

2m 11.3003.10

Université de Montréal

**ACTIVATION NORADRÉNERGIQUE DU COUPLAGE AUX
PROTÉINES G DANS LA MOELLE ÉPINIÈRE DU RAT**

par

Zineb Ghali

Département de physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de Maître (maîtrise, M.Sc) en sciences
neurologiques

Août 2002

©Zineb Ghali, 2002



W
4
U58
2002
v.112

King Fahd

Department of Psychology

Faculty of Medicine

résumé présenté à la conférence internationale sur la psychologie

à l'occasion du centenaire de la fondation de l'Université de la Méditerranée

Alger, Algérie

2002

2002



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**ACTIVATION NORADRÉNERGIQUE DU COUPLAGE AUX
PROTÉINES G DANS LA MOELLE ÉPINIÈRE DU RAT**

Présenté par

Zineb Ghali

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Vincent Castellucci
président-rapporteur

Laurent Descarries
successeur-directeur

Trevor Drew
membre du jury

Mémoire accepté le :

Sommaire

La distribution des terminaisons à noradrénaline (NA) et des récepteurs adrénergiques dans la moelle épinière du rat suggère que cette afférence, issue du tronc cérébral, contribue au contrôle des fonctions somatosensorielles, autonomiques et motrices. Afin de déterminer l'efficacité de couplage aux protéines G des récepteurs adrénergiques de la moelle, nous avons utilisé la méthode d'autoradiographie du [³⁵S]GTP γ S après activation par la NA elle-même, la NA en présence de l'antagoniste alpha non sélectif, phentolamine, et deux agonistes alpha2 spécifiques : la clonidine et le guanabenz. Même sans activation pharmacologique, une incorporation significative du [³⁵S]GTP γ S est observée dans toute la substance grise, aux trois niveaux segmentaires examinés (cervical, thoracique et lombaire), dont l'intensité est particulièrement élevée dans les couches superficielles de la corne dorsale (lames II-III). Sous l'action de la NA, l'incorporation du [³⁵S]GTP γ S est fortement mais uniformément augmentée dans les diverses régions de la substance grise aux trois niveaux. Une faible activation est également détectée dans la substance blanche. L'activation par la NA en présence de phentolamine est encore significative, mais uniformément diminuée, et dans la substance grise et dans la substance blanche. Les deux agonistes alpha2 apparaissent sans effet par comparaison à l'incorporation endogène.

L'homogénéité de distribution de l'incorporation du [³⁵S]GTP γ S stimulée par la NA et son blocage partiel par la phentolamine montrent qu'il existe des récepteurs adrénergiques alpha et bêta dans toute la matière grise, et aussi, en moindre densité, dans la substance blanche. Une telle distribution de l'efficacité de couplage aux protéines G des deux familles de récepteurs adrénergiques semble en accord avec celle de l'innervation NA. Elle est compatible avec les divers rôles fonctionnels attribués à la NA dans la moelle épinière. L'absence d'effet notable des agonistes alpha2 soulève la possibilité que l'activation du couplage aux protéines G par des récepteurs presque exclusivement localisés sur les terminaisons nerveuses soit quantitativement insuffisante pour être détectée par la méthode autoradiographique du [³⁵S]GTP γ S.

Mots-clés: noradrénaline, récepteurs adrénergiques, protéine-G, autoradiographie, moelle épinière.

Summary

The distribution of noradrenaline (NA) axon terminals and of adrenergic receptors in the rat spinal cord suggests that this input, issued from the brainstem, participates in the control of somatosensory, autonomic and motor functions. To assess the G-protein coupling efficacy of the adrenergic receptors in the cord, we used the [³⁵S]GTP_γS autoradiographic method following activation by NA itself, NA in presence of the non specific alpha antagonist phentolamine, and two specific alpha₂ agonists: clonidine and guanabenz. Even without pharmacological activation, a significant incorporation of [³⁵S]GTP_γS is observed throughout the grey matter at the three segmental levels examined (cervical, thoracic and lumbar), that is particularly intense in the superficial layers of the dorsal horn (lamina II-III). Under the action of NA, the incorporation of [³⁵S]GTP_γS is strongly but uniformly increased in the various layers of the grey matter at the three levels. A weak activation is also noticeable in the white matter. The activation by NA in presence of phentolamine is also significant, but uniformly diminished in both the gray and the white matter. The two alpha₂ agonists are without apparent effect by comparison with the endogenous incorporation.

The homogenous distribution of the [³⁵S]GTP_γS incorporation stimulated by NA and its partial blockade by phentolamine indicates the presence of alpha and beta adrenoceptors throughout the spinal cord grey matter, and also, in lesser density, in the white matter. Such a distribution of the efficacy of coupling to G-proteins of both families of adrenergic receptors is in keeping with that of the NA innervation. It is consistent with the functional roles imparted to NA in the spinal cord. The apparent lack of effect of the two alpha₂ agonists raises the possibility that the activation of G-protein coupling by receptors mostly located on axon terminals is not quantitatively sufficient to be detected by the autoradiographic [³⁵S]GTP_γS method.

Key-words: noradrenaline, adrenergic receptors, G-protein, autoradiography, spinal cord.

Table des matières

Sommaire.....	iii
Summary.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures et tableau.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	ix
Dédicace.....	x
Chapitre 1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Innervation à noradrénaline de la moelle épinière.....	2
1.1.1 Origine et distribution.....	2
1.1.2 Ultrastructure.....	5
1.2 Les récepteurs noradrénergiques de la moelle épinière.....	6
1.2.1 Caractérisation.....	6
1.2.2 Les sous-types alpha1.....	7
1.2.3 Les sous-types alpha2.....	8
1.2.4 Les sous-types bêta.....	8
1.3 Localisation des récepteurs alpha dans la moelle épinière.....	9
1.4 Localisation des récepteurs bêta dans la moelle épinière.....	11
1.5 Signalisation par les récepteurs adrénérgiques.....	12
1.6 Rôles physiologiques.....	13
1.6.1 Nociception.....	13
1.6.2 Régulation autonome.....	15
1.6.3 Motricité.....	16
1.7 Problématique.....	17

Chapitre 2. MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	20
2.1 Produits chimiques.....	21
2.2 Animaux.....	21
2.3 Autoradiographie du [³⁵S]GTP_γS.....	22
2.4 Analyse des résultats et statistiques.....	23
Chapitre 3. RÉSULTATS.....	25
3.1 Activité basale.....	26
3.2 Activation de l'incorporation du [³⁵S]GTP_γS par la noradrénaline.....	26
3.3 Réduction de l'activation noradrénergique par la phentolamine.....	26
3.4 Absence d'activation par les agonistes alpha2.....	27
Chapitre 4. DISCUSSION.....	32
4.1 Considérations méthodologiques.....	33
4.2 Hétérogénéité de l'incorporation endogène du [³⁵S]GTP_γS....	34
4.3 Activation de l'incorporation du [³⁵S]GTP_γS par la noradrénaline.....	35
4.4 Réduction de l'activation noradrénergique par la phentolamine.....	37
4.5 Absence d'effet de la clonidine et du guanabenz.....	38
4.6 En guise de conclusion.....	39
Chapitre 5. BIBLIOGRAPHIE.....	41

Liste des figures et tableaux

- Figure 1 :** Voies descendantes et innervation à noradrénaline de la moelle épinière du rat (selon Björklund et Lindvall, 1986).....4
- Figure 2 :** Autoradiographie de l'incorporation du [³⁵S]GTP_γS à trois niveaux segmentaires de la moelle épinière du rat : cervical, thoracique et lombaire.....28
- Tableau 1 :** Localisation des récepteurs adrénergiques dans la moelle épinière du rat.....11a
- Tableau 2 :** Activation noradrénergique de l'incorporation du [³⁵S]GTP_γS.....30

Liste des abréviations

5-HT : 5-hydroxytryptamine (sérotonine)

9-AAP : 9-amino-acridin propanolol

[³⁵S]GTP_γS : guanosine 5'-O-(γ-[³⁵S]thio)triphosphate

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARC 239 : 2-[2,4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]ethyl-4,4-dimethyl-1,3-(2H,4H)-isoquinolindione

ARNm : acide ribonucléique messenger

B-HT 920 : 6-allyl-2-amino-5,6,7,8-tetrahydro-4H-thiazolo-azepine[4,5-d]-azepine

CGP 20712 : 1-[2-((3-carbamoyl-4-hydroxy)phenoxy)ethylamino]-3-[4-(1-methyl-4-trifluoromethyl-2-imidazolyl)phenoxy]-2-propanol

DBH : dopamine-β-hydroxylase

ICI 118,551 : erythro(±)1-[(7-methylindane-4-yl)-oxy]-3-isopropylamino-2-butanol

GABA : acide gamma-aminobutyrique

NA : noradrénaline

Ro 363 : 1-(3,4-dihydroxyphenoxy)-3-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethylamino]-2-propanol

UK-14304 : 5-bromo-6-(2-imidazolyl-2-yl-amino)-quinoxaline

WB-4101 : 2(N[2,6-dimethoxyphenoxyethyl]) amino-methyl-1,4-benzodioxane

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon mari Réda Laamari pour son soutien émotionnel durant des épreuves difficiles lors de ma maîtrise.

Je tiens aussi à remercier les membres du jury de bien vouloir évaluer ce mémoire de Maîtrise.

Je remercie également mon directeur de recherche le docteur Tomás A. Reader pour la confiance qu'il m'a témoigné en m'accueillant dans son laboratoire. Disponible en tout temps, il a su m'éclairer de ses connaissances et de ses nombreux conseils tout au long de cette recherche.

Je remercie le docteur Vincent Castellucci pour m'avoir référé au docteur Laurent Descarries.

Je voudrais aussi remercier le docteur Laurent Descarries pour m'avoir pris en charge pour la rédaction de mon mémoire après le décès du docteur Tomás A. Reader. Ses qualités scientifiques, son support indispensable et sa patience, m'ont beaucoup apporté. Il est pour moi une grande source d'inspiration.

Des remerciements aussi à mon amie Valérie Lapointe pour son support moral et son aide à la finalisation de mon mémoire.

Reste à remercier le docteur Serge Rossignol, lequel a été très patient et compréhensif. Enfin, Jacques Sénécal (technicien de recherche) et Claude Gauthier (Graphiste). Bien sûr je souhaite aussi remercier infiniment notre secrétaire Joanne Payette qui fait beaucoup pour les étudiants.

