



**HAL**  
open science

# Etude multimodale in vivo des mécanismes de toxicité neurorespiratoire des opioïdes chez le rat

Dominique Vodovar

► **To cite this version:**

Dominique Vodovar. Etude multimodale in vivo des mécanismes de toxicité neurorespiratoire des opioïdes chez le rat. Toxicologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT: 2018US-PCC168 . tel-02414310

**HAL Id: tel-02414310**

**<https://theses.hal.science/tel-02414310>**

Submitted on 16 Dec 2019

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

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

**UNIVERSITE SORBONNE PARIS CITE - UNIVERSITE PARIS DIDEROT**

Ecole doctorale : Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries (ED 563)

*UMR-S 1144 - Variabilité de Réponse aux Psychotropes*

*UMR 1023 - Imagerie Moléculaire In Vivo*

# **Étude multimodale *in vivo* des mécanismes de toxicité neurorespiratoire des opioïdes chez le rat**

Par Dominique VODOVAR

**DOCTORAT MEDICAMENT, TOXICOLOGIE, CHIMIE, IMAGERIE – SPECIALITE TOXICOLOGIE**

Dirigée par Bruno MEGARBANE et codirigée par Nicolas TOURNIER

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 12 novembre 2018

- Directeur :** M le Professeur Bruno MEGARBANE, Université Paris Diderot
- Codirecteur :** M le Docteur Nicolas TOURNIER, Commissariat à l'Énergie Atomique
- Rapporteurs :** M le Professeur Mathieu RAUX, Université Pierre et Marie Curie  
M le Professeur Stein SILVA, Université Toulouse III
- Examineurs :** Mme le Professeur Anne ROUSSIN, Université Toulouse III  
M le Professeur François COUDORE, Université Paris Sud  
M le Professeur Éric Maury, Université Pierre et Marie Curie

*A Sophie, Louis, Sibylle et Basile*

*A mes parents*

*A Blanche*

## Remerciements

**A Monsieur le Professeur Bruno MEGARBANE.** Bruno, je ne saurais te remercier pour tout ce que tu m'as apporté au cours de ces dix dernières années. Merci pour ton enseignement, ta rigueur scientifique, ta disponibilité et ta générosité. Tu m'as fait aimer la réanimation médicale, la toxicologie et enfin la recherche fondamentale. Avoir effectué cette thèse sous ta direction a été dans cette continuité que nous poursuivrons, je l'espère, au sein de la Fédération de Toxicologie.

**A Monsieur le Docteur Nicolas TOURNIER.** Nicolas, je te remercie pour m'avoir encadré au cours de cette thèse et de m'avoir ouvert des horizons scientifiques que je n'avais pas imaginés ; tu m'as transmis ta passion pour l'imagerie moléculaire ! Merci également pour ta gentillesse, ta disponibilité, ta patience et ta mesure. Réaliser une partie de cette thèse dans ton équipe a été un très agréable moment ; j'espère que nous poursuivrons cette collaboration tant amicale que professionnelle.

**A Monsieur le Professeur Mathieu RAUX.** Monsieur, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

**A Monsieur le Professeur Stein SILVA.** Stein, je te remercie de ta confiance et d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

**A Madame le Professeur Anne ROUSSIN.** Madame, je vous remercie d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

**A Monsieur le Professeur François COUDORE.** Monsieur, je vous remercie d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

**A Monsieur le Professeur Éric MAURY.** Monsieur, je vous remercie d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse et de votre intérêt pour la toxicologie souvent rare dans notre spécialité.

**A Monsieur le Professeur Jean-Louis LAPLANCHE.** Monsieur, je vous remercie de m'avoir accueilli pour la réalisation de cette thèse (et de m'accueillir prochainement) au sein de l'UMRS 1144. Je vous remercie pour votre patience et votre gentillesse ainsi que toute votre équipe.

**A Madame Irène BUVAT.** Irène, je ne saurais vous remercier pour votre soutien sans faille au cours de ces trois dernières années et votre chaleureux accueil au sein de l'IMIV.

**A Monsieur le Professeur Vincent LEBON.** Vincent, je te remercie pour ta confiance.

**A Mesdames Patricia RISEDES et Lucie CHEVILLARD.** Patricia et Lucie ces quelques mots ne seraient pas suffisants pour vous remercier de votre gentillesse et de votre bienveillance à mon égard. Nous appartenons maintenant à la même unité et à la même équipe et devons nous voir plus souvent !

**A Madame Géraldine POTTIER.** Géraldine je te remercie pour ton accueil, ton aide et ta bienveillance. Je te souhaite beaucoup de réussite dans ta nouvelle affectation.

**A Mesdames Maud GROISLARD et Émilie JAUMAIN.** Maud et Émilie, je vous remercie pour votre aide et votre patience entre TRAMAGABA, FLUMOPIOID, THERANEXUS ... J'espère que nous continuerons à travailler ensemble.

**A Madame Claire LEROY, à Messieurs Sébastien AUVITY, Michel BOTTLANDER, Fabien CAILLE, Jérôme CAYLA, Philippe GERVAIS, Sébastien GOUTAL, Bertrand KHUNAST ... et j'en oublie.** Je vous remercie pour votre accueil chaleureux, votre aide et votre professionnalisme au sein du SHFJ.

**A Monsieur le Professeur Gilles DHONNEUR.** Monsieur, je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité d'accepter ce poste d'accueil APHP-CEA en restant à mi-temps au sein de votre service.

**A Monsieur le Docteur Hakim HAOUACHE.** Hakim, je te remercie de m'avoir accueilli au sein de la réanimation chirurgicale et cardiovasculaire de l'hôpital Henri-Mondor. Merci pour ta confiance et ta patience.

**A Madame le Docteur Ophélie CONSTANT, à Messieurs les Docteurs Boris BOULANGER, Chamsedine CHERAIT et Velislav SLAVOV.** Ophélie, Boris, Chamsedine et Velislav, je vous remercie pour ces trois années (et parfois moins) passées en votre compagnie. Ophélie, je te souhaite beaucoup de réussite dans ton futur exercice américain.

**A Monsieur le Docteur Nicolas MONGARDON.** Nicolas, ces trois années à tes côtés ont été enrichissantes aussi bien amicalement, médicalement que scientifiquement. Je te remercie pour ton aide et ta bienveillance.

**Au service du Centre Anti-Poison et de Toxicovigilance de Paris.** Je vous remercie pour votre accueil chaleureux.

**A Monsieur le Docteur Jérôme LANGRAND.** Jérôme, c'est un réel plaisir de venir travailler avec toi et je l'espère de mener à bien les projets dont nous rêvons.

**A Madame Chantal SEVENS.** Chantal je ne te remercierai jamais assez pour ton regard toujours bienveillant et ta gentillesse.

**Au Monsieur le Docteur Vianney MOURMAN.** Vianney, j'espère vivement pouvoir assister à ta soutenance l'année prochaine. Merci pour ton amitié et ta gentillesse.

**Aux screetchs ? et à leur descendance (spécialement Roman), à Matthieu et Emilie, à Cédric et Dève, Camille et Nicolas et j'en oublie ...** Je vous remercie à tous de faire perdurer notre amitié au fil des ans.

**A mes beaux-parents, à mes belles-sœurs et beaux-frères. A Augustin, Amélie, Apolline, Cyprien et Alexis. A Eléonore et Sixtine mes filleuls.**

**A monsieur le Docteur Jean DECHOUX et son épouse Maik.**

**A mes frères, à ma sœur.** Alex tu seras maintenant le seul sans PhD.

**A Nicola et Felipe.**

**A Toma, Stéphane et Anna.**

**A Monsieur et Madame Alphonse et Marguerite BOUMBA.**

**A mes grands-parents.**

**A mes parents.** Vous m'avez toujours soutenu dans tout ce que j'ai entrepris et je vous en remercie profondément.

**A Sophie.** Ta présence à mes côtés et ton indéfectible soutien m'ont été et me sont ce qu'il y a de plus précieux.

**A nos enfants Louis, Sibylle et Basile.**



## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>3</b>
<b>Table des illustrations</b> .....	<b>11</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>13</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>15</b>
<b>Première partie : Section bibliographique</b> .....	<b>17</b>
<b>I - Histoire de la consommation des opioïdes</b> .....	<b>17</b>
I.A - Usage et mésusage : de l'antiquité aux années 70 .....	17
I.B - Évolution de la consommation des opioïdes licites à partir des années 80.....	20
I.C - La crise des opioïdes aux États-Unis.....	22
I.D - La situation européenne .....	28
I.E - La situation française.....	30
<b>II - Pharmacologie des opioïdes</b> .....	<b>33</b>
II.A - Les récepteurs opioïdes .....	33
II.B - Ligands des récepteurs opioïdes .....	34
II.C - Interaction ligand récepteur.....	38
II.D - Effets respiratoires des opioïdes.....	41
<b>III - Aspects cliniques de l'intoxication par opioïdes</b> .....	<b>47</b>
III.A - Substances opioïdes incriminées .....	47
III.B - Clinique.....	50
III.C - Prise en charge .....	52
<b>Partie 2 : Problématiques et objectifs</b> .....	<b>55</b>
<b>I - Contexte</b> .....	<b>55</b>
<b>II - Problématiques : cas particuliers de la buprénorphine et du tramadol</b> .....	<b>56</b>
I.A - Buprénorphine .....	56
I.B - Tramadol .....	60
<b>III - Objectifs du travail de thèse</b> .....	<b>65</b>
<b>Partie 3 : Section expérimentale</b> .....	<b>67</b>
<b>I - Conditions générales</b> .....	<b>67</b>
I.A - Laboratoires d'accueil .....	67
I.B - Financement.....	67
I.C - Aspects réglementaires.....	67
<b>II - Matériel</b> .....	<b>69</b>
II.A - Animaux .....	69
II.B - Produits .....	69
II.C - Radiotraceurs .....	71
<b>III - Procédures d'anesthésie et d'euthanasie</b> .....	<b>72</b>
III.A - Anesthésie.....	72
III.B - Euthanasie.....	72
<b>IV - Procédures de pose des cathéters artériels ou veineux, d'implantation des sondes de télémétrie et d'électromyographie</b> .....	<b>73</b>
IV.A - Pose des cathéter artériels et veineux tunnelisés .....	73
IV.B - Implantation des sondes de télémétrie .....	73
IV.C - Implantation des électrodes d'électromyographie.....	73



<b>V - Analyse <i>in vivo</i> de la fonction respiratoire.....</b>	<b>75</b>
V.A - Pléthysmographie corps entier sur animal vigi.....	75
V.B - Mesure des gaz du sang artériel sur animal vigi.....	78
V.C - Électromyographie diaphragmatique sur animal vigi.....	80
<b>VI - Analyses comportementales.....</b>	<b>82</b>
VI.A - Activité locomotrice.....	82
VI.B - Échelle de sédation, ataxie et tonus.....	82
VI.C - Convulsions.....	82
<b>VII - Dosages cérébraux.....</b>	<b>84</b>
VII.A - Recueil des cerveaux.....	84
VII.B - Dosage de l'histamine.....	84
VII.C - Monoamines.....	84
VII.D - Modafinil et flécaïnide.....	85
<b>VIII - La tomographie par émission de positons (TEP).....</b>	<b>86</b>
VIII.A - Principes.....	86
VIII.B - Modalités d'acquisition des images TEP.....	87
VIII.C - Analyse des données TEP.....	87
<b>Partie 4 : Articles.....</b>	<b>93</b>
<b>I - Projet 1 : Intégration de données d'imagerie à des données pharmacodynamiques pour l'étude de la neuropharmacologie de molécules psychoactives chez le rat : application à l'association flecaïnide/modafinil.....</b>	<b>93</b>
I.A - Contexte.....	93
I.B - Objectifs.....	94
I.C - Schéma expérimental.....	94
I.D - Analyse statistique.....	95
I.E - Résultats.....	96
I.F - Discussion et conclusion.....	96
<b>II - Projet 2 : Étude multimodale des mécanismes impliqués dans l'interaction buprénorphine/diazépam à l'origine d'une dépression respiratoire.....</b>	<b>109</b>
II.A - Contexte.....	109
II.B - Objectifs.....	110
II.C - Schéma expérimental.....	110
II.D - Analyse statistique.....	112
II.E - Résultats.....	113
II.F - Discussion et conclusion.....	113
<b>III - Projet 3 : Investigation des mécanismes impliqués dans la survenue des convulsions observées au cours des intoxications par tramadol.....</b>	<b>137</b>
III.A - Contexte.....	137
III.B - Objectifs.....	137
III.C - Schéma expérimental.....	137
III.D - Analyse statistique.....	139
III.E - Résultats.....	140
III.F - Discussion et conclusion.....	142
<b>Discussion - Conclusion.....</b>	<b>165</b>
<b>Études des mécanismes de l'interaction entre le diazépam et la buprénorphine à l'origine d'une dépression respiratoire.....</b>	<b>166</b>
<b>Rôle du système GABAergique dans les convulsions observées au cours des intoxications par tramadol.....</b>	<b>171</b>

<b>Intégration de l'imagerie TEP dans une approche multimodale de l'étude des mécanismes de toxicité des opioïdes.....</b>	<b>175</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>178</b>
<b><i>Bibliographie</i> .....</b>	<b>179</b>



## Table des illustrations

FIGURE 1 - DIFFERENTES PUBLICITES ET FORMULATIONS DE LAUDANUM.....	17
FIGURE 2 - CRITERES DIAGNOSTIQUES D'UN TROUBLE DE L'USAGE DES OPIOÏDES SELON DSM-5.....	18
FIGURE 3 - DIFFERENTES PUBLICITES POUR L'HEROÏNE COMMERCIALISEE PAR LE LABORATOIRE BAYER .....	19
FIGURE 4 - ÉCHELLE DE LA DOULEUR DE L'OMS TELLE QU'ELLE A ÉTÉ PUBLIÉE EN 1986 PAR L'OMS.....	21
FIGURE 5 - THEORIE DU TROUBLE DE L'USAGE DE L'HEROÏNE SELON VINCENT DOLE ET MARIE NYSWANDER.....	21
FIGURE 6 - REPRODUCTION DE LA LETTRE PUBLIÉE EN 1980 PAR PORTER ET JICK.....	23
FIGURE 7 - CAMPAGNE DE PROMOTION POUR RECONNAITRE LA DOULEUR COMME LE CINQUIÈME PARAMÈTRE VITAL .	24
FIGURE 8 - CAMPAGNE DE PROMOTION MENÉE PAR LE LABORATOIRE PURDUE POUR PROMOUVOIR L'OXYCONTIN® ..	24
FIGURE 9 - DIFFÉRENCE ENTRE LES DEUX FORMULATIONS D'OXYCONTIN® APRES PILAGE DES COMPRIMES .....	25
FIGURE 10 - ÉVOLUTION DE LA MORTALITÉ PAR OVERDOSE DE SUBSTANCE AUX ÉTATS-UNIS ENTRE 1999 ET 2015 ...	26
FIGURE 11 - NOMBRE D'AMÉRICAINS PRÉSENTANT UN TROUBLE DE L'USAGE DES OPIOÏDES .....	27
FIGURE 12 - RÉPARTITION DES DÉCÈS PAR OPIOÏDES AUX ÉTATS-UNIS EN FONCTION DE L'ÂGE EN 2015 .....	28
FIGURE 13 - CONSOMMATION D'OPIOÏDES ANALGÉSIFIQUES AU COURS DU TEMPS AUX ÉTATS-UNIS ET EN EUROPE EN S-DDD .....	29
FIGURE 14 - CARACTÉRISTIQUES DE LA CONSOMMATION D'OPIOÏDE ET DES DÉCÈS QUI LUI SONT RAPPORTÉS EN EUROPE EN 2017 .....	29
FIGURE 15 - ÉVOLUTION DE LA CONSOMMATION DES ANTALGIQUES OPIOÏDES DITS MOYENS EN FRANCE ENTRE 2006 ET 2015.....	30
FIGURE 16 - ÉVOLUTION DE LA CONSOMMATION DES ANTALGIQUES OPIOÏDES DITS FORTS EN FRANCE ENTRE 2006 ET 2015.....	31
FIGURE 17 - ÉVOLUTION DES HOSPITALISATIONS POUR OVERDOSE ET DES DÉCÈS EN FRANCE LIÉS AUX OPIOÏDES DE 2000 À 2014 .....	32
FIGURE 18 - DENDROGRAMME DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G (GPCR) HUMAINS.....	33
FIGURE 19 - EFFETS PHARMACODYNAMIQUES CENTRAUX ET PÉRIPHÉRIQUES APRÈS ACTIVATION DES RECEPTEURS OPIOÏDES.....	34
FIGURE 20 - CLASSIFICATION DES OPIOÏDES SELON LEUR STRUCTURE CHIMIQUE.....	36
FIGURE 21 - CLASSIFICATION DES OPIOÏDES SELON LEUR ACTIVITÉ PHARMACOLOGIQUE .....	37
FIGURE 22 - CHANGEMENTS INTRACELLULAIRES SURVENANT APRÈS LA LIAISON D'UN AGONISTE OPIOÏDE A UN RECEPTEUR OPIOÏDE.....	38
FIGURE 23 - ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA RESPIRATION.....	42
FIGURE 24 - VUE PARA SAGITTALE DU TRONC CÉRÉBRAL CONTENANT LES CENTRES RESPIRATOIRES .....	43
FIGURE 25 - EFFET DU FENTANYL/BUPRENORPHINE CHEZ DES VOLONTAIRES SAINS SUR LA VENTILATION MINUTE .....	44
FIGURE 26 - ÉVOLUTION DE LA CONSOMMATION MONDIALE DE TRAMADOL ENTRE 2000 ET 2012 .....	47
FIGURE 27 - RÉPARTITION DES NPS CONSOMMÉS DANS LE MONDE EN 2017 .....	48
FIGURE 28 - SUBSTANCES LES PLUS SOUVENT IMPLIQUÉES EN 2016 DANS LES INTOXICATIONS/EXPOSITIONS ET DÉCÈS PAR OPIOÏDES .....	49

FIGURE 29 - CLINIQUE DE L'INTOXICATION PAR LES OPIOÏDES .....	50
FIGURE 30 - REPONSE A LA NALOXONE ET/OU AU FLUMAZENIL EN FONCTION DE L'OPIOÏDE DETECTE .....	57
FIGURE 31 - HYPOTHESES SUR LES MECANISMES DE L'INTERACTION ENTRE LA BUPRENORPHINE ET LES BENZODIAZEPINES .....	58
FIGURE 32- HYPOTHESES SUR LES VOIES DE NEUROTRANSMISSION IMPLIQUEES DANS DES CONVULSIONS LIEES AU TRAMADOL .....	61
FIGURE 33- METABOLISME DU TRAMADOL .....	64
FIGURE 34 - SCHEMA DU PLETHYSMOGRAPHE .....	76
FIGURE 35 - DIFFERENTES ETAPES NECESSAIRES A L'OBTENTION D'UNE IMAGERIE TEP. ....	86
FIGURE 36 - RECALAGE DE L'IMAGE TEP SUR LE MODELE ANATOMIQUE.....	88
FIGURE 37 - ANALYSE REGIONALE DE LA RADIOACTIVITE AU COURS DU TEMPS.....	88
FIGURE 38 - STRUCTURE ET METABOLISME DU <sup>18</sup> F-FDG.....	89
FIGURE 39 - COMPARAISON DE LA CAPTATION DE GLUCOSE ENTRE LES GROUPE (SPM8®) .....	97
FIGURE 40- VARIATIONS REGIONALES INTRA-GROUPE SELON LES METHODES POUR DECRIRE LA CONSOMMATION DE GLUCOSE .....	98
FIGURE 41 - IMPACT DU TRAMADOL A DOSE CROISSANTE SUR LE BP <sub>ND</sub> DU <sup>11</sup> C-FLUMAZENIL .....	141
FIGURE 42- RADIOACTIVITE AU COURS DU TEMPS EXPERIMEE EN SUV DANS LES TROIS GROUPE .....	141
FIGURE 43 - PROPOSITION D'ALGORITHME DE PRISE EN CHARGE DES INTOXICATIONS PAR OPIOÏDES .....	169

## Liste des abréviations

- %ID** : pourcentage de la dose injectée
- <sup>18</sup>FDG** : 2-désoxy-2-(<sup>18</sup>F)fluoro-D-glucose
- AMPc** : adénosine monophosphate cyclique
- ASIC** : canaux ioniques à détection d'acides
- AUC** : aire sous la courbe
- B<sub>max</sub>** : densité de récepteurs
- BötC** : complexe Bötzinger
- BP<sub>ND</sub>** : rapport entre la densité totale de récepteur (*B<sub>max</sub>*) sur la constante de dissociation du radiotracer pour ce récepteur (*K<sub>d</sub>*)
- CGRP** : peptide relié à la calcitonine
- cVRG** : groupe respiratoire caudal ventrale
- DAMGO** : [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol]-enkephalin
- f** : fréquence respiratoire
- GABA** : acide γ-aminobutyrique
- GABA-A** : récepteurs à l'acide γ-aminobutyrique de type A
- GIRK** : courants potassiques rectifiants activés par les protéines G
- GPCR** : récepteurs couplés aux protéines G
- HCN** : hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel
- i.p** : intrapéritonéal
- i.v** : intraveineux
- IVSE** : intraveineux à la seringue électrique
- K<sub>D</sub>** : affinité d'une substance pour un récepteur
- KF** : Kölliker-Fuse
- LC** : locus coeruleus
- LRN** : noyau réticulé latéral
- MMR** : région du raphé médullaire caudal
- MRGlu** : metabolic rate of glucose
- NA** : noyau ambigu
- NMDA** : N-méthyl-D-aspartate
- NTS** : noyau du tractus solitaire
- NVsnpr** : noyau sensoriel masticatoire principal du trijumeau
- PaCO<sub>2</sub>** : pression partielle en dioxyde de carbone
- PaO<sub>2</sub>** : pression partielle en oxygène
- PB** : noyau parabrachial
- PFL** : noyau para facial latéral
- PFv** : noyau para-facial ventral
- Pi<sub>co</sub>** : complexe post-inspiratoire
- préBötC** : complexe pré-Bötzinger
- rVRG** : groupe respiratoire ventral rostral

**s.c** : sous cutané  
**SERT** : transporteur de la sérotonine  
**SRTM** : simplified reference tissue model  
**SUV** : standard uptake value  
**TEP** : tomographie par émission de positons  
 $T_E$  : temps expiratoire  
 $T_I$  : temps inspiratoire  
**TRPV1** : Transient Receptor Potential Vanilloide 1  
 $T_{TOT}$  : temps total  
**V** : noyau moteur trijumeau  
 $V_E$  : volume minute  
**VII** : noyau moteur facial  
**vIRT** : formation réticulée intermédiaire ventrale  
 $V_T$  : volume courant  
**VTA** : aire tegmentale ventrale  
**XII** : noyau moteur hypoglosse

## Introduction

---

Les substances opioïdes rassemblent l'ensemble des substances naturelles, hémisynthétiques ou synthétiques se liant aux récepteurs opioïdes (Hemmings and Egan, 2013). Leur principal intérêt pharmacologique réside dans leurs actions analgésiques et anesthésiques en faisant des piliers de la pharmacopée. Elles sont également utilisées de manière illicite (usage détourné [à savoir mésusage de médicaments opioïdes], consommation de substances illicites opioïdes), à des fins récréatives ou dans un contexte de trouble de l'usage des opioïdes, pour leurs effets psychoactifs notamment euphorisants (Volkow and McLellan, 2016).

Les opioïdes exposent néanmoins à deux complications majeures qui sont intrinsèquement liées (Volkow and McLellan, 2016). La première est que leur consommation répétée, même dans un contexte thérapeutique, peut entraîner des troubles de leur usage (O'Brien, 2011). La seconde est le risque de survenue de surdosage à l'origine d'intoxications entraînant des troubles de la conscience et une dépression respiratoire dose-dépendante souvent mortelle (Boyer, 2012). Ce risque est augmenté chez les personnes exposées chroniquement aux opioïdes et qui développent une tolérance pharmacologique les obligeant à augmenter la dose d'opioïde consommée pour obtenir l'effet antalgique ou psychoactif escompté (Volkow and McLellan, 2016). Ces deux complications représentent aujourd'hui un problème majeur de santé public dans les pays occidentaux. A titre d'exemple, aux États-Unis où la situation est la plus préoccupante, les intoxications par opioïdes sont la première cause de décès toxiques, loin devant les décès par arme à feu (en 2015, 33091 décès par intoxication par opioïdes versus 12979 décès par arme à feu) (Rudd *et al*, 2016).

La recherche d'alternatives thérapeutiques aux opioïdes ainsi que le développement de nouvelles substances opioïdes dénuées de tels effets secondaires sont aujourd'hui des enjeux majeurs (Skolnick, 2018). En attendant de telles découvertes, la meilleure compréhension des mécanismes de toxicité neurologique et respiratoire des opioïdes pourrait permettre de prévenir et de mieux prendre en charge les patients intoxiqués par ces substances.





## Première partie : Section bibliographique

---

### I - Histoire de la consommation des opioïdes

#### I.A - Usage et mésusage : de l'antiquité aux années 70

Le rapport des Hommes aux opioïdes a toujours été complexe oscillant dans un équilibre précaire entre utilisation de leurs propriétés analgésiques et recherche de leurs effets psychoactifs. L'opium est consommé depuis des millénaires et son utilisation est rapportée dès le IV<sup>ème</sup> siècle avant Jésus-Christ. En Mésopotamie inférieure, il était initialement employé par les Sumériens dans les rites religieux pour ses effets euphorisants (Kritikos and Papadaki, 1967). Il était alors appelé « gil » (joie) (Brownstein, 1993).

Les propriétés analgésiques de l'opium ont été décrites à partir de l'Antiquité. Utilisé pour des actes chirurgicaux mineurs ou pour diminuer les pleurs d'enfant, l'usage de l'opium a cependant été limité par la survenue d'effets secondaires parfois mortels (Brownstein, 1993). Au cours du Moyen-Âge, Paracelse (1493-1541) concoctait une préparation à base d'opium qu'il nommait *Laudanum*. Bien que modifiée, la formulation la plus connue restant celle de Thomas Sydenham (1624-1689) (Figure 1), le *Laudanum* constitua l'un des principaux moyens thérapeutiques de la pharmacopée des siècles suivants. Il était commercialisé en France jusqu'en 1976 et reste encore disponible aux États-Unis sur prescription (Rhodin, 2006).

**Élément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 1 - Différentes publicités et formulations de laudanum

En 1805, Friedrich W.A Sertürner (1783-1841) isola le premier alcaloïde de l'opium qu'il nomma « morphium » (devenu aujourd'hui morphine) en hommage à *Morpheus* le dieu Grec des rêves. Cette découverte fut rapidement suivie par celle de la codéine en 1832 et de la papavérine en 1848. Au XIX<sup>ème</sup> siècle, ces alcaloïdes purs ou le *Laudanum*, étaient couramment utilisés pour traiter divers maux (diarrhée, toux, douleurs, troubles de l'humeur ...). L'invention de la seringue hypodermique (1853) permettait l'administration de morphine à visée antalgique ou comme adjuvant pour les anesthésies générales (Brownstein, 1993). La morphine a ainsi été largement prescrite dans ces indications au cours de la guerre de Sécession (1861-1865) (Quinones, 2009).

Parallèlement à son utilisation médicale, des effets toxiques et des troubles de l'usage de l'opium ont été rapportés dès le XVI<sup>ème</sup> siècle en Europe et au Moyen-Orient (Brownstein, 1993).

Le terme trouble de l'usage d'une substance remplace aujourd'hui les termes d'abus ou de dépendance précédemment utilisés, dans le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (Figure 2). Il désigne également le terme général « addiction » qui n'a pas été retenu dans cette dernière classification compte tenu de son caractère péjoratif (O'Brien, 2011). Le trouble de l'usage d'une substance est défini actuellement comme une situation pathologique liée à la consommation d'une substance sur une période supérieure ou égale à un an entraînant une perte de contrôle de soi, une interférence sur les activités scolaires ou professionnelles, ou encore la poursuite de la consommation malgré la prise de conscience des troubles qu'elle engendre (American Psychiatric Association, 2013).

### **Elément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 2 - Critères diagnostiques d'un trouble de l'usage des opioïdes selon la cinquième édition du manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-5). (Source : American Psychiatric Association, 2013)

C'est à la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle en Chine, où l'opium était fumé (mêlé avec du tabac) dans un but récréatif, que de tels troubles liés à la consommation d'opium ont été considérés pour la première fois comme problème de santé publique. Une première « crise des opioïdes » survint également aux États-Unis après la guerre de Sécession avec le développement, chez bon nombre de vétérans traités par morphine pour des blessures de guerre, de troubles de l'usage des opioïdes appelée alors « maladie du soldat » ou « soldier's disease » (Quinones, 2009). En Europe, on assista aussi à une consommation croissante d'opium. En Angleterre, où le *Laudanum* était largement détourné dans un but récréatif, sa consommation affecta l'ensemble de la société et, en particulier, la classe ouvrière (Berridge, 1978). En France, où l'accès au *Laudanum* était plus réglementé, l'opium était régulièrement fumé sous forme de « chandou » (ou opium raffiné) et particulièrement prisé par les artistes, l'aristocratie ou la haute-bourgeoisie (Chossegros, 2007).

Le développement de troubles de l'usage de l'opium et de la morphine, ont incité à rechercher des alternatives thérapeutiques. En 1898, la société pharmaceutique Bayer synthétisa la 3,6-diacétylmorphine obtenue par di-acétylation de la morphine. Ce nouveau composé dit hémisynthétique, réputé plus actif et moins addictif, a été commercialisé sous la marque déposée « Héroïne » (Figure 3).

### **Élément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 3 - Différentes publicités pour l'héroïne commercialisée par le laboratoire Bayer

L'héroïne était alors utilisée comme antitussif chez les patients atteints de tuberculose et comme traitement pour lutter contre la dépendance à la morphine. Néanmoins, l'héroïne a rapidement été reconnue pour avoir des propriétés narcotiques et addictives supérieures à celles de la morphine (Brownstein, 1993). Dans le même objectif de recherche d'un « analgésique peu addictif », la mépiridine (1929) et la méthadone (1946) ont notamment été synthétisées (Michaelis *et al*, 2007; Scott and Chen, 1946).

Le début du XX<sup>ème</sup> siècle a constitué un premier tournant dans la consommation des opioïdes. C'est en effet la période à partir de laquelle sont apparues les premières mesures législatives nationales et internationales contrôlant la fabrication et l'usage des opioïdes ; la première Convention internationale de l'opium se tint en 1912. Ces législations ont eu pour effet de diminuer la consommation des opioïdes illicites. Parallèlement, la communauté médicale a pris conscience des conséquences sociales et médicales de la consommation abusive et de l'usage détourné (mésusage) des opioïdes utilisés comme médicament, et en a restreint drastiquement la prescription. Ce courant médical était connu sous le terme « opiophobie » (Rhodin, 2006). A partir des années soixante jusqu'aux années 90, on assista à une résurgence de la consommation d'héroïne dans les pays occidentaux favorisée par le mouvement hippie et sa consommation fréquente par des musiciens iconiques (Chossegros, 2007).

### I.B - Évolution de la consommation des opioïdes licites à partir des années 80

Les années 80 ont représenté un nouveau tournant pour l'utilisation médicale des opioïdes. En 1969, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) abandonna le postulat selon lequel l'utilisation de morphine conduit inéluctablement à un trouble de l'usage des opioïdes. Par ailleurs, sous l'impulsion de l'américain John Bonica (1917-1994), fondateur en 1973 de l'*International Association for the Study of Pain*, les recherches sur les mécanismes nociceptifs s'intensifièrent. La douleur, jusqu'alors négligée, devint progressivement une préoccupation centrale pour le corps médical (Vargas-Schaffer, 2010). Ces changements de paradigme aboutirent à la réhabilitation des opioïdes comme antalgique. Dans les « Recommandations pour la prise en charge la douleur cancéreuse » publiées en 1986 par l'OMS, les opioïdes étaient considérés comme des antalgiques incontournables (Ferrari *et al*, 2012). Ces recommandations, dans lesquelles apparaissait pour la première fois « l'échelle d'emploi des analgésiques selon l'intensité de la douleur évaluée » (ou « Echelle de la douleur de l'OMS »), préconisaient l'utilisation d'opioïdes dits « faibles » pour les douleurs modérées à sévères (palier 2) et d'opioïdes dits « forts » pour les douleurs sévères (palier 3) (Figure 4). Cette échelle a par la suite été généralisée à tous les types de douleur (Vargas-Schaffer, 2010).

### **Élément sous droit, diffusion non autorisée**

*Figure 4 - Échelle de la douleur de l'OMS telle qu'elle a été publiée en 1986 par l'OMS*

Indépendamment, on assista au développement des politiques publiques de substitution des opioïdes afin notamment, de contrer l'épidémie de SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) chez les héroïnomanes utilisateurs de seringues usagées (Hoffman, 2000). Cette approche dite « substitutive » a été développée par Vincent Dole (1913-2006) et Marie Nyswander (1919-1986) aux États-Unis à la fin des années soixante (Figure 5).

### **Élément sous droit, diffusion non autorisée**

*Figure 5 - Théorie du trouble de l'usage de l'héroïne selon Vincent Dole et Marie Nyswander (Source : Dole et Nyswander, 1967)*

Elle préconisa la prescription d'opioïdes pour traiter les troubles de l'usage d'héroïne, ceux-ci n'étant plus considérés comme une maladie psychologique mais comme un désordre métabolique liée à la dérégulation des systèmes de neurotransmission opioïdiques (Figure 5) (Dole and Nyswander, 1967). La méthadone était initialement utilisée et fut suivie plusieurs décennies plus tard par la buprénorphine (Kreek and Vocci, 2002).

Ces changements de paradigmes vis-à-vis des opioïdes dans leur usage médical ont entraîné une augmentation globale de la consommation licite des opioïdes à partir des années 80.

## I.C - La crise des opioïdes aux États-Unis

### I.C.1 - Définition et origine

La « Crise des opioïdes » est définie par l'augmentation massive du nombre d'overdoses par opioïdes rapportée aux États-Unis depuis le début des années 2000. Ces overdoses ont pour particularité d'être secondaires, dans une grande majorité des cas, au mésusage d'opioïdes licites, initialement prescrits à visée thérapeutique. La genèse de cette crise repose sur trois événements indépendants (Skolnick, 2018).

Le *premier évènement* est au départ anodin. En 1980, une lettre de huit lignes dans le *New England Journal of Medicine* décrivait l'expérience de la prescription d'opioïdes à visée antalgique au *Boston University Medical Center* (Figure 6). Dans cette lettre, les auteurs rapportaient un nombre très faible de patients présentant un trouble de l'usage des opioïdes après en avoir reçu comme traitement antalgique (4 patients sur les 11 882 patients traités par opioïdes au cours de la période étudiée). Leur conclusion était que malgré une large prescription d'opioïdes au sein de leur hôpital, le développement d'une dépendance aux opioïdes restait anecdotique en l'absence d'antécédents d'addiction (Porter and Jick, 1980). Cette lettre a été citée depuis sa publication 608 fois (jusqu'à 06/2017) ; à titre de comparaison le taux médian de citation des 11 autres lettres publiés dans le même numéro est de 11. La justification de la large prescription sans précaution particulière des opioïdes a reposé, pour la plupart des études publiées depuis les années 80, sur les données purement descriptives et peu documentées de cette lettre (439 articles sur les 608 citant cette lettre) (Figure 6). Ce serait, pour certains auteurs, l'un des points de départ de la crise des opioïdes

américaines (Leung *et al*, 2017).

### Elément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 6 – *Reproduction de la lettre publiée en 1980 dans le New England Journal of Medicine suspectée d'être l'une des origines de la crise des opioïdes aux Etats-Unis (à gauche). Le tableau de droite montre le nombre de citation au cours du temps de la lettre de Porter et Jick (vert foncé citations affirmatives, vert plus claire citations négatives) (Source : Leung et al, 2017)*

Le *deuxième évènement* a été le lancement d'une campagne de sensibilisation des professionnels de santé à la prise en charge de la douleur aux États-Unis. Cette campagne, baptisée « pain as the 5<sup>th</sup> vital sign » a été menée par l'*American Pain Society* à partir de 1996 (Figure 7). Elle a été ensuite soutenue par de nombreuses sociétés médicales nationales et internationales (Campbell, 1996). Son objectif était de reconnaître la douleur comme un cinquième paramètre vital au même titre que les quatre paramètres vitaux habituellement utilisés en médecine (fréquence cardiaque, pression artérielle, fréquence respiratoire et température corporelle). De nombreux outils simples d'auto-évaluation de la douleur ont alors été développés (échelle visuelle analogique, l'échelle numérique ou l'échelle verbale simple) et la prise en charge de la douleur est rapidement devenue une priorité nationale en entrant dans les référentiels de qualité des soins des hôpitaux américains (Skolnick, 2018). Il est aujourd'hui suggéré que cette campagne, associée au changement de paradigme dans le traitement de la douleur au cours des années 80 (élargissement des prescriptions d'opioïdes aux douleurs non cancéreuses) et à la sous-évaluation du potentiel addictif des opioïdes, a largement encouragé la sur-prescription des opioïdes (Mandell, 2016; Porter and Jick, 1980). Sans être totalement abandonné, le concept de « pain as the 5<sup>th</sup> vital sign » est aujourd'hui en net recul (Levy *et al*, 2018).



### **Élément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 7 - Campagne de promotion pour reconnaître la douleur comme le cinquième paramètre vital (Source : [www.painpathways.org](http://www.painpathways.org))

*Le troisième événement* a été l'autorisation de mise sur le marché d'une forme à libération prolongée de l'oxycodone - OxyContin® - par le laboratoire américain Purdue Pharma. Ce médicament a rapidement connu un succès grandissant et son chiffre de vente a été multiplié par 65 entre 1996 et 2010 (3,1 milliards de dollars en 2010 soit 30% du marché total des analgésiques aux Etats-Unis) (Skolnick, 2018). Ce succès étonnant, dans un marché américain des opioïdes génériques à libération prolongée déjà saturé, n'est que très partiellement expliqué par la campagne « pain as the 5<sup>th</sup> vital sign ». Celle-ci a en effet entraîné l'augmentation des ventes de l'ensemble des opioïdes (fentanyl et morphine notamment) mais dans des proportions bien inférieures (Van Zee, 2009). La forte consommation d'oxycodone s'explique par la campagne massive et inégalée menée par le laboratoire Purdue Pharma pour promouvoir l'OxyContin® (Figure 8).

### **Élément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 8 - Campagne de promotion menée par le laboratoire Purdue pour promouvoir l'oxycodone à libération prolongée OxyContin®

Cette promotion était destinée tant aux professionnels de santé qu'au grand public. L'OxyContin® y était présenté (en comparaison à la forme à libération immédiate de l'oxycodone) comme assurant une analgésie plus efficace, comme étant moins addictif et plus difficile à mésuser que les autres opioïdes (Skolnick, 2018). Ces trois arguments se sont ensuite révélés faux. Plusieurs études n'ont pas montré de bénéfice clinique comparant l'OxyContin® à l'oxycodone à libération immédiate moins chère car déjà disponible en générique (Hale *et al*, 1999; Stambaugh *et al*, 2001). Par ailleurs, plusieurs travaux sur le traitement de la douleur chronique ont montré des caractéristiques addictives similaires entre l'OxyContin® et les autres opioïdes (Davis *et al*, 2003). Enfin, les comprimés d'OxyContin® ont été rapidement détournés en étant pilés. La poudre était consommée par voie inhalée (« sniffée » ou fumée) ou par voie intraveineuse. En 2010 une formulation « dissuasive » a été commercialisée (Figure 9).

### **Élément sous droit, diffusion non autorisée**

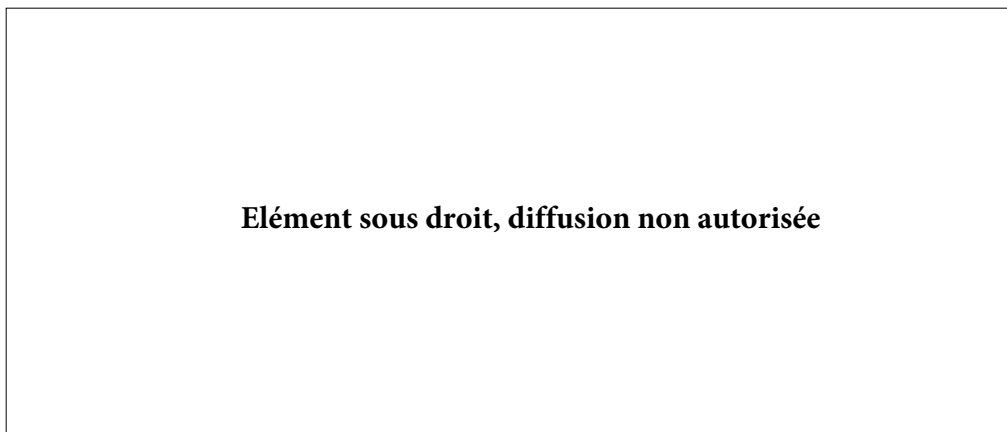
*Figure 9 - Différence entre les deux formulations d'OxyContin® après pilage des comprimés (Source : [www.opiateaddictionresource.com](http://www.opiateaddictionresource.com))*

Cette nouvelle formulation est en effet plus difficile à piler et à solubiliser que la précédente. Cette modification, associée à la restriction des prescriptions d'opioïdes, a entraîné une baisse

de la consommation d'OxyContin® et un report des consommations vers des produits illicites tels que l'héroïne ou le fentanyl non pharmaceutique dont l'usage a considérablement augmenté depuis 2010 (Cicero *et al*, 2012). Enfin, et dans une moindre mesure, l'approbation et la commercialisation de l'OxyContin® 160 mg (versus 80 mg initialement) pour les patients dits tolérants aux opioïdes en 2000 a permis de mettre à disposition des utilisateurs de fortes doses d'opioïde, ce qui a contribué à renforcer l'attrait des personnes ayant un trouble de l'usage des opioïdes pour l'OxyContin® (Skolnick, 2018).

### I.C.2 - Conséquences de la crise des opioïdes aux États-Unis

Les derniers chiffres disponibles aux États-Unis datent de 2015 et montrent une situation alarmante. Depuis 2000, on assiste à une augmentation massive du nombre de décès par overdose aux opioïdes (Figure 10). Le taux de mortalité ajusté à l'âge a augmenté de 200 % entre 2000 et 2014 (taux de mortalité par overdose ajusté à l'âge, 6.2 pour 100 000 en 2000, 16.3 pour 100 000 en 2015) (Rudd *et al*, 2016). Cette augmentation est à intégrer dans une tendance globale d'augmentation du taux de décès par overdose, toutes substances confondues, de 136 % parmi lesquelles les opioïdes sont surreprésentés (Rudd *et al*, 2016; Seth, 2018). Les décès liés à l'usage d'opioïdes sont en très grande majorité non intentionnels.



Source: National Vital Statistics System, Mortality File, CDC WONDER.

Figure 10 - Évolution de la mortalité par overdose de substance aux États-Unis entre 1999 et 2015. Les opioïdes sont impliqués dans la très grande majorité de ces décès. Les overdoses d'opioïdes responsables de décès sont le plus souvent non intentionnelles (Source : Seth P, 2018)

En 2015, 33 091 américains sont décédés d'une overdose par opioïde, ce qui représentait 63,1 % des décès par overdose toutes substances confondues. On estime qu'aujourd'hui plus de 3 américains meurent chaque heure d'une overdose par opioïde. Quarante pour cent de ces overdoses sont secondaires à la prise d'un opioïde prescrit médicalement. Environ 1000

personnes présentant une overdose par opioïde sont pris en charge chaque jour dans les urgences des hôpitaux américains ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov))

Comme pour la mortalité, on observe également depuis les années 2000 une augmentation du nombre de patients présentant un trouble de l'usage des opioïdes. En 2016, environ 2,1 millions d'américains (0,7% des personnes âgées de plus de 12 ans) étaient dépendants aux opioïdes. Parmi ces personnes, 1,8 million avaient une dépendance aux opioïdes licites, 626 000 à l'héroïne et 326 000 aux deux types de substances. Ces chiffres auraient progressé de 500% depuis 2010 pour les addictions aux opioïdes licites et de 50 % pour les addictions à l'héroïne (Figure 11) (Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2017).

### **Élément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 11 - Nombre d'américains présentant un trouble de l'usage des opioïdes (OUD : opioid use disorder)

Enfin, le coût sociétal et humain de la crise des opioïdes est considérable, la mortalité affectant, en majorité, la classe d'âge active entre 25 et 55 ans (Birnbaum *et al*, 2011) (Figure 12). Le coût économique est lui aussi vertigineux. Ces coûts intègrent le recours au système de soin et la perte de productivité des consommateurs d'opioïdes ainsi que les coûts relatifs aux procédures judiciaires impliquant les héroïnomanes et les consommateurs d'opioïdes illicites. Ainsi, la crise des opioïdes aurait coûté 504 milliards de dollars en 2015 (Florence *et al*, 2016; The Council of Economic Advisers, 2017).

## **Élément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 12 - Répartition des décès par opioïdes aux États-Unis en fonction de l'âge en 2015

### **I.D - La situation européenne**

Le contexte européen est plus délicat à étudier en l'absence d'instruments de surveillance aussi développés qu'aux États-Unis.

Comme aux États-Unis à la fin des années 90, le traitement de la douleur (notamment non cancéreuse) est devenu une priorité en Europe. La consommation d'analgésiques opioïdes a alors augmenté mais dans une moindre mesure qu'aux États-Unis. Cette différence est en grande partie liée aux modalités d'accès et de prescription des opioïdes qui sont plus restreintes en Europe qu'aux États-Unis ou au Canada (Nilsen, 2017). On peut néanmoins noter que la consommation d'opioïdes et son évolution au cours du temps sont très hétérogènes entre les pays européens (Figure 13) (INCB, 2015).

### **Elément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 13 - **A** : Consommation d'opioïdes analgésiques au cours du temps aux États-Unis et en Europe en S-DDD. **B** : Consommation d'opioïdes analgésiques au cours du temps dans les différents pays européens. (Source : [www.incb.org](http://www.incb.org) et [www.who.int](http://www.who.int))

Les données globales européennes dont on dispose concernant le mésusage d'opioïdes licites ou l'usage d'opioïdes illicites proviennent du Centre Européen de Contrôle des Drogues et des Addictions (EMCDDA). Ce centre collecte les données des filières de soin en addictologie des différents pays européens. Ces données sous-estiment très probablement le mésusage des opioïdes licites. Néanmoins, à partir des rapports de l'EMCDDA, on peut évaluer le nombre de personnes présentant une dépendance aux opioïdes dans l'union européenne à 1,3 million (0.34% de la population) en 2015 (Figure 14).

### **Elément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 14 - Caractéristiques de la consommation d'opioïde et des décès qui lui sont rapportés en Europe en 2017 (Source : EMCDDA, 2017)

Ce chiffre est stable depuis 2007, date des premiers rapports exploitables. L'héroïne reste l'opioïde illicite le plus consommé ; mais plusieurs sources indiquent que les opioïdes de synthèse sont de plus en plus consommés en mésusage (notamment les analgésiques opioïdes) et qu'il existe probablement une crise des opioïdes à minima en Europe (Casati *et al*, 2012; EMCDDA, 2017; van Amsterdam and van den Brink, 2015).

Concernant la mortalité, il n'existe pas de données évolutives récentes concernant les opioïdes. Le nombre de décès en 2017 par overdose en Europe serait de 7109 (soit un taux de 21,3 par million d'habitants). Les opioïdes seraient ainsi impliqués dans près de 80% des décès (EMCDDA, 2017) (Figure 14). Néanmoins ce nombre décès, bien que moins important qu'aux États-Unis, est probablement assez largement sous-estimé.

### I.E - La situation française

La situation française est à première vue plus rassurante. La prévalence de l'usage des antalgiques opioïdes a diminué de 11 % en France entre 2006 et 2015. Cette diminution est en grande partie liée à la diminution de la consommation des opioïdes de palier 2 de l'OMS (-53%) suite au retrait de l'autorisation de mise sur le marché du dextropropoxyphène en 2011 (Figure 15) (Hider-Mlynarz *et al*, 2018). Par ailleurs, le nombre de patients dépendants aux opioïdes est stable à 200 000 personnes depuis plusieurs années (EMCDDA, 2017).

### **Élément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 15 - Evolution de la consommation des antalgiques opioïdes dits moyens en France entre 2006 et 2015 (Source : Hider-Mlynarz *et al*, 2018)

Néanmoins, ces données contrastent avec d'autres éléments beaucoup plus inquiétants.

Si la consommation des opioïdes de palier 2 a baissé, celle des opioïdes de palier 3 a considérablement augmenté entre 2006 et 2015 (+37 %). Cette augmentation s'est principalement faite au profit de l'oxycodone (+613 %) et du fentanyl (patch, +263 % ; transmuqueux buccal ou nasal, +72%) (Hider-Mlynarz *et al*, 2018) (Figure 16).

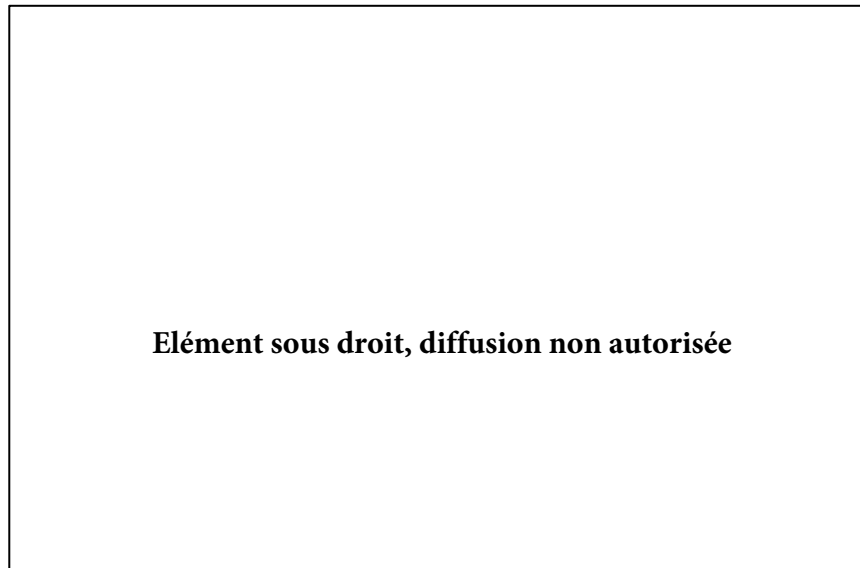


Figure 16 - Evolution de la consommation des antalgiques opioïdes dits forts en France entre 2006 et 2015 (Source : Hider-Mlynarz et al, 2018)

De plus, le mésusage et l'abus des opioïdes licites sont peu évalués et probablement sous-estimés. Dans une étude réalisée dans 2263 pharmacies françaises, les patients achetant de la codéine (sans ordonnance en France) avouaient un mésusage dans 6,8 % des cas, un abus dans 0,85 % et une dépendance dans 17,8 % (Roussin *et al*, 2013). Une autre étude réalisée à partir des données de l'assurance maladie du Sud-Est de la France, montrait que les opioïdes de palier 3 étaient les psychotropes les plus fréquemment obtenus par chevauchement de prescription auprès des pharmacies (*i.e* dispensation à partir de deux ou plusieurs ordonnances de deux ou plusieurs prescripteurs pour une même période) (Ponté *et al*, 2018). Enfin, les hospitalisations associées à la prescription d'opioïdes ont augmenté de 128 % entre 2000 et 2015 (de 15 à 34 pour 1 million d'habitants). Les décès par surdosage involontaire impliquant un opioïde ont augmenté de 161 % entre 2000 et 2014. Ces décès représentaient 9 % des décès involontaires en 2000, contre 15 % en 2014 (Barreau *et al*, 2017) (Figure 17). Si nous sommes loin de la situation américaine (59 décès par opioïde pour 1 million d'habitants aux États-Unis contre 3,4 pour 1 million d'habitants en France), la situation reste préoccupante, à l'image de l'ensemble du continent européen qui vit actuellement une crise des opioïdes à minima.



**Éléments sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 17 - Évolution de la prévalence (par million d'habitants) des hospitalisations pour overdose d'opioïdes (hors héroïne et méthadone) [PMSI] de 2000 à 2015 et des décès liés aux opioïdes (CépiDC) de 2000 à 2014 (Source : Barreau et al. 2018)

## II - Pharmacologie des opioïdes

Le système opioïdérique a été caractérisé à partir de la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle. La première démonstration de l'existence de « récepteurs opiacés » date de 1973 (Pert and Snyder, 1973) En 1975, les endorphines ont été les premiers peptides opioïdes endogènes mis en évidence (Hughes *et al*, 1975).

### II.A - Les récepteurs opioïdes

Les récepteurs opioïdes sont exprimés aussi bien par les neurones du système nerveux central que périphérique. Ils sont également présents sur les cellules neuroendocrines (hypophysaires, surrénales), immunitaires et ectodermiques (Zöllner and Stein, 2007)

On définit actuellement trois types de récepteurs opioïdes au niveau du système nerveux central :  $\mu$  ou MOP,  $\kappa$  ou KOP,  $\delta$  ou DOP. Un autre type de récepteur très proche a été décrit, le récepteur NOP (Trescot *et al*, 2008). Néanmoins ce récepteur n'est pas considéré comme un récepteur opioïde à part entière (Alexander *et al*, 2017). Des sous-catégories de récepteurs  $\mu$ ,  $\kappa$  et  $\delta$  ont également été décrites ; mais seuls trois gènes - OPRM1, OPRK1, OPRD1 (Figure 18) - correspondant à chacun des trois types de récepteur opioïde ont été identifiés (Improta and Broccardo, 1994; Law *et al*, 2013; Zukin *et al*, 1988).

**Elément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 18 - Dendrogramme des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) humains. Les récepteurs opioïdes sont nommés par leurs gènes : OPRM1, OPRK1, OPRD1 (Source : Katritch *et al*, 2013)

Les sous-types pharmacologiques décrits résultent probablement d'un épissage alternatif, de modifications post-traductionnelles et/ou d'une oligomérisation des récepteurs (Stein, 2016).

Les récepteurs opioïdes appartiennent au sous-groupe  $\gamma$  de la classe A des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Figure 18). Ces récepteurs possèdent sept domaines transmembranaires, l'extrémité N-terminale étant extracellulaire et l'extrémité C-terminale intracellulaire. Les trois types de récepteurs opioïdes présentent une homologie de 50 à 70% entre leurs gènes (Katritch *et al*, 2013).

L'activation de chaque type de récepteur est associée à un ou plusieurs effets pharmacologiques qui sont résumés dans la Figure 19 (Stein, 2016).

### **Élément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 19 - Effets pharmacodynamiques centraux et périphériques observés après activation des différents récepteurs opioïdes par un agoniste

Les récepteurs opioïdes peuvent s'organiser en oligomères constitués soit de récepteurs de même type (homo-oligomère) soit de récepteurs de types différents (hétéro-oligomères). L'exact signification pharmacologique de ces oligomères reste aujourd'hui mal connue (Levac *et al*, 2002).

## **II.B - Ligands des récepteurs opioïdes**

### **II.B.1 - Endogènes**

On distingue aujourd’hui quatre grandes classes d’opioïdes endogènes (Trescot *et al*, 2008).

- ◆ Les enképhalines, qui sont dérivées de la pro-enképhaline et sont des ligands  $\delta$  relativement sélectifs.
- ◆ Les endorphines, qui sont dérivées de la pro-opiomélanocortine et se lient au récepteur  $\mu$ .
- ◆ Les dynorphines, qui sont dérivées des pro-dynorphines et sont hautement sélectives au niveau du récepteur  $\mu$ .
- ◆ Enfin, les nociceptines, identifiées plus récemment, qui peuvent avoir des effets hyperalgésiques puissants. Elles interagissent avec le récepteur Opioid-Like-Receptor-1 et ont peu d’affinité pour les récepteurs  $\mu$ ,  $\delta$  ou  $\kappa$ .

## II.B.2 - Exogènes

Les substances opioïdes exogènes peuvent être classées en fonction de leur origine (naturelle, semi-synthétique ou synthétique), de leur structure chimique ou de leur activité pharmacologique.

### II.B.2.a - Classification selon l’origine

Le latex du pavot (*Papaverum somniferum*) à l’origine de l’opium contient principalement quatre alcaloïdes : la morphine, la codéine, la papavérine et la thébaine. Ces alcaloïdes sont appelés « opioïdes naturels ». Au cours du temps d’autres opioïdes ont été synthétisés à partir de ces alcaloïdes, ils sont appelés « opioïdes hémi-synthétiques ou semi-synthétiques ». A partir de 1929, date de la première synthèse de la mépidine, d’autres substances opioïdes ne dérivant pas des alcaloïdes naturels du pavot ont été directement synthétisées et appelées « opioïdes synthétiques » (Tableau 1) (Michaelis *et al*, 2007).

Opioïdes naturels	Opioïdes hémi-synthétiques	Opioïdes synthétiques
Morphine, codéine	Héroïne, Pholcodine	Méthadone, buprénorphine, fentanyl, tramadol ....

Tableau 1 - Classification des opioïdes selon leur origine naturelle, hémi-synthétique ou synthétique.

Historiquement les opioïdes naturels et les opioïdes hémi-synthétiques étaient appelées opiacés et les autres molécules de synthèse, opioïdes. Pour d’autres auteurs, les opiacés ne

comprennent que les opioïdes ayant une structure similaire à celle de la morphine (Brownstein, 1993). D'un point de vue pharmacologique, on entend par « opioïde » toute substance se liant spécifiquement aux récepteurs opioïdes (Hemmings and Egan, 2013). De manière intéressante, le tramadol, opioïde de synthèse, a été retrouvé à l'état naturel en 2013 au Cameroun dans une plante servant dans la médecine traditionnelle (Boumendjel *et al*, 2013). Néanmoins cette découverte a été par la suite réfutée ; il pourrait s'agir, en réalité, de la contamination de la terre par du tramadol pharmaceutique utilisé pour traiter les douleurs des animaux dans les élevages (Kusari *et al*, 2014).

