



Le récepteur opioïde Mu et les interactions entre systèmes opioïde et cannabinoïde dans les effets nociceptifs et addictogènes de la morphine

Laurie-Anne Roeckel

► To cite this version:

Laurie-Anne Roeckel. Le récepteur opioïde Mu et les interactions entre systèmes opioïde et cannabinoïde dans les effets nociceptifs et addictogènes de la morphine. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ012 . tel-02917931

HAL Id: tel-02917931

<https://theses.hal.science/tel-02917931>

Submitted on 20 Aug 2020

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LE VIE ET DE LA SANTE (ED414)

**Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives**

THÈSE présentée par :
Laurie-Anne ROECKEL

soutenue le : **13 avril 2018**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Le récepteur opioïde Mu et les interactions entre
systèmes opioïde et cannabinoïde dans les
effets nociceptifs et addictogènes de la
morphine.**

THÈSE dirigée par :

Mme BEFORT Katia

Mme GAVERIAUX-RUFF Claire

Chargée de recherche, CNRS, Université de Strasbourg

Professeure, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr CHAOULOFF Francis

Mr RIVAT Cyril

Directeur de recherche, INSERM, Université de Bordeaux

Maître de conférences, Université de Montpellier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme DECOSTERD Isabelle

Mr SALVAT Eric

Professeure, Université de Lausanne

Professeur, Université de Strasbourg

Remerciements de thèse

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, Pr Isabelle Decosterd, Dr Francis Chaouloff, Dr Cyril Rivat et Pr Eric Salvat d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'examiner mon travail de thèse.

Ayant réalisé ma thèse dans deux instituts de recherche différents, j'ai croisé de nombreuses personnes, qui toutes autant qu'elles sont, ont participé à ma progression durant ces 4 années.

Tout d'abord, à l'IGBMC, je tiens à remercier ma directrice de thèse, Claire. Merci pour votre disponibilité et votre enthousiasme. C'est votre passion pour le système opioïde qui m'a poussée à réaliser une thèse. Toujours à l'IGBMC, je remercie un autre passionné, mais de Rock, David. Tu m'as appris la quasi-totalité des manips de comportement et de biomol réalisées à l'IGBMC, et ce, toujours avec patience et sympathie.

Merci au maître de l'ironie, et un peu des jeux de mots (oui mais en fait Dom te dépasse dans ce domaine, désolée...). Hervé, je te souhaite bonne route chez les belges avec tes femmes.

Djémo et Gilles, merci pour tous ces bons moments passés à l'animalerie et pour les bons soins apportés aux animaux.

Pour finir avec l'IGBMC, un grand merci à mon homologue ou mon double psychologique, Ekaterina !

Merci à Yannick Goumon, Frédéric Simonin, Rémy Schlichter, Jean-Christophe Cassel, Katia Befort, Serge Potier et Catherine Schuster pour leur aide à un moment critique de ma thèse.

Au LNCA, je tiens tout particulièrement à remercier ma seconde directrice de thèse, Katia. Merci pour ces 2 années passées à travailler à tes côtés, mais pas que... Oui, on a beaucoup travaillé, on a passé des heures à regarder des souris se lécher, ou sauter... ou ne rien faire (les joies du comportement)! Mais ces moments, à priori ennuyeux, nous ont permis de discuter pendant des heures et des heures de nos intérêts communs pour les animaux et les voyages. Du coup, ces manips fastidieuses sont devenues des rendez-vous potins. A quand la prochaine manip de sevrage ?! Plus sérieusement, merci pour ta gentillesse, ton oreille attentive et ta bienveillance !

Merci aussi à Dom. Maintenant que l'heure de la retraite est venue, le labo n'est malheureusement plus bercé par tes jeux de mots scientifiques. Pense à écrire un recueil, ça sera nécessaire à la relève ! Merci aussi à toi pour toutes les discussions agréables que nous avons pu avoir. A peluche !

Débora, j'ai passé de très agréables moments avec toi, rien que pour cela merci. Merci aussi pour ta grande aide durant la thèse. Tu es une personne très rigoureuse, appliquée et motivée... et toujours souriante. Eclate toi bien au pays du cannelé !

Merci David et Romain pour votre sympathie et votre bonne humeur au quotidien. David, je pense que tu seras toujours mon modèle de zenitude, reste comme ça. Romain (notre expert gras sucre), bonne route avec l'équipe 3 !

Merci à tous mes collègues thésard ou futurs thésards (hein Gaëlle). D'ailleurs Gaëlle merci pour ta gentillesse. Surtout, continue à être bricoleuse, tu en auras besoin ! Caroline, je te souhaite un très grand courage pour les années à venir (ouais pas facile de faire une thèse avec Pascal, je rigole). Tiens, en parlant de Pascal, ça me rappelle la grande époque du bureau 109^e, toujours un truc à fêter et une bonne occasion de s'offrir des cadeaux autour d'un verre ! Merci aux résidents du 109^e

Etienne, décidément on ne se lâchera jamais, ça fait maintenant 10 ans qu'on se connaît et tu n'as pas changé et surtout ne change pas. Etant donné que nos chemins se croisent toujours, je te dis à la prochaine !

Merci aux « filles » pour les soirées passées ensemble : Estelle, Marie, Amélie, Caroline, Débora, Aurélie.

Merci Cella pour vos conseils toujours pertinents, et votre gentillesse.

J'avais une copie psychologique à l'IGBMC, et bien j'en ai une au LNCA aussi : Amélie. Nous partageons beaucoup de choses, dont notre façon de penser et de fonctionner sur de nombreux aspects. Nous avons aussi partagé de nombreuses choses ensemble : un congrès à Copenhague, des projets de voyage à travers le monde, et même une rédaction de thèse. Forcément ça créé des liens forts, pour tout ça je te remercie !

Je ne pensais pas en arrivant au LNCA découvrir bien plus qu'un labo de recherche, mais une petite famille.

Merci à tous et surtout aux fées du labo, Brigitte et Karin !

Domi, merci pour votre aide, et vos nombreux conseils au long de la thèse. Merci aussi pour votre soutien et votre gentillesse.

Un merci tout particulier à l'entreprise Elia médical et plus particulièrement à Monsieur Boukhaled, pour leur soutien de mon projet de thèse et le financement des 7 mois supplémentaires.

Merci à mes amis qui ont été là à tous les moments de la thèse, les plus heureux et les plus difficiles également.

Merci aux immunologistes et aux chimistes de l'IBMC : Sophia, notre 'petite' sœur, qui m'a soutenue jusqu'à la dernière minute, Diane, la 'grande' sœur toujours de bonne humeur, Ben et Pauline, les cocos, toujours prêts à faire la fête, Adriano, l'homme d'affaires, mon futur associé ? Merci aussi à Farouk, le président, Giacomo, spécialiste bacalhau, Franchet, détenteur de la poudre de fées, mais aussi Simone, Janina, Amandine, Flora et Margot. Merci à ce super groupe d'amis, pour tous les excellents moments passés ensemble.

Merci à nos amis de toujours, Julie et Arnaud, à nos côtés durant toutes ces années, et surtout pendant les années de thèse.

Merci à ma belle-famille, qui s'est dit que soutenir un thésard n'était pas suffisant. Nan, nan, vous avez carrément opté pour le super package du « couple de doctorants ». Merci à Yann, futur champion de polo ! Merci à toute ma famille en général et particulièrement à ma marraine et mes grands-mères. Un grand merci à mes parents, pour le soutien constant et l'aide qu'ils m'apportent dans les situations difficiles. Merci aussi pour leur patience et bravo pour votre courage face à mon caractère si doux ! Cette thèse, je vous la dois.

Enfin, merci à Matthieu. Tout ce que je vais écrire tu le sais déjà, et je ne sais pas comment te remercier pour toute l'aide que tu m'as apportée, à tous points de vue, durant ces années. Sans toi, je n'y serais pas arrivée ! Je vous souhaite de très très nombreuses années à continuer à nous éclater ensemble, et à traverser la planète pour observer la moindre trace de vie. Un grand merci à toi !

Je ne peux pas finir sans remercier les filles, Phoenix, Lola, Léonie et Nala !

PLAN DE THESE

Le récepteur opioïde Mu et les interactions entre systèmes opioïde et cannabinoïde dans les effets nociceptifs et addictogènes de la morphine.

CHAPITRE I : Rôle du récepteur opioïde Mu dans les effets nociceptifs de la morphine

PREFACE	2
INTRODUCTION	3-51
I. Généralités sur la douleur	3-8
A. Définitions, chiffres et enjeux sociétaux	3
B. Etiologie de la douleur et modèles précliniques	4-8
1. Transmission de la douleur	4
2. Modèles précliniques de douleur chronique	7
II. Rôle des cellules gliales	8-15
A. En condition non pathologique	8
B. En conditions pathologiques	9
C. Les astrocytes et la microglie dans la douleur chronique	12
III. Le système opioïde	16-43
A. Composition	16
B. Fonctionnement	17
C. Le système opioïde et la douleur	19
D. Les analgésiques opiacés et leurs effets secondaires	19
E. L'hyperalgie induite par les opiacés (OIH) – <i>revue</i> (Roedel et al., 2016)-	21
IV. Rôle des cellules gliales dans les effets chroniques de la morphine	46
V. Rôle de TLR4 dans les réponses morphiniques	47
VI. Rôle du métabolite de la morphine, la morphine-3-b-glucuronide dans l'hyperalgie morphinique	48

PROJET I : Rôles du récepteur opioïde Mu dans les hypersensibilités induites par la morphine et son métabolite, la morphine-3-b-glucuronide (M3G)	52-98
I. Préambule	53
II. Article: l'hyperalgie morphinique implique les récepteurs Mu et la M3G (Roeckel et al., 2017)	55
III. Matériels et méthodes supplémentaires	71
IV. Résultats supplémentaires	75-82
A. Régulations des gènes du système opioïde et des marqueurs de l'inflammation dans la moelle épinière suite à un traitement répété à la morphine	75
B. Effets de la M3G sur le bien-être	76
<i>Effets de la M3G sur un comportement associé à de l'anxiété</i>	78
<i>Effets de la M3G sur un comportement associé à de la dépression</i>	80
V. Discussion	83-97
A. Régulations des marqueurs de l'inflammation dans la moelle épinière suite un traitement répété à la morphine	83
B. Expression de gènes chez les souris KO Mu	84
C. La M3G et l'anxiété	85
D. La M3G et la dépression	85
SCHEMA BILAN	87

PROJET II : Rôles du récepteur opioïde Mu, de l'activation microgliale et du récepteur Mu microglial dans la nociception	88-1
I. Préambule	89
II. Matériels et méthodes	90
III. Résultats	96-111
A. Hypersensibilité neuropathique induite par la pSNL	96
B. Effets d'un cotraitement à base de minocycline et de morphine sur la neuropathie	107
C. Caractérisation d'un knockout conditionnel Mu dans les microglies (MOR-Cx3Cr1-Cre)	108
IV. Suite du projet (en cours depuis avril 2016)	111
V. Discussion	112-120
A. Rôle du récepteur opioïde Mu dans les réponses antinociceptives basales	112
B. Rôle du récepteur opioïde Mu dans un modèle de ligature partielle du nerf sciatique	113
C. Hyperalgie induite par un traitement répété à la morphine	116
D. Rôle des microglies dans la douleur neuropathique post-pSNL et l'hyperalgie morphinique	117-120
<i>Effets de la minocycline seule</i>	117
<i>Effets du cotraitement minocycline+morphine</i>	117
E. Knockout du récepteur Mu dans les microglies	120
SCHEMA BILAN	121
CONCLUSIONS DU CHAPITRE I (projets I et II)	122-125
Bibliographie du chapitre	126-136

CHAPITRE II : Interactions entre les systèmes opioïde et cannabinoïde dans l'antinociception, le sevrage, la récompense et des comportements naturels.

PREFACE	136
INTRODUCTION	139-187
I. Généralités sur l'addiction	139-148
A. Définitions, chiffres et enjeux sociétaux	139
B. Traitements de la dépendance aux opiacés	142
C. Comorbidité de l'addiction	144
D. Modèles précliniques de la dépendance et de la dépression	146-148
1. Modèles de dépendance	146
2. Modèles de dépression	147
II. Le système opioïde	147-156
A. Les récepteurs opioïdes et la dépendance	147
B. Les récepteurs opioïdes et la récompense	152
C. Les récepteurs opioïdes et le bien-être	153
III. Le système cannabinoïde	157-173
A. Composition et fonctionnement	157
B. Le système cannabinoïde et la dépendance	162
C. Le système cannabinoïde et la récompense	163
D. Le système cannabinoïde et la douleur	168
E. Le système cannabinoïde et le bien-être	171
IV. Interactions entre systèmes cannabinoïde et opioïde	174-186
A. Interactions dans la nociception	174-178
1. Résultats d'études de traitements opioïdes chez des animaux où les récepteurs CB1 sont bloqués ou inactivés	174
2. Résultats d'études de traitements CB chez des animaux où les récepteurs opioïdes sont bloqués ou inactivés	176
3. Potentialisation de l'analgésie lors de cotraitements avec des agonistes CB et opioïdes	176
B. Interactions dans les effets récompensants	179-182
1. Résultats d'études de traitements opioïdes chez des animaux où les récepteurs CB1 sont bloqués ou inactivés	179

2.	Résultats d'études de traitements CB chez des animaux où les récepteurs opioïdes sont bloqués ou inactivés	181
3.	Effets d'un prétraitement CB sur la récompense aux opiacés	182
C.	Interactions dans la dépendance physique	182-148
1.	Résultats d'études de traitements opioïdes chez des animaux où les récepteurs CB1 sont bloqués ou inactivés	182
2.	Résultats d'études de traitements CB chez des animaux où les récepteurs opioïdes sont bloqués ou inactivés	184
3.	Effets d'un prétraitement CB sur le sevrage aux opiacés	185
D.	Interactions moléculaires	186
	SCHEMA BILAN	187
	PROJET III : Caractérisation comportementale de l'agoniste du récepteur CB1: ACEA et rôle du système opioïde dans ces réponses.	188-222
I.	Préambule	189
II.	Article: Etudes des réponses comportementales de l'agoniste ACEA du récepteur cannabinoïde CB1, et rôle des récepteurs opioïdes Mu et Delta dans ces réponses (Roedel et al., en soumission)	191
III.	Discussion complémentaire	217
	SCHEMA BILAN	222

PROJET IV : Interactions entre le récepteur opioïde Mu et le récepteur CB1 dans l'analgésie et la dépendance physique induite par la morphine	223-
I. Préambule	224
II. Matériels et méthodes	226
III. Résultats	236-252
A. Effets du cotraitement ACEA+morphine sur l'antinociception morphinique (immersion de la queue)	236
B. Le cotraitement ACEA+morphine et les effets locomoteurs de la morphine	239
C. Le cotraitement ACEA+morphine et les effets récompensant de la morphine (place préférence)	240
D. Effets du cotraitement ACEA+morphine sur le sevrage morphinique (sevrage précipité à la naloxone)	241
E. Régulations de l'expression des gènes du système opioïde, du système cannabinoïde et de l'inflammation induites par le cotraitement ACEA+morphine (qRT-PCR)	243
F. Régulations de l'activation des récepteurs opioïdes Mu et CB1 induites par le cotraitement ACEA+morphine (GTPγS[35])	246
G. Régulations de l'expression du récepteur CB1 induite par le cotraitement ACEA+morphine (immunohistochimie CB1)	249
H. Régulations de l'activité neuronale induite par le cotraitement ACEA+morphine (immunohistochimie cFOS)	251
IV. Annexe I: Mise au point du protocole de CPP morphinique et de mesure de l'activité locomotrice après injection de morphine.	252
V. Annexe II: Sevrage morphinique précipité à la naloxone après un prétraitement ACEA, chez des souris KO Mu et WT de fond génétique mixte (50% C57Bl6j; 50% 129svPas)	256
VI. Discussion	258-
A. Effets protecteurs du cotraitement ACEA+morphine sur l'antinociception morphinique	258-261
<i>Effets de l'ACEA</i>	258
<i>Effets de la morphine</i>	259
<i>Effets du prétraitement ACEA sur les effets nociceptifs de la morphine</i>	259
B. Le cotraitement ACEA+morphine et les effets récompensant de la morphine et le sevrage morphinique	261-265
<i>Effets sur la récompense</i>	261
<i>Effets sur la locomotion</i>	262
<i>Effets sur le sevrage</i>	263

C.	Régulations de l'expression des gènes de l'inflammation induites par le cotraitement ACEA+morphine	265
D.	Régulations de l'activité des récepteurs Mu et CB1, de l'expression de leurs transcrits et de l'expression du récepteur CB1 induites par le cotraitement ACEA+morphine	267-272
	<i>Régulations du système opioïde</i>	267-269
	• <i>par la morphine</i> • <i>par le prétraitement ACEA</i> • <i>par le cotraitement ACEA+morphine</i>	
	<i>Régulations du système cannabinoïde</i>	269-272
	• <i>par la morphine</i> • <i>par le prétraitement ACEA</i> • <i>par le cotraitement ACEA+morphine</i>	
E.	Régulations de l'activité neuronale cFOS induite par le cotraitement ACEA+morphine	272
VII.	Suite du projet IV (en cours)	274
	SCHEMA BILAN	275
	CONCLUSIONS DU CHAPITRE II (projets III et IV)	276-279
	CONCLUSION GENERALE DE LA THESE	280-282
	Bibliographie du chapitre	283-305
	ANNEXE DE THESE : Nouveau Chapitre de Thèse	306-322

Liste des abréviations

6-MAM 6-MonoAcetylMorphine

AC Adénylate Cyclase

ACEA Arachidonyl-2-ChloroEthylAmide

ADP Adénosine DiPhosphate

AMPc adénosine monophosphate cyclique

ASIC Acid-Sensing Ion Channels

ATP Adénosine TriPhosphate

BHE Barrière HématoEncéphalique

BL Baseline

CB Cannabinoïde

CB1 Récepteur CB1

CBD Cannabidiol

CCI Chronic Constriction Injury

CD11b Cluster of Differentiation 11b

CeA Central nucleus of the Amygdala

CFA Complete Freund Adjuvant

CIM Classification Internationale des Maladies

CPA Conditioned Place Aversion

CPP Conditioned Place Preference

Cpu Caudé putamen

Cre Cyclization recombinase

Cx3Cr1 CX3C Chemokine Receptor 1

DAGLA DiAcylGlycerol Lipase Alpha

DLS Striatum dorso-latéral

DMS Striatum dorso-médian

DOR Delta Opioid Receptor

DSM Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders

EC50 50% de la concentration effective

Emax effet maximum possible d'un agoniste

ERK Extracellular signal-Regulated Kinases

FAAH Fatty Acid Amide Hydrolase

FCx Frontal Cortex

GFAP Glial Fibrillary Acidic Protein

Iba1 Ionized calcium-binding adapter molecule 1

Il interleukine

Ip intrapéritonéale

It intrathécale

JNK c-Jun N-terminal kinases

KO KnockOut

KOR Kappa Opioid Receptor

LPS LipoPolySaccharide

M3G morphine-3-glucuronide

M6G morphine-6-glucuronide

MAPK Mitogen-Activated Protein Kinases

MGL MonoacylGlycerol Lipase

MOR Mu Opioid Receptor

Nac Noyau accumbens

Nape-PLD N-acyl phosphatidylethanolamine-specific Phospholipase D

NK Natural Killer

NLX naloxone

NMDA N-methyl-D-aspartate

NO monoxyde d'azote

NTI naltrindole

NTX naltrexone

OMS Organisation Mondiale de la Santé

PAMP Pathogen-Associated Molecular Patterns

Pdyn pro-dynorphine

Penk pro-enképhaline

PFC cortex préfrontal

PKA Protéine Kinase AMPc dépendante

PLC PhosphoLipase C

PRR Pattern Recognition Receptor
pSNL partial Sciatic Nerve Ligation
RCPG Récepteurs Couplés aux Protéines G
ROS Reactive Oxygen Species
Sc sous-cutané
SNC Système Nerveux Central
SNI Spared Nerve Injury
SNP Système Nerveux Périphérique
Sr141716A rimonabant
TAK Transforming growth factor-Activated Kinase

TGFβ Transforming Growth Factor beta
THC Δ-9-tétrahydrocannabinol
TLR4 Toll Like Receptor 4
TNF Tumor Necrosis Factor
TRPM Transient Receptor Potential Melastatin
TRPV Transient Receptor Potential Vanilloïde
TSO Traitements de Substitution aux Opiacés
VIH Virus de l'Immunodéficience Humaine
VTA aire tegmentale ventrale
WT WildType, animaux sauvages

CHAPITRE I :

Rôle du récepteur opioïde Mu dans les effets nociceptifs de la morphine

CHAPITRE I : Rôle du récepteur opioïde Mu dans les effets nociceptifs de la morphine

PREFACE

Le premier chapitre de thèse porte sur le travail réalisé à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), dans l'équipe Système opioïde et fonctions cérébrales, dirigée par Brigitte Kieffer, sous la direction de Claire Gavériaux-Ruff.

Ce travail étudie le rôle du récepteur opioïde Mu dans les effets nociceptifs de la morphine, et a été réalisé entre Janvier 2014 (début du master) et avril 2016.

Ce chapitre de thèse se compose d'un projet principal qui a donné lieu à la publication d'un article (Roeckel et al., 2017) et qui porte sur l'implication du récepteur Mu dans l'hyperalgie morphinique et l'hyperalgie induite par le métabolite morphine-3- β -glucuronide ([projet I](#)).

La seconde partie de ce travail porte sur le rôle de la microglie dans les effets nociceptifs de la morphine ([projet II](#)). Une partie de ce travail a été publiée dans l'article Roeckel et al., 2017, figure 4, mais étant donné le format de l'article, ces résultats ne sont que très peu discutés. Pour ces raisons, j'ai choisi de les intégrer dans la description du projet 2 et de les discuter plus en détail.

Cette première partie de thèse a aussi donné lieu à la publication d'une revue de la littérature sur l'hyperalgie induite par les opiacés et les mécanismes moléculaires et cellulaires qui les régissent (Roeckel et al., 2016). Cette revue constitue une partie de l'introduction ([III. E](#)).

L'introduction de ce chapitre de thèse est générale aux projets 1 et 2 et est complémentaire des informations déjà décrites dans les articles (Roeckel et al., 2016, 2017).

Les matériels et méthodes; descriptions des résultats et discussions sont propres à chaque projet, et également complémentaires de ce qui a été publié dans l'article (Roeckel et al., 2017).

INTRODUCTION

I. Généralités sur la douleur

A. Définitions, chiffres et enjeux sociétaux

La douleur est définie par l'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur (IASP), comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles, ou décrite en des termes évoquant de telles lésions.

La douleur est un problème majeur de santé publique qui concerne 30% de la population adulte européenne, et 60% des patients douloureux estiment être soignés de façon inappropriée ou insuffisante (Breivik et al., 2013).

Cliniquement, on distingue la douleur aiguë de la douleur chronique. La douleur aiguë joue un rôle protecteur contre des stimuli douloureux initiés par des lésions tissulaires ; elle est généralement de courte durée. Lorsqu'elle persiste plus de 3 mois, la douleur est qualifiée de chronique. Elle a été définie par la Haute Autorité de Santé (HAS) dans un rapport en 2008 comme un « syndrome multidimensionnel » qui peut être défini par plusieurs caractéristiques : **(1)** la persistance ou la récurrence; **(2)** une évolution sur plus de 3 mois; **(3)** une réponse insuffisante aux traitements et **(4)** d'une détérioration des échanges relationnelles, mais aussi des capacités fonctionnelles des patients dans leurs activités journalières (d'après l'argumentaire de décembre 2008 des HAS).

C'est un état pathologique qui se caractérise par une hypersensibilité à des stimuli normalement non douloureux et par une hyperalgie, qui peuvent être accompagnés par une léthargie, une anxiété et un état dépressif.

En situation de douleur chronique, le seuil de perception de la douleur est abaissé, de telle sorte que des stimuli de nature non douloureuse sont perçus comme douloureux (allodynie) et la perception des stimuli douloureux est intensifiée (hyperalgie) (Roedel et al., 2016).

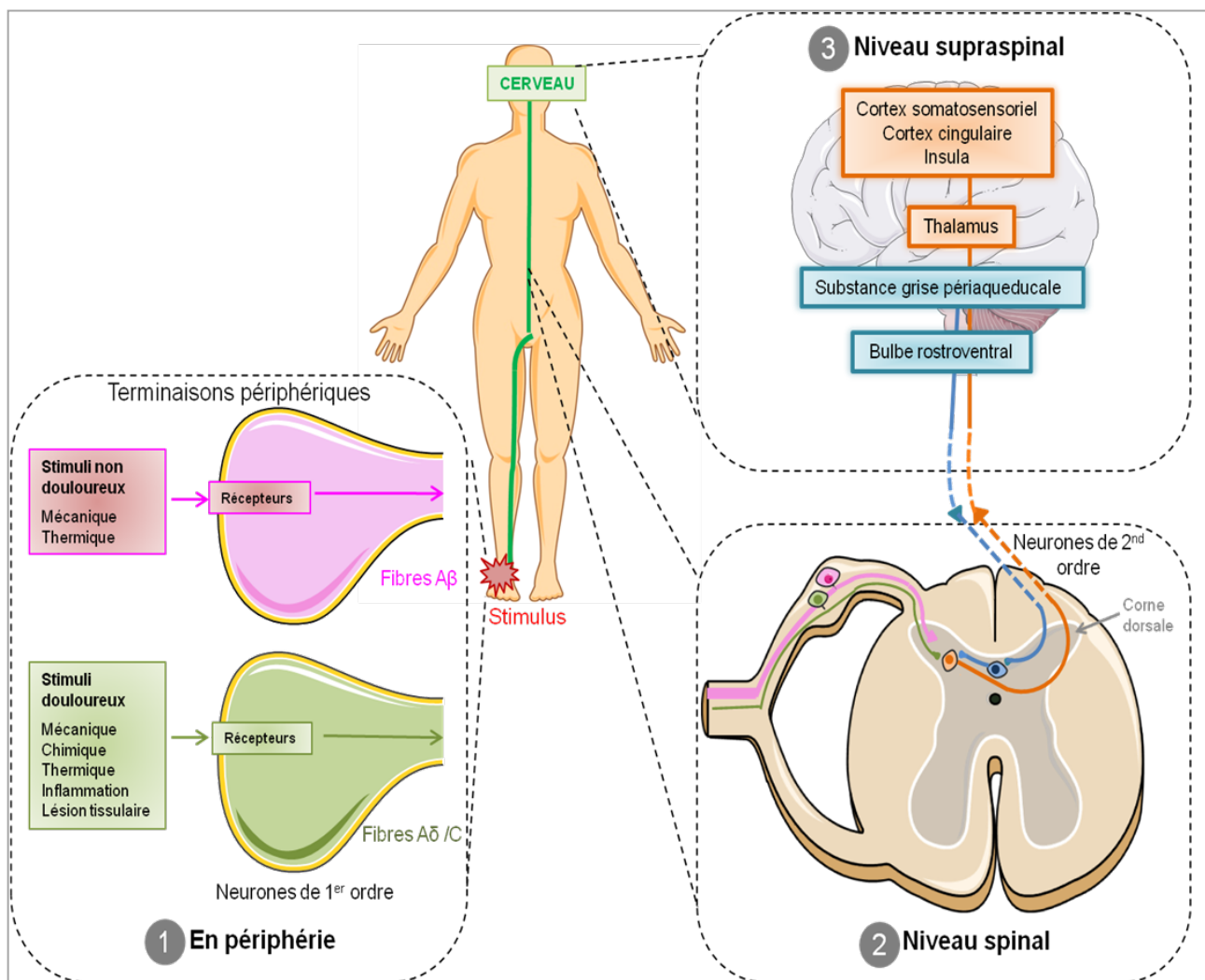
De par ces différents aspects, les conséquences sociétales de la douleur chronique ne sont pas négligeables, bien au contraire. En effet, d'après l'étude ECONEP réalisée en 2006, on estime que les patients souffrant de douleurs chroniques présentent un nombre d'arrêts de travail 5 fois plus élevé que le reste de la population. Pour 45% des patients, ces arrêts dépassent une durée moyenne cumulée de 4mois/an. Cela entraîne également un nombre de consultations plus élevé que pour les autres catégories de patients avec une moyenne annuelle de 10 consultations chez un généraliste et 4 chez un spécialiste. Les patients douloureux chroniques ont une consommation de soins médicaux et

médicamenteux élevée. La pathologie est parfois si lourde, que le patient se voit de devoir arrêter son activité professionnelle et mène ainsi à des déclarations d'invalidité. En plus des souffrances physiques et morales infligées aux patients, la douleur chronique présente donc un coût élevé pour la société. A titre d'exemple, le nombre de consultations supplémentaires induites par les douleurs chroniques génèreraient près de 1.163 milliards d'euros (chiffre pour 2012 en France, Mick et al., 2013). Pourtant, 80% de ces patients français considèrent leur douleur insuffisamment soulagée.

B. Etiologie de la douleur et modèles précliniques

1. Transmission de la douleur

Les stimuli douloureux et non douloureux sont perçus par différents types de neurones sensitifs, appelés neurones de premier ordre. Parmi ces neurones de premier ordre, on distingue les neurones à haut seuil d'activation, des neurones à faibles seuils d'activation. Les neurones à haut seuil d'activation sont des nocicepteurs de type C ou A δ , et sont responsables de la perception de la douleur « physiologique » (Figure 1, d'après Grace et al., 2014). Ces fibres portent des récepteurs sensibles aux stimuli d'ordres mécaniques, thermiques, et chimiques. Les fibres sensitives de faible seuil d'activation A β sont impliquées dans la transmission d'informations tactiles et sont nécessaires à la proprioception (perception des mouvements et de la posture corporelle). L'information perçue en périphérie est ensuite transmise au système nerveux central comme décrit dans la Figure 1. Dans le système nerveux central, et plus précisément dans la corne dorsale de la moelle épinière, les neurones primaires activent les neurones de second ordre par libération de neuromédiateurs excitateurs tels que le glutamate ou la substance P. Ces neurones secondaires empruntent l'axe spino-thalamique. Les neurones thalamiques projettent alors vers des régions corticales où l'information douloureuse est intégrée. Cette perception douloureuse est également modulée par des voies descendantes inhibitrices (Bushnell et al., 2013).



D'après Grace et al., 2014

Figure 1 : Transmission de l'information sensorielle de la périphérie vers le SNC

1. En périphérie, les stimuli activent des récepteurs situés à la surface des terminaisons libres des neurones de premier ordre. Les stimuli non douloureux seront transmis par les fibres Aβ tandis que les stimuli douloureux seront transmis par les fibres de types Aδ ou par les fibres C.
2. Les neurones de premier ordre projettent dans la corne dorsale de la moelle épinière, où ils activent des neurones de second ordre (en orange). Les neurones de 2nd ordre, après décussation dans la moelle épinière, projettent vers différentes régions supra spinales, responsables de l'intégration de l'information douloureuse.
3. L'information transite par le thalamus, avant d'activer diverses régions intégratrices de l'information douloureuse. De plus l'activation de la substance grise périaqueducule va activer le bulbe rostroventral, entraînant l'activation de voies descendantes inhibitrices, qui inhibent la synapse excitatrice entre les neurones de 1^{er} et de 2nd ordre, dans la corne dorsale de la moelle épinière.

Selon la nature du stimulus appliqué en périphérie, différents types de récepteurs vont être activés. Un stimulus thermique pourra ainsi être détecté par des récepteurs sensibles au chaud ou au froid. Parmi ces récepteurs, les récepteurs TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid I) sont sensibles aux températures élevées, supérieures à 42°C. Ce sont aussi les récepteurs responsables de la sensation de chaleur ressentie lorsque nous mangeons quelque chose de pimenté. Ce sont des récepteurs canaux ioniques non sélectifs. Leur activation entraîne une dépolarisation membranaire et la génération d'un potentiel d'action. Ces récepteurs sont aussi sensibles aux stimuli chimiques et aux variations de pH, et plus particulièrement aux pH acides. Il a été montré que l'activité de ce récepteur est augmentée dans les tissus lésés, en réponse à la présence de composés pro-inflammatoires (Schwartz et al., 2013). Ce phénomène est responsable de la sensation de chaleur qui peut être ressentie au niveau d'une blessure. Les travaux menés sur des animaux knockouts pour ce récepteur ont montré une diminution de la sensibilité aux stimuli thermiques à des températures élevées, mais pas à des températures faibles. Parmi les récepteurs responsables de la détection du froid on compte les TRPM8 (Transient Receptor Potential Melastatin 8) (Jankowski et al., 2017) qui sont activés à des températures froides non nociceptives (8-26°C) et qui sont également activés en réponse à une exposition à du menthol, de l'eucalyptus ou de l'icilin (Andersson et al., 2004; Mickle et al., 2015). Les récepteurs au froid activés à de plus faibles températures sont les TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1). Ces récepteurs sont également activés par une large variété de composés chimiques tels les isothiocyanates, famille dont font partie les huiles de moutarde, de radis ou de wasabi (Pan et al., 2017).

Les stimuli chimiques font également intervenir plusieurs types de récepteurs dont des TRPs (Transient Receptors Potential), comme abordés préalablement (TRPV1-capsaïcine ; TRPM8-menthol, eucalyptus; TRPA1-isothiocyanates) (Mickle et al., 2015). Des stimuli de nature chimiques acides, comme la production de protons, ou acidose, suite à une lésion tissulaire active des canaux sodium, les ASICs (Acid-sensing ion channels).

Enfin, les stimuli mécaniques nociceptifs sont détectés par des canaux ioniques, appelés Piezo 1 et 2 (Volkers et al., 2015), mais à nouveau, des stimuli de cette nature peuvent être détectés par des ASICs, ou des récepteurs de la famille des TRPs (pour revue, Basbaum et al., 2009).