A Tom,

Chapitre 1. INTRODUCTION

1.1 Innervation à noradrénaline de la moelle épinière

1.1.1 Origine et distribution

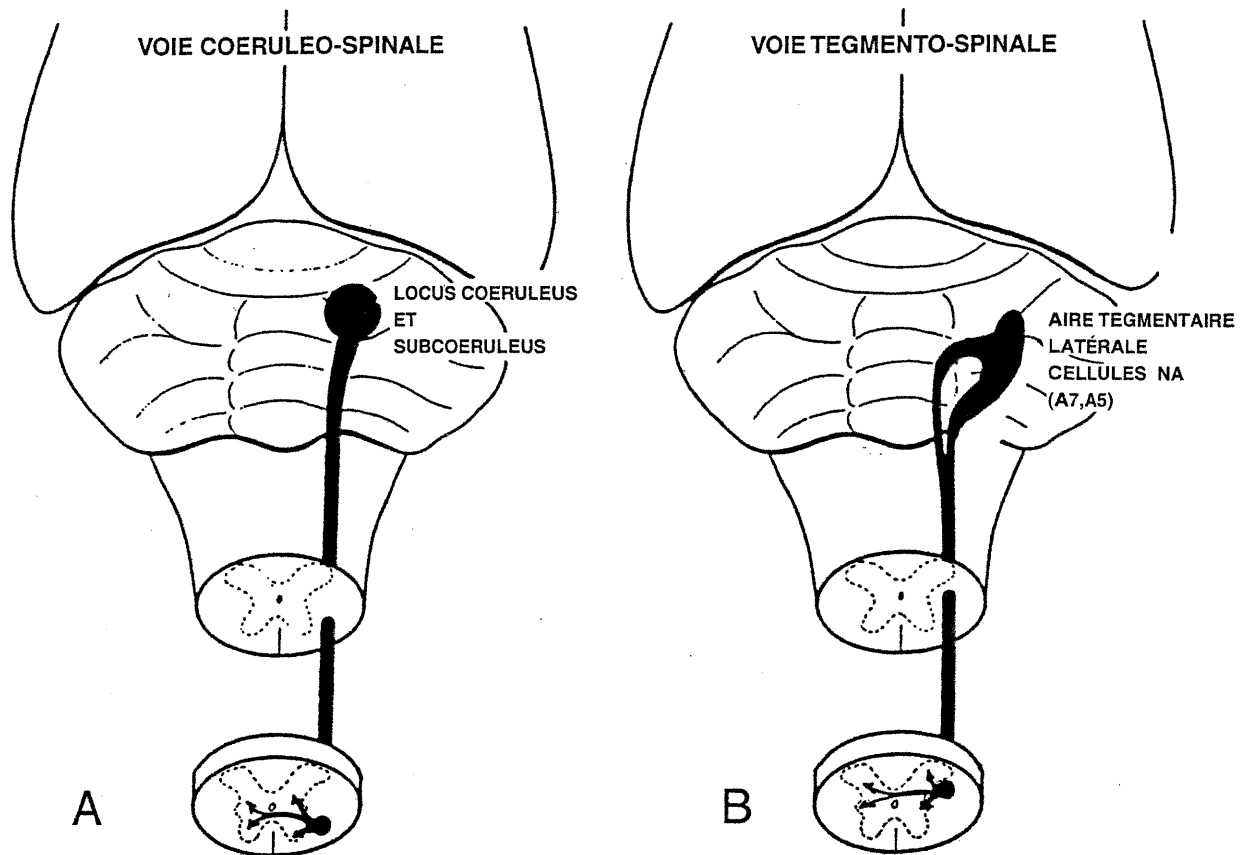
Les groupes de neurones à noradrénaline (NA) du système nerveux central (A1-A7, selon la nomenclature suédoise) sont tous situés dans le bulbe et la protubérance du tronc cérébral (Dahlström et Fuxe, 1964). Des études utilisant le transport rétrograde d'un anticorps dirigé contre la dopamine-beta-hydroxylase (DBH), l'enzyme de biosynthèse de la NA, ont permis de localiser les cellules d'origine de ces voies descendantes vers la moelle épinière chez le rat (Weslund et al., 1981). Par suite d'injection de l'anticorps dans divers segments de la moelle, les corps cellulaires d'origine ont été visualisés dans le locus coeruleus, le noyau subcoeruleus, les noyaux parabrachial médian et latéral, le noyau de Kolliker-Fuse et la région dorsale et latérale du noyau de l'olive supérieure, c'est-à-dire les groupes noradrénergiques A5-A7. Aucune cellule n'a été détectée dans les groupes noradrénergiques plus caudaux (A1-A4), indiquant que toutes les afférences à NA de la moelle épinière proviennent de la protubérance (Weslund et al., 1981). La NA de la moelle épinière provient exclusivement de ces projections descendantes. En effet, par suite de section de la moelle, les catécholamines dopamine et NA disparaissent entièrement caudalement à la section (Carlsson et al., 1964), excluant la présence de corps cellulaires neuronaux à NA dans la moelle épinière elle-même (pour revue, voir Björklund et Skagerberg, 1982).

Chez le rat, divers travaux ont permis de préciser la distribution de l'innervation noradrénergique dans la matière grise de la moelle (Figure 1). Les études en histochimie de fluorescence avaient montré que les axones

issus du locus coeruleus (A6) et du subcoeruleus cheminaient ipsilatéralement dans le cordon ventrolatéral (Fig. 1A) pour innerver la partie ventrale de la corne dorsale et la région intermédiaire à tous les niveaux de la moelle, alors que les noyaux Kölliker-Fuse, A5 et A7 (cellules tegmentales latérales) et quelques cellules du groupes A1, se projetaient via le cordon dorsolatéral ipsilatéral sur la corne dorsale, la région intermédiaire et la corne intermédiolatérale (Fig. 1B) (Björklund et Skagerberg, 1982). Les arborisations et terminaisons (varicosités) axonales marquées avec l'anticorps anti-DBH ont été retrouvées dans toute la matière grise, avec une prédilection pour la couche marginale (lame I) de la corne dorsale, la corne intermédiolatérale des segments thoracique et sacré et la corne ventrale (parmi les motoneurones) (Westlund et al., 1983; voir aussi Rajaofetra, 1992). Par contre, d'autres expériences conjugant un traçage axonal antérograde avec la leucoagglutinine *Phaseolus vulgaris* à l'immunocytochimie de la DBH ont mené à la conclusion que les neurones du locus coeruleus (A6) se projetaient principalement sur la corne dorsale (lames I et II) et la corne intermédiolatérale, alors que les neurones des groupes A5 et A7 se projetaient sur les motoneurones somatiques et les cellules de la colonne intermédiolatérale (Fritschy et Grzanna, 1992).

Figure 1

**VOIES DESCENDANTES ET INNERVATION À NORADRÉNALINE
DE LA MOELLE ÉPINIÈRE DU RAT (selon Björklund et Lindvall, 1986)**



A. Les axones noradrénergiques issus du complexe coeruleus-subcoeruleus (A6) descendent ipsilatéralement dans les cordons ventral and ventrolateral pour s'arboriser dans la corne ventrale, la région intermédiaire et la partie ventrale de la corne dorsale, bilatéralement.

B. Les axones issus des groupes noradrénergiques A5 et A7 de la protubérance descendent ipsilatéralement dans le cordon dorsolatéral pour se terminer dans la corne intermédiolatérale, autour du canal épendymaire et dans les couches superficielles de la corne dorsale.

1.1.2 Ultrastructure

En 1990, une première étude en microscopie électronique de terminaisons (varicosités) axonales immunoréactives pour la DBH a été effectuée dans la corne dorsale de la moelle épinière du rat (Hagihira et al., 1990). Selon ces auteurs, les varicosités marquées étaient particulièrement nombreuses dans les couches I et II, contenaient de nombreuses petites vésicules claires et quelques vésicules granulaires, et plus de la moitié de leurs sections fines montraient des contacts synaptiques avec d'autres éléments neuronaux (mais non sur les afférences primaires). Une majorité (69%) des cibles synaptiques de ces varicosités étaient de petites dendrites et 28% des épines, suggérant que la NA agisse principalement sur les neurones de la corne dorsale via un mécanisme postsynaptique.

Quelques années plus tard, Rajaofetra et al. (1992) ont utilisé l'immunocytochimie avec des anticorps dirigés contre la NA elle-même pour effectuer une étude ultrastructurale plus systématique et détaillée des terminaisons axonales (varicosités) NA à divers niveaux segmentaires de la moelle épinière du rat. Cette analyse a permis de déterminer la véritable proportion de ces varicosités qui étaient dotées ou non de jonctions membranaires synaptiques. Dans la corne dorsale, à tous les niveaux, l'innervation NA est apparue largement non synaptique (75%), laissant supposer que la modulation noradrénergique des fonctions nociceptives dépend d'une transmission diffuse (volumique). Dans la corne intermédiolatérale et la corne ventrale, les proportions de varicosités NA jonctionnelles sont apparues plus élevées (87% et 85%), et ces synapses pour

la plupart formées sur des dendrites et très rarement des corps cellulaires neuronaux.

1.2 Les récepteurs noradrénergiques de la moelle épinière

1.2.1 Caractérisation

Les récepteurs noradrénergiques (adrénocepteurs) ont été initialement classifiés en deux familles, alpha et bêta, puis pharmacologiquement caractérisés et subdivisés en sous-types α_1 , α_2 , β_1 et β_2 , selon leur affinité respective pour les agonistes et antagonistes (Lands et al., 1967; Strake et Langer, 1979). La caractérisation des récepteurs alpha a débuté dans les années 1960, avec la découverte que des antagonistes adrénérgiques déclenchaient une libération de NA par les terminaisons sympathiques du système nerveux autonome. La meilleure explication de cet effet était un blocage d'autorécepteurs présynaptiques médiant normalement une action inhibitrice de la NA sur sa propre libération. Par la suite, d'autres études ont montré l'existence de récepteurs alpha-adrénergiques postsynaptiques, dont les caractéristiques pharmacologiques étaient différentes, et proposé la distinction entre récepteurs de type alpha1, postsynaptiques, et autorécepteurs de type alpha2, présynaptiques. Quelques années plus tard, des récepteurs du type alpha2 ont pu être localisés en postsynaptique, qui déclenchent des réponses excitatrices dans les muscles lisses du rat et du chat (Ruffolo et Hieble, 1994). Ces observations ont conduit à l'abandon de la classification des récepteurs alpha fondée uniquement sur leur localisation pré- ou postsynaptique et son remplacement par une classification pharmacologique et biomoléculaire (voir ci-dessous).

Pour ce qui est des récepteurs bêta, leur subdivision en sous-types β_1 et β_2 , initialement proposée par Lands et collègues (1967), a longtemps reposé sur le potentiel de certains composés sympathomimétiques à induire différentes réponses physiologiques. Ici encore, cependant, les données de la pharmacologie et de la biologie moléculaire ont conduit à une reclassification (voir ci-dessous).

1.2.2 Les sous-types alpha1

Les récepteurs alpha1 sont caractérisés pharmacologiquement par leur haute affinité pour les agonistes phényléphrine, méthoxamine et cirazoline, et les antagonistes WB-4101, prazosin, phénoxybenzamine et corynanthine (Ruffolo et al, 1991). Les études biomoléculaires et de radiolisation ont permis d'identifier plusieurs sous-types d'adrénocepteurs alpha1, tous dotés d'une forte affinité pour le prazosin, mais dont l'ordre d'affinité différait pour les autres antagonistes. Une première classification en sous-types α_{1A} et α_{1B} a été fondée sur l'affinité relative pour l'antagoniste compétitif WB 4101 et l'agent alkylant du site, chloroethylclonidine (Johnson et Minneman, 1987). Après isolation de trois ADNc et du clonage des protéines alpha1, quatre sous-types ont été désignés α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} et α_{1D} (pour revue, voir Ruffolo et al., 1994).