#### II.B.2.b - Classification selon la structure chimique

Les opioïdes peuvent être classés selon leur structure chimique en quatre classes (Atkinson and Fudin, 2017) (Figure 20).

### **Élément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 20 - Classification des opioïdes selon leur structure chimique (Source : Atkinson et Fudin, 2017)

Les *phénanthrènes* sont l'archétype des opioïdes puisqu'ils regroupent notamment les opioïdes dits naturels et semi-synthétiques. La présence d'un groupe hydroxyle (-OH) en position 6 serait associé à une incidence plus élevée de nausées et d'hallucinations (Trescot *et al*, 2008). En effet, les patients présentant des nausées avec des phénanthrènes possédant un groupe hydroxyle en position 6 (morphine, codéine), voient ces effets secondaires digestifs diminué avec les phénanthrènes dé-hydroxylées (hydromorphone, oxycodone) (Wirz *et al*, 2008).

Les *benzomorphanes* ne comptent plus aujourd’hui qu’un seul représentant, la pentazocine. Cette classe a été développée par simplification des relations structures-activités du squelette chimique de la morphine. D’autres molécules telles que la phenazocine, la dezocine, et l’éptazocine ont été commercialisées puis retirées du marché (Trescot *et al*, 2008; Turnaturi *et al*, 2018). Le principal effet secondaire rapporté dans cette classe d’opioïde est la fréquente survenue d’hallucinations (Stacher *et al*, 1983).

Les *phénylpipéridines* incluent notamment le fentanyl et ses dérivés (alfentanil, sufentanil) ainsi que la mépéridine. Cette classe comporte aujourd’hui la majorité des « Nouveaux Produits de Synthèses (NPS) » : le fentanyl non pharmaceutique et ses dérivés, la desméthylprodine (ou MPPP) ... (Zawilska, 2017).

Les *diphénylheptanes* ne comportent aujourd’hui que la méthadone depuis le retrait du dextropropoxyphène du marché européen et américain au début des années 2000 ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), <https://www.fda.gov>).

Enfin, le tramadol représente une classe à lui seul ; c’est un analogue 4-phényl-pipéridine de la codéine (Trescot *et al*, 2008).

#### II.B.2.c - Classification selon leur activité pharmacologique

Les opioïdes peuvent également être classés en fonction de leurs effets sur les récepteurs opioïdes (Figure 21).

**Élément sous droit, diffusion non autorisée**

Les opioïdes peuvent ainsi être considérés comme des agonistes, des agonistes partiels et/ou des antagonistes (Pathan and Williams, 2012). Les agonistes interagissent avec un récepteur opioïde et vont induire une réponse fonctionnelle maximale médiée par ce récepteur (exemple : analgésie après administration de morphine).

Inversement, les antagonistes se lient aux récepteurs mais ne produisent aucune réponse pharmacodynamique, tout en empêchant un agoniste de se lier à ce récepteur (exemple : naloxone). Les agonistes partiels se lient aux récepteurs mais ne suscitent qu'une réponse fonctionnelle partielle plafonnée, quelle que soit la quantité d'opioïde administrée (exemple : buprénorphine). Certains opioïdes sont appelés agonistes-antagonistes car ils sont agonistes de certains types récepteurs opioïdes et antagonistes pour d'autres (la buprénorphine, par exemple, est un agoniste partiel des récepteurs  $\mu$  et antagoniste des récepteurs  $\kappa$ )

## II.C - Interaction ligand récepteur

### I.C.1 - Activation

La fixation d'un ligand agoniste sur les récepteurs opioïdes, entraîne des changements de conformation du récepteur qui vont permettre le couplage intracellulaire du complexe protéique trimérique  $G_{i/o}$  avec l'extrémité C terminale du récepteur. Cette interaction provoque la dissociation du complexe  $G_{i/o}$  en deux sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$ . La sous-unité  $G\alpha$  inhibe alors l'adénylate cyclase et donc la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Tedford and Zamponi, 2006). La sous-unité  $G\beta\gamma$  interagit directement avec différents canaux ioniques de la membrane neuronale (Lüscher and Slesinger, 2010) (Figure 22).

### **Élément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 22 - Changements intracellulaires survenant après la liaison d'un agoniste opioïde à un récepteur opioïde couplé à la protéine G (Source : Pathan et Williams, 2012)

L'interaction de la sous-unité  $G\beta\gamma$  avec les canaux ioniques va entraîner :

- ◆ La modulation voire la suppression de l'influx de calcium au travers des canaux calciques pré- et post-synaptiques provoquant l'atténuation de l'excitabilité des neurones et/ou la réduction de la quantité de neurotransmetteurs nociceptifs libérés (Wang *et al*, 2010).
- ◆ L'ouverture des courants potassiques rectifiants activés par les protéines G (GIRK) empêchant ainsi l'excitation neuronale et/ou la propagation des potentiels d'action (Tedford and Zamponi, 2006).
- ◆ L'inhibition de différents canaux dont les canaux sodiques (Gold and Levine, 1996), les canaux HCN (Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel) de type  $I_h$  (Ingram and Williams, 1994), les canaux TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloïde 1) (Endres-Becker *et al*, 2006; Spahn *et al*, 2013), les canaux ioniques à détection d'acides (ASIC) dans les neurones des ganglions spinaux et les courants postsynaptiques excitateurs générés par l'activation des récepteurs du glutamate situés dans la moelle épinière (Cai *et al*, 2014).

L'ensemble de ces phénomènes entraîne :

- ◆ Une diminution de la transmission des stimuli nociceptifs à tous les niveaux de l'axe neural (Zöllner and Stein, 2007) ;
- ◆ Une réduction de la libération présynaptique de neuromédiateurs excitateurs tels que le glutamate, le peptide relié à la calcitonine (CGRP) et la substance P (Trescot *et al*, 2008) ;
- ◆ En conséquence, une perception profondément réduite de la douleur (Stein, 2016).

## II.C.2 - Régulation (Stein, 2016)

Cette activation est finement régulée par la phosphorylation de domaines intracellulaires du récepteur opioïde par des kinases couplées aux GPCR. Ces kinases vont favoriser la liaison des molécules d'arrestine au récepteur opioïde. La formation d'un tel complexe va entraîner la désensibilisation du récepteur opioïde en empêchant le couplage de la protéine G et son internalisation via des voies dépendantes de la clathrine. Il existe alors deux options : soit le récepteur opioïde déphosphorylé est recyclé et réintégré dans la membrane plasmique rétablissant ainsi la transduction du signal, soit son ciblage par les lysosomes conduit à sa



dégradation. Ce sont les protéines de tri associées au GPCR qui modulent le tri lysosomal, et donc la régulation négative (*downregulation*) fonctionnelle des récepteurs opioïdes.

### II.C.3 - Interaction du système opioïdérique avec d'autres systèmes de neurotransmission

Les opioïdes sont connus pour interagir avec d'autres voies de neurotransmission. Ces voies incluent de manière non exhaustive :

- **Les systèmes dopaminergique, GABAergique et glutamatergique** : L'interaction avec le système dopaminergique jouerait un rôle important dans les mécanismes à l'origine des troubles de l'usage des opioïdes. Chez le rongeur, les opioïdes entraînent au niveau de la queue de l'aire tegmentale ventrale (tVTA) l'inhibition des neurones produisant de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) inhibant les neurones dopaminergiques de la VTA. De plus ils ont une action directe de stimulation des neurones glutamatergiques, eux même stimulateurs du système dopaminergique (Kaufling *et al*, 2016). Ce dernier mécanisme serait également impliqué dans les phénomènes d'hyperalgésie observés au cours des traitements par antalgiques opioïdes (Lee *et al*, 2011). Chez l'Homme plusieurs travaux (utilisant l'imagerie par la tomographie par émission de positons (TEP) couplée à des radiotraceurs se liant aux récepteurs opioïdes ou de la dopamine) ont également montré le rôle majeur de l'interaction entre les systèmes opioïdériques et dopaminergiques dans les mécanismes impliqués dans les troubles de l'usage d'alcool ou de cocaïne (Volkow, 2010).
- **Le système sérotoninergique** : Cette interaction a connu un intérêt grandissant au cours de ces dernières années. Elle résulte soit de l'inhibition du transporteur de la sérotonine (SERT - tramadol, meperidine, methadone, tapentadol et dextrométhorphan) aboutissant à l'augmentation des taux de sérotonine synaptique mais aussi possiblement par une interaction directe avec le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub> (fentanyl) (Baldo, 2018).
- **Le système histaminergique** : Les opioïdes entraînent de manière variable un relargage d'histamine. Celui-ci pourrait être en partie médié par les récepteurs opioïdes puisqu'il est bloqué par de fortes doses de naloxone (Baldo and Pham, 2012).

Enfin, les récepteurs de ces neurotransmetteurs sont fréquemment exprimés sur les mêmes neurones que les récepteurs opioïdes (Stein, 2016).

## II.D - Effets respiratoires des opioïdes

### II.D.1 - Rappels physiologiques et principaux déterminants anatomiques de la respiration

La respiration est un phénomène physiologique complexe, encore imparfaitement élucidé. Pendant l'inspiration, la descente du diaphragme (secondaire à sa contraction) et l'ascension de la cage thoracique par les muscles intercostaux externes permettent l'expansion des poumons et l'aspiration de l'air (Figure 23) (Del Negro *et al*, 2018).

L'expiration est passive au repos mais devient active dans diverses situations physiologiques (effort, parole) ou pathologiques. Elle implique alors la contraction des muscles abdominaux obliques et transverses et des muscles intercostaux internes. Ces deux phases ne sont possibles qu'en cas de perméabilité des voies aériennes supérieures. Celle-ci est assurée par la modulation de la contraction des muscles squelettiques de la langue (généioglosse, hypoglosse, styloglosse et stylo-hyoïdiens), de la glotte, du larynx et du pharynx, ainsi que par les muscles lisses des bronches. Les muscles sternocléidomastoïdiens et scalènes sont des muscles accessoires permettant de stabiliser la cage thoracique (Del Negro *et al*, 2018).

### **Elément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 23 - Anatomie et physiologie de la respiration - pF : région para faciale, préBötC : complexe preBötzinger (Source : De Negro, 2018)

D'un point de vue électrophysiologique, le cycle respiratoire peut être décomposé en trois phases distinctes : l'inspiration, la post-inspiration et l'expiration. La phase post inspiratoire est une phase active qui correspond à la phase toute initiale de l'expiration. Elle est marquée par 1) l'allongement du temps de contraction des muscles du diaphragme crural et 2) l'augmentation du raccourcissement des muscles constricteurs du larynx (entraînant une majoration des résistances des voies aériennes supérieures). Ces deux phénomènes vont retarder la déflation pulmonaire permettant d'augmenter la durée des échanges gazeux alvéolaires et d'éviter le collapsus des voies aériennes supérieures. La modulation de la

résistance des voies aériennes supérieures pendant la post-inspiration contribue également aux réflexes expulsifs et aux comportements non-respiratoires, tels que la déglutition ou la vocalisation (Dutschmann *et al*, 2014).

Trois régions intracérébrales sont particulièrement impliquées dans la régulation de ces phases : le complexe préBötzinger (préBötC - inspiration) (Smith *et al*, 1991), le complexe post-inspiratoire (Pi<sub>co</sub> - post-inspiration) (Anderson *et al*, 2016) et le noyau para facial latéral (PFL - expiration active) (Pagliardini *et al*, 2011) (Figure 24).

### Elément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 24 - Vue para sagittale du tronc cérébral contenant les centres respiratoires (Source : De Negro, 2018)

D'autres structures cérébrales sont également impliquées dans :

- La rythmicité de la respiration : formation réticulée intermédiaire ventrale liée au mouvement (vIRT), noyau sensoriel masticatoire principal du trijumeau (NVsnpr) ;
- Le contrôle des muscles modulant la résistance des voies aériennes supérieures : noyau moteur hypoglosse (XII), noyau ambigu (NA), noyau moteur facial (VII) et noyau moteur trijumeau (V) ;
- Le contrôle de la motricité des muscles respiratoires et dans l'intégration des stimuli sensitivomoteurs (barorécepteurs) : groupe respiratoire ventrale rostral (rVRG) composé essentiellement de neurones pré-moteurs destinés aux muscles phréniques et intercostaux externes (inspiratoire), groupe respiratoire caudal ventrale (cVRG) composé essentiellement de neurones pré-moteurs destinés aux muscles expiratoires ;
- L'intégration des stimuli chimiques (chémorecepteurs) : noyau para-facial ventral (PF<sub>V</sub>).

D'autres structures, dont les fonctions exactes restent mal connues, ont été décrites comme jouant un rôle dans la régulation du cycle respiratoire: le noyau Kölliker-Fuse (KF), le noyau

parabrachial (PB), le noyau du tractus solitaire (NTS), le complexe Bötzing (BötC) expiratoire, le locus coeruleus (LC), le cervelet et le noyau réticulé latéral (LRN) (Del Negro *et al*, 2018).

#### II.D.2 - Effets centraux des opioïdes sur la respiration

Les intoxications par opioïdes induisent une dépression respiratoire dont la sévérité dépend de la voie d'administration, de la dose et de la nature de l'opioïde impliqué (Dahan, 2007). Chaque opioïde semble avoir un profil de dépression respiratoire unique résultant de son profil pharmacologique (agoniste, agoniste partiel ou antagoniste) et/ou de sa capacité à interagir simultanément ou non avec les différents types de récepteurs (Imam *et al*, 2018; Kuo *et al*, 2015). A ce titre la buprénorphine a un profil particulier. Contrairement aux autres opioïdes qui induisent une dépression respiratoire dose-dépendante, la buprénorphine induit une dépression respiratoire plafonnée (Figure 25). Cette particularité est souvent attribuée à son effet agoniste partiel  $\mu$  (Dahan *et al*, 2005).

### **Elément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 25 - Effet du fentanyl et de la buprenorphine chez des volontaires sains sur la ventilation minute en fonction de la dose administrée (Source : Dahan *et al*, 2005)

La dépression respiratoire induite par les opioïdes associe deux composantes : la diminution de la fréquence respiratoire ( $f$ ) et la diminution du volume courant ( $V_T$ ). Ces deux composantes, et donc la dépression respiratoire induite par les opioïdes, sont attribuées à l'activation des récepteurs  $\mu$  centraux qui exercent une action inhibitrice sur les centres respiratoires (Imam *et al*, 2018).

La diminution de la fréquence respiratoire semble principalement liée aux effets inhibiteurs des opioïdes sur le préBötC (Gray *et al*, 1999; Manzke *et al*, 2003; Mellen *et al*, 2003; Montandon *et al*, 2011). Cette inhibition impliquerait des mécanismes présynaptiques (via la modulation de la fonction des canaux potassiques KCNQ) (Ballanyi *et al*, 2010; Wei and Ramirez, 2016) et postsynaptiques (via les récepteurs de la neurokinine-1) (Lalley, 2008; Montandon *et al*, 2011). L'inhibition des noyaux PB et KF jouerait également un rôle. L'application de [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol]-enkephalin (DAMGO - agoniste très sélectif des récepteurs opioïdes  $\mu$ ) sur le noyau KF entraîne notamment l'abolition de la phase post inspiratoire (Dutschmann and Herbert, 2006; Miller *et al*, 2017; Prkic *et al*, 2012). La diminution de la fréquence respiratoire est secondaire à l'allongement des temps inspiratoire et expiratoire (Chevillard *et al*, 2009).

La diminution du volume courant est liée en partie à la diminution de la perméabilité des voies aériennes supérieures secondaire à l'action inhibitrice des opioïdes sur les noyaux moteur hypoglosse (XII) et le KF (Dutschmann and Herbert, 2006; Hajiha *et al*, 2009; Levitt *et al*, 2015; Lorier *et al*, 2010). Il existe également une action inhibitrice des opioïdes sur la contractilité diaphragmatique (Ehsan *et al*, 2015; Stucke *et al*, 2015).

A ces deux composantes s'ajoute une action inhibitrice sur les chémorécepteurs et barorécepteurs. L'abolition de la réponse compensatrice en cas d'hypercapnie et/ou d'hypoxie semble liée à l'action inhibitrice des opioïdes sur la région du raphé médullaire caudal (MRR) et du noyau du tractus solitaire (NTS) (Zhang *et al*, 2007; 2009; 2011). Le groupe respiratoire ventral rostral (rVRG) serait la région au niveau de laquelle les opioïdes inhiberaient les barorécepteurs (Miyawaki *et al*, 2002).

Certains travaux ont suggéré l'implication des récepteurs  $\delta$  dans la survenue de la dépression respiratoire induite par les opioïdes ; mais cette hypothèse est actuellement infirmée (Dahan, 2007; Ling *et al*, 1985). Par ailleurs, l'activation des récepteurs  $\kappa$  semble être protectrice. L'agoniste sélectif des récepteurs  $\kappa$ , U-50-488H, n'induit pas de dépression respiratoire (Castillo *et al*, 1986) ; administré avec un agoniste sélectif des récepteurs  $\mu$ , il provoque la réversion de la dépression respiratoire (Dosaka-Akita *et al*, 1993).

D'autres voies de neurotransmission pourraient également jouer un rôle dans la modulation de la dépression respiratoire induite par les opioïdes :

- L'activation des récepteurs 5-HT<sub>4(a)</sub>, 5-HT<sub>7</sub> (sérotoninergiques) et D<sub>1</sub> (dopaminergique) prévient et reverse la dépression respiratoire induite par le fentanyl (Lalley, 2005; Manzke *et al*, 2003; Richter *et al*, 2003) ;
- L'administration d'un antagoniste des récepteurs  $\alpha$ 2-adrénérique ou d'inhibiteurs des cholinestérases atténue la dépression respiratoire induite par les opioïdes (Tsujiita *et al*, 2007; Vonhof and Sirén, 1991) ;
- La co-administration d'un antagoniste des récepteurs NMDA avec des opioïdes exacerbe la dépression respiratoire liée aux opioïdes (Hoffmann *et al*, 2003) ;
- En revanche, l'activation de la microglie ou des récepteurs GABA-A ne semble pas être directement impliquée (Takita *et al*, 2000; Zwicker *et al*, 2014).

### II.D.3 - Effets périphériques des opioïdes sur la respiration

Les effets périphériques des opioïdes sur la respiration proviennent majoritairement de leur action centrale sur les muscles des voies aériennes supérieures (Ehsan *et al*, 2015; Imam *et al*, 2018). Certains opioïdes, notamment le fentanyl, peuvent induire « un syndrome du thorax de bois » caractérisé par une rigidité de la paroi thoracique secondaire à la contraction des muscles abdominaux et intercostaux. Dans sa forme extrême, ce syndrome entraîne une rigidité complète du thorax empêchant toute ampliation thoracique et conduisant au décès. Le mécanisme de ce syndrome est imparfaitement connu mais serait également d'origine central et impliquerait le système dopaminergique (Çoruh *et al*, 2013).

Les récepteurs opioïdes sont présents en grande quantité sur les parois alvéolaires pulmonaires et les muscles lisses trachéaux et bronchiques. Cependant, leur rôle physiologique exact n'est pas clairement défini (Zebraski *et al*, 2000). Leur implication dans la survenue de la dépression respiratoire induite par les opioïdes reste à ce jour inconnue (Imam *et al*, 2018).

### III - Aspects cliniques de l'intoxication par opioïdes

#### III.A - Substances opioïdes incriminées

Actuellement, deux tendances sont observées concernant l'épidémiologie des opioïdes consommés lors des intoxications. La *première*, est l'augmentation dans les pays occidentaux des cas d'intoxication par le tramadol (Gummin *et al*, 2017; Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2013), secondaire à l'augmentation de la consommation mondiale de tramadol (Mendy, 2014). Ce phénomène est lié principalement au report des prescriptions/consommations vers le tramadol suite au retrait du dextropropoxyphène en Europe, à partir de 2009, et aux États-Unis, à partir de 2010. (Figure 26).

**Élément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 26 - Evolution de la consommation mondiale de tramadol entre 2000 et 2012 (Source : The Wall-Street journal)

La *seconde*, est l'arrivée sur le marché de « Nouveaux Produits de Synthèse (NPS) » opioïdes. Les NPS sont définis par l'Office des Nations unies contre la drogue et le crime (UNDOC) comme "*substances d'abus, sous une forme pure ou une préparation, qui ne sont pas contrôlées par la convention de 1961 sur les stupéfiants ou la convention de 1971 sur les*



*substances psychotropes, mais qui peut constituer une menace pour la santé publique "* ([www.unodc.org](http://www.unodc.org)). Le terme « Nouveaux » ne se réfère pas à l'invention de nouvelles molécules ; certains NPS ont été synthétisés pour la première fois il y a 40 ans. Il regroupe les substances stupéfiantes ou psychotropes non contrôlées par les conventions de 1961 et 1971. Parmi les 800 NPS recensés en 2017, 4% étaient des opioïdes (UNODC, 2018) (Figure 27). Les principaux NPS opioïdes sont le fentanyl dit « non pharmaceutique », les dérivés du fentanyl beaucoup plus puissants que la morphine ou que le fentanyl (Suzuki and El-Haddad, 2017). Trois molécules structurellement différentes du fentanyl (AH-7921, MT-45, et U-47700) ont récemment été décrites (Zawilska, 2017).

### **Élément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 27 - Répartition des NPS consommés dans le monde en 2017 (Source : United Nations Office on Drugs and Crime, Early Warning Advisory on NPS, 2017)

Aux États-Unis en 2016, les opioïdes les plus fréquemment incriminés dans les expositions/intoxications rapportés aux Centres Anti-Poison étaient par ordre de fréquence (Figure 28) : le tramadol suivi par l'oxycodone, l'héroïne, la buprénorphine, la morphine et la méthadone (Gummin *et al*, 2017). A la même date, les opioïdes les plus fréquemment identifiés dans les décès par overdose étaient par ordre de fréquence (Figure 28) : l'héroïne, les opioïdes naturels (morphine et codéine) et semi-synthétiques (majoritairement oxycodone, hydrocodone, hydromorphone, et oxymorphone), les opioïdes de synthèse autre que la méthadone (majoritairement le tramadol et le fentanyl), et la méthadone (Seth, 2018).

### Élément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 28 - Substances les plus souvent impliquées en 2016 dans les intoxications/expositions (tableau gauche) et décès par opioïdes (figure de droite) (Source : Gummin et al, 2017; Seth, 2018)

En Europe en 2016, comme vu plus haut, l'héroïne semble être l'opioïde le plus souvent consommé dans un contexte d'abus. C'est également l'opioïde responsable du plus grand nombre de décès. Néanmoins, l'augmentation observée du mésusage des opioïdes licites se traduit également par l'augmentation du nombre de décès qui leurs sont rapportés, notamment par overdose de tramadol (EMCDDA, 2017; Giraudon *et al*, 2016; UNODC, 2018).

En France, on peut noter que :

- Le nombre d'hospitalisations liées à des overdoses par opioïdes licites est supérieur au nombre d'hospitalisations liées à des overdoses par héroïne ou médicament de substitution des opiacés (Barreau *et al*, 2017) ;
- Le nombre de décès liés aux opioïdes licites est équivalent voire supérieur au décès par opioïde illicites (ANSM, 2018a; 2018b; Barreau *et al*, 2017) ;
- Le tramadol est aujourd'hui le médicament le plus fréquemment impliqué dans les décès liés aux antalgiques (ANSM, 2018a) ; son implication dans les intoxications/expositions a augmenté entre 2007 et 2013 (Cassier, 2014).

Enfin, les overdoses par opioïdes sont rarement isolées. Les poly-intoxications sont fréquentes avec d'autres psychotropes aggravant la dépression respiratoire (White et Irvine, 1999). Les psychotropes les plus souvent retrouvés au cours des intoxications par opioïdes sont les benzodiazépines notamment parce qu'elles potentialiseraient les effets euphorisants des opioïdes (Jones *et al*, 2012)

### III.B - Clinique

Le tableau clinique de l'intoxication par opioïde ou « overdose par opioïde » peut être défini par une entité clinique syndromique appelée « toxidrome opioïde ».

Ce toxidrome associe dans sa forme complète, un myosis punctiforme non réactif, un trouble de la vigilance (qui s'étend de la stupeur au coma) et une dépression respiratoire définie par une bradypnée inférieure ou égale à 12 cycles par minutes (voire une apnée) (Boyer, 2012) (Figure 29). L'association de ces trois signes pour le diagnostic d'une intoxication par opioïde a une sensibilité et une spécificité respectivement de 92% et 76%, (Hoffman *et al*, 1991). Néanmoins l'ensemble de ces signes cliniques sont rarement présents (Hoffman and Goldfrank, 1995).

**Elément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 29 - Clinique de l'intoxication par les opioïdes (Boyer, 2012)

La présence du seul myosis est insuffisante pour porter le diagnostic. Certains autres psychotropes (neuroleptiques, antiépileptiques, éthanol ...) peuvent provoquer un myosis avec coma mais ne sont pas associés à une dépression respiratoire (Alberto *et al*, 1989;

Mitchell *et al*, 1976; O'Malley *et al*, 1999; Schep *et al*, 2012) Le toxidrome cholinergique peut comporter un myosis (syndrome muscarinique) et une apnée (syndrome central) mais est associé à d'autres symptômes neurologiques et cardiovasculaires au premier plan (Giyawani *et al*, 2017). Inversement certains opioïdes (propoxyphène, tramadol, mépiridine) peuvent provoquer une mydriase associée à une dépression respiratoire (Clark *et al*, 1995; Zacny, 2005).

C'est en fin de compte la présence d'une dépression respiratoire clinique qui fait suspecter le diagnostic d'intoxication par opioïdes (Boyer, 2012). La dépression respiratoire peut être confirmée par la mesure des gaz du sang artériels montrant une hypoxémie associée à une hypercapnie responsable d'une acidose (O'Driscoll *et al*, 2017). L'hypoxémie peut être aggravée par un œdème pulmonaire non-cardiogénique (dont les causes restent imparfaitement connues) ou par une pneumopathie d'inhalation secondaire au coma (Sporer and Dorn, 2001). Au stade ultime, la dépression respiratoire entraîne un arrêt cardiaque hypoxique qui est la cause principale des décès au cours des intoxications par opioïdes.

Outre la dépression respiratoire, la survenue d'une hypothermie et/ou d'une rhabdomyolyse est fréquente. Elle est secondaire à l'immobilisation prolongée liée au coma. Beaucoup plus rarement, une insuffisance hépatique peut être rencontrée. Elle est alors secondaire à la toxicité du paracétamol fréquemment associée aux opioïdes dans les formulations commerciales antalgiques (Boyer, 2012). D'autres complications sont spécifiquement associées à certains opioïdes :

- Le tramadol, la mépiridine et le dextropropoxyphène peuvent être à l'origine de convulsions (Barkin *et al*, 2006; Clark *et al*, 1995; Sansone and Sansone, 2009) ;
- Le tramadol peut également entraîner un syndrome sérotoninergique dans 5% des cas (Spiller 1997) et les intoxications au dextropropoxyphène un effet stabilisant de membrane (Barkin *et al*, 2006) ;
- Enfin la méthadone est fréquemment associée à un allongement du QT dont le caractère dose-dépendant reste à démontrer (Alinejad *et al*, 2015).

### III.C - Prise en charge

La prise en charge en urgence des intoxications symptomatiques par opioïde (avec dépression respiratoire cliniquement significative et/ou coma) repose en premier lieu sur l'administration de naloxone afin d'éviter le recours à l'intubation orotrachéale (traitement de deuxième ligne) (Boyer, 2012). Dans les deux cas, naloxone ou ventilation mécanique, les buts recherchés sont de corriger l'hypoxie et l'hypercapnie secondaires à la dépression respiratoire et d'assurer la protection des voies aériennes supérieures.

La naloxone répond à la définition d'antidote selon l'OMS, à savoir « *une substance administrée spécialement dans le but de contrecarrer les effets toxiques d'un poison* » (<http://www.who.int>). La naloxone est un antagoniste compétitif des trois types de récepteur opioïde. Son administration au cours des intoxications par opioïde entraîne la réversion de l'ensemble des symptômes (myosis, dépression respiratoire et coma). Outre son effet thérapeutique, l'efficacité de la naloxone devant un syndrome opioïde permet d'en affirmer le diagnostic (test diagnostique pharmacodynamique) (Boyer, 2012).

La naloxone est administrée préférentiellement par voie intraveineuse. La voie orale n'est pas préconisée du fait de la faible biodisponibilité de la naloxone après ingestion compte tenu d'un premier passage hépatique important (Pond and Tozer, 1984). Il n'existe pas de dose à administrer à priori. La dose efficace est empirique et dépend de plusieurs paramètres (Berkowitz, 1976; Fishman *et al*, 1973; Tenenbein, 1984) : de la quantité d'analgésique opioïde prise ou reçue par le patient, de l'affinité relative de la naloxone pour le récepteur opioïde  $\mu$  par rapport à l'opioïde impliqué (loi d'action de masse), du poids du patient, du degré de pénétration de l'opioïde dans le cerveau et de l'existence d'un trouble de l'usage des opioïdes (chez les patients présentant un tel trouble, la dose de naloxone à administrer est souvent plus importante du fait d'un volume de distribution plus élevé et d'une demi-vie d'élimination plus longue comparée aux patients sans trouble de l'usage). Par conséquent, la naloxone doit être titrée progressivement (0,04 mg / 2 minutes) jusqu'à ce que la fréquence respiratoire soit supérieure à 15 cycles par minutes. Le but recherché n'est pas la normalisation du myosis ou de l'état de conscience qui exposeraient à un risque de surdosage. Un surdosage dans ce contexte est défini par l'apparition d'un syndrome de sevrage aux opioïdes caractérisé par un état d'agitation extrême (Rzasa Lynn and Galinkin,

2018). Compte-tenu de la demi-vie courte de la naloxone (entre 20 et 90 min) comparée à celle des principaux opioïdes impliqués dans les intoxications, un relai par voie intraveineuse à la seringue électrique est souvent nécessaire pour éviter la réapparition des effets toxiques des opioïdes (Rzasa Lynn and Galinkin, 2018). La dose à administrer est alors la dose ayant permis la réversion de la dépression respiratoire convertie en dose horaire.

L'échec de réversion est défini par des recommandations nationales. En France, l'échec de réversion est défini par la persistance d'une dépression respiratoire après l'administration de 2 mg de naloxone (Hantson and Bedry, 2006). Aux États-Unis, la dose retenue est de 15 mg (Boyer, 2012). Un échec de réversion doit faire discuter une intubation oro-trachéale et faire évoquer un diagnostic différentiel (cause structurelle, autre psychotrope). Elle peut également faire évoquer une intoxication par buprénorphine dont les effets respiratoires sont mal ou non reversés par la naloxone (Megarbane *et al*, 2010). Cette particularité serait liée à la forte affinité et à la très lente dissociation de la buprénorphine du récepteur  $\mu$  (Yassen *et al*, 2007).

Outre la voie veineuse, les administrations intramusculaires, sous-cutanée et inhalées de naloxone sont possibles. Les études pharmacocinétiques, bien qu'inhomogènes, montrent que chez le volontaire sain, la voie intramusculaires et intranasales sont peut différentes. Néanmoins le pic plasmatique de naloxone semble être obtenu plus précocement pour la naloxone intramusculaire (McDonald *et al*, 2017). Ces modalités d'administration sont donc à réserver pour les cas où l'administration intraveineuse est impossible. En effet, elles ne permettent ni d'assurer une titration fine de la dose de naloxone (exposant au risque de sevrage) ni d'administrer une dose d'entretien (pour empêcher la réapparition d'une dépression respiratoire). La voie inhalée, de part sa facilité d'utilisation, a de fait été choisie pour le développement de la naloxone « take home » (Nalscue<sup>®</sup> en France), mis à disposition de l'entourage d'un patient usager d'opioïdes, pour réverser une overdose éventuelle en réduisant la dépression respiratoire le temps de l'arrivée des secours. Cette politique préventive semble avoir porté des résultats très satisfaisants aux États-Unis, en ayant permis d'éviter des milliers d'overdoses aux opioïdes.



## Partie 2 : Problématiques et objectifs

---

### I - Contexte

Les intoxications par opioïdes sont un problème de santé publique majeur dans les pays occidentaux responsables de décès accidentels et précoces (Seth, 2018; The Council of Economic Advisers, 2017). Les mécanismes pharmacologiques à l'origine de la dépression respiratoire fatale observée au cours des intoxications par opioïdes sont globalement connus. Ceux-ci impliquent principalement une interaction de type « agoniste complet » des opioïdes avec le récepteur  $\mu$  (White and Irvine, 1999).

Néanmoins, deux molécules, la buprénorphine et le tramadol, présentent des profils de toxicité particuliers dont les mécanismes ne sont pas clairement élucidés. Leur meilleure caractérisation est d'autant plus importante que la consommation de ces deux molécules est en pleine croissance. La buprénorphine est de plus en plus utilisée en alternative à la méthadone dans le traitement de substitution aux opioïdes de par le monde (Wakeman and Barnett, 2018). La consommation de tramadol est quant à elle, en très forte augmentation depuis le retrait du dextropropoxyphène (Mendy, 2014).



## II - Problématiques : cas particuliers de la buprénorphine et du tramadol

### I.A - Buprénorphine

La buprénorphine haut dosage a reçu une autorisation de mise sur le marché en 1995 en France comme « médicament de substitution aux opiacés ». Dès le départ, sa prescription était possible par tout médecin de ville et sa dispensation autorisée dans toute officine de ville (contrairement à la méthadone dont la prescription initiale est réservée aux médecins exerçant en centres spécialisés ou en établissements de santé ) (Gatignol, 2009). Ces modalités d'accès à la buprénorphine ont longtemps représentés une spécificité française et ont été progressivement implémentées dans plusieurs pays d'Europe. Les États-Unis sont aujourd'hui en passe d'appliquer ce même modèle de prescription de la buprénorphine en réponse à la crise des opioïdes (Wakeman and Barnett, 2018).

Le choix de favoriser l'accès à la buprénorphine plutôt qu'à la méthadone a principalement été justifié par les effets respiratoires plafonnés (agoniste partiel  $\mu$ ) de la buprénorphine, qui lui confèrent une sécurité d'emploi théorique (Dahan *et al*, 2005). Cependant, dès les premières années de commercialisation, des décès ou des intoxications avec dépression respiratoire impliquant la buprénorphine ont été rapportés et liés à deux circonstances principales : le mésusage de la buprénorphine (comprimés pilés injectés) et surtout sa co-administration avec d'autres psychotropes, au premier rang desquels les benzodiazépines (Pirnay *et al*, 2004). La co-consommation fréquente de benzodiazépines chez les usagers d'opioïdes (estimée entre 50 et 70 %) peut être expliquée par leurs effets « positifs » sur les effets psychoactifs des opioïdes (Jones *et al*, 2012). La naloxone est peu ou pas efficace pour réverser le effets respiratoires de la buprénorphine (Megarbane *et al*, 2010), du fait de sa forte affinité et de sa très lente dissociation du récepteur  $\mu$  (Yassen *et al*, 2007).

Les études précliniques ont démontré la réalité de cette interaction entre buprénorphine et benzodiazépines sur la fonction respiratoire. L'administration de 90 mg/kg de buprénorphine par voie intra-péritonéale chez le rat (soit 80% de sa dose létale 50 - LD50) n'induisait pas d'acidose hypercapnique significative par rapport aux contrôles (Gueye *et al*, 2001). De même

l'administration de diazépam (20 mg/kg sous cutané) (Chevallard *et al*, 2009; Cohier *et al*, 2014; McCormick *et al*, 1984; Nielsen and Taylor, 2005), de midazolam (160 mg/kg intrapéritonéal) (Gueye *et al*, 2002), de flunitrazepam (40 mg/kg intraveineux) (Pirnay *et al*, 2008a), de clonazépam (5 mg/kg intraveineux), d'oxazepam (12 mg/kg intraveineux) ou de bromazepam (1 mg/kg) (Pirnay *et al*, 2008b) seuls n'entraînaient pas de dépression respiratoire cliniquement significative. En revanche, l'administration combinée d'une de ces benzodiazépines avec la buprénorphine était responsable d'une acidose hypercapnique significative et prolongée dans le temps (Gueye *et al*, 2002; Nielsen and Taylor, 2005; Pirnay *et al*, 2008a; 2008b). De manière intéressante, l'administration de flunitrazepam chez le rat divisait par 10 la LD50 de la buprénorphine alors qu'elle ne divisait que par 3 celle de la méthadone et n'avait pas d'effet sur celle de la morphine, suggérant un mécanisme d'interaction possiblement différent entre ces différents opioïdes avec les benzodiazépines (Borron *et al*, 2002). De même, l'administration de différentes benzodiazépines avec la buprénorphine chez le rat entraînait des profils de dépression respiratoire différents (Pirnay *et al*, 2008b).

Une étude clinique suggère également fortement l'implication des benzodiazépines dans la survenue d'une dépression respiratoire après intoxication par buprénorphine. Ce travail, réalisé en réanimation, comparait la réponse à la naloxone de patients intoxiqués par héroïne, méthadone ou buprénorphine. La dépression respiratoire observée n'était réversée que dans les deux premiers types d'intoxication. Celle observée chez les patients intoxiqués par la buprénorphine, était en revanche réversée par le flumazénil antagoniste compétitif des benzodiazépines (Figure 30) (Megarbane *et al*, 2010).

### **Élément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 30 - Réponse à la naloxone et/ou au flumazénil en fonction de l'opioïde détecté dans les urines à l'admission

Les mécanismes exacts impliqués dans cette interaction restent cependant inconnus (Jones *et al*, 2012) ; les hypothèses émises sont résumées dans la figure 31.

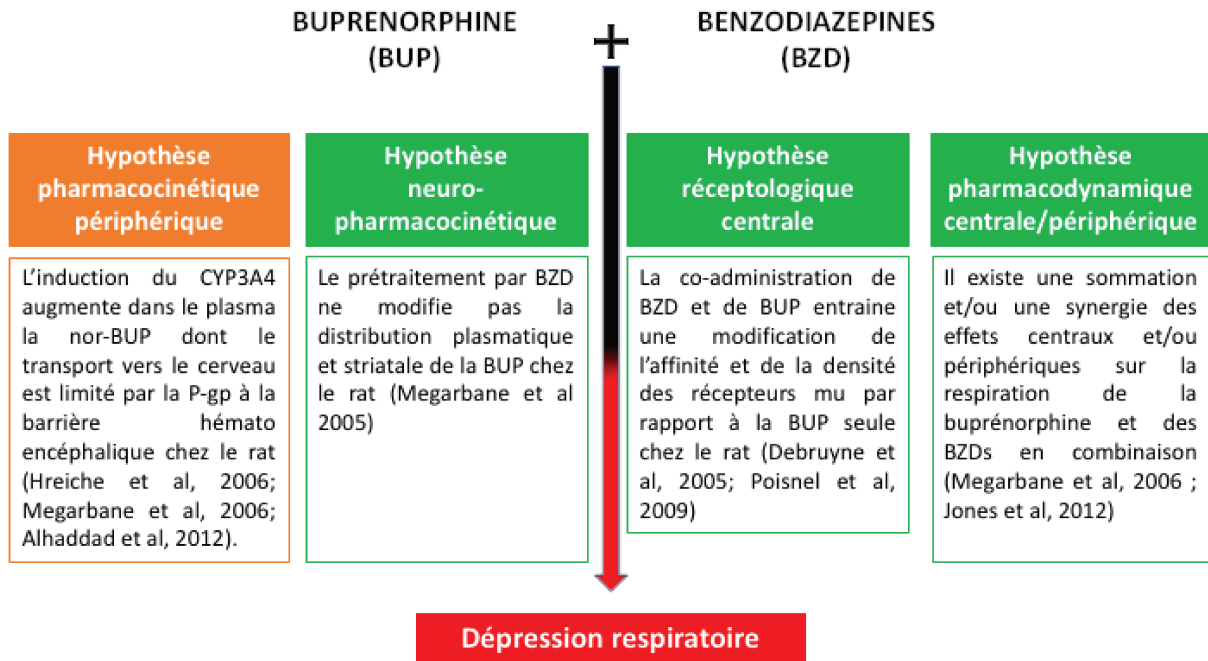


Figure 31 - Hypothèses émises sur les mécanismes impliqués dans l'interaction entre la buprénorphine et les benzodiazépines à l'origine d'une dépression respiratoire. (en orange hypothèses exclues, en vert hypothèses possibles non explorées ou incomplètement démontrées ; BUP : buprénorphine ; BZD : benzodiazépine)

Une interaction pharmacocinétique périphérique a été exclue. La buprénorphine est métabolisée par le cytochrome 3A4 en norbuprénorphine, un puissant dépressur respiratoire (Ohtani *et al*, 1997). Malgré une étude chez le rat montrant une augmentation modeste des concentrations de desméthyl-flunitrazépam (métabolite du flunitrazépam) après l'administration de buprénorphine et de flunitrazépam à très forte dose (40 mg/kg intraveineux), les données *in vitro* humaines n'ont pas confirmé une telle interaction (Kilicarslan and Sellers, 2000). Les études *in vivo* chez le rat et *in vitro* chez l'homme n'ont également pas mis en évidence d'altérations significatives du métabolisme de la buprénorphine en présence de diverses benzodiazépines (Megarbane *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2003). L'induction du cytochrome 3A4 par la dexaméthasone entraînait une augmentation de la concentration plasmatique de norbuprénorphine mais sans aggraver la dépression respiratoire (Hreiche *et al*, 2006). Cette discordance, entre les concentrations de norbuprénorphine et les effets respiratoires observés est vraisemblablement liée au rôle protecteur de la P-glycoprotéine, un transporteur d'efflux capable de limiter le passage cérébral de la norbuprénorphine au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Alhaddad *et al*, 2012).

L'hypothèse d'une interaction neuro-pharmacocinétique (distribution cérébrale) entre buprénorphine et les benzodiazépines a également été étudiée. La distribution dans le striatum, mesurée *in vivo* chez le rat par microdialyse, n'était pas différente, que la buprénorphine ait été administrée seule ou en combinaison avec une benzodiazépine (Megarbane *et al*, 2005). Néanmoins cette étude *in vivo* n'était limitée qu'à une seule région cérébrale.

Deux études chez le rat, utilisant une méthode d'autoradiographie *ex vivo*, ont mesuré la densité ( $B_{max}$ ) et l'affinité ( $K_D$ ) des récepteurs opioïdes  $\mu$  dans l'amygdale, le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus et le thalamus après administration aiguë de buprénorphine avec différentes benzodiazépines (clorazépate dipotassique, alprazolam, clonazepam, flunitrazepam, loprazolam et zolpidem) (Debruyne *et al*, 2005; Poisnel *et al*, 2009). La co-administration de ces benzodiazépines en combinaison avec la buprénorphine entraînait une différence significative régionale du  $B_{max}$  et du  $K_D$  des récepteurs  $\mu$  par rapport aux rats témoins n'ayant reçu que la buprénorphine. L'hypothèse d'une interaction réceptologique entre systèmes opioïdérique et GABAergique est plausible puisque les deux types de récepteurs sont exprimés au niveau cérébral (notamment dans les centres respiratoires) et jouent un rôle dans le contrôle du rythme respiratoire (Kalyuzhny *et al*, 2000). Néanmoins, l'autoradiographie était réalisée 24 h après administration des substances, ne permettant pas de conclure si ce mécanisme était responsable de la dépression respiratoire observée quelques minutes après l'administration. Par ailleurs, ces données obtenues *ex vivo* n'ont pas été étudiées *in vivo* rendant toute conclusion définitive difficile.

Enfin, certains auteurs ont suggéré que l'interaction buprénorphine/benzodiazépine résulterait de l'addition des effets pharmacodynamiques centraux et périphériques de chaque substance sur la respiration (Jones *et al*, 2012; Megarbane *et al*, 2006b). Les benzodiazépines entraînent, pour leur part, une obstruction des voies aériennes supérieures secondaire à la dilatation des muscles pharyngés et une dysfonction diaphragmatique. La buprénorphine, pour sa part, entraînerait une diminution de la réponse physiologique à l'hypoxie, l'hypercapnie et à l'obstruction des voies aériennes (Megarbane *et al*, 2006a). Cependant, les preuves concernant cette hypothèse font encore défaut (Jones *et al*, 2012).

## I.B - Tramadol

Le tramadol est un agoniste faible des récepteurs  $\mu$  utilisé comme antalgique de palier 2. Comme autre propriété pharmacologique, il inhibe la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine (Hassamal *et al*, 2018). Les intoxications par tramadol sont aujourd'hui les plus fréquentes des intoxications par opioïdes de synthèse aux États-Unis (Gummin *et al*, 2017). En Europe, comme en France, leur fréquence exacte reste peu connue ; mais on observe une augmentation des décès impliquant le tramadol (ANSM, 2018a; EMCDDA, 2017).

La survenue d'un toxidrome opioïde avec dépression respiratoire est possible mais semble moins fréquente en cas d'intoxication par tramadol en comparaison aux intoxications par opioïdes forts (probablement du fait de l'activité agoniste faible du tramadol sur le récepteur  $\mu$ ). Dans les études rétrospectives, les intoxications par tramadol sont associées à une dépression respiratoire dans 0,5 à 4,8% des cas (Marquardt *et al*, 2005; Spiller *et al*, 1997; Tsutaoka *et al*, 2015). Une étude prospective rapportait un chiffre plus élevé de 14,8% (Hassanian-Moghaddam and Rashidi, 2008).

Les deux particularités cliniques de l'intoxication par tramadol résident dans la survenue possible de convulsions (très fréquemment) et/ou d'un syndrome sérotoninergique (beaucoup plus rarement). L'exacte incidence du syndrome sérotoninergique (caractérisé par une mydriase, une hyperthermie, des troubles de la vigilances, une rigidité musculaire, des myoclonies, des troubles digestifs et parfois des convulsions) est inconnue et semble favorisée par la co-consommation de médicaments sérotoninergiques (Boyer and Shannon, 2005; Hassamal *et al*, 2018). La survenue de convulsions est mieux documentée et surviendrait dans 15% des intoxications par tramadol (Spiller *et al*, 1997). Les convulsions se présentent typiquement comme des crises convulsives tonico-cloniques généralisées survenant dans les 4-6 heures suivant l'intoxication (Jovanović-Cupić *et al*, 2006) ; la survenue de crises récurrentes ou d'état de mal épileptique est possible (Shadnia *et al*, 2012; Taghaddosinejad *et al*, 2011; Talaie *et al*, 2009). Le tramadol était en 2007 le quatrième médicament le plus fréquemment impliqué dans les convulsions rapportées par les centres anti-poison américains (Thundiyl *et al*, 2007). La survenue de convulsions semble être dose-dépendante (Ahmadimanesh *et al*, 2018).

Ces données cliniques ont été complétées par des études précliniques chez le rongeur confirmant la survenue de convulsions suite à l'administration d'une dose toxique de tramadol (75% de la LD50) mais aussi à la dose de 45 mg/kg (40% de la LD50), considérée comme une dose antalgique forte chez le rat (Lagard *et al*, 2016). En revanche, la dose de 30 mg/kg, considérée comme une dose antalgique modérée chez le rongeur, ne provoquait pas de convulsions (Potschka *et al*, 2000).

Les convulsions observées au cours des intoxications par tramadol ont longtemps été attribuées au syndrome sérotoninergique qui peut entraîner à lui seule des convulsions (Boyer and Shannon, 2005). Selon cette hypothèse, elles seraient secondaires à l'augmentation des concentrations de sérotonine notamment au niveau des sous-types de récepteurs A1 et A2 (Boyer and Shannon, 2005; Sternbach, 1991). Néanmoins des études animales récentes ont remis en question ce mécanisme. En effet, le prétraitement par la cyproheptadine (antidote du syndrome sérotoninergique) ou par la combinaison de 5-hydroxytryptophane/benserazide (augmentant la concentration cérébrale de sérotonine et potentialisant théoriquement la survenue de convulsions) étaient sans effet sur la survenue de convulsions (Fujimoto *et al*, 2015; Lagard *et al*, 2016).

Des interactions avec d'autres voies de neurotransmissions ont en revanche été évoquées à partir de données *in vitro* et *in vivo* résumées dans la figure 32.

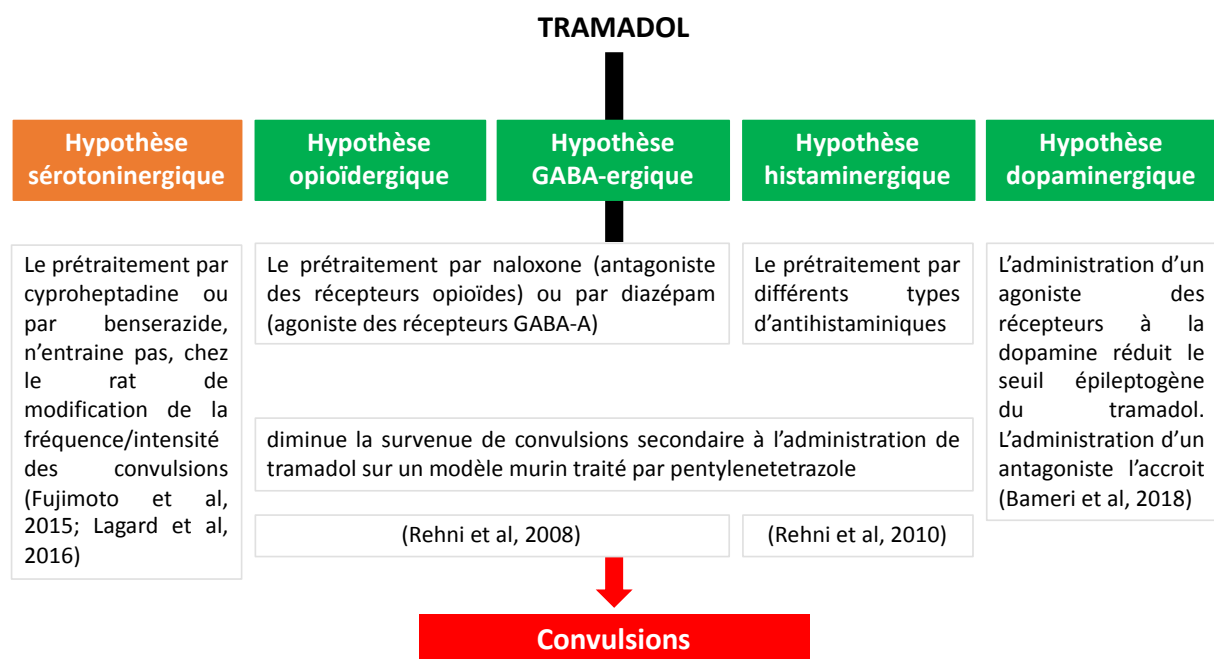


Figure 32- Hypothèses concernant les voies de neurotransmission impliquées dans la survenue des convulsions liées au tramadol (en orange hypothèses peu probables, en vert hypothèses possibles)

Ces interactions concerneraient le :

- **Système GABAergique** : *In vitro*, l'incubation d'œufs de xénope exprimant des récepteurs GABA-A humains avec de fortes concentrations de tramadol entraînait une inhibition des récepteurs GABA-A (Hara *et al*, 2005). *In vivo*, chez des rats traités par une dose convulsivante de tramadol (75 mg/kg intrapéritonéal), le prétraitement ou l'administration 15 min après de diazépam, prévenait la survenue des convulsions sans aggraver la dépression respiratoire observée avec le tramadol seul (Lagard *et al*, 2016; 2018). L'implication du système GABAergique était également suggérée dans une étude humaine montrant une diminution de la survenue de convulsions lorsque le tramadol était ingéré avec d'autres psychotropes dont des benzodiazépines (Ahmadimaneh *et al*, 2018). Néanmoins, les benzodiazépines étant des agonistes des récepteurs GABA-A, ont une activité antiépileptique propre empêchant toute conclusion définitive à partir des études *in vivo* publiées. Par ailleurs les données *ex vivo* sur les œufs de xénopes doivent être confirmées par des études *in vivo*.
- **Système opioïdergique** : Les données sur le système opioïdergique sont contradictoires. Une étude *in vivo* a montré que le prétraitement par naloxone permettait de diminuer l'occurrence et la sévérité des crises induites par le tramadol chez des souris ayant un seuil épiléptogène abaissé par un traitement par pentylènetétrazole (Rehni *et al*, 2008). Une seconde étude *in vivo* cette fois-ci chez le rat a, en revanche, montré que l'administration de naloxone 15 min après une dose convulsivante de tramadol (75 mg/kg intrapéritonéale) ne permettait pas de faire cesser les convulsions induites par le tramadol voire même les aggravait (Lagard *et al*, 2018). Dans les études cliniques, cette même discordance était observée. Les études rétrospectives ont montré que l'administration de naloxone entraînait une augmentation (Shadnia *et al*, 2012), une diminution (Eizadi-Mood *et al*, 2014) ou n'influaient pas (Tashakori and Afshari, 2010) sur le risque de convulsions induites par le tramadol. Les études prospectives ont montré que l'administration d'une forte dose unique de naloxone (0,8 mg) entraînait une augmentation des convulsions chez les patients intoxiqués par tramadol (Farzaneh *et al*, 2012) alors qu'une dose titrée plus faible (0,05 mg toutes les 3 à 5 minutes) était protectrice (Saidi *et al*, 2010).
- **Système histaminergique** : Cette hypothèse repose sur une étude *in vivo* réalisée sur des souris ayant un seuil épiléptogène abaissé par un traitement par pentylènetétrazole

(Rehni *et al*, 2010). Cette étude a montré qu'un prétraitement par antihistaminique (cétirizine, fexofenadine) permettait de diminuer l'occurrence et la sévérité des crises convulsives induites par le tramadol. Le prétraitement par acide cromoglicique (qui inhibe la libération mastocytaire d'histamine) ayant un effet identique dans la prévention des crises convulsives induites par le tramadol, les auteurs ont conclu au probable rôle du système histaminergique dans la survenue des crises convulsives induites par le tramadol. Néanmoins, le modèle choisi (identique à celui utilisé par la même équipe pour la naloxone) est sujet à caution du fait de la sensibilisation des animaux par pentylènetétrazole.

- **Système dopaminergique** : Cette dernière hypothèse est la plus récente. Dans une étude *in vivo* chez la souris, il a été montré que le prétraitement par halopéridol (antagoniste des récepteurs dopaminergiques) ou par cabergoline (agoniste des récepteurs dopaminergique) augmentait ou diminuait respectivement la survenue des convulsions induites par le tramadol (Bameri *et al*, 2018). Néanmoins, les systèmes dopaminergiques jouant un rôle crucial dans la survenue de convulsions, il est difficile de conclure sur ces résultats, chaque molécule jouant possiblement par elle-même un rôle pro- ou anti-convulsivant.

Une hypothèse pharmacocinétique a également été évoquée. Le tramadol est métabolisé par *O* et *N*-déméthylation et par des réactions de conjugaison permettant la formation de conjugués principalement de type glucuronides, éliminés principalement, comme le tramadol, par voie rénale (Figure 33) (Gong *et al*, 2014).

L'*O*-déméthylation du tramadol en son principal métabolite l'*O*-desméthyltramadol (M1), est catalysée par le cytochrome P450 (CYP) 2D6. La *N*-déméthylation en *N*-desméthyltramadol (M2) est catalysée par le CYP2B6 et le CYP3A4 (Paar *et al*, 1992; 1997; Subrahmanyam *et al*, 2001). M1 et M2 sont ensuite métabolisés en métabolites secondaires : le *N,N*-didésthméthyltramadol (M3) et le *N,O*-didésthméthyltramadol (M5), puis en *N,N,O*-tridésthméthyltramadol (M3) (Subrahmanyam *et al*, 2001). Parmi tous ces métabolites, seuls M1 et M5 sont pharmacologiquement actifs. M1 a une affinité significativement plus élevée pour les récepteurs opioïdes  $\mu$  ( $K_i = 0,0034\mu\text{M}$ ) que le tramadol ( $K_i = 2,4\mu\text{M}$ ) produisant un effet analgésique plus important (Gillen *et al*, 2000). M5 est également agoniste des récepteurs  $\mu$  mais ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique (Grond and Sablotzki,



2004; Reeves and Burke, 2008). A ce jour il n’y a aucune donnée dans la littérature montrant qu’un de ces métabolites pourrait être à l’origine des convulsions observées au cours des intoxications par tramadol, notamment chez les patients présentant une induction des différents cytochromes impliqués. Les cinétiques du tramadol et de ses métabolites sur un modèle de convulsions au tramadol tendent même à contredire cette hypothèse (Lagard *et al*, 2016).

**Elément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 33- Métabolisme du tramadol (d’après Gong *et al*. 2014)

### III - Objectifs du travail de thèse

Les objectifs de ce travail de thèse étaient de formuler et de tester les hypothèses permettant d'expliquer les mécanismes de toxicité impliqués dans les effets cliniques décrits spécifiquement au cours des intoxications par buprénorphine et tramadol.

Pour la buprénorphine, il s'agissait d'étudier les hypothèses neuropharmacocinétiques, receptologiques et pharmacodynamiques à l'origine de la dépression respiratoire observée au cours de l'interaction benzodiazépine/buprénorphine. Pour le tramadol, il s'agissait d'étudier les différentes voies de neurotransmission possiblement impliquées dans les convulsions observées au cours des intoxications.

Nous avons, pour cela, choisi de développer une approche multimodale privilégiant au maximum une approche *in vivo* mimant au mieux la réalité clinique et incluant des éléments pharmacodynamiques (pléthysmographie, électromyogramme, gaz du sang, analyse comportementale) et neuro-pharmacocinétiques (imagerie par tomographie à émission de positons (TEP), dosages des monoamines cérébrales).

La mise au point des procédures d'acquisition et d'analyse des données TEP ont fait l'objet d'un premier travail méthodologique permettant d'introduire l'utilisation et la pertinence de cette modalité d'imagerie translationnelle à des fins d'études neuropharmacologiques et neurotoxicologiques en parallèle de la mesure de paramètres pharmacodynamiques (Projet 1, en collaboration avec Adeline Duchêne). Cette méthodologie a ensuite été utilisée, en association avec la mesure de paramètres toxicodynamiques, pour l'étude des mécanismes de la toxicité respiratoire de la buprénorphine (Projet 2), et des mécanismes de la neurotoxicité du tramadol (Projet 3 en collaboration avec Camille Lagard).