2. Modèles précliniques de douleur chronique

Afin de mieux comprendre les douleurs chroniques mais aussi de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques, il a fallu générer des modèles animaux de ces pathologies. Différentes espèces animales sont utilisées comme modèles précliniques de la douleur, mais la majorité des études sont réalisées sur le rongeur. Nous nous concentrerons donc sur les modèles rongeurs dans cette partie. Ces modèles présentent des limites assez évidentes qui sont tout d'abord la différence d'espèce (homme vs rongeur) et de mode de vie. Les différences métaboliques sont elles aussi majeures. Malgré tout, ces modèles restent les plus utilisés. Les résultats obtenus avec les modèles murins ne sont donc pas transposables simplement à l'Homme, mais restent de bons indicateurs des phénomènes qui régissent la douleur (Mogil, 2009).

Etant conscients de ce biais important, les scientifiques ont généré des modèles induits de diverses pathologies à l'origine de douleurs chroniques, de façon directe ou indirecte. Des modèles de fibromyalgie -rétention prolongée dans un tube 6h/jour pendant 21 jours-; de douleurs associées aux traitements anticancéreux -traitement au paclitaxel-; de douleurs inflammatoires -injection avec de l'adjuvant complet de Freund ou CFA-; de douleurs viscérales -consommation de sodium dextran sulfate ou DSS-; et encore de nombreux autres modèles existent (Lee et al., 2017; Montague and Malcangio, 2017; Reiss et al., 2017; Weibel et al., 2013). Il est difficile, voire impossible de mimer une pathologie chez l'animal étant donné le nombre de facteurs qui interviennent lors de la mise en place complexe d'une maladie. Ces modèles reflètent donc un ou au mieux quelques aspects observés dans une pathologie (Barrot, 2012).

Les modèles de neuropathie chez le rongeur sont nombreux et plus ou moins invasifs. Concernant uniquement les modèles de neuropathie mécanique induite par chirurgie il n'existe pas moins d'une dizaine de modèles (pour revue Ueda and Inoue, 2001). Parmi elles, il ya les transections qui consistent à couper un nerf sur tout son diamètre. Elles peuvent être réalisées à l'extrémité de la patte, au niveau du nerf tibial ou sural, bien plus en amont, au niveau du nerf sciatique, ou encore au niveau des racines spinales, prenant alors le nom de rhizotomie (Basbaum, 1974). Il existe aussi des modèles de ligatures, consistant à comprimer plus ou moins le nerf à l'aide d'un fil lassé autour de ce dernier. Les ligatures peuvent être totales ou partielles. Parmi elles, il ya le modèle de constriction chronique du nerf sciatique qui consiste à entourer de façon lâche le nerf sciatique avec quatre fils (Bennett and Xie, 1988) ; la ligature totale du nerf sciatique ; ou encore la ligature partielle du nerf sciatique (pSNL) (Seltzer et al., 1990). Il existe aussi des modèles lésionnelles comme des écrasements (crush) du nerf sciatique (Chen and Wang, 1995). Enfin, il y a aussi des modèles mixtes, faisant intervenir une ligation et une axotomie, comme le modèle de SNI (ou spared nerve injury) (Decosterd and Woolf, 2000).

Les résultats des études réalisées utilisant ce type de modèles sont parfois divergents, et au vu de la grande diversité de modèles existants, de leur caractère plus ou moins invasif et persistant, ces divergences de résultats sont compréhensibles.

D'un point de vue plus général, les modèles de douleurs chroniques, tous confondus, sont d'autant plus nombreux. Malgré cette grande variété de modèles, des processus communs ont pu être identifiés comme une activation du système immunitaire et des cellules gliales.

II. Rôle des cellules gliales

A. En condition non pathologique

Le système nerveux est constitué de neurones et de cellules gliales. Les neurones sont responsables de la transmission de l'influx nerveux et les cellules gliales sont impliquées dans le maintien de l'intégrité du tissu nerveux et de son bon fonctionnement. Elles sont essentielles à la communication entre neurones.

Il existe trois types de cellules gliales dans le système nerveux central (SNC): les astrocytes, les cellules microgliales et les oligodendrocytes. Au niveau périphérique (SNP), on en distingue deux types: les cellules gliales satellites et les cellules de Schwann.

Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann constituent la gaine de myéline favorisant l'influx nerveux.

Les astrocytes représentent la population cellulaire majoritaire du SNC. Ils apportent les nutriments aux neurones. Les cellules équivalentes aux astrocytes au niveau périphérique sont les cellules gliales satellites. Elles sont activées très rapidement après une blessure grâce au contact étroit qu'elles forment avec les neurones (Ji et al., 2013).

Les cellules microgliales interagissent également avec les neurones, jouant le rôle de senseurs et de modulateurs des fonctions neuronales en conditions physiologiques et pathologiques. Ces cellules, issues de la lignée hématopoïétique, sont considérées comme les macrophages du système nerveux central. Alors que les macrophages sont des cellules dérivées de la moelle osseuse, les microglies résidentes du SNC sont issues du sac vitellin et par rapport aux phagocytes périphériques, possèdent une durée de vie plus importante (Prinz and Priller, 2014; Prinz et al., 2017). Cependant, tout comme les macrophages en périphérie, les microglies sont des cellules appartenant au système immunitaire dit inné, et sont donc capables d'éliminer des pathogènes, ainsi que des débris cellulaires rapidement (Hughes, 2012) et ainsi de maintenir un environnement favorable au bon fonctionnement neuronal.

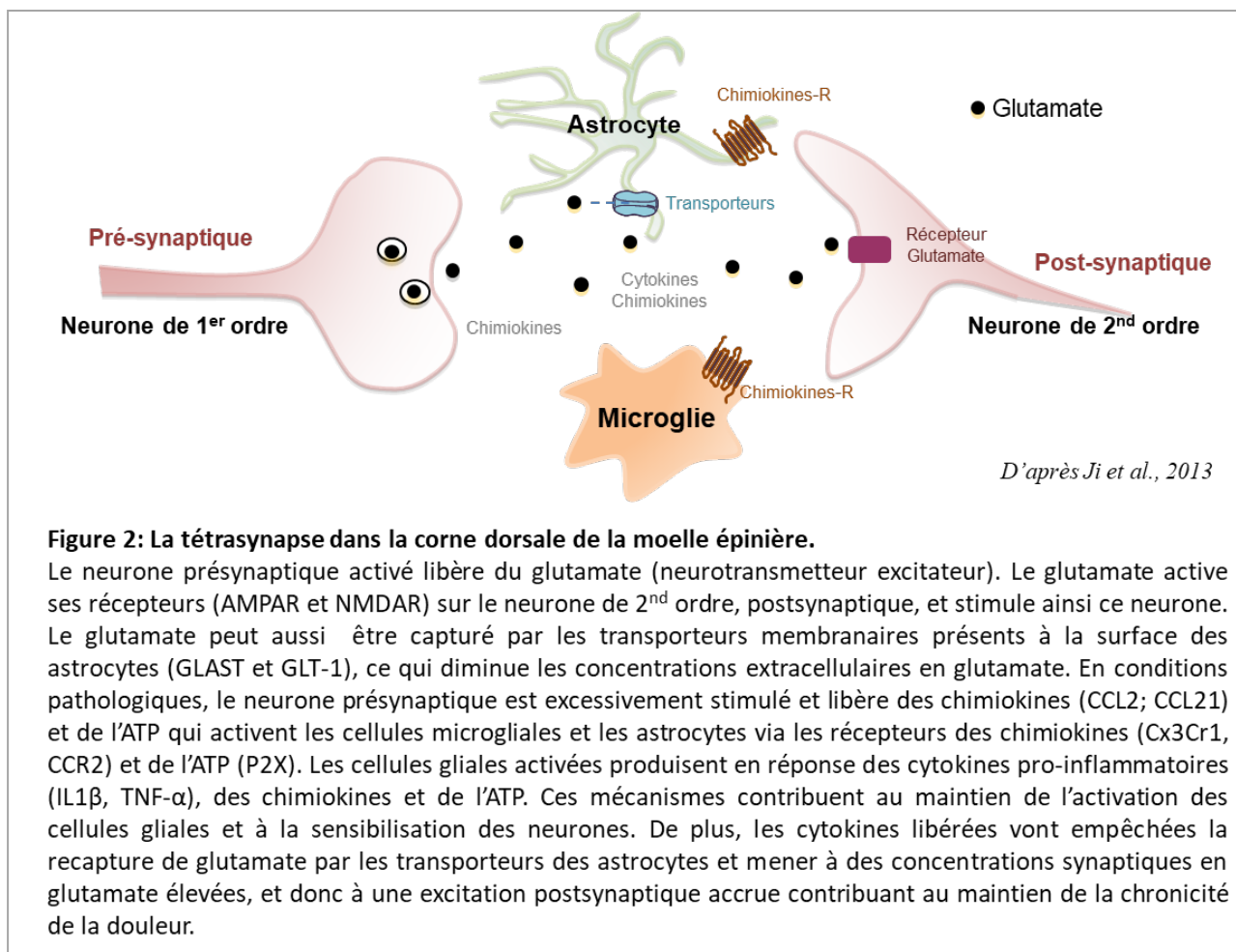
Lorsque la fonction microgliale est déficiente, l'équilibre homéostatique n'est pas maintenu et cela affecte l'activité neuronale. En effet, les microglies éliminent les débris majoritairement produits par les neurones, particulièrement au niveau synaptique et ainsi régulent l'activité et la plasticité synaptique (Parkhurst et al., 2013; Yang et al., 2011; pour revue, Tremblay, 2011). Les microglies jouent également un rôle considérable lors du développement cérébral en régulant la mort cellulaire programmée et l'élagage synaptique ou « synaptic pruning » (Bilimoria and Stevens, 2015). De plus, les microglies exercent un rôle de neuroprotection en produisant des cytokines anti-inflammatoires comme l'interleukine 10 (Il-10), l'interleukine 4 (Il-4) et le transforming growth factor β (TGF β) (Chen and Trapp, 2016). Le système immunitaire fonctionnant selon un équilibre anti-inflammatoire/pro-inflammatoire, la production de cytokines anti-inflammatoires permet de contrer l'action de cytokines pro-inflammatoires et ainsi contrebalancer la neuroinflammation. Cependant, il est important de noter que cette production de cytokines anti-inflammatoires est la conséquence d'un rétrocontrôle négatif, c'est-à-dire qu'elle succède la production d'interleukine 6 (Il-6) pro-inflammatoire par les microglies elles-mêmes (Colton, 2009). Suite à une infection par un pathogène, les microglies produisent dans un premier temps des médiateurs de l'inflammation nécessaires pour l'élimination de ce pathogène, et permettent le retour à un équilibre de la fonction immunitaire en produisant des cytokines anti-inflammatoires. Mais ces cellules appartenant au système immunitaire, tout comme les autres cellules de ce système, une dérégulation de leur activation peut mener au développement, mais aussi au maintien de pathologies.

B. En conditions pathologiques

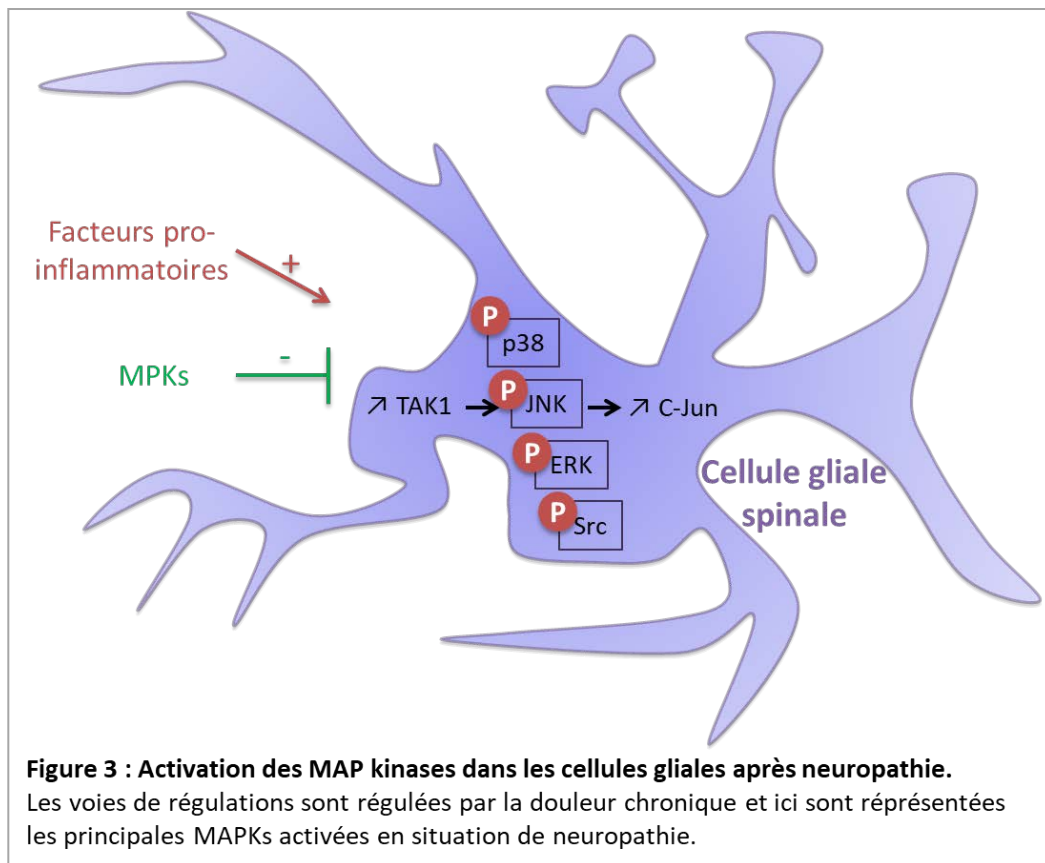
Les cellules gliales sont aussi impliquées dans un bon nombre de pathologies du système nerveux central. Par exemple, il a été montré que les astrocytes et les microglies changent d'état et deviennent actifs chez les patients atteints de maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington ou d'autres pathologies neurodégénératives (pour revues : Cartier et al., 2014; Cornejo and von Bernhardi, 2016; Joshi and Singh, 2017). Les astrocytes et surtout les microglies étant les principaux médiateurs de l'inflammation au niveau central, sont également impliqués dans des pathologies induisant une neuroinflammation comme les affections virales par des prions (pour revue, Aguzzi and Zhu, 2017). De même, il a été montré que ces cellules jouent un rôle important dans le développement des cancers comme les glioblastomes (pour revue, Dello Russo et al., 2017). Dans les différents exemples cités précédemment, les cellules gliales sont médiatrices mais aussi initiatrices de la pathologie. Des études ont mis en avant une activation gliale en conséquence de lésions traumatiques cérébrales, qui incluent les traumatismes crâniens, les arrêts vasculaires cérébraux ou encore les ruptures d'anévrisme. Dans ces cas, l'activation gliale n'est pas la cause de la maladie mais elle contribue à la persistance mais aussi

à l'apparition de nouveaux symptômes suite à l'accident (pour revue, Jassam et al., 2017). De même, les cellules gliales jouent un rôle dans les maladies métaboliques, et les microglies participent au développement et au maintien de l'obésité (pour revue, Kalsbeek et al., 2016).

Les cellules gliales sont donc des médiateurs d'un grand nombre de pathologies et constituent donc de potentielles cibles thérapeutiques pour traiter ces pathologies affectant le système nerveux central. En cas de douleur chronique, les neurones et les cellules gliales interagissent au sein d'une synapse tétrapartite dans la corne dorsale de la moelle épinière (Figure 2). Dans cette synapse, les neurotransmetteurs libérés par les terminaisons centrales des neurones primaires provoquent l'activation des astrocytes et des microglies; et réciproquement, les cellules gliales stimulent les neurones primaires et secondaires (Ji et al., 2013). Ces phénomènes contribuent au développement (1) de la sensibilisation périphérique, qui est une hyperexcitabilité et une sensibilisation des neurones périphériques, et aussi au développement (2) de la sensibilisation centrale, qui consiste à une exacerbation de la perception de la douleur lors de l'exposition à un stimulus nociceptif. La sensibilisation centrale est une conséquence d'une excitabilité neuronale accrue, associée à une diminution de l'inhibition de l'activité neuronale au niveau spinal (Latremoliere and Woolf, 2009; pour revue, Mélik Parsadaniantz et al., 2015).



Après une lésion ou un stimulus nociceptif, une cinétique précise des états d'activation des cellules gliales a été proposée (Ji et al., 2013). Celle-ci se décompose en 4 étapes : **(1)** une première étape, très précoce où ont lieux les changements de morphologie des cellules et changements d'expression des marqueurs gliaux. **(2)** Cette étape est succédée par une phosphorylation des mitogen-activated protein ou MAP kinases et des Src. Comme exemple, citons le cas des neuropathies qui induisent l'activation ou la phosphorylation de nombreuses MAPKs (Figure 3). Parmi celles-ci, on note la phosphorylation de p38 ; des extracellular signal-regulated kinases (ERK) ; et de c-Jun N-terminal kinases (JNK), ainsi que de l'activateur des JNK, le transforming growth factor-activated kinase 1 (TAK1) et de son effecteur c-Jun. L'activation de ces MAPKs joue un rôle essentiel dans le développement de la douleur chronique. En effet, des études utilisant des inhibiteurs de ces MAPKs ou des phosphatases (MPK ou MAPK phosphatases) ont montré une réduction significative des douleurs neuropathiques (Ji and Suter, 2007; Ji et al., 2009; Ndong et al., 2012). **(3)** En conséquence, une régulation des récepteurs, des canaux et des transporteurs gliaux est observée. Cette régulation aura pour conséquence **(4)** une régulation de la production et de la sécrétion de chimiokines, de cytokines et de facteurs de croissance gliaux (Ji et al., 2013). Ensemble, ces phénomènes contribuent à la persistance de la douleur chronique.



C. Les astrocytes et la microglie dans la douleur chronique

L'activation des cellules gliales et les interactions entre microglies, astrocytes et neurones constituent aujourd'hui des mécanismes clés dans le développement et la persistance de la douleur chronique. Divers facteurs sont à l'origine des douleurs chroniques, comme les blessures, les compressions, les infections, les inflammations ou les cancers. Suite à ces affections, l'activation des cellules gliales dans la moelle épinière est séquentielle. Les premières à être activées sont les cellules microgliales, suivies des astrocytes. Cela a particulièrement été mis en évidence par la cinétique d'activation de ERK dans les microglies et les astrocytes. Pour des cas de cancer osseux (Wang et al., 2012) et de lésion nerveuse (Zhuang et al., 2005), une activation ou phosphorylation précoce, à une semaine, de ERK a été observée dans les microglies de la moelle épinière, et progressivement, cette activation diminue dans les microglies et augmente dans les astrocytes. Cette cinétique particulière est également observable sur les niveaux d'expression des marqueurs cellulaires. Après une lésion nerveuse, l'expression du marqueur astrocytaire Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP) et du marqueur microglial Cluster of Differentiation 11b (CD11b), a été mesurée à différents moments après la lésion au niveau de la moelle épinière (Zhang and De Koninck, 2006). Il a été montré que le pic d'activation des microglies (CD11b) apparaît au jour 14 post-chirurgie, alors que celui des astrocytes (GFAP) n'apparaît qu'au jour 150. Cela montre une cinétique d'activation des astrocytes et microglies différente.

Les astrocytes joueraient un rôle dans le maintien de la douleur chronique (Ji et al., 2013). Les cellules microgliales, quant à elles, seraient activées très précocement et seraient responsables de la mise en place de la douleur chronique. Les cellules microgliales à l'état quiescent ont une forme étoilée, ramifiée et lors de leur activation, elles changent de conformation pour adopter une forme amoeboïde et migrent alors vers la portion de la moelle épinière contenant les afférences centrales des neurones lésés.

Le système immunitaire renforce la nociception en produisant de nombreux facteurs proinflammatoires. La [figure 4](#) résume les principales interactions cellulaires déjà décrites au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière dans une telle situation (pour revues, Grace et al., 2014; Ji et al., 2013; Mélik Parsadaniantz et al., 2015). Les neurones présynaptiques activés produisent du glutamate qui va activer les récepteurs perméables au calcium (Ca^{2+}), les AMPAR (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) et aussi les récepteurs ionotropiques du glutamate, les NMDAR (N-methyl-D-aspartate receptor) présents sur le neurone post-synaptique. Cela entraîne une entrée massive de Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique, sa dépolarisation et la génération d'un potentiel d'action. Le neurone présynaptique activé produit également des chimiokines qui elles vont activer la quasi-totalité des cellules présentes. En effet, on trouve des récepteurs aux chimiokines sur les microglies, les astrocytes et les neurones. Ces chimiokines activent les cellules gliales qui, en réponse, vont produire des cytokines pro-inflammatoires : interleukines 1β (IL- 1β), 6 (IL-6), le Tumor Necrosis Factor $\text{TNF}\alpha$; des dérivés actifs de l'oxygène (ROS); de l'ATP et de l'ADP ; et des chimiokines. La concentration élevée en médiateurs de l'inflammation va entraîner l'activation des cellules infiltrées: les lymphocytes T et les macrophages, qui, à leur tour vont sécréter des facteurs proinflammatoires. Le $\text{TNF}\alpha$ et l'IL- 1β présents dans la fente synaptique vont bloquer la recapture du glutamate par les transporteurs présents à la surface des astrocytes et qui ont pour but, en conditions physiologiques, de réguler les concentrations synaptiques en glutamate. En parallèle, les récepteurs TRPV1, TRPA1 présents sur les neurones présynaptiques sont sensibilisés par la neuroinflammation et ont leur seuil d'activation abaissé. Ensemble, avec les NMDAR aussi présents au niveau présynaptique, ces récepteurs entraînent une entrée massive d'ions calciques au niveau présynaptique qui va favoriser l'exocytose de vésicules glutamatergiques. La quantité élevée de glutamate induite par cette production élevée par les neurones, et l'absence de recapture par les astrocytes, contribue au maintien de l'excitation neuronale. De plus, les cellules endothéliales des vaisseaux de la barrière hématoencéphalique (BHE) portent également à leur surface des récepteurs des chimiokines. L'activation de ces récepteurs sur les cellules endothéliales induit l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules (intégrines, PECAM), qui vont permettre la migration transendothéliale de la

circulation sanguine vers le SNC. Cette perméabilisation de la BHE, permet une infiltration de macrophages et de lymphocytes T au niveau central. Ces cellules infiltrées sont aussi sensibles aux chimiokines, et vont répondre aux signaux pro-inflammatoires environnants en produisant également des molécules pro-inflammatoires et donc activer encore plus le système nociceptif.

En cas de neuropathie, les cellules microgliales participent directement au développement de la douleur. Il a été montré, dans des modèles animaux, que l'utilisation de cytokines anti-inflammatoires ou d'inhibiteurs microgliaux tels que la minocycline (Mika et al., 2007; Sorge et al., 2015), la pentoxifylline (Raghavendra et al., 2003), le fluorocitrate (Sorge et al., 2015) ou la propentofylline (Sorge et al., 2015), réduit la douleur neuropathique (Ji et al., 2013; Mika, 2008 pour revues).

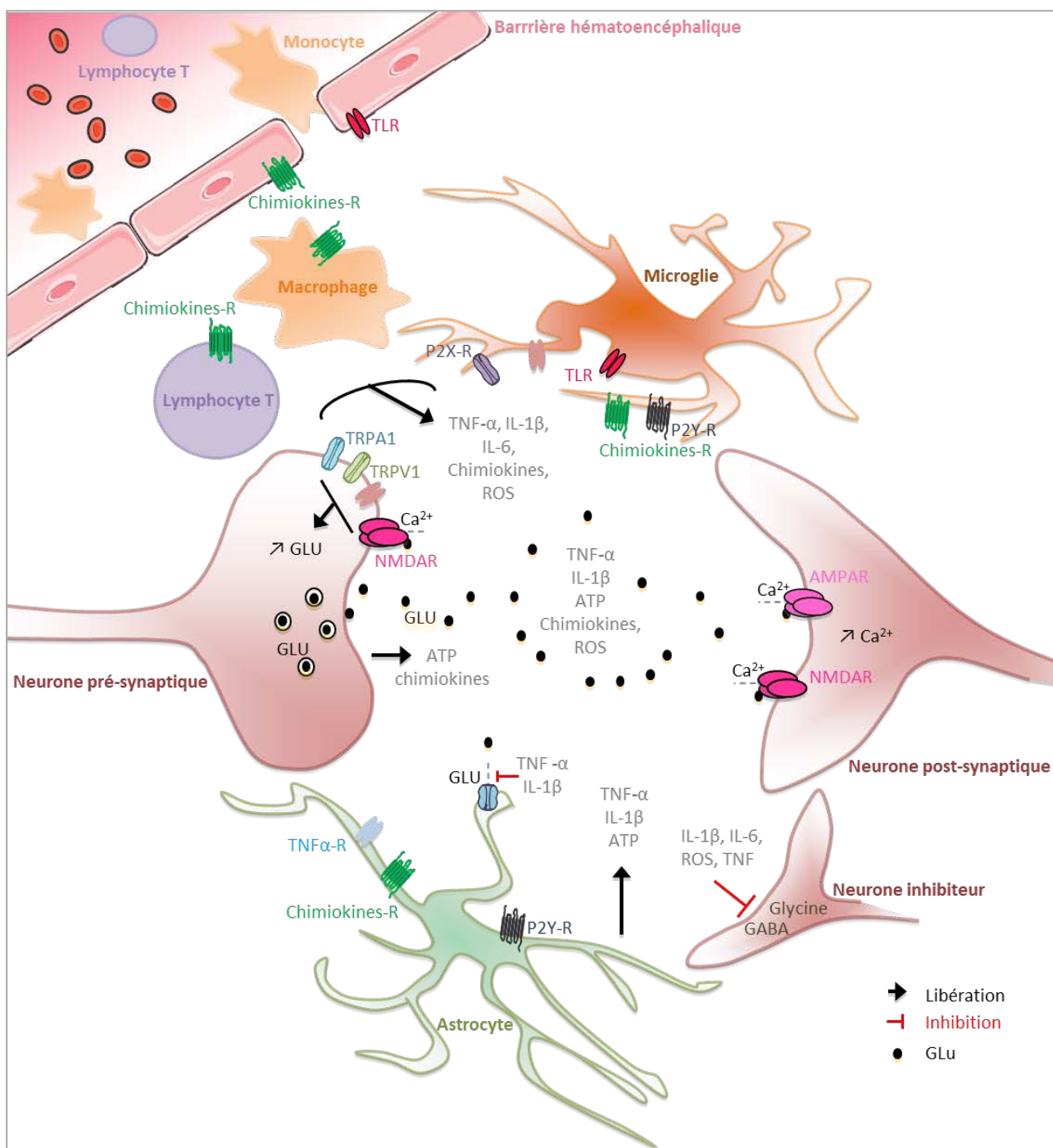


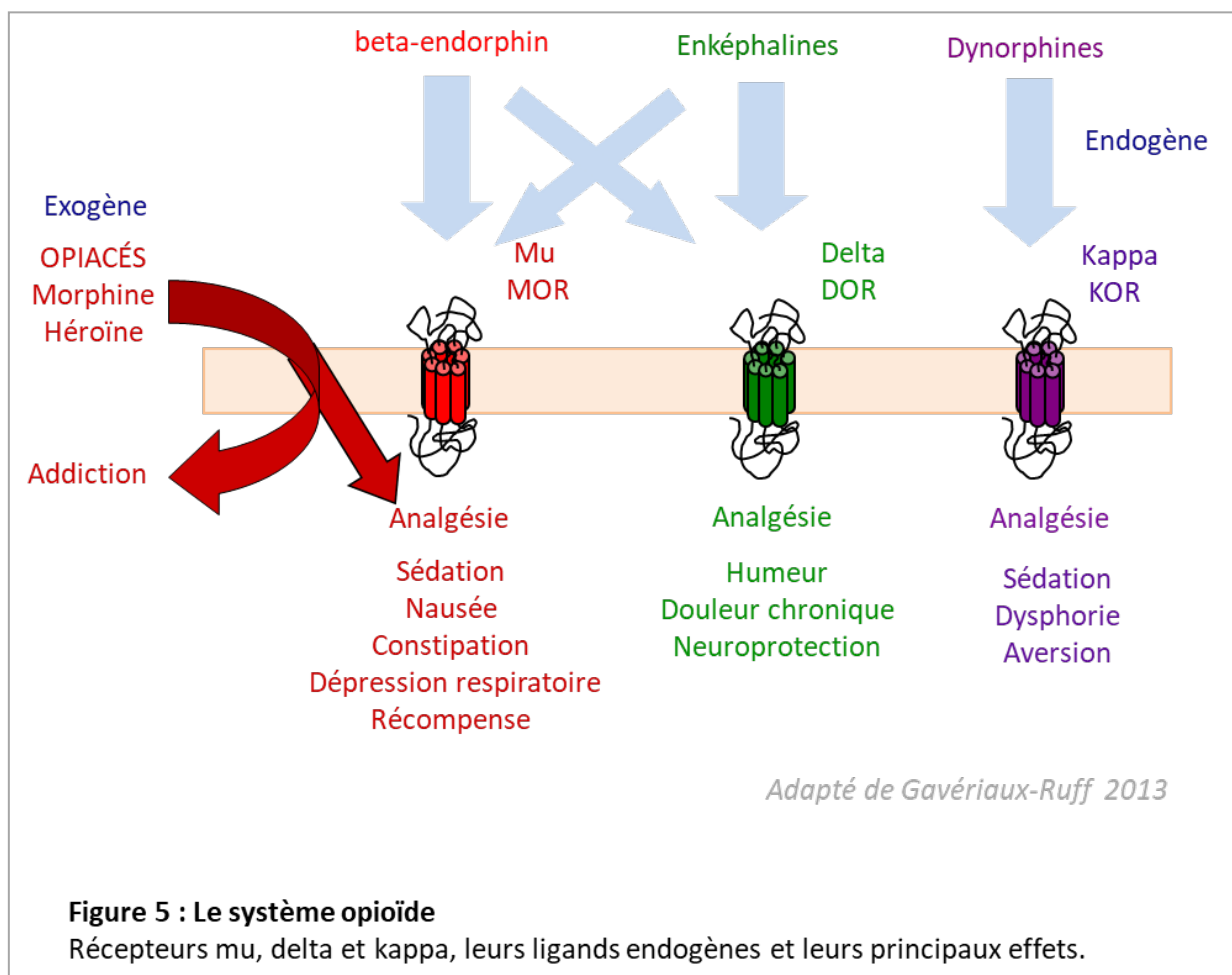
Figure 4: Interactions cellulaires dans la corne dorsale de la moelle épinière en situation de douleur chronique

En cas de douleur chronique, les cellules de la tétrasynapse sont activées et produisent des facteurs proinflammatoires comme les chimiokines, les cytokines, des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) qui contribuent au développement et au maintien de cet état de neuroinflammation et de sensibilisation.

III. Le système opioïde

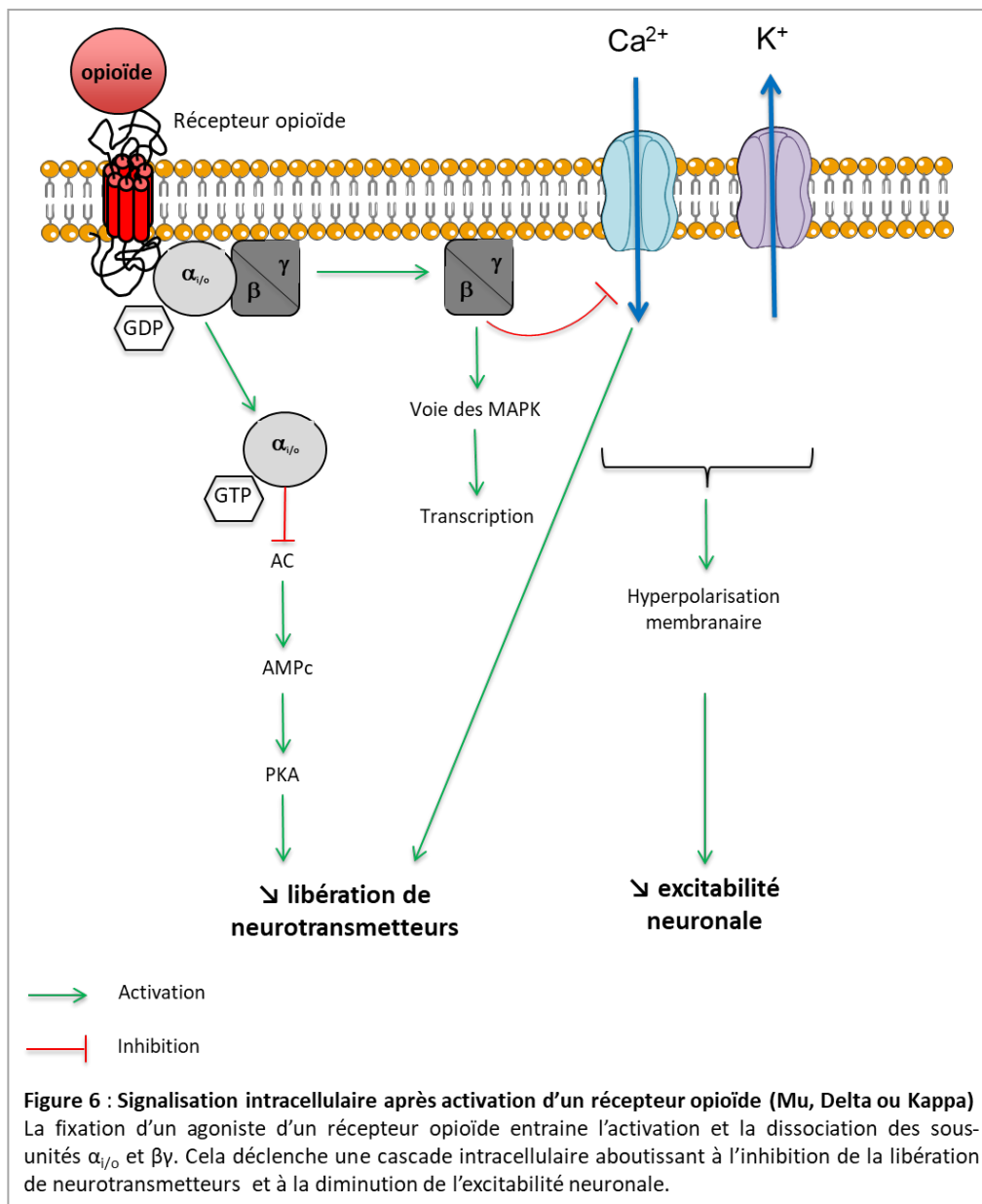
A. Composition

Le système opioïde est composé des récepteurs Mu (MOR), Delta (DOR) et Kappa (KOR). Ils appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), et plus particulièrement à la protéine Gi/0. En plus de ces récepteurs, le système opioïde est aussi composé de peptides endogènes qui sont les dynorphines, les enképhalines et les endorphines (Akil et al., 1998; Gavériaux-Ruff, 2013). Le système opioïde intervient dans diverses fonctions physiologiques (Figure 5) allant de la régulation de la respiration (Lalley, 2008), du système cardiovasculaire (Saraiva et al., 2004), du système digestif (Mehendale and Yuan, 2006), de la thermorégulation (Rawls et al., 2005), de l'immunité, à la régulation des processus régissant les émotions (Drolet et al., 2001).