1.2.3. Les sous-types alpha2

Les récepteurs alpha2 sont activés par l' α -méthyl-norépinéphrine, la clonidine, le B-HT 920, l'UK-14.304, et bloqués par les antagonistes yohimbine, rauwolscine et idaxozane. La sous-classification de ces adrénoccepteurs a reposé initialement sur la capacité ou non du prazosin à inhiber le marquage par la [3 H]yohimbine ou [3 H]rauwolscine dans des

homogénats provenant d'une variété de tissus isolés ou de cultures de lignées cellulaires (Petrash et Bylund, 1986). Le prazosin et un autre antagoniste α_1 , l'ARC 239, ont une haute affinité pour le sous-type récepteuriel α_2 désigné comme α_{2B} , et peu d'affinité pour un sous-type α_{2A} . Deux autres sous-types α_2 , α_{2C} et α_{2D} , ont également été décrits, en fonction de l'affinité avec laquelle le prazosin inhibe le marquage par la [3 H]rauwolscine dans d'autres préparations et lignées cellulaire (Bylund et al. 1994).

1.2.4 Les sous-types bêta

Tous les adrénoccepteurs bêta identifiés par les études pharmacologiques sont aujourd'hui clonés. Le sous-type β_1 est activé par les agonistes sélectifs denopamine, Ro 363 et xamoterol, et ses antagonistes sélectifs sont le métoprolol, practolol, atenolol, betaxolol et le CGP 20712A (Dooley et al. 1986). Le sous-type β_2 est activé par les agonistes terbutaline, salbutamol, salmeterol, et zinterol, et bloqué par la butoxamine et le ICI 118,551 (O'Donnell and Wanstall, 1980). L'ADNc des adrénoccepteurs β_1 et β_2 a été obtenu à partir d'une variété de tissus du dindon, du hamster, de la souris, du rat et de l'humain. Un adrénoccepteur β_3 propre à l'humain a également été cloné. Les caractéristiques pharmacologiques des récepteurs recombinants correspondent bien à celles des tissus d'origine, sauf dans le cas de cet adrénoccepteur β_3 (Bylund et al. 1994).

1.3 Localisation des récepteurs alpha dans la moelle épinière

Chez le rat, les études autoradiographiques de la radioliation du prazosin ont montré une distribution relativement homogène des récepteurs alpha1 dans les différentes lames des divers segments de la moelle épinière, avec une densité accrue au pourtour du canal central et légèrement plus faible dans la corne dorsale (Roudet et al., 1993). La densité des récepteurs alpha2 mesurée avec la [³H]rauwolscine est apparue la plus forte dans les lames superficielles de la corne dorsale et la plus faible dans la corne ventrale (lamina IX) (Roudet et al, 1994). Une étude récente visant à discriminer entre les sous-types α_{2A} et α_{2C} à l'aide de nouveaux ligands a révélé une prédominance des sites de radioliation α_{2A} dans les couches superficielles de la corne dorsale (Uhlen et al., 1997). Chez le chat, des sites alpha1 marqués par le [³H]prazosin ont été retrouvés en grand nombre dans les lamina II, III et IX ainsi que la lamina X (Giroux et al, 1999), alors que le marquage des récepteurs alpha2 avec le [³H]idaxozan s'est avéré le plus dense dans les lamina II, III et X (région du canal central) (Giroux et al, 1999). La présence de sites de radioliation alpha1 mais non alpha2 dans la corne ventrale (lamina IX) des deux espèces laisse croire que les récepteurs alpha1 ont un rôle important à jouer dans le contrôle de l'excitabilité motoneuronale, alors que la prédominance des sites alpha2 dans les couches superficielles de la corne dorsale suggère un rôle prédominant dans la modulation de l'information nociceptive.

Divers laboratoires ont eu recours à l'amplification par la transcriptase inverse, l'hybridation in situ et/ou l'immunocytochimie pour préciser la distribution des divers sous-types d'adréno-récepteurs alpha dans la moelle

épinière et le lieu d'origine de ses afférences somatosensorielles primaires, le ganglion de la racine dorsale. Une étude d'hybridation in situ avec des sondes dirigées contre divers sous-types alpha1 ($_{1A/D}$ et $_{1B}$) a révélé une expression peu abondante et uniforme de ces mRNA dans la substance grise de la moelle du rat, sauf pour un marquage préférentiel de la corne intermédiolatérale avec la sonde dirigée contre le sous type $_{1B}$ (Pieribone et al., 1994).

Une première étude d'hybridation in situ, effectuée avec des sondes dirigées contre les trois sous-types récepteuriel alpha2, a montré la présence de l'ARNm du sous-type α_{2A} dans la corne intermédiolatérale de la moelle thoracique (Nicholas et al., 1993a). L'ARNm du sous-type α_{2B} est alors apparu peu abondant tandis que celui du α_{2C} a été détecté dans le ganglion de la racine dorsale. Une étude plus récente utilisant l'amplification par la transcriptase inverse a montré la présence des trois sous-types de ARNm dans le ganglion de la racine dorsale, mais des sous-types α_{2B} et α_{2C} seulement par hybridation in situ, lors même que l'immunocytochimie permettait d'y visualiser la protéine du sous-type α_{2A} (Gold et al., 1997). En tenant compte de la répartition cellulaire des signaux d'ARN, ces auteurs ont suggéré la coexistence probable des trois sous-types α_2 dans les mêmes neurones ganglionnaires.

En immunocytochimie, le sous type α_{2A} a d'abord été visualisé dans les lames superficielles de la corne dorsale (Rosin et al., 1993). Une autre étude, effectuée avec des anticorps dirigés sélectivement contre les récepteurs α_{2A} ou α_{2C} a permis de démontrer la présence du sous-type α_{2A} sur les terminaisons des afférences primaires sensibles à la capsaïcine et contenant la substance P,

alors que la majorité des récepteurs α_{2C} est apparue localisée à une sous-population de neurones contenant l'enképhaline (Stone et al., 1998). Paradoxalement, ni l'un ni l'autre sous-type n'a alors été visualisé sur les terminaisons noradrénergiques. Il faut également noter, qu'en immunocytochimie, le sous-type récepteuriel α_{2C} avait été entre-temps détecté dans les corps cellulaires de la corne ventrale (Rosin et al., 1996).

1.4 Localisation des récepteurs bêta dans la moelle épinière

Un analogue fluorescent du propranolol (antagoniste bêta), le 9-AAP, a permis, il y a plus de vingt-cinq ans déjà, d'observer et de localiser les récepteurs bêta dans la moelle épinière du rat (Melamed et al., 1976). Le 9-AAP fluorescent est apparu distribué dans toute la matière grise, à tous les niveaux de la moelle épinière. La plus haute intensité de fluorescence a été détectée dans la corne ventrale, principalement dans les régions contenant les corps cellulaires des motoneurones α . Quelques années plus tard, l'autoradiographie d'antagonistes bêta, comme le [^3H]dihydroalprenolol et le [^3H]carazolol, effectuée sur des cultures ou des coupes de la moelle épinière du rat, a montré la présence d'une forte densité de sites de liaison sur les corps cellulaires et dendrites des motoneurones (Hösli et Hösli, 1982). Ces auteurs ont également rapporté que la [^3H]NA se lie à de nombreux neurones de grande taille et quelques neurones de taille moyenne répartis dans toute la substance grise (Hösli et Hösli, 1982). Par la suite, Patterson et Hanley (1987) ont décrit un fort marquage de la corne dorsale et notamment des terminaisons des fibres afférentes sensibles à la capsaïcine avec le ligand bêta non sélectif [^3H]dihydroalprenolol.

Tableau 1

**LOCALISATION DES RECEPTEURS NORADRENERGIQUES
DANS LA MOELLE EPINIERE DU RAT**

		Sous-types alpha 1			Sous-types alpha 2			Sous-types bêta	
		$\alpha_{1A/D}$	α_{1B}	α_{1C}	α_{2A}	α_{2B}	α_{2C}	β_1	β_2
Corne dorsale	Radioliation	+	+	+	++	++	+	++	+
	Immunocytochimie				++				
	Hybridation in situ						+		
Corne intermédio-latérale	Radioliation	+						++	+
	Immunocytochimie								
	Hybridation in situ		+		++	+		+	
Corne ventrale	Radioliation	++			+	+	+	++	+
	Immunocytochimie						++		
	Hybridation in situ								

Voir section 1.4 pour une description détaillée et les références bibliographiques. + et ++ indiquent la simple présence (+) ou la mention d'une densité notable (++) de récepteurs.

Des données de radioliation ont été obtenues par Schrader et Grobecker (1989) sur la densité respective des sous-types β_1 et β_2 marqués par le [^3H]dihydroalprenolol en présence de ligands froids sélectifs, dans les divers segments de la moelle épinière du rat adulte. Cette étude a montré une prédominance des sites de liaison β_1 (70%), comparativement aux β_2 (30%), et une répartition relativement uniforme des deux sous-types aux trois niveaux segmentaires, cervical, thoracique et lombaire. Lors d'une étude ultérieure en hybridation in situ, Nicholas et al. (1993b) ont pu montrer la présence de l'ARNm du sous-type récepteuriel β_1 dans la matière grise intermédiaire de la moelle épinière du rat.

1.5 Signalisation par les récepteurs adrénergiques

Les récepteurs adrénergiques sont tous couplés aux protéines G. Les systèmes de seconds messagers impliqués dans les réponses médiées par les récepteurs alpha ont été revus par Ruffolo et collègues (1994). Presque tous les effets α_1 , qui sont, nous l'avons vu, des récepteurs postsynaptiques, s'accompagnent d'une augmentation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire. Cette augmentation provient d'une stimulation de l'activité de la phospholipase C via l'activation de la protéine G couplée au récepteur. L'augmentation d'activité de la phospholipase C entraîne la production des seconds messagers inositol triphosphate (IP $_3$) et diacylglycérol (DAG) via la voie des phosphoinositides (Ruffolo et al. 1994). Les récepteurs α_2 , majoritairement pré-synaptiques et impliqués dans le contrôle de la synthèse et de la libération de la noradrénaline, sont, quant à eux, couplés négativement à l'adénylyl cyclase, laquelle permet la synthèse du second messenger AMPc. Ils inhibent son action via l'activation d'une protéine G_i .

Tous les sous-types bêta adrénrgiques activent l'adénylyl cyclase, et donc la production d'AMPc, via une protéine G stimulatrice (Tale et al. 1991). On n'a pas observé jusqu'à maintenant de différences d'interaction récepteur-cyclase entre les sous-types de récepteurs bêta.