## Partie 3 : Section expérimentale

---

### I - Conditions générales

#### I.A - Laboratoires d'accueil

Les travaux expérimentaux présentés dans cette thèse ont été conduits au sein des laboratoires

- « **Variabilité de Réponse aux Psychotropes** » (INSERM UMR-S 1144, Faculté de Pharmacie, Paris) dirigé par Monsieur le Professeur Jean-Luc LAPLANCHE. Ils ont plus précisément été conduits au sein de l'équipe 3 dirigée par Monsieur le Professeur Bruno MEGARBANE.

- « **Imagerie Moléculaire In Vivo** » (UMR 1023 Inserm, CEA, Université Paris Sud, ERL 9218 CNRS, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Orsay) dirigé par Madame Irène BUVAT. Ils ont plus précisément été conduits au sein de l'équipe Investigations Cliniques dirigée par Monsieur le Docteur Nicolas TOURNIER.

#### I.B - Financement

Ce doctorat a été financé pendant 2 ans par un poste d'accueil mi-temps APHP-CEA en parallèle d'une activité clinique de réanimation à l'hôpital Henri Mondor à Créteil. Le travail d'imagerie a été principalement financé grâce à un contrat de recherche réalisé avec la société Theranexus (Projet 1). La finalisation de ce travail de thèse a notamment été rendue possible grâce à un contrat INSERM de 4 mois à plein temps à l'UMR 1023 (financement ANR-16-CE17-0011-01).

#### I.C - Aspects réglementaires

Les procédures expérimentales présentées dans cette thèse ont été réalisées conformément au cadre réglementaire français et européen relatif à l'expérimentation animale. Ces

procédures ont bénéficié d'un accord favorable du comité d'éthique animal de l'Université Paris-Descartes (N° P2.BM.128.10) et du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (N°-APAFIS#5285-2017031714499381v2 et N°-APAFIS#7466-2016110417049220v2).

## II - Matériel

### II.A - Animaux

Les procédures expérimentales ont été réalisées chez des rats sains de type Sprague-Dawley (éleveur Janvier, France) de 250-300 grammes le jour de l'expérimentation. Nous avons choisi cette espèce compte tenu des modèles de toxicité respiratoire et neurologique des opioïdes déjà développés au sein du laboratoire « Variabilité de Réponse aux Psychotropes » (Chevallard *et al*, 2009; Lagard *et al*, 2016).

Les rats étaient livrés aux laboratoires au moins 5 jours avant l'expérimentation. Ils étaient hébergés par cage de 2 ou 3 animaux dans une animalerie aux conditions thermométriques (21-22°C), hygrométriques et d'éclairage (cycle de lumière/obscurité de 12h/12h) strictement régulées. L'accès à l'eau et à la nourriture n'était pas restreint. Un suivi clinique des rats était réalisé par la mesure régulière de leur poids corporel et de leurs ingestats (alimentation et eau) et la recherche de signes de stress tels que l'apparition d'une chromodacryorrhée et de stéréotypies.

### II.B - Produits

#### II.B.1 - Anesthésie

La kétamine (Clorkétam® 1000) était utilisée en solution injectable à 50 mg/ml (Vétoquinol).

La xylazine (Rompun®) était utilisée en solution injectable à 20 mg/ml (Bayer).

L'isoflurane était utilisé à des concentrations de 2% (Forene®) ou 4% (Vetflurane®) dans l'air inspiré et administré par système d'administration Minerve (Abb vie, Virbac).

#### II.B.2 - Euthanasie

Le pentobarbital sodique était utilisé en solution injectable à 50 mg/mL (CEVA santé).

#### II.B.3 - Traitements

Le modafinil en poudre (Orchid Pharma) était solubilisé dans du diméthylsulfoxyde (Sigma-Aldrich) puis dilué dans du sérum physiologique pour obtenir une solution injectable à la concentration de 10 mg/ml.

Le flécaïnide en poudre (Sigma-Aldrich) était solubilisé dans du diméthylsulfoxyde (Sigma-Aldrich) puis dilué dans du sérum physiologique pour obtenir une solution injectable à la concentration de 1 mg/ml.

Le diazépam en poudre (Sigma-Aldrich) était solubilisé dans du Tween 10% ou du Tween 4% (respectivement obtenus par dilution du Tween 20% (Sigma-Aldrich) avec du sérum physiologique) pour obtenir une suspension à la concentration de 2 ou 20 mg/ml. Le diazépam (Valium®) était également utilisé en solution injectable à la concentration de 5mg/ml (Roche).

La poudre d'hydrochloride de buprénorphine (Sigma-Aldrich) était solubilisée dans du Tween 10% (obtenu par dilution du Tween 20% (Sigma-Aldrich) avec du sérum physiologique) pour obtenir une suspension à la concentration de 30 mg/ml. La buprénorphine était également utilisée sous sa forme pharmaceutique injectable (Temgesic®) concentrée à 0,3 mg/ml (Rb pharma ltd).

Le chlorhydrate de tramadol (Contramal®) était dilué dans de l'eau pour préparation injectable pour obtenir une solution à la concentration de 44 mg/ml (Grünenthal GmbH).

#### II.B.4 - Prétraitements

La poudre de dihydrochloride de naloxonazine (Sigma-Aldrich) était solubilisée dans de l'eau distillée pour obtenir une solution de naloxonazine concentrée à 10 mg/kg.

La poudre de dihydrochloride de nor-binaltorphimine (Sigma-Aldrich) était solubilisée dans de l'eau distillée pour obtenir une solution de nor-binaltorphine concentrée à 5 mg/kg.

La poudre de dihydrochloride de naltrindole (Sigma-Aldrich) était solubilisée dans de l'eau distillée pour obtenir une solution de naltrindole concentrée à 3 mg/kg.

La poudre de dihydrochloride de flumazénil (Sigma-Aldrich) était solubilisée dans du Tween 10% (obtenu par dilution du Tween 20% (Sigma-Aldrich) avec du sérum physiologique) pour obtenir une suspension de flumazénil concentrée à 10 mg/kg.

La poudre de saclofène (Sigma-Aldrich) était solubilisée dans du sérum physiologique pour obtenir une solution de saclofène concentrée à 11,2 mg/kg.

Les comprimés de cyproheptadine (Périactine®), étaient pilés puis dissouts dans du sérum physiologique afin d'obtenir une solution de cyproheptadine concentrée à 8 mg/ml (Teofarma S.r.l).

La naloxone a été utilisée pure en solution injectable concentrée 0,4 mg/ml (Aguettant).

Les comprimés de fexofénadine (Telfast®), étaient pilés puis dissouts dans du sérum physiologique afin d'obtenir une solution de fexofénadine concentrée à 15 mg/ml (Sanofi-Aventis).

## II.C - Radiotraceurs

Au cours de ces travaux, trois radiotraceurs ont été utilisés : le [<sup>18</sup>F]-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (<sup>18</sup>F-FDG). Le <sup>18</sup>F-FDG a été obtenu commercialement (Cyclopharma, France). La production de la <sup>11</sup>C-buprénorphine et du [<sup>11</sup>C]-flumazénil a été réalisée par l'équipe de radiochimie du Service Hospitalier Frédéric Joliot. Ces radiotraceurs correspondent aux analogues chimiques strictes de la buprénorphine et du flumazénil utilisés comme médicaments. Compte tenu de la période très courte du carbone 11 (20 minutes), les traceurs marqués au carbone 11 (<sup>11</sup>C-buprénorphine et <sup>11</sup>C-flumazénil) étaient produits extemporanément, selon une méthode déjà validée (Jewett, 1992; Luthra *et al*, 1987).

La qualité des produit radiomarqués au SHFJ, était systématiquement contrôlée par la recherche d'impuretés et par la mesure de la radioactivité spécifique (rapport entre la radioactivité mesurée à un temps t sur la masse molaire totale de la molécule d'intérêt contenue dans le radiotraceur).



### III - Procédures d'anesthésie et d'euthanasie

#### III.A - Anesthésie

Pour toutes les procédures chirurgicales invasives (cathétérisme artériel fémoral, cathétérisme veineux jugulaire, implantation péritonéale du boitier de télémétrie, implantation des électrodes d'électroencéphalographie et d'électromyographie), les animaux étaient anesthésiés par l'administration intra-péritonéale (i.p.) de 50 mg/kg de kétamine (Ketalar®) et 10 mg/kg de xylazine (Rompun®).

Pour prélever les cerveaux, les animaux étaient anesthésiés par un mélange d'oxygène et d'isoflurane à 4%.

Pour l'imagerie TEP, un mélange d'oxygène et d'isoflurane à 2% était utilisé (cathétérisme de la veine caudale, acquisition dynamique).

Dans tous les cas, le rat était positionné sur un tapis chauffant afin de maintenir sa température corporelle. La profondeur de l'anesthésie était évaluée par une immobilité complète de l'animal, un coma profond et l'absence de réponse à une stimulation douloureuse de la patte. Après chirurgie invasive, les rats étaient isolés dans une cage individuelle afin de leur assurer une récupération optimale avant expérimentation.

#### III.B - Euthanasie

Les animaux étaient euthanasiés en fin de procédure (sauf lorsque les cerveaux étaient récupérés) par l'injection d'une dose létale de pentobarbital sodique i.p. ou par décapitation sous anesthésie.

## IV - Procédures de pose des cathéters artériels ou veineux, d'implantation des sondes de télémétrie et d'électromyographie

### IV.A - Pose des cathéter artériels et veineux tunnelisés

Les cathéters utilisés étaient des cathéters en Silastic® (diamètre interne 0,51 mm, diamètre externe 0,94 mm - Dow Corning Co). Pour pouvoir prélever un échantillon de sang artériel, un cathéter de 30 cm de long était implanté dans l'artère fémorale gauche, 3 jours avant l'expérimentation sous anesthésie générale par kétamine/xylazine i.p. Pour pouvoir injecter les traitements par voie intraveineuse (i.v), un cathéter en silastic de 60 cm de long était implanté dans la veine jugulaire 7 jours avant l'expérimentation sous anesthésie générale par kétamine/xylazine i.p. Les cathéters étaient tunnelisés sous la peau et fixés à la nuque pour éviter leur arrachement par l'animal. À la fin de la chirurgie, de l'héparine (Choay®, Sanofi) diluée dans du sérum physiologique, était injectée dans le cathéter pour en éviter l'occlusion. Pour l'injection du radiotracteur, un autre type de cathéter veineux (Jelco®, Smiths Medical International Ltd, 24 gauges) était inséré dans une veine caudale quelques minutes avant l'injection sous anesthésie générale par isoflurane 2%.

### IV.B - Implantation des sondes de télémétrie

Pour mesurer la température corporelle de l'animal, une sonde de télémétrie (DSI) était implantée 72 heures avant l'expérimentation dans le péritoine de l'animal sous anesthésie générale par kétamine/xylazine i.p.

### IV.C - Implantation des électrodes d'électromyographie

Pour mesurer la différence de potentiel entre deux sites du diaphragme, des sondes constituées de deux fils multibrins en acier inoxydable et raccordés à un boîtier de télémétrie (DSI) étaient implantées sous anesthésie générale par kétamine/xylazine i.p. Une procédure

chirurgicale longue (30 min, ouverture de la cavité abdominale puis exposition du diaphragme) était nécessaire pour fixer les sondes (colle biologique 3M®) sur deux sites du diaphragme costal, de part et d'autre de l'œsophage (Fat-Chun Tony Chang and Harper, 1989). Compte tenu de la lourdeur de l'intervention, les animaux étaient implantés au moins 5 jours avant l'expérimentation.

## V - Analyse *in vivo* de la fonction respiratoire

### V.A - Pléthysmographie corps entier sur animal vigilant

#### V.A.1 - Principe

La pléthysmographie corps entier est une technique non-invasive sur animal vigilant, permettant l'exploration de la fonction respiratoire par l'estimation des volumes et des temps respiratoires. Son principe est basé sur l'application de la théorie des gaz parfaits et repose sur la mesure de la variation de pression ( $\Delta P$ ) entre l'air inspiré et expiré par l'animal au sein d'une enceinte close. Le réchauffement et la saturation en vapeur d'eau de l'air inspiré lors de son passage dans les poumons de l'animal engendrent une augmentation de pression. À l'inverse, le refroidissement et la désaturation en eau de l'air expiré entraînent un retour à la pression de base de l'enceinte (Bartlett and Tenney, 1970).

#### V.A.2 - Description du pléthysmographe

Le pléthysmographe est constitué de deux enceintes en plexiglas d'une capacité de 5 litres chacune (volume adapté pour des rats de 250 à 350g) (Figure 34).

Une des enceintes est destinée à accueillir l'animal (A). L'autre sert de chambre de référence (B). L'enceinte destinée à recevoir l'animal est munie d'orifices d'entrée (air comprimé humidifié 5-10 l/min) et de sortie (C) d'air et d'un orifice plus petit (D) pouvant accueillir une seringue de 1 ml nécessaire à la calibration. Les deux boîtes sont reliées entre-elles de deux manières. D'une part, un tuyau présentant un rétrécissement serré (E) permet une équilibration lente des températures et des pressions entre les deux enceintes sans interférer avec le signal lors de l'enregistrement. D'autre part, un capteur différentiel (F) de pression (Validyne MP, 45 +/- 3 cm H<sub>2</sub>O, Northridge, CA) permet de mesurer la variation de pression ( $\Delta P$ ) entre les deux enceintes. Cette variation de pression est ensuite transformée en un signal électrique modulé via un intégrateur (PCI-DAS1000, DSI, Chatillon, France). Ce signal est visualisé sur l'écran sous forme d'un tracé évoluant entre + 6 000 et - 6 000 mV (G).

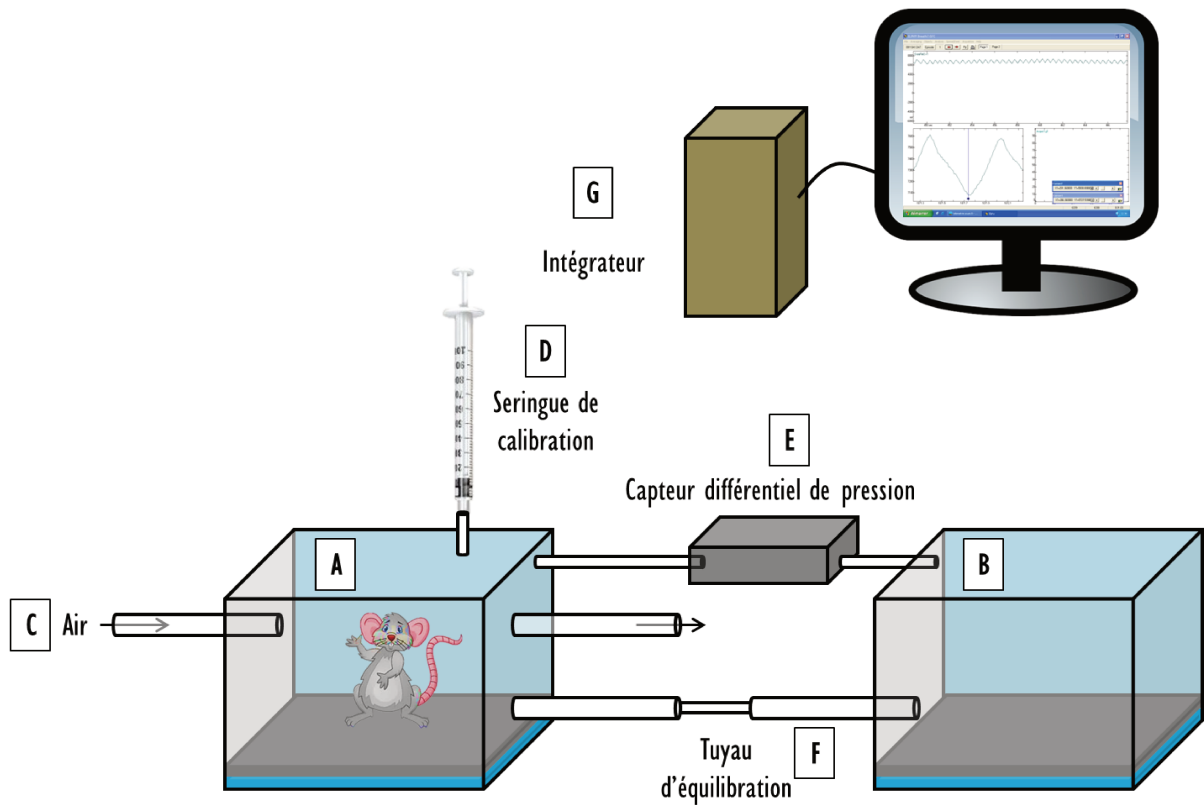


Figure 34 - Schéma du pléthysmographe (Source : Bartlett et Tenney, 1975)

A proprement dit, la pléthysmographie vigile corps entier permet de mesurer le volume courant ( $V_T$ ) (les autres paramètres étant déduits par l'exploitation informatique des données) suivant la relation proportionnelle suivante :

$$V_T = \frac{P_T}{P_K} \times V_K \times \frac{T_R (P_B - P_C)}{T_R (P_B - P_C) - T_C (P_B - P_R)}$$

$V_T$ = volume courant	$T_R$ = température corporelle de l'animal
$V_K$ = volume d'air injecté dans la chambre de l'animal pour la calibration.	$T_C$ = température de la chambre
$P_T$ = déviation de pression associée à chaque $V_T$	$P_B$ = pression barométrique
$P_K$ = déviation de pression associée à l'injection du volume de calibration	$P_R$ = pression de la vapeur d'eau à la température corporelle de l'animal
	$P_C$ = pression de la vapeur d'eau dans l'enceinte de l'animal

Par conséquent, la mesure de la variation de pression intègre la température corporelle de l'animal, la pression atmosphérique et la température à l'intérieur et à l'extérieur de l'enceinte. La mesure de la température corporelle de l'animal est mesurée par une sonde de télémétrie (DSI) implantée 72 h avant l'expérimentation dans le péritoine de l'animal. La

pression atmosphérique et la température à l'intérieur et à l'extérieur de l'enceinte sont mesurées par des sondes de télémétrie infrarouge.

V.A.3 - Validation de la méthode

Pour que les mesures effectuées soient reproductibles et valides, un certain nombre de conditions doivent être vérifiées avant la procédure expérimentale. Ces conditions sont détaillées dans le tableau ci-dessous (Tableau 2) :

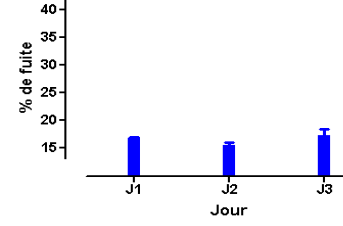
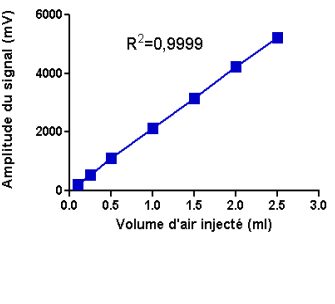
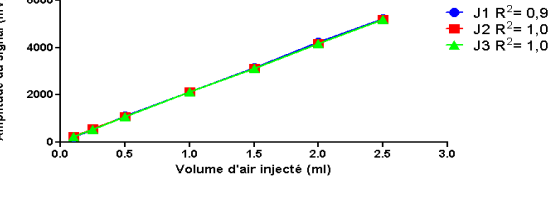
<p><b>Test de fuite</b></p>	<p>La présence d'une fuite correspondait à la diminution de l'amplitude du signal de plus de 33% en 5 s. Les tests d'étanchéité (10 mesures répétées pendant 3 jours) ont été satisfaisants. Un test de fuite était réalisé quotidiennement avant chaque expérience.</p>																										
<p><b>Seuils de détection et de quantification</b></p>	<p>Pour obtenir un déflexion 3 fois supérieure au bruit de fond (limite de détection), le volume minimum d'air à injecter était de 15,5 µl. Pour obtenir une déflexion 10 fois supérieure au bruit de fond (limite de quantification), le volume était de 70 µl.</p>																										
<p><b>Etude de linéarité</b></p>	<p>Dans l'éventail des volumes testés (de 50 à 2500 µl), la mesure était linéaire. Un volume de calibration était réalisé quotidiennement avant chaque expérience à l'aide d'une seringue d'un ml. Dix mesures étaient effectuées et la moyenne des variations du signal était utilisée lors de l'analyse des tracés.</p>																										
<p><b>Etude de la reproductibilité (variabilité inter-jour)</b></p>	<p>Sept séries de dix mesures sur des volumes de 50 à 2500 µl ont été effectuées à 3 jours différents. Le coefficient de variation moyen était de 0,91 +/- 0,19.</p>																										
<p><b>Etude de la répétabilité (variabilité intra-jour)</b></p>	<p>Quatre séries de cinq mesures ont été effectuées le même jour. Le coefficient de variation moyen était de 0,185 +/- 0,04 %.</p>	<table border="1" data-bbox="861 1568 1276 1747"> <thead> <tr> <th>Moyenne</th> <th>2120</th> <th>2126</th> <th>2124</th> <th>2124</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Erreur standard</td> <td>1,840</td> <td>0,9860</td> <td>1,572</td> <td>2,632</td> </tr> <tr> <td>IC 95% inférieur</td> <td>2116</td> <td>2123</td> <td>2120</td> <td>2117</td> </tr> <tr> <td>IC 95% supérieur</td> <td>2126</td> <td>2128</td> <td>2129</td> <td>2131</td> </tr> <tr> <td>Coefficient de variation</td> <td>0.19%</td> <td>0.10%</td> <td>0.17%</td> <td>0.28%</td> </tr> </tbody> </table>	Moyenne	2120	2126	2124	2124	Erreur standard	1,840	0,9860	1,572	2,632	IC 95% inférieur	2116	2123	2120	2117	IC 95% supérieur	2126	2128	2129	2131	Coefficient de variation	0.19%	0.10%	0.17%	0.28%
Moyenne	2120	2126	2124	2124																							
Erreur standard	1,840	0,9860	1,572	2,632																							
IC 95% inférieur	2116	2123	2120	2117																							
IC 95% supérieur	2126	2128	2129	2131																							
Coefficient de variation	0.19%	0.10%	0.17%	0.28%																							
<p><b>Etude de ré-inhalation du CO2 :</b></p>	<p>L'étude de ré-inhalation a pour but de mesurer, lors des périodes de clampage, la teneur moyenne en CO2 dans la chambre qui, par définition, ne doit pas dépasser 0,6% de l'air contenu de la chambre. La période optimale de clampage obtenue était de 60 s pour un débit d'air de 8 l/min.</p>																										

Tableau 2 - Composantes de la validation de la méthode pléthysmographique

#### V.A.4 - Modalités d'enregistrement des tracés

Pour chaque mesure, l'entrée et la sortie d'air étaient clampées pour une durée d'une minute et un enregistrement des différences de pression entre les deux enceintes était effectué.

Le T0 était défini comme le moment de l'injection des traitements. L'animal vigile était d'abord placé dans l'enceinte pendant 30 min pour l'acclimater aux conditions expérimentales. Trois enregistrements étaient ensuite réalisés avant toute intervention (valeurs de base ; T-30, T-15, T-5). Ces valeurs étaient moyennées en une valeur dite de référence. Pour les injections (T0), l'animal était sorti avec précaution de l'enceinte après les trois premières mesures avant d'y être replacé. Les enregistrements étaient ensuite effectués sur une durée totale de 240 min aux temps définis par le protocole expérimental (T5, T10, T15, T30, T60, T120, T180, T240).

#### V.A.5 - Paramètres mesurés

Les tracés du cycle respiratoire étaient analysés avec le logiciel ELPHY (ElectroPhysiological Software Version 2.462) d'étude de la physiologie de la commande respiratoire. Chaque enregistrement était analysé sur une durée minimale de 20 s. L'analyse des tracés permettait de déterminer les paramètres suivants : le volume courant ( $V_T$ ), les temps inspiratoires ( $T_I$ ) et expiratoires ( $T_E$ ), le temps total ( $T_{TOT}$ ), la fréquence respiratoire ( $f$ ) et le volume minute ( $V_E$ ).

Les relations entre ces différents paramètres sont résumées ci-dessous :

$$V_E = V_T \times f \rightarrow f = \frac{1}{T_{TOT}} = \frac{1}{(T_I + T_E)}$$

$V_E$  = volume minute

$T_{TOT}$  = temps total

$f$  = fréquence respiratoire

$T_I$  = temps inspiratoire,  $T_E$  = temps expiratoire

### V.B - Mesure des gaz du sang artériel sur animal vigile

#### V.B.1 - Principe

Il s'agit d'une méthode invasive *in vivo* de la pression partielle des gaz dissous dans le sang artériel. Elle nécessite le prélèvement d'un échantillon de sang artériel. Cette méthode est définie comme la plus sensible et spécifique pour identifier une dépression respiratoire (Whiteside *et al*, 2016).

### V.B.2 - Description de l'automate

Les échantillons artériels ont été analysés sur l'automate Bayer Rapidlab® 248 (Bayer, Allemagne) préalablement étalonné. Cet automate est un dispositif médical utilisé en pratique clinique courante. L'échantillon de sang artériel était placé dans un réceptacle muni d'un embout adapté à la seringue par lequel il était aspiré dans l'automate. La mesure des différents paramètres était rendue possible par des électrodes spécifiques permettant la mesure du pH, de la pression partielle en oxygène (PaO<sub>2</sub>) et de la pression partielle en dioxyde de carbone (PaCO<sub>2</sub>) ; les autres paramètres étant calculés. Ces mesures nécessitaient au préalable de renseigner la fraction inspirée en oxygène (21%) et la température corporelle de l'animal. Les résultats de l'analyse ont ensuite été imprimés et colligés.

### V.B.3 - Modalités de mesure des gaz du sang

Le jour de l'expérimentation, le rat vigil était placé dans une boîte de contention munie de plusieurs trous au niveau de la tête pour éviter le phénomène de ré-inhalation de CO<sub>2</sub>. Le cathéter artériel était alors extériorisé puis purgé pour vérifier sa perméabilité. Un prélèvement de 100 µl était effectué, pour chaque mesure, dans des tubes capillaires (Blood Gas Collection, Bayer, Allemagne) après avoir mesuré la température anale de l'animal. Le T0 était défini comme le moment de l'injection des traitements. Avant l'injection de toute drogue, un premier prélèvement de référence était réalisé et analysé (T-5). Les traitements étaient ensuite injectés (T0) en sortant l'animal avec précaution de la boîte avant de l'y replacer. Les prélèvements étaient effectués sur une période de 240 minutes aux temps définis par le protocole expérimental (T5, T10, T15, T30, T60, T120, T180, T240). Le volume total des prélèvements n'excédant pas 10% du volume sanguin, aucune compensation des pertes sanguines n'était effectuée au cours de l'intervention.

### V.B.4 - Paramètres colligés

Les paramètres colligés pour chaque mesure étaient le pH, la PaO<sub>2</sub>, la PaCO<sub>2</sub> et la concentration de bicarbonate. L'interprétation des gaz du sang était réalisée selon les données physiologiques déjà publiées chez le rat (Brun-Pascaud *et al*, 1982).



## V.C - Électromyographie diaphragmatique sur animal vigile

### V.C.1 - Principe

L'étude électromyographique a consisté à étudier l'activité électrique d'un muscle au cours d'un cycle de contraction musculaire en mesurant la différence de potentiel électrique spontané entre deux sites d'un même muscle. Le signal obtenu ou électromyogramme correspondait à l'expression électrique de la contraction musculaire (Basmajian and De Luca, 1985; Daube and Rubin, 2009) .

### V.B.2 - Analyse des tracés

Le signal électrique brut enregistré devait être dans un premier temps modulé avant d'être analysé. La modulation du signal comprenait quatre étapes (Dataquest ART 4.3 DSI, France) : a) la filtration du signal au travers d'une bande-passantes à haute fréquence (100 Hz) pour éliminer le signal électrique généré par les battements cardiaques, b) la rectification du signal pour ne prendre en considération que les valeurs positives moyennées, c) la filtration du signal rectifié au travers d'une bande passante à basse fréquence (3 Hz) pour obtenir une enveloppe linéaire du signal et la conversion de l'enveloppe linéaire en données numériques pour permettre l'analyse des résultats.

### V.C.3 - Modalités d'enregistrement des tracés

L'enregistrement des tracés s'effectuait selon les mêmes modalités que pour la pléthysmographie.

### V.C.4 - Paramètres mesurés

Des segments de six secondes étaient extraits à chaque temps défini, comme pour le protocole de la pléthysmographie ; les premières mesures moyennées servant de valeur de référence. Après normalisation des tracés par rapport au tracé de référence, les paramètres analysés, étaient l'amplitude de contraction, correspondant pour chaque cycle respiratoire à la différence entre le minimum (valeur minimale avant inflexion de la courbe vers le haut) et le maximum (valeur maximale avant inflexion de la courbe vers le bas), et le travail

diaphragmatique, correspondant à l'aire sous la courbe de chaque segment de six secondes extrait.

## VI - Analyses comportementales

### VI.A - Activité locomotrice

Après administration des traitements, les rats ont été placés dans une cage en plexiglas et filmés pendant 120 minutes. La mesure cumulative du nombre de pas par tranche de 5 minutes a été déterminée grâce au logiciel Videotrack® (ViewPoint). Cette partie expérimentale a été réalisée par Adeline Duchêne.

### VI.B - Échelle de sédation, ataxie et tonus

Après administration des drogues étudiées, le niveau de sédation des rats a été mesuré, à chacun des temps définis par les protocoles, à l'aide d'une échelle numérique allant de 0 à 3 (Pirnay *et al*, 2008b) :

- ◆ Le niveau 0 correspond à un rat complètement éveillé, avec une démarche normale et des réflexes de redressement intacts,
- ◆ Le niveau 1 correspond à un rat avec une activité réduite, une légère altération de la démarche, des réflexes de redressement intacts et un tonus musculaire diminués ;
- ◆ Le niveau 2 correspond à un rat endormi ou immobile, avec des réflexes de redressement diminués ;
- ◆ Le niveau 3 correspond à un rat comateux, sans aucun réflexe de redressement.

### VI.C - Convulsions

Après administration des drogues étudiées, l'intensité des convulsions a été mesurée, à chacun des temps définis par les protocoles, à l'aide d'une échelle numérique allant de 1 à 5 (Racine, 1972) :

- ◆ Au niveau 1, le rat est immobile, les yeux fermés, avec des contractions des vibrisses et un clonus de la face ;
- ◆ Au niveau 2, le rat présente des hochements de tête avec clonus de la face plus important ;

- ◆ Au niveau 3, le rat présente un clonus d'un membre antérieur ;
- ◆ Au niveau 4, le rat se redresse avec un clonus bilatéral des membres antérieurs ;
- ◆ Au niveau 5, le rat se redresse avec perte d'équilibre et chute accompagnées par des crises cloniques généralisées.

Le recueil de ces données cliniques a été réalisée par Camille Lagard.

## VII - Dosages cérébraux

### VII.A - Recueil des cerveaux

Pour tous les dosages cérébraux, les animaux ont été anesthésiés dans une chambre d'induction par isoflurane 4%. Ils ont ensuite été exsanguinés puis décapités et leur cerveau extrait de la boîte crânienne. Une microdissection des vaisseaux sanguins cérébraux restants était alors réalisée. Par la suite, chaque cerveau était sectionné selon les besoins de chacun des protocoles, afin de récupérer : le cortex frontal, le cervelet et le tronc cérébral. Les échantillons étaient ensuite conservés au congélateur à -80°C (projet 1) et -20 °C (projet 3) jusqu'au jour du dosage. Le recueil des cerveaux a été réalisé par Adeline Duchêne (Projet 1) et Camille Lagard (Projet 3).

### VII.B - Dosage de l'histamine

Après homogénéisation des prélèvements cérébraux, le dosage de l'histamine a été réalisé par méthode radio-enzymatique par compétition entre un traceur acylhistamine radiomarqué à l'iode 125 et l'acylhistamine présente dans l'échantillon après acylation. Ce dosage a été effectué par Camille Lagard en collaboration avec le Pr Jacques Callebert du Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire de l'Hôpital Lariboisière.

### VII.C - Monoamines

Après homogénéisation des prélèvements cérébraux les monoamines cérébrales ont été dosées par une méthode de chromatographie en phase liquide haute performance couplée à de la fluorimétrie (Kema *et al*, 1993). Ce dosage a été effectué par Camille Lagard en collaboration avec le Pr Jacques Callebert du Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire de l'Hôpital Lariboisière.

## VII.D - Modafinil et flécaïnide

Après homogénéisation des prélèvements cérébraux, le modafinil et le flécaïnide étaient dosés en utilisant une méthode de chromatographie en phase inversée couplée à une spectrométrie de masse. Les analyses ont été réalisées par le laboratoire Eurofins ADME Bioanalyses).

## VIII - La tomographie par émission de positons (TEP)

### VIII.A - Principes

La TEP est une modalité d'imagerie quantitative et non-invasive permettant de mesurer une concentration de radioactivité associée à l'injection d'un radiotraceur dans différents tissus au cours du temps. Les isotopes radioactifs incorporés à la molécule marquée et utilisés en imagerie TEP, émettent des rayons  $\beta^+$ . L'émission de positons, (également connue sous le nom de décroissance  $\beta^+$ ) correspond au processus de désintégration isobare de cet isotope : un proton, alors en excès à l'intérieur d'un noyau radionucléide, est converti en neutron en libérant un positon et un neutron. Après une faible distance dans la matière, dépendant de son énergie d'émission, le positon interagit avec un électron du milieu. Cette rencontre donne lieu à un processus dit d'annihilation, duquel est issu l'émission de deux photons de 511 keV en sens opposé ( $180^\circ$ ). C'est la détection en coïncidence de ces deux photons par la couronne de « cristaux » ou de « détecteurs » de la caméra qui est à la base de l'imagerie TEP.

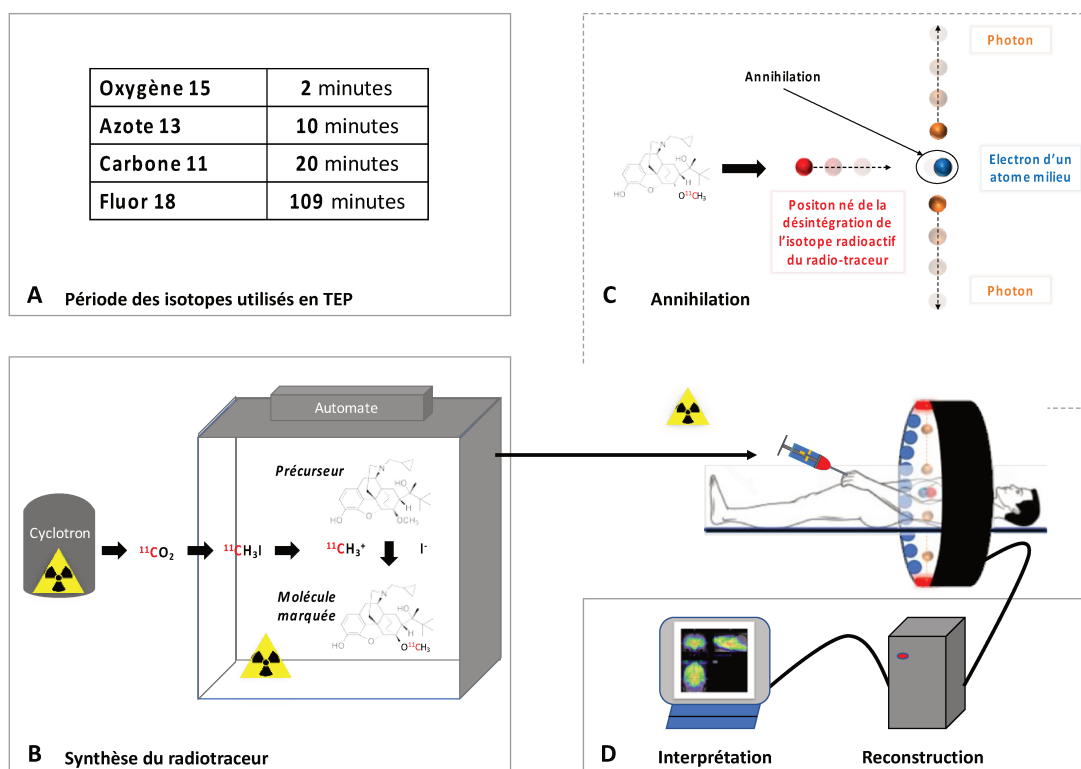


Figure 35 - Différentes étapes nécessaires à l'obtention d'une imagerie TEP. Principaux isotopes utilisés en imagerie TEP (A). Synthèse d'un radiotraceur à partir d'un précurseur non radioactif (B). Principe physique de l'imagerie TEP (C). Reconstruction des images (D).

Les évènements détectés sont intégrés par des algorithmes mathématiques permettant de localiser l'annihilation et de reconstituer la distribution spatiale de la radioactivité de manière quantitative. La résolution des caméras TEP utilisée dans ces travaux (caméra Inveon®, Siemens dédiée pour le petit animal) était de 1,2 mm.

Les caméras TEP sont souvent couplées à d'autres modalités d'imagerie comme le scanner X (CT) permettant la localisation anatomique du signal TEP et la correction de l'atténuation du signal par les tissus. Aujourd'hui, des fabricants mettent à disposition des appareils associant l'imagerie TEP à d'autres modalités d'imagerie complémentaires comme l'IRM fonctionnelle. (Figure 35)

### VIII.B - Modalités d'acquisition des images TEP

Les animaux étaient anesthésiés par un mélange d'oxygène et d'isoflurane 2% afin de permettre la pose d'un cathéter veineux caudal et la réalisation de l'acquisition TEP. En fonction du protocole expérimental les animaux recevaient le traitement soit avant soit après l'injection du traceur radioactif.

L'acquisition débutait en même temps que l'injection du radiotracer par voie i.v. Ce type d'acquisition, dites dynamiques, permettait de mesurer la cinétique de la radioactivité associée au radiotracer dans le tissu d'intérêt. La durée d'acquisition totale dépendait de la cinétique tissulaire du radiotracer, de la demi-vie radioactive de l'isotope et du protocole.

### VIII.C - Analyse des données TEP

#### VIII.C.1 - Recalage des images sur un modèle anatomique

Une fois les images TEP dynamiques acquises, la première étape de l'analyse comportait un recalage des images sur un modèle anatomique afin de rendre les images comparables entre elles et d'identifier les structures d'intérêt. Les images TEP étaient recalées par Rigid Matching sur l'IRM de référence disponible dans le logiciel Pmod® 3.6 (PMOD Technologies LLC) (Figure 36) (Schiffer *et al*, 2006).



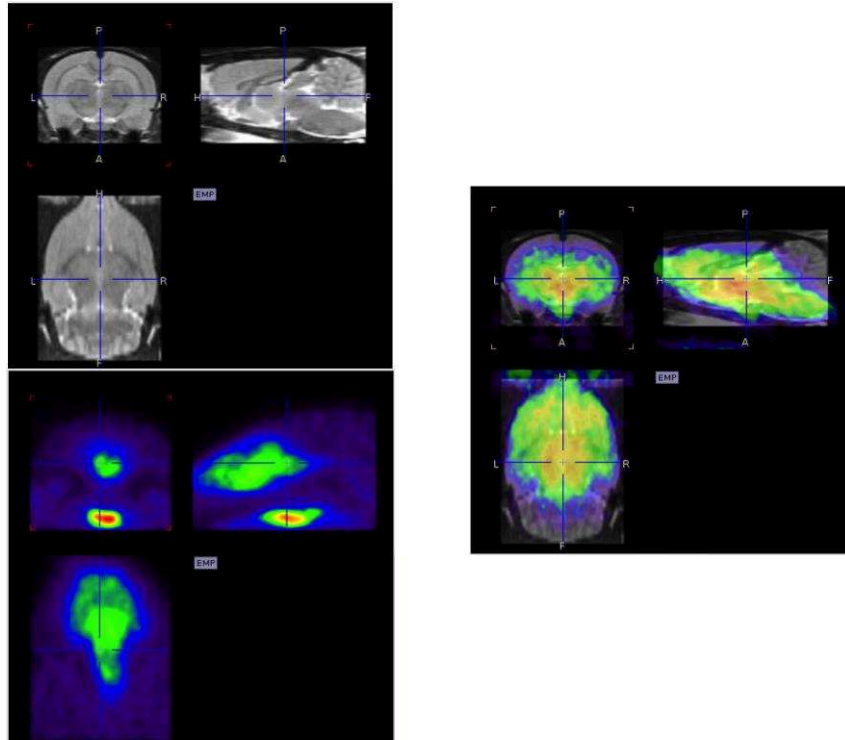


Figure 36 - Recalage de l'image TEP sur le modèle anatomique (Pmod 3.6)

### VIII.C.2 - Analyse de la radioactivité au sein des tissus en fonction du temps

A partir des données TEP dynamiques, on peut déterminer l'évolution de la radioactivité au cours du temps au sein du tissu d'intérêt. Cette radioactivité pouvait être normalisée en fonction de la dose injectée (%ID) ou de la dose injectée et du poids de l'animal (SUV pour standard uptake value). Grâce aux régions anatomiques déjà dessinées sur le modèle anatomique, on pouvait ainsi comparer les courbes de radioactivités au cours du temps en fonction des traitements et des régions Pmod® 3.6 (PMOD Technologies LLC) (Figure 37).

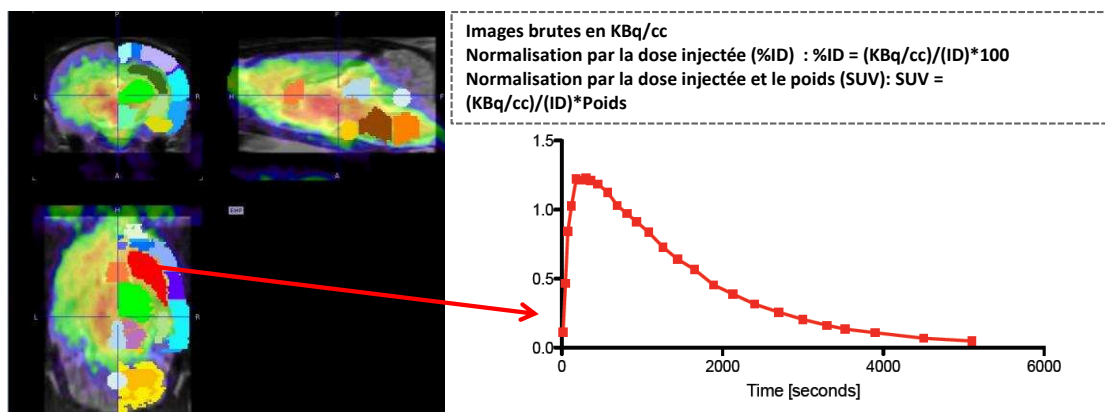


Figure 37 - Analyse régionale de la radioactivité au cours du temps (KBq/cc = kilo-bécquerel par ml; %ID = pourcentage de la dose injectée, SUV = standard uptake value) (Pmod 3.6)

### VIII.C.3 - Modélisation pharmacocinétique

#### VIII.C.3.a - Estimation du MRGLU

Le FDG (fluorodésoxyglucose) est un analogue du glucose dans lequel le groupe hydroxyle du carbone en position 2 a été remplacé par un fluor 18 (Figure 38-A).

#### **Elément sous droit, diffusion non autorisée**

Figure 38 - Structure et métabolisme du  $^{18}\text{F}$ -FDG. (A) Structure chimique du FDG : le  $^{18}\text{F}$ -FDG est un analogue du glucose dont le groupe hydroxyle en position 2 a été changé par un fluor 18. (B) Transport et métabolisme du  $^{18}\text{F}$ -FDG : le mécanisme d'absorption du  $^{18}\text{F}$ -FDG est similaire à celui du glucose, le  $^{18}\text{F}$ -FDG est transporté dans le compartiment intracellulaire par le transporteur GLUT1 et est métabolisé par l'hexokinase et la glucose-6-phosphatase. Par la suite il est piégé dans la cellule, car il ne peut pas subir de glycolyse. (Source : Speirs et al, 2015)

Le  $^{18}\text{F}$ -FDG pénètre dans la cellule selon les mêmes modalités que le glucose. Glucose et  $^{18}\text{F}$ -FDG sont alors métabolisés respectivement en glucose-6-phosphate et  $^{18}\text{F}$ FDG-6-phosphate par l'hexokinase. Les voies métaboliques du glucose et du  $^{18}\text{F}$ -FDG divergent alors : le glucose poursuit son métabolisme (glycolyse) alors que  $^{18}\text{F}$ -FDG n'est pas métabolisé (la perte du groupe hydroxyle empêchant sa transformation en fructose-6-phosphate) (Figure 36-B).

Compte tenu de cette impasse métabolique tissulaire, le  $^{18}\text{F}$ FDG et son métabolite le  $^{18}\text{F}$ FDG -6-phosphate s'accumulent dans la cellule. Cette particularité cinétique permet d'estimer le métabolisme du glucose (MRGLU exprimé en  $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{ml}$ ) en utilisant un modèle pharmacocinétique non compartimentale appelé analyse graphique de Patlak. Cette méthode permet de déterminer, à partir de la radioactivité tissulaire et de la radioactivité sanguine émise par le  $^{18}\text{F}$ -FDG, le taux de captation tissulaire ( $K_i^*$ ) du  $^{18}\text{F}$ -FDG (Patlak *et al*, 1983). Ce modèle nécessite donc l'utilisation d'une fonction d'entrée. Compte tenu des difficultés méthodologiques pour obtenir une fonction d'entrée de manière concomitante à l'acquisition TEP, la fonction d'entrée a été déterminée pour chaque animal à partir d'un volume d'intérêt (VOI) au niveau de la veine cave inférieure (fonction d'entrée dérivée de l'image) (Lanz *et al*, 2014).

Le MRGlu pouvait alors être estimé par l'expression ci-dessous.

$$\text{MRGlu} = \frac{[\text{Glu}]}{LP} * K_i^*$$

La concentration plasmatique de glucose [Glu] correspondait à la glycémie capillaire avant l'acquisition. La « lumped constant (LC) » correspondait à une constante, déterminée pour chaque espèce, permettant d'estimer le MRGlu à partir de celui du  $^{18}\text{F}$ -FDG compte tenu des différences métaboliques décrites plus hauts (Tokugawa *et al*, 2007). La modélisation était effectuée par le logiciel PKIN<sup>®</sup> 3.6 (PMOD Technologies LLC)

#### VII.C.3.b - Modèle pharmacocinétique utilisant une région de référence

L'imagerie TEP permet d'étudier certaines propriétés des neurorécepteurs *in vivo*, grâce à l'utilisation de radiotraceurs spécifiques d'une cible pharmacologique d'intérêt. La spécificité du signal TEP associé à l'interaction d'un radiotracer avec sa cible est déterminée par une analyse pharmacocinétique des données. La méthode classique est une approche compartimentale, qui nécessite souvent la mesure invasive d'une fonction d'entrée artérielle. Cependant, il existe des approches non-invasives basées sur l'utilisation d'une région de référence, qui est une région cérébrale qui n'exprime pas la cible étudiée. Le modèle SRTM (Simplified reference tissue compartmental model) a été utilisé pour étudier l'interaction spécifique de la  $^{11}\text{C}$ -buprénorphine et du  $^{11}\text{C}$ -flumazénil avec leurs cibles cérébrales dans nos conditions expérimentales (Lammertsma and Hume, 1996). Le modèle SRTM permet d'établir une relation mathématique entre les courbes de radioactivité au cours du temps dans les tissus d'intérêt et la courbe de radioactivité au cours du temps dans une région dite de référence où, par définition, il n'existe pas de fixation spécifique du radiotracer (Lammertsma and Hume, 1996). Cette approche permet d'estimer le potentiel de liaison ( $BP_{ND}$ ) qui reflète le rapport entre la densité totale de récepteur ( $B_{max}$ ) sur la constante de dissociation du radiotracer pour ce récepteur ( $K_d$ ).

L'utilisation du modèle SRTM nécessitait donc d'un tissu de référence. Cette région était bien identifiée chez le rat pour le  $^{11}\text{C}$ -flumazénil ; il s'agit du pont (Parente *et al*, 2017). Pour la  $^{11}\text{C}$ -buprénorphine, une telle région n'était pas connue chez le rongeur. Elle a nécessité de mettre en évidence une liaison réversible de la  $^{11}\text{C}$ -buprénorphine par l'injection d'une dose pharmacologique de buprénorphine afin d'identifier une région dépourvue de fixation spécifique. La modélisation a été effectuée par le logiciel PKIN<sup>®</sup> 3.6 (PMOD Technologies LLC)

### VIII.C.3.c - Analyse des données modélisées

Les données modélisées pouvaient faire l'objet d'une analyse régionale comme pour les courbes de radioactivité au cours du temps. La valeur de chaque paramètre d'intérêt modélisé dans une région définie dans l'atlas de Schiffer (Schiffer *et al*, 2006) pouvait ainsi être comparée entre les groupes.

Cette analyse régionale résultant de l'étude de régions cérébrales définie *a priori*, les données pouvaient également être analysées selon une méthode dite paramétrique. Dans cette modalité d'analyse, le paramètre modélisé n'était pas calculé pour un groupe de voxel, mais déterminé pour chaque voxel de l'image (PXMOD, PMOD Technologies LLC). On obtenait alors une image paramétrique où chaque voxel correspondait à la valeur du paramètre normalisé au sein du voxel de l'image initial. Les images de chaque groupe étaient comparées ensuite voxel à voxel par le logiciel SPM8® (University College London). Un modèle général linéaire était appliqué pour décrire la variabilité des données (effets expérimentaux, effets confondants, variabilité résiduelle). Compte tenu du fait que l'analyse portait sur l'ensemble des voxels et qu'un test statistique était réalisé pour chaque voxel des corrections statistiques étaient effectuées pour limiter le nombre de faux positifs.



## Partie 4 : Articles

---

### I - Projet 1 : Intégration de données d'imagerie à des données pharmacodynamiques pour l'étude de la neuropharmacologie de molécules psychoactives chez le rat : application à l'association flecainide/modafinil

#### I.A - Contexte

Ce projet a été réalisé dans le cadre d'un contrat de recherche et d'une collaboration avec la société Theranexus, start-up initialement incubée au CEA, qui développe des médicaments en partenariat avec la recherche académique. Leur innovation pharmacologique repose sur la modification des propriétés pharmacologiques d'un médicament existant (comme le modafinil), déjà développé dans le traitement de maladies neurologiques (ici la narcolepsie), en y associant des modulateurs des connexines (comme le flécaïnide).

Le modafinil est un psychostimulant non amphétaminique recommandé comme traitement symptomatique de première intention de la narcolepsie par les agences européenne et américaine du médicament. La narcolepsie est un trouble neurologique rare caractérisé par une somnolence diurne excessive associée (narcolepsie type 1, NT1) ou non (narcolepsie type 2, NT2) à la cataplexie. Le modafinil favorise l'éveil et améliore les performances cognitives chez les sujets sains privés ou non de sommeil. Chez les patients narcoleptiques, le modafinil induit une diminution significative de la somnolence diurne excessive. Cependant, ses effets sur la cataplexie sont limités (Scammell, 2015).

Les mécanismes impliqués dans l'action du modafinil sur le système nerveux central sont complexes et restent incomplètement connus (Minzenberg and Carter, 2008). Néanmoins il a été montré que le modafinil modulait l'activité cellulaire des astrocytes en augmentant la communication inter-astrocytaire via les connexines (protéines transmembranaires de jonctions communicantes) (Clasadonte *et al*, 2017; Franco-Pérez and Paz, 2009; Franco-Pérez

*et al*, 2012). Par ailleurs plus récemment il a été montré que l'adjonction de faible dose de flécaïnide (un modulateur de la connexine Cx30) améliorerait chez la souris l'action du modafinil sur la cognition et la somnolence. Cette association avait par ailleurs une action anti-narcoleptique qui est faible ou inexistante pour le modafinil seul (Duchêne *et al*, 2016; Lu and Chen, 2016). L'association flécaïnide + modafinil a été développée sous le nom de THN102.

## I.B - Objectifs

Les objectifs de ce travail étaient de coupler les données pharmacodynamiques (activité locomotrice) en comparant les différentes modalités de traitement à des données pharmacocinétiques *ex vivo* (dosages plasmatiques et cérébraux) et métaboliques *in vivo* cérébrales (imagerie TEP utilisant le  $^{18}\text{F}$ -FDG). Le but était de démontrer que l'action pharmacodynamique, déjà observée chez la souris, était liée à une activation cérébrale supérieure avec le THN 102 comparé au modafinil ou au flécaïnide seul tout en vérifiant l'absence d'interaction pharmacocinétique entre le modafinil et le flécaïnide.

Le sujet de ce travail ne faisait pas partie de la thématique de thèse à proprement dit. Ma participation à ce projet a consisté en la réalisation et l'analyse de la partie TEP. Adeline Duchêne post-doctorante chez Theranexus a réalisé la partie pharmacodynamique et les dosages plasmatiques et cérébraux des médicaments. L'article a été écrit par nous deux et nous en sommes co-premiers auteurs.

Ce projet, réalisé en début de thèse, avait pour objectif la mise en place des procédures d'acquisition TEP chez le petit animal avec un traceur ayant une plus longue période que le carbone-11. Aussi, un travail important d'analyse et d'interprétation des images (recalage et normalisation) a été réalisé afin de modéliser les paramètres neuropharmacocinétiques d'un traceur largement éprouvé qu'est le  $^{18}\text{F}$ -FDG. Ce travail a donc permis de poser des bases méthodologiques essentielles à mon apprentissage pour mener à bien mon projet de thèse.

## I.C - Schéma expérimental

Compte tenu de la résolution de l'imagerie TEP, le rat a été choisi comme modèle expérimental et préféré à la souris, afin de permettre une analyse régionale plus fine des

régions cérébrales impliquées dans l'action des traitements. La dose de modafinil utilisée était celle déjà décrite dans la littérature comme étant responsable d'un effet thérapeutique similaire à celui observé chez l'Homme (Gozzi *et al*, 2011). La dose de flécaïnide était la même que celle utilisée dans une étude précédente chez la souris (Duchêne *et al*, 2016). Les rats étaient randomisés chaque jour de procédure expérimentale en 4 groupes (N=5 par groupe) pour recevoir soit les véhicules i.v, soit le modafinil + véhicule i.v à la dose de 10 mg/kg, soit le flécaïnide + véhicule i.v à la dose de 1 mg/kg, soit l'association modafinil + flécaïnide i.v (THN102).

#### I.C.1 - Mesure de l'activité métabolique cérébrale utilisant l'imagerie TEP au $^{18}\text{F}$ -FDG

Le jour de la procédure expérimentale, les rats à jeun depuis la veille, recevaient l'un des quatre traitements par voie i.v. Trente minutes après, l'acquisition dynamique était débutée en même temps que l'injection de  $^{18}\text{F}$ -FDG (1 mL  $^{18}\text{F}$ -FDG – dose moyenne  $42,2 \pm 26,3$  MBq – i.v à la seringue électrique sur 1 minute). La durée d'acquisition était de 60 min. Une glycémie capillaire était mesurée pour chaque rat avant le début de l'acquisition.

#### I.C.2 - Mesure de l'activité locomotrice

Sur une série d'animaux différente, immédiatement après administration des traitements i.v., les rats étaient placés dans une cage en plexiglas et l'activité locomotrice était mesurée.

#### I.C.3 - Dosages plasmatiques et cérébraux

Sur une série d'animaux différente, 30 minutes après avoir reçu soit le modafinil seul i.v. ou en association avec le flécaïnide i.v., un échantillon de sang était prélevé et centrifugé puis le cerveau du rat était récupéré par décapitation après exsanguination de l'animal.

### I.D - Analyse statistique

Les résultats de la locomotion et des données pharmacocinétiques étaient exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. La différence était considérée comme significative à un seuil de  $p < 0,05$ . L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Graphpad (GraphPad Prism version 7). La distance cumulée parcourue au cours du temps a été comparée à l'aide d'une ANOVA à



mesures répétées à deux facteurs, suivie du test de comparaison multiple de Bonferroni. Enfin, les concentrations sériques et cérébrales de modafinil ont été comparées en utilisant un *t-test* de Student non apparié

La comparaison entre les groupes pour les images paramétriques a été effectuée en utilisant un modèle ANOVA dans SPM8. Un seuil de de significativité  $< 0,05$  (non corrigé pour les comparaisons multiples) et une taille de groupe de voxels minimale de 200 étaient requis. Seuls les groupes de voxels ayant un seuil de significativité  $< 0,05$  (corrigé pour des comparaisons multiples) ont été considérés. Les groupes de voxel significativement différents ont été localisés anatomiquement en utilisant l'atlas du cerveau de rat de Paxinos et Watson.

## I.E - Résultats

La glycémie capillaire avant et après l'imagerie TEP n'était pas différente entre les groupes. Le THN 102 augmentait l'activité spontanée chez le rat en comparaison au flécainide et au modafinil seul. Cette différence pharmacodynamique n'était pas liée à une interaction pharmacocinétique périphérique ou centrale entre le modafinil et le flécainide. En revanche elle s'accompagnait 1) d'une augmentation concomitante de la captation relative du glucose dans le groupe THN102 comparé aux groupes véhicule, modafinil, flécainide notamment dans les régions corticales et sous-corticales impliquées dans la régulation du cycle nyctéméral et 2) d'une augmentation concomitante du métabolisme du glucose dans le groupe THN102 comparé au groupe MOD seul dans ces mêmes régions.

La figure 39 montre l'ensemble des résultats obtenus avec la normalisation par le cerveau entier. Les différences de significativité entre cette approche et l'approche MRGlu peut être expliquée par une meilleure normalisation des images par cette approche (Figure 40)

## I.F - Discussion et conclusion

L'imagerie TEP, réalisée dans des conditions parallèles à celles d'études pharmacodynamiques, permet de déterminer les régions cérébrales impliquées dans l'effet d'un médicament. L'imagerie TEP constitue donc un outil précieux pour l'étude des

mécanismes cérébraux à l'origine des effets neuropharmacologiques et/ou neurotoxiques des médicaments et ce, *in vivo* et de manière non-invasive.