B. Fonctionnement

Les récepteurs opioïdes sont des récepteurs couplés aux protéines G constituées des sous unités α_i/o ; β et γ . Suite à l'activation du récepteur, la sous-unité α se dissocie des sous-unités β - γ . La sous-unité α_i/o se couple à du GTP et va empêcher l'adénylate cyclase (AC) d'exercer ses fonctions, c'est-à-dire catalyser la formation d'AMPc à partir de l'ATP. La concentration en AMPc dans le cytosol diminue considérablement ce qui empêche l'activation de la PKA (Protéine kinase AMPc dépendante) et empêche la phosphorylation de canaux ioniques, récepteurs membranaires ou protéines cytoplasmiques. Cela diminue l'excitabilité de la cellule, et dans le cas d'un neurone, diminue aussi la libération de neurotransmetteurs (Figure 6).



Le [tableau 1](#) liste quelques ligands du système opioïde utilisés dans les études précliniques ainsi que leur cible pharmacologique.

Nom du composé	Activité	Spécificité
morphine	agoniste	MOR (Ki ~10nM vs ~1000 nM pour DOR ou KOR)
DAMGO	agoniste	MOR (Ki ~1nM vs ~1000 nM pour DOR ou KOR)
SNC80	agoniste	DOR (Kd <1nM)
U-50,488h	agoniste	KOR (Kd <1nM vs 1000nM pour MOR)
naltrexone	antagoniste	MOR-DOR-KOR (Ki ~1-10nM)
naloxone	antagoniste	MOR-DOR-KOR (Ki ~1-10nM)
CTOP	antagoniste	MOR (Kd <1nM)
naltrindole	antagoniste	DOR (Ki ~0,01nM vs >10nM pour DOR ou MOR)
norBNI	antagoniste	KOR (Ki <0,1nM vs >1nM pour DOR ou MOR)

Tableau 1: Ligands des récepteurs opioïdes couramment utilisés en préclinique

Références: (Hawkins et al., 1989; Lahti et al., 1982; Negus et al., 1998; Schmidt et al., 1985; Williams et al., 2001)

C. Le système opioïde et la douleur

L'effet analgésique des opiacés est connu depuis des siècles et les premières descriptions d'usage d'opium, extrait du pavot somnifère (*Papaver somniferum*), remontent à l'Égypte antique. Outre ses puissants effets analgésiques, l'opium présente également des propriétés psychotropes euphorisantes. La morphine a été identifiée comme le constituant analgésique le plus puissant de l'opium et est largement utilisée en clinique pour lutter contre les douleurs sévères.

L'effet analgésique des opioïdes est dû à l'activation des récepteurs opioïdes mu (MOR), delta (DOR) et kappa (KOR). Ces récepteurs sont aussi activés par les peptides opioïdes endogènes enképhalines, β -endorphines et dynorphines, et constituent avec ces peptides le système opioïde endogène (Charbogne et al., 2014). L'activation de ces récepteurs mène généralement à une inhibition de l'influx calcique, ce qui entraîne une inhibition du neurone. Le clonage des gènes de ces récepteurs a permis d'identifier *Oprm1*, *Oprd1* et *Oprk1* comme étant respectivement les gènes codants pour MOR, DOR et KOR. Ces études ont mené à la connaissance de la distribution de l'expression de ces récepteurs le long des voies nociceptives, mais aussi dans l'ensemble du système nerveux. Ces trois récepteurs présentent une grande homologie de séquence et induisent tous trois de l'analgésie, mais possèdent également des propriétés distinctes (Figure 5) (Pradhan et al., 2011).

De nos jours, le récepteur mu est le mieux caractérisé des récepteurs opioïdes et le plus ciblé en clinique pour lutter contre la douleur.

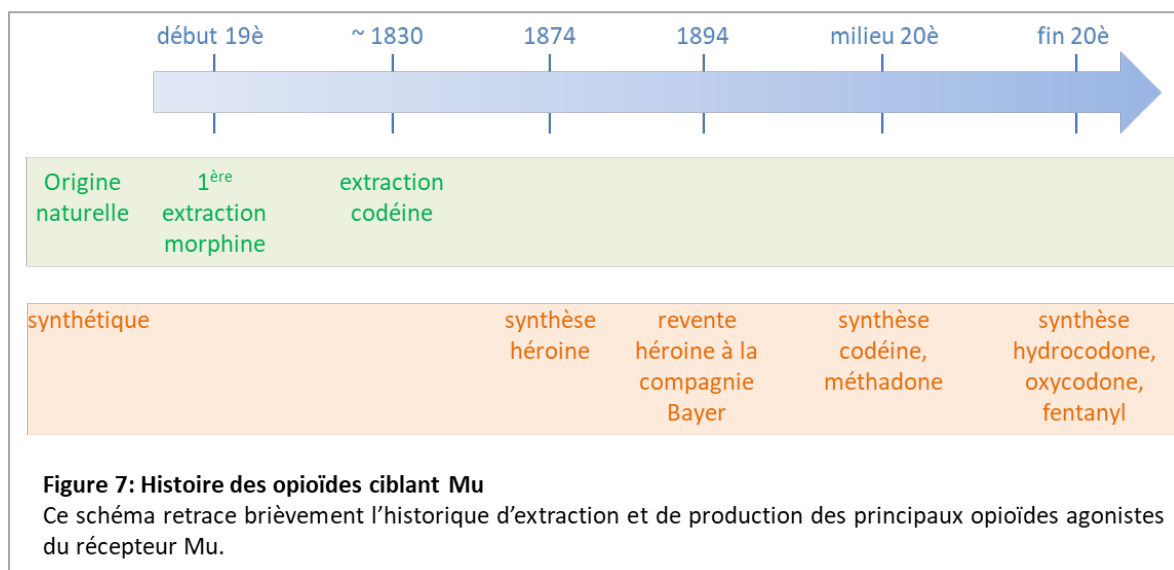
D. Les analgésiques opiacés et leurs effets secondaires

Etant donné que les seuls opiacés antidouleurs sur le marché ciblent le récepteur Mu, nous nous focaliserons sur les effets secondaires des agonistes Mu dans cette partie.

Malgré le fait qu'il existe de nombreux agonistes du récepteur Mu, d'origine naturelle ou de synthèse, le référent reste la morphine (pour revue, Chan et al., 2017). La morphine a été extraite pour la première fois de l'opium 1809 par Friedrich Sertürner (Figure 7) (Brownstein, 1993). C'est un alcaloïde issu du pavot somnifère (*Papaver somniferum*). Elle a été massivement utilisée pour soigner les blessés au front. Quelques années plus tard, dans les années 1830, la forme naturellement méthylée de la morphine, la codéine est extraite. En 1874, un scientifique anglais synthétise l'héroïne et décide de la revendre à la firme pharmaceutique Bayer en 1894, qui l'utilise à des fins thérapeutiques, pour mieux prendre en charge la douleur. Seulement, les patients présentent des effets secondaires, dont une forte dépendance physique. Afin d'obtenir des traitements antidouleurs moins addictifs, au cours du

20^{ème} siècle, des chimistes synthétisent la méthadone et la codéine. Enfin, à la fin du 20^{ème} siècle sont synthétisés d'autres dérivés opioïdes apparentés à la morphine comme l'hydrocodone, l'oxycodone, ou le fentanyl. L'histoire des opioïdes Mu s'est étendue sur de nombreuses années, mais au final, c'est la morphine, première extraite de l'opium, qui reste l'opiacé de référence.

Comme abordé précédemment, l'activation du récepteur Mu s'accompagne d'effets secondaires. Parmi ceux-ci, le plus connu est l'addiction et le développement d'une dépendance physique des consommateurs (Webster, 2017, pour plus de détails, cf [chapitre 2](#)). Mais d'autres effets secondaires

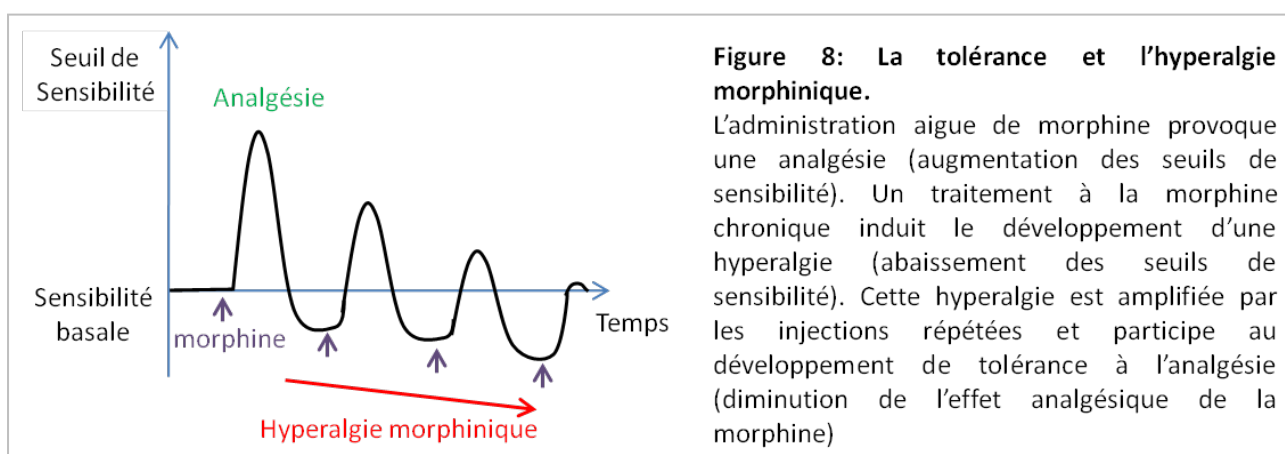


rendent les traitements avec ces molécules délicats. On note, par exemple, l'apparition de dépression respiratoire (Houmes et al., 1992) lors de l'utilisation d'opiacés à des fins anesthésiantes. Chez les patients sous traitement, des effets affectant le système digestif ont aussi été décrits. Les opiacés induisent un ralentissement du transit intestinal ainsi qu'une déshydratation des selles mène à la constipation (Sridharan and Sivaramakrishnan, 2017). En parallèle, les patients ressentent des nausées pouvant mener au vomissement (Chinachoti et al., 2013). Ensemble, ces effets entraînent une perte de poids des patients et donc une détérioration de la santé déjà affaiblie des malades. Enfin, la morphine et ses dérivés possèdent des propriétés sédatives pouvant rendre difficile l'exercice d'activités du quotidien.

Les patients sont également sujets au développement d'hyperalgie et de tolérance à l'analgésie. Ces derniers aspects sont particulièrement développés dans la partie suivante, et la revue Roedel et al., 2016.

E. L'hyperalgie induite par les opiacés (OIH) – revue (Roeckel et al., 2016)-

L'hyperalgie et la tolérance à l'analgésie morphinique sont des phénomènes liés aux effets antinociceptifs de la morphine. Les traitements chroniques aux opiacés peuvent entraîner le développement d'une tolérance à l'analgésie qui résulte en l'obligation d'augmenter les doses pour maintenir l'effet analgésique. La tolérance analgésique est décrite par certains comme étant une conséquence directe de l'hyperalgie : le seuil de sensibilité étant abaissé en cas d'hyperalgie, il paraît logique que l'effet analgésique de la morphine sur un fond sensibilisé ne permette pas d'atteindre les seuils de sensibilité élevés atteints lors de la première administration de morphine, soit lorsqu'il n'y avait pas d'hypersensibilité (pour revue, Roeckel et al., 2016). Cependant, ce lien de cause à effet de l'hyperalgie et de la tolérance morphinique reste encore discuté. En effet, dans notre étude, nous avons montré que la diminution de l'effet analgésique au dernier jour d'un traitement morphinique est plus élevée que l'hypersensibilité mesurée ce même jour, avant injection de morphine (Figure 8) (Roeckel et al., 2017). L'étude de Ferrini et al. 2013 montre également qu'il est possible de dissocier expérimentalement la tolérance et l'hyperalgie opioïde (Ferrini et al., 2013). Pour résumé, le delta de tolérance analgésique semble plus important que le delta d'hyperalgie.



Revue :

« opioid-induced hyperalgesia: cellular and molecular mechanisms »

REVIEW

OPIOID-INDUCED HYPERALGESIA: CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS

LAURIE-ANNE ROECKEL,^{a,b,c,d,†} GLENN-MARIE LE COZ,^{e,†}
CLAIRE GAVÉRIAUX-RUFF^{a,b,c,d,f,‡} AND
FRÉDÉRIC SIMONIN^{e,‡,*}

^a Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire,
Illkirch, France

^b Université de Strasbourg, Illkirch, France

^c Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104,
Illkirch, France

^d Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale,
U964, Illkirch, France

^e Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR 7242
CNRS, Université de Strasbourg, Illkirch, France

^f Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Université
de Strasbourg, France

Abstract—Opioids produce strong analgesia but their use is limited by a paradoxical hypersensitivity named opioid-induced hyperalgesia (OIH) that may be associated to analgesic tolerance. In the last decades, a significant number of preclinical studies have investigated the factors that modulate OIH development as well as the cellular and molecular

mechanisms underlying OIH. Several factors have been shown to influence OIH including the genetic background and sex differences of experimental animals as well as the opioid regimen. Mu opioid receptor (MOR) variants and interactions of MOR with different proteins were shown important. Furthermore, at the cellular level, both neurons and glia play a major role in OIH development. Several neuronal processes contribute to OIH, like activation of neuroexcitatory mechanisms, long-term potentiation (LTP) and descending pain facilitation. Increased nociception is also mediated by neuroinflammation induced by the activation of microglia and astrocytes. Neurons and glial cells exert synergistic effects, which contribute to OIH. The molecular actors identified include the Toll-like receptor 4 and the anti-opioid systems as well as some other excitatory molecules, receptors, channels, chemokines, pro-inflammatory cytokines or lipids. This review summarizes the intracellular and intercellular pathways involved in OIH and highlights some mechanisms that may be challenged to limit OIH in the future.

This article is part of a Special Issue entitled: Pain. © 2016 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: opioid-induced hyperalgesia, morphine, opiates, mu-opioid receptor, neuroinflammation, pain.

*Correspondence to: F. Simonin, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR 7242 CNRS/UDS, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, 300, Boulevard Sébastien Brant, BP 10413, 67412 Illkirch Cedex, France. Fax: +33-368-85-46-83.

E-mail address: simonin@unistra.fr (F. Simonin).

[†] Co-first authors.

[‡] Co-senior authors.

Abbreviations: 5-HT, serotonin; β 2-AR, β 2-adrenergic receptor; β -FNA, β -funaltrexamine; BDNF, brain derived neurotrophic factor; CCK, cholecystokinin; CNS, central nervous system; CxCR, chemokine receptor; CxCL, chemokine; DAMGO, Tyr-D-Ala-Gly-NMe-Phe-Gly-ol; DOR, delta-opioid receptor; DRG, dorsal root ganglia; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GABA, gamma aminobutyric acid; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GLT-1, glutamate transporter 1; GPCR, G protein coupled receptor; HDAC, histone deacetylase; icv., intracerebroventricular; IL-1 β , interleukin-1 β ; IL, interleukin; it., intrathecal; JNK, c-Jun N-terminal kinase; KCC2, K⁺/Cl[−] cotransporter; LPS, lipopolysaccharide; LTP, long-term potentiation; M3G, morphine-3-glucuronide; M6G, morphine-6-glucuronide; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MOR, mu-opioid receptor; mTOR, mammalian target of rapamycin; NF- κ B, nuclear factor κ B; NMDA, N-methyl-D-aspartic acid; NPFF, neuropeptide FF; NOP, nociceptin; OIH, opioid-induced hyperalgesia; OFQ, orphanin FQ; PAG, periaqueductal gray matter; PKC, protein kinase C; PKA, protein kinase A; PLC, phospholipase C; PNS, peripheral nervous system; PTX, pertussis toxin; RVM, rostral ventral medulla; S1P, sphingosine-1-phosphate; sc., subcutaneous; SDF-1, stromal derived factor 1; SNL, sciatic nerve ligation; TLR4, toll like receptor 4; TM, transmembrane domain; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; TrkB, tyrosine kinase B; TRPM8, transient receptor potential member 8; TRPV1, transient receptor potential vanilloid 1.

Contents

Introduction	161
Factors influencing OIH	162
The role of MOR	162
Mu receptor variants	162
Functional interactions of MOR with other GPCRs	163
MOR heterodimers and OIH	163
G protein activation	163
Pharmacological blockade of MOR	164
Other factors influencing OIH	164
Sex	164
Genetic background	164
Opiate regimen	165
Opiate metabolites	165
Mechanisms and targets described for OIH at the neuronal level	165
Mechanisms described for OIH	165
Long-term potentiation (LTP)	165
Hyperalgesic priming	166
Descending pain facilitation	166
Molecular targets described for OIH	167
NMDA – glutamatergic system	167
K ⁺ /Cl [−] cotransporter (KCC2) and Cl [−] homeostasis	167
Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)	167
Transient receptor potential member 8 (TRPM8)	168

5HT-3 receptor	168
EphrinB receptors	168
mammalian target of rapamycin (mTOR)	168
Neuroinflammatory mechanisms in OIH	168
Astrocytes and microglia contribution to OIH	170
Molecular actors of OIH in neuroinflammatory cells	170
Toll like receptor 4 (TLR4)	170
Cytokines, chemokines and chemokine receptors	172
ATP, P2X4 receptor and BDNF	172
Tachykinin NK1 receptor	172
Sphingolipid ceramides	172
Superoxides and peroxynitrites	173
Other systems involved in OIH	173
Anti-opioid peptides	173
GPCRs and intracellular pathways	173
Epigenetics as a novel mechanism for OIH	174
Conclusion	174
Acknowledgments	175
References	175

INTRODUCTION

Chronic pain is a major health issue in our society that clearly impacts quality of life. 30–40% of the population in United States, and equivalent in Europe, suffer from chronic pain and its total cost has been estimated at 560–635 billion dollars annually (see [Renfrey et al., 2003](#); [Breivik et al., 2006, 2013](#); [Johannes et al., 2010](#)). Even if research progresses and new targets appear for treating acute and chronic pain, opioids still represent the gold standard analgesics. However, opioid treatments induce several adverse side effects among which analgesic tolerance and opioid-induced hyperalgesia (OIH) are of major importance. Analgesic tolerance corresponds to a progressive decrease of analgesia produced by a given dose of opiate upon chronic administration, resulting in the need to increase the opiate dosage in order to maintain the initial analgesic effect. OIH refers usually to the development of hypersensitivity to painful stimuli observed upon chronic opiates administration. Therefore, the treatment supposed to relieve the patient's pain will, in an opposite way, generate a more exacerbated pain sensation. In clinic, these two phenomena are conflicting since the development of analgesic tolerance will lead to increase opiate dosage, which in turn will induce an enhancement of OIH. In this review we will focus our discussion on OIH, observed in both human and animal models (see [Angst and Clark, 2006](#), see [Silverman, 2009](#), see [Crofford, 2010](#); [Chen et al., 2014](#); [Johnson et al., 2014](#); [Hayhurst and Durieux, 2016](#)). OIH is well established in humans in different types of pain such as post-surgical pain ([Fletcher and Martinez, 2014](#)), low back pain ([Chu et al., 2006](#)), cancer pain ([Carullo et al., 2015](#)), musculoskeletal pain ([Crofford, 2010](#)), but also in healthy volunteers (see [Fishbain et al., 2009](#), see [Ruscheweyh et al., 2011](#); [Mauermann et al., 2016](#)) and opioid addicts ([Compton et al., 2001](#)). Hence, the clinician faces a dilemma to treat or not chronic pain with opioids, known to have a beneficial effect at first, with a risk of noxious consequences.

In clinic, diverse strategies are used in order to reduce OIH. First, the practitioner can change the type of opiate

used, i.e. opiate switching, in order to limit the side effects due to a specific opiate (see [Mercadante and Arcuri, 2005](#), see [Mercadante and Bruera, 2016](#)). This alternative is used in 21 to 44% of patients with cancer pain and considered successful when the pain felt is decreased of at least 33% ([Mercadante et al., 2009](#)). Another possibility is to block the glutamatergic system, which is known to be implicated in OIH (see [Lee et al., 2011](#)). Ketamine, a classical antagonist of a glutamate receptor, has been shown to be effective in preventing the development of OIH (see [Ramasubbu and Gupta, 2011](#)), however its chronic administration also produces adverse side effects ([Cvrcek, 2008](#)). Finally, usage of non-opioid medication including pregabalin, propofol or cyclooxygenase 2 (COX2) inhibitors can be efficient to prevent OIH (see [Lee et al., 2011](#)), but clinical data are limited.

Although well characterized in humans, OIH has been less studied than analgesic tolerance in preclinical models. Most opiate molecules commonly used in clinic have been shown to induce OIH, such as morphine, fentanyl and remifentanyl (see [Angst and Clark, 2006](#)). Moreover, heroin also leads to OIH, as shown in heroin-dependent users before and under methadone or buprenorphine maintenance therapy ([Compton et al., 2012](#)). However, the kinetic of action, metabolism and potency of the different opiate molecules can greatly influence the strength and rapidity of OIH development. Morphine, fentanyl and methadone are strong agonists of the mu-opioid receptor (MOR), when codeine and oxycodone for example are considered as moderate agonists. In addition, morphine has a low intrinsic efficacy whereas fentanyl has a high intrinsic efficacy ([Duttaroy and Yoburn, 1995](#)). Therefore, switch from moderate to strong agonists and from low to high intrinsic activity agonists may diminish the adverse side effects and increase the potency of the analgesia.

As in humans, diverse opiates can produce OIH in preclinical models, including fentanyl ([Celerier et al., 2000](#)), remifentanyl ([Aguado et al., 2015](#)), morphine ([Mao et al., 1994](#) and references cited in [Table 2](#)), and codeine ([Johnson et al., 2014](#)). In addition, OIH can also be induced by Tyr-D-Ala-Gly-NMe-Phe-Gly-ol (DAMGO), a synthetic opioid peptide selectively activating MOR ([Drdla et al., 2009](#)). Different animal models are available to study OIH. For example, a single fentanyl injection will induce OIH for two to three days ([Elhabazi et al., 2012](#); [Laboureyras et al., 2014](#)), repeated morphine administrations will induce long lasting OIH with a return to basal nociceptive threshold around 10 days after the last administration ([Richebe et al., 2005](#); [Elhabazi et al., 2014](#)), and after 6 days of daily injections of 1 µg of DAMGO in the paw, mice develop hypersensitivity to mechanical stimuli ([Rowan et al., 2014a](#)). These models enable to identify the molecular mechanisms underlying OIH as well as to find novel molecules that block its development.

Although OIH is not yet completely understood, different mechanisms have been identified for this adaptive process including sensitization of primary afferent neurons and enhanced release of glutamate by these primary afferents, hyperexcitability of second

order neurons to excitatory neurotransmitters, and up-regulation of nociceptive neuromodulators by descending pain controls (see [Chu et al., 2008](#), see [Lee et al., 2011](#)). More recently, not only neurons but also glial cells have been shown to participate, being activated concomitantly with OIH and involving diverse targets and receptors on both microglia and astrocytes (see [Hutchinson et al., 2011](#)). These mechanisms are summarized in [Fig. 1](#).

In this review we will focus non-exhaustively on the different factors that can influence OIH as well as on the newest mechanisms discovered over the last decade, in term of cellular and molecular implication.

FACTORS INFLUENCING OIH

The role of MOR

Mu receptor variants. The MOR is the main target of opiates used in clinic ([Matthes et al., 1996](#)). MOR activation leads to analgesia, but also to adverse effects such as hyperalgesia (see [Lee et al., 2011](#)). It has been proposed that these two opposite effects are due to specific isoforms of the receptor. MOR is a seven transmembrane domain (7TM) G protein-coupled receptor (GPCR) encoded by the *OPRM1* gene in humans, named *Oprm1* in mouse. Since its initial molecular characterization as a 7TM receptor encoded by 4 exons, several variants have been discovered (see [Law et al., 2013](#), see [Pasternak and Pan, 2013](#); [Convertino et al., 2015](#)). In humans, alternative splicing mechanisms result in 7TM, 6TM and 1TM receptor variants. The role of these variants, their relative

expression levels as well as distribution in the human nervous system, have not been extensively explored yet. However, 6TM MOR is studied because of its peculiar properties on nociception. The 6TM isoform lacks residues in the N-terminal region corresponding to the extracellular tail and first transmembrane domain. Activation of the 6TM receptor induces excitatory cellular effects by activating Gs ([Gris et al., 2010](#)), while activation of the 7TM receptor inhibits neurons because of Gi activation. Moreover specific silencing of MOR-1K variant in mice led to a decrease of morphine-induced hyperalgesia compared to wild-type animals suggesting that the Gs coupling of this 6TM MOR isoform could be important for the development of OIH ([Convertino et al., 2015](#); [Oladosu et al., 2015](#)). From these results, it was hypothesized that specific MOR isoforms could be involved in OIH while the classical 7TM receptor would be responsible for analgesia. Interestingly, a β_2 -adrenergic (β_2 -AR) antagonist reversed hyperalgesia induced either by chronic morphine or by a 6TM-MOR selective agonist in mice suggesting that the β_2 -AR antagonist disrupts the 6TM-MOR- β_2 -AR heterodimer signaling producing OIH ([Samoshkin et al., 2015](#)). These new findings may be put in relation to previous genetic analyses that identified a haplotype block containing the β_2 -AR that was associated to OIH ([Liang et al., 2006](#)).

Interestingly, patients display differential reactions to morphine in relation to their genetic variability ([Lotsch and Geisslinger, 2010](#)). For example, patients homozygous for *OPRM1* (mu receptor) gene A118G show less analgesia to morphine (see [De Gregori et al., 2012](#)).

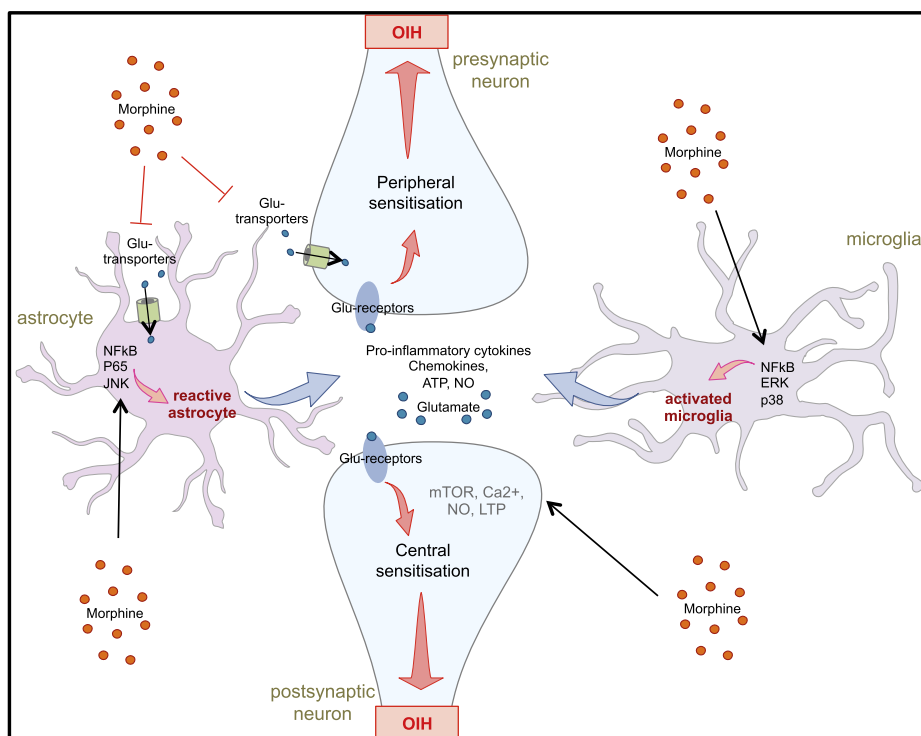


Fig. 1. Tetrasynapse activation contributes to OIH. Morphine activates neurons, astrocytes and microglia by inhibiting glutamate recapture and inducing production of pro-inflammatory molecules. In response to its activation, each cell will produce more excitatory substances such as pro-inflammatory chemokines, cytokines, ATP or NO contributing to the establishment and the maintenance of OIH. ERK, Extracellular signal-regulated kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; NFkB, nuclear factor kappa B; NO, nitric oxide; LTP, long-term potentiation.

These findings suggest that a case-by-case analysis and understanding of OIH in patients may help solving this problem.

Finally, MOR is known to be present in the central and peripheral nervous systems (CNS, PNS). The analgesic effects of MOR activation on either CNS or PNS have been explored, and the analysis of mice with a conditional MOR deletion in peripheral Nav1.8+ sensory neurons has revealed the involvement of these receptors in opioid-induced analgesia (Weibel et al., 2013, see Stein, 2016). In the future, the investigation of particular opioid receptor populations or splice variants in OIH may be determined by using similar genetic approaches and/or injection of opioids in specific areas.

Functional interactions of MOR with other GPCRs. In case of tolerance to analgesia, desensitization of MOR has been observed (see Dang and Christie, 2012, see Williams et al., 2013). Desensitization corresponds to molecular changes in receptor signaling following repeated exposure to agonists, resulting in a loss of effectiveness or a biased answer to agonist binding (Dang and Christie, 2012; Williams et al., 2013). Two types of desensitization can be distinguished, homologous desensitization, i.e. the activation of a receptor type provokes its own desensitization (i.e. MOR activation desensitizes MOR), and heterologous desensitization when the activation of another receptor desensitizes MOR. Heterologous desensitization has been described between MOR and chemokine receptors (CxCrRs) above all (see Melik Parsadaniantz et al., 2015). For instance, Heinisch and collaborators studied MOR–CxCr4 and MOR–CxCr1 interactions in the periaqueductal gray matter (PAG), and recorded heterologous desensitization of these receptors by whole cell patch clamp electrophysiology (Heinisch et al., 2011). Neurons treated with the respective CxCr4 or CxCr1 agonists CXCL12 or CX3CL1 displayed decreased morphine-induced electrophysiological activity *in vitro*. In addition, intraspinal CXCL12 administration diminished morphine analgesia, while a CXCR4 antagonist potentiated morphine analgesia, revealing a role for a MOR–CxCr4 crosstalk in the spinal cord *in vivo* (Rivat et al., 2014). From a molecular point of view, CxCrRs activate protein kinase C (PKC), which phosphorylates the intracytoplasmic tail of MOR (see Williams et al., 2013). Different mechanisms occur for homologous and heterologous MOR phosphorylation on different serine or threonine residues, which have been reviewed recently (see Mann et al., 2015). MOR phosphorylation uncouples MOR from Gi. Then, G protein receptor kinase (GRK) and arrestin are recruited to MOR, leading to MOR internalization and therefore to analgesic tolerance (see Williams et al., 2013). CxCr activation can also lead to activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway that decreases nociceptive thresholds and hence induces hyperalgesia (see Melik Parsadaniantz et al., 2015).

MOR heterodimers and OIH. As a member of the family of GPCRs, MOR can interact with other GPCRs and form heterodimers (Gomes et al., 2013). High hopes are awarded to the comprehension of opioid receptors

heterodimers function. Delta-opioid receptor (DOR) may be involved in OIH, and contrasting results have been obtained on the role of DOR in analgesic tolerance. Indeed, pretreatment with DOR antagonists reversed analgesic tolerance (Beaudry et al., 2015), while tolerance was lost or maintained in DOR knockout mice (Zhu et al., 1999; Scherrer et al., 2009). Heterodimers of MOR and DOR receptors have been characterized, and novel ligands have been developed with mu-agonist and delta-antagonist properties that produce longer analgesia (Harland et al., 2015) or analgesia without development of tolerance (Mosberg et al., 2014). The interaction between MOR and DOR remains a field of investigation and the novel pharmacology of MOR–DOR heterodimers has been reviewed recently (see Ong and Cahill, 2014, see Fujita et al., 2015). Also, a synergy between MOR and α 2-adrenoreceptors was evidenced for analgesia and analgesic tolerance (Milne et al., 2008; Chabot-Dore et al., 2015). MOR heterodimers with other GPCRs have been mainly described in cellular assays. However, some of them have been evidenced *ex vivo* by either physical association or co-localization in neurons, as recently reviewed (see Massotte, 2015). These findings are of great interest because they open a new field of development for analgesic drugs with potency comparable to MOR agonists, but devoid of tolerance and OIH induced by classical opiates. However, the influence of MOR heterodimers on OIH and the capacity of new ligands targeting these heterodimers to limit the development of OIH remain mostly unknown.