1.6 Rôles physiologiques

De nombreuses études ont impliqué la NA et ses divers sous-types de récepteurs dans les principales fonctions de la moelle épinière : somesthésie, régulation autonome et motricité. Nous nous contenterons de présenter ici de l'information récente impliquant ces récepteurs dans leur localisation intra-spinale. On notera que les données sur la somesthésie concernent uniquement la nociception.

1.6.1 Nociception

Une étude déjà ancienne de Dray et Nunan (1987) a montré que des actions supraspinales de la morphine impliquent une activation des récepteurs noradrénrgiques et sérotoninrgiques de la moelle via les voies noradrénrgiques et sérotoninrgiques descendantes. Peu de données suggèrent cependant une implication des récepteurs alpha1 dans la nociception. Un effet pronociceptif a été imputé à cette famille de récepteurs lors de la modulation de la nociception par l'isoflurane, mais il s'agirait alors de récepteurs supraspinaux (Kingery et al., 2002). De même, l'effet antinociceptif du paracétamol (analgésique) serait principalement dû à une activation centrale du système inhibiteur noradrénrgique descendant via ses récepteurs alpha1 (Pinardi et al., 2002). La contribution des récepteurs alpha1 de la moelle à la nociception reste donc à définir.

Des données particulièrement intéressantes ont pu être obtenues au sujet des récepteurs α_{2A} chez la souris, où l'effet antinociceptif des agonistes alpha2, incluant la clonidine et le dexmedetomidine, est bien démontré (Fairbanks et Wilcox, 1999; Stone et al., 1997). Chez la souris mutante α_{2A} -D79N, contrairement aux souris sauvages, les agonistes alpha2 sont complètement inefficaces comme antinociceptifs lors du test d'immersion de la queue ou de l'épreuve de la substance P (Hunter et al., 1997). La mutation α_{2A} -D79N bloque aussi la synergie démontrée chez la souris sauvage entre les agonistes alpha2 et les agonistes delta-opioïdes (Stone et al., 1997). Les souris déficientes en récepteur α_{2A} présentent également des effets antinociceptifs diminués lors de l'administration d'isoflurane (Kingery et al., 2002). Cependant, tous les agonistes des récepteurs alpha2 n'exigent pas de récepteurs α_{2A} fonctionnels pour exercer leur effet antinociceptif. Le moxonidine, ligand des récepteurs alpha2 et des sites à imidazolines, induit une analgésie spinale qui est partiellement dépendante des récepteurs α_{2C} (Fairbanks et al., 2002).

De façon surprenante, l'oxyde nitrique, utilisé comme analgésique à inhaler pendant l'anesthésie, exerce cet effet antinociceptif via le sous-type α_{2B} (Guo et al., 1999 ; Sawamura et al., 2000). Les récepteurs opioïdes supraspinaux et les récepteurs α_{2B} de la moelle épinière seraient impliqués dans l'effet analgésique de l'oxyde nitrique. Une libération d'endorphines dans la substance grise périaqueducule, induite par l'oxyde nitrique, stimulerait la voie noradrénergique descendante capable d'activer les récepteurs α_{2B} dans la corne dorsale de la moelle épinière (Zhang et al., 1999).

En ce qui a trait aux récepteurs bêta, il a été rapporté que, chez la souris, l'effet antinociceptif de l'isoprotérénol, un agoniste adrénergique non sélectif, pouvait être contré par l'administration intrathécale de l'antagoniste bêta adrénergique propanolol (Peng et al., 1993). On ignore cependant lequel des deux sous-types bêta est impliqué dans cet effet.

1.6.2 Régulation autonome

Une participation des récepteurs alpha adrénergiques de la moelle au contrôle cardiovasculaire est bien démontrée, indépendamment de celle de cette famille de récepteurs en périphérie. Ainsi, la clonidine injectée par voie intrathécale induit une diminution de la pression sanguine et du rythme cardiaque, suggérant une implication des récepteurs alpha₂. Cependant, la bradycardie induite par la clonidine est renversée par le prazosin, le WB4101, le piperoxan ou la yohimbine, laissant supposer que les adrénoccepteurs alpha₁ plutôt que alpha₂ contrôlent alors cette réponse (Connor et al., 1981). D'ailleurs, il est maintenant connu que l'activation des récepteurs alpha₁ situés dans la corne intermédiolatérale de la moelle épinière du rat engendre des réponses sympathiques excitatrices (Malhotra et al., 1993b). Ainsi, l'élévation maximale de pression sanguine avec tachycardie provoquée par l'injection intrathécale d'épinéphrine est bloquée par le prazosin. À plus forte dose, cependant, l'injection d'épinéphrine cause une bradycardie, qui serait médiée par le sous-type récepteuriel alpha₂, tel que confirmé par administration locale de clonidine (Malhotra et al., 1993a). De même, Carmen et al., (1996) ont démontré que les effets hypertensifs de l'administration de fortes doses de NA par voie intrathécale impliqueraient l'activation des sous-types α_{1A} - et α_{1B} -adrénergiques (del Carmen et al.,

1996), alors que les réponses hypotensives induites par les catécholamines semblent impliquer les adrénoccepteurs spinaux α_{2A} .

La contribution des récepteurs bêta adrénergiques à la régulation des fonctions autonomiques est démontrée en périphérie, mais reste à établir dans le cas des récepteurs bêta situés dans la moelle épinière.

1.6.3 Motricité

Diverses données ont impliqué les récepteurs adrénergiques de la moelle dans le contrôle moteur, tant chez le rat et le chat intact, que chez l'animal spinalisé (pour revue, voir Rossignol, 1996).

Wada et al. (1997), notamment, ont pu déterminer le sous-type récepteuriel α_1 responsable de l'effet facilitateur de la NA sur l'activité des motoneurones α de la moelle épinière du rat. Après avoir testé l'action de plusieurs agonistes et antagonistes catécholaminergiques sur le réflexe de flexion, ces auteurs ont constaté que l'ordre de puissance des agonistes était le même que leur affinité pour les adrénoccepteurs α_{1A} . Ces données sont en accord avec des observations antérieures qui avaient montré que, chez le rat spinalisé, l'agoniste α_2 prototypique clonidine pouvait faciliter le réflexe de flexion via une stimulation des adrénoccepteurs α_1 de la moelle épinière, contrairement à l'inhibition de ce réflexe qu'elle induit chez le rat intact (Kehne et al., 1985).

Des études déjà anciennes, chez le chat spinal, ont indiqué que la clonidine administrée par voie systémique peut déclencher une marche sur tapis roulant dès les premiers jours après une section complète de la moelle, suggérant ainsi que des effets moteurs de la NA pouvaient être attribués aux récepteurs α_2 adrénergiques de la moelle (Forssberg et Grillner, 1973).

Des travaux plus récents, ayant recours à l'administration intrathécale chez le chat spinal, ont confirmé que la clonidine, de même que divers agonistes α_2 , tels la tizanidine et l'oxymétazoline, pouvaient exercer cet effet (Chau et al., 1998). Ces auteurs ont également mis en évidence un effet de la méthoxamine, un agoniste α_1 , même si la marche était alors moins soutenue (moins de 10 cycles à la suite) et de vitesse réduite (Chau et al., 1998).

Une étude récente laisse croire que des récepteurs bêta adrénergiques (β_1) puissent médier un effet activateur sur la locomotion chez le rat intact (Kaur et Ahlenius, 2000). Il faut néanmoins souligner que, dans ce modèle comportement, les agents pharmacologiques ont été administrés par voie systémique, ce qui n'autorise pas de conclusion quant à la localisation spinale des récepteurs impliqués.

1.7 Problématique

Au cours des années récentes, il est devenu possible de localiser et d'évaluer le couplage des récepteurs aux protéines G, grâce à la méthode autoradiographique du $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$. Cette méthode permet de visualiser le couplage et de mesurer l'efficacité des récepteurs à l'induire, grâce à une mise en évidence de l'incorporation du $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ lors de l'activation du récepteur par un agoniste (Sim et al. 1995, 1996). Les expériences nécessitent une préincubation des tissus en présence d'un excès de GDP, de manière à faire pencher l'équilibre vers l'état inactif des protéines G jusqu'à l'ajout de l'agoniste. L'agoniste est ensuite introduit pour activer le récepteur et stimuler son couplage à une ou plusieurs protéines G, en présence d'un analogue radioactif, non hydrolysable, du GTP, le $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$.

L'activation du récepteur par l'agoniste a pour effet de diminuer l'affinité de la sous-unité $G\alpha$ des protéines G pour le GDP et d'augmenter ainsi leur affinité pour le GTP. Les protéines G fixent alors le GTP ou le [^{35}S]GTP γ S exogène. *In vivo*, la sous-unité $G\alpha$, qui joue un rôle de GTPase, hydrolyserait alors le GTP. Mais *in vitro*, l'analogue du GTP, le [^{35}S]GTP γ S résiste à l'hydrolyse et reste fixé à la sous unité $G\alpha$. En conséquence, l'augmentation de l'incorporation de [^{35}S]GTP γ S induite par l'agoniste est proportionnelle au couplage du récepteur aux protéines G et traduit son efficacité.

En l'absence de toute donnée antérieure sur le sujet et tenant compte de l'état actuel des connaissances sur la distribution et les rôles présumés de la NA et des récepteurs adrénergiques dans la moelle épinière, il nous est apparu intéressant d'examiner cette nouvelle dimension de leurs mode d'action. Nous avons donc eu recours à l'autoradiographie du [^{35}S]GTP γ S pour, dans un premier temps, localiser et mesurer le couplage aux protéines G dans la moelle lors d'une activation de l'ensemble des récepteurs adrénergiques par la NA elle-même. Ensuite, nous avons voulu savoir dans quelle mesure le blocage des récepteurs adrénergiques par un antagoniste alpha non sélectif affecterait l'activation induite par la NA, de manière à localiser et mesurer de possibles effets bêta adrénergiques. Enfin, nous avons cherché à déterminer si une composante de l'activation observée sous l'action de la NA pouvait être imputée au sous-type alpha2, grâce à l'utilisation d'agonistes spécifiques de cette famille de récepteurs adrénergiques.

En raison du pouvoir de résolution de la méthode autoradiographique, nous avons tenu à examiner distinctement, au cours de ce travail, les

différentes couches de la substance grise à trois niveaux segmentaires de la moelle : cervical, thoracique et lombaire. Il devenait ainsi possible de corréler plus étroitement les résultats concernant l'efficacité de couplage aux protéines G aux données sur la distribution de l'innervation NA et de ses récepteurs.

Chapitre 2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 Produits chimiques

Le 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine(DPCPX), la L(-)noradrénaline HCl, la phentolamine mésylate, la clonidine HCl, le guanabenz acétate [D-Ala²,N-Me-Phe⁴, la guanosine 5'-diphosphate (GDP) et la guanosine 5'-O-3-thiophosphate (GTP γ S) ont été achetés chez Sigma Chemical (St-Louis, MO), et le [³⁵S]GTP γ S (activité spécifique 1 100-1 200 Ci/mmol) chez NEN / DuPont (Boston, MA).