Dans le cas de cette étude, les différences pharmacodynamiques caractérisant le THN102 en comparaison au flécainide et au modafinil seuls semblaient être liées à l'augmentation du métabolisme glucidique cérébrale et donc de l'activité cérébrale dans les régions corticales et sous-corticales impliquées dans la régulation du cycle nyctéméral.

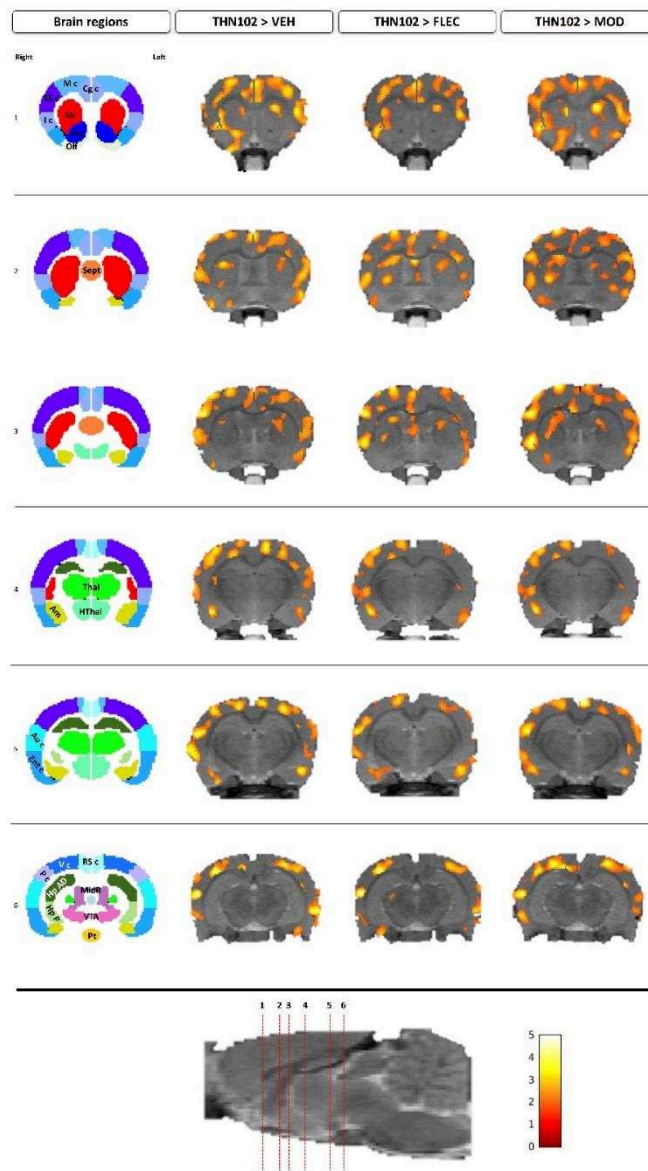


Figure 39 - Comparaison de la captation de glucose entre le groupe THN102 et les groupes contrôle (VEH), flecainide (FLEC) et modafinil (MOD) (SPM8®)

Amygdala							
MRGlu				Whole brain normalization			
Control	Flécainide	Modafinil	THN102	Control	Flécainide	Modafinil	THN102
20.84%	20.56%	38.93%	69.12%	1.88%	2.42%	1.67%	26.80%
Striatum							
MRGlu				Whole brain normalization			
Control	Flécainide	Modafinil	THN102	Control	Flécainide	Modafinil	THN102
22.05%	20.74%	39.39%	69.37%	2.12%	3.20%	2.32%	28.39%
Cortex							
MRGlu				Whole brain normalization			
Control	Flécainide	Modafinil	THN102	Control	Flécainide	Modafinil	THN102
19.82%	17.65%	38.70%	73.31%	2.73%	2.92%	4.01%	23.83%

Figure 40 - Coefficient de variation regional intra-groupe en fonction de la méthode utilisée pour décrire la consommation cérébrale de glucose.



## REGULAR RESEARCH ARTICLE

## Cortico-Amygdala-Striatal Activation by Modafinil/ Flecainide Combination

Dominique Vodovar, Adeline Duchêne, Catriona Wimberley,  
Claire Leroy, Géraldine Pottier, Yves Dauvilliers, Christian Giaume,  
Jian-Sheng Lin, Franck Mouthon, Nicolas Tournier, and Mathieu Charvériat

Imagerie Moléculaire In Vivo, IMIV, CEA, Inserm, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris Saclay, CEA-SHFJ, Orsay, France (Drs Vodovar, Wimberley, Leroy, Pottier, and Tournier); Theranexus, Lyon, France (Ms Duchêne, Mr Mouthon, and Dr Charvériat); National Reference Centre for Narcolepsy, CHU Montpellier, INSERM U1061, France (Dr Dauvilliers); Collège de France, Centre for Interdisciplinary Research in Biology, Paris, France (Dr Giaume); Laboratory WAKING, CRNL-INSERM U1028-CNRS UMR 5292-UCBL, Lyon, France (Dr Lin).

D.V. and A.D. contributed equally.

Correspondence: Mathieu Charvériat, PhD, Theranexus, 60, avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France ([mathieu.charveriat@theranexus.com](mailto:mathieu.charveriat@theranexus.com)).

### Abstract

**Background:** Modafinil, a nonamphetaminic wake-promoting compound, is prescribed as first line therapy in narcolepsy, an invalidating disorder characterized by excessive daytime sleepiness and cataplexy. Although its mode of action remains incompletely known, recent studies indicated that modafinil modulates astroglial connexin-based gap junctional communication as administration of a low dose of flecainide, an astroglial connexin inhibitor, enhanced the wake-promoting and procognitive activity of modafinil in rodents and healthy volunteers. The aim of this study is to investigate changes in glucose cerebral metabolism in rodents, induced by the combination of modafinil + flecainide low dose (called THN102).

**Methods:** The impact of THN102 on brain glucose metabolism was noninvasively investigated using  $^{18}\text{F}$ -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose Positron Emission Tomography imaging in Sprague-Dawley male rats. Animals were injected with vehicle, flecainide, modafinil, or THN102 and further injected with  $^{18}\text{F}$ -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose followed by 60-minute Positron Emission Tomography acquisition.  $^{18}\text{F}$ -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose Positron Emission Tomography images were coregistered to a rat brain template and normalized from the total brain Positron Emission Tomography signal. Voxel-to-voxel analysis was performed using SPM8 software. Comparison of brain glucose metabolism between groups was then performed.

**Results:** THN102 significantly increased regional brain glucose metabolism as it resulted in large clusters of  $^{18}\text{F}$ -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake localized in the cortex, striatum, and amygdala compared with control or drugs administered alone. These regions, highly involved in the regulation of sleep-wake cycle, emotions, and cognitive functions were hence quantitatively modulated by THN102.

**Conclusion:** Data presented here provide the first evidence of a regional brain activation induced by THN102, currently being tested in a phase II clinical trial in narcoleptic patients.

**Keywords:** modafinil, astroglial connexin, FDG PET imaging, neuroglia, narcolepsy

Received: November 17, 2017; Revised: February 21, 2018; Accepted: March 14, 2018

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of CINF.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

687

Downloaded from <https://academic.oup.com/ijnp/article-abstract/21/7/687/4938109>  
by guest  
on 19 July 2018

**Significance Statement**

THN102 (modafinil/flecainide) is efficient to reduce excessive daytime sleepiness. The impact of THN102 on rat brain metabolism was investigated with FDG PET imaging. Cortex, striatum, and amygdala were more activated after THN102 compared with modafinil. This study provides insights on the mechanism of action of THN102 innovative product.

**Introduction**

Modafinil is a nonamphetaminic, wake-promoting compound used as first line treatment of excessive daytime sleepiness (EDS), associated with narcolepsy (Lavault et al., 2011; Thorpy and Dauvilliers, 2015; Barateau et al., 2016). It has also been proposed as a treatment to reduce EDS in Parkinson's disease (Sheng et al., 2013; Rodrigues et al., 2016). Mechanisms involved in wake-promoting and procognitive actions of modafinil are complex, as it modulates multiple monoaminergic and GABAergic neuronal systems (Minzenberg and Carter, 2008).

Early studies using Fos as a marker of neuronal activity in cat (Lin et al., 1996) and rat (Engber et al., 1998) suggested the hypothalamus as main brain target of modafinil. Subsequent studies in rodents indicated that cortex and striatum were activated after wake enhancement by modafinil (Scammell et al., 2000; Willie et al., 2005). Imaging in rodents depicted higher metabolism in hippocampus, thalamus, and amygdala (Engber et al., 1998) and showed activating effects of modafinil in fronto-cortical areas (Gozzi et al., 2012); those areas are involved in both arousal (Duteil et al., 1990; Lin et al., 1992) and cognitive enhancement (Lynch et al.; Béracochéa et al., 2003). Using pharmacological magnetic resonance imaging, or surface electroencephalography, modafinil was found to increase brain activity notably in the hippocampus and frontal cortex in healthy volunteers (Joo et al., 2008a) and narcoleptic patients (Saletu et al., 2007; Joo et al., 2008b). Moreover, positron emission tomography (PET) using  $^{18}\text{F}$ -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) in narcoleptic patients unveiled that modafinil increased the glucose brain metabolism in the hippocampus (Kim et al., 2007).

More recently, modafinil was shown to modulate astrocyte functions by increasing cell-cell communication mediated by connexin channels (Liu et al., 2013), membrane proteins involved in cellular communication (Giaume et al., 2010), and sleep regulation (Franco-Pérez and Paz, 2009; Franco-Pérez et al., 2012; Clasadonte et al., 2017). It was further shown in rodents that modulating astrocyte connexin by flecainide impacted the pharmacological action of modafinil by enhancing its wake-promoting, procognitive, and, notably, antinarcotic effects (Duchêne et al., 2016; Lu and Chen, 2016). The mechanisms of action of the modafinil/flecainide combination (THN102) remain to be further investigated but would likely be based on a restoration of the functionality of astroglial connexins. Using FDG PET in the rat, the aim of the present study was to assess the CNS effects of THN102 at the functional level compared with modafinil or flecainide used alone, both at their effective and clinically relevant doses.

**Materials and Methods****Animals**

Male Sprague-Dawley rats (Elevage Janvier) were collectively housed with food and water *ad libitum*. They were kept in a temperature- and humidity-controlled facility with 12-hour-dark-/light cycles (lights on at 8:00 AM). Experiments were performed during the light phase between 9:00 AM and 1:00 PM.

The study was conducted in accordance with the French legislation and European directives on the use of animals in research (EU Directive 2010/63/EU). The protocol has been approved by the local committee for animal use in research (APAFIS#7466-201611 04 1 7049220 v2).

**Drugs and Chemicals**

Drugs were administered by i.v. injection in the tail vein (1 mL/kg). Treatments included vehicle (VEH), modafinil 10 mg/kg (MOD; Orchid Pharma), flecainide 1 mg/kg (FLE; Sigma-Aldrich), or the combination of both (THN102). FDG for i.v. injection was purchased from Cyclopharma.

**FDG PET Imaging: Acquisition Protocol and Imaging Data Analysis**

PET imaging study was performed using PET systems coupled with a computerized tomography scanner (Inveon microPET-CT; spatial resolution ~1.6 mm; Siemens) in anesthetized and fasted rats (1.5%–2.5% inhaled isoflurane, weight 250–350 g) (Bao et al., 2009). PET experiments were exclusively performed in the morning. Each day of experiment, 4 rats were randomly assigned to each group: animals were i.v. injected with VEH, MOD, FLE, or THN102 before being placed into the scanner for computerized tomography acquisition. Thirty minutes after the administration, 1 mL FDG (mean dose =  $42.2 \pm 26.3$  MBq) was injected over 1 minute using a syringe pump. Dynamic PET acquisition began immediately after the start of FDG infusion for 60 minutes. Blood glucose measurement was performed before  $^{18}\text{F}$ -FDG injection and at the end of PET acquisition using a portable glucometer (Accu-check Performa, Roche).

PET data were reconstructed using the FORE+OSEM2D algorithm including normalization, attenuation, scatter, and random corrections. To reduce noise and correct for partial volume effect, an iterative deconvolution using the point spread function of the scanner with a temporal based denoising was applied to each image. The method was previously reported and validated for use in small animal PET imaging (Wimberley et al., 2014; Reilhac et al., 2015).

Dynamic and summed (30–60 minutes) FDG PET images were spatially normalized to a standard rat brain FDG Schiffer's template using Pmod software (version 3.6) (Schiffer et al., 2006). The brain kinetics of FDG may depend on its plasma kinetics (input function) and peripheral blood glucose level. Two normalization methods were thus performed to detect any regional change in FDG uptake by the brain. First, summed PET images were normalized by their respective whole-brain activity, thus highlighting the relative FDG uptake by the different brain regions. Then, the absolute metabolic rate of glucose (MRGlu) was estimated using pharmacokinetic modelling. To that end, a volume of interest was drawn on the vena cava to generate an imaged-derived input function of FDG, as previously described (Weber et al., 2002; Lanz et al., 2014). MRGlu Parametric PET images (PXMOD, Pmod software, version 3.6) were then generated for

each animal from the dynamic brain PET images and corresponding imaged-derived input function (from 0 to 60 minutes) using the FDG Patlak model, considering blood glucose level measured immediately before PET (Patlak et al., 1983). The 0.71 lumped constant was used to take the difference between glucose and FDG metabolism into account (Tokugawa et al., 2007).

Comparison of parametric images (FDG brain uptake and MRGlu) obtained in each group (n=5 animals/group) was performed using a statistical parametric mapping (SPM) and a voxel-to-voxel analysis (SPM8 software) as previously described (Schiffer et al., 2006; Soto-Montenegro et al., 2009). A brain mask was created from the FDG template and applied to all registered and normalized scans to include only cerebral voxels. Comparison was then performed using an ANOVA design to detect differences between groups. A significance level threshold of .05 (uncorrected for multiple comparisons) and a minimum cluster size of 200 voxels were selected. Only the clusters that were significant at  $P < .05$  levels (corrected for multiple comparisons) were considered. The size of the clusters exceeding the threshold and their corrected significance were anatomically located using the Paxinos and Watson rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2007).

#### Spontaneous Locomotor Activity Assessment

In an independent experiment, spontaneous locomotor activity was recorded in an open-field device (50x50x50 cm), during 2 hours, starting immediately after administration (VEH, MOD, FLE, and THN102). Cumulated traveled distance per 5-minute time bins was analyzed with ViewPoint. Experiments were performed with 8 drug-naïve animals in each group. The experimenter was blinded to treatment.

#### Determination of Modafinil Concentration in Serum and Brain

In parallel experiments, performed in another population of rats, brain and serum concentrations of modafinil were determined after MOD and THN102 administration in rats. Animals (n=8 rats/group) were anesthetized with isoflurane 30 minutes after i.v. administration and blood samples were collected, centrifuged (3000 g x 15 min, 20°C), and stored at -80°C. Brains were collected immediately after blood sampling, frozen on dry ice, and stored at -80°C. Modafinil and flecainide concentrations in serum and brain lysate were determined using a reverse phase liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection technique (Eurofins ADME Bioanalyses).

#### Statistical Analysis

Results of the locomotion and pharmacokinetic data are expressed as mean ± SEM. Difference was considered significant at  $P < .05$  levels. Statistical analysis was performed using Graphpad software (GraphPad Prism version 7). Cumulative traveled distance over time was compared using a 2-way repeated-measure ANOVA followed by Bonferroni's posthoc test. Finally, serum and brain modafinil concentrations were compared using an unpaired t test.

#### Results

The goal of this study was to compare the brain metabolism after treatment with THN102, combination between modafinil and flecainide at low dose, to modafinil alone.

#### THN102 Locally Increases the Brain Glucose Metabolism

Normalization of FDG uptake by whole-brain activity was associated with a low variability. In the VEH group, the coefficient of variation ( $CV = SD/mean \times 100$ ) of the relative uptake of FDG was  $CV = 2.73\%$  in the cortex. SPM analysis did not show any significant difference in the distribution of relative FDG brain uptake between FLE or MOD groups compared with the VEH group ( $P > .05$ ). Significant increase in the relative brain uptake of FDG could be regionally observed in the THN102 group compared with the MOD group. The effect was observed bilaterally and was homogeneously distributed in the cortex, amygdala and striatum (Table 1; Figure 1). Notably, a cluster of significant increase in FDG uptake could be observed in the nucleus accumbens. Similar distribution of increased relative FDG uptake could be observed in the THN102 group compared with the FLE or MOD alone ( $P < .05$ ).

Within the significant clusters, further detailed analysis allowed to locate the relevant peak regions. Hence, THN102 enhanced the brain metabolism compared with MOD in the subcortical regions such as the dysgranular and retrosplenial-dysgranular cortices, primary/secondary motor, dorsolateral entorhinal and visual cortices, the retrosplenial-dysgranular area, as well as the layer 3 and basolateral amygdaloid nuclei.

There was a significant increase in blood glucose levels measured before ( $85.8 \pm 4.5$  mg/dL) and at the end ( $116 \pm 4.3$  mg/dL) of PET acquisitions ( $P < .05$ ). However, initial as well as final glucose concentrations were not different between the 4 treatment groups, suggesting the absence of treatment-induced change in peripheral glucose metabolism. Compared with the relative FDG uptake, absolute quantification of the brain MRGlu was associated with a higher variability ( $CV = 19.82\%$  in the cortex of the VEH group). SPM analysis nonetheless highlighted patterns of significantly higher glucose consumption in the THN102 group compared with MOD alone ( $P < .05$ ). The regional increase in MRGlu was consistent with the regional increase in the relative FDG uptake (Table 2; Figure 2). However, difference in MRGlu in the THN102 group compared with the VEH and FLE groups was not significant, which may be due to a higher variability of the MRGlu data.

#### THN102 Increases Spontaneous Locomotor Activity

To assess whether doses of modafinil allowed to discriminate THN102 compared with modafinil alone, spontaneous motor activity in unrestrained awake rats was monitored for 2 hours after treatment, during the lights-on period (Figure 3). Locomotor activity in the MOD group tends to be increased compared with the VEH group without reaching significance (+15.2% at 120 minutes). THN102 administration induced a significant increase in cumulative locomotor activity compared with VEH-treated animals, beginning at 95 minutes (+22.0% at 120 minutes vs VEH,  $P = .0309$ ). THN102 was more effective in increasing the locomotor activity compared with MOD; however, the difference was not statistically significant (+5.89% at 120 minutes). Moreover, no effect of FLE treatment was found at the 1-mg/kg dose when administered alone.

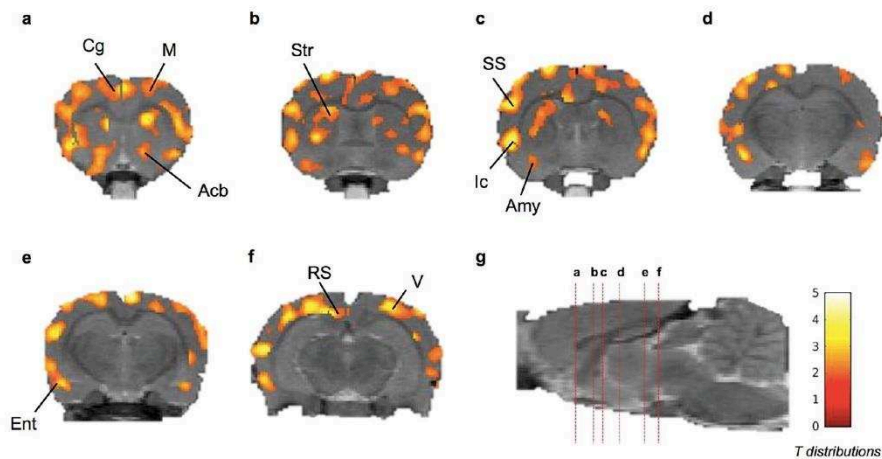
#### Brain and Serum Concentrations of Modafinil

Serum and brain were collected 30 minutes after treatment with modafinil alone (MOD) or combined with flecainide (THN102; Figure 4). Quantification of modafinil concentration levels treated with MOD or THN102 demonstrated no significant difference between both groups in serum ( $2.12 \pm 0.472$  ng/mL and  $2.14 \pm 0.419$  ng/mL, respectively) or in brain ( $1.37 \pm 0.262$  ng/g and

**Table 1.** SPM Results Showing Clusters, Peak Coordinates, and Significant Levels of Brain Regions with an Increase in <sup>18</sup>F-FDG Uptake When Comparing THN102 to MOD, FLE, or VEH

Intergroup Comparisons	Significant Clusters	Significant Peak Coordinates within Clusters			Peak Regions
		x	y	z	
THN102 > VEH	Cortex	0.5	4.6	3.6	R pre-limbic cortex
	Caudate and putamen (Striatum)	6.7	4.6	-5.6	R primary auditory cortex
	Amygdala	-5.7	3	-8.8	L temporal association cortex
		-0.1	1.2	-0.2	L cingulate cortex area 1
		-5.5	8.2	-0.6	L layer 3 of cortex
THN102 > FLE	Cortex	6.5	4.6	-5.8	R primary auditory cortex
	Caudate and putamen (Striatum)	4.3	2.8	2.0	R primary somatosensory
	Amygdala	-5.5	8.6	-4.8	L layer 3 of cortex
		-2.1	3.6	3.8	L forceps minor corpus callosum
		-3.1	0.4	-7.8	L primary visual cortex monocular
THN102 > MOD	Cortex	5.7	7.2	-1.6	R dysgranular cortex
	Caudate and putamen (Striatum)	2.1	1.4	4.4	R secondary motor cortex
	Amygdala	2.5	0.8	-5.2	R secondary visual cortex
		-0.7	0.4	-4.2	L retrosplenial/dysgranular cortex
		-3.7	6.8	3.0	L layer 3 of cortex
		-5.5	8.6	-4.8	L basolateral amygdaloid nucleus, posterior

Voxels comparison-based analysis was performed using SPM8 (n=5) rats per group using 1-way ANOVA followed by multiple comparison test. A significance level threshold of .05 and a minimum cluster size of 200 voxels were selected to identify significant clusters. Coordinates of significant peak ( $P < .05$ ) were given according to the Paxinos and Watson rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2007). FLE, flecainide 1 mg/kg; MOD, modafinil 10 mg/kg; THN102, modafinil 10 mg/kg + flecainide 1 mg/kg; VEH, vehicle.



**Figure 1.** Coronal brain section showing statistical parametric map for increase in relative <sup>18</sup>F-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (<sup>18</sup>F-FDG) uptake after Modafinil (MOD) + flecainide (THN102) treatment in comparison to MOD alone in rats. Following a cranio-caudal orientation centered on bregma (anterior is positive), coronal brain sections were at (a) 1.05, (b) -0.68, (c) -1.29, (d) -3.07, (e) -4.34, and (f) -5.76 millimeters from the bregma and (g) sagittal view of the brain with the marked coronal sections (red dotted lines) from a to f. Color scale represents all T distributions achieving statistical significance (see SPM statistical analysis). Acb, accumbens; Amy, amygdala; Cg, cingulate cortex; Ent, entorhinal cortex; Ic, insular cortex; M, motor cortex; RS, retrosplenial cortex; SS, somatosensory cortex; Str, striatum; V, visual cortex.

1.50 ± 0.277 ng/g, respectively). Therefore, there is no apparent pharmacokinetic interaction between MOD and FLE on MOD metabolism.

**Discussion**

In this study, we reported that THN102 significantly activates the cortico-amygdala-striata regions compared with MOD used alone.

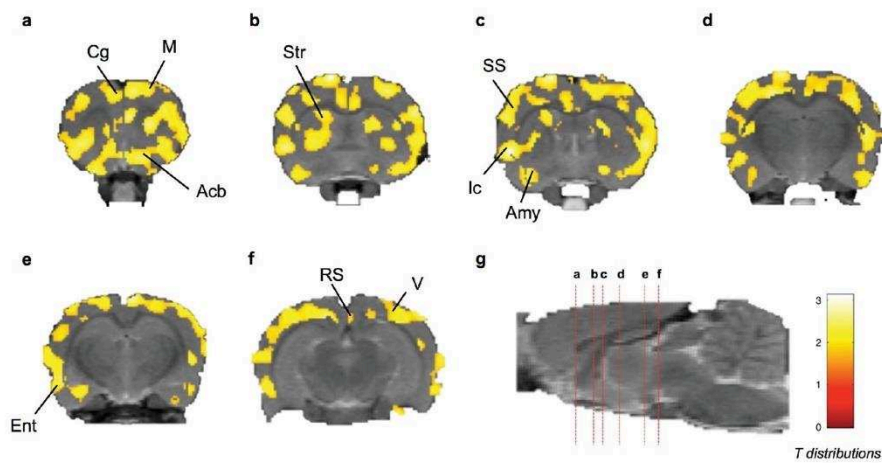
Modafinil has been largely proposed in sleep medicine to treat EDS associated with narcolepsy (Lavault et al., 2011; Thorpy and Dauvilliers, 2015; Barateau et al., 2016), Parkinson’s disease (Sheng et al., 2013; Rodrigues et al., 2016), idiopathic hypersomnia (Lavault et al., 2011; Lopez et al., 2017), and obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome (Black and Hirshkowitz, 2005). Numerous preclinical studies have generated a wealth of experimental data, which lead to many hypotheses regarding the mode of action of modafinil (Gerrard and Malcolm, 2007;

Downloaded from <https://academic.oup.com/ijnp/article-abstract/21/7/687/4938109> by guest on 19 July 2018

**Table 2.** SPM Results Showing Clusters, Peak Coordinates, and Significant Levels of Brain Regions with an Increase in MRGlu When Comparing THN102 to MOD in Rats

Intergroup Comparisons	Significant Clusters	Significant Peak Coordinates within Clusters			Peak Regions
		x	y	z	
THN102 > MOD	Cortex	4.1	0.8	-5.2	R primary visual cortex
	Caudate and putamen (Striatum)	0.7	2.2	3.8	R secondary motor cortex
	Amygdala	5.7	8.6	-4.6	R layer 3 of cortex
	Accumbens	-1.5	0.6	-0.4	L primary motor cortex
		-4.9	9.0	0.0	L layer 3 of cortex
		-6.5	6.4	-8.8	L dorsolateral entorhinal cortex

Voxels comparison based analysis was performed using SPM8 (n=5) rats per group using 1-way ANOVA followed by multiple comparison test. A significance level threshold of .05 and a minimum cluster size of 200 voxels were selected to identify significant clusters. Coordinates of significant peak ( $P < .05$ ) were given according to the Paxinos and Watson rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2007). MOD, modafinil 10 mg/kg; MRGlu, metabolic rate of glucose; THN102, modafinil 10 mg/kg + flecainide 1 mg/kg.



**Figure 2.** Coronal brain section showing statistical parametric map for increase in absolute metabolic rate of glucose (MRGlu) after Modafinil (MOD) + flecainide (THN102) treatment in comparison to MOD in rats. Following a cranio-caudal orientation centered on bregma (anterior is positive), coronal brain sections were at (a) 1.05, (b) -0.68, (c) -1.29, (d) -3.07, (e) -4.34, and (f) -5.76 millimeters from the bregma; and (g) sagittal view of the brain with the marked coronal sections (red dotted lines) from a to f. Color scale represents all T distributions achieving statistical significance (see SPM statistical analysis). Acb, accumbens; Amy, amygdala; Cg, cingulate cortex; Ent, entorhinal cortex; Ic, insular cortex; M, motor cortex; RS, retrosplenial cortex; SS, somatosensory cortex; Str, striatum; V, visual cortex.

Minzenberg and Carter, 2008). The central noradrenergic hypothesis has been supported by data showing that inhibition of catecholamine synthesis or antagonism of adrenergic receptors is able to attenuate the wake-promoting effects of modafinil (Duteil et al., 1991; Lin et al., 1992). Recent studies using mice lacking the noradrenaline synthesis or  $\alpha 1\beta$ -adrenoceptor (Stone et al., 2002a, 2002b; Hou et al., 2005) or brain imaging in humans (Minzenberg and Carter, 2008) also support the critical involvement of the locus coeruleus noradrenergic system in modafinil profile. The dopaminergic hypothesis has been very attractive and prevailing since the identification of an affinity of modafinil with dopamine transporter (Mignot et al., 1994; Wisor et al., 2001; Wisor and Eriksson, 2005; Korotkova et al., 2007; Qu et al., 2008). The brain disinhibitory hypothesis (Lin et al., 1996, 2000) has received less attention, yet it is supported by the fact that modafinil induces a significant decrease in GABA outflow (Ferraro et al., 1996) in many brains areas, notably those critically involved in sleep-wake cycle control.

Recent data indicated that not only neurons but also glial cells, in particular astrocytes, were modulated by modafinil, as it enhanced astrocyte coupling and the expression of one of their connexins, Cx30 (Liu et al., 2013). These data suggest that astroglial connexins might be involved in modafinil mode of action. Indeed, flecainide, an astroglial connexin inhibitor, was able to enhance modafinil procognitive and wake-promoting activities when coadministered to modafinil in rodents (Duchêne et al., 2016; Lu and Chen, 2016). THN102 is currently in phase II clinical trial on narcoleptic patients (NCT02821715). In this context, we compared the impact on brain functions between THN102 and modafinil in the rat by assessing their drug-induced changes in brain glucose metabolism.

The route of administration and dose of modafinil (10 mg/kg, i.v.) was based on a previous functional magnetic resonance imaging (fMRI) study in rats (Gozzi et al., 2012). Flecainide dose was chosen according to previous studies in rodents (Duchêne et al., 2016). Additionally, at selected doses, THN102 significantly increased locomotor activity, whereas modafinil alone



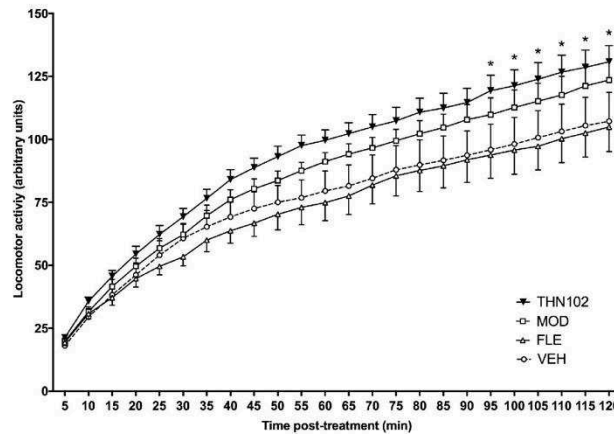


Figure 3. Cumulative traveled distance over 2 hours after vehicle (VEH), flecainide 1 mg/kg (FLE), modafinil 10 mg/kg (MOD), or MOD 10 mg/kg + FLE 1 mg/kg (THN102) treatment in awake rats. Locomotor activity of rats was measured during 2 hours after treatment. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 8 rats/group) and compared using 2-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \* $P < .05$  THN102 vs VEH.

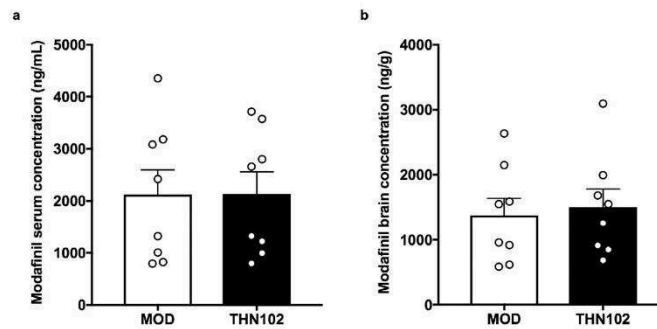


Figure 4. Serum (a) and brain (b) concentrations of modafinil after modafinil 10 mg/kg + flecainide 1 mg/kg (THN102) and modafinil 10 mg/kg (MOD) treatment. Thirty minutes after the treatment injection, serum and brain levels of MOD were sampled and quantified by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Data are expressed as means with scattered plots  $\pm$  SEM (n = 8 rats/group) and compared using an unpaired t test.

showed only a tendency to increase it (nonsignificant), as partially described elsewhere (Simon et al., 1996; Edgar and Seidel, 1997; Zolkowska et al., 2009). As previously reported in mice (Duchêne et al., 2016), assessment of modafinil concentration in the serum and brain confirmed that flecainide did not increase the brain distribution of modafinil. Therefore, pharmacokinetic interaction between flecainide and modafinil can unlikely explain the brain effect of THN102 compared with vehicle and modafinil alone. Serum concentrations were close to modafinil levels found in subjects following dosing of clinically effective doses (McClellan and Spencer, 1998; Wong et al., 1999), suggesting potential relevance of the presented data to clinical conditions.

Several methods have been proposed to investigate the CNS effects of modafinil in human (Ellis et al., 1999; Spence et al., 2005; Hunter et al., 2006; Thomas and Kwong, 2006; Kim et al., 2007; Joo et al., 2008a; Minzenberg et al., 2008; Rasetti et al., 2010; Ghahremani et al., 2011; Minzenberg et al., 2011; Goudriaan et al., 2013; Schmaal et al., 2013; Funayama et al., 2014; Schmaal et al., 2014; Ikeda et al., 2017; Schmidt et al., 2017) and animals (Engber et al., 1998; van Vliet et al., 2008; Dawson et al., 2012;

Gozzi et al., 2012), including fMRI, 2-deoxyglucose autoradiography, FDG PET, and cerebral blood flow assessment using single-photon emission computed tomography. These data tend towards a consensus over cortical and subcortical brain activations induced by modafinil including hypothalamic and thalamic regions (Thomas and Kwong, 2006; Gozzi et al., 2012), which are highly involved in the regulation of sleep-wake cycle (Szabadi, 2006; Lin et al., 2011). Other major structures are highlighted following modafinil administration as the caudate putamen (striatum), the amygdala, and the hippocampus (Engber et al., 1998; Ghahremani et al., 2011), known for their implication in driving emotions and cognitive functions (Joo et al., 2008a).

In our conditions, modafinil alone did not modulate glucose brain metabolism assessed by FDG PET compared with vehicle. Even though the dosage and the route were identical to a previous fMRI study (Gozzi et al., 2012), the observed cortical activation after treatment was not detected in our analysis. This difference highlights the discrepancies that may exist between the drug-induced response on blood oxygenation levels-dependent response and on energy consumption (Di et al., 2012;

Cabrera et al., 2016). Another explanation for such discrepancies may be the presence of anesthesia. In the present study, animals were exposed to <2.5% isoflurane during drug administration and subsequent PET acquisition. It was reported that isoflurane may modulate the brain glucose uptake and may thus limit the sensitivity of the method to detect the CNS response to investigated compounds in vivo (Spangler-Bickell et al., 2016; Park et al., 2017). Working on awake rodents was shown feasible, although technically challenging (Spangler-Bickell et al., 2016; Park et al., 2017). In the present study, we chose to administer investigated treatments under isoflurane anesthesia to facilitate animal handling, i.v. administration, and avoid any stress due to the experimental procedure. Moreover, we showed that the locomotor activity was different between groups, which may non-specifically impact FDG uptake by the brain in awake animals. Therefore, the whole procedure was performed under isoflurane anesthesia to highlight the intrinsic effect of each treatment on brain function and allow for dynamic PET acquisition for 60 minutes in immobile animals.

Some brain structures such as the locus coeruleus, thalamus, and hypothalamus, modulated by modafinil (Minzenberg et al., 2008; Gozzi et al., 2012; Schmaal et al., 2013) were not activated by THN102 compared with modafinil alone. More interestingly, this study reported that THN102 significantly increased the relative glucose brain uptake in the whole cortex, amygdala, and striatum compared with modafinil alone, hence suggesting a different activity on glucose metabolism between both treatment groups. Similar effects could be observed using pharmacokinetic modelling and estimation of the absolute MRGl<sub>u</sub>. Despite higher variability in this parameter, patterns of increased metabolic rate of glucose were detected in the cortex, striatum, amygdala, and accumbens of rats in the THN102 group compared with the MOD group. Such brain regions may be considered as substrates for the enhancement of modafinil effects by flecainide. They notably process attention states and motivation and code behavioral responses (Cardinal et al., 2002; Cho et al., 2013), functions that are altered in narcolepsy and that are potentially modulated by THN102 (Bayard et al., 2012).

The amygdala, cortex, and striatum are dopamine- and glutamate-rich brain areas (Darvas et al., 2011; Oikonomou et al., 2014). Data presented in this study point toward a putative role of THN102 on those dopaminergic and glutamatergic neurotransmission systems, potential targets of modafinil (Minzenberg and Carter, 2008). Furthermore, plasticity of astrocytes has also been demonstrated at least in the amygdala (Johnson et al., 2010) and cortex (Sims et al., 2015), providing potential evidence for the involvement of astrocyte networks in modafinil pharmacological profile (Duchêne et al., 2016).

Furthermore, our data confirm, for the first time, the greater effects of THN102 compared with modafinil in terms of brain activation, supporting the hypothesis that a modulation of connexins, and notably astroglial connexins Cx30 and Cx43 by flecainide, can impact modafinil mechanism of action. Recent PET studies in narcoleptic patients evidenced hypermetabolism in cortical regions compared with healthy controls, further pointing out the role of those areas in this disorder (Dauvilliers et al., 2010, 2017). Clinical FDG PET is feasible and may be useful to highlight the impact of THN102 on brain function in healthy volunteers and patients in the absence of anesthesia. Such studies might encompass dose-effect range and address the impact of flecainide on the neuropharmacology of modafinil in humans.

Taking together, we demonstrated here that THN102 enhanced both locomotor activity and glucose metabolism in cortical and subcortical areas involved in the regulation of

sleep-wake cycle and behaviors. Our results further support the hypothesis that astrocyte connexins are involved in pharmacological responses of psychoactive drugs such as modafinil (Duchêne et al., 2016; Jeanson et al., 2016; Charvériat et al., 2017).

## Funding

This work was supported by Theranexus Company and the Agence Nationale de la Recherche (grant number 14-CE16-0022).

## Acknowledgments

We thank Emile Jaumain for helpful technical assistance.

## Statement of Interest

F.M., M.C., and A.D. are full-time employees of Theranexus company. Y.D. served as consultant for Bioprojet Pharma, Flamel Technologies, Jazz Pharmaceuticals, Theranexus, Takeda, and UCB. The other authors declare no financial conflict of interest.

## References

- Bao Q, Newport D, Chen M, Stout DB, Chatziioannou AF (2009) Performance evaluation of the inveon dedicated PET preclinical tomograph based on the NEMA NU-4 standards. *J Nucl Med* 50:401–408.
- Barateau L, Lopez R, Dauvilliers Y (2016) Treatment options for narcolepsy. *CNS Drugs* 30:369–379.
- Bayard S, Croisier Langenier M, Cochen De Cock V, Scholz S, Dauvilliers Y (2012) Executive control of attention in narcolepsy. *Plos One* 7:e33525.
- Béracochéa D, Celerier A, Peres M, Pierard C (2003) Enhancement of learning processes following an acute modafinil injection in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 76:473–479.
- Black JE, Hirshkowitz M (2005) Modafinil for treatment of residual excessive sleepiness in nasal continuous positive airway pressure-treated obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome. *Sleep* 28:464–471.
- Cabrera EA, Wiers CE, Lindgren E, Miller G, Volkow ND, Wang GJ (2016) Neuroimaging the effectiveness of substance use disorder treatments. *J Neuroimmune Pharmacol* 11:408–433.
- Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ (2002) Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* 26:321–352.
- Charvériat M, Naus CC, Leybaert L, Sáez JC, Giaume C (2017) Connexin-dependent neuroglial networking as a new therapeutic target. *Front Cell Neurosci* 11:174.
- Cho YT, Ernst M, Fudge JL (2013) Cortico-amygdala-striatal circuits are organized as hierarchical subsystems through the primate amygdala. *J Neurosci* 33:14017–14030.
- Clasadonte J, Scemes E, Wang Z, Boison D, Haydon PG (2017) Connexin 43-mediated astroglial metabolic networks contribute to the regulation of the sleep-wake cycle. *Neuron* 95:1365–1380.
- Darvas M, Fadok JP, Palmiter RD (2011) Requirement of dopamine signaling in the amygdala and striatum for learning and maintenance of a conditioned avoidance response. *Learn Mem* 18:136–143.
- Dauvilliers Y, Comte F, Bayard S, Carlander B, Zanca M, Touchon J (2010) A brain PET study in patients with narcolepsy-cataplexy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81:344–348.
- Dauvilliers Y, Evangelista E, de Verbizier D, Barateau L, Peigneux P (2017) [18F]fluorodeoxyglucose-positron emission tomography

- evidence for cerebral hypermetabolism in the awake state in narcolepsy and idiopathic hypersomnia. *Front Neurol* 8:350.
- Dawson N, Thompson RJ, McVie A, Thomson DM, Morris BJ, Pratt JA (2012) Modafinil reverses phencyclidine-induced deficits in cognitive flexibility, cerebral metabolism, and functional brain connectivity. *Schizophr Bull* 38:457–474.
- Di X, Biswal BB, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2012) Metabolic brain covariant networks as revealed by FDG-PET with reference to resting-state fmri networks. *Brain Connect* 2:275–283.
- Duchêne A, Perier M, Zhao Y, Liu X, Thomasson J, Chauveau F, Piérard C, Lagarde D, Picoli C, Jeanson T, Mouthon F, Dauvilliers Y, Giaume C, Lin JS, Charvériat M (2016) Impact of astroglial connexins on modafinil pharmacological properties. *Sleep* 39:1283–1292.
- Duteil J, Rambert FA, Pessonnier J, Hermant JF, Gombert R, Assous E (1990) Central alpha 1-adrenergic stimulation in relation to the behavioural stimulating effect of modafinil; studies with experimental animals. *Eur J Pharmacol* 180:49–58.
- Duteil J, Rambert FA, Pointeau AM, Mangiameli P, Assous E (1991) Flerobuterol: a potential antidepressant drug related to beta-adrenergic agonists. Experimental profile in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 5:695–708.
- Edgar DM, Seidel WF (1997) Modafinil induces wakefulness without intensifying motor activity or subsequent rebound hypersomnolence in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 283:757–769.
- Ellis CM, Monk C, Simmons A, Lemmens G, Williams SC, Brammer M, Bullmore E, Parkes JD (1999) Functional magnetic resonance imaging neuroactivation studies in normal subjects and subjects with the narcoleptic syndrome. *Actions of modafinil. J Sleep Res* 8:85–93.
- Engber TM, Dennis SA, Jones BE, Miller MS, Contreras PC (1998) Brain regional substrates for the actions of the novel wake-promoting agent modafinil in the rat: comparison with amphetamine. *Neuroscience* 87:905–911.
- Ferraro L, Tanganelli S, O'Connor WT, Antonelli T, Rambert F, Fuxe K (1996) The vigilance promoting drug modafinil decreases GABA release in the medial preoptic area and in the posterior hypothalamus of the awake rat: possible involvement of the serotonergic 5-HT<sub>3</sub> receptor. *Neurosci Lett* 220:5–8.
- Franco-Pérez J, Ballesteros-Zebadúa P, Fernández-Figueroa EA, Ruiz-Olmedo I, Reyes-Grajeda P, Paz C (2012) Sleep deprivation and sleep recovery modifies connexin36 and connexin43 protein levels in rat brain. *Neuroreport* 23:103–107.
- Franco-Pérez J, Paz C (2009) Quinine, a selective gap junction blocker, decreases REM sleep in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 94:250–254.
- Funayama T, Ikeda Y, Tateno A, Takahashi H, Okubo Y, Fukayama H, Suzuki H (2014) Modafinil augments brain activation associated with reward anticipation in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 231:3217–3228.
- Gerrard P, Malcolm R (2007) Mechanisms of modafinil: A review of current research. *Neuropsychiatr Dis Treat* 3:349–364.
- Ghahremani DG, Tabibnia G, Monterosso J, Helleman G, Poldrack RA, London ED (2011) Effect of modafinil on learning and task-related brain activity in methamphetamine-dependent and healthy individuals. *Neuropsychopharmacology* 36:950–959.
- Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N (2010) Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 11:87–99.
- Goudriaan AE, Veltman DJ, van den Brink W, Dom G, Schmaal L (2013) Neurophysiological effects of modafinil on cue-exposure in cocaine dependence: a randomized placebo-controlled cross-over study using pharmacological fmri. *Addict Behav* 38:1509–1517.
- Gozzi A, Colavito V, Seke Etet PF, Montanari D, Fiorini S, Tambalo S, Bifone A, Zucconi GG, Bentivoglio M (2012) Modulation of fronto-cortical activity by modafinil: a functional imaging and fos study in the rat. *Neuropsychopharmacology* 37:822–837.
- Hou RH, Freeman C, Langley RW, Szabadi E, Bradshaw CM (2005) Does modafinil activate the locus coeruleus in man? Comparison of modafinil and clonidine on arousal and autonomic functions in human volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 181:537–549.
- Hunter MD, Ganesan V, Wilkinson ID, Spence SA (2006) Impact of modafinil on prefrontal executive function in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 163:2184–2186.
- Ikeda Y, Funayama T, Tateno A, Fukayama H, Okubo Y, Suzuki H (2017) Modafinil enhances alerting-related brain activity in attention networks. *Psychopharmacology (Berl)* 234:2077–2089.
- Jeanson T, Duchêne A, Richard D, Bourgoin S, Picoli C, Ezan P, Mouthon F, Giaume C, Hamon M, Charvériat M (2016) Potentiation of amitriptyline anti-hyperalgesic-like action by astroglial connexin 43 inhibition in neuropathic rats. *Sci Rep* 6:38766.
- Johnson RT, Breedlove SM, Jordan CL (2010) Astrocytes in the amygdala. *Vitam Horm* 82:23–45.
- Joo EY, Tae WS, Jung KY, Hong SB (2008a) Cerebral blood flow changes in man by wake-promoting drug, modafinil: a randomized double blind study. *J Sleep Res* 17:82–88.
- Joo EY, Seo DW, Tae WS, Hong SB (2008b) Effect of modafinil on cerebral blood flow in narcolepsy patients. *Sleep* 31:868–873.
- Kim YK, Yoon IY, Shin YK, Cho SS, Kim SE (2007) Modafinil-induced hippocampal activation in narcolepsy. *Neurosci Lett* 422:91–96.
- Korotkova TM, Klyuch BP, Ponomarenko AA, Lin JS, Haas HL, Sergeeva OA (2007) Modafinil inhibits rat midbrain dopaminergic neurons through D2-like receptors. *Neuropharmacology* 52:626–633.
- Lanz B, Poitry-Yamate C, Gruetter R (2014) Image-derived input function from the vena cava for 18F-FDG PET studies in rats and mice. *J Nucl Med* 55:1380–1388.
- Lavault S, Dauvilliers Y, Drouot X, Leu-Semenescu S, Gormard JL, Lecendrex M, Franco P, Arnulf I (2011) Benefit and risk of modafinil in idiopathic hypersomnia vs Narcolepsy with cataplexy. *Sleep Med* 12:550–556.
- Lin JS, Roussel B, Akaoka H, Fort P, Debilly G, Jouvret M (1992) Role of catecholamines in the modafinil and amphetamine induced wakefulness, a comparative pharmacological study in the cat. *Brain Res* 591:319–326.
- Lin JS, Hou Y, Jouvret M (1996) Potential brain neuronal targets for amphetamine-, methylphenidate-, and modafinil-induced wakefulness, evidenced by c-fos immunocytochemistry in the cat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14128–14133.
- Lin JS, Gervasoni D, Hou Y, Vanni-Mercier G, Rambert F, Frydman A, Jouvret M (2000) Effects of amphetamine and modafinil on the sleep/wake cycle during experimental hypersomnia induced by sleep deprivation in the cat. *J Sleep Res* 9:89–96.
- Lin JS, Anacleit C, Sergeeva OA, Haas HL (2011) The waking brain: an update. *Cell Mol Life Sci* 68:2499–2512.
- Liu X, Petit JM, Ezan P, Gyger J, Magistretti P, Giaume C (2013) The psychostimulant modafinil enhances gap junctional communication in cortical astrocytes. *Neuropharmacology* 75:533–538.
- Lopez R, Arnulf I, Drouot X, Lecendrex M, Dauvilliers Y (2017) French consensus. Management of patients with hypersomnia: which strategy? *Rev Neurol (Paris)* 173:8–18.
- Lu J, Chen M (2016) Glial gap junctions boost modafinil action on arousal. *Sleep* 39:1175–1177.

- Lynch G, Palmer LC, Gall CM (2011) The likelihood of cognitive enhancement. *Pharmacol Biochem Behav* 99:116–129.
- McClellan KJ, Spencer CM (1998) Modafinil: a review of its pharmacology and clinical efficacy in the management of narcolepsy. *CNS Drugs* 9:311–324.
- Mignot E, Nishino S, Guilleminault C, Dement WC (1994) Modafinil binds to the dopamine uptake carrier site with low affinity. *Sleep* 17:436–437.
- Minzenberg MJ, Carter CS (2008) Modafinil: a review of neurochemical actions and effects on cognition. *Neuropsychopharmacology* 33:1477–1502.
- Minzenberg MJ, Watrous AJ, Yoon JH, Ursu S, Carter CS (2008) Modafinil shifts human locus coeruleus to low-tonic, high-phasic activity during functional MRI. *Science* 322:1700–1702.
- Minzenberg MJ, Yoon JH, Carter CS (2011) Modafinil modulation of the default mode network. *Psychopharmacology (Berl)* 215:23–31.
- Oikonomou KD, Singh MB, Sterjanaj EV, Antic SD (2014) Spiny neurons of amygdala, striatum, and cortex use dendritic plateau potentials to detect network UP states. *Front Cell Neurosci* 8:292.
- Park TY, Nishida KS, Wilson CM, Jaiswal S, Scott J, Hoy AR, Selwyn RG, Dardzinski BJ, Choi KH (2017) Effects of isoflurane anesthesia and intravenous morphine self-administration on regional glucose metabolism ( $^{18}\text{F}$ FDG-PET) of male sprague-dawley rats. *Eur J Neurosci* 45:922–931.
- Patlak CS, Blasberg RG, Fenstermacher JD (1983) Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. *J Cereb Blood Flow Metab* 3:1–7.
- Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6<sup>th</sup> ed.
- Qu WM, Huang ZL, Xu XH, Matsumoto N, Urade Y (2008) Dopaminergic D1 and D2 receptors are essential for the arousal effect of modafinil. *J Neurosci* 28:8462–8469.
- Rasetti R, Mattay VS, Stankevich B, Skjei K, Blasi G, Sambataro F, Arrillaga-Romany IC, Goldberg TE, Callicott JH, Apud JA, Weinberger DR (2010) Modulatory effects of modafinil on neural circuits regulating emotion and cognition. *Neuropsychopharmacology* 35:2101–2109.
- Reilhac A, Charil A, Wimberley C, Angelis G, Hamze H, Callaghan P, Garcia MP, Boisson F, Ryder W, Meikle SR, Gregoire MC (2015) 4D PET iterative deconvolution with spatiotemporal regularization for quantitative dynamic PET imaging. *Neuroimage* 118:484–493.
- Rodrigues TM, Castro Caldas A, Ferreira JJ (2016) Pharmacological interventions for daytime sleepiness and sleep disorders in Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis. *Parkinsonism Relat Disord* 27:25–34.
- Salet M, Anderer P, Semlitsch HV, Saletu-Zyhlarz GM, Mandl M, Zeithofer J, Saletu B (2007) Low-resolution brain electromagnetic tomography (LORETA) identifies brain regions linked to psychometric performance under modafinil in narcolepsy. *Psychiatry Res* 154:69–84.
- Scammell TE, Estabrooke IV, McCarthy MT, Chemelli RM, Yanagisawa M, Miller MS, Saper CB (2000) Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness. *J Neurosci* 20:8620–8628.
- Schiffer WK, Mirrione MM, Biegon A, Alexoff DL, Patel V, Dewey SL (2006) Serial micropet measures of the metabolic reaction to a microdialysis probe implant. *J Neurosci Methods* 155:272–284.
- Schmaal L, Joos L, Koeleman M, Veltman DJ, van den Brink W, Goudriaan AE (2013) Effects of modafinil on neural correlates of response inhibition in alcohol-dependent patients. *Biol Psychiatry* 73:211–218.
- Schmaal L, Goudriaan AE, Joos L, Dom G, Pattij T, van den Brink W, Veltman DJ (2014) Neural substrates of impulsive decision making modulated by modafinil in alcohol-dependent patients. *Psychol Med* 44:2787–2798.
- Schmidt A, Muller F, Dolder PC, Schmid Y, Zanchi D, Liechti ME, Borgwardt S (2017) Comparative effects of methylphenidate, modafinil and MDMA on response inhibition neural networks in healthy subjects. *Int J Neuropsychopharmacol* 20:712–720.
- Sheng P, Hou L, Wang X, Wang X, Huang C, Yu M, Han X, Dong Y (2013) Efficacy of modafinil on fatigue and excessive daytime sleepiness associated with neurological disorders: a systematic review and meta-analysis. *Plos One* 8:e81802.
- Simon P, Hémet C, Costentin J (1996) Analysis of stimulant locomotor effects of modafinil in various strains of mice and rats. *Fundam Clin Pharmacol* 10:431–435.
- Sims RE, Butcher JB, Parri HR, Glazewski S (2015) Astrocyte and neuronal plasticity in the somatosensory system. *Neural Plast* 2015:732014.
- Soto-Montenegro ML, Vaquero JJ, Pascau J, Gispert JD, García-Barreno P, Desco M (2009) Detection of visual activation in the rat brain using 2-deoxy-2-[( $^{18}\text{F}$ )fluoro-D- $\beta$ -glucose and statistical parametric mapping (SPM). *Mol Imaging Biol* 11:94–99.
- Spangler-Bickell MG, de Laat B, Fulton R, Bormans G, Nuyts J (2016) The effect of isoflurane on  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake in the rat brain: a fully conscious dynamic PET study using motion compensation. *EJNMMI Res* 6:86.
- Spence SA, Green RD, Wilkinson ID, Hunter MD (2005) Modafinil modulates anterior cingulate function in chronic schizophrenia. *Br J Psychiatry* 187:55–61.
- Stone EA, Cotecchia S, Lin Y, Quartermain D (2002a) Role of brain alpha 1B-adrenoceptors in modafinil-induced behavioral activity. *Synapse* 46:269–270.
- Stone EA, Lin Y, Suckow RF, Quartermain D (2002b) Stress-induced subsensitivity to modafinil and its prevention by corticosteroids. *Pharmacol Biochem Behav* 73:971–978.
- Szabadi E (2006) Drugs for sleep disorders: mechanisms and therapeutic prospects. *Br J Clin Pharmacol* 61:761–766.
- Thomas RJ, Kwong K (2006) Modafinil activates cortical and subcortical sites in the sleep-deprived state. *Sleep* 29:1471–1481.
- Thorpy MJ, Dauvilliers Y (2015) Clinical and practical considerations in the pharmacologic management of narcolepsy. *Sleep Med* 16:9–18.
- Tokugawa J, Ravasi L, Nakayama T, Schmidt KC, Sokoloff L (2007) Operational lumped constant for FDG in normal adult male rats. *J Nucl Med* 48:94–99.
- van Vliet SA, Blezer EL, Jongsma MJ, Vanwersch RA, Olivier B, Philippens IH (2008) Exploring the neuroprotective effects of modafinil in a marmoset parkinson model with immunohistochemistry, magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Brain Res* 1189:219–228.
- Weber B, Burger C, Biro P, Buck A (2002) A femoral arteriovenous shunt facilitates arterial whole blood sampling in animals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 29:319–323.
- Willie JT, Renthal W, Chemelli RM, Miller MS, Scammell TE, Yanagisawa M, Sinton CM (2005) Modafinil more effectively induces wakefulness in orexin-null mice than in wild-type littermates. *Neuroscience* 130:983–995.
- Wimberley C, Angelis G, Boisson F, Callaghan P, Fischer K, Pichler BJ, Meikle SR, Grégoire MC, Reilhac A (2014) Simulation-based optimisation of the PET data processing for partial saturation approach protocols. *Neuroimage* 97:29–40.

- Wisor JP, Nishino S, Sora I, Uhl GH, Mignot E, Edgar DM (2001) Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness. *J Neurosci* 21:1787–1794.
- Wisor JP, Eriksson KS (2005) Dopaminergic-adrenergic interactions in the wake promoting mechanism of modafinil. *Neuroscience* 132:1027–1034.
- Wong YN, Simcoe D, Hartman LN, Laughton WB, King SP, McCormick GC, Grebow PE (1999) A double-blind, placebo-controlled, ascending-dose evaluation of the pharmacokinetics and tolerability of modafinil tablets in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 39:30–40.
- Zolkowska D, Jain R, Rothman RB, Partilla JS, Roth BL, Setola V, Prisinzano TE, Baumann MH (2009) Evidence for the involvement of dopamine transporters in behavioral stimulant effects of modafinil. *J Pharmacol Exp Ther* 329:738–746.

## II - Projet 2 : Étude multimodale des mécanismes impliqués dans l'interaction buprénorphine/diazépam à l'origine d'une dépression respiratoire

### II.A - Contexte

L'efficacité de la méthadone et de la buprénorphine est probablement comparable dans le traitement des troubles de l'usage des opioïdes (West *et al*, 2000). En revanche, la méthadone est associée à une plus grande mortalité en comparaison avec la buprénorphine (Bell *et al*, 2009). Cette différence est attribuée aux effets respiratoires plafonnés de la buprénorphine et à son activité d'agoniste partiel des récepteurs  $\mu$  (Cowan *et al*, 1977; Walsh *et al*, 1994). L'autre particularité de la buprénorphine, par rapport aux autres opioïdes, est que la dépression respiratoire qu'elle engendre est peu ou pas reversée par la naloxone, l'antagoniste des récepteurs opioïdes utilisé en pratique clinique (Megarbane *et al*, 2010).

Cependant, dès les premières années de sa commercialisation, des décès impliquant la buprénorphine ont été rapportés essentiellement dans deux circonstances : lorsque la buprénorphine était mésusée (comprimés pilés injectés) et surtout lorsqu'elle était administrée avec d'autres psychotropes, au premier rang desquels les benzodiazépines (Pirnay *et al*, 2004). La co-consommation fréquente de benzodiazépines chez les usagers d'opioïdes (estimée entre 50 et 70 %) peut être expliquée par leurs effets positifs sur les effets psychoactifs des opioïdes (Jones *et al*, 2012). Mieux comprendre cette interaction, pour la prévenir et la traiter, est aujourd'hui un enjeu majeur. La buprénorphine est, en effet, de plus en plus utilisée et supplante dans certains pays la prescription de méthadone (Wakeman and Barnett, 2018).