G protein activation. Another mechanism underlying OIH consists in a potential shift of MOR coupling from Gi to Gs. Analgesic properties of MOR are initiated by Gi activation in neurons, resulting in neuron hyperpolarization and inhibition of nociception. This classical MOR Gi-mediated pathway seems to be counteracted in OIH by other signaling pathways. Under L5–L6 spinal nerve ligation (SNL)-induced neuropathic condition, MOR coupling to Gs increases in the spinal cord, repeated oxycodone augments SNL-induced MOR–Gs coupling and ultra-low-dose naltrexone attenuates this Gs coupling, as well as oxycodone-evoked OIH (Largent-Milnes et al., 2008). The role of Gs has also been evidenced by the use of the Gi protein signaling-disrupter pertussis toxin (PTX). PTX treatment induces ADP-ribosylation of Gi proteins and therefore prevents their interaction with GPCRs, leading to increased coupling of MOR to Gs protein. Hyperalgesia induced by acute morphine is correlated with an increase of spinal MOR coupling to Gs, and is reversed by ultra-low dose of naloxone (Tsai et al., 2009). In contrast, Gi was found involved rather than Gs in the periaqueductal gray of mice by using an OIH paradigm induced by ultra-low dose of morphine (Bianchi et al., 2009). Further, G α 1–3 and G α o1 are necessary in this OIH paradigm, as shown by an antisense oligodeoxynucleotide approach (Bianchi et al., 2011). Altogether these data indicate that Gi and Gs involvement in OIH may depend upon the dose and chronicity of morphine, as well as on the nervous system site under study.

Pharmacological blockade of MOR. Because opiates are MOR agonists, and as analgesic tolerance and OIH occur following prolonged treatments with opiates, the prevention of OIH by opioid antagonists has been investigated. Two opioid receptor antagonists were mainly used: naloxone and naltrexone. These compounds displayed no effect on the nociceptive threshold when they were administered alone under non-pathological conditions but efficiently blocked opioid-induced analgesia (Celerier et al., 1999; Juni et al., 2006; Corder et al., 2013; Sanna et al., 2014, 2015a). A pre-treatment with naloxone or with the selective MOR antagonist D-Phe-Cys-Tyr-D-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂ (CTOP) prevented low-dose opiate OIH (Sanna et al., 2014, 2015a,b), thereby demonstrating MOR involvement in the development of this acute hyperalgesia. In the other way, naltrexone did not prevent and even aggravate OIH when using 1.6 or 10 mg/kg morphine pellets (Juni et al., 2006). Also, naltrexone induced hyperalgesia when it was administered before a morphine analgesic dose (Swartjes et al., 2012). These studies used different protocols for inducing hyperalgesia and for measuring nociception as well as naltrexone vs naloxone (Table 1) that may explain the divergent results.

MOR has been shown mandatory for morphine analgesia (see Gaveriaux-Ruff, 2013, see Pasternak and Pan, 2013) but its role in OIH is still unclear as shown in Table 1 with the contrasting effects of opioid antagonists on OIH. In addition, some studies show no involvement of opioid receptors in OIH. For example, naloxone had no effect on hyperalgesia induced by remifentanyl infusion in healthy human volunteers (Chu et al., 2011). Furthermore, toll like receptor-4 (TLR4) has been proposed as a mediator of OIH as shown by naltrexone effects on TLR4 (Hutchinson et al., 2010, 2011, see Grace et al., 2015). The neuroinflammatory aspects of OIH including studies on TLR4 are summarized in the section “neuroinflammatory mechanisms in OIH” of this review.

Other factors influencing OIH

OIH is a phenomenon observed in humans and modeled in experimental animals. In both clinical and preclinical studies, pain perception depends on the gender (Hampton et al., 2015), and on genetic profiles (see Denk et al., 2014). As summarized in the following paragraphs, OIH is also under the influence of sex, species and genetic background, and depends of the dose of opioid used.

Sex. Most of the teams working on pain or OIH have used males rather than females (see Mogil, 2012). However, a few teams have reported different profiles of OIH between males and females, although a sex-dependent factor for OIH is not clearly established yet. In their papers, Holtman and Wala (2005, 2007) have reported increased morphine induced-hyperalgesia in females as compared to males, in agreement with higher analgesic tolerance in females (Hopkins et al., 2004). Of note, the studies by Holtman and colleagues have been performed on rats while most other studies were on mice, suggesting that the species also constitutes a factor influencing OIH. In comparison, no sex difference was observed for OIH in C57BL/6J mice under morphine infusion (40 mg/kg/d or 1.6 mg/kg/d; Juni et al., 2010). Interestingly, in a previous paper, the same authors noticed a stronger hyperalgesia in CD-1 females as compared to males, for morphine infusion at 1.6 mg/kg/d but not at 40 mg/kg/d (Juni et al., 2008). These results suggest a potential interaction for the influences of sex, genetic background and opioid dose (see Bodnar and Kest, 2010). Recently, the supraspinal MC1R melanocortin receptor antagonist and the N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor antagonist MK-801 were shown to selectively reverse morphine-induced hyperalgesia in males and females mice, respectively (Arout et al., 2015b). These results suggest that MC1R and NMDAR may underlie the qualitative sex difference observed in the development of morphine-induced hyperalgesia in mice.

Genetic background. The influence of the genetic background on OIH has been clearly demonstrated in rodent models. Liang and colleagues have compared 23 strains of inbred mice in a chronic morphine protocol (40 mg/kg/d for 4 days), and have found strain differences for OIH (Liang et al., 2006, 2014b). As an example, C57BL/6J mice displayed a strong hyperalgesia whereas 129/S mice developed no or a weak OIH under a same morphine protocol (Liang et al., 2006, 2014b; Oladosu et al., 2015). Furthermore, single nucleotide polymorphisms at the multi-PDZ-domain protein 1 (MPDZ/MUPP1) gene may contribute to this mouse strain variation in OIH, as the SNPs correlated with the OIH phenotypes, and heterozygous mutant mice for MPDZ displayed less morphine-induced hyperalgesia (Donaldson et al., 2016). An influence of the strain in the development of OIH has also been observed in rats (Laboureyras et al., 2014).

Table 1. Effect of opioid receptor antagonists on morphine-induced hyperalgesia in preclinical models

Kind of treatment	Dose	Administration	Effect	Opioid antagonist	Nociception test	Result on OIH	Reference
Morphine ultra low dose	1 µg/kg	Subcutaneous injection	Acute	CTOP, 0.001 µg intrathecally immediately before morphine Naloxone, 1 mg/kg intraperitoneally 15 min. before morphine	Latency before paw licking on hot plate 52.5 °C Latency before paw licking on hot plate 52.5 °C	Prevents OIH Prevents OIH	Sanna et al. (2014, 2015a, b)
Morphine low dose Morphine high dose	1.6 mg/kg 40 mg/kg	Osmotic pump	Chronic	Naltrexone, 30-mg pellet 24 h before morphine	Latency before tail withdrawal in tail immersion 47.3 °C	Provokes OIH	Juni et al. (2006, 2008, 2010)

Opiate regimen. It has been shown that the dose of opiate administered impacts both analgesia and hyperalgesia. In this context, a morphine dose below 1 mg/kg can be considered as a low dose in rodents. Low as well as ultra-low morphine doses induced acute hyperalgesia (Bianchi et al., 2011; Milne et al., 2013; Alizadeh et al., 2014; Sanna et al., 2015a,b) while a treatment over 1 mg/kg was rather analgesic (Sanna et al., 2014). The same applies to buprenorphine for which doses over 20 µg/kg elicited analgesia in rats, whereas a dose of 0.1 µg/kg induced hyperalgesia (Wala and Holtman, 2011). Similarly to OIH elicited by chronic high opioid doses, hyperalgesia induced by ultra-low dose of opiates could also be affected by the sex (Holtman and Wala, 2005, 2007). Interestingly, repeated treatment with low doses of morphine produced tolerance to hyperalgesia (Holtman and Wala, 2005; Wala et al., 2011; Milne et al., 2013) while a chronic treatment with analgesic doses of morphine is classically known to cause hyperalgesia (see Lee et al., 2011). It is noteworthy that low doses of opiates also led to the development of OIH and higher post-operative morphine consumption in chronic pain patients with osteoarthritis scheduled for orthopedic surgery (Hina et al., 2015).

Classically, in rodent models, opiate systemic administration is performed through intraperitoneal, subcutaneous (sc.) and intramuscular injections (see Jin et al., 2015). Intravenous administrations are mainly used to obtain fast answers (Kranke et al., 2015). Additionally, the role of specific brain regions can also be explored by injections into the areas themselves. Opiates produce analgesia, analgesic tolerance and OIH via the different routes, intraperitoneal (Tumati et al., 2012), sc. (Bianchi et al., 2011), intrathecal (Milne et al., 2013 and many other papers) and intradermally (Araldi et al., 2015).

Opiate metabolites. The main metabolites obtained following *in vivo* morphine administration are morphine-3-glucuronide (M3G) and morphine-6-glucuronide (M6G). In human, morphine is converted into 44–55% of M3G and 9–10% of M6G (see Andersen et al., 2003; Frolich et al., 2011), and numerous metabolites have been identified in blood of patients treated with morphine (see Laux-Biehlmann et al., 2013). M6G is estimated to be 2–5 times more analgesic than morphine (see Collier et al., 2009, see Lotsch, 2009), whereas M3G is considered as hyperalgesic and devoid of any analgesic property (see Komatsu et al., 2009; Due et al., 2012; Swartjes et al., 2012). Codeine can also produce hyperalgesia, and it is known that about 10% of this opiate is metabolized into morphine (Johnson et al., 2014).

MECHANISMS AND TARGETS DESCRIBED FOR OIH AT THE NEURONAL LEVEL

At the neuronal level, several possible mechanisms for OIH have been studied including (i) sensitization of primary afferent neurons (ii) sensitization of second order neurons to excitatory neurotransmitters and (iii) adaptation of pain descending control leading to an up-regulation of nociceptive neuromodulators and

enhanced release of glutamate by primary afferents (see Chu et al., 2008). In the last few years, several novel neuronal targets have been involved in these phenomena. This section will particularly focus on the most recent studies describing neuronal mechanisms and targets associated with development of OIH. They are summarized in Fig. 2.

Mechanisms described for OIH

Long-term potentiation (LTP). LTP is a sensitization of homosynapses leading to an enhanced strength of the synapse and its signal transduction. This will lead to a hypersensitivity of the system and so may contribute to hyperalgesia in models of persistent pain. LTP has been shown to occur at synapses between C fibers and neurons from the superficial layers of the spinal cord dorsal horn (Liu and Sandkuhler, 1997), being a prime site of the nociceptive processing. This phenomenon can also occur at the level of heterosynapses inducing a spread sensitization to the neighboring synapses leading to secondary hyperalgesia (Scanziani et al., 1996). The link between LTP and hyperalgesia induced by persistent pain has been revealed by drugs able to block LTP that can also prevent hyperalgesia, such as ketamine (Klein et al., 2007; Zhou et al., 2010) or minocycline (Zhong et al., 2010). More recently, LTP has also been shown to be involved in OIH. Indeed, the withdrawal following remifentanyl infusion has been shown to lead to a potentiation of the synapse between nociceptive C fibers and neurons in superficial dorsal horn of the spinal cord (Drdla et al., 2009). In another study, the withdrawal from the three opiates morphine, fentanyl and remifentanyl induced an increase in C fibers field potential (Drdla-Schutting et al., 2012). Other arguments are in favor of a role of LTP in OIH including the fact that the three opioid receptors are present on primary afferents C fibers and in neurons of the superficial spinal dorsal horn (Besse et al., 1990) and that LTP and OIH share common signaling pathways. For example, the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor (BDNF) that is released by glial cells and plays a role in the development of OIH (Ferrini et al., 2013) has been shown to be involved in the maintenance of LTP (Zhou et al., 2010). Moreover, secondary messengers such as calmodulin kinase 2 (CaMKII), PKC, protein kinase A (PKA) and phospholipase C (PLC) are part of both OIH and LTP hypersensitivity signaling, and their inhibition can prevent LTP (Chen and Huang, 1991; Yang et al., 2004; Drdla et al., 2009). Also of major importance, LTP and OIH require NMDA receptors (see Mayer et al., 1999, see Sandkuhler, 2009) and can be prevented by NMDA receptor antagonists including ketamine (Benrath et al., 2005; Haugan et al., 2008), and MK801 (Frankiewicz et al., 1996; Li et al., 2001). Finally, glial cells and pro inflammatory cytokines are mediators of LTP and OIH. Regarding LTP itself, interleukin-1β (IL-1β) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) can enhance the frequency and/or amplitude of spontaneous excitatory post synaptic potential (EPSCs) leading to neuroexcitation in the spinal cord (Zhang et al., 2011). These cytokines will act mostly through the activation of glial cells (although

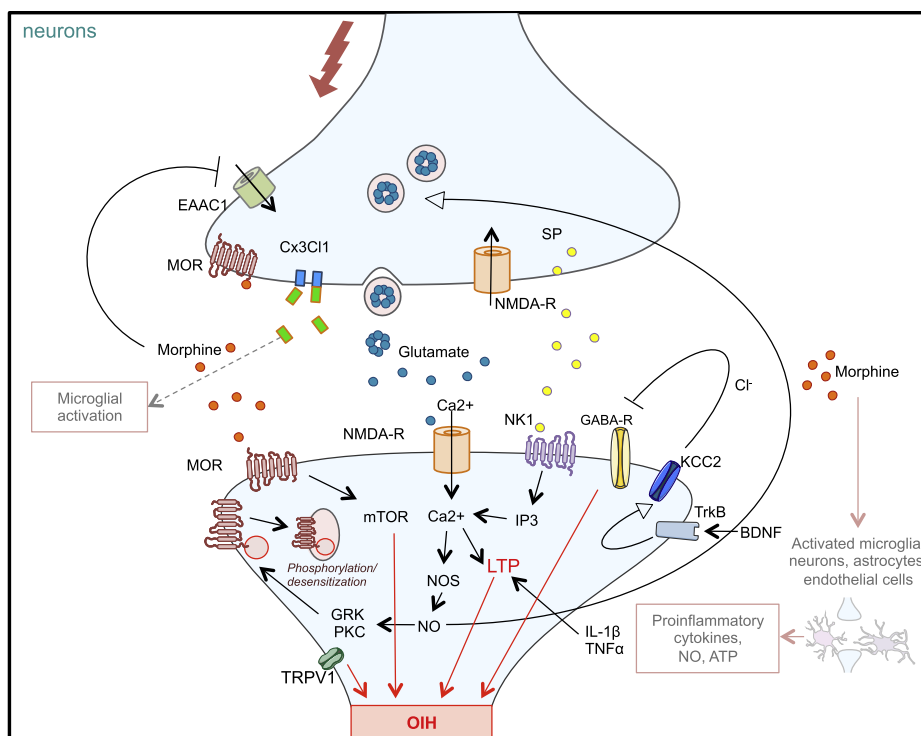


Fig. 2. Neuronal pathways involved in OIH. Activation of neuronal MOR by its agonists (i.e. morphine) induces regulation of intracellular mechanisms involved in OIH. Morphine activates mTOR signaling taking part in neuroexcitation and OIH. Morphine can also block the glutamate transporter EAAC1 involved in glutamate recapture. Synaptic concentrations of glutamate are thus increased. Glutamate will play an important role, through its receptor NMDA and the LTP to provoke OIH. Other factors are involved such as TrkB, the BDNF receptor, which will diminish KCC2 action, modulating the Cl^- homeostasis, leading to a switch in the role of GABA from inhibitory to stimulatory and thus producing OIH. Activated glial cells and neurons by morphine will contribute to OIH by producing cytokines such as $\text{IL-1}\beta$ or $\text{TNF-}\alpha$ involved in LTP. Altogether, these mechanisms participate to the establishment and persistence of OIH. BDNF, brain derived neurotrophic factor; Cx3Cl1, chemokine Cx3Cl1; EAAC1, glutamate transporter EAAC1; GABA-R, Gamma Aminobutyric Acid receptor; GRK, G protein coupled receptor kinase; $\text{IL-1}\beta$, Interleukin beta; IP3, inositol triphosphate; KCC2, K^+/Cl^- cotransporter 2; LTP, long-term potentiation; MOR, mu-opioid receptor; mTOR, mammalian target of rapamycin; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; NK1, neurokinin 1 receptor; NMDA-R, N-methyl-D-aspartic acid receptor; PKC, protein kinase C; SP, substance P; $\text{TNF-}\alpha$, Tumor Necrosis Factor alpha; TrkB, Tyrosine Kinase B; TRPV1, Transient Receptor Potential vanilloid 1.

some neurons also express their receptors) to induce the release of other mediators that will trigger LTP and hyperalgesia (Gruber-Schoffnegger et al., 2013).

Taken together, these data argue in favor of an association between LTP and OIH.

Hyperalgesic priming. Hyperalgesic priming is a mechanism that was first identified in an inflammatory pain model in which the short lasting hyperalgesia induced by carrageenan in rats was shown to induce a phenomenon of latent pain sensitization in primary nociceptors that resulted in a long lasting increased response to inflammatory mediators including prostaglandin E2, 5-hydroxytryptamine or adenosine A2 receptor agonist (Aley et al., 2000). Latent pain sensitization was further prevented by the administration of a PKC epsilon inhibitor. In a recent work, Araldi and collaborators showed that intradermal injection of DAMGO induces mechanical hyperalgesia as well as a marked prolongation of the hyperalgesia induced by further administration of prostaglandin E2 (Araldi et al., 2015). They further showed that these two phenomena are attenuated by a PKA inhibitor and by antisense oligonucleotides against PLC- β 3. However, this effect was reversible, indicating that both PKA and PLC- β 3 are involved in the expression,

but not the induction or maintenance of DAMGO-induced hyperalgesia and hyperalgesic priming. Moreover, $\text{G}\alpha$ protein does not seem to be involved, as PTX did not affect the hyperalgesia produced by DAMGO while the G-protein β/γ inhibitor gallein inhibited both DAMGO-induced and hyperalgesic priming. Altogether, these data clearly highlight a critical role of primary nociceptors in the development of OIH and that repeated opioid exposure can also induce hyperalgesic priming like other nociceptive stimuli although with some differences in the mechanisms (Araldi et al., 2015).

Descending pain facilitation. The descending pain modulation from the PAG and rostral ventromedial medulla has clearly been involved in the facilitation of nociceptive signaling in different models of persistent pain (Donovan-Rodriguez et al., 2006; Svensson et al., 2006; Dogrul et al., 2009) as well as in the development of hyperalgesia and analgesic tolerance induced by opiates (Vanderah et al., 2001). The implication of descending pathways originating from the rostral ventromedial medulla (RVM) was investigated further in naïve and paw incision-sensitized rats. Local administration of lidocaine into RVM abolished fentanyl-induced hyperalgesia in both rat models, supporting a main role for

descending facilitatory pathways in OIH (Rivat et al., 2009). Interestingly, glial cell-based mechanisms in PAG have been shown to participate to OIH (Eidson and Murphy, 2013b). In the PAG, administration of an inhibitor of protein G $\beta\gamma$ signaling reversed acute hyperalgesia induced by a low dose of morphine. This low dose induced the specific coupling of G $\beta\gamma$ proteins to the PLC subunit $\beta 3$ whose activation appears associated to this form of OIH (Bianchi et al., 2009). In the PAG also, OIH induced by an ultra-low dose of morphine was associated with the phosphorylation of MAPK such as ERK1, whereas in the frontal cortex the same treatment induced phosphorylation of ERK1, ERK2 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Sanna et al., 2014). Interestingly, the same kinases were not activated in the thalamus. Furthermore, ERK and JNK inhibitors administered intracerebroventricular (icv.) suppressed ultra-low-dose morphine-induced hyperalgesia. Altogether, these results suggest that the activation of ERK and JNK in the descending facilitation pathway participates to OIH. In line with this, c-Fos expression was increased in the PAG by acute morphine or its metabolite M3G (Arout et al., 2014), indicating an activation of the pain descending circuits. Finally, a recent study showed that remifentanyl infusion in mice induced hyperalgesia and MOR protein downregulation in the PAG that was reversed by intracerebral administration of antisense oligonucleotides to the neuron-restrictive silencer factor (NRSF; Lu et al., 2015). NRSF oligonucleotides restored MOR expression, indicating that reduced MOR expression in the PAG under fentanyl infusion contributes to fentanyl OIH.

Molecular targets described for OIH

NMDA – glutamatergic system. OIH shares common mechanisms with chronic pain, and one of them is the involvement of the glutamatergic system and particularly of the NMDA glutamate receptors. NMDA receptors are located presynaptically on the central terminals of primary afferent neurons as well as postsynaptically on spinal dorsal horn neurons (Antal et al., 2008). Several studies showed that the sc., intrathecal (it.) or icv. administration of a NMDA receptor antagonist diminishes or prevents OIH in both rats and mice (Larcher et al., 1998; Celerier et al., 2001; Li et al., 2001; Ohnesorge et al., 2013; Arout et al., 2015a). In addition, under OIH conditions, chronic morphine augmented NMDAR1 subunit expression in brain that was reversed by NMDA blockade (Ohnesorge et al., 2013). Furthermore, NMDA receptor antagonists given chronically together with morphine under OIH condition lowered β -arrestin 2 transcripts (Arrb2) in mouse whole brain (Ohnesorge et al., 2013). Arrb2 has previously been described to be upregulated in case of analgesic tolerance in the PAG, cortex and striatum (Bohn et al., 2000; Hurle, 2001; Jiang et al., 2006). This arrestin isoform is responsible of MOR desensitization, a mechanism described as a cause of analgesic tolerance (see Williams et al., 2013). These results demonstrated that NMDA-regulated Arrb2 activity is involved in both OIH and tolerance therefore strengthening the link

between these two phenomena. With electrophysiology experiments, it has been demonstrated that a chronic opioid treatment increases presynaptic NMDA receptor activity in spinal dorsal horn as well as decreases the postsynaptic NMDA receptor activity (Zhao et al., 2012b). The hypothesis of Zhao and colleagues is that chronic opioid administration can induce a translocation of PKC to the plasma membrane leading to the activation of presynaptic NMDA receptor by the removal of the Mg²⁺ blocker from the receptor. This results in promoting NMDA receptor trafficking to the plasma membrane to increase its activity, ending up with a higher release of glutamate (Zhao et al., 2012b). Correlated with the observation of a decrease of the glutamate transporters glutamate aspartate transporter (GLAST) and GLT1 after a sustained morphine administration (Mao et al., 2002), this will induce an enhancement of glutamate level in the synaptic cleft, and hence an overstimulation of the synapse that could lead to hyperalgesia.

A new study from Gong and collaborators underlines the importance of the PNS in OIH and more precisely of dorsal root ganglia (DRG) neurons through the upregulation of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter-3 (EAAT3) and NMDA receptor subunit NMDA receptor subunit 2B (GluN2B) (Gong et al., 2016). MORs are expressed mainly by small diameter neurons and by some larger diameter neurons of the DRG (Scherrer et al., 2009; Wang et al., 2010; Erbs et al., 2016). The recent work from Gong and coworkers shows that sustained morphine administration increased the excitability of small diameter DRG neurons but not of large neurons, which, when they are activated, can lead to an increase in intracellular calcium signaling and release of excitatory amino acids, resulting in an overexcitability of the fibers (Gong et al., 2016).

K⁺/Cl⁻ cotransporter (KCC2) and Cl⁻ homeostasis. Disruption of Cl⁻ homeostasis at the level of the dorsal horn spinal cord has been shown to be critical for the development of hyperalgesia in different persistent pain syndromes including inflammatory and neuropathic pain (see Zeilhofer et al., 2012). Trans-synaptic reduction in the expression of the potassium chloride exporter KCC2 is considered a key mechanism that leads to a shift in neuronal anion gradient associated with the development of hyperalgesia in neuropathic pain (Coull et al., 2003, 2005). Moreover, modulation of KCC2 expression results from the release of BDNF by activated microglia and further tyrosine kinase B (TrkB) receptor activation in lamina 1 neurons (Coull et al., 2005). This mechanism has recently been shown to underlie hyperalgesia induced by opiates but not analgesic tolerance (Ferrini et al., 2013; see below for details).

Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). The capsaicin receptor TRPV1 is a non-selective cation channel activated by heat and chemical ligands that plays a role in transduction of noxious chemical and thermal stimuli (Caterina et al., 2000). This channel is present at both central and peripheral terminals of primary sensory neurons (see Julius, 2013). Several pieces of

evidence indicate that TRPV1 is involved in the development of OIH. Chronic use of opiates can repeatedly stimulate TRPV1-expressing primary afferents and increase the nociceptive input leading to the sensitization of spinal dorsal horn neurons and hyperalgesia (Zhou et al., 2010). Different TRPV1 antagonists (e.g. AMG0347, SB366791) were able to suppress tolerance and OIH (Chen et al., 2008; Vardanyan et al., 2009; Zhou et al., 2010), TRPV1 KO mice did not develop thermal and tactile hypersensitivity after chronic morphine administration (Vardanyan et al., 2009) and TRPV1 mRNA is increased in DRG and spinal cord of rats after chronic morphine treatment. Moreover, the TRPV1 channel can be found in association with β -arrestin2, which permits its regulation through its desensitization and internalization (Por et al., 2012). Recently, MOR agonists have been shown to sequester β -arrestin2 to MOR therefore attenuating the TRPV1/ β -arrestin2 interaction to amplify TRPV1 activity in peripheral sensory neurons and contribute to symptoms of OIH (Rowan et al., 2014b). The same mechanism was observed with DOR and the DOR-selective agonist SNC80 resulting in sensitization of TRPV1 and behavioral signs of OIH (Rowan et al., 2014a).

Transient receptor potential member 8 (TRPM8). The menthol receptor TRPM8 is another member of the transient receptor potential channel (TRP) superfamily that has been shown to be responsible for mild cold sensation in mammals (Bautista et al., 2007). Like TRPV1, TRPM8 is expressed in primary nociceptors but in a distinct neuronal population in naïve animals, indicating that different cells may operate the detection of hot and cold noxious stimuli (see Basbaum et al., 2009). In a recent study, sustained stimulation of MOR has been shown to suppress TRPM8 activity in DRG neurons by promoting its internalization (Shapovalov et al., 2013). This phenomenon has been proposed to form the basis of cold analgesia induced by opiates. Moreover, both morphine cold analgesia and hyperalgesia were suppressed in TRPM8 deficient mice suggesting that functional interaction between MOR and TRPM8 are critical for both phenomena.

5HT-3 receptor. Among serotonin (5-HT) receptors, the 5HT-3 subtype is the only ligand-gated cation channel with excitatory function. It is expressed both in spinal dorsal horn and primary afferent neurons and has been identified as an important player in the modulation of pain hypersensitivity by descending serotonergic neurons (see Lopez-Garcia, 2006). Recently, pharmacological blockade of 5-HT3 receptor with ondansetron by systemic or it. administrations was shown to significantly prevent and reverse OIH and tolerance indicating that adaptations to chronic opiate treatments are also controlled by descending serotonergic processing from the rostral ventromedial medulla (Vera-Portocarrero et al., 2007; Bannister et al., 2011; Liang et al., 2011). In addition, Guo and colleagues have shown that selective activation of neuronal 5-HT3 receptor leads to hyperreactivity of microglia and astrocytes, which result in spinal sensitization and pain hypersensitivity (Guo et al., 2014). These

results suggest the existence of a link between descending facilitation and glial mechanisms in OIH.

EphrinB receptors. Ephrin receptors form the largest known subfamily of receptor tyrosine kinases. They are activated by membrane bound ligands called ephrins. EphrinB receptors have largely been shown to regulate the development of glutamatergic synapses and their plasticity in adult nervous system by interaction with NMDA receptors (Dalva et al., 2000; Henderson et al., 2001; Takasu et al., 2002). More recently, EphrinB receptor blockers have been shown to inhibit the induction and maintenance of hyperalgesia and allodynia induced by nerve injury as well as hyperexcitability of nociceptive small DRG neurons, sensitization of dorsal horn neurons and LTP of synapses between primary nociceptors (C fibers) and spinal neurons. A recent study further extends these observations by showing that an antagonist of ephrinB receptor inhibits remifentanyl-induced hyperalgesia in rats (Xia et al., 2014). Moreover, similarly to what was observed in a model of nerve-injury, ephrinB1 and its receptor were found up-regulated in spinal cord dorsal horn of rats treated with remifentanyl.

mammalian target of rapamycin (mTOR). mTOR is a Serine/Threonine kinase forming two different complexes: mTORC1 with the protein raptor, is sensitive to the antibiotic rapamycin and is involved in protein translation through the regulation of phosphorylation/activation of downstream effectors such as p70S6K and 4E-BP1 (see Hay and Sonenberg, 2004, see Lutz et al., 2015). mTORC2, with the protein rictor, is rapamycin insensitive and can regulate the phosphorylation of PKB/Akt and PKC proteins (see Hay and Sonenberg, 2004). mTOR, p70S6 K and 4E-BP1 mRNAs and proteins are present in DRG and spinal dorsal horn neurons but not in astrocytes or microglia (Xu et al., 2010). A recent study from Xu and colleagues focused on morphine-induced hyperalgesia and demonstrated that MOR activation induces the phosphorylation and thus activation of mTOR and its downstream effectors (Xu et al., 2014). Moreover, MOR, mTOR, phosphoinositide 3 kinase (PI3K)/Akt and NMDA receptor subunit NR1 were shown to colocalize in neurons of the spinal dorsal horn and pharmacological inhibition of mTOR action decreased morphine tolerance and hyperalgesia (Xu et al., 2014). Altogether, these data are in favor of a role of mTOR activation in the spinal cord in morphine-induced hyperalgesia mechanism through the increase of protein translation in the spinal dorsal horn (Xu et al., 2014, 2015; Lutz et al., 2015).

NEUROINFLAMMATORY MECHANISMS IN OIH

Besides neuronal regulations, neuroinflammatory cells have been identified as key actors in these opioid-induced phenomena, and their role in OIH has been reviewed recently (see Grace et al., 2015). These cells include oligodendrocytes, astrocytes, microglia, perivascular macrophages, endothelial cells and infiltrating immune cells (see Grace et al., 2015, see Thomas et al., 2015), although most studies were carried on

Table 2. Neuroimmune inhibitors decrease OIH

Drug name and dose	Chronic opioid name and dose	Species Sex	OIH	Tolerance	Reference
IL-1ra 100 µg it.	Morphine 10 µg it.	Rats Males	Reduced	Reduced	Johnston et al. (2004)
Anti-Cx3cr1 Antibody 10 µg it.	Morphine 10 µg it.	Rats Males	Reduced	Reduced	Johnston et al. (2004)
IL-10 by adenovirus 5 µg it.	Morphine 10 µg it.	Rats Males	Reduced	Reduced	Johnston et al. (2004)
AMD3100 Cxcr4 antagonist 10 mg/kg	Morphine 10 mg/kg	Rats Females	Reduced	Not tested	Wilson et al. (2011)
Minocycline 30–100 mg/kg i.p.	Remifentanyl 240 µg /kg/h i.v.	Rats Males	No effect	No effect	Aguado et al. (2015)
Mac-1 Ab-saporin 20–36 µg it.	Morphine 10 mg/kg sc.	Rats Males	Reduced	No effect	Ferrini et al. (2013)
Bdnf-cKO in microglia	Morphine 10–40 mg/kg sc.	Mice Males	Reduced	No effect	Ferrini et al. (2013)
IL-1ra/sTNFR/anti-IL6 Ab 100 µg/30 µg/0.08 µg it.	Morphine 10 mg/kg sc.	Rats Males*	Reduced	Reduced	Raghavendra et al. (2002)
Propentofylline 1–10 µg it.	Morphine 10 mg/kg sc.	Rats Males	Reduced	Reduced	Raghavendra et al. (2004)
Pentoxifylline 50 mg/kg i.p.	Morphine 10–40 mg/kg sc.	Mice Males [#]	Reduced	Not tested	Liang et al. (2008)
IL1ra 100 mg/kg i.p.	Morphine 20 mg/kg	Mice Males	Reduced	Not tested	Johnson et al. (2014)
Ibuprofen 15 mg/kg i.p.	Codeine 21 mg/kg				
LPS-RS 20 µg it.	Morphine 10 µg it.	Rats Males	Reduced	Reduced	Bai et al. (2014)
IL1ra 100 µg it.	M3G 0.75 µg it.	Rats Males	Reduced	No analgesia	Lewis et al. (2010)
Compound 15 Tlr4 inhibitor	M3G 10 mg/kg i.p.	Rats Females	Reduced	No analgesia	Due et al. (2012)

All studies were performed on naïve animals except in * [Raghavendra et al., 2002](#) where rats underwent spinal nerve transection, and in [#][Liang et al., 2008](#) where OIH was followed by hind paw incision.

astrocytes and microglia. The neuroimmune mechanisms in OIH appear to constitute one facet of the glial cell contribution to chronic pain. Since the initial discussion on the tetrapartite synapse for central pain sensitization (see [De Leo et al., 2006](#)), several reviews on the role of neuroimmune activation in chronic pain have been published (see [Stein and Machelska, 2011](#); [Calvo et al., 2012](#); [von Hehn et al., 2012](#); [Ji et al., 2013, 2014](#); [Mika et al., 2013](#); [Grace et al., 2014](#); [Austin et al., 2015](#); [Old et al., 2015](#); [Ren and Dubner, 2015](#); [Yaksh et al., 2015](#)).