2.2 Animaux

L'étude a été réalisée sur des rats adultes mâles, Sprague-Dawley (Charles River, St-Constant, QC) de 250-300 g. L'expérimentation s'est déroulée conformément aux règles du Conseil Canadien pour la Protection des Animaux et selon des protocoles approuvés par le Comité de déontologie pour l'expérimentation sur les animaux de l'Université de Montréal.

Environ la moitié des animaux ont été soumis à un entraînement sur tapis roulant (Letica Scientific Instruments, Barcelone), pour des périodes de 30 minutes par jour, 6 jours par semaine, durant 4 semaines, à la vitesse de 30 cm /seconde. Durant ces périodes, des chocs électriques d'intensité modérée (0.6 mA) ont été appliqués à travers une grille de métal pour inciter les rats à la course. Les rats témoins ont été manipulés et placés sur le tapis arrêté pendant 10 minutes par jour, 6 jours par semaine, durant le même mois que les coureurs.

A la fin du mois d'entraînement, les rats des deux groupes ont été sacrifiés par décapitation et leur moelle épinière rapidement prélevée et divisée en 3 segments - cervical, thoracique et lombaire. Ces échantillons

ont été congelés par immersion (15-20 sec) dans le *N*-methyl-2-butane refroidi à - 40°C avec de l'azote liquide et stockés à -80°C.

2.3 Autoradiographie du [³⁵S]GTP γ S

Chaque segment de moelle épinière a été débité en coupes transverses séries de 20 μ m d'épaisseurs à l'aide d'un cryostat. Les coupes ont été montées sur des lames recouvertes de gélatine (0.2% gélatine / 0.033% sulfate potassium chromium) ou des lames SuperfrostTM (Fisher Scientific Co.; Montréal, QC) et conservées à -80°C. L'incorporation du [³⁵S]GTP γ S a été mesuré par autoradiographie suivant une méthode bien établie (Sim et al., 1995, 1996; Adlersberg et al., 2000). Les coupes ont d'abord été séchées, rincées une première fois dans le tampon Tris-HCl 50mM (pH 7.4) à 25°C (15 min), puis préincubées (15 min) à 25°C dans une solution du même tampon contenant 100 mM de NaCl, 3mM de MgCl₂, 0.2mM d'EGTA, 10 μ M de DPCPX et 2mM de GDP. Le DPCPX a été ajouté pour bloquer les récepteurs A1 de l'adénosine (Laitinen et Jokinen, 1999), ce qui augmente le rapport signal/bruit de l'incorporation de GTP γ S stimulée par l'agoniste (Moore et al., 2000). Les coupes ont été ensuite incubées en présence de 40 pM de [³⁵S]GTP γ S, avec ou sans une concentration fixe de 300 μ M de noradrénaline ou ses agonistes (clonidine, guanabenz), pendant 120 min à 25°C, dans la même solution tamponnée. L'effet de la phentolamine sur l'activation par la noradrénaline a été testé en introduisant cet antagoniste (1mM) dans le milieu de pré incubation (Adlersberg et al., 2000). En vue de l'évaluation subséquente du bruit de fond, des coupes ont été incubées en présence de 10 μ M de GTP γ S non radioactif.

Après lavage (2×2 min) dans le tampon Tris-HCl froid et rinçage à l'eau distillée (30 sec), les coupes ont été séchées sous la hôte dans un courant d'air froid. Par la suite, elles ont été placées au contact d'un film MR BiomaxTM (Easrman Kodak Co.; New Haven, CT) dans des cassettes autoradiographiques, en présence de standards [¹⁴C] ([¹⁴C]MicroscalesTM; Amersham; Arlington Heights, IL). Les films ont été exposés pendant 2-3 jours, à 4°C, et révélés dans le GBXTM (Kodak).

2.4 Analyse des résultats et statistiques

Les mesures densitométriques sur film ont été réalisées avec un système d'analyse d'images MCIDTM (Imaging Research, St-Catharines, ON). Du fait de la minceur des différentes couches de la substance grise (Rexed, 1952) et des limites de résolution de l'appareil, les lamina ont été échantillonnées en groupe : II-III (la substance gélatinoza de Rolando), lame IV-V et lame VII-IX (la corne ventrale). Trois ou quatre coupes ont été lues à chaque niveau segmentaire et dans chaque condition, pour un total de 20-100 lectures de densité optique par coupe (et condition). Les courbes de calibration des [¹⁴C]Microscales ont été utilisées pour convertir les valeurs de densité optique en densité de marquage, exprimée en femtomoles par milligramme de protéine (Unnerstall et al. 1982; Reader et Strazielle, 1999). Les valeurs qualifiées de *Basal* ont été obtenues après soustraction du bruit de fond. Les valeurs en condition d'activation ont été calculées en soustrayant le *Basal* et le bruit de fond du marquage total.

Les activations ont été comparées au *Basal* ou entre elles à l'aide d'un test de t de Student. Un test de Bonferroni a été utilisé pour les

comparaisons du marquage *Basal* entre lames à différents niveaux segmentaires ou lames d'un même niveau. (GraphPadTM ; Motulsky, 1995). En l'absence de toute différence significative entre les deux groupes, les valeurs obtenues chez les rats soumis ou non au programme d'exercice ont été agglomérées pour simplifier la présentation.

Chapitre 3. RÉSULTATS

3.1 Activité basale

Tel qu'illustrée en Figure 2 et mesurée au Tableau, l'activité basale, c'est-à-dire l'incorporation du [³⁵S]GTP γ S en l'absence d'agoniste, est plus du double dans les lames II-III de la corne dorsale, que les lames IV-V (région intermédiaire) et les lames VII-IX (corne ventrale), aux trois niveaux segmentaires examinés ($p < 0.001$). Cette activité basale apparaît comparable pour les mêmes lames, entre les trois segments. Aucune activité basale n'est détectée dans la substance blanche.

3.2 Activation de l'incorporation du [³⁵S]GTP γ S par la noradrénaline

La NA stimule fortement l'incorporation du [³⁵S]GTP γ S dans toutes les lames de tous les segments de la matière grise de la moelle épinière ($p < 0.001$ par rapport au basal) (Fig. 2 et Tableau). Les valeurs d'activation (au dessus du basal) en femtomoles par milligramme de protéine varient peu entre les lames d'un même segment et d'un segment à l'autre. On note également une activation (non mesurée) dans la substance blanche (Fig. 2).

3.3 Réduction de l'activation noradrénergique par la phentolamine

L'activation par la NA en présence de phentolamine (antagoniste alpha non sélectif) reste hautement significative par rapport au basal dans toute la substance grise de chaque segment de la moelle (Fig. 2 et Tableau). Elle est cependant moindre qu'avec la NA seule (presque deux fois plus faible), avec des valeurs de nouveau sensiblement équivalentes d'une lame et d'un segment à l'autre (Tableau). On note encore une fois une certaine activation

dans la substance blanche (non mesurée), qui apparaît cependant un peu plus faible qu'avec la NA seule (Fig. 2).

3.4 Absence d'activation par les agonistes alpha2

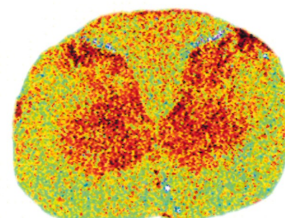
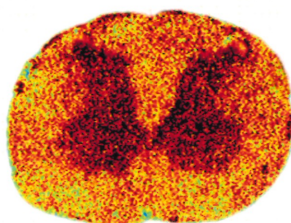
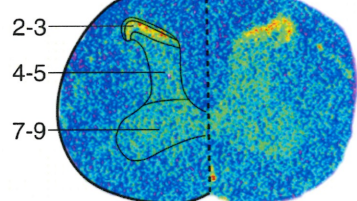
La *clonidine* et le *guanabenz* (deux agonistes alpha2 spécifiques) ont été sans effet apparent sur l'incorporation du [³⁵S]GTPγS (Tableau).

BASAL

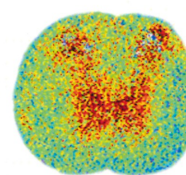
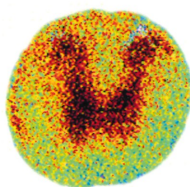
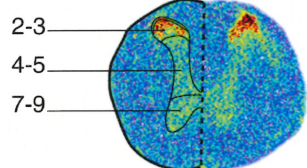
NORADRENALINE

**NORADRENALINE
+PHENTOLAMINE**

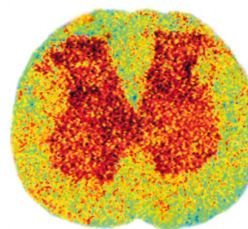
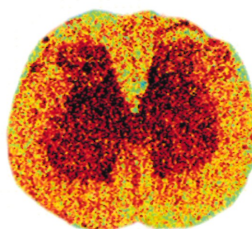
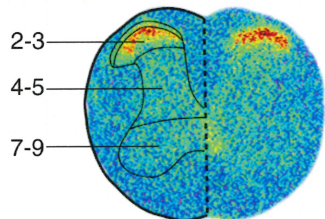
Cervical



Thoracique



Lombaire



f mole/mg p.



Légende de la Figure 2

Autoradiographie de l'incorporation du [³⁵S]GTP γ S à trois niveaux segmentaires de la moelle épinière du rat : cervical (C3), thoracique (T5) et lombaire (L3). Ces images informatisées, représentent la quantité de [³⁵S]GTP γ S incorporée, en femtomole par milligramme de protéines, selon le code couleur de l'échelle standard incluse dans la figure. Les limites des zones d'échantillonnage pour les diverses lames de la substance grise ont été tracées sur un côté des moelles en condition basale (selon Molander et Grant, dans Paxinos 1995). Trois conditions expérimentales sont illustrées : la condition basale, l'activation par la noradrénaline (NA) et l'activation par la NA en présence de l'antagoniste non sélectif des récepteurs alpha adrénergiques, phentolamine. Dans les deux conditions d'activation, les images correspondent aux valeurs obtenues après soustraction de l'incorporation basale (comme dans le Tableau). Noter qu'aux trois niveaux segmentaires : 1) le *Basal* est plus élevé pour les lames II-III que les lames IV-V et VII-IX; 2) l'activation par la NA est plus forte que par la NA + phentolamine, uniforme dans les diverses couches de la substance grise, et détectable, bien que de faible intensité, dans la substance blanche; 3) en présence de phentolamine, l'activation résiduelle par la NA est également uniforme dans la substance grise et détectable, bien que d'intensité maintenant très faible, dans la substance blanche.