Depuis plusieurs années, les mécanismes de cette interaction ont été étudiés. L'hypothèse d'une interaction pharmacocinétique périphérique semble exclue (Alhaddad *et al*, 2012; Hreiche *et al*, 2006). En revanche l'hypothèse d'une interaction neuro-pharmacocinétique et/ou réceptologique et/ou pharmacodynamique reste à démontrer.

## II.B - Objectifs

Ce projet constitue le cœur de mon travail de thèse. L'objectif de ce travail était d'étudier les hypothèses neuro-pharmacocinétique, réceptologique et pharmacodynamique chez le rat selon une approche multi-modale *in vivo* afin d'élucider les mécanismes impliqués dans les effets déresseurs respiratoires de l'interaction entre la buprénorphine et les benzodiazépines.

## II.C - Schéma expérimental

Les précédentes études expérimentales, chez le rat, avaient été principalement réalisées avec le flunitrazépam dans les années 2000 qui était alors la benzodiazépine la plus utilisée chez les toxicomanes. Le flunitrazépam ayant été retiré du marché, la consommation s'est reportée sur le diazépam que nous avons utilisé dans cette étude. La dose choisie a été celle rapportée dans la littérature comme n'induisant pas d'effets respiratoires cliniquement significatifs (McCormick *et al*, 1984). La dose de buprénorphine était celle utilisée dans le modèle développé au sein de notre équipe (Hreiche *et al*, 2006).

### II.C.1 - Étude des effets respiratoires du diazépam, de la buprénorphine et de l'association diazépam/buprénorphine sur la fonction respiratoire

Les rats étaient randomisés en 4 groupes par procédure expérimentale pour recevoir concomitamment soit : les solvants (Tween 10% 1ml/kg sous cutané (s.c.) et 1ml/kg i.p., groupe contrôle), soit diazepam 20 mg/kg s.c. + Tween 10% 1 ml/kg i.p., soit Tween 10% 1 ml/kg s.c. + buprénorphine 30 mg/kg i.p. soit diazepam 20 mg/kg s.c. + buprénorphine 30 mg/kg i.p.

Trois procédures expérimentales ont été réalisées :

- ◆ Une première série de rats avec mesure des gaz du sang à T-30, T-15, T-5, T0, T5, T10, T15, T30, T60, T120, T180, T240 (T0 définissant le temps d'injection des produits)
- ◆ Une seconde série de rats avec mesure des temps et volumes respiratoires par pléthysmographie corps entier à T-5, T0, T5, T10, T15, T30, T60, T120, T180, T240 (T0 définissant le temps d'injection des produits)

- ◆ Une troisième série de rats avec enregistrement de l'électromyogramme diaphragmatique entre T-30 et T240 (T0 définissant le temps d'injection des produits)

### II.C.2 - Impact d'un prétraitement par antagonistes des récepteurs opioïdes et GABA sur la dépression respiratoire induite par l'association diazepam/buprénorphine.

Les rats étaient randomisés en 2 groupes de 6 rats pour chaque antagoniste (antagoniste et solvant) et chaque procédure expérimentale (gaz du sang et pléthysmographie). Les doses et le délai avant l'injection de diazépam et de buprénorphine étaient décrits dans la littérature comme entraînant une activité antagoniste maximale. Par ailleurs, aucun des antagonistes opioïdes n'étaient décrits pour entraîner des effets respiratoires (Chevillard *et al*, 2009). En l'absence de données pour le flumazénil et le scalofène nous avons vérifiés l'absence d'effet de ces molécules sur les données des gaz du sang et de pléthysmographie (N=3).

Ils recevaient respectivement :

- ◆ Naloxonazine [antagoniste des récepteurs  $\mu$ ] 10 mg/kg ou eau distillée 1 ml/kg i.v. 5 min avant l'injection de diazépam 20 mg/kg s.c. + buprénorphine 30 mg/kg i.p.
- ◆ NorBNI [antagoniste des récepteurs  $\kappa$ ] ou eau distillée 1 ml/kg i.v. 6 h avant l'injection de diazépam 20 mg/kg s.c. + buprénorphine 30 mg/kg i.p.
- ◆ Naltrindole [antagoniste des récepteurs  $\delta$ ] 3 mg/kg ou eau distillée 1 ml/kg s.c. 45 min avant l'injection de diazépam 20 mg/kg s.c. + buprénorphine 30 mg/kg i.p.
- ◆ Flumazénil [antagoniste des récepteurs GABA-A] 10 mg/kg ou Tween 10% 1 ml/kg s.c. 20 min avant l'injection de diazépam 20 mg/kg s.c. + buprénorphine 30 mg/kg i.p.
- ◆ Saclofène [antagoniste des récepteurs GABA-B] : 11,2 mg/kg ou sérum physiologique 1ml/kg s.c. 15 min avant l'injection de diazépam 20 mg/kg s.c. + buprénorphine 30 mg/kg i.p.

Deux procédures expérimentales ont été réalisées :

- ◆ Une première série de rats avec mesure des gaz du sang à T-30, T-15, T-5, T0, T5, T10, T15, T30, T60, T120, T180, T240 (T0 définissant le temps d'injection des produits)
- ◆ Une seconde série de rats avec mesure des temps et volumes respiratoires par pléthysmographie corps entier à T-30, T-15, T-5, T0, T5, T10, T15, T30, T60, T120, T180, T240 (T0 définissant le temps d'injection des produits)



### II.C.3 - Impact d'un prétraitement par diazépam sur l'exposition cérébrale et la fixation cérébrale de $^{11}\text{C}$ -buprénorphine

#### II.C.3.a - Recherche d'une région de référence

Les rats étaient randomisés en 2 groupes (N=2). Dans un premier groupe les rats recevaient une injection de  $^{11}\text{C}$ -buprénorphine suivie d'une acquisition TEP dynamique de 60 min. Dans un second groupe les modalités étaient les mêmes hormis une injection de buprénorphine « froide » à 0,15 mg/kg i.v. après 30 min d'acquisition.

#### II.C.3.b- Impact du diazépam sur la fixation cérébrale de $^{11}\text{C}$ -buprénorphine

La fixation cérébrale de  $^{11}\text{C}$ -buprénorphine i.v. a été évaluée chez 10 rats : 5 rats ayant reçu une injection s.c. de Tween 10% 15 min avant l'injection de  $^{11}\text{C}$ -buprénorphine et 5 rats traités par diazépam 20 mg/kg s.c. 15 min avant l'injection de  $^{11}\text{C}$ -buprénorphine i.v. Les acquisitions TEP étaient réalisées sous anesthésie (isoflurane 2%) et de manière dynamique pendant 60 min. La fixation cérébrale  $^{11}\text{C}$ -flumazénil était estimée par le calcul de  $BP_{ND}$  par le modèle SRTM dans les deux conditions expérimentales.

### II.D - Analyse statistique

Pour l'analyse des volumes respiratoires, des gaz du sang et de l'électromyogramme, les données étaient normalisées par rapport aux données moyennées obtenues avant l'injection des traitements.

Les résultats étaient exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Pour analyser simultanément l'effet du temps (jusqu'à 240 min) et l'effet des traitements sur chaque paramètre étudié et pour chaque animal, nous avons effectué une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) suivi de tests de comparaisons multiples avec correction de Bonferroni. Les aires sous la courbe (AUC) étaient calculées en utilisant la méthode trapézoïdale pour analyser l'effet global de chaque médicament sur chaque paramètre et chez chaque animal pendant les 60 premières minutes après l'administration du médicament (Tallarida and Murray, 1987). Les AUCs étaient comparées à l'aide d'un *t-test* de Student ou d'une ANOVA à un facteur suivies de tests de comparaisons multiples avec correction de Bonferroni. Dans l'étude TEP, le  $BP_{ND}$  entre les

deux groupes était comparé par un *t-test* de Student. Une comparaison voxel a voxel a également été réalisée sur des images paramétriques selon les mêmes modalités que dans le premier projet.

Pour étudier l'interaction entre le diazépam et la buprénorphine sur chaque paramètre, nous avons construit un tableau des AUCs 2x2 (diazépam ou non x buprénorphine ou non) et effectué une ANOVA à deux facteurs (Slinker, 1998).

Tous les tests ont été réalisés en utilisant le logiciel GraphPad (GraphPad Prism version 5). Un seuil de  $p < 0,05$  était considéré comme significatif.

## II.E - Résultats

Le diazépam ou la buprénorphine seuls n'induisaient pas de dépression respiratoire. En revanche, l'association des deux molécules entraînait une dépression respiratoire cliniquement significative.

La baisse de la fréquence respiratoire était secondaire à l'allongement du temps inspiratoire lié à la buprénorphine et au raccourcissement limité du temps expiratoire lié au diazépam. La diminution du volume courant était secondaire aux effets du diazépam sur la fonction diaphragmatique alors que la buprénorphine augmentait la contraction et le travail du diaphragme (tendance).

L'entrée dans le cerveau des rats de la  $^{11}\text{C}$ -buprénorphine, comme sa fixation aux récepteurs opioïdes, n'étaient pas modifiées en présence de diazépam.

Le prétraitement par antagoniste des récepteurs opioïdes et GABA montrait une réversion de ces effets respiratoires par la naloxonazine et le flumazénil.

## II.F - Discussion et conclusion

La dépression respiratoire observée au cours des intoxications par diazépam et buprénorphine résultait de la combinaison des effets pharmacodynamiques des deux molécules et non d'une interaction neuropharmacocinétique ou réceptologique. Cette interaction impliquait les récepteurs opioïdes  $\mu$  et GABA-A.

**Elucidating the mechanisms of respiratory depression induced by buprenorphine and diazepam in combination - an experimental study in the rat**

SOU MIS A ANESTHESIOLOGY

Dominique Vodovar, M.D., Lucie Chevillard, Ph.D.,

Fabien Caille, Ph.D., Patricia Risède, Tech., Géraldine Pottier, M.Sc.,

Sylvain Auvity, Pharm.D, Ph.D., Catriona Wimberley, Ph.D., Irène Buvat, Ph.D.,

Bruno Mégarbane, M.D., Ph.D. \*, Nicolas Tournier, Pharm.D., Ph.D. \*

From Inserm, UMRS-1144, Paris-Descartes and Paris-Diderot Universities, Paris, France (D.V., L.C., P.R., B.M.); Imagerie Moléculaire In Vivo, IMIV, CEA, INSERM, CNRS, Paris-Sud and Paris-Saclay Universities, CEA-SHFJ, Orsay, France (D.V., F.C., G.P., S.A., C.W., I.B., N.T.); and Department of Medical and Toxicological Critical Care, Lariboisière Hospital, Paris, France (B.M.).

\*These authors contributed equally to this work.

For information regarding this article, E-mail: [bruno-megarbane@wanadoo.fr](mailto:bruno-megarbane@wanadoo.fr)

**Correspondence:**

Address correspondence to ~~Prof~~MD PhD. Bruno Mégarbane: Réanimation Médicale et Toxicologique, Hôpital Lariboisière, 2 Rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France. Telephone: +33-149958961; Fax: +33-149956578. E-mail: [bruno-megarbane@wanadoo.fr](mailto:bruno-megarbane@wanadoo.fr)

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank the animal housing facility team of the Pharmacy Faculty in Paris-Descartes University for their technical assistance. They would like also to thank Mrs. Alison Good (Scotland, UK) for her helpful review of the manuscript.

**Word count:** abstract (300 words) – manuscript (4,000 words) + **4 Figures and 1 Table**

**Abbreviated title:** Buprenorphine/diazepam-induced respiratory depression

**Keywords:** Buprenorphine; benzodiazepine; mechanism; respiratory depression; rat; PET imaging

## **Conflict of interest statement**

There are no conflicts of interest associated with this study.

## **Funding statement**

Dominique Vodovar received a joined grant from AP-HP and CEA.

### **What We Already Know about This Topic**

- Despite its partial mu-opioid receptor agonist activity with ceiling respiratory effects, respiratory depression has been attributed to buprenorphine, mainly in patients combining buprenorphine and benzodiazepines.
- Benzodiazepines are unlikely to alter peripheral disposition and elimination of buprenorphine.

### **What This Article Tells Us That Is New**

- Interaction between diazepam and buprenorphine is not related to diazepam-induced alterations in brain buprenorphine distribution or buprenorphine binding to the brain opioid receptors.
- Respiratory depression resulting from the diazepam/buprenorphine combination is due to the combination of the physiological effects of each drug on ventilation parameters.

## ABSTRACT

**Background:** Despite its partial mu-opioid receptor (OR) agonist activity with ceiling respiratory effects, respiratory depression has been attributed to buprenorphine (BUP), the prescription of which has been encouraged to combat the opioid overdose crisis. Deleterious benzodiazepine (BZD)/BUP interactions have been hypothesized, but the mechanisms remain poorly understood. We conducted a rat study aiming to investigate three possible mechanisms of BZD/BUP interaction including 1- BZD-induced increase in brain BUP distribution; 2- BZD-induced potentiation of BUP interaction with ORs; and 3- the combination of BUP- and BZD-related effects on ventilation.

**Methods:** We studied the neuro-respiratory effects of BUP (30 mg/kg, intraperitoneally), diazepam (DZP, 20 mg/kg, subcutaneously) and their combination using arterial blood gas, plethysmography and diaphragm electromyography. Pretreatments with various receptor antagonists were administered. The impact of DZP on  $^{11}\text{C}$ -BUP brain binding and distribution was studied using PET imaging.

**Results:** In contrast to DZP and BUP alone, the DZP/BUP combination significantly induced early-onset sedation ( $P < 0.001$ ), hypothermia ( $P < 0.01$ ) and respiratory depression ( $P < 0.001$ ). Based on our PET investigation, DZP pretreatment did not alter  $^{11}\text{C}$ -BUP kinetics or binding potential in tested brain regions. DZP/BUP combination-induced effects on inspiratory time were additive and abolished by naloxonazine ( $P < 0.05$ ), with negligible contribution of DZP compared to BUP ( $P < 0.001$ ). DZP/BUP combination-attributed effects on expiratory time were non-additive ( $P < 0.01$ ), significantly different from BUP- ( $P < 0.05$ ) but not DZP-induced effects and abolished by flumazenil ( $P < 0.001$ ). DZP/BUP combination-attributed effects on tidal volume were non-additive ( $P < 0.01$ ), significantly different from DZP- ( $P < 0.05$ ) and BUP-induced effects ( $P < 0.001$ ) and abolished by naloxonazine ( $P < 0.01$ ) and flumazenil ( $P < 0.05$ ). Similarly to DZP, the DZP/BUP combination significantly decreased diaphragm amplitude contraction compared to BUP ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions:** The DZP/BUP combination is responsible for respiratory depression. We ruled out DZP-induced alteration in brain BUP kinetics and binding to ORs. Pharmacodynamic parameters and antagonist pretreatments strongly argue that DZP/BUP combination-induced respiratory depression results from the combination of each of the drug-induced effects on ventilation.

## Introduction

Opioid overdose is a major public health concern worldwide representing the first cause of drug-related deaths in the US.<sup>1</sup> Buprenorphine (BUP), a partial mu-opioid receptor (OR) agonist with respiratory ceiling effects, is increasingly used as maintenance treatment in opioid-dependent patients. Recently, BUP prescription has been encouraged to limit the opioid overdose crisis.<sup>2</sup> However, despite its well-established safety pattern, fatalities and respiratory depression have been reported in BUP-treated patients.<sup>3,4</sup> Toxicity has been mainly attributed to the benzodiazepine (BZD)/BUP combination, suggesting deleterious drug-drug interactions.

Preclinical studies strongly supported the onset of deleterious BZD/BUP interaction on respiration, although the exact mechanisms involved remained poorly understood. In the rat, neither BUP alone (up to 80% of its lethal dose-50%) nor BZDs alone induced significant respiratory depression, while their combination did.<sup>5-14</sup> In vivo and in vitro studies consistently showed that BZDs were not likely to alter peripheral BUP disposition and elimination<sup>10,12,15,16</sup>. Interestingly, norbuprenorphine, the major active BUP metabolite by cytochrome P450 (CYP)3A, was shown to be a potent respiratory depressor transported by the P-glycoprotein, in contrast to BUP.<sup>6,11,17</sup> In P-glycoprotein-knockout mice, BUP was responsible for respiratory depression attributed to the lack of P-glycoprotein-mediated N-BUP efflux at the blood-brain barrier.<sup>18,19</sup>

Since BZDs are neither CYP3A inducers nor P-glycoprotein inhibitors, hypotheses of increase in N-BUP production and/or brain uptake appeared unlikely to explain respiratory depression resulting from the BZD/BUP interaction. We hypothesized three alternative mechanisms including increased brain distribution of BUP in relation to BZDs (hypothesis 1); BZD-mediated potentiation of BUP interaction with ORs (hypothesis 2); and the additive or non-additive combination of BUP- and BZD-related effects on ventilation (hypothesis 3).

Therefore, we designed the following rat study aiming to investigate the neuropharmacokinetic, receptologic and pharmacodynamic components of diazepam (DZP)/BUP interaction in vivo. A rat model mimicking respiratory depression observed after DZP/BUP co-administration was used. A multimodal in vivo approach including plethysmography, arterial blood gas, diaphragm electromyogram (EMG) and carbon-11 radiolabeled BUP (<sup>11</sup>C-BUP) positron emission tomography (PET) imaging was performed. Selective  $\gamma$ -aminobutyric acid-receptor (GABA-R) and OR antagonists were used to clarify the contribution of each receptor system to the DZP/BUP interaction resulting in respiratory depression.

## Materials and Methods

The study was conducted in accordance with the French legislation and European directives on animal use in research. The protocol was approved by the local committee for animal experimentation (P2.BM.128.10 and APAFIS#7466-20-1611-04-1-7049220v2).

### Animals

We used male Sprague-Dawley rats (Janvier, France) weighing 250-350 g on the day of experiment. They were housed in a temperature- and humidity-controlled facility, with 12h-dark-light cycles and free access to food and water. For surgery, anesthesia was performed using intraperitoneal (i.p.) 70mg/kg ketamine and 10mg/kg xylazine. At the end of experiment, rats were sacrificed using a CO<sub>2</sub> chamber.

### Clinical parameters

Drug-induced effects on temperature were continuously measured during plethysmography. Sedation, ataxia and tonus were assessed in 4 levels (from 0 to 3).<sup>13</sup> Regarding sedation, rats were completely awake (stage 0), had reduced activity (stage 1), were asleep with no spontaneous motility (stage 2) or comatose (stage 3). Regarding ataxia, rats presented normal (stage 0), mildly impaired (stage 1), moderately impaired gait (stage 2) or abolished walking capacity (stage 3). Regarding tonus, rats had intact righting reflex (stage 0), intact righting reflex accompanied by diminished muscular tone (stage 1), reduced righting reflex (stage 2) or no righting reflex (stage 3). Clinical parameters were obtained 30, 15 and 5 min before and 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 and 240 min after drug injection.

### Arterial blood gas

One day before the experiment, the rat was placed on a warming blanket with controlled temperature. The femoral artery was catheterized under anesthesia using a 30cm-silastic tubing with 0.94mm-external and 0.51mm-internal diameters (Dow Corning Co., Midland, USA). The arterial catheter was subcutaneously tunneled and fixed at the back of the neck. Heparinized saline was injected to prevent catheter thrombosis and obstruction. A 24h-recovery period was required to allow complete anesthesia washout. On the day of the experiment, the rat was placed in a horizontal Plexiglas cylinder (6.5cm-internal diameter, up to 20cm-adjustable length) (Harvard Apparatus, Inc. Holliston, USA), modified by the addition of holes at the cephalic end to prevent CO<sub>2</sub> rebreathing. After a 60min-period of accommodation, the catheter was exteriorized, flushed, and its patency verified. One-hundred- $\mu$ l-blood was sampled and immediately analyzed using Rapidlab<sup>®</sup> 248 (Bayer Diagnostics, Germany) 5 min



before and, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 and 240 min after drug injection. Every hour, 200µl heparinized 0.9% NaCl were administered to avoid catheter clotting and compensate for volume loss.

### **Plethysmography parameters**

Respiratory parameters were recorded in a whole-body plethysmograph by the barometric method.<sup>20</sup> The day of experimentation, the rat was placed in a rectangular 3l-Plexiglas chamber connected to a reference chamber of the same size by a high-resistance leak to minimize the effects of changes in room pressure. The chamber was continuously flushed with 5l/min-humidified air. During recording, the inlet and outlet tubes were temporarily clamped. Pressure changes associated with breath were recorded using a differential pressure transducer (Validyne MP,  $45\pm 3$  cmH<sub>2</sub>O, Northridge, USA), connected to the chambers. During each measurement, calibration was performed by three injections of 1ml-air into the chamber. Ambient temperature was noted. Spirograms were recorded on a computer equipped with a PCI-DAS1000-data card (Dipsi, France) and analyzed using Acquis1-Software (CNRS, France). This technique was validated with a daily series of leak tests (a leak was signaled if reduction in the signal amplitude  $>33\%$  in 5s).<sup>21</sup> The limit of quantification corresponded to a minimum 70µl-air volume injected. Within the range of 100-300µl, volume measurements were linear. The coefficient of intra-day variability (four series of five measurements on the same day) was  $0.19\pm 0.04\%$ . The coefficient of inter-day variability (25 measurements on three different days) was  $0.91\pm 0.19\%$ . We checked that CO<sub>2</sub> measured using an Ohmeda-5250-RGM capnograph during clamping periods did not exceed 0.6% of the air contained in the chamber (rebreathing test).

Three days before the experiment, temperature transmitters (DSI, France) were implanted under anesthesia in the rat peritoneal cavity before recovery. On the experiment day, treatment was administered after a 60min-period of accommodation. The rat was gently removed for injection and replaced in the chamber. Respiratory parameters were recorded at 30, 15 and 5 min before and 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 and 240 min after drug injection, each recording lasting ~60s. The tidal volume ( $V_T$ ), the inspiratory time ( $T_I$ ) and the expiratory time ( $T_E$ ) were measured. The total time ( $T_{Tot}=T_I+T_E$ ), the respiratory frequency ( $f=1/T_{Tot}$ ) and the minute ventilation ( $V_E=V_T*f$ ) were calculated.

### **Diaphragm EMG**

EMG signal represents the electrical expression of neuromuscular stimulation resulting in muscle contraction.<sup>22</sup> EMG measures the spontaneous electrical potential difference between two sites in a muscle, corresponding to a single motor unit action potential.<sup>23</sup> Five days before the experiment, the rat peritoneal cavity was surgically opened under anesthesia and two insulated multi-stranded stainless-steel wires fixed on the costal diaphragm using biological glue (3M®).<sup>24</sup> Wires were connected to a telemetry transmitter (DSI, France) implanted in the peritoneal cavity (as described above). On the

experiment day, the rat was placed in a cage upon the telemetry platform (DSI, France). Signal was recorded continuously during a 60min-acclimatization period. The rat was gently removed for injection and replaced in the chamber. Signal was then recorded during 240 min. The demodulated electrical signal was high-pass filtered at 100Hz to eliminate electrocardiogram interferences, rectified to get only positive values (half-wave rectification), and smoothed using a low-pass filter to obtain an envelope equivalent of the modulating signal (Dataquest-A.R.T.4.3. DSI, France). The curve was converted into digital data. Six-second segments were analyzed at 30, 15 and 5 min before and 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 and 240 min after drug injection.

### **<sup>11</sup>C-BUP PET imaging**

PET imaging was conducted using an Inveon<sup>®</sup> microPET-CT scanner (Siemens, Germany).<sup>25</sup> Anesthesia was induced and thereafter maintained using 3 and 1.5–2.5% isoflurane in O<sub>2</sub>, respectively. After catheterizing its caudal vein, the rat was placed into the microPET-CT-scanner with its head in the field of view. After CT-scan completion, dynamic PET acquisition started at the time of intravenous <sup>11</sup>C-BUP injection. First, displacement experiments were performed to characterize <sup>11</sup>C-BUP specific (displaceable) binding to brain regions and validate the cerebellum as reference region (devoid of specific binding).<sup>26</sup> Then, impact of DZP exposure on brain exposure and receptor binding of <sup>11</sup>C-BUP was investigated in vivo (90min-PET acquisition).

PET data were reconstructed using the FORE+OSEM2D algorithm including normalization, attenuation, scatter and random corrections. To reduce noise and correct for partial volume effect, an iterative deconvolution using the point spread function of the scanner with temporal based denoising was applied to each image, as previously validated in small animal PET imaging.<sup>27,28</sup>

PET images were co-registered to an adult male Sprague-Dawley brain magnetic resonance imaging Schiffer's template using the Pmod software (v3.6, Switzerland) as previously described.<sup>29</sup> Time activity curves were generated from dynamic PET images in selected brain regions predefined in the template. Concentration of the radioactivity in each region was normalized by the injected dose and animal weight and expressed as standard uptake value. Brain exposure to <sup>11</sup>C-BUP was estimated using the area under the curve (AUC) of the time-activity curve from 0 to 90 min. Pharmacokinetic modeling using the simplified reference tissue model (SRTM) and the cerebellum as reference region was performed to estimate <sup>11</sup>C-BUP binding potential to selected brain regions ( $BP_{ND} = B_{max}/K_D$ , where  $B_{max}$  represents the total density of receptors in the tissue and  $K_D$ , the radioligand equilibrium dissociation constant).

### **Drug preparation and dosage regimens**

Neuro-respiratory effect study: BUP hydrochloride (Schering-Plough, France) and DZP (Sigma–Aldrich, France) were diluted in Tween® 10% (Sigma–Aldrich, France) to obtain 30 and 20mg/ml solutions, respectively. Drugs were administered at selected doses and routes (i.p. 30mg/kg BUP and subcutaneous (s.c.) 20mg/kg DZP), known not to induce respiratory depression when administered separately.<sup>5,30</sup> Imaging experiments: BUP (Buprecare®, Animalcare, UK) was diluted in saline to obtain a 0.15mg/ml solution and administered by the tail vein at 0.15mg/kg dose. <sup>11</sup>C-BUP (CEA, France) was synthesized as previously described<sup>31</sup> and diluted in saline to obtain 42.7±1.6 MBq in 1ml volume (specific radioactivity, 76.2±8.2 GBq/μmol). Antagonists: Naloxonazine dihydrochloride (NLZ, mu-OR antagonist), nor-binaltorphimine dihydrochloride (nor-BNI, kappa-OR antagonist), naltrindole dihydrochloride (NTI, delta-OR antagonist), flumazenil (FMZ, GABA<sub>A</sub>-R antagonist), and saclofen (SAC, GABA<sub>B</sub>-R antagonist) were purchased from Sigma–Aldrich (France). All, except FMZ, were diluted in distilled water to obtain 5mg/ml NLZ, 3mg/ml nor-BNI, 2.5mg/ml NTI and 10mg/ml SAC solutions. FMZ was diluted in Tween® 10% to obtain a 10mg/ml solution. Antagonists were administered before DZP/BUP combination at times and doses known to ensure complete antagonism of various opioids and BZDs in the rat, i.e. i.v. 10mg/kg NLZ 5min before, s.c. 5 mg/kg nor-BNI 45min before, s.c. 3 mg/kg NTI 6h before, i.p. 10mg/kg FMZ 20min before and i.p. 11.2 mg/kg SAC 15min before DZP/BUP administration.<sup>32-34</sup>

## Study design

**Study 1 - Neuro-respiratory effects of DZP/BUP combination:** For each sub-study, rats were randomized in four groups (N=6/group) to receive DZP or its vehicle immediately followed by BUP or its vehicle, defining the vehicle/vehicle, DZP/vehicle, vehicle/BUP, DZP/BUP groups. Thereafter, the clinical, blood gas (Study 1a), plethysmography (Study 1b) and EMG (Study 1c) parameters were studied.

**Study 2 - Effects of DZP on <sup>11</sup>C-BUP brain exposure and receptor binding:** To validate the cerebellum as reference region, rats were randomized in two groups (N=2/group) to receive intravenous BUP (displacement group) or saline (control group), 30min after <sup>11</sup>C-BUP administration (study 2a). To assess the impact of DZP on the regional <sup>11</sup>C-BUP exposure and receptor binding, rats were randomized in two groups (N=5/group) to receive DZP (DZP/<sup>11</sup>C-BUP group) or its vehicle (vehicle/<sup>11</sup>C-BUP group), 15min (peak of respiratory effects) before <sup>11</sup>C-BUP administration (study 2b).

**Study 3 - Effects of GABA-R and OR antagonists:** Preliminary experiments were performed to assess the absence of intrinsic respiratory effects of each GABA-R and OR antagonist (data not shown). For each antagonist, rats were randomized into ten groups (N=6/group) to receive the antagonist or its

vehicle (distilled water or Tween® 10%, as appropriate) followed by the DZP/BUP combination. Thereafter, the clinical, blood gas and plethysmography parameters were studied.

### Statistical Analysis

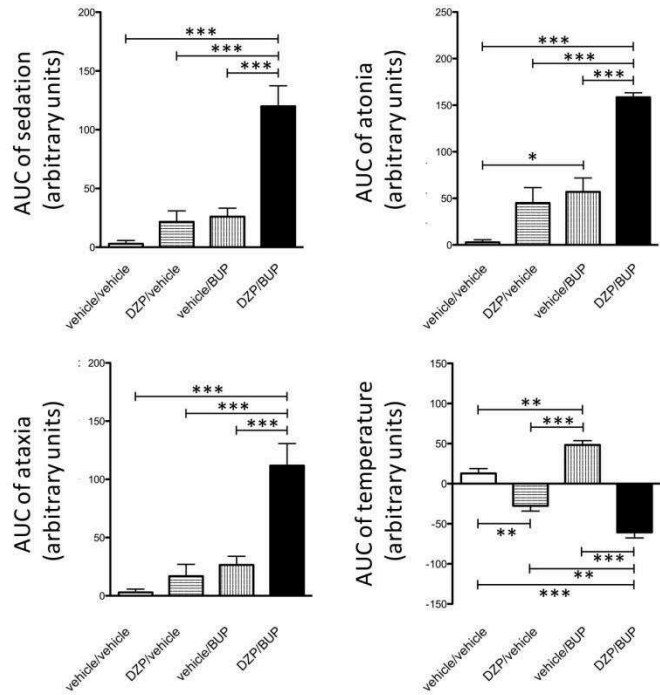
Results were expressed as mean±SEM. For the clinical, blood gas, plethysmography and EMG parameters,  $T_0$  was the mean of the baseline measurements collected during the accommodation period. For each parameter and at each time, the measured value was corrected with its corresponding baseline value. To simultaneously analyze the effect of time (up to 240 min) and treatments on each studied parameter and for each animal, we performed a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by multiple comparison tests with Bonferroni's correction. AUCs were calculated using the trapezoid method to analyze the global effect of each drug on each parameter and in each animal during the first 60min after drug administration.<sup>35</sup> AUCs were compared using Student t-tests or one-way ANOVA followed by multiple comparison tests with Bonferroni's correction, as appropriate. In the PET-imaging study, we compared the  $BP_{ND}$  using Student t-tests. To study DZP/BUP interaction on each parameter, we built a 2x2 (DZP or not x BUP or not) table of AUCs and performed a two-way ANOVA.<sup>36</sup> Tests were performed using Prism v5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). P-values < 0.05 were deemed significant.

## RESULTS

### Study 1- Neuro-respiratory effects of the DZP/BUP combination

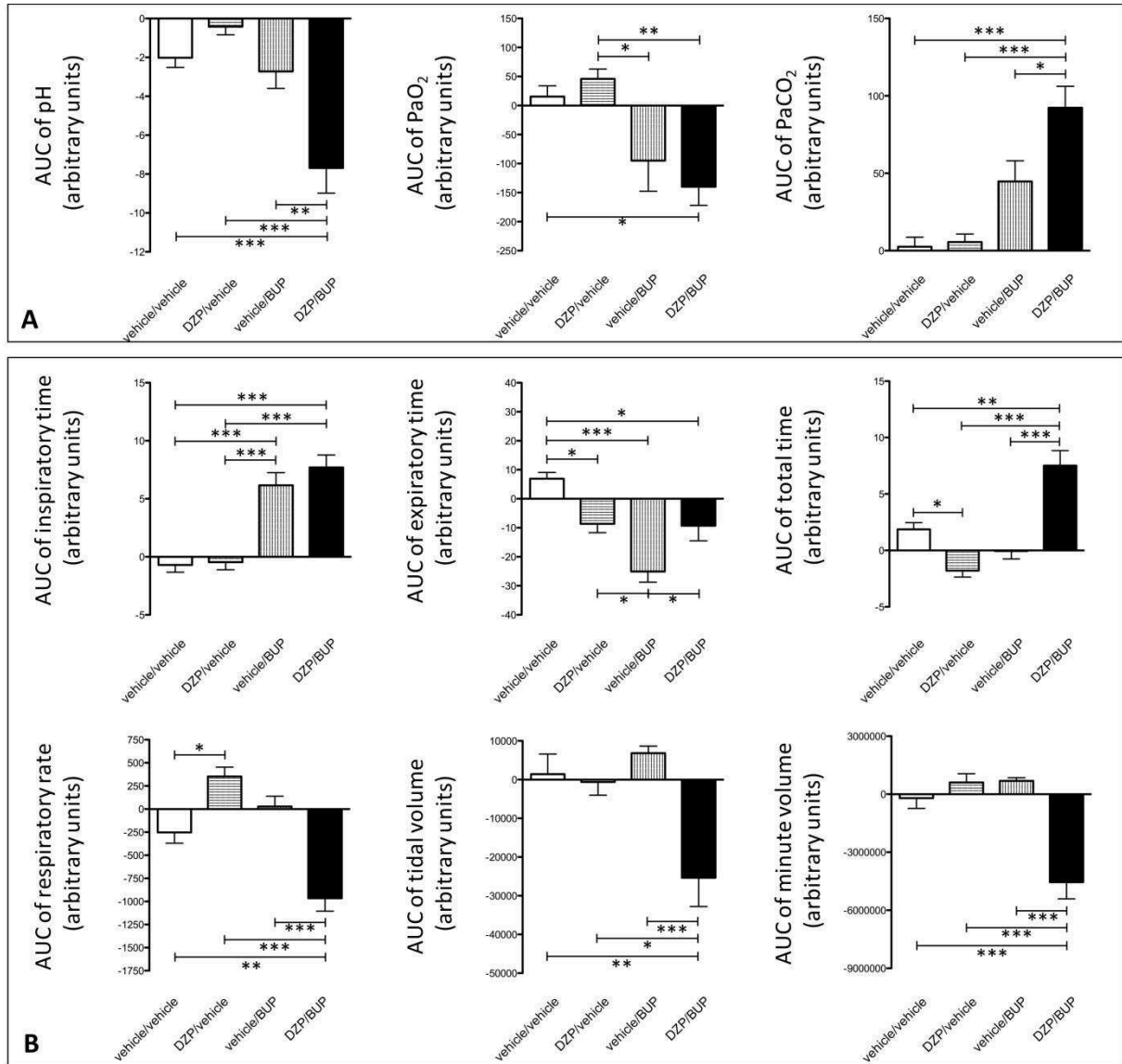
**Clinical findings.** The DZP/BUP combination significantly deepened sedation, decreased tonus and increased ataxia in comparison to the other groups ( $P<0.001$ ; Fig.1). DZP/BUP combination-related effects were of early-onset (at 5min) and peaked at 30min (for hypotonia) and 120min (for sedation and ataxia). Interestingly, hypotonia was more marked in the vehicle/BUP than the vehicle/vehicle group ( $P<0.05$ ). DZP/BUP interaction was non-additive on sedation and ataxia ( $P<0.001$ ) but additive on the tonus. The DZP/BUP combination significantly decreased body temperature compared to other groups ( $P<0.01$ ). Temperature was lower in the DZP/vehicle versus vehicle/vehicle group ( $P<0.01$ ) and higher in the vehicle/BUP versus vehicle/vehicle ( $P<0.01$ ) and DZP/vehicle groups ( $P<0.001$ ). DZP/BUP interaction on temperature was non-additive ( $P<0.001$ ).

**Fig. 1.** Effects of vehicle/vehicle (white), diazepam/vehicle (horizontal lines), vehicle/buprenorphine (vertical lines) and diazepam/buprenorphine (black) on rat sedation, tonus, ataxia and body temperature. Each group consisted of 6 rats. Values represent mean  $\pm$  SEM of the area under the curve (AUC) of each parameter between the time of injection and 60min post-injection. Comparisons were performed using one-way ANOVA followed by multiple tests using Bonferroni's correction. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ . (DZP, diazepam; BUP, buprenorphine).



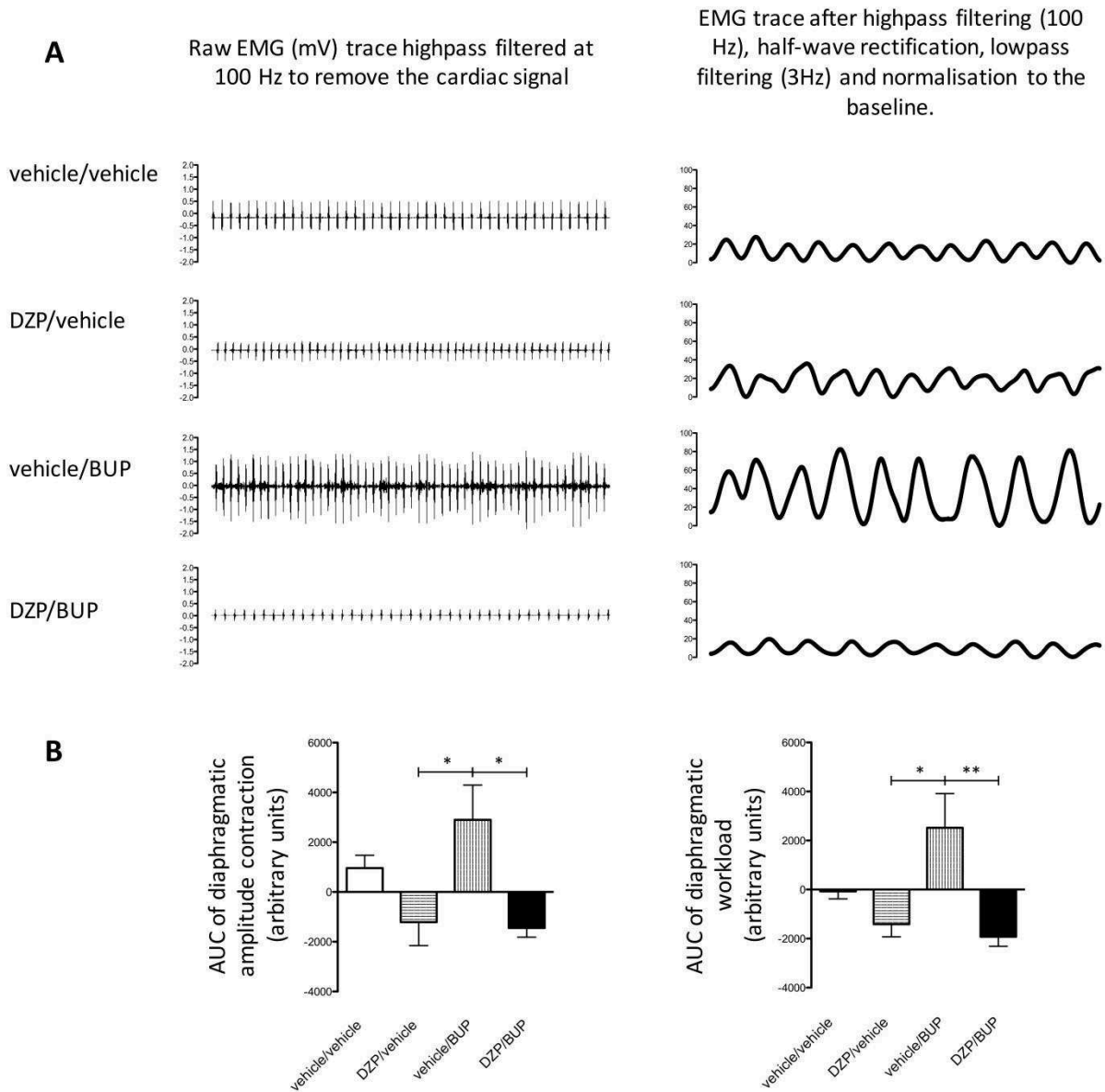
**Arterial blood gas.** The DZP/BUP combination significantly decreased arterial pH and increased PaCO<sub>2</sub> in comparison to the other groups ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively; Fig.2A). DZP/BUP combination significantly decreased PaO<sub>2</sub> in comparison to the vehicle/vehicle and DZP/vehicle groups ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively). Interestingly, increase in PaO<sub>2</sub> was observed in DZP/vehicle versus vehicle/BUP ( $P < 0.05$ ). DZP/BUP combination-induced effects were of early-onset (at 5min), peaked at 15min but were no longer significant after 30min. DZP/BUP interaction was non-additive on pH and PaCO<sub>2</sub> ( $P < 0.001$  and  $P < 0.05$ ) and additive on PaO<sub>2</sub>. No differences regarding bicarbonates were observed (data not shown).

**Plethysmography.** Significant increase in T<sub>I</sub> was observed in the vehicle/BUP and DZP/BUP groups in comparison to the vehicle/vehicle and DZP/vehicle groups ( $P < 0.001$ ). Significant decrease in T<sub>E</sub> was observed in all the groups in comparison to the vehicle/vehicle group ( $P < 0.05$ ) with more marked decrease in the vehicle/BUP versus DZP/vehicle and DZP/BUP groups ( $P < 0.05$ ). The DZP/BUP combination significantly decreased f ( $P < 0.01$ ), T<sub>Tot</sub> ( $P < 0.01$ ), V<sub>T</sub> ( $P < 0.05$ ), and V<sub>E</sub> ( $P < 0.001$ ) in comparison to the other groups (Fig.2B). Interestingly, increase in f and T<sub>tot</sub> was observed in the DZP/vehicle versus vehicle/vehicle group ( $P < 0.05$ ). DZP/BUP combination-induced effects on V<sub>E</sub> was of early-onset (5min), peaked at 15min, and were no longer significant after 30min. DZP/BUP interaction was additive on T<sub>I</sub> but not on T<sub>E</sub> ( $P < 0.01$ ), f ( $P < 0.001$ ), V<sub>T</sub> ( $P < 0.01$ ) and V<sub>E</sub> ( $P < 0.001$ ).



**Fig. 2.** Effects of vehicle/vehicle (white), diazepam/vehicle (horizontal lines), vehicle/buprenorphine (vertical lines) and diazepam/buprenorphine (black) on arterial pH, PaCO<sub>2</sub> and PaO<sub>2</sub> (**2A**); and inspiratory time (T<sub>I</sub>), expiratory time (T<sub>E</sub>), total time (T<sub>tot</sub>), respiratory rate (f), tidal volume (V<sub>T</sub>) and minute volume (V<sub>E</sub>) (**2B**). Each group consisted of 6 rats. Values represent mean ± SEM of the area under the curve (AUC) of each parameter between the time of injection and 60min post-injection. Comparisons were performed using one-way ANOVA followed by multiple tests using Bonferroni's correction. \*P<0.05, \*\*P<0.01, and \*\*\*P<0.001. (DZP, diazepam; BUP, buprenorphine; PaCO<sub>2</sub>, arterial partial pressure of CO<sub>2</sub>; PaO<sub>2</sub>, arterial partial pressure of O<sub>2</sub>).

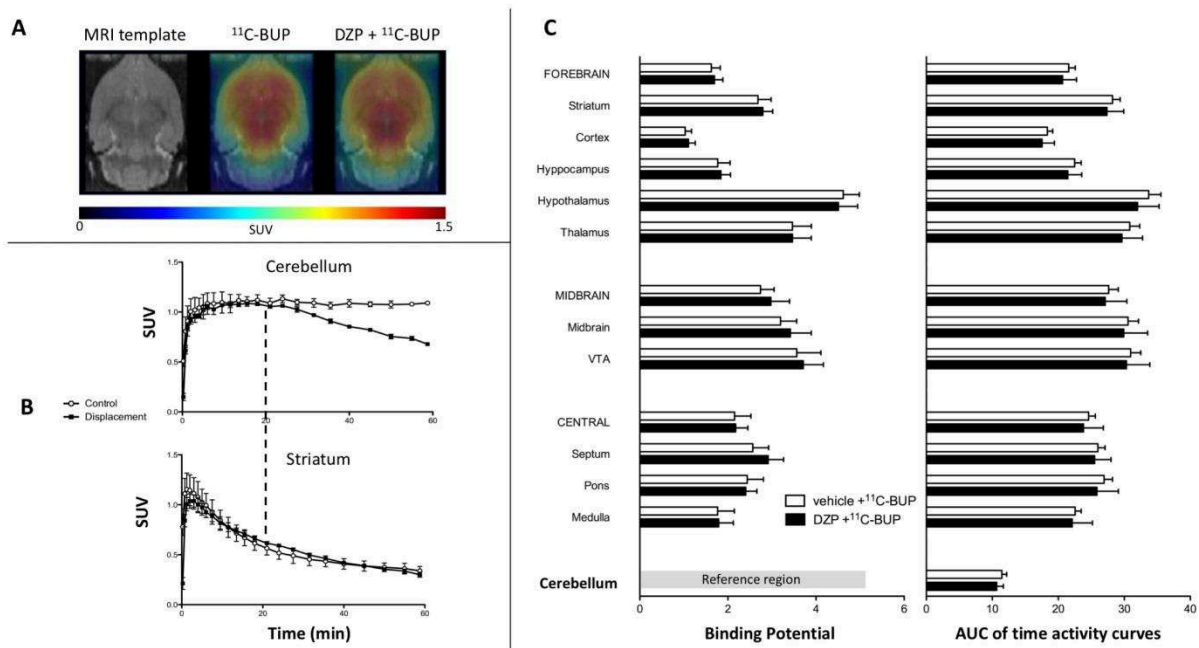
**Diaphragm EMG.** The diaphragm workload and contraction amplitude were significantly increased in the vehicle/BUP versus DZP/vehicle (P<0.05) and DZP/BUP groups (P<0.01 and P<0.05, respectively; Fig.3). DZP/BUP interaction was additive.



**Fig. 3.** Typical diaphragm electromyogram obtained at 15min post-injection (**3A**) and effects of vehicle/vehicle (white), diazepam/vehicle (horizontal lines), vehicle/buprenorphine (vertical lines) and diazepam/buprenorphine (black) on diaphragmatic amplitude contraction and diaphragmatic workload (**3B**). Each group consisted of 6 rats. Values represent mean  $\pm$  SEM of the area under the curve (AUC) of each parameter between the time of injection and 60min post-injection. Comparisons were performed using one-way ANOVA followed by multiple tests using Bonferroni's correction. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ . (DZP, diazepam; BUP, buprenorphine).

**Study 2 - Effects of DZP on <sup>11</sup>C-BUP brain exposure and receptor binding**

Compared with baseline <sup>11</sup>C-BUP brain kinetics, the injection of unlabeled BUP induced pronounced displacement of the radioactivity from the striatum, an OR-rich region, which highlighted the specific binding of <sup>11</sup>C-BUP to receptors in this region (Fig.4B). Such displacement was not observed in the cerebellum, devoid of OR.<sup>26</sup> DZP pretreatment did not increase <sup>11</sup>C-BUP delivery to any tested brain region including the cerebellum and striatum (Fig.4C). DZP pretreatment did not induce significant changes in <sup>11</sup>C-BUP BP<sub>ND</sub> in any brain region (Fig.4C).



**Fig. 4.** <sup>11</sup>C-buprenorphine PET images obtained without (left) or with (right) pre-treatment by diazepam, 15min before (4A). <sup>11</sup>C- buprenorphine time activity curves in cerebellum and striatum obtained without (control group, white circles) or with buprenorphine (displacement group, black squares) administered 20min after the beginning of PET acquisition (4B). Each group consisted of 2 rats. Results are expressed as mean ± SEM. Effects of diazepam on <sup>11</sup>C-buprenorphine binding in selected brain regions in rats receiving baseline <sup>11</sup>C-buprenorphine followed 15 min later by Tween® 10% (vehicle/<sup>11</sup>C-buprenorphine, white) or diazepam (diazepam/<sup>11</sup>C-buprenorphine group, black) (4C). Each group consisted of 5 rats. Results are expressed as mean ± SEM. (SUV, standard uptake value; <sup>11</sup>C-BUP, <sup>11</sup>C-radiolabeled buprenorphine, BUP, buprenorphine; DZP, diazepam; VTA, Ventral tegmental area).

**Study 3 - Effects of GABA-R and OR antagonists.**

FMZ reduced DZP/BUP induced sedation and hypotonia (P<0.01; Table1). FMZ and NBNI reduced DZP/BUP combination-induced hypothermia (P<0.05 and P<0.01, respectively). FMZ and NLZ limited DZP/BUP combination-induced effects on pH (P<0.05) and PaCO<sub>2</sub> (P<0.05). NTI, NBNI and SAC did not significantly alter DZP/BUP combination-induced effects on gas parameters. FMZ and NLZ reduced DZP/BUP combination-induced effects on V<sub>E</sub> (P<0.01). FMZ reduced DZP/BUP combination-induced



effects on  $T_E$  ( $P < 0.001$ ),  $f$  ( $P < 0.001$ ) and  $V_T$  ( $P < 0.05$ ). NLZ reduced DZP/BUP combination-induced effects on  $T_I$  ( $P < 0.05$ ),  $f$  ( $P < 0.01$ ) and  $V_T$  ( $P < 0.01$ ). SAC, NTI and NBNI did not significantly alter DZP/BUP combination-induced effects on plethysmography parameters.

	GABA receptor antagonists		Opioid receptor antagonists		
	FMZ	SAC	NLZ	NTI	NBNI
Temperature	↗	0	0	0	↗↗
Sedation	↘↘	0	0	0	0
Tonus	↗↗	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0
Arterial pH	↗	0	↗	0	0
PaO <sub>2</sub>	0	0		0	0
PaCO <sub>2</sub>	↘	0	↘	0	0
T <sub>I</sub>	0	0	↘	0	0
T <sub>E</sub>	↘↘↘	0	0	0	0
T <sub>Tot</sub>	↘↘	0	↘↘	0	0
f	↗↗↗	0	↗↗	0	0
V <sub>T</sub>	↗	0	↗↗	0	0
V <sub>E</sub>	↗↗	0	↗↗	0	0

**Table 1.** Effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptor antagonists (flumazenil and saclofen) and opioid receptor antagonists (naloxonazine, naltrindole and nor-binaltorphimine) on diazepam/buprenorphine combination-induced neuro-respiratory effects in the rat. Each group consisted of 6 rats. Each pre-treatment was compared to its respective control using Student t-tests (↗ $P < 0.05$ , ↗↗ $P < 0.01$ , ↗↗↗ $P < 0.001$ . DZP, diazepam; BUP, buprenorphine; FMZ, flumazenil; SAC, saclofen; NLZ, naloxonazine; NTI, naltrindole; NBNI, nor-binaltorphimine; PaCO<sub>2</sub>, arterial partial pressure of CO<sub>2</sub>; PaO<sub>2</sub>, arterial partial pressure of O<sub>2</sub>; T<sub>I</sub>, inspiratory time; T<sub>E</sub>, expiratory time; T<sub>Tot</sub>, total time; f, respiratory rate; V<sub>T</sub>, tidal volume; V<sub>E</sub>, minute volume)

## DISCUSSION

By contrast to each drug administered alone, the DZP/BUP combination is responsible for marked respiratory depression in the rat. Our experimental approach ruled out DZP-induced increase in brain distribution of BUP and potentiation of BUP interaction with ORs. We demonstrated that respiratory depression related to the DZP/BUP combination results from the deleterious combination of the physiological consequences of each drug on ventilation.

Our findings are consistent with previous rat studies describing the effects of BUP and DZP alone or in combination on blood gas and plethysmography. DZP and BUP alone (despite increase in  $T_I$  balanced by decrease in  $T_E$ ) preserved  $V_E$  and gas homeostasis.<sup>5-10,12-14,17,30,34,37-39</sup> Conversely, the DZP/BUP combination reduced  $V_T$  and  $f$ , resulting in a decrease in  $V_E$ , respiratory acidosis and hypoxemia. Variability in intensity and duration of the observed respiratory effects previously reported<sup>8,9,11,13</sup> could be attributed to differences in drug regimens, administration routes and types of BZD investigated.

Our findings allowed clarification of the mechanisms involved in the DZP/BUP interaction. Using  $^{11}\text{C}$ -BUP PET imaging, we demonstrated that DZP did not modify the whole brain and regional brain exposure to  $^{11}\text{C}$ -BUP, suggesting that DZP is unlikely to alter BUP transport across the blood-brain barrier (hypothesis1). This observation was consistent with previous *in vivo* data obtained using microdialysis and demonstrating that flunitrazepam did not increase BUP uptake in the rat striatum.<sup>11</sup> Pharmacokinetics modeling showed that DZP did not alter the specific binding of  $^{11}\text{C}$ -BUP with its brain targets, ruling out the hypothesis of DZP-induced changes in BUP interaction with ORs (hypothesis2). Our results contrast with *ex-vivo* studies showing regional decrease in  $\mu$ -OR down-regulation after BUP administration in combination with various BZDs and analogues in the rat.<sup>40,41</sup> Interestingly, chlorazepate, alprazolam, flunitrazepam, clonazepam, loprazolam and zolpidem but not DZP were investigated. Additionally, rats were sacrificed 24h after drug administration while our *in vivo* PET study measured  $\text{BP}_{\text{ND}}$  immediately after the administration, focusing on the consequences of the BZD/BUP combination on ORs at the time of respiratory depression onset, thus mimicking the clinical situation. Our data suggested that BZD-mediated alterations in BUP binding to ORs, reported with acute or chronic BZD administration, is not the mechanism accounting for the acute respiratory depression but did not preclude its possible contribution to alterations under chronic BUP treatment.

We investigated the hypothesis that respiratory depression resulted from the combination of DZP and BUP-induced physiological effects on ventilation (hypothesis3). DZP/BUP combination-induced decrease in  $f$  was related to the combination of BUP-induced effects on  $T_I$  and DZP-induced effects on  $T_E$ . Since interaction between DZP/BUP on  $T_I$  was additive and DZP-related effects on  $T_I$  negligible, the observed increase in  $T_I$  attributed to the DZP/BUP combination was almost exclusively due to BUP. In conformation, NLZ pretreatment limited the decrease in  $T_I$  expected from the DZP/BUP combination.

Therefore, our findings suggested that the loss of BUP-attributed ceiling effects when combined with DZP is not related to alterations in  $T_I$ . By contrast, the decrease in  $T_E$  related to the DZP/BUP combination was not significantly different from that obtained with DZP alone but significantly more limited than that observed with BUP alone. Additionally, interaction between DZP and BUP on  $T_E$  was non-additive and FMZ pretreatment limited the decrease in  $T_E$  related to the DZP/BUP combination. Both findings supported that DZP may overcome the BUP-attributed ceiling effects on  $f$  by reducing the BUP-induced decrease in  $T_E$ . Surprisingly, respiratory depression resulting from the DZP/BUP combination did not result from an increase in  $T_E$ , as would have been expected from any  $\mu$ -OR agonist, which toxicity typically results from increase in both  $T_I$  and  $T_E$ .<sup>34</sup> This observation was consistent with our PET findings that did not show BZD-induced alterations in BUP binding to Ors, thus ruling out any receptor-related switch from partial to full OR agonist properties.

Respiratory rhythm and  $T_I/T_E$  partition are generated by anatomical structures located in the brainstem including a coupling inspiration/expiration oscillator (the pre-Bötzinger complex and retro-trapezoid/parafacial respiratory groups, respectively) modulated by the pons structures (the Kölliker-Fuse nucleus, parabrachial complex and locus coeruleus which control the inspiration/expiration transition or post-inspiratory phase) and peripheral/central chemoreceptors.<sup>42</sup> OR and GABA<sub>A</sub>-R systems are co-expressed in these structures.<sup>43,44</sup> Opioids are known to suppress the baseline inspiratory neuronal activity and possibly the blunting of glutamate-evoked increase in inspiration drive.<sup>45,46</sup> BZDs are known to alter the central inspiratory off-switch mechanism which controls the duration of inspiration and transition to expiration.<sup>45-47</sup> Moreover, both opioids and BZDs are known to reduce the chemoreceptor response to hypoxia and hypercapnia.<sup>43,48</sup> Consequently, the BZD/BUP interaction effect on respiratory times probably occurs at the brain level.

DZP/BUP combination-induced decrease in  $V_T$  is related to the combination of BUP- and DZP-induced effects on upper-airways and DZP-induced effects on the diaphragm. The DZP/BUP combination induced a major and significant decrease in  $V_T$  in comparison to either treatment singly, resulting in a non-additive interaction. Both opioids and BZDs are known to induce upper-airway obstruction following oropharyngeal muscle relaxation. Additionally, opioids increase inter-costal muscle rigidity, decreasing chest compliance,<sup>49-51</sup> even though such effects are more limited with BUP given its partial  $\mu$ -OR pattern. Opioids are known to decrease diaphragm contractility.<sup>52,53</sup> In the present investigation, BUP increased diaphragm contraction, suggesting the preservation of its inspiratory loading reflex, i.e. the increase in inspiratory muscle activity including diaphragm, in response to the upper airway obstruction.<sup>49,50</sup> Following BZD administration, upper-airway obstruction is balanced by the increase in inspiratory intercostal and expiratory abdominal muscle activities, so that  $V_T$  remains unchanged or modestly decreased,<sup>54,55</sup> consistently with our results. However, since DZP may reduce or abolish inspiratory diaphragm loading reflex and/or alter diaphragm contraction, BUP may be hypothesized to counteract DZP-induced stimulation of intercostal muscle contractility to balance such a decrease in

diaphragm contraction. These hypotheses are supported by the reversion of DZP/BUP combination-induced  $V_T$  decrease by FMZ and NLZ.