Neuroimmune mechanisms for OIH have been first demonstrated using inhibitors of glial cell activity. These inhibitors include the glial cell blockers pentoxifylline, propentofylline, fluorocitrate and minocycline, as well as proinflammatory cytokines antagonists (see [Hutchinson et al., 2011](#)). It is noteworthy that while many reports have described the importance of neuroinflammation in analgesic tolerance, only a dozen have focused on immune mechanisms for OIH. The different studies, which report that blockade of immune activation diminishes OIH are summarized in [Table 2](#). Most articles show that inhibition of inflammation attenuates hyperalgesia induced by repeated morphine doses. Interestingly, the only one paper in which animals were chronically treated with remifentanyl showed that minocycline did not prevent the development of OIH ([Aguado et al., 2015](#)). Differences in drugs (remifentanyl versus other opiates) and

administration protocols (intravenous versus other route of administration) may contribute to this divergent result. In any case, this raises the notion that both opioid type and administration schedule may have a significant impact on analgesic tolerance and OIH.

It is important to note that among papers describing a link between neuroinflammation and OIH, most of them used male rats or mice, and only two have involved female rats ([Wilson et al., 2011](#); [Due et al., 2012](#)). However, sex has recently been reported to have a major influence on the immune mechanisms mediating pain ([Sorge et al., 2015](#); [Mapplebeck et al., 2016](#)). In male mice, peripheral nerve injury induced an increase in P2X4 receptor expression and BDNF release by spinal microglia that activated TrkB receptor on neurons, leading to neuronal disinhibition and hyperalgesia. In contrast, female mice microglia did not show these responses, and the suppression of microglia activation reversed hypersensitivity in males but not in females. It has been suggested that, in females, peripheral nerve injury rather elicits T lymphocytes activation resulting in hyperalgesia ([Sorge et al., 2015](#); [Mapplebeck et al., 2016](#)). Similarly, in male rats the microglial inhibitor minocycline increased morphine analgesia and lowered morphine-induced glial activation whereas it had no effect on morphine analgesia in female rats and tended to increase some glia activation markers ([Posillico et al., 2015](#)). As microglia appears to

be more involved in pain and OIH in males as compared to females, upcoming studies focusing on neuroimmune mechanisms involved in the development of OIH should therefore consider analyzing both males and females. Moreover, species, strain and opioid category will also have to be regarded in studies on neuroimmune mechanisms for OIH (see Table 2). Finally, as mentioned above for females, peripheral immune cells may also regulate OIH mechanisms. Indeed, in damaged tissues they release pronociceptive mediators and trigger analgesia by releasing endogenous opioids, therefore playing a dual role in pain control (see Machelska, 2011, see Sacerdote et al., 2012, see Ninkovic and Roy, 2013, see Basso et al., 2014).

Astrocytes and microglia contribution to OIH

At first, several papers showed that morphine exposure triggers astrocyte activation. Acute morphine exposure led to glial fibrillary acidic protein (GFAP), IL-1 β and matrix metalloproteinase-9 upregulation (MMP9) in DRG satellite glial cells, as shown by co-staining with GFAP (Berta et al., 2012). Furthermore, 5–7 days of chronic morphine was required for spinal astrocyte activation and IL-1 β upregulation in astrocytes (Berta et al., 2012, 2013). On the other hand, LPS-induced Ca²⁺ response in astrocytes was attenuated by the mu-agonist endomorphin *in vitro* (Block et al., 2013). A specific action on neurons and astrocytes vs microglia was shown following it. chronic morphine in rats, as reflected by augmented levels of NF- κ B-phospho-p-65 in both spinal neurons and astrocytes but not microglia (Bai et al., 2014). In this study, the TLR4 antagonist LPS-RS prevented p-65 phosphorylation as well as tolerance and OIH. A selective activation of astrocytes was also found in response to an ultra-low morphine dose inducing OIH (Sanna et al., 2015a). Morphine at 1 μ g/kg produced hyperalgesia and the activation of spinal astrocytes but not microglia. Astrocytic levels of p-JNK were increased by morphine while JNK and NMDA antagonists prevented the development of OIH (Sanna et al., 2015a). Similarly, buprenorphine at ultra-low dose (0.1 μ g/kg) produced hyperalgesia and activated spinal astrocytes while microglia did not show enhanced reactivity (Gerhold et al., 2015). Moreover, spinal administration of 5-HT₂ receptors antagonists prevented descending facilitating pathways, diminished astrocytes activation and reversed buprenorphine-induced hyperalgesia (Gerhold et al., 2015). This indicates that ultra-low-dose of buprenorphine induced OIH through a 5-HT-mediated mechanism in astrocytes (Gerhold et al., 2015).

Secondly, microglia have been shown activated upon chronic opioid administration. Chronic morphine and codeine treatments lead to augmented cluster of differentiation molecule 11b (CD11b) but not GFAP expression in trigeminal ganglia and spinal cord (Johnson et al., 2014). As well, microglia were shown *in vitro* to release proinflammatory cytokines and nitric oxide upon morphine or DAMGO stimulation (Merighi et al., 2013). Ferrini and colleagues have also identified a specific role of microglia in OIH (Ferrini et al., 2013). They showed that both microglia depletion by spinal

anti-Mac-1-saporin treatment and the conditional inactivation of BDNF gene in microglia prevent chronic morphine OIH while sparing tolerance. They demonstrated that the microglia to neuron signaling cascade involves purinergic receptor P2X (P2X₄R) upregulation in microglia that release BDNF (see below for detailed mechanisms). Interestingly, these findings have identified a pathway that contributes to OIH without affecting analgesic tolerance, dissociating the two phenomena (Ferrini et al., 2013). The opposite has been observed in patients with low back pain that had analgesic tolerance without OIH (Chu et al., 2012, see Richebe et al., 2012). To conclude, these different studies indicate that a number of microglial actors and mechanisms participate in the development of OIH.

Finally, concurrent activation of astrocytes and microglia has also been observed under chronic morphine conditions. In particular, chronic morphine injections in rats activate both spinal microglia and astrocytes, together with TNF- α release (Tumati et al., 2012). In neuropathic animals also, both spinal astrocytes and microglia are activated by chronic morphine. Furthermore, glial activation and morphine analgesia are reduced following a chronic co-treatment with botulinum toxin, suggesting a potential clinical application (Vacca et al., 2013). Coincident activation of microglia and astrocytes also occurred in the ventrolateral periaqueductal gray matter (vlPAG) following repeated morphine, indicating that glial cells besides neurons are involved in OIH-associated events in the PAG (Eidson and Murphy, 2013a). Also, persistent peripheral inflammation attenuated chronic morphine-induced activation of astrocytes and microglia in the vlPAG together with lowered analgesic tolerance, revealing a long-distance effect of peripheral injury on PAG-mediated OIH mechanisms (Eidson and Murphy, 2013b). Accordingly, similar results were found on the role of peripheral inflammation on analgesic tolerance (Zollner et al., 2008). Lin and co-workers published a recent method for quantifying the different parameters of microglia and astrocyte activation found in OIH that will help in future studies focused on glia activation in OIH (Lin et al., 2015b). Interestingly, whereas morphine triggers OIH and astrocytes-microglia activation, some novel endomorphin derivatives induce less tolerance together with a lack of OIH or glia activation (Zadina et al., 2015). This indicates that mu opioid agonists that possess good analgesic properties without glia-mediated adverse effects can be developed.

Molecular actors of OIH in neuroinflammatory cells

In the recent years, several novel glial targets have been associated with development of OIH. This section will focus on the studies describing these newly identified actors that are summarized in Fig. 3 for microglial cells and Fig. 4 for astrocytes.

Toll like receptor 4 (TLR4). Among neuroimmune mechanisms, TLR4 activation has been shown to contribute to opioid-induced tolerance and hyperalgesia. Blockade of TLR4 activation potentiated and prolonged acute opioid analgesia (Hutchinson et al., 2010), suggest-

ing a role in analgesic tolerance. Also, the TLR4 antagonist LPS-RS prevented OIH and tolerance as well as p-65 phosphorylation in the spinal cord (Bai et al., 2014). Furthermore, morphine and other opiates were reported to bind directly to – and activate TLR4 by molecular modeling and *in vitro* cellular assays (Hutchinson et al., 2010). In contrast, morphine, fentanyl, naltrexone

and β -funaltrexamine (β -FNA) lowered TLR4 activation in a similar functional cell assay (Stevens et al., 2013). The notion that morphine elicits analgesic tolerance and hyperalgesia through TLR4 activation raised much interest and debate (Skolnick et al., 2014; Watkins et al., 2014, see Grace et al., 2015). To our knowledge until now, four studies have investigated TLR4 implication in

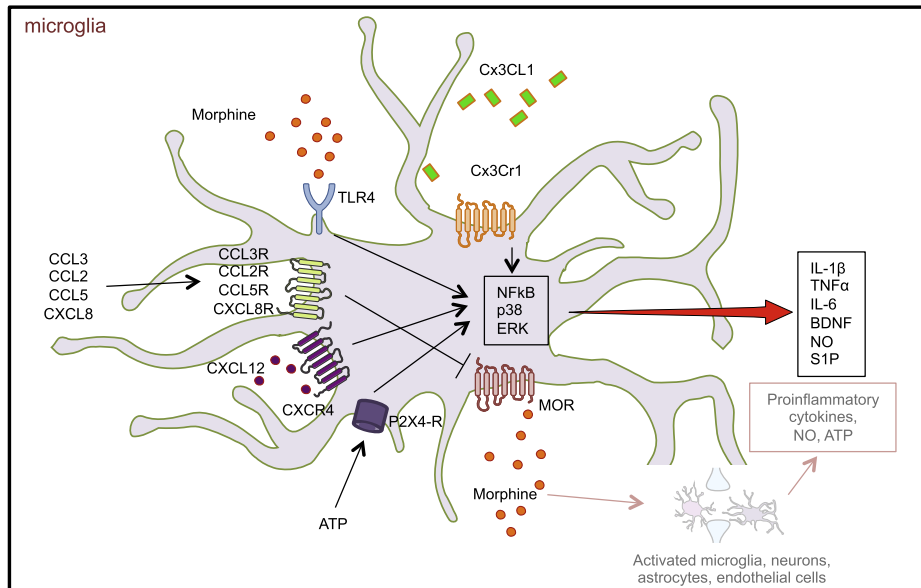


Fig. 3. Microglia activation contributes to OIH. Morphine binds to its specific receptor MOR or to TLR4 and will activate molecular intracellular cascades. This will trigger the activation of microglial cells. In addition, diverse pro-inflammatory molecules such as chemokines, cytokines and ATP also participate in reinforcing this activation and OIH. BDNF, brain derived neurotrophic factor; Cx3CL1, chemokine Cx3CL1; Cx3Cr1, CX3C chemokine receptor 1; CCL, chemokines with CC motif; CXCL, chemokines with CXC motif; ERK, Extracellular signal-regulated kinase; IL, interleukin; MOR, mu-opioid receptor; NFκB, nuclear factor kappa B; NO, nitric oxide; P2X4-R, purinergic receptor P2X4; S1P, sphingosin-1-phosphate; TLR4, toll like receptor 4; TNFα, tumor necrosis factor alpha; R, receptor.

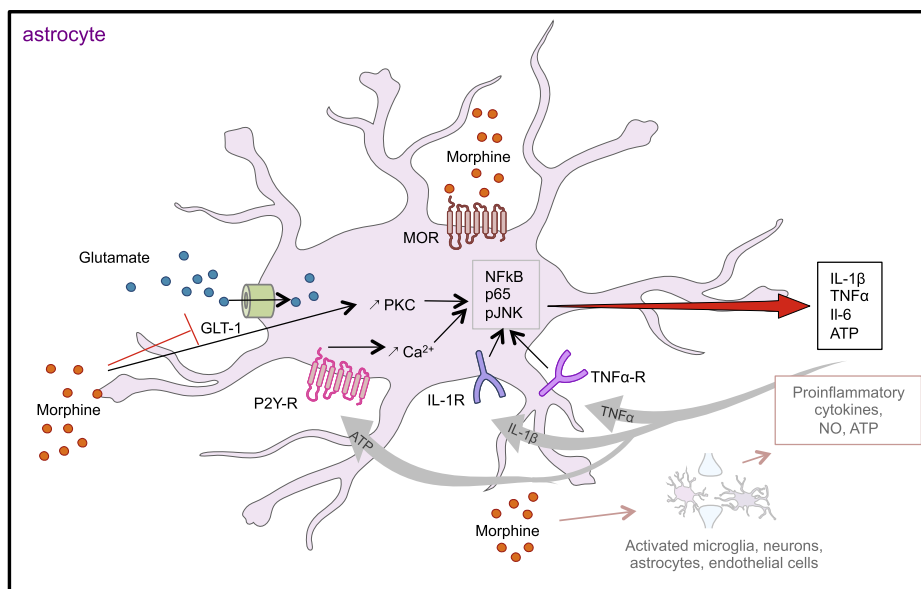


Fig. 4. Astrocytes are actors of OIH. Concomitant actions of opiates and cytokines induce intracellular cascades leading to production and release of cytokines that confer an activated state to astrocytes. In addition, morphine is able to block the glutamate transporter (GLT-1) resulting in an increase of glutamate in the synaptic cleft, which will then reverberate on neuronal excitation. GLT1, glutamate transporter 1; IL-1β, Interleukin-1β; IL1R, interleukin 1 receptor; IL-6, Interleukin 6; JNK, junk kinase; MOR, mu-opioid receptor; NFκB, nuclear factor kappa B; NO, Nitric Oxide; P2Y-R, purinergic receptor P2Y; P65, protein 65; PKC, Protein Kinase C; TNFα, tumor necrosis factor alpha; TNFα-R, tumor necrosis factor alpha receptor.

OIH by genetic approaches, through *in vivo* experiments with TLR4 deficient mice (Due et al., 2012; Ferrini et al., 2013; Johnson et al., 2014; Mattioli et al., 2014). Main features from these papers are summarized in Table 3. Two of these studies found no OIH in TLR4 mutants while the two others reported that OIH was preserved. In addition, two papers found intact analgesic tolerance in TLR4 deficient mice (Fukagawa et al., 2013; Mattioli et al., 2014) while tolerance was not investigated in the other OIH studies. These conflicting findings on the implication or lack of implication of TLR4 in OIH may be explained by disparities in experimental conditions including mouse strains, sanitary status that may activate TLR4 to different extents, morphine regimen as well as OIH evaluation. Besides, TLR9 was found involved in *in vitro* microglia responses to morphine, in a MOR-dependent manner (He et al., 2011). Also, TLR2, TLR5, TLR8 and microRNA-124 expression was regulated by morphine in microglia culture experiments (Qiu et al., 2015). Future analyses will be required to understand more deeply the implication of TLRs in opioid-induced analgesic tolerance and OIH.

Cytokines, chemokines and chemokine receptors. In addition to the TLRs, several cytokines, chemokines (CxCL) and CXCRs were identified as important actors in OIH or tolerance (see Melik Parsadaniantz et al., 2015). Neutralizing antibodies to monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) or CX3CR1 administrated intrathecally reduced analgesic tolerance or OIH (Johnston et al., 2004; Zhao et al., 2012a). Activation of CXCR4 receptor by the chemokine CXCL12 counteracted acute morphine analgesia in naïve rats (Rivat et al., 2014). Along the same lines, chronic morphine upregulated stromal derived factor 1 (SDF1)/CXCL12 and CXCR4 whereas CXCR4 blockade reversed OIH (Wilson et al., 2011). More broadly, the SDF1/CXCL12–CXCR4 system is considered as a general modulator of chronic pain (Luo et al., 2016). Interestingly, a study on cancer patients reported increased CXCL1 levels in the cerebrospinal fluid of the opioid-tolerant group (Lin et al., 2015a). In the same paper, morphine analgesia in rats was decreased by CXCL1 infusion and improved by CXCL1-neutralizing antibody (Ab) or CXCR2 antagonist administration (Lin et al., 2015a). These studies pointed to MCP-1/CCR2, CX3CL1/CX3CR1, SDF1/CXCR4 and CXCL1/CXCR2 as major chemokine systems involved in OIH. In addition, chemokines such as CCL3, CCL2, CCL5 and CXCL8 can

alter the function of the MOR by desensitizing it through the activation of their respective GPCR receptors (Zhang et al., 2004). On the cytokine side, the IL-1 receptor antagonist IL-1ra (Johnston et al., 2004; Johnson et al., 2014), a combination of IL-1, TNF- α and IL-6 blockers (Lewis et al., 2010), as well as the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Johnston et al., 2004) prevented OIH (Table 2). In connection with these results, TNF- α and IL-1 β were shown to contribute to high frequency stimulation-induced hyperalgesia and synaptic LTP potentiation by activating their receptors on glial cells in the spinal cord (Gruber-Schoffnegger et al., 2013).

ATP, P2X4 receptor and BDNF. Following the initial demonstrations that morphine promotes microglia migration via MOR and P2X4 receptor dependent signaling (Takayama and Ueda, 2005; Horvath and DeLeo, 2009), inhibition of P2X4 receptors activity on microglia was shown to prevent morphine analgesic tolerance (Horvath et al., 2010). Recently, genetic tools in mice have been used to confirm those findings and showed that OIH relies on two different mechanisms, a MOR-dependent upregulation of P2X4 receptors on microglia, and a MOR-independent gating of BDNF release (Ferrini et al., 2013). Spinal BDNF activates TrkB on neurons and downregulates the potassium-chloride co-transporter KCC2, leading to the disinhibition of GABAergic neurons and hyperalgesia (see Grace et al., 2015, see Trang et al., 2015). Interestingly, BDNF signaling from microglia has been previously shown important in learning and memory (Parkhurst et al., 2013), indicating a common mechanism for memory and persistent pain.

Tachykinin NK1 receptor. In the spinal cord, the tachykinin NK1 receptor has been shown to be involved in glia activation during OIH. Morphine withdrawal-induced glial cell activation and OIH is attenuated by the tachykinin NK1 receptor antagonist L-732,138, indicating a role for the tachykinin-NK1 receptor system in OIH. In addition, an opioid agonist-NK1 antagonist bivalent compound did not activate spinal glial cells and prevented OIH. This indicates that substance P-triggered glia activation and OIH following sustained morphine can be prevented by targeting opioid and NK1 receptors concomitantly (Tumati et al., 2012).

Sphingolipid ceramides. In glial cells, the sphingolipid ceramide system has been described as an actor in

Table 3. Opioid Induced Hyperalgesia studies on TLR4 deficient mice

Mouse lines	Opiate treatments	Sensitivity assays	Result	Reference
C57BL/6 Ctrlrs B10ScNJ mutants	Morphine-3 glucuronide 25 mg/kg	Von Frey filaments Hot plate	OIH in Ctrlrs No OIH in mutants	Due et al. (2012)
Balb/c Ctrlrs TLR4-KO mutants	Morphine 20 mg/kg Codeine 21 mg/kg 2 $\times$ /day/4 days	Von Frey filaments	OIH in Ctrlrs No OIH in mutants	Johnson et al. (2014)
C3H/HeOuJ Ctrlrs C3H/HeJ mutants B10ScSNJ Ctrlrs B10ScNJ mutants	Morphine 10–40 mg/kg 2 $\times$ /day/7 days	Von Frey filaments	OIH in Ctrlrs OIH in mutants	Mattioli et al. (2014)
C3H/HeOuJ Ctrlrs C3H/HeJ mutants	Morphine 10–40 mg/kg 2 $\times$ /day/7 days	Von Frey filaments	OIH in Ctrlrs OIH in mutants	Ferrini et al. (2013)

OIH. The sphingosine-1-phosphate (S1P) and its GPCR are expressed in the spinal cord and DRG, structures well known to be involved in nociceptive processing. Otherwise, there is an overlapping distribution of S1P receptor and MOR in different CNS regions like the striatum, amygdala or spinal cord (see [Salvemini et al., 2013](#)). OIH was shown correlated to sphingolipid ceramide upregulation in rat spinal astrocytes and microglia under chronic morphine infusion ([Muscoli et al., 2010](#)). Moreover, it. administration of ceramide inhibitors prevented OIH as well as upregulation of S1P and inflammatory cytokines (TNF- α , IL1- β and IL-6; [Muscoli et al., 2010](#)). These results are in agreement with a previous study showing that the neuraminidase inhibitor oseltamivir blocked ganglioside-regulated morphine analgesic tolerance and low-dose morphine hyperalgesia in mice ([Crain and Shen, 2004](#)). Another argument for the implication of the ceramide pathway in OIH is that the activation of TLR4 (see above) leads to an enhanced production of ceramides by glial cells, suggesting that this receptor could be involved in OIH development by triggering the ceramide pathway. In addition to OIH, the sphingolipid pathway is currently considered as a therapeutic target for chronic pain management (see [Salvemini et al., 2013](#)).

Superoxides and peroxynitrites. Spinal peroxynitrite has been involved in OIH. Indeed, the superoxide-sparing peroxynitrite decomposition catalyst SRI-110 prevented morphine-induced hyperalgesia and analgesic tolerance ([Little et al., 2013](#)). SRI-110 lowered morphine-induced upregulation of TNF- α , IL-1 β and IL-6 while it increased IL-4 and IL-10 anti-inflammatory cytokines ([Little et al., 2013](#)). Therefore, restoring spinal mitochondrial function by removal of superoxides and peroxynitrites may increase the levels of anti-inflammatory mediators and ensuing pain relief.

OTHER SYSTEMS INVOLVED IN OIH

Several molecular targets have been described to play a role in the development of OIH in the past decades. However, for most of these targets the mechanism of action remains poorly understood. This section aims to summarize the current knowledge on these targets.

Anti-opioid peptides

Several neuropeptides have been shown to display pro-nociceptive activity that opposes anti-nociceptive action of opiates. They have been proposed to be part of a homeostatic equilibrium in which exogenous administration of opiates triggers the release of these peptides that in turn counteract the analgesic action of opiates thus leading to the development of hyperalgesia and analgesic tolerance. The most studied peptides include cholecystokinin (CCK), neuropeptide FF (NPFF) and orphanin FQ (OFQ)/nociceptin (NOP) as well as the opioid peptide dynorphin. The anti-opioid action of these peptides and their receptors has already been described in several reviews (see [Rothman, 1992](#); [McNally, 1999](#);

[Ossipov et al., 2003](#); [Mouledous et al., 2010](#); [Toll et al., 2016](#)).

CCK has long been proposed to act as an endogenous anti-opioid ([Faris et al., 1983](#)). Several studies have shown that morphine triggers the release of CCK in the spinal cord ([de Araujo Lucas et al., 1998](#); [Gustafsson et al., 2001](#)) and CCK receptor antagonists have been shown to prevent the development of antinociceptive tolerance to morphine ([Dourish et al., 1990](#); [Hoffmann and Wiesenfeld-Hallin, 1994](#)). Moreover, pharmacological blockade of CCK2 receptors in the RVM have been shown to block the development of hyperalgesia induced by continuous systemic morphine indicating that endogenous CCK activity in RVM may decrease spinal analgesic effect of opiates by activating descending pain facilitatory mechanism to exacerbate spinal nociceptive sensitivity ([Xie et al., 2005](#)).

Both neuropeptide FF and OFQ/NOP induce hyperalgesia and reverse morphine analgesia when administered intracerebroventrically, but display antinociceptive effect when administered intrathecally suggesting that these peptides could display both pro and anti-nociceptive properties (see [Simonin, 2006](#), see [Toll et al., 2016](#)). However, systemic administration of NPFF receptor antagonist RF9 have been shown to completely prevent the development of hyperalgesia and analgesic tolerance induced by chronic opiates administration indicating that NPFF and its receptors represent a *bona fide* anti-opioid system ([Simonin et al., 2006](#); [Elhabazi et al., 2012](#)). Although the consequence of systemic pharmacological blockade of OFQ/NOP receptor on the development of OIH has not been investigated so far, systemic administration of a selective antagonist (J-113397) as well as the genetic blockade of NOP receptor or OFQ/NOP precursor genes produced a significant increase of mouse nociceptive behavior in inflammatory pain models. These data indicate that for this system the spinal antinociceptive action prevails over supraspinal pronociceptive effects ([Depner et al., 2003](#); [Rizzi et al., 2006](#)).

Kappa-opioid receptor and its endogenous ligand dynorphin have also been shown to counteract MOR action in different brain regions (see [Pan, 1998](#)). However, systemic administration of kappa-opioid receptor selective agonists produce analgesic effect indicating that, similarly to OFQ/NOP system, the antinociceptive action of kappa-opioid receptor and dynorphin prevails over anti-analgesic actions of this system ([Simonin et al., 1998](#)). Recently, the kappa receptor system has been shown implicated in pain aversion (see [Cahill et al., 2014](#)). Therefore, this system may also contribute to aversive mechanisms underlying hyperalgesia induced by chronic opiates.

GPCRs and intracellular pathways

In addition to the so-called anti-opioid peptides and their receptors several other GPCRs as well as intracellular targets have been involved in the development of OIH.

A genetic analysis in mice pointed to β 2 adrenergic receptor (β 2-AR) as an important player in the development of OIH, which was further confirmed by pharmacological and genetic blockade of this receptor

(Liang et al., 2006; Samoshkin et al., 2015). These studies concluded that genetic variants of $\beta 2$ -AR gene could explain the differences observed between different strains of mice in the development of OIH.

Selective antagonist of melanocortin 4 receptor (HS104) has also been shown to prevent the development of analgesic tolerance induced by chronic morphine infusion in rats as well as hyperalgesia that was observed after drug withdrawal (Kalange et al., 2007). Moreover, pharmacological blockade of this receptor during the induction of morphine tolerance was further shown to reduce the activation of astrocytes as well as the expression of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) and to upregulate the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the rat spinal cord (Niu et al., 2012).

At the intracellular level, protein kinase C γ was shown to play an important role in the development of OIH. Indeed, PKC γ deficient mice displayed an enhancement of fentanyl acute analgesia as well as a complete absence of secondary hyperalgesia (Celerier et al., 2004). This effect could be due to the fact that Ca²⁺-sensitive protein kinases C, particularly the γ isoform catalyzes the NMDA receptor phosphorylation upon stimulation of opioid receptors leading to sensitization to painful stimuli (Celerier et al., 2004). Moreover, thermal hypernociception induced by morphine in mice was further shown to be inhibited by the PLC inhibitor U73122 and the PKC blocker, calphostin C as well as by antisense phosphodiester oligonucleotides directed against PLC $\beta 3$ and PKC γ suggesting that PLC $\beta 3$ /PKC γ /NMDA pathway is stimulated upon morphine administration and play an opposing role in morphine analgesia (Galeotti et al., 2006). More recently, hyperalgesia induced by ultra-low dose of morphine was shown to be dependent on ERK1/2-c-JUN signaling pathway at different levels of the CNS including the spinal cord (Sanna et al., 2014, 2015a,b). In this latter region JNK was shown activated specifically in astrocytes suggesting that activation of neuronal MOR could lead to the activation of ERK1/2-c-JUN pathway in astrocytes, thus contributing to hyperalgesia induced by ultra-low doses of morphine.

EPIGENETICS AS A NOVEL MECHANISM FOR OIH

Epigenetic adaptations reflect the impact of the environment on DNA leading to a modulation of gene transcription. Two main mechanisms are involved: the cytosine methylation of the DNA leading to a repression of gene transcription and the histone acetylation, increasing the access for gene transcription. Histone deacetylases (HDAC) inhibitors are able to diminish pain sensitivity, indicating that epigenetic mechanisms are involved in chronic pain (see Denk et al., 2014, see Descalzi et al., 2015).

The first evidence for a link between OIH and epigenetic is that opiates users have an increase of methylation on the MOR promoter gene that will influence its transcription (see Doebring et al., 2011), suggesting that opiates may inhibit MOR gene demethylation (Doebring et al., 2013). Another study showed that modifications of the degree of histone acetylation induced by

morphine in the spinal cord participate in the regulation of morphine tolerance, dependence and OIH (Liang et al., 2013). Indeed, the concomitant treatment with chronic morphine and the HDAC inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) enhanced OIH in naïve mice (Liang et al., 2014a) and induced changes in BDNF and prodynorphin gene histones acetylation that modified their expression (Liang et al., 2013, 2014a). On the other hand, the HDAC inhibitors trichostatin A and valproic acid have been shown to reverse neuropathy-induced decrease in morphine analgesia in mice (Uchida et al., 2015). Neuropathic damage decreased MOR expression in DRG, and the HDAC inhibitors restored morphine analgesia by upregulating MOR mRNA expression to non-injury levels. Both studies were performed on young adult C57BL/6 male mice, but Liang and collaborators used an escalating morphine treatment of pain-naïve mice whereas the study by Uchida and colleagues was performed with nerve-injured mice acutely treated with morphine. BDNF was also found upregulated following a repeated morphine treatment inducing OIH, with a downregulation of BDNF exon IV methylation level (Chao et al., 2016). In addition, the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine upregulated BDNF expression and augmented OIH, suggesting the existence of an epigenetic control of BDNF gene expression in OIH (Chao et al., 2016). Very recently, epigenetic changes in BDNF and Prodorphin genes were found in the spinal cord of mice with post-operative pain and OIH, which was shown attenuated by histone acetyltransferase inhibitor anacardic acid (Sahbaie et al., 2016). Altogether, these studies show a contribution of epigenetic in OIH that will be influenced by the animal pain state and opioid regimen.

Finally, epigenetic could represent a new track to create personalized treatments in order to limit the development of opiates side effects including OIH. Profiles of DNA methylation or acetylation are specific from an individual to another and can be obtained with a genetic diagnosis. Hence, knowing these personal characteristics could help to treat patients individually e.g. with HDAC inhibitors in addition to other drugs. However, epigenetic modifications are not specific to genes involved in pain pathways and OIH, therefore side effects could be also induced (see Doebring et al., 2011).

CONCLUSION

In this review, we present the numerous mechanisms and actors that have been recently identified in OIH. Interestingly, some of them are similar to those involved in chronic pain. In neuropathic or inflammatory pain models, a tetrasynapse composed of the central terminal of primary afferent neurons, projection neurons, astrocytes and microglia has been demonstrated in the spinal cord dorsal horn (see Grace et al., 2014). In non-pathological conditions, one of the main nociceptive mechanisms is the glutamatergic signaling transmitting the nociceptive message to supraspinal areas. This phenomenon is characterized by a short duration because of compensations and regulations by environmental cells.

GABAergic inhibitory neurons and endogenous opioid systems are thus activated and decrease neuroexcitatory responses and thereby alleviate pain. Additionally, glutamate transporters present on neurons or astrocytes (EEAC or glutamate transporter 1 (GLT-1) respectively), recapture glutamate in the synapse cleft and so contribute to the decrease of neuroexcitation induced by the nociceptive stimulus, and participate to pain relief.

Both chronic pain and OIH show a disruption of these regulatory processes. In case of OIH, the recapture of glutamate by neurons or astrocytes is reduced, increasing synaptic concentrations of glutamate in the synaptic cleft and thus neuroexcitation by elevating intracellular Ca^{2+} concentrations through specific receptors activation. On the other hand, KCC2 channel activation will block the inhibitory GABA-R on neurons also leading to neuroexcitation. In addition to this context, LTP, induced by high Ca^{2+} intracellular concentrations, and reactive oxygen species participates to the maintenance of neurons hypersensitivity. Consequently, these activated neurons produce chemokines, which will in turn stimulate microglial cells that will release molecules responsible of neuroinflammation. Astrocytes are also activated in this context and feed this neuroinflammatory environment. The chronological order of tetrasynapse cells activation is currently under debate, but the fact that glial cells and neurons play a role in the development of OIH appears well established. Specific MOR variants, with different numbers of TM domains, have been shown to induce hyperalgesia under acute exposure to opiates. This suggests a change of the signaling pathways engaged in case of hyperalgesia compared to those involved in analgesia. In addition, other receptors could be involved in OIH including other GPCRs or TLR4.

The environment also appears to have a great impact on OIH development. According to the gender, age, genetic background, immune conditions, pain and opiate treatment history as well as the doses of opiates administered, OIH establishment, development and maintenance may differ. All these OIH influencing factors identified in preclinical studies make these observations close to the clinical conditions of OIH. Indeed, each patient is a unique case. The opiate treatment is initiated by different painful situations and each patient has his own health history with, or without opiate pre-exposure, his own genetic profile and life environment. This patient is a man or a woman, young or aged, and all these factors will influence the establishment of OIH, its intensity and persistence. Preclinical studies show that OIH implicates complex mechanisms, reflecting somehow the clinical reality, and providing hints for the development of strategies to avoid OIH.

Furthermore, tolerance to analgesia may be described as a consequence of OIH. Because OIH lowers the basal nociceptive level, analgesia will be masked by OIH, leading to analgesic tolerance. From a mechanistic point of view, this phenomenon may contribute to tolerance beside or in addition to the decrease of functional MOR induced by chronic exposure to opiates, contributing to the loss of analgesic effects of opiates (see Williams

et al., 2013). In the future, the respective contribution of OIH and other mechanisms in the development of analgesic tolerance will need further investigation.

Finally, mechanisms that underlie OIH may also contribute to other adaptations associated with opiates. Particularly, the understanding of OIH mechanisms may help to link the nociceptive effects of opiates and their psychological adverse effects such as mood disorders and addiction. Indeed, it is tempting to speculate that development of hyperkatifeia, which corresponds to an enhanced sensitivity to negative emotions observed during withdrawal from opiates or drug abuse (see Shurman et al., 2010) could rely on similar mechanisms than OIH. In the future, it will be interesting to study more precisely the adaptations in brain areas involved in mood disorders in OIH conditions.

Acknowledgments—This work was supported by the CNRS, Université de Strasbourg and by grants from Conectus and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV1-0001). This work has been published within the LABEX ANR-10-LABX-0034-Medalis and received financial support from the French government managed by “Agence Nationale de la Recherche” under “Programme d’investissement d’avenir. This work was supported by the EU Project Seventh Framework Programme FP7-Health-2013-Innovation under grant agreement 602919, by the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d’Avenir ANR-10-IDEX-0002-02. L.-A. R. is a recipient of a fellowship from the Ministère de l’Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie.