Tableau 2

ACTIVATION NORADRENERGIQUE DE L'INCORPORATION DU [³⁵S]GTP-γS

Segment	Basal	Noradrénaline ¹	Noradrénaline + Phentolamine ¹	Clonidine ¹	Guanabenz ¹
<i>CERVICAL</i>					
Lames II-III	1.2 ± 0.14	2.4 ± 0.36 ***	1.2 ± 0.30 *** †	- 0.1 ± 0.13	0.5 ± 0.12
Lames IV-V	0.5 ± 0.06	2.4 ± 0.27 ***	1.5 ± 0.17 *** †	0.0 ± 0.04	0.1 ± 0.02
Lames VII-IX	0.4 ± 0.05	2.5 ± 0.32 ***	1.5 ± 0.17 *** †	0.0 ± 0.01	0.1 ± 0.02
<i>THORACIQUE</i>					
Lames II-III	1.4 ± 0.19	2.2 ± 0.37 ***	1.5 ± 0.15 ***	- 0.1 ± 0.19	0.4 ± 0.13
Lames IV-V	0.6 ± 0.06	2.4 ± 0.27 ***	1.3 ± 0.20 *** ††	- 0.1 ± 0.05	0.1 ± 0.03
Lames VII-IX	0.4 ± 0.04	2.5 ± 0.30 ***	1.5 ± 0.12 *** †	0.0 ± 0.04	0.1 ± 0.03
<i>LOMBAIRE</i>					
Lames II-III	1.8 ± 0.26	1.9 ± 0.19 ***	0.9 ± 0.20 ** ††	- 0.2 ± 0.20	0.5 ± 0.15
Lames IV-V	0.7 ± 0.06	2.2 ± 0.22 ***	1.4 ± 0.15 *** †	- 0.1 ± 0.06	0.0 ± 0.05
Lames VII-IX	0.4 ± 0.04	2.2 ± 0.22 ***	1.4 ± 0.12 *** †	- 0.1 ± 0.04	0.0 ± 0.03

Légende du Tableau 2

Moyennes \pm erreurs standards de la moyenne, en femtomoles/mg de protéine, pour 13-18 rats par groupe, sauf pour Noradrénaline + Phentolamine (9-12 rats). Les valeurs «*Basal* » correspondent au marquage endogène, bruit de fond soustrait. ¹ Les valeurs en condition d'activation (Noradrénaline, Noradrénaline + Phentolamine, Clonidine, Guanabenz) correspondent au marquage au dessus du *Basal*. ** p < 0.01 et *** p < 0.001 indiquent les différences significatives entre le marquage observé et le *Basal*; † p < 0.05, †† p < 0.01 indiquent les différences significatives entre Noradrénaline + Phentolamine et Noradrénaline. Les valeurs par lames ne sont pas significativement différentes d'un segment à l'autre, mais, dans chaque segment, le *Basal* est plus élevé pour les lames II-III que les lames IV-V et VII-IX (p < 0.001).

Chapitre 4. DISCUSSION

4.1 Considérations méthodologiques

Au cours de ce travail, nous avons utilisé la méthode autoradiographique du [³⁵S]GTP γ S dans les conditions prescrites par plusieurs études antérieures sur d'autres récepteurs (ex. Sim et al. 1995, 1996; Ase et al., 2002). Des expériences effectuées en parallèle avec les agonistes DAMGO (opiacés) et Baclofen (GABA_B) ont d'ailleurs permis de retrouver les marquages caractéristiques décrits par Sim et al. (1995, 2000) dans le cerveau et la moelle épinière (non illustré). Ces derniers résultats débordent du cadre de la présente étude, mais se sont avérés hautement significatifs en termes de validation de tous les aspects techniques de la méthode de l'incorporation du [³⁵S]GTP γ S.

En raison d'une incorporation endogène ubiquitaire du [³⁵S]GTP γ S, dépendante de l'existence des récepteurs A1 de l'adénosine, il est recommandé d'effectuer ce type d'expérimentation en présence d'un antagoniste des récepteurs A1, le DPCPX, ce qui favorise la détection des changements d'incorporation secondaires à l'activation par tout agoniste à l'étude (augmentation du rapport signal-bruit) (Laitinen et Jokinen, 1998). Nos incubations ont donc toujours été réalisées en présence de DPCPX.

Les expériences d'activation par la NA et les deux agonistes alpha2 ont été effectuées avec une concentration de 300 μ M de ces trois produits, alors que la concentration de phentolamine était de 1 mM dans la condition noradrénaline + phentolamine. Pour la NA, il s'agit d'une concentration six fois supérieure à celle utilisée dans des tranches in vitro pour activer les neurones de la substance gélatineuse de la moelle épinière du rat (50 μ M)

(North et Yoshimura, 1984). Dans le cas de la clonidine ou du guanabenz, comme de la phentolamine, il s'agit de concentrations largement supérieures à celles qui ont été employées pour la radiolisation sur préparation membranaire de cerveau ou de moelle épinière (clonidine : 10^{-5} M à $10 \mu\text{M}$ selon Rae et al., 1984, Bond et al., 1986 et Raiteri et al., 1992; guanabenz : 10 nM - $100 \mu\text{M}$ selon Hayashi et al., 2001; phentolamine : 10^{-6} M selon Connell et al., 1989), Nous nous sommes ainsi assurés d'un effet maximal, sans avoir à procéder à une étude dose-réponse pour chaque drogue, du fait que notre objectif premier n'était pas de les comparer les unes aux autres.

4.2 Hétérogénéité de l'incorporation endogène du [^{35}S]GTP γ S

L'incorporation endogène du [^{35}S]GTP γ S dans la moelle épinière traduit vraisemblablement l'existence d'une activité constitutive des récepteurs couplés aux protéine G, telle que décrite pour un grand nombre d'autres systèmes (Lefkowitz et al., 1993; Milligan et al., 1995). Selon ces auteurs, ce type d'activité ne dépend pas d'un faible niveau d'hormone (ou agoniste) ni de la présence de complexes agoniste-récepteur à longue durée de vie. Il semblerait plutôt que les récepteurs couplés aux protéines G puissent se retrouver dans une conformation active en raison d'une isomérisation spontanée, capable de générer une activité constitutive en l'absence d'agoniste (Pauwels et Wurch, 1998). Cette propriété a été démontrée dans des préparations membranaires aussi bien pour des récepteurs recombinants sauvages que mutés (Birdsall et Lazareno, 1997). La localisation prédominante de divers récepteurs dans la corne dorsale (ex. NK-1, Nazli et Morris, 2000; opiacés, Zerari et al., 1994; alpha-2, voir introduction;

mGluR4, Azkue et al., 2001; GABA_B, Towers et al., 2000); cholecystokinine, Zouaoui et al., 1990) pourrait expliquer une activité constitutive particulièrement forte dans cette région de la moelle. Une participation significative des récepteurs alpha-2 est cependant peu probable, en l'absence de toute stimulation détectable de l'incorporation du [³⁵S]GTP γ S par les agonistes spécifiques de ce sous-type réceptoriel (voir ci-dessous). Quant à l'absence d'incorporation endogène, donc d'activité constitutive apparente, dans la substance blanche, elle pourrait traduire une densité relativement faible des récepteurs couplés aux protéines G localisés sur les cellules gliales et les faisceaux d'axones de la moelle.

4.3 Activation de l'incorporation du [³⁵S]GTP γ S par la noradrénaline

Nous avons mesuré une stimulation forte mais relativement homogène de l'incorporation du [³⁵S]GTP γ S dans les différentes couches de la substance grise des divers segments de la moelle épinière, en accord avec l'existence démontrée de sous-types réceptoriels adrénérgiques alpha1, alpha2 et bêta répartis dans toute la matière grise de la moelle épinière (voir les références en Introduction). Un marquage relativement faible mais significatif de la substance blanche a également été noté, qui pourraient être dû à l'activation de récepteurs alpha et/ou bêta adrénérgiques situés sur les cellules gliales et notamment les astrocytes (Hosli et Hosli, 1982). Ces récepteurs moduleraient des courants K⁺ entrants rectifiés et pourraient ainsi participer à des fonctions trophiques de la NA (Roy et Sontheimer, 1995).

L'homogénéité de distribution de l'incorporation du [³⁵S]GTP γ S activée par la NA ne signifie pas nécessairement que chaque sous-type réceptoriel

adrénergique s'y trouve distribué de façon uniforme (voir section 1.3 et 1.4). En effet, la méthode du [³⁵S]GTP γ S ne permet pas de distinguer les divers sous-types réceptoriels activés par la NA, à moins d'être appliquée en présence d'un antagoniste que l'on saurait sélectif et capable d'affecter le niveau d'incorporation. Or, à l'heure actuelle, on ne dispose pas d'antagonistes sélectifs des divers sous-types alpha ou bêta.

L'homogénéité d'activation par la NA dans la matière grise reste cependant difficile à interpréter. Compte tenu de l'hétérogénéité des marquages observés dans la moelle par autoradiographie de ligands spécifiques des récepteurs adrénérergiques (Roudet et al., 1993, 1994), on ne peut que réitérer que c'est l'ensemble des activations reliées aux différents sous-types qui donne un résultat homogène pour les différentes couches et les divers segments de la moelle. On peut toutefois s'interroger sur la correspondance entre localisation et fonctionnalité dans le cas de la mise en évidence des récepteurs par radioliation. Faut-il supposer que l'homogénéité de l'activation du couplage aux protéines G par l'ensemble des récepteurs adrénérergiques d'une famille de récepteurs est un meilleur reflet de la fonctionnalité de ces récepteurs? Rien ne nous y autorise, pour plusieurs raisons. D'abord, la distinction qui s'impose entre l'affinité et l'efficacité du couplage, en l'absence de toute information à ce sujet dans le cas des récepteurs adrénérergiques (Onaran et Costa 1997 ; Stanasila et al., 2000). Ensuite, le fait que les divers sous-types réceptoriels adrénérergiques soient couplés à des protéines G différentes (activatrices, inhibitrices), dont l'efficacité peut varier. Enfin, la possibilité que certains d'entre eux puissent être couplés à plus d'une seule protéine G.

4.4 Réduction de l'activation noradrénergique par la phentolamine

Une autre série d'expérience nous a montré que l'incorporation du [³⁵S]GTP γ S induite par la NA est diminuée en présence de l'antagoniste alpha non sélectif phentolamine. Ce résultat a été obtenu lorsque les coupes de moelle épinière ont été prétraitées avec la phentolamine (par pré incubation), mais non lorsque l'antagoniste a été appliqué en même temps que la NA (résultat non publié), ce qui suggère une affinité plus forte de la NA que la phentolamine envers les récepteurs bloqués par cette dernière. La stimulation noradrénergique de l'incorporation de [³⁵S]GTP γ S en présence de phentolamine est apparue uniforme dans toutes les lames et segments de la moelle épinière, de même que la stimulation par la NA seule, ce qui laisse supposer une répartition relativement uniforme de l'ensemble des récepteurs bêta (et a fortiori des récepteurs alpha), dans les différentes lames et divers segments de la moelle épinière, tel que discuté ci-haut pour l'ensemble des récepteurs NA. Les données de radioliation suggèrent pourtant que certains sous-types bêta puissent avoir une distribution hétérogène dans la substance grise de la moelle épinière. L'autoradiographie de la radioliation du [³H]dihydroalprénolol (Jones et al., 1982; Schrader et Grobecker, 1989), un antagoniste non sélectif, montre en effet une plus forte densité de sites β -adrénergiques dans la corne dorsale que les autres régions de la substance grise, lesquels seraient en grande partie localisés sur les afférences nociceptives, sensibles à la capsaïcine (Patterson et Hanley, 1987). Les mêmes limitations que ci-haut, s'appliquent donc à l'interprétation des données sur l'homogénéité apparente de l'efficacité du couplage induit par la NA en présence de la phentolamine.