We assessed the impact of different pre-treatments on DZP/BUP combination-induced respiratory depression. NLZ and FMZ reversed DZP/BUP combination-induced reduction in  $V_E$ , by contrast to SAC, although GABA<sub>B</sub>-R expression on human airway smooth muscle cells and contribution to the central control of ventilation were demonstrated.<sup>46,56</sup> The delta-OR antagonist had no effects on blood gas and respiratory parameters as previously reported,<sup>57</sup> although the exact contribution of mu/delta-OR hetero-dimerization remains to be investigated.<sup>58</sup> Similarly, the role of kappa-ORs on respiration is limited and rather complex; our study confirmed the lack of reversion of BUP-attributed effects by the kappa-OR antagonist as previously reported.<sup>34,59,60</sup> Altogether, our findings suggest that DZP/BUP interaction mainly depends on mu-ORs and GABA<sub>A</sub>-Rs, while the role of delta- and kappa-ORs as well as GABA<sub>B</sub>-Rs appears negligible.

At the bedside, NLX was shown to be poorly efficient in reversing BUP overdose.<sup>3</sup> This observation is assumed to result from the slow receptor dissociation kinetics of BUP in combination with the fast elimination kinetics of naloxone.<sup>61,62</sup> Surprisingly, FMZ improved consciousness impairment and bradypnea in most BUP-poisoned patients when BZD was known as co-ingestant.<sup>3</sup> This observation is consistent with our findings supporting FMZ as a second-line antidote in patients presenting with an opioid-like toxidrome not reversed by NLX, in the absence of contra-indications.

One of our study strengths was to investigate the deleterious DZP/BUP interaction in vivo with fewer biases than any ex-vivo approach. However, limitations exist. Our PET study required rat anesthesia that may have influenced the neuro-pharmacokinetic and receptologic parameters; but experimental conditions were comparable in the tested and control rats. Input function was not used to estimate <sup>11</sup>C-BUP brain binding; however, we showed that the cerebellum can be used as a reference region for reference tissue modeling.

In conclusion, our study based on an in vivo multimodal approach strongly supports the hypothesis that respiratory depression attributed to the DZP/BUP combination results from the combination of each drug-induced effects on ventilation, molecularly related to the GABA<sub>A</sub>-R and mu-OR systems.

## REFERENCES

1. Seth P: Overdose Deaths Involving Opioids, Cocaine, and Psychostimulants — United States, 2015–2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2018; 67:349–58
2. Wakeman SE, Barnett ML: Primary Care and the Opioid-Overdose Crisis - Buprenorphine Myths and Realities. *N Engl J Med* 2018; 379:1–4

3. Megarbane B, Buisine A, Jacobs F, Résière D, Chevillard L, Vicaut E, Baud FJ: Prospective comparative assessment of buprenorphine overdose with heroin and methadone: clinical characteristics and response to antidotal treatment. *J Subst Abuse Treat* 2010; 38:403–7
4. Jones JD, Mogali S, Comer SD: Polydrug abuse: a review of opioid and benzodiazepine combination use. *Drug Alcohol Depend* 2012; 125:8–18
5. McCormick GY, White WJ, Zagon IS, Lang CM: Effects of diazepam on arterial blood gas concentrations and pH of adult rats acutely and chronically exposed to methadone. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 230:353–9
6. Ohtani M, Kotaki H, Nishitaten K, Sawada Y, Iga T: Kinetics of respiratory depression in rats induced by buprenorphine and its metabolite, norbuprenorphine. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281:428–33
7. Gueye PN, Borron SW, Risède P, Monier C, Buneaux F, Debray M, Baud FJ: Lack of effect of single high doses of buprenorphine on arterial blood gases in the rat. *Toxicol Sci* 2001; 62:148–54
8. Gueye PN, Borron SW, Risède P, Monier C, Buneaux F, Debray M, Baud FJ: Buprenorphine and midazolam act in combination to depress respiration in rats. *Toxicol Sci* 2002; 33:5454–65
9. Nielsen S, Taylor DA: The effect of buprenorphine and benzodiazepines on respiration in the rat. *Drug Alcohol Depend* 2005; 79:95–101
10. Mégarbane B, Pirnay S, Borron SW, Trout H, Monier C, Risède P, Boschi G, Baud FJ: Flunitrazepam does not alter cerebral distribution of buprenorphine in the rat. *Toxicol Lett* 2005; 157:211–9
11. Mégarbane B, Marie N, Pirnay S, Borron SW, Gueye PN, Risède P, Monier C, Noble F, Baud FJ: Buprenorphine is protective against the depressive effects of norbuprenorphine on ventilation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 212:256–67
12. Hreiche R, Mégarbane B, Pirnay S, Borron SW, Monier C, Risède P, Milan N, Descatoire V, Pessayre D, Baud FJ: Dexamethasone hepatic induction in rats subsequently treated with high dose buprenorphine does not lead to respiratory depression. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 217:352–62
13. Pirnay SO, Mégarbane B, Borron SW, Risède P, Monier C, Ricordel I, Baud FJ: Effects of Various Combinations of Benzodiazepines with Buprenorphine on Arterial Blood Gases in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103:228–39
14. Yassen A, Olofsen E, Kan J, Dahan A, Danhof M: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the effectiveness and safety of buprenorphine and fentanyl in rats. *Pharm Res* 2008; 25:183–93
15. Kilicarslan T, Sellers EM: Lack of Interaction of Buprenorphine With Flunitrazepam Metabolism. *Am J Psychiatry* 2000; 157:1164–6
16. Zhang W, Ramamoorthy Y, Tyndale RF, Sellers EM: Interaction of buprenorphine and its metabolite norbuprenorphine with cytochromes p450 in vitro. *Drug Metab Dispos* 2003; 31:768–72

17. Tournier N, Chevillard L, Mégarbane B, Pirnay S, Scherrmann J-M, Declèves X: Interaction of drugs of abuse and maintenance treatments with human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2). *Int J Neuropsychopharmacol* 2010; 13:905–15
18. Alhaddad H, Cisternino S, Declèves X, Tournier N, Schlatter J, Chiadmi F, Risède P, Smirnova M, Besengez C, Scherrmann J-M, Baud FJ, Mégarbane B: Respiratory toxicity of buprenorphine results from the blockage of P-glycoprotein-mediated efflux of norbuprenorphine at the blood–brain barrier in mice. *Crit Care Med* 2012; 40:3215–23
19. Alhaddad H, Cisternino S, Saubamea B, Schlatter J, Chiadmi F, Risède P, Smirnova M, Cochois-Guégan V, Tournier N, Baud FJ, Mégarbane B: Gender and strain contributions to the variability of buprenorphine-related respiratory toxicity in mice. *Toxicology* 2013; 305:99–108
20. Bartlett D, Tenney SM: Control of breathing in experimental anemia. *Respir Physiol* 1970; 10:384–95
21. Bonora M, Bernaudin J-F, Guernier C, Brahimi-Horn MC: Ventilatory responses to hypercapnia and hypoxia in conscious cystic fibrosis knockout mice *Cfr*<sup>-/-</sup>. *Pediatr Res* 2004; 55:738–46
22. Basmajian JV, De Luca CJ: *Muscles alive: their functions revealed by electromyography*, 5th edition. Baltimore, Williams & Wilkins Co, 1985
23. Daube JR, Rubin DI: Needle electromyography. *Muscle Nerve* 2009; 39:244–70
24. Fat-Chun Tony Chang, Harper RM: A procedure for chronic recording of diaphragmatic electromyographic activity. *Brain Res Bull* 1989; 22:561–3
25. Bao Q, Newport D, Chen M, Stout DB, Chatziioannou AF: Performance Evaluation of the Inveon Dedicated PET Preclinical Tomograph Based on the NEMA NU-4 Standards. *J Nucl Med* 2009; 50:401–8
26. Holland MJ, Carr KD, Simon EJ: Pharmacokinetics of [3H]-buprenorphine in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1989; 64:3–16
27. Reilhac A, Charil A, Wimberley C, Angelis G, Hamze H, Callaghan P, Garcia M-P, Boisson F, Ryder W, Meikle SR, Gregoire M-C: 4D PET iterative deconvolution with spatiotemporal regularization for quantitative dynamic PET imaging. *NeuroImage* 2015; 118:484–93
28. Wimberley C, Angelis G, Boisson F, Callaghan P, Fischer K, Pichler BJ, Meikle SR, Gregoire M-C, Reilhac A: Simulation-based optimisation of the PET data processing for partial saturation approach protocols. *NeuroImage* 2014; 97:29–40
29. Schiffer WK, Mirrione MM, Biegon A, Alexoff DL, Patel V, Dewey SL: Serial microPET measures of the metabolic reaction to a microdialysis probe implant. *J Neurosci Methods* 2006; 155:272–84
30. Cohier C, Chevillard L, Risède P, Roussel O, Megarbane B: Respiratory effects of buprenorphine/naloxone alone and in combination with diazepam in naive and tolerant rats. *Toxicol Lett* 2014; 228:75–84

31. Luthra SK, Pike VW, Brady F, Horlock PL, Prenant C, Crouzel C: Preparation of [11C]buprenorphine--a potential radioligand for the study of the opiate receptor system in vivo. *Int J Rad Appl Instrum A* 1987; 38:65–6
32. Korkmaz S, Ljungblad E, Wahlström G: Interaction between flumazenil and the anesthetic effects of hexobarbital in the rat. *Brain Res* 1995; 676:371–7
33. Akada Y, Mori R, Kato Y, Yamasaki F, Mochizuki H: Analgesic properties of the novel compound M43068 in rat models of acute and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2005; 523:46–53
34. Chevillard L, Megarbane B, Risède P, Baud FJ: Characteristics and comparative severity of respiratory response to toxic doses of fentanyl, methadone, morphine, and buprenorphine in rats. *Toxicol Lett* 2009; 191:327–40
35. Tallarida R, Murray RB: *Manual of pharmacologic calculations with Computer*, 2<sup>nd</sup> edition. New York, Springer-Verlag, 1987, pp 47–9
36. Slinker BK: The Statistics of Synergism *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30:723–31
37. Chevillard L, Declèves X, Baud FJ, Risède P, Megarbane B: Respiratory effects of diazepam/methadone combination in rats: a study based on concentration/effect relationships. *Drug Alcohol Depend* 2013; 131:298–307
38. Kuo A, Wyse BD, Meutermans W, Smith MT: In vivo profiling of seven common opioids for antinociception, constipation and respiratory depression: no two opioids have the same profile. *Br J Pharmacol* 2015; 172:532–48
39. Cohier C, Chevillard L, Salle S, Risède P, Roussel O, Megarbane B: Editor's Highlight: Neurorespiratory Effects of Buprenorphine and Ethanol in Combination: A Mechanistic Study of Drug–Drug Interactions in the Rat. *Toxicol Sci* 2017; 155:389–99
40. Debruyne D, Quentin T, Poisnel G, Lelong-Boulouard V, Barre L, Coquerel A: Acute and chronic administration of clorazepate modifies the cell surface regulation of mu opioid receptors induced by buprenorphine in specific regions of the rat brain. *Brain Res* 2005; 1052:222–31
41. Poisnel G, Dhilly M, Le Boisselier R, Barre L, Debruyne D: Comparison of five benzodiazepine-receptor agonists on buprenorphine-induced mu-opioid receptor regulation. *J Pharmacol Sci* 2009; 110:36–46
42. Richter DW, Smith JC: Respiratory Rhythm Generation In Vivo. *Physiology (Bethesda)* 2014; 29:58–71
43. Lintzeris N, Nielsen S: Benzodiazepines, Methadone and Buprenorphine: Interactions and Clinical Management. *Am J Addict* 2010; 19:59–72
44. Kalyuzhny AE, Dooyema J, Wessendorf MW: Opioid- and GABA(A)-receptors are co-expressed by neurons in rat brain. *Neuroreport* 2000; 11:2625–8
45. Masneuf S, Buetler J, Koester C, Crestani F: Role of  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-GABAA receptors in mediating the respiratory changes associated with benzodiazepine sedation. *Br J Pharmacol* 2012; 166:339–48

46. Bonham AC: Neurotransmitters in the CNS control of breathing. *Respir Physiol* 1995; 101:219–30
47. Haji A, Takeda R, Okazaki M: Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacol Ther* 2000; 86:277–304
48. Igarashi A, Zadzilka N, Shirahata M: Benzodiazepines and GABA-GABAA Receptor System in the Cat Carotid Body, Arterial Chemoreceptors. Dordrecht, Springer, 2009, pp 169–75
49. Vankova ME, Weinger MB, Chen DY, Bronson JB, Motis V, Koob GF: Role of central mu, delta-1, and kappa-1 opioid receptors in opioid-induced muscle rigidity in the rat. *Anesthesiology* 1996; 85:574–83
50. Hajiha M, DuBord MA, Liu H, Horner RL: Opioid receptor mechanisms at the hypoglossal motor pool and effects on tongue muscle activity in vivo. *J Physiol* 2009; 587:2677–92
51. Ehsan Z, Mahmoud M, Shott SR, Amin RS, Ishman SL: The effects of anesthesia and opioids on the upper airway: a systematic review. *Laryngoscope* 2015; 126:270–84
52. Rigg JR, Rondi P: Changes in rib cage and diaphragm contribution to ventilation after morphine. *Anesthesiology* 1981; 55:507–14
53. Campbell C, Weinger MB, Quinn M: Alterations in diaphragm EMG activity during opiate-induced respiratory depression. *Respir Physiol* 1995; 100:107–17
54. Molliex S, Dureuil B, Montravers P, Desmots JM: Effects of midazolam on respiratory muscles in humans. *Anesth Analg* 1993; 77:592–7
55. Gueye PN, Lofaso F, Borron SW, Mellerio F, Vicaut E, Harf A, Baud FJ: Mechanism of respiratory insufficiency in pure or mixed drug-induced coma involving benzodiazepines. *J Toxicol Clin Toxicol* 2002; 40:35–47
56. Bongianini F, Mutolo D, Nardone F, Pantaleo T: GABAergic and glycinergic inhibitory mechanisms in the lamprey respiratory control. *Brain Res* 2006; 1090:134–45
57. May CN, Dashwood MR, Whitehead CJ, Mathias CJ: Differential cardiovascular and respiratory responses to central administration of selective opioid agonists in conscious rabbits: correlation with receptor distribution. *Br J Pharmacol* 1989; 98:903–13
58. Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V, Devi LA: Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* 2000; 20:RC110
59. Shook JE, Watkins WD, Camporesi EM: Differential roles of opioid receptors in respiration, respiratory disease, and opiate-induced respiratory depression. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:895–909
60. Dosaka-Akita K, Tortella FC, Holaday JW, Long JB: The kappa opioid agonist U-50,488H antagonizes respiratory effects of mu opioid receptor agonists in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 264:631–7
61. Yassen A, Olofsen E, van Dorp E, Sarton E, Teppema L, Danhof M, Dahan A: Mechanism-Based Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modelling of the Reversal of Buprenorphine-Induced Respiratory Depression by Naloxone. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46:965–80



62. Van Dorp E, Yassen A, of ESTJ, 2006: Naloxone reversal of buprenorphine-induced respiratory depression. *Anesthesiology* 2006; 105:51–7

### III - Projet 3 : Investigation des mécanismes impliqués dans la survenue des convulsions observées au cours des intoxications par tramadol

#### III.A - Contexte

Comme nous l'avons vu précédemment, le tramadol est le médicament le plus fréquemment impliqué dans les intoxications par opioïdes aux États-Unis (Gummin *et al*, 2017) et probablement en Europe (EMCDDA, 2017). Du fait de son activité agoniste  $\mu$  faible, le tramadol entraîne assez rarement un syndrome opioïde avec dépression respiratoire. En revanche, il semble plus fréquemment entraîner, à dose toxique, des convulsions usuellement attribuées à une des manifestations du syndrome sérotoninergique, le tramadol inhibant la recapture de la sérotonine (Hassamal *et al*, 2018; Spiller *et al*, 1997). Néanmoins, cette notion a été récemment remise en cause par des données expérimentales chez le rat montrant l'absence d'impact sur les convulsions induites par le tramadol d'un prétraitement par un antidote du syndrome sérotoninergique ou par un médicament favorisant la production cérébrale de sérotonine. Des interactions avec d'autres voies de neurotransmission ont été évoquées à partir de données *in vitro*. Elles impliqueraient le système GABA-A-ergique et/ou opioïdergique et/ou histaminergique et/ou dopaminergique (Bameri *et al*, 2018; Hara *et al*, 2005; Rehni *et al*, 2008; 2010).

#### III.B - Objectifs

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'implication de chacune des voies de neurotransmission suspectée d'être impliquées dans la survenue de convulsions au cours des intoxications par tramadol.

#### III.C - Schéma expérimental

Nous avons choisi un modèle de convulsions induites chez le rat qui a été développé au sein

du laboratoire UMRS 1144 (Lagard *et al*, 2016). La dose de tramadol utilisée était de 75 mg/kg i.p.

### III.C.1 - Impact de différents prétraitements sur la survenue de convulsions, la sédation, la température

Les rats étaient randomisés en 6 groupes (N=6 par groupe ; dont un groupe contrôle ne recevant que les solvants). Cinq de ces groupes étaient prétraités par différents agonistes et antagonistes ou leur solvant avant de recevoir la dose pro-convulsivante de tramadol. Les doses et les voies d'administration étaient choisies en fonction de données déjà publiées chez le rat. Les délais entre l'injection de ces prétraitements et l'injection du tramadol correspondaient au maximum de l'effet pharmacologique de chaque molécule.

Les rats étaient prétraités par

- ◆ Un agoniste des récepteurs GABA-A (diazépam 1,77 mg/kg i.p 15 min avant l'injection de tramadol) (Beaune *et al*, 2012),
- ◆ Un antagoniste des récepteurs opioïdes  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$  (naloxone 2 mg/kg en bolus i.v puis 4 mg/kg/h en i.v continu à la seringue électrique 10 min avant l'injection de tramadol) (Haglund, 1992),
- ◆ Un antagoniste des récepteurs 2A et 2C de la sérotonine (cyproheptadine 10 mg/kg i.p 15 min avant l'injection de tramadol) (Beaune *et al*, 2012) et
- ◆ Un antagoniste des récepteurs à l'histamine H1 (fexofenadine 15 mg/kg i.p 30 min avant l'injection de tramadol) (Anoush and Mohammad Khani, 2015)

Selon ces modalités expérimentales

- ◆ Sur une première série de rats l'impact du prétraitement sur la température, la sédation et la survenue de convulsions cliniques étaient étudiées.
- ◆ Sur une seconde série d'animaux, les cerveaux étaient prélevés 15-20 minutes après l'administration de tramadol (correspondant au pic de survenue des convulsions) puis congelés. Les monoamines cérébrales étaient ensuite dosées dans le cortex frontal, région cérébrale possédant de nombreuses projections sérotoninergiques. Les composés dosés étaient les monoamines cérébrales (dopamine, sérotonine, norépinephrine, histamine), le L-tryptophane (précurseur de la sérotonine) et leurs métabolites (acide 5- hydroxy-indole-

acétique (5-HIAA), 3-methoxy-4-hydroxyphenoglycol (MHPG), l'acide 3,4-dihydroxyphenylacétique (DOPAC), acide homovanillique (HVA)).

### III.C.2 - Impact du tramadol sur la fixation cérébrale de $^{11}\text{C}$ -flumazénil

La fixation cérébrale de  $^{11}\text{C}$ -flumazénil i.v. a été évaluée chez 10 rats : 5 rats ayant reçu une injection i.p. d'eau stérile 15 min avant l'injection de  $^{11}\text{C}$ -flumazénil et 5 rats traités par tramadol à dose convulsivante i.p. 15 min avant l'injection de  $^{11}\text{C}$ -flumazénil i.v. Les acquisitions TEP étaient réalisées sous anesthésie générale (isoflurane 2%) et de manière dynamique pendant 60 min. La fixation cérébrale  $^{11}\text{C}$ -flumazénil était estimée par le calcul du  $BP_{ND}$  par le modèle SRTM2 dans les deux conditions expérimentales.

Le déplacement du  $^{11}\text{C}$ -flumazénil par le tramadol et le diazépam (N=2 par groupe) a été testé en injectant une dose croissante de tramadol i.v. (1 et 25 mg/kg) et une dose unique de diazépam (1 mg/kg) 30 min après l'injection de  $^{11}\text{C}$ -flumazénil.

### III.D - Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en médiane et en quartiles dans la première partie et en moyenne  $\pm$  SEM dans la partie 2.

Pour analyser simultanément l'effet du temps et l'effet des traitements sur la sédation, la température et les concentrations de monoamine, nous avons calculé pour chaque paramètre étudié, l'aire sous la courbe (AUC) de T0 à la fin de la mesure (120 min) en utilisant la méthode trapézoïdale. Les AUCs des paramètres sédation et température étaient comparées en utilisant le test de Kruskal-Wallis pour comparer les cinq groupes. Les concentrations de monoamine entre les groupes ont été comparées en utilisant le *U-test* de Mann-Whitney (comparaisons deux à deux). Les effets des traitements sur les convulsions ont été comparés en utilisant une analyse de variance à deux facteurs suivi de tests de comparaisons multiples avec correction de Bonferroni. Dans l'étude TEP, le  $BP_{ND}$  entre les deux groupes était comparé par un test de Mann-Whitney. Tous les tests ont été réalisés en utilisant le logiciel GraphPad (GraphPad Prism version 6). Un seuil de  $p < 0,05$  était considéré comme significatif.

### III.E - Résultats

#### III.E.1 - Résultats de la publication

Le prétraitement par diazépam prévenait la survenue des convulsions induites par le tramadol mais augmentait significativement la sédation et l'hypothermie, alors qu'aucun autre prétraitement ne modifiait ces paramètres significativement.

L'injection d'une dose pro-convulsivante de tramadol entraînait une augmentation significative des monoamines et une diminution de leurs métabolites. Le prétraitement par diazépam augmentait la concentration cérébrale des monoamines de manière significative en comparaison au groupe traité par tramadol seul.

La fixation du  $^{11}\text{C}$ -flumazénil sur son récepteur était significativement modifiée par une dose pro-convulsivante de tramadol. La fixation du  $^{11}\text{C}$ -flumazénil n'était pas modifiée après l'injection d'une dose croissante de tramadol.

#### III.E.2 - Résultats supplémentaires

Impact du prétraitement par tramadol 25 mg/kg i.p sur la fixation cérébrale de  $^{11}\text{C}$ -flumazénil (Figure 41) : Pour compléter ces données nous avons réalisé le même schéma expérimental avec une dose analgésique de tramadol dite moyenne (25 mg/kg i.p.). Ces résultats montraient une modulation dose dépendante de la fixation cérébrale de  $^{11}\text{C}$ -flumazénil en présence de tramadol.

Validité des données (Figure 42) : Afin que la modélisation pharmacocinétique soit valide, nous avons comparé pour les 3 groupes les cinétiques normalisées en SUV dans le pont (région de référence) pour chaque groupe. Ces cinétiques étaient superposables et non significativement différentes.

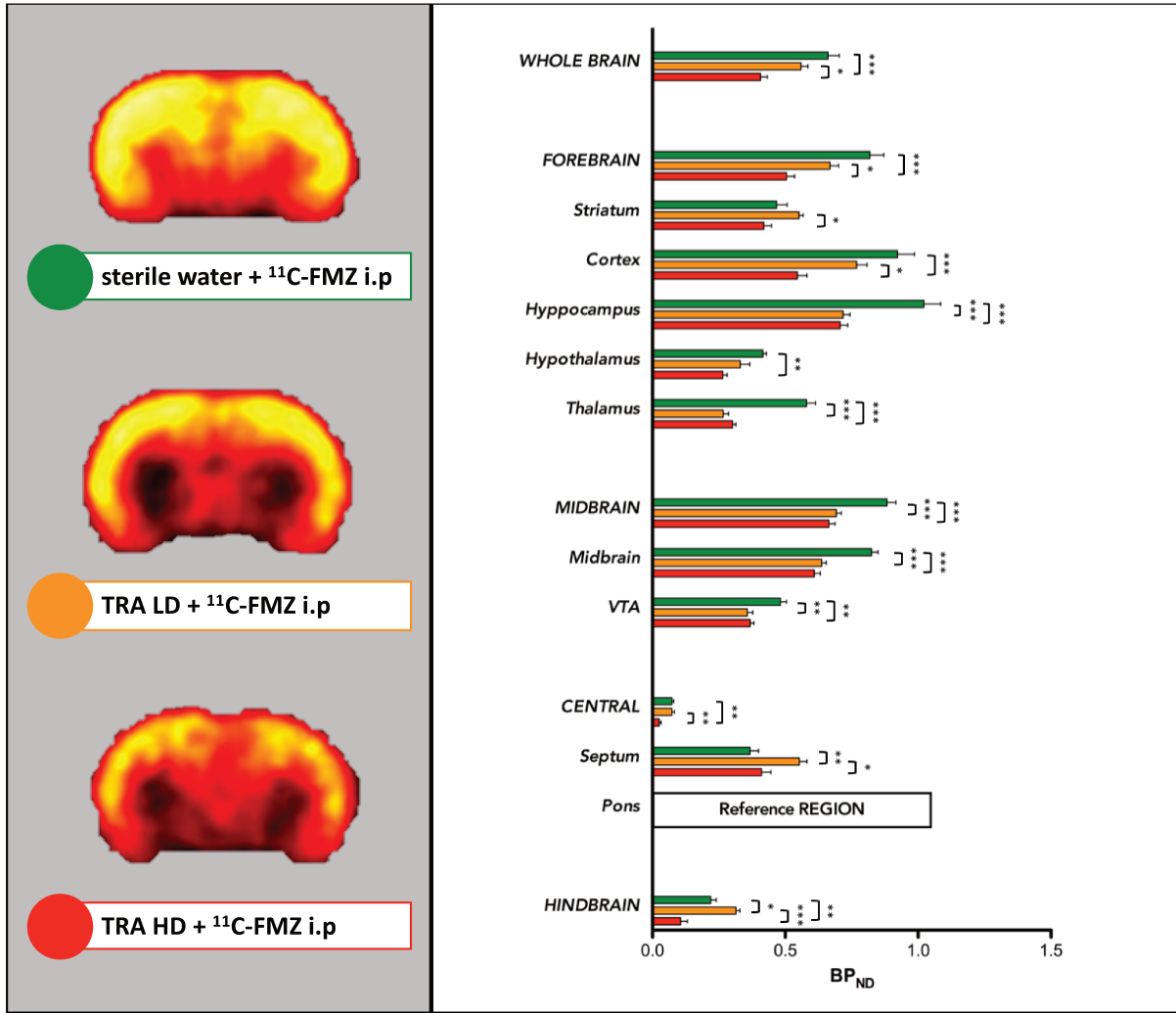


Figure 41 - Impact du tramadol à dose croissante sur le BP<sub>ND</sub> du <sup>11</sup>C-flumazénil (TRA LD : tramadol 25 mg/kg ; TRA HD : tramadol 75 mg/kg)

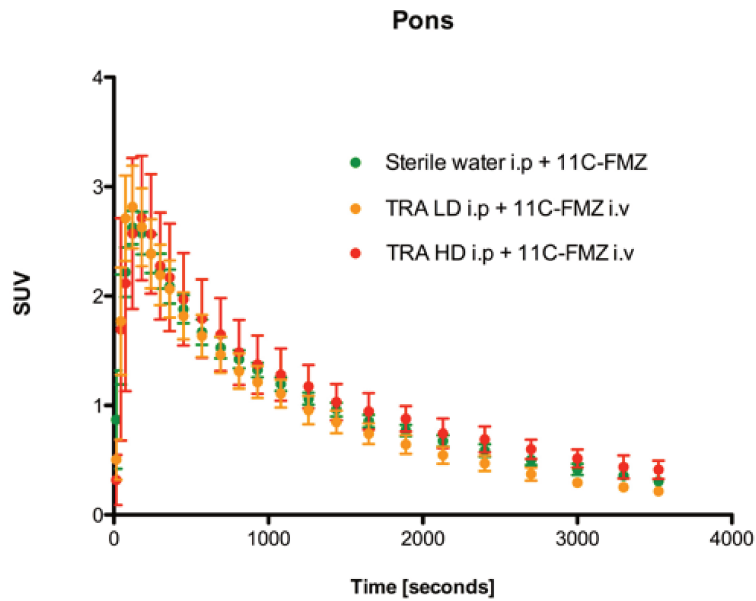


Figure 42- Radioactivité au cours du temps expérimentée en SUV dans les trois groupes

### III.F - Discussion et conclusion

Cette étude montrait l'absence d'implication des monoamines cérébrales dans la survenue des convulsions liées aux intoxications par tramadol. En revanche, la voie GABA-A-ergique semblait impliquée, les convulsions au cours des intoxications par tramadol résulteraient donc de la levée de l'action inhibitrice GABAergique synaptique.

# Investigation of the mechanisms of tramadol-induced seizures in overdose in the rat

SOU MIS A CLINICAL TOXICOLOGY

Camille Lagard, PhD<sup>1\*</sup>; Dominique Vodovar, MD<sup>1,2,3\*</sup>; Lucie Chevillard, PhD<sup>1</sup>;  
Jacques Callebert, PharmD, PhD<sup>1,4</sup>; Fabien Caillé, PhD<sup>3</sup>; Géraldine Pottier, MSc<sup>3</sup>;  
Hao Liang, MSc<sup>1</sup>; Patricia Risède, Tech<sup>1</sup>; Irène Buvat, PhD<sup>3</sup>;  
Nicolas Tournier, PharmD, PhD<sup>3</sup>; Bruno Mégarbane, MD, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Inserm, UMRS-1144, Paris-Descartes and Paris-Diderot Universities, Paris, France.

<sup>2</sup>Department of Medical and Toxicological Critical Care, Lariboisière Hospital, Paris, France. <sup>3</sup>Imagerie Moléculaire In Vivo, IMIV, CEA, INSERM, CNRS, Paris-Sud and Paris-Saclay Universities, CEA-SHFJ, Orsay, France.

<sup>6</sup>Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Lariboisière Hospital, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Paris, France.

\*These authors contributed equally to this work.

For information regarding this article, E-mail: [bruno-megarbane@wanadoo.fr](mailto:bruno-megarbane@wanadoo.fr)

**Correspondence:** Bruno Mégarbane. Réanimation Médicale et Toxicologique, Hôpital Lariboisière, 2 Rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France. Telephone: +33-149958961; Fax: +33-149956578. E-mail: [bruno-megarbane@wanadoo.fr](mailto:bruno-megarbane@wanadoo.fr)

**Running title:** Mechanisms of tramadol-induced seizures

**Word count:** abstract (300 words) – manuscript (2,700 words)

**Conflict of interest statement:** There are no conflicts of interest associated with this study.



## ABSTRACT

**Objective:** Since the withdrawal of dextropropoxyphene from the market, overdoses and fatalities attributed to tramadol, a WHO step-2 opioid analgesic drug with serotonin reuptake inhibiting activity, have increased markedly. Besides central nervous system depression, tramadol overdose may result in seizures, usually included in the induced serotonin syndrome. However, the serotonergic mechanism of tramadol-attributed seizures has been recently questioned. Our objective was to identify the mechanisms involved in seizures accompanying tramadol overdose to improve tramadol-poisoned patient management.

**Design:** Experimental study.

**Setting:** University-affiliated research laboratory.

**Subjects:** Male Sprague-Dawley rats.

**Interventions:** We studied the effects of various specific pretreatments on tramadol-induced seizure onset and alterations in brain monoamines. Positron emission tomography (PET) imaging was used to investigate the interaction between tramadol and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)<sub>A</sub> receptors in the brain in vivo.

**Measurements and Main Results:** Diazepam abolished tramadol-induced seizures, in contrast to naloxone, cyproheptadine and fexofenadine pretreatments. Interestingly, despite seizure abolishment, diazepam significantly enhanced tramadol-induced increase in the brain serotonin ( $p < .01$ ), histamine ( $p < .01$ ), dopamine ( $p < .05$ ) and norepinephrine ( $p < .05$ ) while no significant modifications were observed with the other tested pretreatments except for histamine with naloxone and cyproheptadine ( $p < .01$ ). In rats receiving tramadol before <sup>11</sup>C-flumazenil, PET imaging showed a marked decrease in <sup>11</sup>C-flumazenil binding to the brain suggesting an interaction between GABA<sub>A</sub>-receptors and tramadol. No displacement of <sup>11</sup>C-flumazenil brain kinetics was observed following tramadol administration in contrast to diazepam, suggesting that the observed interaction was not related to a competitive mechanism between tramadol and flumazenil at the benzodiazepine binding site.

**Conclusions:** Our findings clearly ruled out the involvement of serotonergic, histaminergic, dopaminergic, norepinephrinergic and opioidergic pathways in tramadol-induced seizures while strongly suggesting a tramadol-induced specific allosteric change in GABA<sub>A</sub>-receptors that could contribute to seizures onset in overdose. Management of tramadol-poisoned patients should take into account that tramadol-induced seizures are mainly related to a GABAergic pathway.

**KEY WORDS:** drug-drug interaction; GABA; monoamine; overdose; positron emission tomography; seizure; tramadol

**RUNNING TITLE:** Tramadol-induced seizures in overdose are related to a GABAergic pathway in the rat

**ABBREVIATIONS**

5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; AUC, area under the curve;  $B_{max}$ , total density of receptors in the tissue;  $BP_{ND}$ , binding potential; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; HVA, homovanillic acid; HPLC, high-performance liquid chromatography; i.p., intraperitoneal; i.v., intravenous;  $K_D$ , the radioligand equilibrium dissociation constant; M1 metabolite, O-desmethyl-tramadol; MHPG, 3-methoxy-4-hydroxyphenoglycol; MOR, mu-opioid receptor; PET, positron emission tomography; SEM, standard error to the mean; SRTM, the simplified reference tissue model; SS, serotonin syndrome

## INTRODUCTION

Opioid overdose is the first cause of drug-induced poisonings and fatalities in the US (1). A substantial part of this increase has been attributed to tramadol, a WHO step-2 opioid analgesics for which prescriptions have extensively grown following dextropropoxyphene withdrawal from the market (2). Tramadol-induced analgesic activity is attributed to its mu-opioid receptor (MOR) agonist properties and ability to inhibit norepinephrine and serotonin reuptake (3).

Tramadol poisoning causes coma (~30%), seizures (~15%), agitation (~10%) and respiratory depression (~5%) (4,5). Tramadol-induced seizures represent a major issue contributing to ~8% of the drug-induced seizures reported to poison control centers (6). Tramadol overdose typically results in isolated, brief, self-limiting generalized tonic-clonic seizures, often occurring within 4-6 hours post-ingestion, although electroencephalogram abnormalities and recurrent seizures or status epilepticus are not rare (5,7,8,9). Additionally, serotonin syndrome (SS) may occur, but its incidence is controversial (10,11).

Mechanisms of tramadol-induced seizures remain poorly understood. Seizures are usually included in the SS and related to serotonin receptor overstimulation, mainly the 1A and 2A receptor subtypes, by increasing synaptic serotonin concentration (12). However, based on animal data, the serotonergic mechanism of tramadol-induced seizures has been questioned (13,14). Rat pretreatment with cyproheptadine, a serotonin receptor antagonist, did not abolish tramadol-induced seizures (14) while 5-hydroxytryptophane/benserazide, a combination enhancing brain serotonin, was protective (13) or without effects (14). Thus, the involvement of non-serotonergic pathways including  $\gamma$ -aminobutyric acid- (GABA)ergic (15), histaminergic (16), dopaminergic (17), and opioidergic (15,16) have been hypothesized to account for tramadol-induced seizures. We designed a rat study to clarify the controversial mechanism of tramadol-induced seizures. Various pretreatments were used to investigate the impact of the hypothesized neurotransmission systems on the onset of tramadol-induced seizures and the brain monoamine content.

## MATERIALS AND METHODS

Protocols were approved by Paris-Descartes University ethics committee for animal experimentation (APAFIS#5285-2017031714499381v2 and APAFIS#7466-2016110417049220v2). We used male Sprague-Dawley rats (Janvier Labs, France) weighing 250-350g. Jugular vein was catheterized when required. Detailed methodology is provided in the Online Supplement.

## Clinical Parameters

Temperature was measured using intraperitoneally (i.p.) implanted transmitters (DSI, Netherlands). Sedation level was assessed using a 4-stage scale (18) and seizure severity using the modified Racine Score based on five stages (19).

## Measurement of Monoamine Concentrations in the Brain

We chose to measure neurotransmitter concentrations in the frontal cortex, the main area of serotonergic projections exhibiting the prominent number of spike-wave discharges after 10-40mg/kg tramadol administration (20). Rats were anesthetized, exsanguinated and decapitated. The frontal cortexes were collected 15-20min after drug administration. Samples were frozen at -80°C until measurement. Concentrations of monoamines (dopamine, serotonin and norepinephrine), L-tryptophan (serotonin precursor) and their metabolites [5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), 3-methoxy-4-hydroxyphenoglycol (MHPG), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA)] were measured using high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to fluorimetry. Radioenzymatic assay was used for histamine concentration determination.

## <sup>11</sup>C-flumazenil Positron Emission Tomography (PET) Imaging

PET imaging acquisition was performed using an Inveon<sup>®</sup> microPET-CT-scanner (Siemens, Germany). Rat caudal vein was catheterized under isoflurane. Anesthetized rats were placed into the micro-PET-CT and brain CT-scan was performed. After CT completion, 60-min dynamic acquisitions were performed starting at the time of <sup>11</sup>C-flumazenil intravenous (i.v.) injection, to study i)- the impact of tramadol on the brain binding of <sup>11</sup>C-flumazenil and ii)- the mechanisms involved in tramadol-induced changes in <sup>11</sup>C-flumazenil brain binding.

PET data were analyzed. Radioactivity concentration was expressed as the percentage of the injected dose (%ID.mL<sup>-3</sup>) versus time. The binding potential (BP<sub>ND</sub>) of <sup>11</sup>C-flumazenil in selected brain regions ( $BP_{ND} = B_{max}/K_D$ , where  $B_{max}$  represents the total density of tissue receptors and  $K_D$ , the radioligand equilibrium dissociation constant) was estimated using the simplified reference tissue model (SRTM) and the pons as reference region. Corresponding parametric PET images were generated using SRTM to visualize <sup>11</sup>C-flumazenil BP<sub>ND</sub> to GABA<sub>A</sub>-receptors (PXMOD, Pmod Software).

## Study Design

### Study 1 - Effects of pretreatments on tramadol-induced sedation, seizures, effects on temperature and brain monoamines.

Catheterized rats were randomly assigned to five groups to receive various agonists or antagonists (Table 1), before i.p. 75mg/kg tramadol at a dose able to induce typical poisoning features (14). Pharmacological doses of the different pretreatments were selected according to previous publications: i.p. 1.77mg/kg diazepam (21); i.v. 2mg/kg bolus followed by 4mg/kg/h infusion naloxone (22); i.p. 10mg/kg cyproheptadine (21); and i.p. 15mg/kg fexofenadine, a histamine-1 receptor antagonist (23). Tramadol was injected after each pretreatment with a delay chosen to allow for its peak effects. In the first series, the clinical parameters described above were measured in the five rat groups (N=6/group) immediately before tramadol injection and at 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 and 120min after injection. In a second series, brain monoamine concentrations were measured at 15-20min after tramadol administration. A sixth group serving as Control group with rats receiving saline i.p. instead of tramadol was additionally considered for the monoamine assays.

Group Time (min)	Tramadol group	Diazepam group	Naloxone group	Cyproheptadine group	Fexofenadine group	Control group
<b>T-30</b>	∅	∅	∅	∅	15 mg/kg fexofenadine i.p.	∅
<b>T-15</b>	4% tween i.p.	1.77 mg/kg diazepam i.p.	4% tween i.p.	10 mg/kg cyproheptadine i.p.	∅	4% tween i.p.
<b>T-10</b>	Saline i.v.	Saline i.v.	2 mg/kg i.v. bolus followed by 4 mg/kg/h infusion	Saline i.v.	Saline i.v.	Saline i.v.
<b>T0</b>	75 mg/kg tramadol i.p.	75 mg/kg tramadol i.p.	75 mg/kg tramadol i.p.	75 mg/kg tramadol i.p.	75 mg/kg tramadol i.p.	Saline i.p.

**Table 1. Treatments administered in the different study groups.** (i.p., intraperitoneal; i.v., intravenous)

## **Study 2 - Interactions of tramadol with GABA<sub>A</sub>-receptors.**

Interaction of tramadol with the GABAergic system was assessed using PET imaging and <sup>11</sup>C-flumazenil. Rats were randomly assigned to two groups (N=5/group) to receive 75mg/kg i.p. tramadol (Tramadol group) or 1.7 ml of sterile water i.p. (Vehicle group), 15min before <sup>11</sup>C-flumazenil injection followed by 60min PET acquisition.

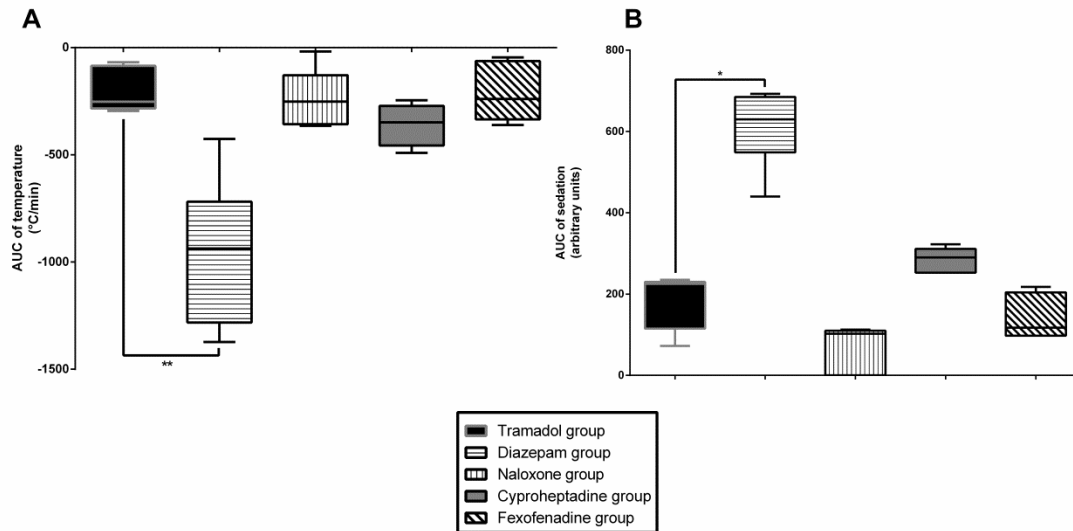
Displacement experiments were performed to address the direct competition of tramadol with <sup>11</sup>C-flumazenil on its binding site (24). To that end, rats were randomized into four groups (N=2/group) to receive i.v. <sup>11</sup>C-flumazenil alone (Baseline group) and in addition, 1mg/kg tramadol (Tramadol-1 group), 25mg/kg tramadol (Tramadol-25 group) or 1mg/kg diazepam (Diazepam group), injected i.v. during PET acquisition 30min after <sup>11</sup>C-flumazenil injection.

## **Data Analysis**

Results are expressed as median and quartiles (Study1) and mean±SEM (Study2). To permit the simultaneous analysis of the effects of time and treatments on sedation, temperature and monoamine concentrations (Study1), we calculated for each animal and each studied parameter, the area under the curve (AUC) from T0 to the completion of measurement (120min) using the trapezoid method. Thereafter, for sedation and temperature, we compared the AUCs using Kruskal-Wallis tests for comparisons between five groups. For monoamine concentrations, we compared the AUCs using Mann–Whitney U-tests for comparisons two-by-two. Regarding the effects of treatments on seizures, comparisons were performed using two-way analysis of variance followed by multiple comparison tests using Bonferroni's correction. In the PET-imaging study, we compared the BP<sub>ND</sub> in the two studied groups using Mann–Whitney U-tests. All tests were performed using Prism version 6.0 (GraphPad Software, USA). P-values <.05 were considered as significant.

## **RESULTS**

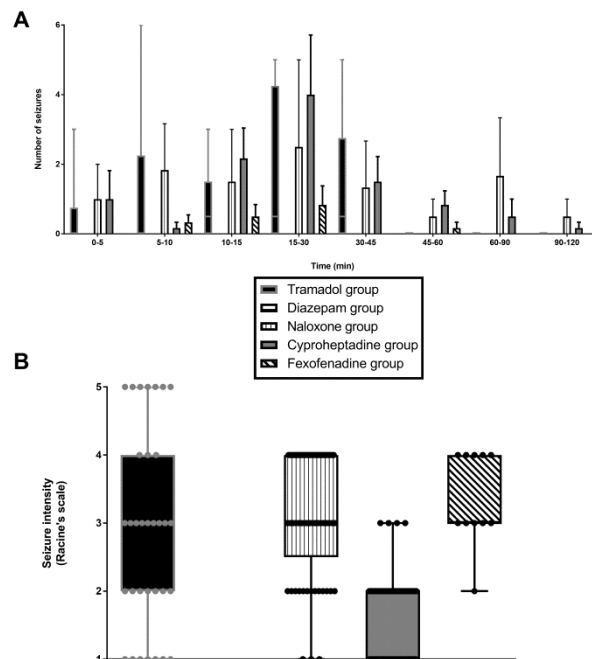
**Study 1** - Diazepam significantly deepened sedation (p<.05) and decreased temperature (p<.01) in tramadol-treated rats (Fig.1). Naloxone, cyproheptadine and fexofenadine did not alter tramadol-induced effects on sedation and temperature.



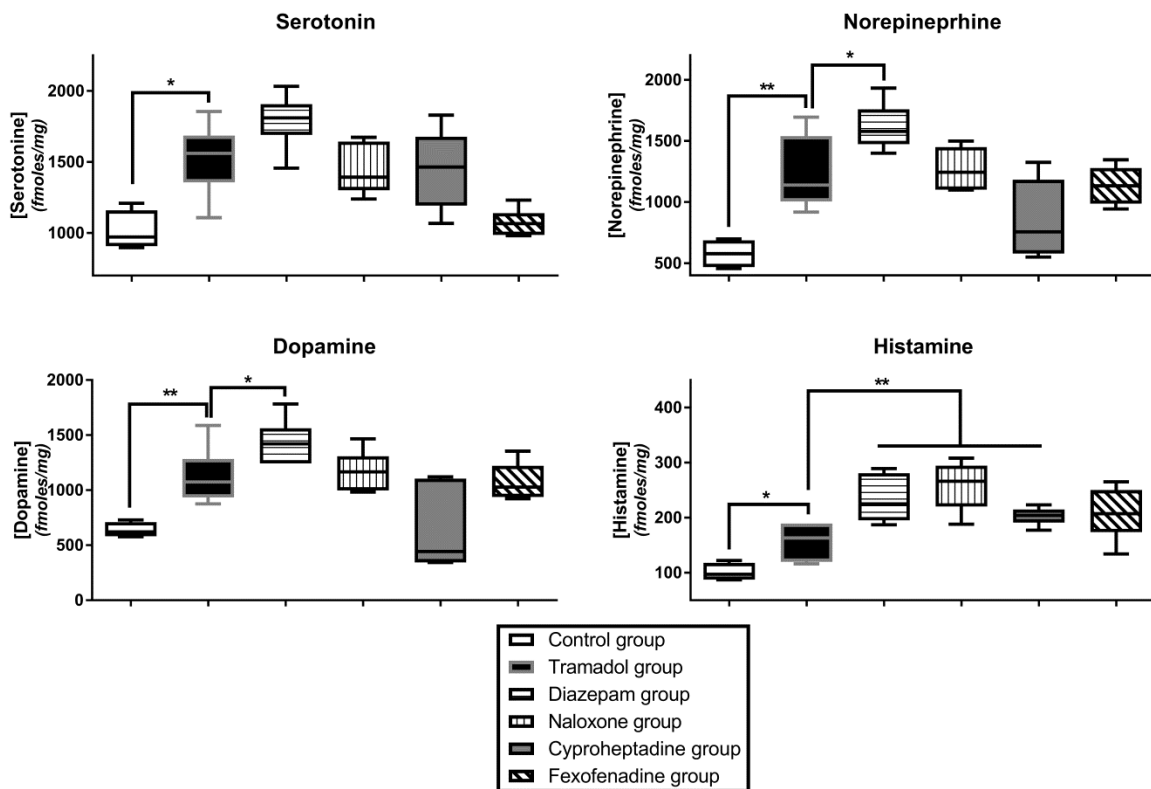
**Figure 1.** Effects on sedation (A) and temperature (B) of intraperitoneal (i.p.) 75 mg/kg tramadol administration (T0) in Sprague-Dawley rats pretreated with i.p. 4% tween at T-15 + intravenous (i.v.) saline at T-10 (Tramadol group, black); i.p. 1.77 mg/kg diazepam at T-15 + i.v. saline at T-10 (Diazepam group, horizontal lines); i.p. 4% tween at T-15 + i.v. 2 mg/kg bolus followed by 4 mg/kg/h naloxone at T-10 (Naloxone group, vertical lines); i.p. 10 mg/kg cyproheptadine at T-15 + i.v. saline at T-10 (Cyproheptadine group, grey); and i.p. 15 mg/kg fexofenadine at T-30 + i.v. saline at T-10 (Fexofenadine group, diagonal lines). Results are expressed as median and quartiles (N=6/group). \*p<.05, \*\*p<.01.

Diazepam completely abolished seizures in tramadol-treated rats, whereas naloxone, cyproheptadine and fexofenadine pretreatments had no significant effects on seizures. However, seizure occurrence was prolonged up to 120 versus 45min by cyproheptadine and fexofenadine pretreatments (Fig.2).

**Figure 2.** Effects on the seizure time-course (A) and intensity (B) of intraperitoneal (i.p.) 75 mg/kg tramadol administration in Sprague-Dawley rats pretreated with i.p. 4% tween at T-15 + intravenous (i.v.) saline at T-10 (Tramadol group, black); i.p. 1.77 mg/kg diazepam at T-15 + i.v. saline at T-10 (Diazepam group, horizontal lines); i.p. 4% tween at T-15 + i.v. 2 mg/kg bolus followed by 4 mg/kg/h naloxone at T-10 (Naloxone group, vertical lines); i.p. 10 mg/kg cyproheptadine at T-15 + i.v. saline at T-10 (Cyproheptadine group, grey); and i.p. 15 mg/kg fexofenadine at T-30 + i.v. saline at T-10 (Fexofenadine group, diagonal lines). Results are expressed as median and quartiles. (N=6/group).



Tramadol overdose was responsible for a significant increase in histamine, serotonin, norepinephrine and dopamine concentrations ( $p < .05$ ,  $p < .05$ ,  $p < .01$  and  $p < .01$ , respectively; Fig.3) and decreases in 5-HIAA, HVA and DOPAC concentrations ( $p < .01$ ) in comparison to the control. Tryptophan concentration was not significantly modified. Diazepam pretreatment significantly increased tramadol-induced effects on histamine, norepinephrine and dopamine concentrations ( $p < .01$ ,  $p < .05$  and  $p < .05$ , respectively) as well as its effects on 5-HIAA, MHPG and HVA concentrations ( $p < .01$ ,  $p < .05$  and  $p < .01$ , respectively). Naloxone significantly increased tramadol-induced effects on histamine concentrations ( $p < .01$ ) as well as its effects on MHPG and DOPAC concentrations ( $p < .05$ ). Cyproheptadine significantly increased tramadol-induced effects on histamine concentration ( $p < .01$ ). Fexofenadine significantly increased tramadol-induced effects on HVA and DOPAC concentrations ( $p < .01$  and  $p < .05$ , respectively). No pretreatment resulted in significant changes in tramadol-induced effects on tryptophan concentrations.

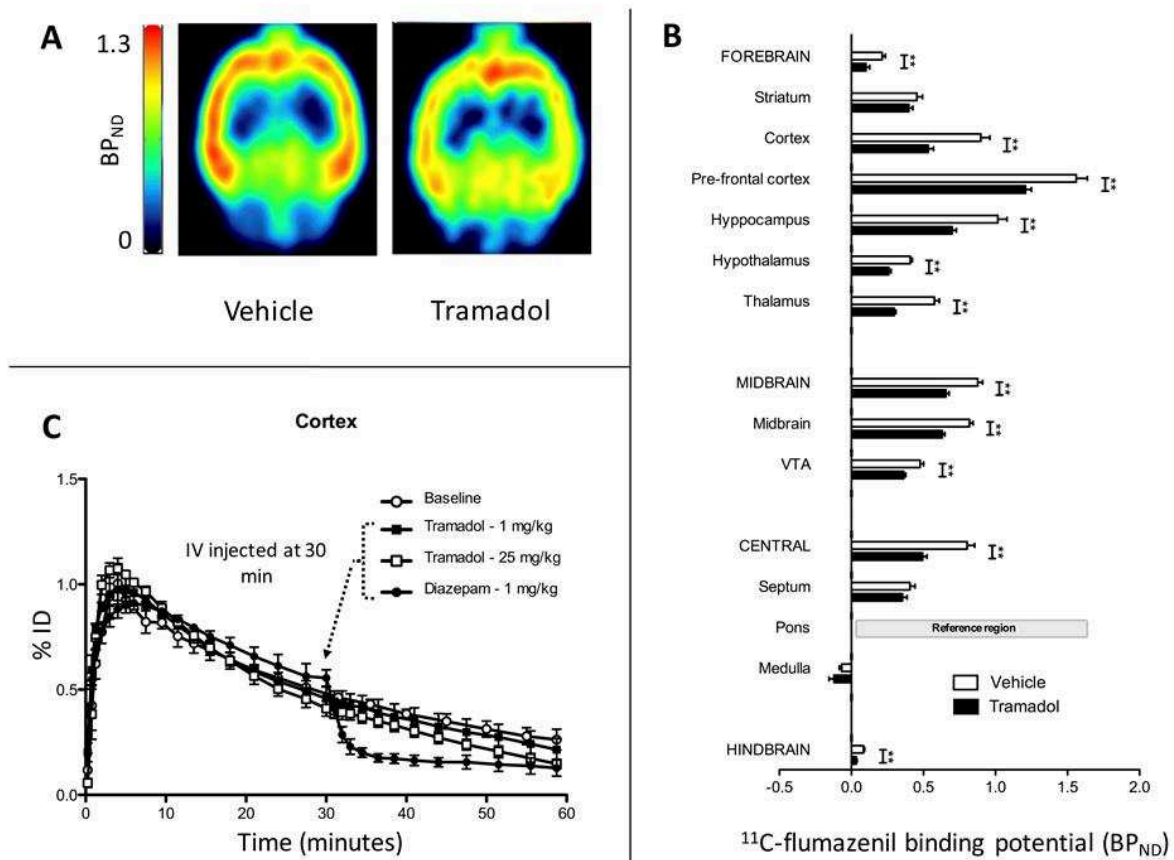


**Figure 3.** Effects on the frontal cortex monoamine concentrations of intraperitoneal (i.p.) 75 mg/kg tramadol administration in Sprague-Dawley rats pretreated with i.p. 4% tween at T-15 + intravenous (i.v.) saline at T-10 (Tramadol group, black); i.p. 1.77 mg/kg diazepam at T-15 + i.v. saline at T-10 (Diazepam group, horizontal lines); i.p. 4% tween at T-15 + i.v. 2 mg/kg bolus followed by 4 mg/kg/h naloxone at T-10 (Naloxone group, vertical lines); i.p. 10 mg/kg cyproheptadine at T-15 + i.v. saline at T-10 (Cyproheptadine group, grey); and i.p. 15 mg/kg fexofenadine at T-30 + i.v. saline at T-10 (Fexofenadine group, diagonal lines). Control rats received i.p. saline at T0 + i.p. 4% tween at T-15 + i.v. saline at T-10 (Control group, white). Results are expressed as median and quartiles. (N=6/group). \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ .



**Study 2** - In the control rats (Vehicle group),  $^{11}\text{C}$ -flumazenil PET images as well as the corresponding  $\text{BP}_{\text{ND}}$  values were consistent with typical data obtained in similar conditions (25). In rats receiving 75mg/kg tramadol i.p. before  $^{11}\text{C}$ -flumazenil, significant reduction in  $\text{BP}_{\text{ND}}$  was observed in most brain regions, except in the striatum, medulla and septum (Fig.4A and Fig.4B).

No displacement of  $^{11}\text{C}$ -flumazenil brain kinetics was observed following i.v. 1 or 25mg/kg tramadol injection after 30min PET acquisition. In comparison, a marked displacement was observed after the injection of the reference ligand diazepam (1mg/kg) administered in the same conditions (Fig.4C).



**Figure 4.** Effects of tramadol on  $^{11}\text{C}$ -flumazenil binding to the brain. Parametric PET images displaying the regional binding of  $^{11}\text{C}$ -flumazenil ( $\text{BP}_{\text{ND}}$ ) without (Vehicle) or with (Tramadol) pre-treatment with intraperitoneal 75 mg/kg tramadol, 15 min before intravenous (i.v.)  $^{11}\text{C}$ -flumazenil are shown in A. The corresponding  $\text{BP}_{\text{ND}}$  in selected brain regions in rats receiving either baseline  $^{11}\text{C}$ -flumazenil (Vehicle group, white) or tramadol injection (Tramadol group, black) are shown in B. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. (N=5/group). \*\* $p < 0.01$ . Displacement experiments are reported in C, displaying  $^{11}\text{C}$ -flumazenil time activity curves in the cortex, i.v. injected alone (white circle), with 1 mg/kg tramadol i.v. (black square), 25 mg/kg tramadol i.v. (white square) or 1 mg/kg diazepam i.v. injected 30 minutes after the beginning of the PET acquisition. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. (N=2/group).

## DISCUSSION

We showed that tramadol-induced seizures in overdose do not involve serotonin-, histamine-, norepinephrine-, and dopamine-mediated pathways. However, an interaction between tramadol and the benzodiazepine binding site of the GABA<sub>A</sub>-receptor has been highlighted, suggesting a role for the GABAergic pathway in mediating tramadol-induced seizures.

Our rat model reliably reproduced tramadol toxicity observed in humans (4,5). As published (14), our tramadol-overdosed rats exhibited early-onset seizures occurring as soon as 5min after tramadol injection and disappearing 45min later. Tramadol overdose induced significant increases in serotonin, histamine, norepinephrine and dopamine concentrations in the brain (Fig.3) with significant decreases in 5-HIAA (serotonin catabolite), MHPG (norepinephrine catabolite), HVA and DOPAC (dopamine catabolites) concentrations. These findings suggested a reduction in monoamine catabolism, attributed to the inhibition of the oxygen-dependent monoamine oxidase-A due to brain tissue hypoxia in tramadol-overdosed rats (14).