REFERENCES

- Aguado D, Abreu M, Benito J, Garcia-Fernandez J, Gomez de Segura IA (2015) Amitriptyline, minocycline and maropitant reduce the sevoflurane minimum alveolar concentration and potentiate remifentanyl but do not prevent acute opioid tolerance and hyperalgesia in the rat: a randomised laboratory study. *Eur J Anaesthesiol* 32:248–254.
- Aley KO, Messing RO, Mochly-Rosen D, Levine JD (2000) Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. *J Neurosci* 20:4680–4685.
- Alizadeh Z, Fereidoni M, Behnam-Rassouli M, Hosseini S (2014) Role of C-fibers in pain and morphine induced analgesia/hyperalgesia in rats. *Iran J Neurol* 13:19–27.
- Andersen G, Christrup L, Sjogren P (2003) Relationships among morphine metabolism, pain and side effects during long-term treatment: an update. *J Pain Symptom Manage* 25:74–91.
- Angst MS, Clark JD (2006) Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review. *Anesthesiology* 104:570–587.
- Antal M, Fukazawa Y, Eordogh M, Muszli D, Molnar E, Itakura M, Takahashi M, Shigemoto R (2008) Numbers, densities, and colocalization of AMPA- and NMDA-type glutamate receptors at individual synapses in the superficial spinal dorsal horn of rats. *J Neurosci* 28:9692–9701.
- Araldi D, Ferrari LF, Levine JD (2015) Repeated mu-opioid exposure induces a novel form of the hyperalgesic priming model for transition to chronic pain. *J Neurosci* 35:12502–12517.
- Arout CA, Caldwell M, McCloskey DP, Kest B (2014) C-Fos activation in the periaqueductal gray following acute morphine-3beta-D-glucuronide or morphine administration. *Physiol Behav* 130:28–33.
- Arout CA, Caldwell M, Rossi G, Kest B (2015a) Spinal and supraspinal N-methyl-D-aspartate and melanocortin-1 receptors

- contribute to a qualitative sex difference in morphine-induced hyperalgesia. *Physiol Behav* 147:364–372.
- Arout CA, Edens E, Petrakis IL, Sofuoglu M (2015b) Targeting opioid-induced hyperalgesia in clinical treatment: neurobiological considerations. *CNS Drugs* 29:465–486.
- Austin PJ, Berglund AM, Siu S, Fiore NT, Gerke-Duncan MB, Ollerenshaw SL, Leigh SJ, Kunjan PA, Kang JW, Keay KA (2015) Evidence for a distinct neuro-immune signature in rats that develop behavioural disability after nerve injury. *J Neuroinflammation* 12:96.
- Bai L, Zhai C, Han K, Li Z, Qian J, Jing Y, Zhang W, Xu JT (2014) Toll-like receptor 4-mediated nuclear factor-kappaB activation in spinal cord contributes to chronic morphine-induced analgesic tolerance and hyperalgesia in rats. *Neurosci Bull* 30:936–948.
- Bannister K, Sikandar S, Bauer CS, Dolphin AC, Porreca F, Dickenson AH (2011) Pregabalin suppresses spinal neuronal hyperexcitability and visceral hypersensitivity in the absence of peripheral pathophysiology. *Anesthesiology* 115:144–152.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267–284.
- Basso L, Boue J, Bourreille A, Dietrich G (2014) Endogenous regulation of inflammatory pain by T-cell-derived opioids: when friend turns to foe. *Inflamm Bowel Dis* 20:1870–1877.
- Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE, Julius D (2007) The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448:204–208.
- Beaudry H, Gendron L, Moron JA (2015) Implication of delta opioid receptor subtype 2 but not delta opioid receptor subtype 1 in the development of morphine analgesic tolerance in a rat model of chronic inflammatory pain. *Eur J Neurosci* 41:901–907.
- Benrath J, Brechtel C, Stark J, Sandkuhler J (2005) Low dose of S + -ketamine prevents long-term potentiation in pain pathways under strong opioid analgesia in the rat spinal cord in vivo. *Br J Anaesth* 95:518–523.
- Berta T, Liu T, Liu YC, Xu ZZ, Ji RR (2012) Acute morphine activates satellite glial cells and up-regulates IL-1beta in dorsal root ganglia in mice via matrix metalloproteinase-9. *Mol Pain* 8:18.
- Berta T, Liu YC, Xu ZZ, Ji RR (2013) Tissue plasminogen activator contributes to morphine tolerance and induces mechanical allodynia via astrocytic IL-1beta and ERK signaling in the spinal cord of mice. *Neuroscience* 247:376–385.
- Besse D, Lombard MC, Zajac JM, Roques BP, Besson JM (1990) Pre- and postsynaptic distribution of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res* 521:15–22.
- Bianchi E, Galeotti N, Menicacci C, Ghelardini C (2011) Contribution of G inhibitory protein alpha subunits in paradoxical hyperalgesia elicited by exceedingly low doses of morphine in mice. *Life Sci* 89:918–925.
- Bianchi E, Norcini M, Smrcka A, Ghelardini C (2009) Supraspinal Gbetagamma-dependent stimulation of PLCbeta originating from G inhibitory protein-mu opioid receptor-coupling is necessary for morphine induced acute hyperalgesia. *J Neurochem* 111:171–180.
- Block L, Bjorklund U, Westerlund A, Jorneberg P, Biber B, Hansson E (2013) A new concept affecting restoration of inflammation-reactive astrocytes. *Neuroscience* 250:536–545.
- Bodnar RJ, Kest B (2010) Sex differences in opioid analgesia, hyperalgesia, tolerance and withdrawal: central mechanisms of action and roles of gonadal hormones. *Horm Behav* 58:72–81.
- Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG (2000) Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 408:720–723.
- Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D (2006) Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10:287–333.
- Breivik H, Eisenberg E, O'Brien T (2013) The individual and societal burden of chronic pain in Europe: the case for strategic prioritisation and action to improve knowledge and availability of appropriate care. *BMC Public Health* 13:1229.
- Cahill CM, Taylor AM, Cook C, Ong E, Moron JA, Evans CJ (2014) Does the kappa opioid receptor system contribute to pain aversion? *Front Pharmacol* 5:253.
- Calvo M, Dawes JM, Bennett DL (2012) The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *Lancet Neurol* 11:629–642.
- Carullo V, Fitz-James I, Delphin E (2015) Opioid-induced hyperalgesia: a diagnostic dilemma. *J Pain Palliat Care Pharmacother* 29:378–384.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science (New York, NY)* 288:306–313.
- Celerier E, Laulin J, Larcher A, Le Moal M, Simonnet G (1999) Evidence for opiate-activated NMDA processes masking opiate analgesia in rats. *Brain Res* 847:18–25.
- Celerier E, Laulin JP, Corcuff JB, Le Moal M, Simonnet G (2001) Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: a sensitization process. *J Neurosci* 21:4074–4080.
- Celerier E, Rivat C, Jun Y, Laulin JP, Larcher A, Reynier P, Simonnet G (2000) Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: preventive effect of ketamine. *Anesthesiology* 92:465–472.
- Celerier E, Simonnet G, Maldonado R (2004) Prevention of fentanyl-induced delayed pronociceptive effects in mice lacking the protein kinase Cgamma gene. *Neuropharmacology* 46:264–272.
- Chabot-Dore AJ, Schuster DJ, Stone LS, Wilcox GL (2015) Analgesic synergy between opioid and alpha2 -adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 172:388–402.
- Chao YC, Xie F, Li X, Guo R, Yang N, Zhang C, Shi R, Guan Y, Yue Y, Wang Y (2016) Demethylation regulation of BDNF gene expression in dorsal root ganglion neurons is implicated in opioid-induced pain hypersensitivity in rats. *Neurochem Int*.
- Chen L, Huang LY (1991) Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a mu opioid. *Neuron* 7:319–326.
- Chen L, Sein M, Vo T, Amhmed S, Zhang Y, Hilaire KS, Houghton M, Mao J (2014) Clinical interpretation of opioid tolerance versus opioid-induced hyperalgesia. *J Opioid Manag* 10:383–393.
- Chen Y, Geis C, Sommer C (2008) Activation of TRPV1 contributes to morphine tolerance: involvement of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Neurosci* 28:5836–5845.
- Chu LF, Angst MS, Clark D (2008) Opioid-induced hyperalgesia in humans: molecular mechanisms and clinical considerations. *Clin J Pain* 24:479–496.
- Chu LF, Clark DJ, Angst MS (2006) Opioid tolerance and hyperalgesia in chronic pain patients after one month of oral morphine therapy: a preliminary prospective study. *J Pain* 7:43–48.
- Chu LF, D'Arcy N, Brady C, Zamora AK, Young CA, Kim JE, Clemenson AM, Angst MS, Clark JD (2012) Analgesic tolerance without demonstrable opioid-induced hyperalgesia: a double-blinded, randomized, placebo-controlled trial of sustained-release morphine for treatment of chronic nonradicular low-back pain. *Pain* 153:1583–1592.
- Chu LF, Dairmont J, Zamora AK, Young CA, Angst MS (2011) The endogenous opioid system is not involved in modulation of opioid-induced hyperalgesia. *J Pain* 12:108–115.
- Coller JK, Christrup LL, Somogyi AA (2009) Role of active metabolites in the use of opioids. *Eur J Clin Pharmacol* 65:121–139.
- Compton P, Canamar CP, Hillhouse M, Ling W (2012) Hyperalgesia in heroin dependent patients and the effects of opioid substitution therapy. *J Pain* 13:401–409.
- Compton P, Charuvastra VC, Ling W (2001) Pain intolerance in opioid-maintained former opiate addicts: effect of long-acting maintenance agent. *Drug Alcohol Depend* 63:139–146.
- Convertino M, Samoshkin A, Gauthier J, Gold MS, Maixner W, Dokholyan NV, Diatchenko L (2015) Mu-opioid receptor 6-transmembrane isoform: a potential therapeutic target for new effective opioids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 62:61–67.

- Corder G, Doolen S, Donahue RR, Winter MK, Jutras BL, He Y, Hu X, Wieskopf JS, Mogil JS, Storm DR, Wang ZJ, McCarson KE, Taylor BK (2013) Constitutive mu-opioid receptor activity leads to long-term endogenous analgesia and dependence. *Science (New York, NY)* 341:1394–1399.
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017–1021.
- Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y (2003) Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424:938–942.
- Crain SM, Shen KF (2004) Neuraminidase inhibitor, oseltamivir blocks GM1 ganglioside-regulated excitatory opioid receptor-mediated hyperalgesia, enhances opioid analgesia and attenuates tolerance in mice. *Brain Res* 995:260–266.
- Crofford LJ (2010) Adverse effects of chronic opioid therapy for chronic musculoskeletal pain. *Nat Rev Rheumatol* 6:191–197.
- Cvrcek P (2008) Side effects of ketamine in the long-term treatment of neuropathic pain. *Pain Med* 9:253–257.
- Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, Greenberg ME (2000) EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103:945–956.
- Dang VC, Christie MJ (2012) Mechanisms of rapid opioid receptor desensitization, resensitization and tolerance in brain neurons. *Br J Pharmacol* 165:1704–1716.
- de Araujo Lucas G, Alster P, Brodin E, Wiesenfeld-Hallin Z (1998) Differential release of cholecystokinin by morphine in rat spinal cord. *Neurosci Lett* 245:13–16.
- De Gregori S, De Gregori M, Ranzani GN, Allegri M, Minella C, Regazzi M (2012) Morphine metabolism, transport and brain disposition. *Metab Brain Dis* 27:1–5.
- De Leo JA, Tawfik VL, LaCroix-Fralish ML (2006) The tetrapartite synapse: path to CNS sensitization and chronic pain. *Pain* 122:17–21.
- Denk F, McMahon SB, Tracey I (2014) Pain vulnerability: a neurobiological perspective. *Nat Neurosci* 17:192–200.
- Depner UB, Reinscheid RK, Takeshima H, Brune K, Zeilhofer HU (2003) Normal sensitivity to acute pain, but increased inflammatory hyperalgesia in mice lacking the nociceptin precursor polypeptide or the nociceptin receptor. *Eur J Neurosci* 17:2381–2387.
- Descalzi G, Ikegami D, Ushijima T, Nestler EJ, Zachariou V, Narita M (2015) Epigenetic mechanisms of chronic pain. *Trends Neurosci* 38:237–246.
- Doehring A, Geisslinger G, Lotsch J (2011) Epigenetics in pain and analgesia: an imminent research field. *Eur J Pain* 15:11–16.
- Doehring A, Oertel BG, Sittl R, Lotsch J (2013) Chronic opioid use is associated with increased DNA methylation correlating with increased clinical pain. *Pain* 154:15–23.
- Dogrul A, Ossipov MH, Porreca F (2009) Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. *Brain Res* 1280:52–59.
- Donaldson R, Sun Y, Liang DY, Zheng M, Sahbaie P, Dill DL, Peltz G, Buck KJ, Clark JD (2016) The multiple PDZ domain protein Mpdz/MUPP1 regulates opioid tolerance and opioid-induced hyperalgesia. *BMC Genomics* 17:313.
- Donovan-Rodriguez T, Urch CE, Dickenson AH (2006) Evidence of a role for descending serotonergic facilitation in a rat model of cancer-induced bone pain. *Neurosci Lett* 393:237–242.
- Dourish CT, O'Neill MF, Schaffer LW, Siegl PK, Iversen SD (1990) The cholecystokinin receptor antagonist devazepide enhances morphine-induced analgesia but not morphine-induced respiratory depression in the squirrel monkey. *J Pharmacol Exp Ther* 255:1158–1165.
- Drdla R, Gassner M, Gingl E, Sandkuhler J (2009) Induction of synaptic long-term potentiation after opioid withdrawal. *Science (New York, NY)* 325:207–210.
- Drdla-Schutting R, Benrath J, Wunderbaldinger G, Sandkuhler J (2012) Erasure of a spinal memory trace of pain by a brief, high-dose opioid administration. *Science (New York, NY)* 335:235–238.
- Due MR, Piekarz AD, Wilson N, Feldman P, Ripsch MS, Chavez S, Yin H, Khanna R, White FA (2012) Neuroexcitatory effects of morphine-3-glucuronide are dependent on Toll-like receptor 4 signaling. *J Neuroinflammation* 9:200.
- Duttaroy A, Yoburn BC (1995) The effect of intrinsic efficacy on opioid tolerance. *Anesthesiology* 82:1226–1236.
- Eidson LN, Murphy AZ (2013a) Blockade of Toll-like receptor 4 attenuates morphine tolerance and facilitates the pain relieving properties of morphine. *J Neurosci* 33:15952–15963.
- Eidson LN, Murphy AZ (2013b) Persistent peripheral inflammation attenuates morphine-induced periaqueductal gray glial cell activation and analgesic tolerance in the male rat. *J Pain* 14:393–404.
- Elhabazi K, Ayachi S, Ilien B, Simonin F (2014) Assessment of morphine-induced hyperalgesia and analgesic tolerance in mice using thermal and mechanical nociceptive modalities. *J Vis Exp: JoVE*:e51264.
- Elhabazi K, Trigo JM, Mollereau C, Mouldous L, Zajac JM, Bihel F, Schmitt M, Bourguignon JJ, Meziane H, Petit-demouliere B, Bockel F, Maldonado R, Simonin F (2012) Involvement of neuropeptide FF receptors in neuroadaptive responses to acute and chronic opiate treatments. *Br J Pharmacol* 165:424–435.
- Erbas E, Faget L, Ceredig RA, Matifas A, Vonesch JL, Kieffer BL, Massotte D (2016) Impact of chronic morphine on delta opioid receptor-expressing neurons in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 313:46–56.
- Faris PL, Komisaruk BR, Watkins LR, Mayer DJ (1983) Evidence for the neuropeptide cholecystokinin as an antagonist of opiate analgesia. *Science (New York, NY)* 219:310–312.
- Ferrini F, Trang T, Mattioli TA, Laffray S, Del'Guidice T, Lorenzo LE, Castonguay A, Doyon N, Zhang W, Godin AG, Mohr D, Beggs S, Vandal K, Beaulieu JM, Cahill CM, Salter MW, De Koninck Y (2013) Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal $Cl(-)$ homeostasis. *Nat Neurosci* 16:183–192.
- Fishbain DA, Cole B, Lewis JE, Gao J, Rosomoff RS (2009) Do opioids induce hyperalgesia in humans? An evidence-based structured review. *Pain Med* 10:829–839.
- Fletcher D, Martinez V (2014) Opioid-induced hyperalgesia in patients after surgery: a systematic review and a meta-analysis. *Br J Anaesth* 112:991–1004.
- Frankiewicz T, Potier B, Bashir ZI, Collingridge GL, Parsons CG (1996) Effects of memantine and MK-801 on NMDA-induced currents in cultured neurones and on synaptic transmission and LTP in area CA1 of rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol* 117:689–697.
- Frolich N, Dees C, Paetz C, Ren X, Lohse MJ, Nikolaev VO, Zenk MH (2011) Distinct pharmacological properties of morphine metabolites at G(i)-protein and beta-arrestin signaling pathways activated by the human mu-opioid receptor. *Biochem Pharmacol* 81:1248–1254.
- Fujita W, Gomes I, Devi LA (2015) Heteromers of mu-delta opioid receptors: new pharmacology and novel therapeutic possibilities. *Br J Pharmacol* 172:375–387.
- Fukagawa H, Koyama T, Kakuyama M, Fukuda K (2013) Microglial activation involved in morphine tolerance is not mediated by toll-like receptor 4. *J Anesth* 27:93–97.
- Galeotti N, Stefano GB, Guarna M, Bianchi E, Ghelardini C (2006) Signaling pathway of morphine induced acute thermal hyperalgesia in mice. *Pain* 123:294–305.
- Gaveriaux-Ruff C (2013) Opiate-induced analgesia: contributions from mu, delta and kappa opioid receptors mouse mutants. *Curr Pharm Des* 19:7373–7381.
- Gerhold KJ, Drdla-Schutting R, Honsek SD, Forsthuber L, Sandkuhler J (2015) Pronociceptive and antinociceptive effects of buprenorphine in the spinal cord dorsal horn cover a dose range of four orders of magnitude. *J Neurosci* 35:9580–9594.

- Gomes I, Fujita W, Gupta A, Saldanha SA, Negri A, Pinello CE, Eberhart C, Roberts E, Filizola M, Hodder P, Devi LA (2013) Identification of a mu-delta opioid receptor heteromer-biased agonist with antinociceptive activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:12072–12077.
- Gong K, Bhargava A, Jasmin L (2016) GluN2B N-methyl-D-aspartate receptor and excitatory amino acid transporter 3 are upregulated in primary sensory neurons after 7 days of morphine administration in rats: implication for opiate-induced hyperalgesia. *Pain* 157:147–158.
- Grace PM, Hutchinson MR, Maier SF, Watkins LR (2014) Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat Rev Immunol* 14:217–231.
- Grace PM, Maier SF, Watkins LR (2015) Opioid-induced central immune signaling: implications for opioid analgesia. *Headache* 55:475–489.
- Gris P, Gauthier J, Cheng P, Gibson DG, Gris D, Laur O, Pierson J, Wentworth S, Nackley AG, Maixner W, Diatchenko L (2010) A novel alternatively spliced isoform of the mu-opioid receptor: functional antagonism. *Mol Pain* 6:33.
- Gruber-Schoffnegger D, Drdla-Schutting R, Honigspurger C, Wunderbaldinger G, Gassner M, Sandkuhler J (2013) Induction of thermal hyperalgesia and synaptic long-term potentiation in the spinal cord lamina I by TNF-alpha and IL-1beta is mediated by glial cells. *J Neurosci* 33:6540–6551.
- Guo W, Miyoshi K, Dubner R, Gu M, Li M, Liu J, Yang J, Zou S, Ren K, Noguchi K, Wei F (2014) Spinal 5-HT3 receptors mediate descending facilitation and contribute to behavioral hypersensitivity via a reciprocal neuron-glial signaling cascade. *Mol Pain* 10:35.
- Gustafsson H, Afrah AW, Stiller CO (2001) Morphine-induced in vivo release of spinal cholecystokinin is mediated by delta-opioid receptors—effect of peripheral axotomy. *J Neurochem* 78:55–63.
- Hampton SB, Cavalier J, Langford R (2015) The influence of race and gender on pain management: a systematic literature review. *Pain Manag Nurs* 16:968–977.
- Harland AA, Yeomans L, Griggs NW, Anand JP, Pogozheva ID, Jutkiewicz EM, Traynor JR, Mosberg HI (2015) Further optimization and evaluation of bioavailable, mixed-efficacy mu-opioid receptor (MOR) agonists/delta-opioid receptor (DOR) antagonists: balancing MOR and DOR affinities. *J Med Chem* 58:8952–8969.
- Haugan F, Rygh LJ, Tjolsen A (2008) Ketamine blocks enhancement of spinal long-term potentiation in chronic opioid treated rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 52:681–687.
- Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18:1926–1945.
- Hayhurst CJ, Durieux ME (2016) Differential opioid tolerance and opioid-induced hyperalgesia: a clinical reality. *Anesthesiology* 124:483–488.
- He L, Li H, Chen L, Miao J, Jiang Y, Zhang Y, Xiao Z, Hanley G, Li Y, Zhang X, LeSage G, Peng Y, Yin D (2011) Toll-like receptor 9 is required for opioid-induced microglia apoptosis. *PLoS ONE* 6:e18190.
- Heinisch S, Palma J, Kirby LG (2011) Interactions between chemokine and mu-opioid receptors: anatomical findings and electrophysiological studies in the rat periaqueductal grey. *Brain Behav Immun* 25:360–372.
- Henderson JT, Georgiou J, Jia Z, Robertson J, Elowe S, Roder JC, Pawson T (2001) The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. *Neuron* 32:1041–1056.
- Hina N, Fletcher D, Poindessous-Jazat F, Martinez V (2015) Hyperalgesia induced by low-dose opioid treatment before orthopaedic surgery: an observational case-control study. *Eur J Anaesthesiol* 32:255–261.
- Hoffmann O, Wiesenfeld-Hallin Z (1994) The CCK-B receptor antagonist CI 988 reverses tolerance to morphine in rats. *NeuroReport* 5:2565–2568.
- Holtman Jr JR, Wala EP (2005) Characterization of morphine-induced hyperalgesia in male and female rats. *Pain* 114:62–70.
- Holtman Jr JR, Wala EP (2007) Characterization of the antinociceptive and pronociceptive effects of methadone in rats. *Anesthesiology* 106:563–571.
- Hopkins E, Rossi G, Kest B (2004) Sex differences in systemic morphine analgesic tolerance following intrathecal morphine injections. *Brain Res* 1014:244–246.
- Horvath RJ, DeLeo JA (2009) Morphine enhances microglial migration through modulation of P2X4 receptor signaling. *J Neurosci* 29:998–1005.
- Horvath RJ, Romero-Sandoval EA, De Leo JA (2010) Inhibition of microglial P2X4 receptors attenuates morphine tolerance, Iba1, GFAP and mu opioid receptor protein expression while enhancing perivascular microglial ED2. *Pain* 150:401–413.
- Hurle MA (2001) Changes in the expression of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin 2 in rat brain during opioid tolerance and supersensitivity. *J Neurochem* 77:486–492.
- Hutchinson MR, Shavit Y, Grace PM, Rice KC, Maier SF, Watkins LR (2011) Exploring the neuroimmunopharmacology of opioids: an integrative review of mechanisms of central immune signaling and their implications for opioid analgesia. *Pharmacol Rev* 63:772–810.
- Hutchinson MR, Zhang Y, Shridhar M, Evans JH, Buchanan MM, Zhao TX, Slivka PF, Coats BD, Rezvani N, Wieseler J, Hughes TS, Landgraf KE, Chan S, Fong S, Phipps S, Falke JJ, Leinwand LA, Maier SF, Yin H, Rice KC, Watkins LR (2010) Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain Behav Immun* 24:83–95.
- Ji RR, Berta T, Nedergaard M (2013) Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* 154(Suppl 1):S10–S28.
- Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ (2014) Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discovery* 13:533–548.
- Jiang B, Shi Y, Li H, Kang L, Ma L (2006) Decreased morphine analgesia in rat overexpressing beta-arrestin 2 at periaqueductal gray. *Neurosci Lett* 400:150–153.
- Jin JF, Zhu LL, Chen M, Xu HM, Wang HF, Feng XQ, Zhu XP, Zhou Q (2015) The optimal choice of medication administration route regarding intravenous, intramuscular, and subcutaneous injection. *Patient Prefer Adherence* 9:923–942.
- Johannes CB, Le TK, Zhou X, Johnston JA, Dworkin RH (2010) The prevalence of chronic pain in United States adults: results of an Internet-based survey. *J Pain* 11:1230–1239.
- Johnson JL, Rolan PE, Johnson ME, Bobrovskaya L, Williams DB, Johnson K, Tuke J, Hutchinson MR (2014) Codeine-induced hyperalgesia and allodynia: investigating the role of glial activation. *Transl Psychiatry* 4:e482.
- Johnston IN, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Frank MG, Zapata V, Campisi J, Langer S, Martin D, Green P, Fleshner M, Leinwand L, Maier SF, Watkins LR (2004) A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine. *J Neurosci* 24:7353–7365.
- Julius D (2013) TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29:355–384.
- Juni A, Cai M, Stankova M, Waxman AR, Arout C, Klein G, Dahan A, Hruby VJ, Mogil JS, Kest B (2010) Sex-specific mediation of opioid-induced hyperalgesia by the melanocortin-1 receptor. *Anesthesiology* 112:181–188.
- Juni A, Klein G, Kest B (2006) Morphine hyperalgesia in mice is unrelated to opioid activity, analgesia, or tolerance: evidence for multiple diverse hyperalgesic systems. *Brain Res* 1070:35–44.
- Juni A, Klein G, Kowalczyk B, Ragnauth A, Kest B (2008) Sex differences in hyperalgesia during morphine infusion: effect of gonadectomy and estrogen treatment. *Neuropharmacology* 54:1264–1270.
- Kalange AS, Kokare DM, Singru PS, Upadhy MA, Chopde CT, Subhedar NK (2007) Central administration of selective melanocortin 4 receptor antagonist HS014 prevents morphine tolerance and withdrawal hyperalgesia. *Brain Res* 1181:10–20.
- Klein T, Magerl W, Nickel U, Hopf HC, Sandkuhler J, Treede RD (2007) Effects of the NMDA-receptor antagonist ketamine on

- perceptual correlates of long-term potentiation within the nociceptive system. *Neuropharmacology* 52:655–661.
- Komatsu T, Sakurada S, Katsuyama S, Sanai K, Sakurada T (2009) Mechanism of allodynia evoked by intrathecal morphine-3-glucuronide in mice. *Int Rev Neurobiol* 85:207–219.
- Kranke P, Jokinen J, Pace NL, Schnabel A, Hollmann MW, Hahnenkamp K, Eberhart LH, Poepping DM, Weibel S (2015) Continuous intravenous perioperative lidocaine infusion for postoperative pain and recovery. The Cochrane database of systematic reviews CD009642.
- Labouereyas E, Aubrun F, Monsaingeon M, Corcuff JB, Laulin JP, Simonnet G (2014) Exogenous and endogenous opioid-induced pain hypersensitivity in different rat strains. *Pain Res Manag* 19:191–197.
- Larcher A, Laulin JP, Celerier E, Le Moal M, Simonnet G (1998) Acute tolerance associated with a single opiate administration: involvement of N-methyl-D-aspartate-dependent pain facilitatory systems. *Neuroscience* 84:583–589.
- Largent-Milnes TM, Guo W, Wang HY, Burns LH, Vanderah TW (2008) Oxycodone plus ultra-low-dose naltrexone attenuates neuropathic pain and associated mu-opioid receptor-Gs coupling. *J Pain* 9:700–713.
- Laux-Biehlmann A, Mouheiche J, Veriepe J, Goumon Y (2013) Endogenous morphine and its metabolites in mammals: history, synthesis, localization and perspectives. *Neuroscience* 233:95–117.
- Law PY, Reggio PH, Loh HH (2013) Opioid receptors: toward separation of analgesic from undesirable effects. *Trends Biochem Sci* 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.
- Lewis SS, Hutchinson MR, Rezvani N, Loram LC, Zhang Y, Maier SF, Rice KC, Watkins LR (2010) Evidence that intrathecal morphine-3-glucuronide may cause pain enhancement via toll-like receptor 4/MD-2 and interleukin-1beta. *Neuroscience* 165:569–583.
- Li X, Angst MS, Clark JD (2001) A murine model of opioid-induced hyperalgesia. *Brain Res Mol Brain Res* 86:56–62.
- Liang D, Shi X, Qiao Y, Angst MS, Yeomans DC, Clark JD (2008) Chronic morphine administration enhances nociceptive sensitivity and local cytokine production after incision. *Mol Pain* 4:7.
- Liang DY, Li X, Clark JD (2011) 5-Hydroxytryptamine type 3 receptor modulates opioid-induced hyperalgesia and tolerance in mice. *Anesthesiology* 114:1180–1189.
- Liang DY, Li X, Clark JD (2013) Epigenetic regulation of opioid-induced hyperalgesia, dependence, and tolerance in mice. *J Pain* 14:36–47.
- Liang DY, Liao G, Wang J, Usuka J, Guo Y, Peltz G, Clark JD (2006) A genetic analysis of opioid-induced hyperalgesia in mice. *Anesthesiology* 104:1054–1062.
- Liang DY, Sun Y, Shi XY, Sahbaie P, Clark JD (2014a) Epigenetic regulation of spinal cord gene expression controls opioid-induced hyperalgesia. *Mol Pain* 10:59.
- Liang DY, Zheng M, Sun Y, Sahbaie P, Low SA, Peltz G, Scherrer G, Flores C, Clark JD (2014b) The Netrin-1 receptor DCC is a regulator of maladaptive responses to chronic morphine administration. *BMC Genomics* 15:345.
- Lin CP, Kang KH, Lin TH, Wu MY, Liou HC, Chuang WJ, Sun WZ, Fu WM (2015a) Role of spinal CXCL1 (GROalpha) in opioid tolerance: a human-to-rodent translational study. *Anesthesiology* 122:666–676.
- Lin SL, Chang FL, Ho SY, Charoenkwan P, Wang KW, Huang HL (2015b) Predicting neuroinflammation in morphine tolerance for tolerance therapy from immunostaining images of rat spinal cord. *PLoS ONE* 10:e0139806.
- Little JW, Cuzzocrea S, Bryant L, Esposito E, Doyle T, Rausaria S, Neumann WL, Salvemini D (2013) Spinal mitochondrial-derived peroxynitrite enhances neuroimmune activation during morphine hyperalgesia and antinociceptive tolerance. *Pain* 154:978–986.
- Liu X, Sandkuhler J (1997) Characterization of long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors. *J Neurophysiol* 78:1973–1982.
- Lopez-Garcia JA (2006) Serotonergic modulation of spinal sensory circuits. *Curr Top Med Chem* 6:1987–1996.
- Lotsch J (2009) Pleiotropic effects of morphine-6beta-glucuronide. *Anesthesiology* 110:1209–1210.
- Lotsch J, Geisslinger G (2010) A critical appraisal of human genotyping for pain therapy. *Trends Pharmacol Sci* 31:312–317.
- Lu C, Shi L, Zhang J, Kong M, Liu Y, Zhou Y, Xu L, He J, Ma Z, Gu X (2015) Neuron-restrictive silencer factor in periaqueductal gray contributes to remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia via repression of the mu-opioid receptor. *J Neurol Sci* 352:48–52.
- Luo X, Wang X, Xia Z, Chung SK, Cheung CW (2016) CXCL12/CXCR4 axis: an emerging neuromodulator in pathological pain. *Rev Neurosci* 27:83–92.
- Lutz BM, Nia S, Xiong M, Tao YX, Bekker A (2015) MTOR, a new potential target for chronic pain and opioid-induced tolerance and hyperalgesia. *Mol Pain* 11:32.
- Machelska H (2011) Control of neuropathic pain by immune cells and opioids. *CNS Neurol Disord: Drug Targets* 10:559–570.
- Mann A, Illing S, Miess E, Schulz S (2015) Different mechanisms of homologous and heterologous mu-opioid receptor phosphorylation. *Br J Pharmacol* 172:311–316.
- Mao J, Price DD, Mayer DJ (1994) Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. *J Neurosci* 14:2301–2312.
- Mao J, Sung B, Ji RR, Lim G (2002) Chronic morphine induces downregulation of spinal glutamate transporters: implications in morphine tolerance and abnormal pain sensitivity. *J Neurosci* 22:8312–8323.
- Mapplebeck JC, Beggs S, Salter MW (2016) Sex differences in pain: a tale of two immune cells. *Pain* 157(Suppl 1):S2–S6.
- Massotte D (2015) In vivo opioid receptor heteromerization: where do we stand? *Br J Pharmacol* 172:420–434.
- Matthes HWD, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, LeMeur M, Dollé P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Nature* 383:819–823.
- Mattioli TA, Leduc-Pessah H, Skelhorn-Gross G, Nicol CJ, Milne B, Trang T, Cahill CM (2014) Toll-like receptor 4 mutant and null mice retain morphine-induced tolerance, hyperalgesia, and physical dependence. *PLoS ONE* 9:e97361.
- Mauermann E, Filitz J, Dolder P, Rentsch KM, Bandschapp O, Ruppen W (2016) Does fentanyl lead to opioid-induced hyperalgesia in healthy volunteers?: A double-blind, randomized, crossover trial. *Anesthesiology* 124:453–463.
- Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD (1999) Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7731–7736.
- McNally GP (1999) Pain facilitatory circuits in the mammalian central nervous system: their behavioral significance and role in morphine analgesic tolerance. *Neurosci Biobehav Rev* 23:1059–1078.
- Melik Parsadaniantz S, Rivat C, Rostene W, Reaux-Le Goazigo A (2015) Opioid and chemokine receptor crosstalk: a promising target for pain therapy? *Nat Rev Neurosci* 16:69–78.
- Mercadante S, Arcuri E (2005) Hyperalgesia and opioid switching. *Am J Hosp Palliat Care* 22:291–294.
- Mercadante S, Bruera E (2016) Opioid switching in cancer pain: from the beginning to nowadays. *Crit Rev Oncol/Hematol* 99:241–248.
- Mercadante S, Ferrera P, Villari P, Casuccio A, Intravaia G, Mangione S (2009) Frequency, indications, outcomes, and predictive factors of opioid switching in an acute palliative care unit. *J Pain Symptom Manage* 37:632–641.
- Merighi S, Gessi S, Varani K, Fazzi D, Stefanelli A, Borea PA (2013) Morphine mediates a proinflammatory phenotype via mu-opioid