4.5 Absence d'effet de la clonidine et du guanabenz

Deux interprétations pourraient rendre compte de l'absence d'effet des agonistes spécifiques du récepteur α_2 sur l'incorporation du [^{35}S]GTP γ S : a) une concentration insuffisante des deux agonistes lors de ces expériences; b) une faible densité réelle de ces récepteurs, même dans la corne dorsale de la moelle, où la radioliation les démontre en concentration relativement élevée. La première explication apparaît peu vraisemblable en raison des fortes concentrations de chacun des deux agonistes (300 μM) utilisée lors des incubations, comparativement à celles qui en démontrent l'efficacité dans différents systèmes fonctionnels. Il faut cependant savoir qu'il n'existe qu'un petit nombre d'agonistes alpha sélectifs permettant un couplage des récepteur de cette famille à leur(s) protéines G. Ainsi, la clonidine est elle considérée comme un agoniste partiel, ne montrant pas une affinité de couplage qui se compare, aux mêmes doses, à celle d'autres agonistes dits complets (*full agonist*). Par contre, ceci n'est pas le cas du guanabenz, qui est généralement catégorisé parmi ces derniers. Il apparaît donc probable que ce soit la faible densité réelle des récepteurs alpha2, et leur localisation comme autorécepteurs ou hétérorécepteurs sur des terminaisons axonales, qui soient en cause. En fait, la démonstration reste à faire que l'activation de couplage aux protéines G d'un quelconque récepteur majoritairement sinon exclusivement localisés sur des terminaisons axonales plutôt que des corps cellulaires et dendrites neuronaux puisse être quantitativement suffisante pour provoquer une augmentation significative et détectable de l'incorporation du [^{35}S]GTP γ S par rapport à son incorporation endogène.

4.6 En guise de conclusion

L'ensemble de ces résultats indique que l'activation du couplage aux protéines G par la NA et ses récepteurs fait partie des mécanismes grâce auxquels ce neurotransmetteur/modulateur exerce son contrôle sur les diverses fonctions de la moelle épinière. La distribution homogène de l'incorporation du [³⁵S]GTP γ S activée par la NA et son blocage partiel par la phentolamine montrent qu'il existe des récepteurs adrénergiques alpha et bêta dans toute la matière grise de la moelle. La distribution apparente de l'efficacité de couplage aux protéines G des deux familles alpha et bêta de récepteurs adrénergiques semble en accord avec celle de l'innervation NA, retrouvée aussi bien dans la corne dorsale et la corne intermedio-latérale que la corne ventrale de la substance grise. Elle est compatible avec les rôles fonctionnels attribués à la NA dans la moelle, auxquels semblent contribuer aussi bien les récepteurs alpha que bêta adrénergiques.

Nous avons pu également constater que la NA est en mesure d'activer un couplage aux protéines G dans la matière blanche, probablement en bonne partie via les récepteurs bêta localisés sur les cellules gliales. En l'absence de terminaisons axonales NA dans la substance blanche de la moelle, une telle action de la NA, tout comme l'existence de récepteurs noradrénergiques, représente à elle seule un autre indice de neurotransmission diffuse par ce transmetteur/modulateur.

Enfin, l'absence d'effet apparent des agonistes spécifiques alpha-2, clonidine et guanabenz, sur l'incorporation du [³⁵S]GTP γ S était inattendue, du fait de la distribution préférentielle de ces récepteurs sur les afférences primaires dans la corne dorsale. Elle soulève la possibilité qu'un récepteur

majoritairement sinon exclusivement localisé sur des terminaisons nerveuses ne puisse pas activer le couplage aux protéines G en quantité suffisante pour être détectée par la méthode du [³⁵S]GTP_γS.

Chapitre 5. BIBLIOGRAPHIE

- Adlersberg M., Arango V., Hsiung S.-C., Mann J.J., Underwood M.D., Liu K.-P., Kassir S.A., Ruggiero, D.A. et Tamir H. (2000) *In vitro* autoradiography of serotonin 5-HT_{2A/2C} receptor-activated G protein: guanosine-5'-(γ -[³⁵S]thio)triphosphate binding in rat brain. *J. Neurosci. Res.* 61: 674-685.
- Azkue J.J., Murga M., Fernandez-Capetillo O., Mateos J.M., Elezgarai I., Benitez R., Osorio A., Diez J., Puente N., Bilbao A., Bidaurrezaga A., Kuhn R. et Grandes P. (2001) Immunoreactivity for the group III metabotropic glutamate receptor subtype mGluR4a in the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn. *J. Comp. Neurol.* 430: 448-457.
- Birdsall N.J. et Lazareno S. (1997) To what extent can binding studies allow the quantification of affinity and efficacy? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 812: 41-47.
- Björklund A. et Lindvall O. (1986) The nervous system, Vol. IV. In: J.M. Brookhart et V.B. Mountcastle (Eds.). *Handbook of Physiology.* pp. 155-235.
- Björklund A. et Skagerberg G. (1982) Descending monoaminergic projections to the spinal cord. In: B. Sjolund et A. Björklund (Eds.), *Brain Stem Control of Spinal Mechanisms.* North Holland-Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp. 55-88.
- Bond R.A., Charlton K.G. et Clarke D.E. (1986) Responses to norepinephrine resistant to inhibition by alpha and beta adrenoceptor antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236: 408-415.
- Bradford H.F. (1986) *Chemical Neurobiology: An Introduction to Neurochemistry.* W.H. Freeman, New York.

- Bylund D.B., Eikenber D.C., Hieble J.P., Langer S.Z., Lefkowitz R.J., Minneman K.P., Molinoff P.B., Ruffolo R.R.Jr. et Trendelengurg U. (1994) IV. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46: 121-136.
- Carlsson A., Falck B., Fuxe K., et Hillarp N.A. (1964) Cellular localization of monoamines in the spinal cord. *Acta Physiol. Scand.* 60: 112-119.
- Connell L.A., Majid A. et Wallis D.I. (1989) Involvement of alpha-1 adrenoceptors in the depolarizing but not the hyperpolarizing responses of motoneurons in the neonate rat to noradrenaline. *Neuropharmacology* 28: 1399-1404.
- Connor H.E., Drew G.M., Finch L. et Hicks P.E. (1981) Pharmacological characteristics of spinal alpha-adrenoreceptors in rats. *J. Auton. Pharmacol.* 1: 149-156.
- Dahlström A. et Fuxe K. (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurones. *Acta Physiol. Scand.* 62: 1-79.
- Dahlström A. et Fuxe K. (1965) Evidence for the existence of monoaminergic neurons in the central nervous system. II. Experimentally induced changes in the intraneuronal amine levels of bulbospinal neuron systems. *Acta Physiol. Scand.* 64: 7-36.
- del Carmen Garcia M., Enero M.A. et Celuch S.M. (1996) Hypotensive and hypertensive effects of catecholamines intrathecally injected in anesthetized rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 59: 17-26.

- Dooley D.J., Bittiger H. et Reymann N.C. (1986) CGP 20712A: a useful tool for quantitating β 1- and β 2-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 130: 137-139.
- Dray A et Nunan L. (1987) Supraspinal and spinal mechanisms in morphine-induced inhibition of reflex urinary bladder contractions in the rat. *Neuroscience* 22: 281-287.
- Fabiani M.E. et Story D.F. (1996) Inhibition of sympathetic noradrenergic transmission by guanabenz and guanethidine in rat isolated mesenteric artery: involvement of neuronal potassium channels. *Pharmacol. Res.* 33: 171-180.
- Forssberg H. et Grillner S. (1973) The locomotion of the acute spinal cat injected with clonidine i.v. *Brain Res.* 50: 184-186.
- Fritschy J.M. et Grzanna R. (1992) Restoration of ascending noradrenergic projections by residual locus coeruleus neurons: compensatory response to neurotoxin-induced cell death in the adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 321: 421-441.
- Giroux N., Rossignol S. and Reader T.A. (1999) Autoradiographic study of α 1- and α 2-noradrenergic and serotonin1A receptors in the spinal cord of normal and chronically transected cats. *J. Comp. Neurol.* 406: 402-414.
- Gold M.S., Dastmalchi S. et Levine J.D. (1997) Alpha 2 adrenergic receptor subtypes in rat dorsal root and superior cervical ganglion neurons. *Pain* 69: 179-190.
- Hagihira S., Senba E., Yoshida S., Tohyama M. et Yoshiya I. (1990) Fine structure of noradrenergic terminals and their synapses in the rat

- spinal dorsal horn: an immunohistochemical study. *Brain Res.* 526: 73-80.
- Hayashi J., Sato H., Tanaka Y., Tokue J., Ishida N., Watanabe K. et Kitamoto K. (2001) Guanabenz, an antihypertensive centrally acting alpha-2 agonist, suppresses morning elevations in aggregation of human platelets. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 37: 89-93.
- Hösli E. et Hösli L. (1982) Evidence for the existence of alpha- and beta-adrenoceptors on neurones and glial cells of cultured rat central nervous system: an autoradiographic study. *Neuroscience* 7: 2873-2878.
- Johnson R.D. et Minneman K.P. (1987) Differentiation of α 1-adrenergic receptors linked to phosphatidylinositol turnover and cyclic AMP accumulation in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 31: 239-246.
- Jones D.J., Kendall D.E. et Enna S.J. (1982) Adrenergic receptors in rat spinal cord. *Neuropharmacology* 21: 367-370.
- Kaur P. et Ahlenius S. (2000) Non-serotonergic potentiation by (-)-pindolol of DOI-induced forward locomotion in rats: possible involvement of beta-adrenoceptors? *J. Neural Transm.* 107: 903-917.
- Kehne J.H., Gallager D.W. et Davis M. (1985) Spinalization unmasks clonidine's alpha 1-adrenergic mediated excitation of the flexor reflex in rats. *J. Neurosci.* 5: 1583-1590.
- Kingery W.S., Agashe G.S., Guo T.Z., Sawamura S., Davies M.F., Clark J.D., Kobilka B.K. et Maze M. (2002) Isoflurane and nociception: spinal alpha2A adrenoceptors mediate antinociception while supraspinal alpha1 adrenoceptors mediate pronociception. *Anesthesiology* 96: 367-374.