Concomitant use of tramadol with tricyclic or serotonin reuptake inhibitor antidepressants has been associated with enhanced risk of seizures, leading to the assumption that tramadol-induced seizures may represent one of the SS symptoms (12), despite the lack of convincing evidence establishing the role of serotonin in the generation of tramadol-induced seizures. Our findings ruled out the involvement of serotonergic pathways in tramadol-induced seizures, as suggested (13,14). Usually, SS-related seizures are prevented by cyproheptadine, a serotonin receptor antagonist, as shown in citalopram overdose (21). In our study, cyproheptadine did not alter tramadol-induced effects neither on sedation, nor on hypothermia (Fig.1) or seizure onset (Fig.2). Additionally, cyproheptadine did not significantly alter most of tramadol-induced effects on brain monoamines in the frontal cortex (Fig.3). Only histamine concentrations were significantly increased possibly related to its antagonist properties on H1-receptors.

Involvement of the dopaminergic system in tramadol-induced seizures was suggested by the increase in tramadol-related seizure threshold obtained in mice with haloperidol, a predominantly D2-receptor antagonist (17). Besides obvious limitations due to haloperidol-related direct epileptic activity in this study, the significant increase in brain dopamine that we observed in diazepam-pretreated rats while exhibiting seizure abolishment precludes the contribution of dopaminergic pathways to seizures.

Multiple mechanisms resulting in opioid receptor overstimulation seem involved in the precipitation of seizure activity in laboratory animals (26). Involvement of kappa-opioid receptors in tramadol-induced seizures was suggested (27), even though tramadol affinity for this receptor subclass is low (3,28). We showed that naloxone did not alter tramadol-induced effects on sedation, temperature (Fig.1) and seizures but prolonged their occurrence time (Fig.2). Experimental data regarding naloxone-related seizurogenic effects remain controversial, depending on the animal model and experimental conditions. Most studies demonstrated rather protective effects against both opioid- and non-opioid-related seizures

(15,29,30). Conversely, other studies reported no protective and even worsening effects of naloxone on seizures (31,32), supporting our findings. Naloxone significantly enhanced tramadol-induced effects on the brain histamine, ruling out the hypothesis of an H1-receptor activation-linked pathway mediated by opioid receptor-dependent histamine release from mast cells (16).

Usually, H1-receptor agonists or histamine releasers exhibit anticonvulsant effects (16,33,34) while H1-receptor antagonists are responsible for seizurogenic effects (35-37). Despite the absence of direct evidence, connections between tramadol-induced seizures and histamine have been hypothesized based on data showing that antihistamines and histamine release inhibitors attenuate this adverse effect (16). Our findings clearly ruled out the involvement of histaminergic pathways in tramadol-induced seizures. Pretreatment with fexofenadine did not alter tramadol-induced effects on sedation, temperature and seizures but prolonged their occurrence time (Fig.1 and Fig.2). The contribution of fexofenadine to the observed decrease in the brain HVA and DOPAC concentrations remained, however, unclear.

We therefore investigated the GABAergic hypothesis. Benzodiazepines, allosteric GABA<sub>A</sub>-receptor agonists, are able to prevent and treat tramadol-induced seizures (4,38,39). Consistently, our previous experimental data combining elevated doses of both diazepam and tramadol clearly showed diazepam-induced abolishment of tramadol-related seizures, even though this combination enhanced respiratory depression (14). In our rat model, diazepam at a pharmacological dose efficiently prevented seizures (Fig.2) while enhancing sedation and hypothermia (Fig.1). Interestingly, diazepam pretreatment was responsible for significant increase in tramadol-induced effects on norepinephrine and dopamine, with a trend towards tramadol-induced increase in serotonin concentration, and significant increase in tramadol-induced effects on 5-HIAA, MHPG, and HVA (Fig.3). These effects could be explained by the enhanced respiratory depression related to diazepam/tramadol combination and its resulting decrease in brain oxygenation explaining monoamine catabolism inhibition (14). Despite diazepam-related seizure prevention, no monoamine concentration went back to its baseline. The increased concentrations of monoamines including norepinephrine and decreased concentrations of their catabolites strongly suggested that they were not involved in tramadol-induced seizures.

GABA is the main inhibitory neurotransmitter, present in ~30% of central synapses. Inhibition of GABAergic pathways was hypothesized to actively participate in tramadol-induced seizures. Based on an in vitro study on human recombinant neurotransmitter-gated ion channels, GABA<sub>A</sub>-receptors were shown to be inhibited by tramadol and its M1 metabolite (O-desmethyl-tramadol), but only at high concentrations (100µM), possibly correlating with convulsion onset in vivo (40). Here, we demonstrated that i.p. 75mg/kg tramadol induced significant decrease in <sup>11</sup>C-flumazenil binding to most brain regions, suggesting a molecular interaction between tramadol and GABA<sub>A</sub>-receptors in the brain accounting for its seizing activity.

Several hypotheses may explain the decrease in  $BP_{ND}$  ( $=B_{max}/K_D$ ) observed after tramadol administration. Increasing doses of tramadol were not able to displace  $^{11}C$ -flumazenil binding from the brain (Fig.4C), supporting the absence of direct competition between tramadol and flumazenil at the  $GABA_A$ -receptors. Interestingly, a decrease in  $^{11}C$ -flumazenil  $BP_{ND}$  has been previously observed in several rat models of epilepsy and explained by the decrease in  $B_{max}$  while  $K_D$  remained constant in comparison to the control (25,41,42). These findings were consistent with the internalization of  $GABA_A$ -receptors in the *in vitro* studies observed at least one hour after status epilepticus (43,44). In our PET study, no seizure was observed following *i.p.* 75mg/kg tramadol administration. Conversely, in non-anesthetized rats, the same dose induced seizures occurring as early as 5min after tramadol injection (14). Isoflurane anesthesia, known to exhibit anti-convulsive properties (45,46), can explain these discrepancies, although occurrence of infra-clinic seizures cannot be ruled out in our anesthetized rats during the procedure since electroencephalographic recording was impossible during PET acquisition. This nonetheless suggests that the decrease in  $BP_{ND}$  resulted from specific tramadol action on the  $GABA_A$ -receptors rather than non-specific  $GABA_A$ -receptor alteration during seizures. This hypothesis is supported by *in vitro* data reporting  $GABA_A$ -receptor inhibition mediated ion channeling by high concentration tramadol and its M1 metabolite (100 $\mu$ M) (40).

The ionotropic  $GABA_A$ -receptor is a ligand-gated ion channel, composed of five subunits forming the  $Cl^-$  channel (47). Both acute and chronic tramadol administration markedly potentiated seizing activity induced in rodents by pentylenetetrazole, a noncompetitive antagonist that blocks GABA-mediated  $Cl^-$  influx by allosteric interaction at the  $Cl^-$  channel (15,48). Allosteric modulation of  $GABA_A$ -receptors by high dose tramadol may thus be hypothesized to explain the decrease in  $BP_{ND}$ . This hypothesis is consistent with the rapid onset of seizures, observed as soon as 5min after tramadol injection (14). The multiplicity of drug binding sites on the  $GABA_A$ -receptor supports such an interaction (49), consistent with several proconvulsant antagonists that interact on various sites of the receptor like bicuculline competing with GABA on its binding site and picrotoxin acting on the “picrotoxin binding site” and blocking the  $Cl^-$  channel (47). Our findings suggest that tramadol at elevated concentrations may bind to the  $GABA_A$ -receptor at a different binding site from the benzodiazepine site and that allosteric modulation resulting from such an interaction explains seizures.

One of our study strengths was to investigate *in vivo* tramadol toxicity at elevated doses. One limitation consisted in the absence of measurement of seizing activity during PET acquisition and brain sampling for monoamine measurement. The hypothesis of tramadol/ $GABA_A$ -receptor interaction may be insufficient to explain tramadol-induced seizures alone. Interestingly, inhibition of glutamate decarboxylase-mediated GABA synthesis has been reported to explain allylglycine-related seizuronic activity (50). Here we did not investigate the brain GABA concentrations and metabolism as well as possible alterations induced by tramadol. However, this hypothesis appears unlikely to explain tramadol-related seizures, due to their rapid onset (14).

## CONCLUSIONS

The present study demonstrated that tramadol-induced seizures are only prevented by diazepam, a GABA<sub>A</sub>-receptor agonist. The serotonergic, histaminergic, opioidergic, dopaminergic and norepinephrinergic pathways seem unlikely to be involved. Our data highly suggest that tramadol-induced seizures may result from tramadol interaction with the GABA<sub>A</sub>-receptor involving a non-competitive mechanism at the benzodiazepine-binding site. Prevention and management of tramadol-induced seizures in overdose should optimally be based on benzodiazepine administration.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Animal Platform, CRP2 - UMS 3612 CNRS - US25 Inserm - IRD - Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris-Descartes, Paris, France for their technical assistance. They would like also to thank Mrs. Emilie Jaumain (CEA-SHFJ, France) for technical assistance and Mrs. Alison Good (Scotland, UK) for her helpful review of the manuscript.

## REFERENCES

- 1- Dart RC, Surratt HL, Cicero TJ, et al: Trends in opioid analgesic abuse and mortality in the United States. *N Engl J Med* 2015; 372:241-248
- 2- Hawton K, Bergen H, Simkin S, et al: Six-year followup of impact of co-proxamol withdrawal in England and Wales on prescribing and deaths: time-series study. *PLoS Med* 2012; 9:e1001213
- 3- Grond S, Sablotzki A: Clinical pharmacology of tramadol. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43:879-923
- 4- Marquardt KA, Alsop JA, Albertson TE: Tramadol exposures reported to statewide poison control system. *Ann Pharmacother* 2005; 39:1039-1044
- 5- Shadnia S, Soltaninejad K, Heydari K, et al: Tramadol intoxication: a review of 114 cases. *Hum Exp Toxicol* 2008; 27:201-205
- 6- Thundiyil JG, Kearney TE, Olson KR: Evolving epidemiology of drug-induced seizures reported to a poison control center system. *J Med Toxicol* 2007; 3:15-19
- 7- Jovanović-Cupić V, Martinović Z, Nesić N: Seizures associated with intoxication and abuse of tramadol. *Clin Toxicol (Phila)* 2006; 44:143-146
- 8- Talaie H, Panahandeh R, Fayaznouri M, et al: Dose-independent occurrence of seizure with tramadol. *J Med Toxicol* 2009; 5:63-67

- 9- Taghaddosinejad F, Mehrpour O, Afshari R, et al: Factors related to seizure in tramadol poisoning and its blood concentration. *J Med Toxicol* 2011; 7:183-188
- 10- Ryan NM, Isbister GK: Tramadol overdose causes seizures and respiratory depression but serotonin toxicity appears unlikely. *Clin Toxicol (Phila)* 2015; 53:545-550
- 11- Tashakori A, Afshari R: Tramadol overdose as a cause of serotonin syndrome: a case series. *Clin Toxicol (Phila)* 2010; 48:337-341
- 12- Boyer EW, Shannon M: The serotonin syndrome. *N Engl J Med* 2005; 352:1112-1120
- 13- Fujimoto Y, Funao T, Suehiro K, et al: Brain serotonin content regulates the manifestation of tramadol-induced seizures in rats: disparity between tramadol-induced seizure and serotonin syndrome. *Anesthesiology* 2015; 122:178-189
- 14- Lagard C, Chevillard L, Malissin I, et al: Mechanisms of tramadol-related neurotoxicity in the rat: Does diazepam/tramadol combination play a worsening role in overdose? *Toxicol Appl Pharmacol* 2016; 310:108-119
- 15- Rehni AK, Singh I, Kumar M: Tramadol-induced seizurogenic effect: A possible role of opioid-dependent gamma-amino butyric acid inhibitory pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103:262-266
- 16- Rehni AK, Singh TG, Singh N, et al: Tramadol-induced seizurogenic effect: A possible role of opioid-dependent histamine H1 receptor activation-linked mechanism. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2010; 381:11-19
- 17- Bameri B, Shaki F, Ahangar N, et al: Evidence for the involvement of the dopaminergic system in seizure and oxidative damage induced by tramadol. *Int J Toxicol* 2018; 37:164-70.
- 18- Pirnay SO, Mégarbane B, Borron SW, et al: Effects of various combinations of benzodiazepines with buprenorphine on arterial blood gases in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103:228-239
- 19- Racine RJ: Modification of seizure activity by electrical stimulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32:269-299
- 20- Jang HS, Jang IS, Lee MG: The effects of tramadol on electroencephalographic spectral parameters and analgesia in rats. *Korean J Physiol Pharmacol* 2008; 14:191-198
- 21- Beaune S, Callebert J, Baud FJ, et al: Mechanisms of high-dose citalopram-induced death in a rat model. *Toxicology* 2012; 302: 248-254
- 22- Haglind E: Effects of continuous naloxone infusion in intestinal ischemia shock in the rat. *Circ Shok* 1992; 32:269-299
- 23- Anoush M, Mohammad Khani MR: Evaluating the Anti-nociceptive and Anti-inflammatory Effects of Ketotifen and Fexofenadine in Rats. *Adv Pharm Bull* 2015; 5:217-222
- 24- Pottier G, Marie S, Goutal S, et al: Imaging the Impact of the P-Glycoprotein (ABCB1) Function on the Brain Kinetics of Metoclopramide. *J Nucl Med* 2016; 57:309-314

- 25- Parente A, Vázquez García D, Shoji A, et al: Contribution of neuroinflammation to changes in [11C]flumazenil binding in the rat brain: Evaluation of the inflamed pons as reference tissue. *Nucl Med Biol* 2017; 49:50-56
- 26- Saboory E, Derchansky M, Ismaili M, et al: Mechanisms of morphine enhancement of spontaneous seizure activity. *Anesth Analg* 2007; 105:1729-1735
- 27- Manocha A, Sharma KK, Mediratta PK: On the mechanism of anticonvulsant effect of tramadol in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 82:74-81
- 28- Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, et al: Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an 'atypical' opioid analgesic. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 260:275-285
- 29- Gilbert PE, Martin WR: Antagonism of the convulsant effects of heroin, d-propoxyphene, meperidine, normeperidine and thebaine by naloxone in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1975; 192: 538-541
- 30- Yang L, Li F, Ge W, Mi C, et al: Protective effects of naloxone in two-hit seizure model. *Epilepsia* 2010; 51:344-353
- 31- Omrani A, Ghadami MR, Fathi N, et al: Naloxone improves impairment of spatial performance induced by pentylenetetrazol kindling in rats. *Neuroscience* 2007; 145:824-821
- 32- Raffa RB, Stone DJ: Unexceptional seizure potential of tramadol or its enantiomers or metabolites in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 325: 500-506
- 33- Yokoyama H, Onodera K, Iinuma K, et al: 2-Thiazolylethylamine, a selective histamine H1 agonist, decreases seizure susceptibility in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 47:503-507
- 34- Soria-Jasso L, Arias-Montano J: Histamine H1 receptor activation stimulates [<sup>3</sup>H] GABA release from human astrocytoma U373 MG cells. *Eur J Pharmacol* 1996; 318:185-192
- 35- Sangalli BC: Role of the central histaminergic neuronal system in the CNS toxicity of the first generation H1-antagonists. *Prog Neurobiol* 1997; 52:145-157
- 36- Kamei C, Ohuchi M, Sugimoto Y, et al: Mechanism responsible for epileptogenic activity by first-generation H1-antagonists in rats. *Brain Research* 2000; 887:183-186
- 37- Fujii Y, Tanaka T, Harada C, et al: Epileptogenic activity induced by histamine H1 antagonists in amygdala-kindled rats. *Brain Research* 2003; 991:258-261
- 38- Eizadi-Mood N, Ozcan D, Sabzghabae AM, et al: Does naloxone prevent seizure in tramadol intoxicated patients? *Int J Prev Med* 2014; 5:302-307
- 39- Shadnia S, Brent J, Mousavi-Fatemi K, et al: Recurrent seizures in tramadol intoxication: implications for therapy based on 100 patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012; 111:133-136
- 40- Hara K, Minami K, Sata T: The effects of tramadol and its metabolite on glycine, gamma-aminobutyric acidA, and N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesth Analg* 2005; 100:1400-1405

- 41- Liefwaard LC, Ploeger BA, Molthoff CF, et al: Changes in GABAA receptor properties in amygdala kindled animals: in vivo studies using [11C]flumazenil and positron emission tomography. *Epilepsia* 2009; 50:88-98
- 42- Syvänen S, Labots M, Tagawa Y, et al: Altered GABAA receptor density and unaltered blood-brain barrier transport in a kainate model of epilepsy: an in vivo study using 11C-flumazenil and PET. *J Nucl Med* 2012; 53:1974-1983
- 43- Naylor DE, Liu H, Wasterlain CG: Trafficking of GABA(A) receptors, loss of inhibition, and a mechanism for pharmacoresistance in status epilepticus. *J Neurosci* 2005; 25:7724-7733
- 44- Goodkin HP, Joshi S, Mtchedlishvili Z et al: Subunit-specific trafficking of GABA(A) receptors during status epilepticus. *J Neurosci* 2008; 28:2527-2538
- 45- Fukuda H, Hirabayashi Y, Shimizu R, et al: Sevoflurane is equivalent to isoflurane for attenuating bupivacaine-induced arrhythmias and seizures in rats. *Anesth Analg* 1996; 83:570-573
- 46- Bar-Klein G, Klee R, Brandt C, et al: Isoflurane prevents acquired epilepsy in rat models of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2016; 80:896-908
- 47- Chua HC, Chebib M: GABA(A) Receptors and the diversity in their structure and pharmacology. *Adv Pharmacol* 2017; 79:1-34
- 48- Gholami M, Saboory E, Roshan-Milani S: Proconvulsant effects of tramadol and morphine on pentylenetetrazol-induced seizures in adult rats using different routes of administration. *Epilepsy Behav* 2014; 36:90-96
- 49- Olsen RW: GABA(A) receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology* 2018; pii:S0028-3908(18)30036-4
- 50- Ashton D, Wauquier A: Effects of some anti-epileptic, neuroleptic and gabaminergic drugs on convulsions induced by D,L-allylglycine. *Pharmacol Biochem Behav* 1979; 11:221-226

## ONLINE SUPPLEMENT

This online supplement adds some methodological details not presented in the methodology section of the main manuscript as well as the complete results of various pretreatments on tramadol-induced effects on brain monoamine concentrations (Study1; Fig. 5 online).

## MATERIALS AND METHODS



Our experimental protocols were carried out within the ethical guidelines established by the National Institutes of Health and approved by Paris-Descartes University ethics committee for animal experimentation and by the French Ministry of Higher Education and Research (APAFIS#5285-2017031714499381v2 and APAFIS#7466-2016110417049220v2).

### **Animals**

Male Sprague-Dawley rats (Janvier Labs, France) weighing 250-350 g at the time of experimentation were used, housed for 7 days before experimentation in an environment maintained at  $21\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  with controlled humidity and light-dark cycle. Food and tap water were provided ad libitum.

### **Drugs**

Tramadol hydrochloride (Grünenthal, Germany) and naloxone (Aguettant, France) were diluted in sterile water to obtain solutions of 44 mg/mL and 0.4 mg/mL, respectively. Diazepam (Roche, France) was diluted in 4% Tween (Tween-20<sup>®</sup> diluted in 0.9% NaCl) to obtain a solution of 2 mg/mL. Cyproheptadine (Teofarma, Italy) and fexofenadine (Sanofi-Aventis, France) were diluted in saline to obtain solutions of 5.3 and 15 mg/ml, respectively. <sup>11</sup>C-flumazenil radiosynthesis and production for IV injection were performed as previously described (1,2) and diluted in saline to obtain  $35.8 \pm 4.9$  MBq in a constant volume of 1 mL (specific radioactivity,  $39.8 \pm 6.1$  GBq/ $\mu\text{mol}$ ).

### **Jugular Catheterization**

One week before the study, the rat jugular vein was catheterized using 60 cm-silastic tubing with external and internal diameters of 0.94 and 0.51 mm, respectively (Dow Corning Co., USA), under ketamine (70 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) anesthesia. Catheters were tunneled subcutaneously and fixed at the back of the neck. Heparinized saline was injected into the catheter to avoid thrombosis and catheter obstruction. Rats were then returned to their individual cages for 7 days, allowing anesthesia washout and complete recovery. On the day of experiment and before drug administration, the catheter was exteriorized, purged, and its permeability checked.

### **Clinical Parameters**

Temperature was measured using intraperitoneal (i.p.) implanted temperature transmitters (DSI, Netherlands). Sedation level based on a 4-stage scale from 0 (awake) to 3 (coma) was assessed (3): At stage 0, rats were completely awake and their gait and righting reflexes were intact. At stage 1, rats had reduced activity, showed light impairment of gait and intact righting reflex with diminished muscle

tonus. At stage 2, rats were asleep or static and showed reduced righting reflex. At stage 3, rats were comatose and did not have any righting reflex. Seizure severity was graded according to the modified Racine Score (4): At stage 1, rats were immobile, with eyes closed, twitching of vibrissae and facial clonus. At stage 2, rats had head nodding associated with more severe facial clonus. At stage 3, rats had clonus of one forelimb. At stage 4, rats had rearing, often accompanied by bilateral forelimb clonus. At stage 5, rats had rearing with loss of balance and falling accompanied by generalized clonic seizures.

### **Measurement of Monoamine Concentrations in the Brain**

We chose to measure neurotransmitter concentrations in the frontal cortex, the main area of serotonergic projections that exhibited the prominent number of spike-wave discharges after 10 to 40 mg/kg tramadol administration (5). Following tramadol administration, rats were immediately placed for 10 min in an anesthesia induction chamber (Tem Segal, France) with 4% isoflurane (Virbac, France). They were exsanguinated to clean the brain of its blood and decapitated. The frontal cortexes were collected 15-20 min after drug administration. Samples were frozen at -80°C until measurement. Concentrations of monoamines (i.e. dopamine, serotonin and norepinephrine), L-tryptophan (the serotonin precursor) and their metabolites (i.e. 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), 3-methoxy-4-hydroxyphenoglycol (MHPG), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA)) were measured using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to fluorimetry as previously described (6). Radioenzymatic assay was used for histamine concentration determination as previously described (7).

### **<sup>11</sup>C-flumazenil Positron Emission Tomography (PET) Imaging**

PET imaging acquisition was performed using an Inveon<sup>®</sup> microPET-CT scanner (Siemens, Germany) (8). Rat anesthesia was induced then maintained using 3 and 1.5–2.5% isoflurane in O<sub>2</sub>, respectively, to insert a catheter in the caudal vein for <sup>11</sup>C-flumazenil injection. Anesthetized rats were placed into the micro-PET-CT and a brain CT-scan was performed. After CT completion, 90- or 60-min dynamic acquisitions were performed starting at the time of <sup>11</sup>C-flumazenil intravenous (i.v.) injection, to study i)- the impact of tramadol on the brain binding of <sup>11</sup>C-flumazenil and ii)- the mechanisms involved in tramadol-induced changes in <sup>11</sup>C-flumazenil brain binding, respectively.

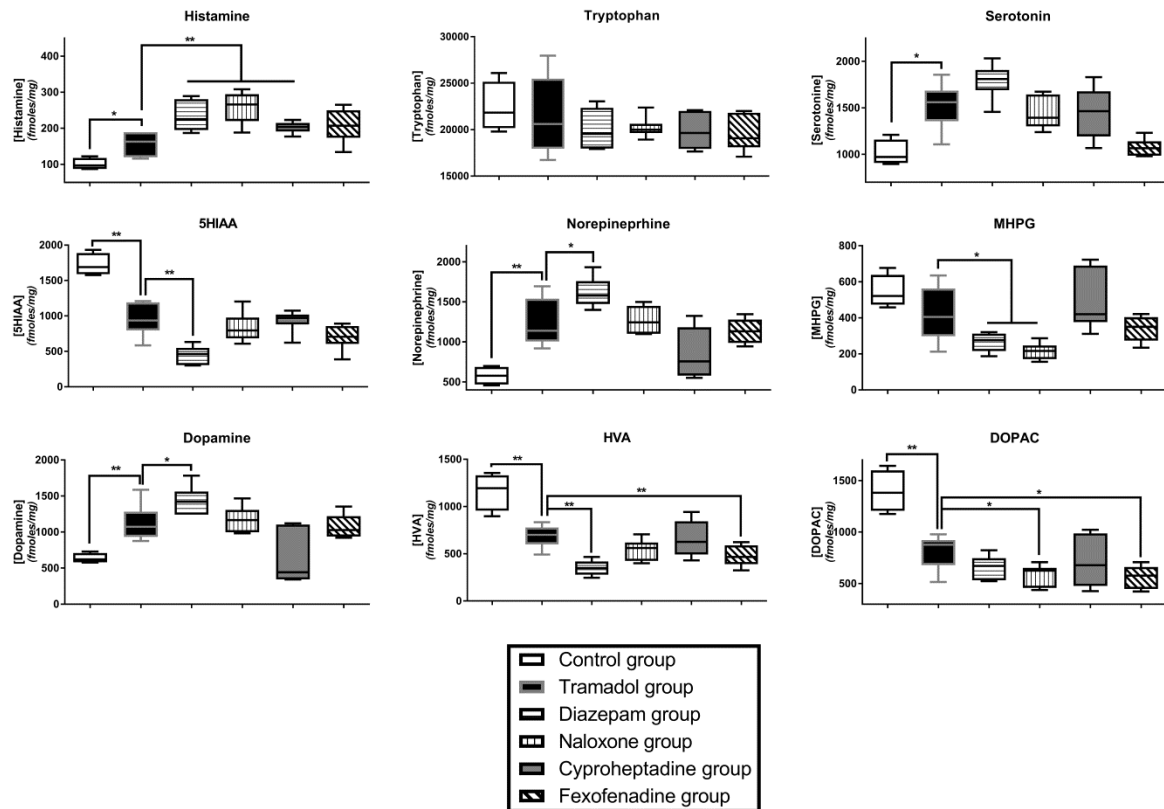
PET data were reconstructed using the FORE+OSEM2D algorithm including normalization, attenuation, scatter and random corrections. PET images were co-registered using Pmod software (version 3.6, Switzerland) to a brain magnetic resonance imaging (MRI) template published by Schiffer et al. (9; normalization of PET-CT on MRI and application of the transformation to the PET images). This template incorporates adult male Sprague-Dawley rats (250-300 g) and implements the Paxinos coordinates. Time activity curves (TACs) were generated in different brain regions predefined in the

Schiffer's template. Radioactivity concentration was expressed as the percentage of the injected dose ( $\%ID.mL^{-3}$ ) versus time (min). The binding potential ( $BP_{ND}$ ) of  $^{11}C$ -flumazenil in selected brain regions ( $BP_{ND} = B_{max}/K_D$ , where  $B_{max}$  represents the total density of receptors in the tissue and  $K_D$ , the radioligand equilibrium dissociation constant) was estimated using the simplified reference tissue model (SRTM) and the pons as the reference region (10). Corresponding parametric PET images were generated using SRTM to visualize  $^{11}C$ -flumazenil binding ( $BP_{ND}$ ) to GABA<sub>A</sub>-receptor (PXMOD, Pmod Software).

## RESULTS

### **Study 1 - Effects of various pretreatments on tramadol-induced effects on brain monoamine concentrations.**

Tramadol overdose was responsible for a significant increase in histamine, serotonin, norepinephrine and dopamine concentrations ( $p < .05$ ,  $p < .05$ ,  $p < .01$  and  $p < .01$ , respectively) and decreases in 5-HIAA, HVA and DOPAC concentrations ( $p < .01$ ) in comparison to the control (Fig. 5 online). Tryptophan concentration was not significantly modified. Diazepam pretreatment significantly increased tramadol-induced effects on histamine, norepinephrine and dopamine concentrations ( $p < .01$ ,  $p < .05$  and  $p < .05$ , respectively) as well as its effects on 5-HIAA, MHPG and HVA concentrations ( $p < .01$ ,  $p < .05$  and  $p < .01$ , respectively). Naloxone significantly increased tramadol-induced effects on histamine concentrations ( $p < .01$ ) as well as its effects on MHPG and DOPAC concentrations ( $p < .05$ ). Cyproheptadine significantly increased tramadol-induced effects on histamine concentration ( $p < .01$ ). Fexofenadine significantly increased tramadol-induced effects on HVA and DOPAC concentrations ( $p < .01$  and  $p < .05$ , respectively). No pretreatment resulted in significant changes in tramadol-induced effects on tryptophan concentrations.



**Figure 5 online.** Effects on the frontal cortex monoamine concentrations of intraperitoneal (i.p.) 75 mg/kg tramadol administration in Sprague-Dawley rats pretreated with i.p. 4% tween at T-15 + intravenous (i.v.) saline at T-10 (Tramadol group, black); i.p. 1.77 mg/kg diazepam at T-15 + i.v. saline at T-10 (Diazepam group, horizontal lines); i.p. 4% tween at T-15 + i.v. 2 mg/kg bolus followed by 4 mg/kg/h naloxone at T-10 (Naloxone group, vertical lines); i.p. 10 mg/kg cyproheptadine at T-15 + i.v. saline at T-10 (Cyproheptadine group, grey); and i.p. 15 mg/kg fexofenadine at T-30 + i.v. saline at T-10 (Fexofenadine group, diagonal lines). Control rats received i.p. saline at T0 + i.p. 4% tween at T-15 + i.v. saline at T-10 (Control group, white). Results are expressed as median and quartiles. (N=6/group). \*p<.05, \*\*p<.01.

## REFERENCES

- 51- Larsen P, Ulin J, Dahlstrom K: A New Method for Production of <sup>11</sup>C-Labelled Methyl Iodide from Methane. *J Label Compd Radiopharm* 1995; 37:73–75
- 52- Jewett DM: A simple synthesis of [<sup>11</sup>C]methyl triflate. *Int J Rad Appl Instrum A* 1992; 43:1383-1385
- 53- Pirnay SO, Mégarbane B, Borron SW, et al: Effects of various combinations of benzodiazepines with buprenorphine on arterial blood gases in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103: 228-239
- 54- Racine RJ: Modification of seizure activity by electrical stimulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32:269-299

- 55- Jang HS, Jang IS, Lee MG: The effects of tramadol on electroencephalographic spectral parameters and analgesia in rats. *Korean J Physiol Pharmacol* 2008; 14:191-198
- 56- Kema IP, Schellings AM, Hoppenbrouwers CJ, et al: High performance liquid chromatographic profiling of tryptophan and related indoles in body fluids and tissues of carcinoid patients. *Clin Chim Acta* 1993 ; 221:143-158
- 57- Haimart M, Launay JM, Zürcher G, et al: Simultaneous determination of histamine and N alpha-methylhistamine in biological samples by an improved enzymatic single isotope assay. *Agents Actions* 1985; 16:71-75
- 58- Bao Q, Newport D, Chen M, et al: Performance evaluation of the inveon dedicated PET preclinical tomograph based on the NEMA NU-4 standards. *J Nucl Med* 2009; 50:401-408
- 59- Schiffer WK, Mirrione MM, Biegon A, et al: Serial microPET measures of the metabolic reaction to a microdialysis probe implant. *J Neurosci Methods* 2006; 155:272-284
- 60- Alves IL, Vález García D, Parente A, et al: Pharmacokinetic modeling of [11C]flumazenil kinetics in the rat brain. *EJNMMI Res* 2017; 7:17

## Discussion - Conclusion

---

La crise des opioïdes que connaissent aujourd’hui les États-Unis et dans une moindre mesure l’Europe est un problème majeur de santé publique (Skolnick, 2018). Outre le nombre croissant des décès observés, cette crise sanitaire a comme particularité de toucher toutes les classes de la société, le plus souvent de jeunes actifs, qui sont devenus dépendants aux opioïdes suite à une prescription à visée antalgique (Birnbaum *et al*, 2011; Volkow and McLellan, 2016). Les décès surviennent le plus souvent de manière accidentelle.

En plus de la prévention institutionnelle, de l’instauration de mesures régulatrices limitant les prescriptions inutiles ou trop longues d’opioïdes, la bonne connaissance de la toxicité neuro-respiratoire des opioïdes est un élément indispensable pour bien prendre en charge les patients intoxiqués (Bruera, 2018). La naloxone reverse les effets neuro- (coma) respiratoires (acidose hypercapnique) de la majorité des opioïdes. Aux États-Unis, le ministère de la santé a récemment publié une note appelant toutes les personnes consommant régulièrement des opioïdes et leurs proches à posséder dans leur pharmacie personnelle de la naloxone ([surgeongeneral.gov](http://surgeongeneral.gov)).

Néanmoins, deux opioïdes qui ont aujourd’hui une place majeure sur le marché des opioïdes licites provoquent des toxicités qui ne sont peu ou pas reversées par la naloxone : il s’agit de la buprénorphine et du tramadol. La buprénorphine, agoniste partiel  $\mu$  aux effets respiratoires plafonnés, induit une dépression respiratoire lorsqu’elle est co-administrée avec des benzodiazépines (Jones *et al*, 2012; Megarbane *et al*, 2006a). Le tramadol, agoniste  $\mu$  faible et inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, induit des convulsions à dose toxique (Hassamal *et al*, 2018). L’objectif de cette thèse était d’étudier les mécanismes à l’origine ces toxicités.

## Études des mécanismes de l'interaction entre le diazépam et la buprénorphine à l'origine d'une dépression respiratoire.

Après quinze ans de recherche, chez le rongeur, au sein du laboratoire « Variabilité de réponse aux psychotropes », les hypothèses d'une interaction pharmacocinétique périphérique ou de la participation de la norbuprénorphine dans la dépression respiratoire observée lors de la co-administration de benzodiazépines et de buprénorphine ont été exclues (Alhaddad *et al*, 2013; Hreiche *et al*, 2006; Kilicarslan and Sellers, 2000; Megarbane *et al*, 2006b; Zhang *et al*, 2003). Les travaux de cette thèse avaient pour but d'explorer les trois autres principales hypothèses émises à ce jour : 1) hypothèse neuro-pharmacocinétique, 2) hypothèse réceptologique et 3) hypothèse pharmacodynamique (Jones *et al*, 2012; Megarbane *et al*, 2006a).

Comme précédemment publié, notre modèle montrait que, la buprénorphine ou le diazépam seul, n'entraînent pas de dépression respiratoire alors que l'association des deux molécules est à l'origine d'une acidose hypercapnique (Gueye *et al*, 2002; Nielsen and Taylor, 2005; Pirnay *et al*, 2008a; 2008b).

Les résultats obtenus en imagerie TEP utilisant la <sup>11</sup>C-buprénorphine était en défaveur des hypothèses neuro-pharmacocinétique et réceptologique. Il a été montré précédemment que le transport au travers de la barrière hémato-encéphalique de la norbuprénorphine, principal métabolite de la buprénorphine, est environ 30 fois inférieur à celui de la buprénorphine chez la souris (Alhaddad *et al*, 2012). Le signal TEP mesuré est donc attribuable à la <sup>11</sup>C-buprénorphine. L'imagerie TEP à la <sup>11</sup>C-buprénorphine nous a permis de vérifier de manière *non invasive* et *in vivo* l'absence de modification de la distribution cérébrale de buprénorphine par le diazépam. Ce résultat est en accord avec de précédentes données obtenues par microdialyse dans le striatum (Megarbane *et al*, 2005). Nos résultats montrent que le diazépam n'induit pas de modification de la cinétique de la <sup>11</sup>C-buprénorphine dans l'ensemble des régions cérébrales, y compris le cervelet, où les récepteurs opioïdes ne sont pas exprimés chez le rat (Holland *et al*, 1989). Cette observation confirme également l'absence d'interaction périphérique, car une augmentation des concentrations plasmatiques aurait induit une augmentation du signal cérébral de la <sup>11</sup>C-buprénorphine. Nos conclusions sont, en revanche, en désaccord avec de précédentes publications *ex vivo* montrant, en autoradiographie, une modulation de l'affinité et/ou de la densité des récepteurs  $\mu$  pour le

DAMGO ([D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol]-enkephalin) lorsqu'une benzodiazépine était administrée avec la buprénorphine (Debruyne *et al*, 2005; Poisnel *et al*, 2009). Cette différence de résultats peut s'expliquer par deux facteurs. Premièrement, cette étude avait été réalisée *ex vivo*. Deuxièmement, les rats étaient sacrifiés 24 heures après l'administration des drogues alors que la dépression respiratoire observée lors de la co-administration de benzodiazépines et de buprénorphine survient généralement dans les 15 min (Cohier *et al*, 2014). Notre méthode *in vivo* utilisant l'imagerie TEP avec la <sup>11</sup>C-buprénorphine était donc plus à même de décrire les mécanismes impliqués au cours de cette dépression respiratoire. Les résultats obtenus à 24 h restent néanmoins intéressants et pourraient faire présager d'une plus grande susceptibilité au risque d'overdose par buprénorphine lorsque les patients sont traités par benzodiazépines au long court. Une telle étude en imagerie TEP, en théorie possible, permettrait de vérifier *in vivo* cette hypothèse.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence l'existence d'une interaction pharmacodynamique entre diazépam et buprénorphine qui pourrait être à l'origine de la dépression respiratoire. Le toxidrome opioïde typique observé en clinique au cours des intoxications combinant buprénorphine et benzodiazépines (Megarbane *et al*, 2010) est similaire à celui rencontré au cours des mono-intoxications pures par les agonistes complets des récepteurs  $\mu$  (Boyer, 2012). On pouvait s'attendre à un profil de toxicité similaire de l'association diazépam/buprénorphine sur les temps respiratoires, à savoir un allongement des temps inspiratoire et expiratoire responsable d'une baisse de la fréquence respiratoire (Chevallard *et al*, 2009). Nos données ont permis d'infirmer cette hypothèse, ce qui renforce nos conclusions concernant l'hypothèse réceptologique. L'association des deux molécules induisait un allongement du temps inspiratoire. Celui-ci était similaire à celui observé avec la buprénorphine seule comme précédemment décrit (Gueye *et al*, 2002; Nielsen and Taylor, 2005; Pirnay *et al*, 2008a; 2008b). Il était en revanche associé à une diminution du temps expiratoire. Cette diminution était similaire à celle observée avec le diazépam seul, mais inférieure à celle observée avec la buprénorphine seule afin de compenser l'allongement du temps inspiratoire et maintenir une fréquence respiratoire normale. L'utilisation d'antagonistes spécifiques des récepteurs GABA-A et opioïdes a permis de mieux comprendre et confirmer la contribution de chaque drogue sur les temps respiratoires : l'allongement du temps inspiratoire, attribué à la buprénorphine, était spécifiquement reversé par la



naloxonazine ; la diminution limitée du temps expiratoire, attribuée au diazépam, était spécifiquement réversée par le flumazénil. Cette interaction centrale entre les deux drogues pourrait être approfondie en étudiant spécifiquement l'action de la buprénorphine, avec ou sans diazépam, sur les différents centres respiratoires de rongeurs décérébrés (Dutschmann *et al*, 2014).

La diminution du volume courant observée lorsque le diazépam et la buprénorphine étaient co-administrés était réversée de manière significative et similaire par la naloxonazine, un antagoniste  $\mu$ -spécifique, et le flumazénil. En l'absence d'autres paramètres pléthysmographiques informatifs, ce résultat ne permet donc pas de conclure sur le rôle respectif de chaque molécule (diazépam, buprénorphine) dans la baisse du volume courant. En effet, le diazépam comme la buprénorphine sont dénués d'effets propres sur le volume courant.

En revanche, l'étude de la fonction diaphragmatique dans les différentes conditions, ont apporté de nouvelles informations mécanistiques. De précédents travaux ont montré que les opioïdes diminuaient la contractilité diaphragmatique (Campbell *et al*, 1995; Rigg and Rondi, 1981). De manière surprenante, nous avons observé que la buprénorphine ne modifiait pas la contraction diaphragmatique et même, qu'elle avait une tendance non significative à l'augmenter. Cette tendance suggère une conservation du reflexe inspiratoire en réponse à l'augmentation des résistances des voies aériennes supérieures, probablement modeste, induite par la buprénorphine (Hajiha *et al*, 2009; Vankova *et al*, 1996). Ce réflexe semble être aboli par le diazépam qui, pourtant, augmentait probablement par son action pharmacologique propre connue, l'obstruction des voies aériennes supérieures. Seul, le diazépam n'a pas entraîné de modification de la contractilité diaphragmatique, même si une tendance non-significative à la diminution a pu être notée, comme déjà rapporté. Les mécanismes compensateurs à cette diminution impliqueraient l'augmentation de l'activité des muscles intercostaux et abdominaux (Gueye *et al*, 2002; Molliex *et al*, 1993). Seule, la buprénorphine pourrait diminuer l'activité des muscles intercostaux de manière modeste (agoniste partiel  $\mu$ ), comme cela a été observé de manière beaucoup plus importante avec d'autres opioïdes agonistes entiers, menant au syndrome de rigidité thoracique (Ehsan *et al*, 2015; Hajiha *et al*, 2009; Vankova *et al*, 1996). Cet effet pourrait donc également contribuer à la baisse du volume courant. Néanmoins, des études supplémentaires électromyographiques

des muscles intercostaux, abdominaux et oropharyngés sont nécessaires pour confirmer ces hypothèses. L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs opioïdes périphériques comme la méthylaltréxone pourrait peut-être permettre d'étayer cette hypothèse mécanistique par une approche pharmacologique.

Ce travail préclinique confirme les données cliniques qui ont rapporté la réversion de la dépression respiratoire par le flumazénil seul. La naloxonazine permettait également de réverser la dépression respiratoire dans notre étude ; néanmoins la naloxone en pratique clinique est le plus souvent inefficace pour réverser de tels effets (Megarbane *et al*, 2010). L'ensemble de ces éléments peuvent nous permettre de proposer un algorithme de prise en charge des intoxications par opioïdes incluant le flumazénil (Figure 43). Le flumazénil est certes non-indiqué en cas d'intoxication polymédicamenteuse ou contre-indiqué avec co-ingestion de produits pro-convulsivants. Cependant, dans la situation de co-ingestion de benzodiazépines et buprénorphine, un toxidrome opioïde typique non réversé par une dose titrée de naloxone (2 mg au total) pourrait devenir une indication de flumazénil.

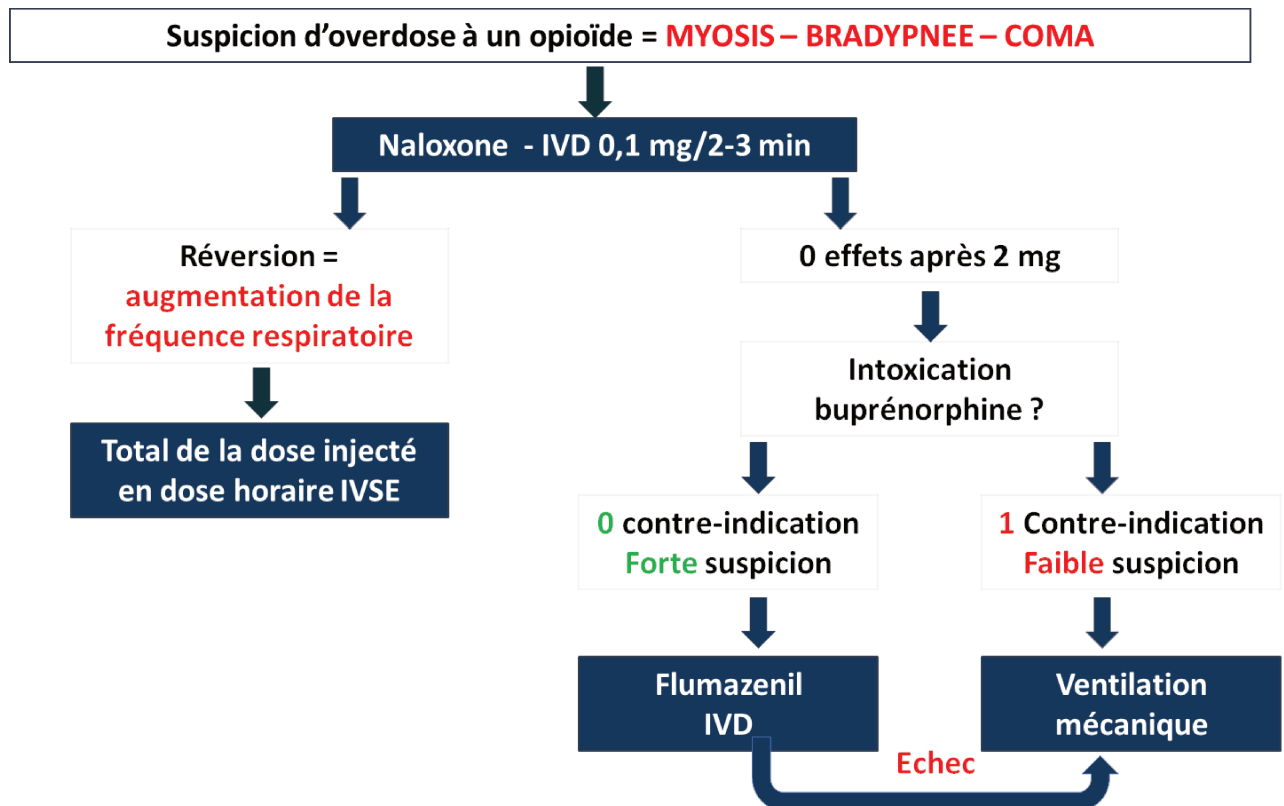


Figure 43 - Proposition d'algorithme de prise en charge des intoxications par opioïdes

Enfin il est à noter que chez l'enfant de moins de deux ans, la toxicité de la buprénorphine s'exprime en mono-intoxication, en rapport avec une immaturité probable de la barrière hémato-encéphalique qui ne freine pas suffisamment le passage cérébral de la norbuprénorphine (Mégarbane and Alhaddad, 2013). Par conséquent cet algorithme n'est applicable que chez les patients de plus de deux ans.

## Rôle du système GABAergique dans les convulsions observées au cours des intoxications par tramadol.

L'augmentation majeure du nombre d'intoxications par tramadol en France comme dans le reste du monde suscite un intérêt croissant du fait de la prévalence de cette molécule dans la prise en charge des douleurs légères à modérées. Beaucoup de travaux ont été publiés sur les mécanismes possiblement impliqués dans ces convulsions au cours des dernières années aboutissant à des hypothèses multiples et parfois contradictoires, notamment du fait de l'inhomogénéité des modèles animaux utilisés. Le but de ce travail était de tester ces différentes hypothèses sur un même modèle de rat développé dans le laboratoire. Dans ce modèle, la description des convulsions était parfaitement documentée puisqu'elle avait été analysée par des enregistrements électroencéphalographiques dans une précédente étude (Lagard *et al*, 2016).

Nous confirmons par notre étude l'absence d'implication du système sérotoninergique comme cela avait été suggéré par deux précédentes études précliniques et une étude clinique (Fujimoto *et al*, 2015; Lagard *et al*, 2016; Ryan and Isbister, 2015). En revanche, nos conclusions vont à l'encontre de celles de deux autres études chez la souris qui avait conclu à l'implication des voies opioïdiques et histaminergiques dans les convulsions induites par le tramadol, sur un modèle de souris épileptiques sensibilisées au pentylènetétrazole (antagoniste des récepteurs GABA-A) (Rehni *et al*, 2008; 2010). La différence d'espèce, et surtout le modèle utilisé sont probablement à l'origine des différences de résultats obtenus. L'hypothèse dopaminergique est plus récente et a été publiée après le début de nos travaux (Bameri *et al*, 2018). Néanmoins, cette hypothèse est à prendre avec précaution. En effet, les médicaments utilisés, la cabergolin et l'halopéridol, sont respectivement des agonistes et antagonistes des récepteurs D2, connus pour être anticonvulsivants lorsqu'ils sont activés et pro-convulsivants lorsqu'ils sont inhibés (Bozzi and Borrelli, 2013). Par conséquent, des études complémentaires sont nécessaires (y compris en imagerie TEP avec un radiotracer spécifique des récepteurs D2 -  $^{11}\text{C}$ -raclopride) afin d'explorer la contribution des voies dopaminergiques dans la survenue de convulsions liées à l'intoxication au tramadol (Högberg, 1993). Dans notre étude, l'administration d'une dose convulsivante de tramadol induisait certes une augmentation de la dopamine cérébrale ; cependant le prétraitement par diazépam entraînait

une disparition des convulsions associée à une augmentation encore plus importante des concentrations de dopamine.

Le principal résultat de cette étude est la démonstration de l'implication des récepteurs GABA-A dans la survenue des convulsions induites par le tramadol. Une telle implication était suspectée par l'absence de survenue de convulsions après administration de diazépam ou de gabapentine, mais qui ont tous les deux une action antiépileptique non spécifique (Lagard *et al*, 2016; Rehni *et al*, 2008). Par ailleurs, des données *in vitro* ont montré que le tramadol à forte concentration inhibait les récepteurs GABA-A humains exprimés à la surface d'œufs de xenopus (Hara *et al*, 2005). La diminution dose-dépendante de la fixation cérébrale du <sup>11</sup>C-flumazenil ( $BP_{ND}$ ) des rats traités par tramadol suggère une interaction spécifique du tramadol avec le système GABAergique.

Par analogie, une diminution du  $BP_{ND}$  ( $B_{max} / K_D$ ) du <sup>11</sup>C-flumazenil avait déjà été rapportée dans des modèles d'épilepsie chez le rat. Cette diminution était liée à la diminution du  $B_{max}$  alors que le  $K_D$  restait constant par rapport au groupe témoin (Liefwaard *et al*, 2009; Syvänen *et al*, 2012). Notre modèle animal de toxicité du tramadol entraînait des convulsions dans les 5 minutes suivant l'administration de tramadol lorsque les rats étaient non anesthésiés (Lagard *et al*, 2016) ; la diminution du  $BP_{ND}$  du <sup>11</sup>C-flumazenil observée dans notre étude pourrait donc être liée à la survenue de convulsions au cours de l'acquisition des images TEP. Néanmoins, plusieurs arguments s'opposent à cette hypothèse bien que nous n'ayons pas réalisé d'enregistrements électroencéphalographiques sous caméra. Dans les modèles lésionnels ou pharmacologiques de rats épileptiques, il a été observé une diminution croissante du  $B_{max}$  (donc du  $BP_{ND}$ ) du <sup>11</sup>C-flumazenil au cours du temps par rapport aux rats contrôles (12% deux jours après le début des crises, 36% entre le 14<sup>ème</sup> et 28<sup>ème</sup> jours suivant les crises (Parente *et al*, 2017; Syvänen *et al*, 2012). Cette diminution serait liée à l'internalisation des récepteurs GABA-A (Goodkin *et al*, 2008; Naylor *et al*, 2005). Nous avons constaté une diminution du  $BP_{ND}$  du <sup>11</sup>C-flumazenil d'environ 30% seulement 10 min après la période de survenue des convulsions observées chez les animaux éveillés. De plus, les animaux étaient anesthésiés par isoflurane qui possède des propriétés anti-convulsivantes (Bar-Klein *et al*, 2016; Fukuda *et al*, 1996). Enfin, la diminution du  $BP_{ND}$  du <sup>11</sup>C-flumazenil dans notre étude était dose dépendante ; la plus faible dose n'étant pas connue pour induire des convulsions (Potschka *et al*, 2000).

Compte tenu de ces éléments, il est très peu probable que la diminution observée du  $BP_{ND}$  soit une conséquence des convulsions induites par le tramadol (Lagard *et al*, 2016).

Nous avons ensuite montré que la diminution du  $BP_{ND}$  du  $^{11}\text{C}$ -flumazénil observée n'était pas liée à un mécanisme compétitif entre le tramadol et le site de fixation des benzodiazépines. En effet, l'administration de fortes doses de tramadol n'a pas modifié la cinétique cérébrale du  $^{11}\text{C}$ -flumazénil et ce, quelle que soit la région. Les récepteurs GABA-A ont pour particularité d'être la cible de plusieurs molécules. On distingue aujourd'hui 5 sites de fixation : les sites de fixation du GABA, des benzodiazépines (et du flumazénil), de la picrotoxine, des anesthésiques généraux et de l'alcool (Olsen, 2018). Les molécules se liant aux récepteurs GABA-A, quel que soit le site, et qui entraînent l'ouverture du canal chlore sont appelées « modulateur allostérique positif », typiquement le GABA. Celles, qui à l'inverse, entraînent sa fermeture sont appelées « modulateur allostérique négatif » comme la picrotoxine. Celles n'entraînant aucun changement dans l'ouverture du canal sont appelées « modulateur allostérique nul » (Olsen, 2018). Par conséquent à partir de ces définitions, on peut envisager que le tramadol soit un modulateur allostérique nul des récepteurs GABA-A à dose antalgique chez le rat. En revanche, il devient modulateur allostérique négatif à forte dose. Une dérégulation excitatrice via le glutamate pourrait aussi être évoquée comme mécanisme de ces convulsions. Néanmoins, le tramadol et son métabolite M1 ont une action inhibitrice sur les récepteurs NMDA (Hara *et al*, 2005). Leurs effets sur les autres récepteurs glutamatergiques (alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate (AMPA) et kainate) restent à démontrer.

Notre étude par imagerie TEP ne permet pas cependant de définir le mécanisme précis par lequel le tramadol interagit avec le récepteur GABA-A. Nos données suggèrent qu'il ne s'agit pas d'une compétition directe sur le site de liaison des benzodiazépines du récepteur GABA-A puisque le  $^{11}\text{C}$ -flumazénil n'a pas été déplacé par des doses croissantes de tramadol i.v. Par ailleurs, le tramadol est fortement métabolisé et nous ne pouvons conclure sur la contribution intrinsèque du tramadol ou de ses métabolites aux effets convulsivants du traitement. Les données pharmacocinétiques/pharmacodynamiques publiées chez le rat montrent qu'il est peu probable que les métabolites M1, M3, M4 et M5 soient impliqués (Lagard *et al*, 2016). En revanche, le rôle de M2 reste inconnu dans la survenue des convulsions observées au cours des intoxications par tramadol. Des études complémentaires étudiant plus spécifiquement le rôle de M2 sont nécessaires.

Les conséquences cliniques de nos résultats sont directement transposables à la pratique clinique. L'administration de benzodiazépines en prétraitement pourrait prévenir la survenue de convulsions chez le patient asymptomatique adressé aux urgences ; les convulsions surviennent le plus souvent précocement et la majorité des benzodiazépines ayant une demi-vie d'élimination longue. Néanmoins, dans ce contexte, l'administration concomitante de naloxone serait à discuter pour empêcher la survenue/aggravation de la dépression respiratoire induite par le tramadol (Lagard *et al*, 2018).

Ainsi, nos données suggèrent qu'une administration de benzodiazépine pour la prise en charge des convulsions induites par le tramadol ne constitue pas seulement un traitement symptomatique, visant à diminuer de manière non-spécifique les convulsions, mais un traitement ciblé qui pourrait agir directement sur les déterminants moléculaires à l'origine des convulsions. Cette hypothèse nécessite cependant de plus amples travaux *in vitro* et *in vivo* afin d'être vérifiée.

## Intégration de l'imagerie TEP dans une approche multimodale de l'étude des mécanismes de toxicité des opioïdes

L'utilisation de l'imagerie TEP pour l'étude des mécanismes des intoxications aiguës est une des originalités de ce travail. Nos travaux suggèrent que l'imagerie TEP bénéficie d'avantages lui permettant de contribuer de façon très significative à l'arsenal des outils *in vivo* et peu invasifs avec lequel nous avons étudié les mécanismes de toxicité des opioïdes. Associée à des données pharmacodynamiques, qui restent indispensables à son interprétation et à la pertinence des informations recueillies, l'imagerie TEP permet de renouveler le concept de relation pharmacocinétique/pharmacodynamique en étudiant l'interaction des molécules étudiées au niveau tissulaire *in vivo*. Ces nouvelles données complètent ainsi les études pharmacocinétiques qui sont limitées au seul compartiment sanguin et/ou à l'étude d'organes *ex vivo*. Nous aurions pu raffiner affiner notre approche méthodologique en couplant les mesures pharmacodynamiques avec l'imagerie TEP comme ceci a déjà été réalisé en imagerie fonctionnelle couplant l'IRM fonctionnelle et l'électroencéphalogramme (Gozzi *et al*, 2011). Néanmoins, la procédure expérimentale aurait été rendue plus lourde par la nécessité de trachéotomiser les animaux pour les curariser et s'affranchir des effets des anesthésiques. A cela s'ajoutait le fait que les techniques de mesures pharmacodynamiques et d'imagerie moléculaire étaient situées sur deux sites différents.

La  $^{11}\text{C}$ -buprénorphine est un radiotracer initialement développé pour l'imagerie cérébrale des récepteurs opioïdes. La  $^{11}\text{C}$ -buprénorphine, pourtant synthétisée dès 1987 (Luthra *et al*, 1987), n'avait jusqu'alors été utilisée que dans deux études anciennes chez le singe (Galynker *et al*, 1996; Shiue *et al*, 1991). Notre étude est la première chez le rongeur ; nous avons déterminé pour cette espèce une région de référence, le cervelet, pour une modélisation à partir de modèles non-compartmentaux. Néanmoins la non-spécificité de la  $^{11}\text{C}$ -buprénorphine pour un récepteur opioïde et, en particulier, son faible déplacement par la naloxone et sa lente dissociation du récepteur  $\mu$  n'en font pas un radiotracer de choix pour l'étude des récepteurs opioïdes (Cowan *et al*, 1977; Yassen *et al*, 2007). Pour l'imagerie des récepteurs  $\mu$ , le radiotracer le plus utilisé reste le  $^{11}\text{C}$ -carfentanil qui a pour avantage d'être facilement déplacé par la naloxone et d'avoir une dissociation rapide du récepteur  $\mu$  (Lever, 2007). En revanche, compte tenu du regain d'intérêt pour la buprénorphine dans le traitement



des troubles de l'usage des opioïdes et de la douleur, l'utilisation de l'imagerie utilisant la  $^{11}\text{C}$ -buprénorphine est prometteuse tant pour étudier finement sa neuropharmacologie que pour étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'addiction.