- receptor-PKCvarepsilon-Akt-ERK1/2 signaling pathway in activated microglial cells. *Biochem Pharmacol* 86:487–496.
- Mika J, Zychowska M, Popielek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B (2013) Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 716:106–119.
- Milne B, Jhamandas K, Sutak M, Grenier P, Cahill CM (2013) Stereoselective inhibition of spinal morphine tolerance and hyperalgesia by an ultra-low dose of the alpha-2-adrenoceptor antagonist efaroxan. *Eur J Pharmacol* 702:227–234.
- Milne B, Sutak M, Cahill CM, Jhamandas K (2008) Low doses of alpha 2-adrenoceptor antagonists augment spinal morphine analgesia and inhibit development of acute and chronic tolerance. *Br J Pharmacol* 155:1264–1278.
- Mogil JS (2012) Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nat Rev Neurosci* 13:859–866.
- Mosberg HI, Yeomans L, Anand JP, Porter V, Sobczyk-Kojiro K, Traynor JR, Jutkiewicz EM (2014) Development of a bioavailable mu opioid receptor (MOPr) agonist, delta opioid receptor (DOPr) antagonist peptide that evokes antinociception without development of acute tolerance. *J Med Chem* 57:3148–3153.
- Mouledous L, Mollereau C, Zajac JM (2010) Opioid-modulating properties of the neuropeptide FF system. *BioFactors* 36:423–429.
- Muscoli C, Doyle T, Dagostino C, Bryant L, Chen Z, Watkins LR, Ryser J, Bieberich E, Neumann W, Salvemini D (2010) Counter-regulation of opioid analgesia by glial-derived bioactive sphingolipids. *J Neurosci* 30:15400–15408.
- Ninkovic J, Roy S (2013) Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. *Amino Acids* 45:9–24.
- Niu Z, Ma J, Chu H, Zhao Y, Feng W, Cheng Y (2012) Melanocortin 4 receptor antagonists attenuates morphine antinociceptive tolerance, astroglial activation and cytokines expression in the spinal cord of rat. *Neurosci Lett* 529:112–117.
- Ohnesorge H, Feng Z, Zitta K, Steinfath M, Albrecht M, Bein B (2013) Influence of clonidine and ketamine on m-RNA expression in a model of opioid-induced hyperalgesia in mice. *PLoS ONE* 8: e79567.
- Oladosu FA, Conrad MS, O'Buckley SC, Rashid NU, Slade GD, Nackle AG (2015) Mu opioid splice variant MOR-1K contributes to the development of opioid-induced hyperalgesia. *PLoS ONE* 10:e0135711.
- Old EA, Clark AK, Malcangio M (2015) The role of glia in the spinal cord in neuropathic and inflammatory pain. *Handb Exp Pharmacol* 227:145–170.
- Ong EW, Cahill CM (2014) Molecular perspectives for mu/delta opioid receptor heteromers as distinct, functional receptors. *Cells* 3:152–179.
- Ossipov MH, Lai J, Vanderah TW, Porreca F (2003) Induction of pain facilitation by sustained opioid exposure: relationship to opioid antinociceptive tolerance. *Life Sci* 73:783–800.
- Pan ZZ (1998) Mu-Opposing actions of the kappa-opioid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 19:94–98.
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates 3rd JR, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB (2013) Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155:1596–1609.
- Pasternak GW, Pan YX (2013) Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacol Rev* 65:1257–1317.
- Por ED, Bierbower SM, Berg KA, Gomez R, Akopian AN, Wetsel WC, Jeske NA (2012) Beta-Arrestin-2 desensitizes the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel. *J Biol Chem* 287:37552–37563.
- Posillico CK, Terasaki LS, Bilbo SD, Schwarz JM (2015) Examination of sex and minocycline treatment on acute morphine-induced analgesia and inflammatory gene expression along the pain pathway in Sprague-Dawley rats. *Biol Sex Differ* 6:33.
- Qiu S, Feng Y, LeSage G, Zhang Y, Stuart C, He L, Li Y, Caudle Y, Peng Y, Yin D (2015) Chronic morphine-induced microRNA-124 promotes microglial immunosuppression by modulating P65 and TRAF6. *J Immunol* 194:1021–1030.
- Raghavendra V, Rutkowski MD, DeLeo JA (2002) The role of spinal neuroimmune activation in morphine tolerance/hyperalgesia in neuropathic and sham-operated rats. *J Neurosci* 22:9980–9989.
- Raghavendra V, Tanga FY, DeLeo JA (2004) Attenuation of morphine tolerance, withdrawal-induced hyperalgesia, and associated spinal inflammatory immune responses by propentofylline in rats. *Neuropsychopharmacology* 29:327–334.
- Ramasubbu C, Gupta A (2011) Pharmacological treatment of opioid-induced hyperalgesia: a review of the evidence. *J Pain Palliat Care Pharmacother* 25:219–230.
- Ren K, Dubner R (2015) Activity-triggered tetrapartite neuron-glial interactions following peripheral injury. *Curr Opin Pharmacol* 26:16–25.
- Renfrew S, Downton C, Featherstone J (2003) The painful reality. *Nat Rev Drug Discovery* 2:175–176.
- Richebe P, Cahana A, Rivat C (2012) Tolerance and opioid-induced hyperalgesia. Is a divorce imminent? *Pain* 153:1547–1548.
- Richebe P, Rivat C, Laulin JP, Maurette P, Simonnet G (2005) Ketamine improves the management of exaggerated postoperative pain observed in perioperative fentanyl-treated rats. *Anesthesiology* 102:421–428.
- Rivat C, Sebaihi S, Van Steenwinckel J, Fouquet S, Kitabgi P, Pohl M, Melik Parsadaniantz S, Reaux-Le Goazigo A (2014) Src family kinases involved in CXCL12-induced loss of acute morphine analgesia. *Brain Behav Immun* 38:38–52.
- Rivat C, Vera-Portocarrero LP, Ibrahim MM, Mata HP, Stagg NJ, De Felice M, Porreca F, Malan TP (2009) Spinal NK-1 receptor-expressing neurons and descending pathways support fentanyl-induced pain hypersensitivity in a rat model of postoperative pain. *Eur J Neurosci* 29:727–737.
- Rizzi A, Nazzaro C, Marzola GG, Zucchini S, Trapella C, Guerrini R, Zeilhofer HU, Regoli D, Calo G (2006) Endogenous nociceptin/orphanin FQ signalling produces opposite spinal antinociceptive and supraspinal pronociceptive effects in the mouse formalin test: pharmacological and genetic evidences. *Pain* 124:100–108.
- Rothman RB (1992) A review of the role of anti-opioid peptides in morphine tolerance and dependence. *Synapse* 12:129–138.
- Rowan MP, Bierbower SM, Eskander MA, Sztejn K, Por ED, Gomez R, Veldhuis N, Bunnett NW, Jeske NA (2014a) Activation of mu opioid receptors sensitizes transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) via beta-arrestin-2-mediated cross-talk. *PLoS ONE* 9:e93688.
- Rowan MP, Sztejn K, Doyle AP, Gomez R, Henry MA, Jeske NA (2014b) Beta-arrestin-2-biased agonism of delta opioid receptors sensitizes transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) in primary sensory neurons. *Mol Pain* 10:50.
- Ruscheweyh R, Wilder-Smith O, Drdla R, Liu XG, Sandkuhler J (2011) Long-term potentiation in spinal nociceptive pathways as a novel target for pain therapy. *Mol Pain* 7:20.
- Sacerdote P, Franchi S, Panerai AE (2012) Non-analgesic effects of opioids: mechanisms and potential clinical relevance of opioid-induced immunodepression. *Curr Pharm Des* 18:6034–6042.
- Sahbaie P, Liang DY, Shi XY, Sun Y, Clark JD (2016) Epigenetic regulation of spinal cord gene expression contributes to enhanced postoperative pain and analgesic tolerance subsequent to continuous opioid exposure. *Mol Pain* 12.
- Salvemini D, Doyle T, Kress M, Nicol G (2013) Therapeutic targeting of the ceramide-to-sphingosine 1-phosphate pathway in pain. *Trends Pharmacol Sci* 34:110–118.
- Samoshkin A, Convertino M, Viet CT, Wieskopf JS, Kambur O, Marcovitz J, Patel P, Stone LS, Kalso E, Mogil JS, Schmidt BL, Maixner W, Dokholyan NV, Diatchenko L (2015) Structural and functional interactions between six-transmembrane mu-opioid receptors and beta2-adrenoreceptors modulate opioid signaling. *Sci Rep* 5:18198.
- Sandkuhler J (2009) Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* 89:707–758.
- Sanna MD, Ghelardini C, Galeotti N (2014) Regionally selective activation of ERK and JNK in morphine paradoxical hyperalgesia: a step toward improving opioid pain therapy. *Neuropharmacology* 86:67–77.

- Sanna MD, Ghelardini C, Galeotti N (2015a) Activation of JNK pathway in spinal astrocytes contributes to acute ultra-low-dose morphine thermal hyperalgesia. *Pain* 156:1265–1275.
- Sanna MD, Mello T, Ghelardini C, Galeotti N (2015b) Inhibition of spinal ERK1/2-c-JUN signaling pathway counteracts the development of low doses morphine-induced hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 764:271–277.
- Scanziani M, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Role of intercellular interactions in heterosynaptic long-term depression. *Nature* 380:446–450.
- Scherrer G, Imamachi N, Cao YQ, Contet C, Mennicken F, O'Donnell D, Kieffer BL, Basbaum AI (2009) Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* 137:1148–1159.
- Shapovalov G, Gkika D, Devilliers M, Kondratskyi A, Gordienko D, Bussierolles J, Bokhobza A, Eschaliere A, Skryma R, Prevarskaia N (2013) Opiates modulate thermosensation by internalizing cold receptor TRPM8. *Cell Rep* 4:504–515.
- Shurman J, Koob GF, Gutstein HB (2010) Opioids, pain, the brain, and hyperkatifeia: a framework for the rational use of opioids for pain. *Pain Med* 11:1092–1098.
- Silverman SM (2009) Opioid induced hyperalgesia: clinical implications for the pain practitioner. *Pain Physician* 12:679–684.
- Simonin F (2006) Neuropeptide FF receptors as therapeutic targets. *Drugs Future* 31:603–609.
- Simonin F, Schmitt M, Laulin J-P, Laboureyras E, Jhamandas JH, MacTavish D, Matifas A, Mollereau C, Laurent P, Parmentier M, Kieffer BL, Bourguignon J-J, Simonnet G (2006) RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:466–471.
- Simonin F, Valverde O, Smadja S, Slowe S, Kitchen I, Dierich A, Le Meur M, Roques BP, Maldonado R, Kieffer BL (1998) Disruption of the k-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective k-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J* 17:886–897.
- Skolnick P, Davis H, Arnette D, Deaver D (2014) Translational potential of naloxone and naltrexone as TLR4 antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 35:431–432.
- Sorge RE, Mapplebeck JC, Rosen S, Beggs S, Taves S, Alexander JK, Martin LJ, Austin JS, Sotocinal SG, Chen D, Yang M, Shi XQ, Huang H, Pillon NJ, Bilan PJ, Tu Y, Klip A, Ji RR, Zhang J, Salter MW, Mogil JS (2015) Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat Neurosci* 18:1081–1083.
- Stein C (2016) Opioid Receptors. *Annu Rev Med* 67:433–451.
- Stein C, Machelska H (2011) Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: implications for pain therapy. *Pharmacol Rev* 63:860–881.
- Stevens CW, Aravind S, Das S, Davis RL (2013) Pharmacological characterization of LPS and opioid interactions at the toll-like receptor 4. *Br J Pharmacol* 168:1421–1429.
- Svensson CI, Tran TK, Fitzsimmons B, Yaksh TL, Hua XY (2006) Descending serotonergic facilitation of spinal ERK activation and pain behavior. *FEBS Lett* 580:6629–6634.
- Swartjes M, Mooren RA, Waxman AR, Arout C, van de Wetering K, den Hartigh J, Beijnen JH, Kest B, Dahan A (2012) Morphine induces hyperalgesia without involvement of mu-opioid receptor or morphine-3-glucuronide. *Mol Med* 18:1320–1326.
- Takasu MA, Dalva MB, Zigmond RE, Greenberg ME (2002) Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors. *Science (New York, NY)* 295:491–495.
- Takayama N, Ueda H (2005) Morphine-induced chemotaxis and brain-derived neurotrophic factor expression in microglia. *J Neurosci* 25:430–435.
- Thomas J, Mustafa S, Johnson J, Nicotra L, Hutchinson M (2015) The relationship between opioids and immune signalling in the spinal cord. *Handb Exp Pharmacol* 227:207–238.
- Toll L, Bruchas MR, Calo G, Cox BM, Zaveri NT (2016) Nociceptin/orphanin FQ receptor structure, signaling, ligands, functions, and interactions with opioid systems. *Pharmacol Rev* 68:419–457.
- Trang T, Al-Hasani R, Salvemini D, Salter MW, Gutstein H, Cahill CM (2015) Pain and poppies: the good, the bad, and the ugly of opioid analgesics. *J Neurosci* 35:13879–13888.
- Tsai RY, Tai YH, Tzeng JI, Lin SL, Shen CH, Yang CP, Hsin ST, Wang CB, Wong CS (2009) Ultra-low dose naloxone restores the antinociceptive effect of morphine in pertussis toxin-treated rats and prevents glutamate transporter downregulation by suppressing the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Neuroscience* 159:1244–1256.
- Tumati S, Largent-Milnes TM, Keresztes AI, Yamamoto T, Vanderah TW, Roeske WR, Hruby VJ, Varga EV (2012) Tachykinin NK(1) receptor antagonist co-administration attenuates opioid withdrawal-mediated spinal microglia and astrocyte activation. *Eur J Pharmacol* 684:64–70.
- Uchida H, Matsushita Y, Araki K, Mukae T, Ueda H (2015) Histone deacetylase inhibitors relieve morphine resistance in neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Pharmacol Sci* 128:208–211.
- Vacca V, Marinelli S, Luvisetto S, Pavone F (2013) Botulinum toxin A increases analgesic effects of morphine, counters development of morphine tolerance and modulates glia activation and mu opioid receptor expression in neuropathic mice. *Brain Behav Immun* 32:40–50.
- Vanderah TW, Suenaga NM, Ossipov MH, Malan Jr TP, Lai J, Porreca F (2001) Tonic descending facilitation from the rostral ventromedial medulla mediates opioid-induced abnormal pain and antinociceptive tolerance. *J Neurosci* 21:279–286.
- Vardanyan A, Wang R, Vanderah TW, Ossipov MH, Lai J, Porreca F, King T (2009) TRPV1 receptor in expression of opioid-induced hyperalgesia. *J Pain* 10:243–252.
- Vera-Portocarrero LP, Zhang ET, King T, Ossipov MH, Vanderah TW, Lai J, Porreca F (2007) Spinal NK-1 receptor expressing neurons mediate opioid-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance via activation of descending pathways. *Pain* 129:35–45.
- von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ (2012) Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron* 73:638–652.
- Wala EP, Holtman Jr JR (2011) Buprenorphine-induced hyperalgesia in the rat. *Eur J Pharmacol* 651:89–95.
- Wala EP, Sloan PA, Holtman Jr JR (2011) Effect of prior treatment with ultra-low-dose morphine on opioid- and nerve injury-induced hyperalgesia in rats. *J Opioid Manag* 7:377–389.
- Wang HB, Zhao B, Zhong YQ, Li KC, Li ZY, Wang Q, Lu YJ, Zhang ZN, He SQ, Zheng HC, Wu SX, Hokfelt TG, Bao L, Zhang X (2010) Coexpression of delta- and mu-opioid receptors in nociceptive sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13117–13122.
- Watkins LR, Wang X, Mustafa S, Hutchinson MR (2014) In vivo veritas: (+)-Naltrexone's actions define translational importance: a letter in response to Skolnick et al. 'Translational potential of naloxone and naltrexone as TLR4 antagonists'. *Trends Pharmacol Sci* 35:432–433.
- Weibel R, Reiss D, Karchewski L, Gardon O, Matifas A, Filliol D, Becker JA, Wood JN, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C (2013) Mu opioid receptors on primary afferent nav1.8 neurons contribute to opiate-induced analgesia: insight from conditional knockout mice. *PLoS ONE* 8:e74706.
- Williams JT, Ingram SL, Henderson G, Chavkin C, von Zastrow M, Schulz S, Koch T, Evans CJ, Christie MJ (2013) Regulation of mu-opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol Rev* 65:223–254.
- Wilson NM, Jung H, Ripsch MS, Miller RJ, White FA (2011) CXCR4 signaling mediates morphine-induced tactile hyperalgesia. *Brain Behav Immun* 25:565–573.
- Xia WS, Peng YN, Tang LH, Jiang LS, Yu LN, Zhou XL, Zhang FJ, Yan M (2014) Spinal ephrinB/EphB signalling contributed to remifentanyl-induced hyperalgesia via NMDA receptor. *Eur J Pain* 18:1231–1239.

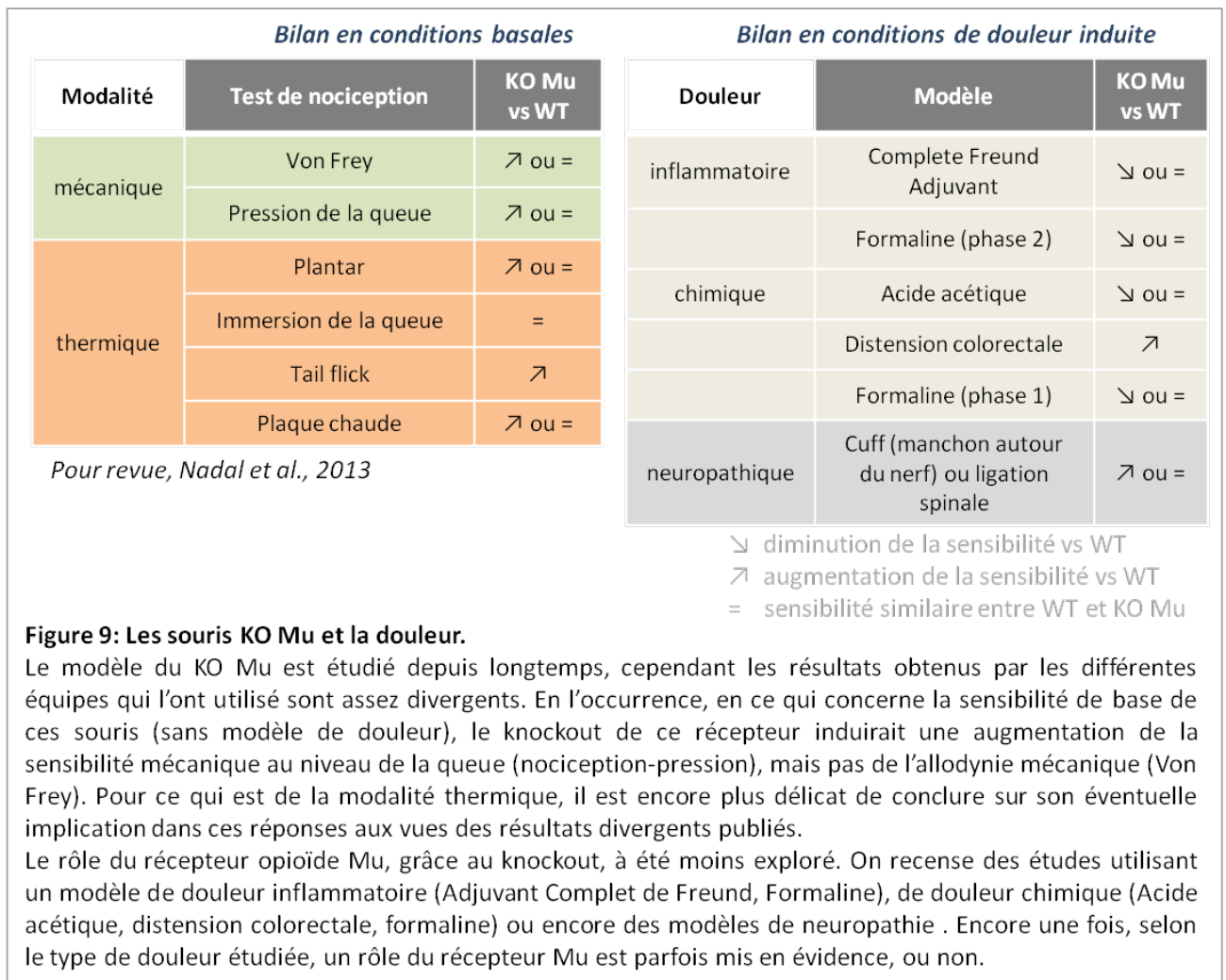
- Xie JY, Herman DS, Stiller CO, Gardell LR, Ossipov MH, Lai J, Porreca F, Vanderah TW (2005) Cholecystokinin in the rostral ventromedial medulla mediates opioid-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance. *J Neurosci* 25:409–416.
- Xu JT, Sun L, Lutz BM, Bekker A, Tao YX (2015) Intrathecal rapamycin attenuates morphine-induced analgesic tolerance and hyperalgesia in rats with neuropathic pain. *Transl Perioper Pain Med* 2:27–34.
- Xu JT, Zhao JY, Zhao X, Ligons D, Tiwari V, Atianjoh FE, Lee CY, Liang L, Zang W, Njoku D, Raja SN, Yaster M, Tao YX (2014) Opioid receptor-triggered spinal mTORC1 activation contributes to morphine tolerance and hyperalgesia. *J Clin Invest* 124:592–603.
- Xu JT, Zhao X, Yaster M, Tao YX (2010) Expression and distribution of mTOR, p70S6K, 4E-BP1, and their phosphorylated counterparts in rat dorsal root ganglion and spinal cord dorsal horn. *Brain Res* 1336:46–57.
- Yaksh TL, Woller SA, Ramachandran R, Sorkin LS (2015) The search for novel analgesics: targets and mechanisms. *F1000Prime Rep* 7:56.
- Yang HW, Hu XD, Zhang HM, Xin WJ, Li MT, Zhang T, Zhou LJ, Liu XG (2004) Roles of CaMKII, PKA, and PKC in the induction and maintenance of LTP of C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *J Neurophysiol* 91:1122–1133.
- Zadina JE, Nilges MR, Morgenweck J, Zhang X, Hackler L, Fasold MB (2015) Endomorphin analog analgesics with reduced abuse liability, respiratory depression, motor impairment, tolerance, and glial activation relative to morphine. *Neuropharmacology* 105:215–227.
- Zeilhofer HU, Benke D, Yevenes GE (2012) Chronic pain states: pharmacological strategies to restore diminished inhibitory spinal pain control. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52:111–133.
- Zhang L, Berta T, Xu ZZ, Liu T, Park JY, Ji RR (2011) TNF- α contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. *Pain* 152:419–427.
- Zhang N, Rogers TJ, Caterina M, Oppenheim JJ (2004) Proinflammatory chemokines, such as C-C chemokine ligand 3, desensitize mu-opioid receptors on dorsal root ganglia neurons. *J Immunol* 173:594–599.
- Zhao CM, Guo RX, Hu F, Meng JL, Mo LQ, Chen PX, Liao XX, Cui Y, Feng JQ (2012a) Spinal MCP-1 contributes to the development of morphine antinociceptive tolerance in rats. *Am J Med Sci* 344:473–479.
- Zhao YL, Chen SR, Chen H, Pan HL (2012b) Chronic opioid potentiates presynaptic but impairs postsynaptic N-methyl-D-aspartic acid receptor activity in spinal cords: implications for opioid hyperalgesia and tolerance. *J Biol Chem* 287:25073–25085.
- Zhong Y, Zhou LJ, Ren WJ, Xin WJ, Li YY, Zhang T, Liu XG (2010) The direction of synaptic plasticity mediated by C-fibers in spinal dorsal horn is decided by Src-family kinases in microglia: the role of tumor necrosis factor- α . *Brain Behav Immun* 24:874–880.
- Zhou HY, Chen SR, Chen H, Pan HL (2010) Opioid-induced long-term potentiation in the spinal cord is a presynaptic event. *J Neurosci* 30:4460–4466.
- Zhu Y, King MA, Schuller AG, Nitsche JF, Reidl M, Elde RP, Unterwald E, Pasternak GW, Pintar JE (1999) Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. *Neuron* 24:243–252.
- Zollner C, Mousa SA, Fischer O, Rittner HL, Shaqura M, Brack A, Shakibaei M, Binder W, Urban F, Stein C, Schafer M (2008) Chronic morphine use does not induce peripheral tolerance in a rat model of inflammatory pain. *J Clin Invest* 118:1065–1073.

(Accepted 16 June 2016)
(Available online 23 June 2016)

IV. Rôle des cellules gliales dans les effets chroniques de la morphine

Il a été montré que le traitement chronique à la morphine induit l'activation microgliale, qui est, elle-même, impliquée dans les phénomènes de tolérance et d'hyperalgie (Ji et al., 2013; Mélik Parsadaniantz et al., 2015). De plus, de nombreuses études ont montré que l'utilisation des inhibiteurs de microglie comme la propentofylline ou la minocycline augmente l'analgésie induite par la morphine et diminuent la tolérance à l'analgésie, particulièrement en situation de douleur chronique, ce qui suggère un rôle clé pour ces cellules (Cui et al., 2008; Hutchinson et al., 2008; Mika et al., 2009, 2013; Nazemi et al., 2012; Zhang et al., 2015; Zychowska et al., 2013). Par contre, à ce jour aucun papier n'a étudié l'effet de la minocycline sur l'hyperalgie morphinique, bien que plusieurs études aient montré que l'inhibition de la neuroinflammation réduit cette hyperalgie sur des animaux sans douleur chronique, voir la Table 2 de notre revue Roeckel et al., 2016.

En parallèle, le rôle primordial du récepteur opioïde Mu dans l'hyperalgie morphinique a été mis en avant depuis peu (Corder et al., 2017; Roeckel et al., 2017). En effet, ce récepteur est responsable de l'hypersensibilité morphinique puisque lorsque son gène est inactivé, cette hyperalgie ne se développe pas. Mais avant la publication de ces deux articles, aucune information sur le rôle du récepteur Mu dans l'hyperalgie morphinique n'était disponible. Par contre, des études sur le rôle du récepteur Mu en nociception basale ou en conditions douloureuses avaient été menées, et l'ensemble des résultats obtenus montre globalement une tendance à une sensibilité à la nociception ou à la douleur chronique un peu plus importante chez les animaux KO mu, alors que d'autres publications ne montrent pas de différence de sensibilité (Figure 9).



Références pour la [Figure 9](#): (Bohren et al., 2010; Corder et al., 2017; Filliol et al., 2000; Gavériaux-Ruff et al., 2008; Gendron et al., 2007; Ide et al., 2011; Mansikka et al., 2002, 2004; Martin et al., 2003; Nadal et al., 2013; Qiu et al., 2000; Reiss et al., 2017; Sora et al., 1999; Walwyn et al., 2016; Weibel et al., 2013).

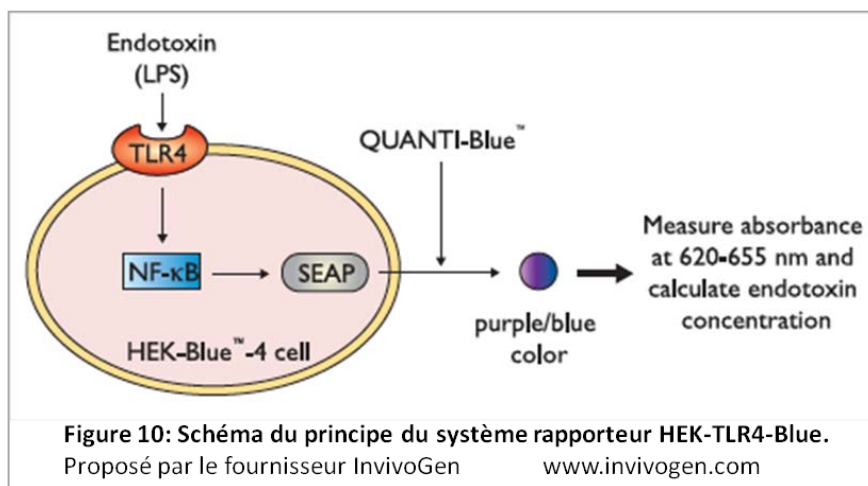
Ensemble, ces données nous ont incitées à analyser de manière plus approfondie l'implication des cellules gliales et du récepteur mu dans le développement de l'hyperalgie aux opiacés.

V. Rôle de TLR4 dans les réponses morphiniques

Le Toll Like Receptor 4 (TLR4) est un récepteur exprimé à la surface de cellules du système immunitaire inné dont font parties les Natural Killer ou NK, les granulocytes, les phagocytes. Le TLR4 est également exprimé à la surface des cellules dendritiques qui sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA), capables d'activer les lymphocytes T naïfs. L'activation des TLR4 induit une importante réponse immunitaire. Le TLR4 appartient à la famille des récepteurs PRR ou pattern recognition receptor, qui

ont la propriété de reconnaître des pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) qui sont des motifs portés par les agents infectieux. Le TLR4 reconnaît particulièrement le lipopolysaccharide ou LPS présent à la surface des bactéries Gram négatives. Son activation initie une réponse immunitaire par sécrétion de cytokines proinflammatoires dont le TNF, l'IL-1 β , l'IL-6, des prostaglandines et des chimiokines (Bonizzi and Karin, 2004).

Le TLR4 a été montré comme jouant un rôle dans le développement des effets indésirables produits par les traitements prolongés avec des opiacés. Différents agonistes et antagonistes du récepteur Mu ont été testés et une activation du récepteur TLR4, en plus du récepteur Mu ont été mises en évidence pour les agonistes suivants: la morphine, la méthadone, l'oxycodone, la buprénorphine, le fentanyl, mais aussi les antagonistes naloxone et naltrexone (Hutchinson et al., 2010). Dans cette étude, Hutchinson et collaborateurs ont réalisé des mesures de l'activation de TLR4 dans un modèle rapporteur cellulaire indirect qui est le TLR4 signaling assay HEK-Blue-hTLR4. En résumé, ce modèle est basé sur le fait que le TLR4 activé, entraîne l'activation du nuclear factor-kappa B (NF- κ B), qui lui-même active la alkaline phosphatase sécrétée ou SEAP dont l'activité est finalement mesurée (Figure 10). Cette étude a donc ajouté la notion que des molécules classiquement connus comme des agonistes opioïdes telles que la morphine, et aussi les naloxone-(+) et naltrexone-(+) classiquement décrits comme étant des antagonistes opioïdes, agissent également sur le TLR4.



En réponse à cette étude, le groupe de Skolnick a montré que, dans ce même modèle rapporteur cellulaire, la naloxone d'une part, et la naltrexone d'autre part, ne sont pas capable d'inhiber le TLR4 (Skolnick et al., 2014).

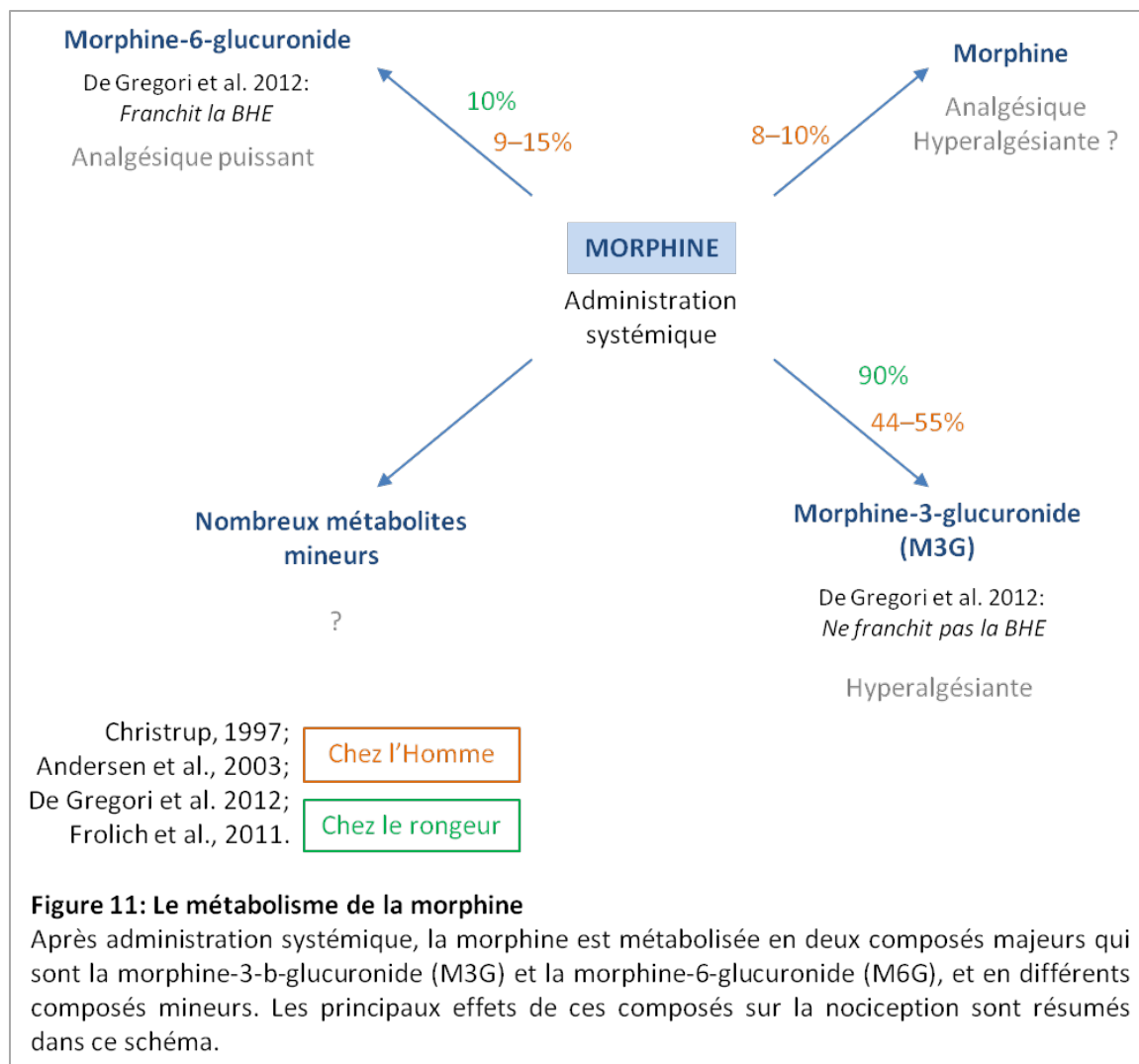
Plus récemment, le papier de Xie et al. 2017 a montré très élégamment que, dans ce système cellulaire TLR4-Blue, l'effet du LPS est bloqué par l'antagoniste LPS-RS mais que les effets de la morphine, M6G et M3G ne sont pas bloqués par le LPS-RS (Xie et al., 2017). De plus, le TNF α lui-même active

directement ce système rapporteur puisque son effet n'est pas bloqué par le LPS-RS, ce qui montre que le TNF α donne un résultat positif dans ce test sans activation du TLR4, le LPS-RS étant incapable de bloquer ce phénomène.