- Laitinen J.T. (1999) Selective detection of adenosine A1 receptor-dependent G-protein activity in basal and stimulated conditions of rat brain [³⁵S]guanosine 5'-(gamma-thio)triphosphate autoradiography. *Neuroscience* 90: 1265-1279.
- Laitinen J.T. et Jokinen M. (1998) Guanosine 5'-(gamma-[³⁵S]thio)triphosphate autoradiography allows selective detection of histamine H3 receptor-dependent G protein activation in rat brain tissue sections. *J. Neurochem.* 71: 808-816.
- Lands A.M., Arnold A., McAuliff J.P., Luduena F.P. et Brown T.G.Jr. (1967) Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214: 597-598.
- Lefkowitz R.J., Cotecchia S., Samama P. et Costa T. (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 303-307.
- Malhotra V.K., Kachroo A. et Sapru H.N. (1993a) Cardiac effects of injections of epinephrine into the spinal intermediolateral column. *Am. J. Physiol.* 265: H633-H641.
- Malhotra V., Kachroo A. et Sapru H.N. (1993b) Role of alpha 1-adrenergic receptors in the intermediolateral column in mediating the pressor responses elicited by the stimulation of ventrolateral medullary pressor area. *Brain Res.* 626: 278-286.
- Marshall K.C. (1983) Catecholamines and their actions in the spinal cord. In: R.A. Davidoff (Ed.), *Handbook of the Spinal Cord: Pharmacology.* Marcel Dekker Inc., New York, pp. 275-328.

- Melamed E., Lahav M. et Atlas D. (1976) Histochemical evidence for β -adrenergic receptors in the rat spinal cord. *Brain Res.* 116: 511-515.
- Milligan G., Bond R.A. et Lee M. (1995) Inverse agonism: Pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy? *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 10-13.
- Molander C. et Grant G. (1995) Spinal cord cytoarchitecture. In: G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, pp. 39-45.
- Moore R.J., Xiao R., Sim-Selley L.J. et Childers S.R. (2000) Agonist-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding in brain modulation by endogenous adenosine. *Neuropharmacology* 39: 282-289.
- Motulsky H. (1995) *Intuitive Statistics*. Oxford University Press, New York and Oxford.
- Nazli M. et Morris R. (2000) Comparison of localization of the neurokinin 1 receptor and nitric oxide synthase with calbindin D labelling in the rat spinal cord. *Anat. Histol. Embryol.* 29: 141-143.
- Nicholas A.P., Pieribone V. et Hökfelt T. (1993a) Distribution of mRNAs for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 328: 575-594.
- Nicholas A.P., Pieribone V. et Hökfelt T. (1993b) Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 56: 1023-1039.
- North R.A. et Yoshimura M. (1984) The actions of noradrenaline on neurones of the rat substantia gelatinosa *in vitro*. *J. Physiol. (Lond.)* 349: 43-55.

- O'Donnell S.R. et Wanstall J.C. (1980) Evidence that ICI 118,551 is a potent highly beta-2-selective adrenoceptor antagonist and can be used to characterize beta-adrenoceptor population in tissues. *Life Sci.* 27: 671-677.
- Onaran H.O. et Costa T. (1997) Agonist efficacy and allosteric model of receptor action. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 812: 99-115.
- Patterson S.I. et Hanley M.R. (1987) Autoradiographic evidence for beta-adrenergic receptors on capsaicin-sensitive primary afferent terminals in rat spinal cord. *Neurosci Lett.* 78: 17-21.
- Pauwels P.J. et Wurch T. (1998) Review: amino acid domains involved in constitutive activation of G-protein-coupled receptors. *Mol. Neurobiol.* 17: 109-135.
- Peng Y.I., Liu H.J. et Fu T.C. (1993) Involvement of alpha- and beta-adrenoreceptors in antinociception at the lumbar spinal level in mice. *Chin. J. Physiol.* 36: 177-180.
- Petrash A.C. et Bylund B.T. (1986) Alpha-2 adrenergic receptor subtypes indicated by [³H]yohimbine binding in human brain. *Life Sci.* 38: 2129-2137.
- Pieribone V.A., Nicholas A.P., Dagerlind A. et Hökfelt T. (1994) Distribution of α_1 adrenoceptors in rat brain revealed by in situ hybridization experiments utilizing subtype-specific probes. *J. Neurosci.* 14: 4252-4268.
- Pinardi G., Sierralta F. et Miranda H.F. (2002) Adrenergic mechanisms in antinociceptive effects of non steroidal anti-inflammatory drugs in acute thermal nociception in mice. *Inflamm. Res.* 51: 219-22.

- Rae G.A. et De Moraes S. (1984) Presynaptic alpha 2-adrenoceptor subsensitivity in the morphine-withdrawn mouse vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 104: 261-266.
- Raiteri M., Bonanno G., Pende M., Andrioli G.C. et Ruelle A. (1992) Subclassification of release-regulating alpha 2-autoreceptors in human brain cortex. *Br. J. Pharmacol.* 107: 1146-1151.
- Rajaofetra N., Ridet J.L., Poulat P., Marlier L., Saudillon F., Geffard M. et Privat A. (1992) Immunocytochemical mapping of noradrenergic projections to the rat spinal cord with an antiserum against noradrenaline. *J. Neurocytol.* 21: 481-494.
- Reader T.A. et Strazielle C. (1999) Quantitative autoradiography of monoamine uptake sites and receptors in rat and mouse brain. In: A.A. Boulton, G.B. Baker, A.N. Bateson (Eds.). *Cell Neurobiology Techniques. Neuromethods Vol. 33*, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp. 1-51.
- Rexed B. (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.* 96: 415-495.
- Rosin D., Zeng D., Stornetta R., Norton F., Riley T., Okusa M., Guyenet P. et Lynch K.R. (1993) Immunohistochemical localization of alpha-2-A adrenergic receptors in catecholaminergic and other brainstem neurons in the rat. *Neuroscience* 56: 139-155.
- Rosin D.L., Talley E.M., Lee A., Stornetta R., Gaylinn B.D., Guyenet P. et Lynch K.R. (1996) Distribution of alpha 2C-adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp. Neurol.* 372: 135-165.

- Rossignol S. (1996) Neural control of stereotypic limb movements. In: L.B. Rowell et J.T. Sheperd (Eds.). Handbook of Physiology, Sect. 12, Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems. Amer. Physiol. Soc., Oxford, pp. 173-216.
- Roudet C., Savasta M. et Feuerstein C. (1993) Normal distribution of alpha1-adrenoceptors in the rat spinal cord and its modification after noradrenergic denervation: a quantitative autoradiographic study. J. Neurosci. Res. 34: 44-53.
- Roudet, C., Mouchet, P., Feuerstein, C., et Savasta, M. (1994) Normal distribution of alpha2-adrenoceptors in the rat spinal cord and its modification after noradrenergic denervation: a quantitative autoradiographic study. J. Neurosci. Res. 39: 319-329.
- Roy M.L. et Sontheimer H. (1995) Beta-adrenergic modulation of glial inwardly rectifying potassium channels. J. Neurochem. 64: 1576-1584.
- Ruffolo R.R.Jr. et Hieble J.P. (1994) α -adrenoceptors. Pharmac. Ther. 61: 1-64.
- Ruffolo R.R.Jr., Nichols A.J., Stadel J.M. et Hieble J.P. (1991) Pharmacologic and therapeutic applications of α 2-adrenoceptor subtypes. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 243-279.
- Ruffolo R.R.Jr., Stadel J.M. et Hieble J.P. (1994) Alpha-adrenoceptors: recent developments. Med. Res. Rev. 14: 229-270.
- Ruggiero D.A., Regunathan S., Wang H., Milner T. et Reis D. (1995) Distribution of imidazoline receptor binding protein in the central nervous system. Ann. N.Y. Acad. Sci. 763: 201-221.

- Schrader E. et Grobecker H. (1989) Distribution and subtype determination of β -receptors in the spinal cord of the adult rat. *Cell. Molec. Neurobiol.* 9: 461-468.
- Sim L.J., Selley D.E. et Childers S.R. (1995) *In vitro* autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[γ - 35 S]thio]-triphosphate binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7242-7246.
- Sim L.J., Selley D.E., Dworkin S.I. et Childers S.R. (1996) Effects of chronic morphine administration on μ opioid receptor-stimulated GTP γ [35 S] autoradiography in rat brain. *J. Neurosci.* 16: 2684-2692.
- Stanasila L., Lim W.K., Neubig R.R. et Pattus F. (2000) Coupling efficacy and selectivity of the human mu-opioid receptor expressed as receptor-Galpa fusion proteins in Escherichia coli. *J. Neurochem.* 75: 1190-1199.
- Stone L.S., Broberger C., Vulchanova L., Wilcox G.L., Hökfelt T., Riedl M.S. et Elde R. (1998) Differential distribution of α_{2A} and α_{2C} Adrenergic receptor immunoreactivity in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 18: 5928-5937.
- Strake K. et Langer S.Z. (1979) A note on terminology for postsynaptic receptors. In: S.Z. Langer, K. Starke, M.L. Dubocovich (Eds). *Presynaptic Receptors*. Pergamon Press, Oxford, pp. 1-3.
- Tate K.M., Briend-Sutren M.M., Emorine L.J., Delavier-Klutchko C., Marullo S. et Strosberg A.D. (1991) Expression of three human β -adrenergic receptor subtypes in transfected Chinese hamster ovary cells. *Eur. J. Biochem.* 196: 357-361.

- Towers S., Princivalle A., Billinton A., Edmunds M., Bettler B., Urban L., Castro-Lopes J. et Bowery N.G. (2000) GABAB receptor protein and mRNA distribution in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Eur. J. Neurosci.* 12: 3201-3210.
- Uhlen S., Lindblom J., Johnson A. et Willkberg E.S.J. (1997) Autoradiographic studies of central α 2A- and α 2C-adrenoceptors in the rat using [3 H]MK912 and subtype-selective drugs. *Brain Res.* 770: 261-266.
- Unnerstall J.R., Niehoff D.L., Kuhar M.J. et Palacios J.M. (1982) Quantitative receptor autoradiography using [3 H]Ultrafilm: application to multiple benzodiazepine receptors. *J. Neurosci. Meth.* 6: 59-73.
- Wada T., Hasegawa Y. et Ono H. (1997) Characterization of alpha-1-adrenoceptor subtypes in facilitation of rat spinal motoneuron activity. *Eur. J. Pharmacol.* 340: 45-52.
- Westlund K.N., Bowker R.M., Ziegler M.G. et Coulter J.D. (1981) Origins of spinal noradrenergic pathways demonstrated by retrograde transport of antibody to dopamine-beta-hydroxylase. *Neurosci Lett.* 25: 243-249.
- Westlund K.N., Bowker R.M., Ziegler M.G. et Coulter J.D. (1983) Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. *Brain Res.* 263: 15-31.
- Zerari F., Zouaoui D., Gastard M., Apartis E., Fischer J., Herbrecht F., Cupo A., Cucumel K. et Conrath M. (1994) Ultrastructural study of delta-opioid receptors in the dorsal horn of the rat spinal cord using monoclonal anti-idiotypic antibodies. *J. Chem. Neuroanat.* 7: 159-170.

Zouaoui D., Benoliel J.J., Conrath M. et Cesselin F. (1990) Cholecystokinin-like immunoreactivity in the dorsal horn of the rat spinal cord: an attempt to analyse contradictory results between immunocytochemistry and radioimmunoassay. *Neuropeptides* 17:177-185.