L'imagerie moléculaire utilisant la TEP a néanmoins des limites structurelles et expérimentales. Les limites structurelles sont représentées par le coût, le nombre de personnes impliquées pour chaque expérimentation (au moins une dizaine) et la période courte des traceurs marqués au carbone-11. L'anesthésie représente également un biais expérimental important. Celle-ci est cependant nécessaire à la réalisation d'acquisitions TEP chez le rongeur mais empêche *in fine* de reproduire les conditions expérimentales utilisées dans les études pharmacodynamiques. Par exemple, il a été montré que l'isoflurane diminue la captation cérébrale du  $^{18}\text{F}$ FDG, soit par un effet propre de l'isoflurane soit parce que l'animal est endormi et que son métabolisme cérébral est diminué (Spangler-Bickell *et al*, 2016). Néanmoins, l'anesthésie peut être également un atout. En effet, dans notre première étude, l'utilisation de l'anesthésie a permis de décrire les phénomènes intrinsèques observés suite à l'administration des différentes drogues, en s'affranchissant des modifications de captation du  $^{18}\text{F}$ FDG qu'aurait pu induire une augmentation de l'activité locomotrice. C'est pour cela qu'une acquisition dynamique a été préférée à une acquisition statique, réalisée plusieurs minutes après l'administration des drogues. L'autre limite expérimentale est liée à la modélisation des paramètres cinétiques chez le rongeur. Notre première étude met en exergue la variabilité observée en utilisant des données dérivées de l'image (ici la fonction d'entrée pour l'estimation du MRGlu) par rapport à des paramètres moins informatifs mais moins variables (captation relative du FDG par rapport au cerveau entier) ne nécessitant pas de données de cinétique sanguine. A ce titre, le développement de radiotraceurs permettant l'utilisation d'une région de référence pour la modélisation de paramètres réceptologiques doit être encouragé, tout en prenant soin de s'affranchir d'une interaction pharmacocinétique périphérique.

Enfin, l'autre avantage de l'imagerie TEP est d'être transposable à des études chez le primate et chez l'Homme pour vérifier les hypothèses précliniques. Le  $^{11}\text{C}$ -flumazenil est un radiopharmaceutique largement utilisé chez l'Homme. Nos résultats suggèrent la pertinence d'une étude clinique utilisant le  $^{11}\text{C}$ -flumazenil pour mettre en évidence l'effet du tramadol, à dose antalgique, sur le système GABAergique chez l'Homme. Une étude avec la  $^{11}\text{C}$ -

buprénorphine similaire à celle réalisée chez le rat est en cours de finalisation chez le babouin. Une étude pour étudier la pharmacologie humaine de la  $^{11}\text{C}$ -buprénorphine chez le volontaire sain est actuellement en cours au SHFJ. En revanche, nos résultats, chez le rongeur, ne nous encouragent pas à promouvoir une étude étudiant l'effet de l'administration aigue de benzodiazépine sur la fixation cérébrale de  $^{11}\text{C}$ -buprénorphine chez l'Homme.

## Conclusion

Ce travail nous a permis de mieux comprendre les mécanismes de toxicité de la buprénorphine et du tramadol. Ces deux toxicités montrent une implication forte du système GABAergique dans la toxicité de ces molécules. Nous avons montré que la combinaison des effets pharmacodynamiques liés à l'activation des récepteurs opioïdes  $\mu$  par la buprénorphine et GABA-A par les benzodiazépines entraînait la survenue d'une dépression respiratoire. Nous avons également montré que l'interaction dose-dépendante du tramadol avec le récepteur GABA-A pourrait être impliquée dans les convulsions observées au cours des intoxications par le tramadol. L'une des originalités de ce travail de thèse a été l'association de techniques d'imagerie moléculaire à des approches plus communément utilisées dans les laboratoires de toxicologie. Nos résultats montrent l'intérêt d'approches multimodales pour la résolution de problématiques d'intérêt en toxicologie. Notre travail, utilisant principalement des outils *in vivo* non ou peu invasifs suggère qu'il est possible de mettre en place des projets de recherche translationnelle permettant, à terme, d'élucider les mécanismes à l'origine des effets toxiques de la buprénorphine et du tramadol, et d'améliorer leur prise en charge par des approches plus ciblées d'un point de vue moléculaire.

## Bibliographie

---

- Ahmadimanesh M, Shadnia S, Rouini MR, Sheikholeslami B, Ahsani Nasab S, Ghazi-Khansari M (2018). Correlation between plasma concentrations of tramadol and its metabolites and the incidence of seizure in tramadol-intoxicated patients. *Drug Metabolism and Personalized Therapy* **33**: 75–83.
- Alberto G, Erickson T, Popiel R, Narayanan M, Hryhorczuk D (1989). Central nervous system manifestations of a valproic acid overdose responsive to naloxone. *Ann Emerg Med* **18**: 889–891.
- Alexander SP, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, Faccenda E, Harding SD, *et al* (2017). The concise guide to pharmacology 2017/18: Overview. *Br J Pharmacol* **174**: S1–S16.
- Alhaddad H, Cisternino S, Declèves X, Tournier N, Schlatter J, Chiadmi F, *et al* (2012). Respiratory toxicity of buprenorphine results from the blockage of P-glycoprotein-mediated efflux of norbuprenorphine at the blood–brain barrier in mice. *Crit Care Med* **40**: 3215–3223.
- Alhaddad H, Cisternino S, Saubamea B, Schlatter J, Chiadmi F, Risède P, *et al* (2013). Gender and strain contributions to the variability of buprenorphine-related respiratory toxicity in mice. *Toxicology* **305**: 99–108.
- Alinejad S, Kazemi T, Zamani N, Hoffman RS, Mehrpour O (2015). A systematic review of the cardiotoxicity of methadone. *EXCLI J* **14**: 577–600.
- American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)*.
- Anderson TM, Garcia AJ, Baertsch NA, Pollak J, Bloom JC, Wei AD, *et al* (2016). A novel excitatory network for the control of breathing. *Nature* **536**: 76–80.
- Anoush M, Mohammad Khani MR (2015). Evaluating the Anti-nociceptive and Anti-inflammatory Effects of Ketotifen and Fexofenadine in Rats. *Adv Pharm Bull* **5**: 217–222.
- ANSM (2018a). Décès Toxiques par Antalgiques Résultats 2016. ANSM at <<http://ansm.sante.fr>>.
- ANSM (2018b). Décès en Relation avec l'Abus de Médicaments Et de Substances Principaux résultats enquête DRAMES 2016. ANSM at <<http://ansm.sante.fr>>.
- Atkinson TJ, Fudin J (2017). Opioids and Related Medications. *Urological and Gynaecological Chronic Pelvic Pain* **10**: 165–190.
- Baldo BA (2018). Opioid analgesic drugs and serotonin toxicity (syndrome): mechanisms, animal models, and links to clinical effects. *Arch Toxicol* **92**: 2457–2473.
- Baldo BA, Pham NH (2012). Histamine-releasing and allergenic properties of opioid analgesic drugs: resolving the two. *Anaesth Intensive Care* **40**: 216–235.
- Ballanyi K, Panaitescu B, Ruangkittisakul A (2010). Indirect opioid actions on inspiratory pre-Bötzinger complex neurons in newborn rat brainstem slices. *Adv Exp Med Biol* **669**: 75–79.
- Bameri B, Shaki F, Ahangar N, Ataei R, Samadi M, Mohammadi H (2018). Evidence for the Involvement of the Dopaminergic System in Seizure and Oxidative Damage Induced by Tramadol. *Int J Toxicol* **37**: 164–170.
- Bar-Klein G, Klee R, Brandt C, Bankstahl M, Bascuñana P, Töllner K, *et al* (2016). Isoflurane prevents acquired epilepsy in rat models of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* **80**: 896–908.
- Barkin RL, Barkin SJ, Barkin DS (2006). Propoxyphene (Dextropropoxyphene): A Critical Review of a Weak Opioid Analgesic That Should Remain in Antiquity. *Am J Ther* **13**: 534–542.

- Barreau M, Chenaf C, Kabore J, Delorme J, Riquelme-Arbre M, Eschalier A, *et al* (2017). Pharmacoépidémiologie de l'usage des antalgiques opioïdes en France. *La lettre du pharmacologue* **31**: 110–112.
- Bartlett D, Tenney SM (1970). Control of breathing in experimental anemia. *Respiration Physiology* **10**: 384–395.
- Basmajian JV, De Luca CJ (Williams & Wilkins Co : Baltimore, 1985). *Muscles alive: Their functions revealed by electromyography*.
- Beaune S, Callebert J, Baud FJ, Risède P, Juvin P, Megarbane B (2012). Mechanisms of high-dose citalopram-induced death in a rat model. *Toxicology* **302**: 248–254.
- Bell JR, Butler B, Lawrance A, Batey R, Salmelainen P (2009). Comparing overdose mortality associated with methadone and buprenorphine treatment. *Drug Alcohol Depend* **104**: 73–77.
- Berkowitz BA (1976). The relationship of pharmacokinetics to pharmacological activity: morphine, methadone and naloxone. *Clin-Pharmacokinet* **1**: 219–230.
- Berridge V (1978). Opium eating and the working class in the nineteenth century: the public and official reaction. *Br J Addict Alcohol Other Drugs* **73**: 107–112.
- Birnbaum HG, White AG, Schiller M, Waldman T, Cleveland JM, Roland CL (2011). Societal costs of prescription opioid abuse, dependence, and misuse in the United States. *Pain Med* **12**: 657–667.
- Borron SW, Monier C, Risède P, Baud FJ (2002). Flunitrazepam variably alters morphine, buprenorphine, and methadone lethality in the rat. *Hum Exp Toxicol* **21**: 599–605.
- Boumendjel A, Taiwe GS, Bum EN, Chabrol T, Beney C, Sinniger V, *et al* (2013). Occurrence of the Synthetic Analgesic Tramadol in an African Medicinal Plant. *Angewandte Chemie International Edition* **52**: 11780–11784.
- Boyer EW (2012). Management of Opioid Analgesic Overdose. *N Engl J Med* **367**: 146–155.
- Boyer EW, Shannon M (2005). The serotonin syndrome. *N Engl J Med* **352**: 1112–1120.
- Bozzi Y, Borrelli E (2013). The role of dopamine signaling in epileptogenesis. *Front Cell Neurosci* **7**: 157.
- Brownstein MJ (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *PNAS* **90**: 5391–5393.
- Bruera E (2018). Parenteral Opioid Shortage - Treating Pain during the Opioid-Overdose Epidemic. *N Engl J Med* **379**: 601–603.
- Brun-Pascaud M, Gaudebout C, Blayo MC, Pocidalo JJ (1982). Arterial blood gases and acid-base status in awake rats. *Respiration Physiology* **48**: 45–57.
- Cai Q, Qiu C-Y, Qiu F, Liu T-T, Qu Z-W, Liu Y-M, *et al* (2014). Morphine inhibits acid-sensing ion channel currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* **1554**: 12–20.
- Campbell C, Weinger MB, Quinn M (1995). Alterations in diaphragm EMG activity during opiate-induced respiratory depression. *Respiration Physiology* **100**: 107–117.
- Campbell JN (1996). APS 1995 Presidential address. *Pain Forum* **5**: 85–88.
- Casati A, Sedefov R, Pfeiffer-Gerschel T (2012). Misuse of Medicines in the European Union: A Systematic Review of the Literature. *Eur Addict Res* **18**: 228–245.
- Cassier V (2014). Étude rétrospective des intoxications aiguës au tramadol 2007-2013 à partir des données du centre antipoison et de toxicovigilance de Bordeaux : impact du retrait du dextropropoxyphène.

- Castillo R, Kissin I, Bradley EL (1986). Selective kappa opioid agonist for spinal analgesia without the risk of respiratory depression. *Anesthesia & Analgesia* **65**: 350–354.
- Chevillard L, Megarbane B, Risède P, Baud FJ (2009). Characteristics and comparative severity of respiratory response to toxic doses of fentanyl, methadone, morphine, and buprenorphine in rats. *Toxicol Lett* **191**: 327–340.
- Chossegros P (2007). Prise en charge de la toxicomanie en France (une histoire). *Gastroentérologie Clinique et Biologique* **31**: 44–50.
- Cicero TJ, Ellis MS, Surratt HL (2012). Effect of Abuse-Deterrent Formulation of OxyContin. *N Engl J Med* **367**: 187–189.
- Clark RF, Wei EM, Anderson PO (1995). Meperidine: therapeutic use and toxicity. *J Emerg Med* **13**: 797–802.
- Clasadonte J, Scemes E, Wang Z, Boison D, Haydon PG (2017). Connexin 43-Mediated Astroglial Metabolic Networks Contribute to the Regulation of the Sleep-Wake Cycle. *Neuron* **95**: 1365–1380.e5.
- Cohier C, Chevillard L, Risède P, Roussel O, Megarbane B (2014). Respiratory effects of buprenorphine/naloxone alone and in combination with diazepam in naive and tolerant rats. *Toxicol Lett* **228**: 75–84.
- Cowan A, Lewis JW, Macfarlane IR (1977). Agonist and antagonist properties of buprenorphine, a new antinociceptive agent. *Br J Pharmacol* **60**: 537–545.
- Çoruh B, Tonelli MR, Park DR (2013). Fentanyl-induced chest wall rigidity. *Chest* **143**: 1145–1146.
- Dahan A (2007). Respiratory depression with opioids. *J Pain Palliat Care Pharmacother* **21**: 63–66.
- Dahan A, Yassen A, Bijl H, Romberg R, Sarton E, Teppema L, *et al* (2005). Comparison of the respiratory effects of intravenous buprenorphine and fentanyl in humans and rats. *Br J Anaesth* **94**: 825–834.
- Daube JR, Rubin DI (2009). Needle electromyography. *Muscle Nerve* **39**: 244–270.
- Davis MP, Varga J, Dickerson D, Walsh D, LeGrand SB, Lagman R (2003). Normal-release and controlled-release oxycodone: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and controversy. *Support Care Cancer* **11**: 84–92.
- Debruyne D, Quentin T, Poisnel G, Lelong-Boulouard V, Barre L, Coquerel A (2005). Acute and chronic administration of clorazepate modifies the cell surface regulation of mu opioid receptors induced by buprenorphine in specific regions of the rat brain. *Brain Res* **1052**: 222–231.
- Del Negro CA, Funk GD, Feldman JL (2018). Breathing matters. *Nat Rev Neurosci* **19**: 351–367.
- Dole VP, Nyswander ME (1967). Heroin addiction—a metabolic disease. *Arch Intern Med* **120**: 19–24.
- Dosaka-Akita K, Tortella FC, Holaday JW, Long JB (1993). The kappa opioid agonist U-50,488H antagonizes respiratory effects of mu opioid receptor agonists in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther* **264**: 631–637.
- Duchêne A, Perier M, Zhao Y, Liu X, Thomasson J, Chauveau F, *et al* (2016). Impact of Astroglial Connexins on Modafinil Pharmacological Properties. *Sleep* **39**: 1283–1292.
- Dutschmann M, Herbert H (2006). The Kölliker-Fuse nucleus gates the postinspiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat. *European Journal of Neuroscience* **24**: 1071–1084.
- Dutschmann M, Jones SE, Subramanian HH, Stanic D, Bautista TG (2014). The physiological significance of postinspiration in respiratory control. *Prog Brain Res* **212**: 113–130.
- Ehsan Z, Mahmoud M, Shott SR, Amin RS, Ishman SL (2015). The effects of Anesthesia and opioids on the upper airway: A systematic review. *The Laryngoscope* **126**: 270–284.

- Eizadi-Mood N, Ozcan D, Sabzghabae AM, Mirmoghtadaee P, Hedaiaty M (2014). Does naloxone prevent seizure in tramadol intoxicated patients? *Int J Prev Med* **5**: 302–307.
- EMCDDA (2017). *European Drug Report 2017: Trends and Developments*. at [www.emcdda.europa.eu](http://www.emcdda.europa.eu)
- Endres-Becker J, Heppenstall PA, Mousa SA, Labuz D, Oksche A, Schafer M, *et al* (2006). Mu-Opioid Receptor Activation Modulates Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Currents in Sensory Neurons in A Model of Inflammatory Pain. *Molecular Pharmacology* **71**: 12–18.
- Farzaneh E, Mostafazadeh B, Mehrpour O (2012). Seizurogenic effects of low-dose naloxone in tramadol overdose. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* **11**: 6–9.
- Fat-Chun Tony Chang, Harper RM (1989). A procedure for chronic recording of diaphragmatic electromyographic activity. *Brain Res Bull* **22**: 561–563.
- Ferrari R, Capraro M, Visenti M (2012). Risk factors in opioid treatment of chronic non-cancer pain: a multidisciplinary assessment. *Pain management* doi:10.5772/29818.
- Fishman J, Roffwarg H, Hellman L (1973). Disposition of naloxone-7,8,3H in normal and narcotic-dependent men. *J Pharmacol Exp Ther* **187**: 575–580.
- Florence CS, Zhou C, Luo F, Xu L (2016). The Economic Burden of Prescription Opioid Overdose, Abuse, and Dependence in the United States, 2013. *Med Care* **54**: 901–906.
- Franco-Pérez J, Ballesteros-Zebadúa P, Fernández-Figueroa EA, Ruiz-Olmedo I, Reyes-Grajeda P, Paz C (2012). Sleep deprivation and sleep recovery modifies connexin36 and connexin43 protein levels in rat brain. *Neuroreport* **23**: 103–107.
- Franco-Pérez J, Paz C (2009). Quinine, a selective gap junction blocker, decreases REM sleep in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **94**: 250–254.
- Fujimoto Y, Funao T, Suehiro K, Takahashi R, Mori T, Nishikawa K (2015). Brain serotonin content regulates the manifestation of tramadol-induced seizures in rats: disparity between tramadol-induced seizure and serotonin syndrome. *Anesthesiology* **122**: 178–189.
- Fukuda H, Hirabayashi Y, Shimizu R, Saitoh K, Mitsuhashi H (1996). Sevoflurane Is Equivalent to Isoflurane for Attenuating Bupivacaine-Induced Arrhythmias and Seizures in Rats. *Anesthesia & Analgesia* **83**: 570–573.
- Galynker I, Schlyer DJ, Dewey SL, Fowler JS, Logan J, Gatley SJ, *et al* (1996). Opioid receptor imaging and displacement studies with [6-O-[11C] methyl]buprenorphine in baboon brain. *Nuclear Medicine and Biology* **23**: 325–331.
- Gatignol C (2009). [Opiate replacement therapy in France]. *Ann Pharm Fr* **67**: 360–364.
- Gillen C, Haurand M, Kobelt DJ, Wnendt S (2000). Affinity, potency and efficacy of tramadol and its metabolites at the cloned human mu-opioid receptor. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* **362**: 116–121.
- Giraudon I, Mathis F, K P (2016). Tramadol- related deaths2016 overview. at [www.emcdda.europa.eu](http://www.emcdda.europa.eu)
- Giyanwani PR, Zubair U, Salam O, Zubair Z (2017). Respiratory Failure Following Organophosphate Poisoning: A Literature Review. *Cureus* **9**: e1651.
- Gold MS, Levine JD (1996). DAMGO inhibits prostaglandin E2-induced potentiation of a TTX-resistant Na<sup>+</sup> current in rat sensory neurons in vitro. *Neurosci Lett* **212**: 83–86.
- Gong L, Stamer UM, Tzvetkov MV, Altman RB, Klein TE (2014). PharmGKB summary: tramadol pathway. *Pharmacogenet Genomics* **24**: 374–380.
- Goodkin HP, Joshi S, Mtchedlishvili Z, Brar J, Kapur J (2008). Subunit-Specific Trafficking of GABA subtype Receptors during Status Epilepticus. *J Neurosci* **28**: 2527–2538.

- Gozzi A, Colavito V, Seke Etet PF, Montanari D, Fiorini S, Tambalo S, *et al* (2011). Modulation of fronto-cortical activity by modafinil: a functional imaging and fos study in the rat. *Neuropsychopharmacology* **37**: 822–837.
- Gray PA, Rekling JC, Bocchiaro CM, Feldman JL (1999). Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBötzing complex. *Science* **286**: 1566–1568.
- Grond S, Sablotzki A (2004). Clinical pharmacology of tramadol. *Clin-Pharmacokinet* **43**: 879–923.
- Gueye PN, Borron SW, Risède P, Monier C, Buneaux F, Debray M, *et al* (2001). Lack of effect of single high doses of buprenorphine on arterial blood gases in the rat. *Toxicol Sci* **62**: 148–154.
- Gueye PN, Borron SW, Risède P, Monier C, Buneaux F, Debray M, *et al* (2002). Buprenorphine and midazolam act in combination to depress respiration in rats. *Toxicol Sci* **33**: 5454–5465.
- Gummin DD, Mowry JB, Spyker DA, Brooks DE, Fraser MO, Banner W (2017). 2016 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 34th Annual Report. *Clinical Toxicology* **55**: 1072–1254.
- Haglund E (1992). Effects of continuous naloxone infusion in intestinal ischemia shock in the rat. *Circ Shock* **38**: 195–201.
- Hajiha M, DuBord MA, Liu H, Horner RL (2009). Opioid receptor mechanisms at the hypoglossal motor pool and effects on tongue muscle activity in vivo. *The Journal of Physiology* **587**: 2677–2692.
- Hale ME, Fleischmann R, Salzman R, Wild J, Iwan T, Swanton RE, *et al* (1999). Efficacy and Safety of Controlled-Release Versus Immediate-Release Oxycodone: Randomized, Double-Blind Evaluation in Patients with Chronic Back Pain. *The Clinical Journal of Pain* **15**: 179.
- Hantson P, Bedry R (2006). Les antidotes. *Réanimation* **15**: 383–389.
- Hara K, Minami K, Sata T (2005). The effects of tramadol and its metabolite on glycine, gamma-aminobutyric acidA, and N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesthesia & Analgesia* **100**: 1400–5– table of contents.
- Hassamal S, Miotto K, Dale W, Danovitch I (2018). Tramadol: Understanding the Risk of Serotonin Syndrome and Seizures. *Am J Med* doi:10.1016/j.amjmed.2018.04.025.
- Hassanian-Moghaddam H, Rashidi B (2008). Mortality and complication associated with acute tramadol intoxication. *EAPCCT XXVIII International Congress*.
- Hemmings HC, Egan TD (Snauders: 2013). *Pharmacology and Physiology for Anesthesia E-Book: Foundations and Clinical Application*. doi:10.1016/C2009-0-41712-4.
- Hider-Mlynarz K, Cavalié P, Maison P (2018). Trends in analgesic consumption in France over the last 10 years and comparison of patterns across Europe. *British Journal of Clinical Pharmacology* **84**: 1324–1334.
- Hoffman JR, Schriger DL, Luo JS (1991). The empiric use of naloxone in patients with altered mental status: a reappraisal. *Ann Emerg Med* **20**: 246–252.
- Hoffman RS (2000). Is methadone a miracle cure or an alternative evil? *West J Med* **172**: 15–16.
- Hoffman RS, Goldfrank LR (1995). The poisoned patient with altered consciousness. Controversies in the use of a 'coma cocktail'. *JAMA* **274**: 562–569.
- Hoffmann VLH, Vermeyen KM, Adriaensen HF, Meert TF (2003). Effects of NMDA receptor antagonists on opioid-induced respiratory depression and acute antinociception in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **74**: 933–941.
- Holland MJ, Carr KD, Simon EJ (1989). Pharmacokinetics of [3H]-buprenorphine in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **64**: 3–16.



- Högberg T (1993). The development of dopamine D2-receptor selective antagonists. *Drug Des Discov* **9**: 333–350.
- Hreiche R, Megarbane B, Pirnay S, Borron SW, Monier C, Risède P, *et al* (2006). Dexamethasone hepatic induction in rats subsequently treated with high dose buprenorphine does not lead to respiratory depression. *Toxicology and Applied Pharmacology* **217**: 352–362.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* **258**: 577–580.
- Imam MZ, Kuo A, Ghasabian S, Smith MT (2018). Progress in understanding mechanisms of opioid-induced gastrointestinal adverse effects and respiratory depression. *Neuropharmacology* **131**: 238–255.
- Improta G, Broccardo M (1994). Effect of selective mu 1, mu 2 and delta 2 opioid receptor agonists on gastric functions in the rat. *Neuropharmacology* **33**: 977–981.
- INCB (2015). *Annual report of the International Narcotics Control Board for 2015*. at < [www.incb.org](http://www.incb.org).
- Ingram SL, Williams JT (1994). Opioid inhibition of Ih via adenylyl cyclase. *Neuron* **13**: 179–186.
- Jewett DM (1992). A simple synthesis of [11C]methyl triflate. *Int J Rad Appl Instrum A* **43**: 1383–1385.
- Jones JD, Mogali S, Comer SD (2012). Polydrug abuse: a review of opioid and benzodiazepine combination use. *Drug Alcohol Depend* **125**: 8–18.
- Jovanović-Cupić V, Martinović Z, Nesić N (2006). Seizures associated with intoxication and abuse of tramadol. *Clinical Toxicology* **44**: 143–146.
- Kalyuzhny AE, Dooyema J, Wessendorf MW (2000). Opioid- and GABA(A)-receptors are co-expressed by neurons in rat brain. *Neuroreport* **11**: 2625–2628.
- Katritch V, Cherezov V, Stevens RC (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**: 531–556.
- Kaufling J, Freund-Mercier M-J, Barrot M (2016). [Impact of opiates on dopaminergic neurons]. *Med Sci (Paris)* **32**: 619–624.
- Kema IP, Schellings AM, Hoppenbrouwers CJ, Rutgers HM, de Vries EG, Muskiet FA (1993). High performance liquid chromatographic profiling of tryptophan and related indoles in body fluids and tissues of carcinoid patients. *Clin Chim Acta* **221**: 143–158.
- Kilicarslan T, Sellers EM (2000). Lack of Interaction of Buprenorphine With Flunitrazepam Metabolism. *Am J Psychiatry* **157**: 1164–1166.
- Kreek MJ, Vocci FJ (2002). History and current status of opioid maintenance treatments: blending conference session. *Journal of Substance Abuse Treatment* **23**: 93–105.
- Kritikos P, Papadaki S (1967). The history of the poppy and of opium and their expansion in antiquity in the eastern Mediterranean area. *Bulletin of narcotics* **19**: 17–38.
- Kuo A, Wyse BD, Meutermans W, Smith MT (2015). In vivo profiling of seven common opioids for antinociception, constipation and respiratory depression: no two opioids have the same profile. *Br J Pharmacol* **172**: 532–548.
- Kusari S, Tatsimo SJN, Zühlke S, Talontsi FM, Kouam SF, Spitteller M (2014). Tramadol--a true natural product? *Angewandte Chemie International Edition* **53**: 12073–12076.
- Lagard C, Chevillard L, Malissin I, Risède P, Callebert J, Labat L, *et al* (2016). Mechanisms of tramadol-related neurotoxicity in the rat: Does diazepam/tramadol combination play a worsening role in overdose? *Toxicology and Applied Pharmacology* **310**: 108–119.

- Lagard C, Malissin I, Indja W, Risède P, Chevillard L, Megarbane B (2018). Is naloxone the best antidote to reverse tramadol-induced neuro-respiratory toxicity in overdose? An experimental investigation in the rat. *Clin Toxicol (Phila)* **56**: 737–743.
- Lalley PM (2005). D1-dopamine receptor agonists prevent and reverse opiate depression of breathing but not antinociception in the cat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**: R45–51.
- Lalley PM (2008). Opioidergic and dopaminergic modulation of respiration. *Respiratory physiology & neurobiology* **164**: 160–167.
- Lammertsma AA, Hume SP (1996). Simplified reference tissue model for PET receptor studies. *NeuroImage* **4**: 153–158.
- Lanz B, Poitry-Yamate C, Gruetter R (2014). Image-Derived Input Function from the Vena Cava for 18F-FDG PET Studies in Rats and Mice. *J Nucl Med* **55**: 1380–1388.
- Law P-Y, Reggio PH, Loh HH (2013). Opioid receptors: toward separation of analgesic from undesirable effects. *Trends in Biochemical Sciences* **38**: 275–282.
- Lee M, Silverman SM, Hansen H, Patel VB, Manchikanti L (2011). A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. *Pain Physician* **14**: 145–161.
- Leung PTM, Macdonald EM, Stanbrook MB, Dhalla IA, Juurlink DN (2017). A 1980 Letter on the Risk of Opioid Addiction. *N Engl J Med* **376**: 2194–2195.
- Levac BAR, O'Dowd BF, George SR (2002). Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units. *Curr Opin Pharmacol* **2**: 76–81.
- Lever JR (2007). PET and SPECT imaging of the opioid system: receptors, radioligands and avenues for drug discovery and development. *CPD* **13**: 33–49.
- Levitt ES, Abdala AP, Paton JFR, Bissonnette JM, Williams JT (2015).  $\mu$  opioid receptor activation hyperpolarizes respiratory-controlling Kölliker–Fuse neurons and suppresses post-inspiratory drive. *The Journal of Physiology* **593**: 4453–4469.
- Levy N, Sturgess J, Mills P (2018). "Pain as the fifth vital sign" and dependence on the "numerical pain scale" is being abandoned in the US: Why? *Br J Anaesth* **120**: 435–438.
- Liefaard LC, Ploeger BA, Molthoff CFM, De Jong HWAM, Dijkstra J, Van Der Weerd L, *et al* (2009). Changes in GABAA receptor properties in amygdala kindled animals: In vivo studies using [11C]flumazenil and positron emission tomography. *Epilepsia* **50**: 88–98.
- Ling GS, Spiegel K, Lockhart SH, Pasternak GW (1985). Separation of opioid analgesia from respiratory depression: evidence for different receptor mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* **232**: 149–155.
- Lorier AR, Funk GD, Greer JJ (2010). Opiate-induced suppression of rat hypoglossal motoneuron activity and its reversal by ampakine therapy. *PLOS ONE* **5**: e8766.
- Lu J, Chen M (2016). Glial Gap Junctions Boost Modafinil Action on Arousal. *Sleep* **39**: 1175–1177.
- Luthra SK, Pike VW, Brady F, Horlock PL, Prenant C, Couzel C (1987). Preparation of [11C]buprenorphine--a potential radioligand for the study of the opiate receptor system in vivo. *Int J Rad Appl Instrum A* **38**: 65–66.
- Lüscher C, Slesinger PA (2010). Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci* **11**: 301–315.
- Mandell BF (2016). The fifth vital sign: A complex story of politics and patient care. *Cleve Clin J Med* **83**: 400–401.

- Manzke T, Guenther U, Ponimaskin EG, Haller M, Dutschmann M, Schwarzacher S, *et al* (2003). 5-HT4(a) receptors avert opioid-induced breathing depression without loss of analgesia. *Science* **301**: 226–229.
- Marquardt KA, Alsop JA, Albertson TE (2005). Tramadol exposures reported to statewide poison control system. *Ann Pharmacother* **39**: 1039–1044.
- McCormick GY, White WJ, Zagon IS, Lang CM (1984). Effects of diazepam on arterial blood gas concentrations and pH of adult rats acutely and chronically exposed to methadone. *J Pharmacol Exp Ther* **230**: 353–359.
- McDonald R, Lorch U, Woodward J, Bosse B, Dooner H, Mundin G, *et al* (2017). Pharmacokinetics of concentrated naloxone nasal spray for opioid overdose reversal: Phase I healthy volunteer study. *Addiction* **113**: 484–493.
- Megarbane B, Buisine A, Jacobs F, Résière D, Chevillard L, Vicaut E, *et al* (2010). Prospective comparative assessment of buprenorphine overdose with heroin and methadone: clinical characteristics and response to antidotal treatment. *Journal of Substance Abuse Treatment* **38**: 403–407.
- Megarbane B, Hreiche R, Pirnay S, Marie N, Baud FJ (2006a). Does high-dose buprenorphine cause respiratory depression?: possible mechanisms and therapeutic consequences. *Toxicol Rev* **25**: 79–85.
- Megarbane B, Marie N, Pirnay S, Borron SW, Gueye PN, Risède P, *et al* (2006b). Buprenorphine is protective against the depressive effects of norbuprenorphine on ventilation. *Toxicology and Applied Pharmacology* **212**: 256–267.
- Megarbane B, Pirnay S, Borron SW, Trout H, Monier C, Risède P, *et al* (2005). Flunitrazepam does not alter cerebral distribution of buprenorphine in the rat. *Toxicol Lett* **157**: 211–219.
- Mellen NM, Janczewski WA, Bocchiaro CM, Feldman JL (2003). Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron* **37**: 821–826.
- Mendy C (2014). Tramadol IFPMA comments for the WHO expert committee on drug dependence. *World Health Organization* at <<http://www.who.int>>.
- Mégarbane B, Alhaddad H (2013). P-glycoprotein should be considered as an additional factor contributing to opioid-induced respiratory depression in paediatrics: the buprenorphine example. *Br J Anaesth* **110**: 842.
- Michaelis M, Schölkens B, Rudolphi K (2007). An anthology from Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* **375**: 81–84.
- Miller JR, Zuperku EJ, Stuth EAE, Banerjee A, Hopp FA, Stucke AG (2017). A Subregion of the Parabrachial Nucleus Partially Mediates Respiratory Rate Depression from Intravenous Remifentanyl in Young and Adult Rabbits. *Anesthesiology* **127**: 502–514.
- Minzenberg MJ, Carter CS (2008). Modafinil: a review of neurochemical actions and effects on cognition. *Neuropsychopharmacology* **33**: 1477–1502.
- Mitchell AA, Lovejoy FH Jr., Goldman P (1976). Drug ingestions associated with miosis in comatose children. *The Journal of Pediatrics* **89**: 303–305.
- Miyawaki T, Goodchild AK, Pilowsky PM (2002). Activation of mu-opioid receptors in rat ventrolateral medulla selectively blocks baroreceptor reflexes while activation of delta opioid receptors blocks somato-sympathetic reflexes. *Neuroscience* **109**: 133–144.
- Molliex S, Dureuil B, Montravers P, Desmonts JM (1993). Effects of midazolam on respiratory muscles in humans. *Anesthesia & Analgesia* **77**: 592–597.

- Montandon G, Qin W, Liu H, Ren J, Greer JJ, Horner RL (2011). PreBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons mediate opioid-induced respiratory depression. *J Neurosci* **31**: 1292–1301.
- Naylor DE, Liu H, Wasterlain CG (2005). Trafficking of GABA<sub>A</sub> Receptors, Loss of Inhibition, and a Mechanism for Pharmacoresistance in Status Epilepticus. *J Neurosci* **25**: 7724–7733.
- Nielsen S, Taylor DA (2005). The effect of buprenorphine and benzodiazepines on respiration in the rat. *Drug Alcohol Depend* **79**: 95–101.
- Nilsen E (2017). Why it's so much easier to get an opioid prescription in the US than in Europe or Japan. *Vox* at [www.vox.com](http://www.vox.com).
- O'Brien C (2011). Addiction and dependence in DSM-V. *Addiction* **106**: 866–867.
- O'Driscoll BR, Howard LS, Earis J, Mak V, British Thoracic Society Emergency Oxygen Guideline Group, BTS Emergency Oxygen Guideline Development Group (2017). BTS guideline for oxygen use in adults in healthcare and emergency settings. *Thorax* **72**: ii1–ii90.
- O'Malley GF, Seifert S, Heard K, Daly F, Dart RC (1999). Olanzapine overdose mimicking opioid intoxication. *Ann Emerg Med* **34**: 279–281.
- Ohtani M, Kotaki H, Nishitateno K, Sawada Y, Iga T (1997). Kinetics of respiratory depression in rats induced by buprenorphine and its metabolite, norbuprenorphine. *J Pharmacol Exp Ther* **281**: 428–433.
- Olsen RW (2018). GABAA receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology* **136**: 10–22.
- Paar WD, Frankus P, Dengler HJ (1992). The metabolism of tramadol by human liver microsomes. *Clin Invest* **70**: 708–710.
- Paar WD, Poche S, Gerloff J, Dengler HJ (1997). Polymorphic CYP2D6 mediates O-demethylation of the opioid analgesic tramadol. *Eur J Clin Pharmacol* **53**: 235–239.
- Pagliardini S, Janczewski WA, Tan W, Dickson CT, Deisseroth K, Feldman JL (2011). Active Expiration Induced by Excitation of Ventral Medulla in Adult Anesthetized Rats. *Journal of Neuroscience* **31**: 2895–2905.
- Parente A, V Ilez Garc a D, Shoji A, Lopes Alves I, Maas B, Zijlma R, *et al* (2017). Contribution of neuroinflammation to changes in [<sup>11</sup>C]flumazenil binding in the rat brain: Evaluation of the inflamed pons as reference tissue. *Nuclear Medicine and Biology* **49**: 50–56.
- Pathan H, Williams J (2012). Basic opioid pharmacology: an update. *British Journal of Pain* **6**: 11–16.
- Patlak CS, Blasberg RG, Fenstermacher JD (1983). Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. *J Cereb Blood Flow Metab* **3**: 1–7.
- Pert CB, Snyder SH (1973). Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* **179**: 1011–1014.
- Pirnay S, Borron SW, Giudicelli CP, Tourneau J, Baud FJ, Ricordel I (2004). A critical review of the causes of death among post-mortem toxicological investigations: analysis of 34 buprenorphine-associated and 35 methadone-associated deaths. *Addiction* **99**: 978–988.
- Pirnay S, Megarbane B, Declèves X, Risède P, Borron SW, Bouchonnet S, *et al* (2008a). Buprenorphine Alters Desmethylflunitrazepam Disposition and Flunitrazepam Toxicity in Rats. *Toxicol Sci* **106**: 64–73.
- Pirnay SO, Megarbane B, Borron SW, Risède P, Monier C, Ricordel I, *et al* (2008b). Effects of Various Combinations of Benzodiazepines with Buprenorphine on Arterial Blood Gases in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **103**: 228–239.

- Poisnel G, Dhilly M, Le Boisselier R, Barre L, Debruyne D (2009). Comparison of five benzodiazepine-receptor agonists on buprenorphine-induced mu-opioid receptor regulation. *J Pharmacol Sci* **110**: 36–46.
- Pond SM, Tozer TN (1984). First-pass elimination. Basic concepts and clinical consequences. *Clin-Pharmacokinet* **9**: 1–25.
- Ponté C, Lepelley M, Boucherie Q, Mallaret M, Lapeyre Mestre M, Pradel V, *et al* (2018). Doctor shopping of opioid analgesics relative to benzodiazepines: A pharmacoepidemiological study among 11.7 million inhabitants in the French countries. *Drug Alcohol Depend* **187**: 88–94.
- Porter J, Jick H (1980). Addiction Rare in Patients Treated with Narcotics. **302**: 123–123.
- Potschka H, Friderichs E, Löscher W (2000). Anticonvulsant and proconvulsant effects of tramadol, its enantiomers and its M1 metabolite in the rat kindling model of epilepsy. *Br J Pharmacol* **131**: 203–212.
- Prkic I, Mustapic S, Radocaj T, Stucke AG, Stuth EAE, Hopp FA, *et al* (2012). Pontine  $\mu$ -opioid receptors mediate bradypnea caused by intravenous remifentanyl infusions at clinically relevant concentrations in dogs. *J Neurophysiol* **108**: 2430–2441.
- Quinones MA (2009). Drug Abuse During the Civil War (1861–1865). *International Journal of the Addictions* **10**: 1007–1020.
- Racine RJ (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **32**: 269–279.
- Reeves RR, Burke RS (2008). Tramadol: basic pharmacology and emerging concepts. *Drugs Today* **44**: 827–836.
- Rehni AK, Singh I, Kumar M (2008). Tramadol-induced seizurogenic effect: a possible role of opioid-dependent gamma-aminobutyric acid inhibitory pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **103**: 262–266.
- Rehni AK, Singh TG, Singh N, Arora S (2010). Tramadol-induced seizurogenic effect: a possible role of opioid-dependent histamine H1 receptor activation-linked mechanism. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* **381**: 11–19.
- Rhodin A (2006). The rise of opiophobia: is history a barrier to prescribing? *J Pain Palliat Care Pharmacother* **20**: 31–32.
- Richter DW, Manzke T, Wilken B, Ponimaskin E (2003). Serotonin receptors: guardians of stable breathing. *Trends Mol Med* **9**: 542–548.
- Rigg JR, Rondi P (1981). Changes in rib cage and diaphragm contribution to ventilation after morphine. *Anesthesiology* **55**: 507–514.
- Roussin A, Bouyssi A, Pouché L, Pourcel L, Lapeyre Mestre M (2013). Misuse and Dependence on Non-Prescription Codeine Analgesics or Sedative H1 Antihistamines by Adults: A Cross-Sectional Investigation in France. *PLOS ONE* **8**: e76499.
- Rudd RA, Seth P, David F, Scholl L (2016). Increases in Drug and Opioid-Involved Overdose Deaths - United States, 2010-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **65**: 1445–1452.
- Ryan NM, Isbister GK (2015). Tramadol overdose causes seizures and respiratory depression but serotonin toxicity appears unlikely. *Clin Toxicol (Phila)* **53**: 545–550.
- Rzasa Lynn R, Galinkin JL (2018). Naloxone dosage for opioid reversal: current evidence and clinical implications. *Ther Adv Drug Saf* **9**: 63–88.
- Saidi H, Ghadiri M, Abbasi S, Ahmadi S-F (2010). Efficacy and safety of naloxone in the management of postseizure complaints of tramadol intoxicated patients: a self-controlled study. *Emerg Med J* **27**: 928–930.

- Sansone RA, Sansone LA (2009). Tramadol: seizures, serotonin syndrome, and coadministered antidepressants. *Psychiatry (Edgmont)* **6**: 17–21.
- Scammell TE (2015). Narcolepsy. *N Engl J Med* **373**: 2654–2662.
- Schep LJ, Knudsen K, Slaughter RJ, Vale JA, Megarbane B (2012). The clinical toxicology of gamma-hydroxybutyrate, gamma-butyrolactone and 1,4-butanediol. *Clinical Toxicology* **50**: 458–470.
- Schiffer WK, Mirrione MM, Biegon A, Alexoff DL, Patel V, Dewey SL (2006). Serial microPET measures of the metabolic reaction to a microdialysis probe implant. *Journal of Neuroscience Methods* **155**: 272–284.
- Scott CC, Chen KK (1946). The action of 1,1-diphenyl-1-(dimethylaminoisopropyl)-butanone-2, a potent analgesic agent. *Fed Proc* **5**: 201.
- Seth P (2018). Overdose Deaths Involving Opioids, Cocaine, and Psychostimulants — United States, 2015–2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **67**: 349–358.
- Shadnia S, Brent J, Mousavi-Fatemi K, Hafezi P, Soltaninejad K (2012). Recurrent seizures in tramadol intoxication: implications for therapy based on 100 patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **111**: 133–136.
- Shiue CY, Bai LQ, Teng RR, Arnett CD, Dewey SL, Wolf AP, *et al* (1991). A comparison of the brain uptake of N-(cyclopropyl[11C]methyl)norbuprenorphine ([11C]buprenorphine) and N-(cyclopropyl[11C]methyl)nordiprenorphine ([11C]diprenorphine) in baboon using PET. *Int J Rad Appl Instrum B* **18**: 281–288.
- Skolnick P (2018). The Opioid Epidemic: Crisis and Solutions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **58**: 143–159.
- Slinker BK (1998). The Statistics of Synergism. 1–9.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL (1991). Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* **254**: 726–729.
- Spahn V, Fischer O, Endres-Becker J, Schäfer M, Stein C, Zöllner C (2013). Opioid withdrawal increases transient receptor potential vanilloid 1 activity in a protein kinase A-dependent manner. *Pain* **154**: 598–608.
- Spangler-Bickell MG, de Laat B, Fulton R, Bormans G, Nuyts J (2016). The effect of isoflurane on 18F-FDG uptake in the rat brain: a fully conscious dynamic PET study using motion compensation. *EJNMMI Res* **6**: 17.
- Spiller HA, Gorman SE, Villalobos D, Benson BE, Ruskosky DR, Stancavage MM, *et al* (1997). Prospective multicenter evaluation of tramadol exposure. *J Toxicol Clin Toxicol* **35**: 361–364.
- Sporer KA, Dorn E (2001). Heroin-related noncardiogenic pulmonary edema : a case series. *Chest* **120**: 1628–1632.
- Stacher G, Steinringer H, Winklehner S, Mittelbach G, Schneider C (1983). Effects of graded oral doses of meptazinol and pentazocine in comparison with placebo on experimentally induced pain in healthy humans. *British Journal of Clinical Pharmacology* **16**: 149–156.
- Stambaugh JE, Reder RF, Stambaugh MD, Stambaugh H, Davis M (2001). Double-Blind, Randomized Comparison of the Analgesic and Pharmacokinetic Profiles of Controlled- and Immediate-Release Oral Oxycodone in Cancer Pain Patients. *The Journal of Clinical Pharmacology* **41**: 500–506.
- Stein C (2016). Opioid Receptors. *Annu Rev Med* **67**: 433–451.
- Sternbach H (1991). The serotonin syndrome. *Am J Psychiatry* **148**: 705–713.

- Stucke AG, Miller JR, Prkic I, Zuperku EJ, Hopp FA, Stuth EAE (2015). Opioid-induced Respiratory Depression Is Only Partially Mediated by the preBötzing Complex in Young and Adult Rabbits In Vivo. *Anesthesiology* **122**: 1288–1298.
- Subrahmanyam V, Renwick AB, Walters DG, Young PJ, Price RJ, Tonelli AP, *et al* (2001). Identification of cytochrome P-450 isoforms responsible for cis-tramadol metabolism in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **29**: 1146–1155.
- Substance Abuse and Mental Health Services Administration (2013). Drug Abuse Warning Network, 2011: National Estimates of Drug-Related Emergency Department Visits. *HHS publications No (SMA) 13-4760*.
- Substance Abuse and Mental Health Services Administration (2017). Key Substance Use and Mental Health Indicators in the United States: Results from the 2016 National Survey on Drug Use and Health. *HHS publications No. SMA 17-5044, NSDUH Series H-52*: 1–86.
- Suzuki J, El-Haddad S (2017). A review: Fentanyl and non-pharmaceutical fentanyls. *Drug Alcohol Depend* **171**: 107–116.
- Syvänen S, Labots M, Tagawa Y, Eriksson J, Windhorst AD, Lammertsma AA, *et al* (2012). Altered GABAA receptor density and unaltered blood-brain barrier transport in a kainate model of epilepsy: an in vivo study using <sup>11</sup>C-flumazenil and PET. *J Nucl Med* **53**: 1974–1983.
- Taghaddosinejad F, Mehrpour O, Afshari R, Seghatoleslami A, Abdollahi M, Dart RC (2011). Factors related to seizure in tramadol poisoning and its blood concentration. *J Med Toxicol* **7**: 183–188.
- Takita K, Herlenius E, Yamamoto Y, Lindahl SG (2000). Effects of neuroactive substances on the morphine-induced respiratory depression; an in vitro study. *Brain Res* **884**: 201–205.
- Talaie H, Panahandeh R, Fayaznouri M, Asadi Z, Abdollahi M (2009). Dose-independent occurrence of seizure with tramadol. *J Med Toxicol* **5**: 63–67.
- Tallarida R, Murray RB (Springer-Verlag: New York, 1987). *Manual of Pharmacologic Calculations - With Computer* | Ronald Tallarida | Springer. 47–49.
- Tashakori A, Afshari R (2010). Tramadol overdose as a cause of serotonin syndrome: a case series. *Clin Toxicol (Phila)* **48**: 337–341.
- Tedford HW, Zamponi GW (2006). Direct G Protein Modulation of Cav2 Calcium Channels. *Pharmacol Rev* **58**: 837–862.
- Tenenbein M (1984). Continuous naloxone infusion for opiate poisoning in infancy. *The Journal of Pediatrics* **105**: 645–648.
- The Council of Economic Advisers (2017). The Underestimated Cost of the Opioid Crisis. 1–14 at [www.whitehouse.gov](http://www.whitehouse.gov).
- Thundiyil JG, Kearney TE, Olson KR (2007). Evolving epidemiology of drug-induced seizures reported to a Poison Control Center System. *J Med Toxicol* **3**: 15–19.
- Tokugawa J, Ravasi L, Nakayama T, Schmidt KC, Sokoloff L (2007). Operational lumped constant for FDG in normal adult male rats. *J Nucl Med* **48**: 94–99.
- Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H (2008). Opioid pharmacology. *Pain Physician* **11**: S133–53.
- Tsujita M, Sakuraba S, Kuribayashi J, Hosokawa Y, Hatori E, Okada Y, *et al* (2007). Antagonism of morphine-induced central respiratory depression by donepezil in the anesthetized rabbit. *Biol Res* **40**: 339–346.
- Tsutaoka BT, Ho RY, Fung SM, Kearney TE (2015). Comparative Toxicity of Tapentadol and Tramadol Utilizing Data Reported to the National Poison Data System. *Ann Pharmacother* **49**: 1311–1316.

- Turnaturi R, Marrazzo A, Parenti C, Pasquinucci L (2018). Benzomorphan scaffold for opioid analgesics and pharmacological tools development: A comprehensive review. *Eur J Med Chem* **148**: 410–422.
- UNODC (2018). Understanding the synthetic drug market: the NPS factor. at [www.unodc.org](http://www.unodc.org).
- van Amsterdam J, van den Brink W (2015). The Misuse of Prescription Opioids: A Threat for Europe? *Curr Drug Abuse Rev* **8**: 3–14.
- Van Zee A (2009). The promotion and marketing of oxycontin: commercial triumph, public health tragedy. *Am J Public Health* **99**: 221–227.
- Vankova ME, Weinger MB, Chen DY, Bronson JB, Motis V, Koob GF (1996). Role of central mu, delta-1, and kappa-1 opioid receptors in opioid-induced muscle rigidity in the rat. *Anesthesiology* **85**: 574–583.
- Vargas-Schaffer G (2010). Is the WHO analgesic ladder still valid? Twenty-four years of experience. *Can Fam Physician* **56**: 514–7– e202–5.
- Volkow ND (2010). Opioid-dopamine interactions: implications for substance use disorders and their treatment. *Biol Psychiatry* **68**: 685–686.
- Volkow ND, McLellan AT (2016). Opioid Abuse in Chronic Pain--Misconceptions and Mitigation Strategies. *N Engl J Med* **374**: 1253–1263.
- Vonhof S, Sirén AL (1991). Reversal of mu-opioid-mediated respiratory depression by alpha 2-adrenoceptor antagonism. *Life Sci* **49**: 111–119.
- Wakeman SE, Barnett ML (2018). Primary Care and the Opioid-Overdose Crisis - Buprenorphine Myths and Realities. *N Engl J Med* **379**: 1–4.
- Walsh SL, Preston KL, Stitzer ML, Cone EJ, Bigelow GE (1994). Clinical pharmacology of buprenorphine: Ceiling effects at high doses. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **55**: 569–580.
- Wang HB, Zhao B, Zhong YQ, Li KC, Li ZY, Wang Q, *et al* (2010). Coexpression of delta- and mu-opioid receptors in nociceptive sensory neurons. *PNAS* **107**: 13117–13122.
- Wei AD, Ramirez J (2016). KCNQ Potassium Channels Reverse Opioid Suppression of Respiratory Drive in preBötzinger Dbx1+ Inspiratory Neurons by a Presynaptic Mechanism. *FASEB* **30**.
- West SL, O'Neal KK, Graham CW (2000). A meta-analysis comparing the effectiveness of buprenorphine and methadone. *J Subst Abuse* **12**: 405–414.
- White JM, Irvine RJ (1999). Mechanisms of fatal opioid overdose. *Addiction* **94**: 961–972.
- Whiteside GT, Hummel M, Boulet J, Beyenhof JD, Strenkowski B, John JD, *et al* (2016). Robustness of arterial blood gas analysis for assessment of respiratory safety pharmacology in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **78**: 32–41.
- Wirz S, Wartenberg HC, Nadstawek J (2008). Less nausea, emesis, and constipation comparing hydromorphone and morphine? A prospective open-labeled investigation on cancer pain. *Support Care Cancer* **16**: 999–1009.
- Yassen A, Olofsen E, van Dorp E, Sarton E, Teppema L, Danhof M, *et al* (2007). Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of the reversal of buprenorphine-induced respiratory depression by naloxone : a study i. *Clin-Pharmacokinet* **46**: 965–980.
- Zacny JP (2005). Profiling the subjective, psychomotor, and physiological effects of tramadol in recreational drug users. *Drug Alcohol Depend* **80**: 273–278.
- Zawilska JB (2017). An Expanding World of Novel Psychoactive Substances: Opioids. *Front Psychiatry* **8**: 243.
- Zebraski SE, Kochenash SM, Raffa RB (2000). Lung opioid receptors: pharmacology and possible target for nebulized morphine in dyspnea. *Life Sci* **66**: 2221–2231.



- Zhang W, Ramamoorthy Y, Tyndale RF, Sellers EM (2003). Interaction of buprenorphine and its metabolite norbuprenorphine with cytochromes p450 in vitro. *Drug Metab Dispos* **31**: 768–772.
- Zhang Z, Xu F, Zhang C, Liang X (2007). Activation of opioid mu receptors in caudal medullary raphe region inhibits the ventilatory response to hypercapnia in anesthetized rats. *Anesthesiology* **107**: 288–297.
- Zhang Z, Xu F, Zhang C, Liang X (2009). Opioid mu-receptors in medullary raphe region affect the hypoxic ventilation in anesthetized rats. *Respiratory physiology & neurobiology* **168**: 281–288.
- Zhang Z, Zhuang J, Zhang C, Xu F (2011). Activation of opioid  $\mu$ -receptors in the commissural subdivision of the nucleus tractus solitarius abolishes the ventilatory response to hypoxia in anesthetized rats. *Anesthesiology* **115**: 353–363.
- Zöllner C, Stein C (2007). Opioids. *Analgesia* 31–63doi:10.1007/978-3-540-33823-9.
- Zukin RS, Eghbali M, Olive D, Unterwald EM, Tempel A (1988). Characterization and visualization of rat and guinea pig brain kappa opioid receptors: evidence for kappa 1 and kappa 2 opioid receptors. *PNAS* **85**: 4061–4065.
- Zwicker JD, Zhang Y, Ren J, Hutchinson MR, Rice KC, Watkins LR, *et al* (2014). Glial TLR4 signaling does not contribute to opioid-induced depression of respiration. *Journal of Applied Physiology* **117**: 857–868.

**Titre : Étude multimodale *in vivo* des mécanismes de toxicité neurorespiratoires des opioïdes chez le rat**

**Résumé :** Les opioïdes peuvent être responsables, en cas d'intoxication, d'une dépression respiratoire mortelle. Deux opioïdes ont un profil de toxicité particulier. La buprénorphine, seule, a des effets respiratoires plafonnés alors qu'administrée avec des benzodiazépines elle peut être à l'origine d'une dépression respiratoire mortelle. Le tramadol, dans un contexte d'intoxication aiguë, entraîne dans 20% des cas des convulsions. Les mécanismes de ces toxicités sont inconnus. L'objectif de cette thèse était d'étudier de façon multimodale les mécanismes impliqués dans ces deux types de toxicité en incluant des données pharmacodynamiques et neuropharmacocinétiques *in vivo*. Pour la buprénorphine, nous avons montré que la dépression respiratoire observée avec le diazépam ne résultait pas d'une interaction neuropharmacocinétique/réceptologique centrale (imagerie TEP <sup>11</sup>C-buprénorphine). En revanche, les données physiologiques respiratoires (pléthysmographie, gaz du sang, électromyographie) et leur réversion par les antagonistes des récepteurs opioïdes et de l'acide γ-aminobutyrique (GABA) étaient en faveur d'une interaction pharmacodynamique. Pour le tramadol, nous avons montré que les convulsions n'impliquaient pas les systèmes noradrénergiques, dopaminergiques, sérotoninergiques ou opioïdiques. Le tramadol agissait comme un modulateur allostérique négatif du site de liaison des benzodiazépines des récepteurs GABA-A (imagerie TEP <sup>11</sup>C-flumazénil). Par cette approche multimodale *in vivo* chez le rat, nous avons pu déterminer que les interactions entre les opioïdes et le système GABAergique jouent un rôle majeur dans les profils de toxicité spécifique de la buprénorphine et du tramadol.

**Mots-clefs :** opioïde, benzodiazépine, buprénorphine, tramadol, <sup>11</sup>C-buprénorphine, <sup>11</sup>C-flumazénil, tomographie par émission de positon

**Title: *In vivo* multimodal study of the neuro-respiratory toxicity of opioids**

**Abstract:** Opioids overdose may be responsible for respiratory depression. Nevertheless, two molecules exhibit particular toxicity patterns. Buprenorphine induces ceiling respiratory effects even at high doses. However, several deaths have been reported, mainly when buprenorphine was co-administered with benzodiazepines. Tramadol is a μ-opioid receptor agonist that induces seizures in 20% of poisoning cases. The exact mechanisms involved in both toxicity remain poorly understood. The aim of our investigation was to study the mechanisms involved in these two types of toxicity using a multimodal approach including pharmacodynamic data and *in vivo* brain neuropharmacokinetics. Regarding buprenorphine, we have shown that respiratory depression with diazepam does not result from neuropharmacokinetic/receptologic interaction (<sup>11</sup>C-buprenorphine PET imaging) Conversely, the study of respiratory parameters (plethysmography, blood gas, electromyogram) and their antagonization by opioid and gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors antagonists supported interactions mediated by the addition of the pharmacodynamic effects of each molecule. Regarding tramadol, we showed that seizures did not involve the noradrenergic, dopaminergic, serotonergic or opioidergic systems. Conversely, they involve the GABA-ergic system; tramadol acts as negative allosteric modulator of the benzodiazepine site of the GABA-A receptor (<sup>11</sup>C-flumazenil PET imaging). Using a multimodal *in vivo* approach in the rat, we have been able to determine that the interactions between opioids and the GABAergic system play a major role in mechanisms of toxicity of buprenorphine and tramadol.

**Keywords:** opioid, benzodiazepine, burpenorphine, tramadol, <sup>11</sup>C-buprenorphine, <sup>11</sup>C-flumazenil, positron emission tomography