Cependant, la sécrétion de molécules proinflammatoires a été montrée comme participant aux effets secondaires de la morphine chronique comme la tolérance à l'analgésie, par exemple. Chez des animaux traités avec un antagoniste du récepteur de l'IL-1, l'IL1-ra, l'effet analgésique de la morphine en aigu est prolongé et potentialisé, et après traitement répété, la tolérance à l'analgésie morphinique est moins marquée (Johnston et al., 2004). Concernant le rôle de TLR4 dans l'hyperalgie induite par les opiacés, les résultats sont plus contradictoires. En effet, des études ont montré un rôle primordial de ce récepteur dans le développement de cette hypersensibilité, en utilisant soit un antagoniste du TLR4, le LPS-RS, ou des souris Knockouts pour le TLR4 (Due et al., 2012; Johnson et al., 2014), alors que d'autres équipes montrent que l'hyperalgie morphinique est conservée chez les KO TLR4 (Ferrini et al., 2013; Mattioli et al., 2014). Ces résultats d'hyperalgie conservée chez les animaux KO TLR4 sont appuyés par une étude sur les KO TLR4 portant cette fois-ci sur la tolérance à l'analgésie morphinique, et montrant que les KO présentent une tolérance comparable aux homologues WT (Fukagawa et al., 2013).

VI. Rôle du métabolite de la morphine, la morphine-3-b-glucuronide dans l'hyperalgie morphinique

La morphine, après administration, est métabolisée en deux principaux composés qui sont la morphine-3-b-glucuronide (M3G) et la morphine-6-glucuronide (M6G) (Boerner, 1975), une part reste de la morphine et le reste (moins de 1%) est à l'origine de la production de métabolites mineurs (Figure 11) (Andersen et al., 2003; Christrup, 1997; Frölich et al., 2011; Laux-Biehlmann et al., 2013; pour revue, De Gregori et al., 2012). Les métabolismes de l'Homme et du rongeur étant différents, les proportions de chacun de ces composés chez l'un et l'autre varient.



Chez le rongeur, il est estimé que 90% de la morphine administrée par voie systémique est métabolisée en M3G et que seulement 10% devient de la M6G après métabolisation avec la principale enzyme de glucuronidation, l'UDP-glucuronosyl transferase 2B7 ou UGT2B7 (De Gregori et al., 2012). Chez l'Homme, la morphine est convertie en 44 à 55% en M3G, 9 à 10 % en M6G, il reste 8 à 10% de morphine résiduelle et une quantité infime de métabolites mineurs (Andersen et al., 2003; Frölich et al., 2011).

La M6G est un métabolite qui possède une forte affinité pour le récepteur Mu et son potentiel analgésique est estimé comme étant 2 à 5 fois plus puissant que celui de la morphine (Coller et al., 2009; Lötsch, 2009). Au contraire, la M3G ne possède aucune propriété analgésique, et est décrite comme induisant une potentialisation de la douleur et possède même un effet hyperalgésiant à elle seule (Roedel et al., 2017).

La M3G a été plutôt décrite comme ayant une très faible affinité pour les récepteurs du système opioïde (Labella et al., 1979; Mignat et al., 1995). Plusieurs études montrent l'implication du TLR4 dans les réponses hyperalgésiantes de la M3G (Allette et al., 2017; Due et al., 2012; Lewis et al., 2010). Pourtant, la M3G a été montrée comme étant un tout aussi faible agoniste du TLR4 que du récepteur Mu (Khabbazi et al., 2016). Il paraît donc intéressant d'étudier les effets hypersensibilisants de la M3G chez des souris knockouts pour le récepteur Mu. Cela permettrait de déterminer si, tout comme le TLR4, malgré une faible affinité du récepteur pour ce ligand, un rôle du récepteur Mu est démontré. Cette étude a été réalisée et discutée dans l'article de thèse Roeckel et al., 2017.

Projet I:

**Rôles du récepteur opioïde Mu dans les hypersensibilités induites par la morphine et son métabolite, la morphine-3-
b-glucuronide (M3G)**

Projet I: Rôles du récepteur opioïde Mu dans les hypersensibilités induites par la morphine et son métabolite, la morphine-3-b-glucuronide (M3G)

I. Préambule

Bien qu'étant un puissant analgésique, la morphine chronique induit le développement d'effets indésirables dont font partie la tolérance analgésique et l'hyperalgie. Les hypothèses expliquant ces phénomènes sont nombreuses (cf revue Roeckel et al., 2016; Rivat and Ballantyne, 2016), mais peu d'informations sont disponibles sur le rôle du récepteur Mu dans ces hypersensibilités.

Ce projet I a constitué le projet principal de ma première partie de thèse (janvier 2014- avril 2016) et vise à mieux comprendre le rôle de Mu dans l'hyperalgie morphinique. Nous avons voulu élargir nos recherches en étudiant le rôle du récepteur Mu dans l'hypersensibilité induite par la M3G, métabolite de la morphine aux propriétés exclusivement hypersensibilisantes. Ces travaux ont donné lieu à l'article Roeckel et al., 2017. En plus d'étudier les réponses nociceptives d'animaux knockouts (KO) pour le récepteur Mu après des traitements hypersensibilisants avec de la morphine ou de la M3G, nous avons aussi exploré les capacités métaboliques après administration de morphine de ces animaux KO Mu, et avons exploré les potentiels effets activateurs de la M3G sur la protéine Gi. Afin de certifier que cette activation Gi est bien Mu dépendante, nous avons utilisé différents antagonistes, spécifiques ou non du récepteur Mu, et nous avons testé cette activité Gi sur des échantillons KO Mu. Enfin, ces études d'activité fonctionnelle de Mu ont été complétées par des études de liaison avec ligands radioactifs. Le matériel et méthodes, les résultats et discussion de ces résultats sont décrits dans l'article Roeckel et al., 2017, présent page suivante.

Comme évoqué précédemment, la M3G induit une hyperalgie aigue. Cette hyperalgie semble également être accompagnée d'un certain mal-être des animaux. Nous avons évalué ces effets de la M3G par des tests de suspension de la queue et de burrowing.

De plus, les traitements chroniques morphiniques sont décrits comme induisant une neuroinflammation, marquée par une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation gliale et des marqueurs proinflammatoires dans la moelle épinière. Cette neuroinflammation est même proposée comme étant responsable de l'hypersensibilité morphinique. Afin de confirmer ces hypothèses, nous avons mesuré les taux d'expression de transcrits gliaux et proinflammatoires dans la moelle épinière après un traitement morphinique induisant une hyperalgie.

Ces éléments supplémentaires portant sur les régulations de gènes et sur le bien-être après administration de M3G sont détaillés dans le matériel et méthodes supplémentaires, résultats supplémentaires et sont discuté dans la partie discussion de ce projet ([chapitre I projet I](#)).

Les principaux résultats obtenus dans ce projet sont synthétisés sous la forme d'un schéma bilan.

- II. Article: l'hyperalgie morphinique implique les récepteurs Mu et la M3G (Roeckel et al., 2017)

Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide

Scientific reports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide

Laurie-Anne Roeckel^{1,2,3,4}, Valérie Utard^{2,5}, David Reiss^{1,2,3,4}, Jinane Mouheiche⁶, Hervé Maurin^{1,2,3,4}, Anne Robé^{1,2,3,4}, Emilie Audouard^{1,2,3,4}, John N. Wood⁷, Yannick Goumon⁶, Frédéric Simonin^{2,5} & Claire Gaveriaux-Ruff^{1,2,3,4}

Opiates are potent analgesics but their clinical use is limited by side effects including analgesic tolerance and opioid-induced hyperalgesia (OIH). The Opiates produce analgesia and other adverse effects through activation of the mu opioid receptor (MOR) encoded by the *Oprm1* gene. However, MOR and morphine metabolism involvement in OIH have been little explored. Hence, we examined MOR contribution to OIH by comparing morphine-induced hyperalgesia in wild type (WT) and MOR knockout (KO) mice. We found that repeated morphine administration led to analgesic tolerance and hyperalgesia in WT mice but not in MOR KO mice. The absence of OIH in MOR KO mice was found in both sexes, in two KO global mutant lines, and for mechanical, heat and cold pain modalities. In addition, the morphine metabolite morphine-3beta-D-glucuronide (M3G) elicited hyperalgesia in WT but not in MOR KO animals, as well as in both MOR flox and MOR-Nav1.8 sensory neuron conditional KO mice. M3G displayed significant binding to MOR and G-protein activation when using membranes from MOR-transfected cells or WT mice but not from MOR KO mice. Collectively our results show that MOR is involved in hyperalgesia induced by chronic morphine and its metabolite M3G.

Chronic pain is a major public health problem with a high prevalence and impacting on quality of life. Pain treatments include both opioids and non-opioid analgesics¹. The mu opioid receptor (MOR) encoded by the *Oprm1* gene is the molecular target for opiate-mediated analgesia and has been shown to be essential for several opiate-induced side effects^{2,3} such as opioid-induced hyperalgesia (OIH) and analgesic tolerance that preclude adequate analgesia, leaving pain unmanaged^{4–6}. However, whether or not OIH requires MOR activation is still an open question. Indeed, some studies have implicated Toll like receptor-4 (TLR4), a key innate immunity receptor, as the mediator for OIH^{7–12}. However other studies led to contrasting results^{4,9,11,13–15}. Therefore, the clarification of MOR implication in OIH is an important step toward understanding OIH that leads to dose escalation and opioid toxicity. Solving this question will allow designing novel strategies for analgesia and thus provide major improvement to existing pain therapies. It will constitute a first step toward the treatment of OIH itself. It will further impact treatment of addiction, as addiction may be induced by increased pain sensitivity.

In order to determine whether MOR is required for OIH development, we used a genetic approach to compare wild type (WT) and MOR knockout (KO) mice in OIH paradigms. In addition, given that gender represents a major factor for pain and opioid analgesia^{16–19}, we studied OIH in both males and females. Then, we determined whether the morphine metabolite morphine-3beta-D-glucuronide (M3G) induces hyperalgesia through MOR activation. To complete the study, we evaluated morphine metabolism to M3G in both genotypes. Morphine- and

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France. ²Université de Strasbourg, Illkirch, France. ³Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, Illkirch, France. ⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U964, Illkirch, France. ⁵Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR 7242 CNRS, Illkirch, France. ⁶CNRS UPR3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France. ⁷Molecular Nociception group, Wolsen Institute for Biomedical Research, University College London, WC1E 6BT, London, UK. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.G.-R. (email: gaveriau@igbmc.fr)

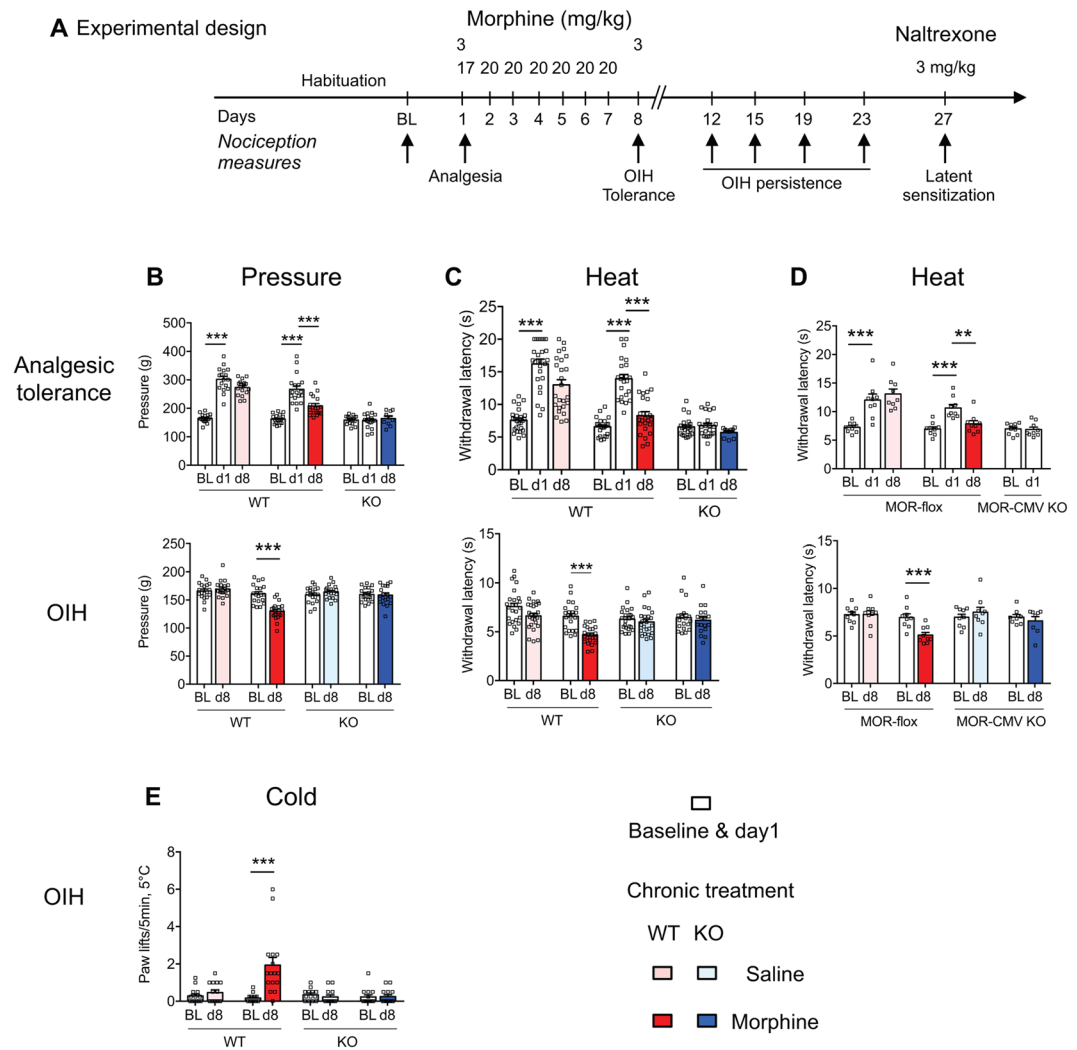


Figure 1. WT but not MOR KO mice show hyperalgesia under repeated morphine analgesic tolerance conditions. **(A)** The experimental design shows the schedule for nociceptive measures (arrows). Following baseline (BL), mice received 3 mg/kg morphine (ip) on day-1 (d1) to evaluate morphine-induced analgesia. Mice received thereafter 20 mg/kg morphine or saline control each day until day-7 (d7). On d8, nociceptive levels were measured before morphine administration to evaluate hyperalgesia, and following 3 mg/kg morphine to measure analgesic tolerance. Maintenance of hyperalgesia (OIH) was scored on the indicated days and latent sensitization on day 27. **(B)** Tail pressure ($n = 18-19/\text{group}$) and **(C)** tail immersion (48°C , $n = 19-25/\text{group}$) results show analgesic tolerance (upper panels) in WT mice with repeated morphine. Pressure and heat hyperalgesia in WT but not KO mice are shown with the same mouse groups in bottom panels. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ compared to baseline or d1. **(D)** Analgesic tolerance and hyperalgesia occur in MOR-flox but not MOR-CMV mice. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ compared to baseline or to d1 (tail immersion 48°C , $n = 8-9/\text{group}$). Two-way repeated ANOVA, Newman-Keuls test. **(E)** WT but not MOR KO mice show cold allodynia under morphine analgesic tolerance conditions. Following baseline (BL) cold response scoring on the 5°C cold plate, mice received 20 mg/kg morphine or saline control once a day until day 7 as described in (A) and paw responses to cold were measured to evaluate cold allodynia. $n = 13-16/\text{group}$. $***p < 0.001$ compared to BL. ANOVA repeated measures, Newman-Keuls test. Detailed statistical analyses are presented in Supplementary Table S2.

M3G-induced hypersensitivities were absent in mice harboring *Oprm1* gene inactivation, demonstrating unambiguously that MOR represents a mandatory target for OIH.

Results

Chronic morphine induces OIH in WT but not MOR knockout animals. We first examined whether MOR is required for chronic morphine-induced hyperalgesia by measuring OIH development in WT and MOR KO mice (KO mice with a Neo cassette insertion in exon-2²⁰, see Supplementary Fig. S1). As expected, acute morphine induced analgesia in WT mice but not in KO mice (Fig. 1A–C), confirming that *Oprm1* gene-derived MOR is the molecular target for morphine-induced analgesia². The subsequent treatment with repeated

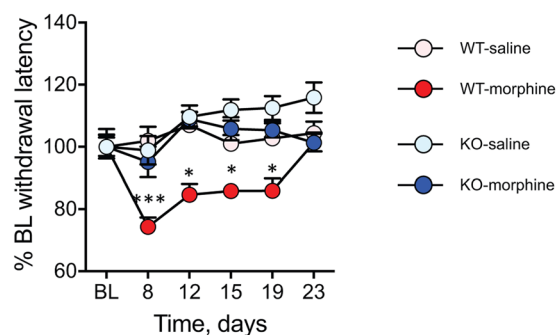


Figure 2. MOR KO mice do not show OIH persistence. Persistence of hyperalgesia after cessation from seven-day 20 mg/kg morphine in WT but not MOR-KO mice. (**B, C**) On day-27 when WT mice had recovered from OIH (Fig. 1A), the opioid antagonist naltrexone induced hyperalgesia *i.e.* latent sensitization in WT (**B**) but no MOR KO (**C**) mice. Tail immersion (48 °C, $n = 11\text{--}14/\text{group}$ for OIH persistence and $n = 6\text{--}8/\text{group}$ for latent sensitization following 20 mg/kg morphine; $n = 8\text{--}10/\text{group}$ for persistence of OIH following 60 mg/kg morphine). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; repeated measures ANOVA followed by Newman-Keuls test. Detailed statistical analyses are presented in Supplementary Table S3.

morphine (20 mg/kg, 7 days) led to analgesic tolerance as well as OIH in WT mice (Fig. 1A–C). However, no OIH was found in MOR KO mice as assessed for pressure, heat and cold modalities (Fig. 1B,C,E). Next we assessed if OIH persisted following morphine arrest. OIH lasted 11 days upon morphine cessation in WT mice (day 19 of the whole experiment; Fig. 2), in agreement with previous reports⁵. In contrast, no hyperalgesia developed in MOR KO mice after morphine arrest, indicating the absence of late onset hyperalgesia in the mutant animals.

In order to confirm undoubtedly the MOR requirement for OIH, we tested an alternative MOR KO line obtained by crossing MOR-flox mice with CMV-Cre mice and lacking whole *Oprm1* gene exons 2–3 (MOR-CMV mice²¹; Supplementary Fig. S1). The MOR-CMV mice showed neither analgesia nor OIH while control MOR-flox mice responded with analgesia and developed both tolerance and hyperalgesia (Fig. 1D). Then we assessed MOR involvement in OIH by applying another protocol previously used to investigate TLR4 role in morphine analgesic tolerance (60 mg/kg, 4 days²²). This morphine protocol induced analgesia, tolerance and OIH in WT animals but neither analgesia nor OIH in MOR KO animals (Supplementary Fig. S2). Collectively our results indicate that MOR is essential for morphine-induced analgesia and hyperalgesia independently of the repeated morphine paradigm or of the MOR knockout model used.

MOR is required for OIH in both females and males. Given that sex represents an important factor that affects pain and analgesia^{16,17}, we have analysed MOR implication in OIH in both the female and male mice. In agreement with previous findings², the absence of MOR did not alter basal sensitivity to heat, cold and mechanical sensitivities, either in females or in males. Morphine elicited comparable analgesia and analgesic tolerance in female and male WT animals and analgesia was absent in KO animals of both sexes (Fig. 3A,B and E,F). OIH induced by chronic morphine developed in WT mice of both sexes, and for all three tested modalities (heat, pressure and cold) and was absent in both female and male MOR KO mice (Fig. 3C,D and G–J), showing no sex-dependency for MOR implication in OIH.

MOR is required for OIH in neuropathic pain states. The role of MOR in OIH was further assessed in a neuropathic pain model. Partial sciatic nerve ligation (pSNL) induced cold and mechanical allodynia as well as heat hyperalgesia measured two weeks post-pSNL (Fig. 4). Cold and mechanical allodynia were aggravated by a 7-day repeated morphine treatment in WT mice while no OIH was observed in KO mice (Fig. 4A–C). No OIH developed in WT or KO mice for the heat modality (Fig. 4D), similarly to Corder *et al.*²³. These results indicate that MOR is also required for OIH after nerve injury.

MOR KO does not change TLR4 expression. TLR4 activation has been reported as a key event in morphine analgesic tolerance and OIH, although conflicting results have been obtained^{4,24}. Thus, to investigate if the lack of OIH in MOR KO animals may be caused by a difference in TLR4 expression in KO mice, we compared TLR4 transcripts in WT and KO mice. TLR4 expression was comparable in the spinal cord of WT and KO mice treated with chronic saline. Chronic morphine did not alter TLR4 expression in either WT or KO mice (Supplementary Fig. S3). In addition, chronic morphine did not alter MOR expression in WT mice. These findings suggest that the absence of OIH in our MOR KO lines did not result from altered TLR4 expression.

MOR is necessary for morphine-3-glucuronide hyperalgesia. The main morphine metabolite morphine-3-glucuronide (M3G) has been proposed as a mediator of morphine-induced hyperalgesia^{4,25}. To investigate whether the lack of morphine hyperalgesia in MOR KO animals may be due to an impaired morphine metabolism to M3G in these animals, we measured M3G levels in the plasma, brain and spinal cord following morphine administration. In control saline treated animals, we found very low endogenous M3G levels of 0.0007 μM in WT mice and 0.025 μM in KO mice. In morphine-treated animals, the plasma M3G concentration of the KO mice (1.5 μM) was decreased by 2.6 fold compared to WT mice (3.9 μM), revealing a genotype effect

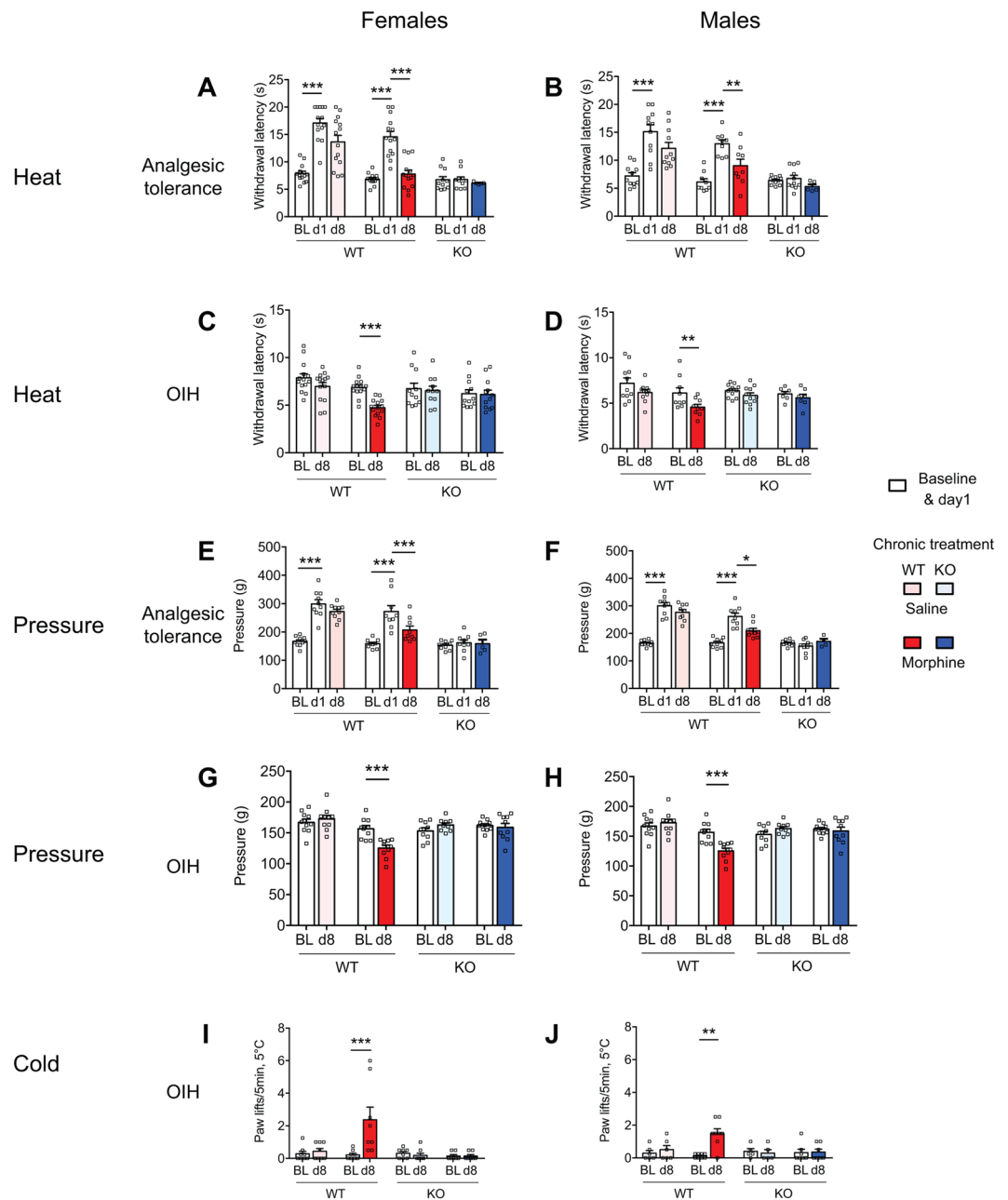


Figure 3. Morphine induced hyperalgesia in female and male WT mice but not MOR KO mice. Analgesia, analgesic tolerance and OIH were measured following the protocol described in Fig. 1A (see sex-grouped analysis in Fig. 1) on female (left panels) and male (right panels) mice with the tail immersion (A–D), pressure analgesimeter (E–H) and cold plate (I, J) tests for heat, pressure and cold hypersensitivities, respectively. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. $n = 7$ –11 mice/group. *, **, *** $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 compared to the corresponding group (ANOVA repeated measures, Newman-Keuls. BL, Baseline. Detailed statistical analyses are presented in Supplementary Table S4.

(Fig. 5A). Brain and spinal cord from morphine-treated WT and KO mice also contained significant M3G levels. Brains from KO mice contained 1.5 fold less M3G than those from WTs (Fig. 5B) although the difference was not significant ($p > 0.05$ Student t -test; $n = 10$ /genotype). Spinal cords from KO and WT mice contained similar M3G levels (Fig. 5C).

To evaluate further if MOR was implicated in M3G-induced hyperalgesia, M3G-induced hypersensitivity was evaluated in WT and MOR KO mice following an acute M3G administration (5 mg/kg i.p.). M3G induced heat hyperalgesia in WT mice within 1–3 hr in the tail immersion assay (Fig. 5D). Similar results were obtained for mechanical hypersensitivity as assessed with the von Frey filaments (Fig. 5E). In contrast, M3G hyperalgesia was lost in KO mice (Fig. 5D,E) revealing that MOR is required for M3G-induced hyperalgesia. Together with morphine metabolism data indicating that KO mice produce M3G, these results suggest that the absence of morphine

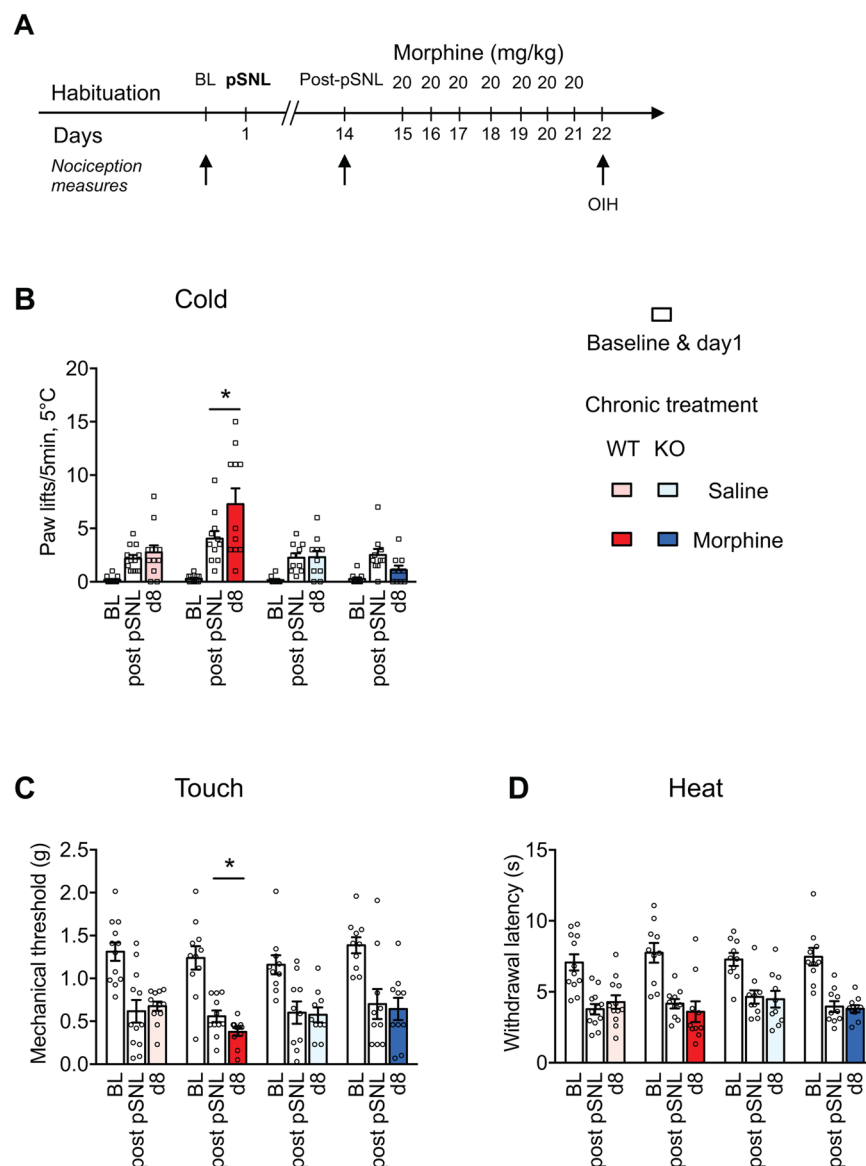


Figure 4. MOR KO mice show no morphine-induced hyperalgesia following partial sciatic nerve ligation (pSNL). **(A)** The experimental design shows the schedule for nociceptive measures (arrows). Following determination of baseline (BL) and neuropathic hypersensitivity (14 days post-pSNL, partial sciatic nerve ligation) on a 5°C cold plate, WT and MOR KO mice were treated for 7 days with either morphine or saline control solution. On d8, allodynia was measured with the cold plate, von Frey filaments and heat plantar tests. **(B)** Cold pSNL allodynia and OIH ($n = 10-12/\text{group}$), two-way ANOVA, Newman-Keuls test. Morphine induced OIH in WT mice, $*p < 0.05$ compared to post-pSNL. **(C)** Mechanical pSNL allodynia ($n = 10-12/\text{group}$), two-way ANOVA, Newman-Keuls test. pSNL induced mechanical allodynia; WT saline group and WT morphine group, $p < 0.001$ pSNL vs BL; KO saline group and KO morphine group, $p < 0.01$ pSNL vs BL. Morphine induced OIH in WT mice, $*p < 0.05$ compared to post-pSNL. **(D)** Heat pSNL allodynia ($n = 10-12/\text{group}$), two-way ANOVA. Morphine induced no OIH. pSNL induced cold, mechanical and heat allodynia. Detailed statistical analyses are presented in Supplementary Table S5.

hyperalgesia in KO mice is not caused by a lack of morphine metabolism to M3G but by a pronociceptive action of M3G through MOR. We have then investigated whether peripheral MOR expressed by Nav1.8 sensory neurons may be involved in M3G hyperalgesia. We observed that conditional KO (cKO) mice deleted for MOR in Nav1.8 neurons displayed comparable hyperalgesia to MOR floxed mice (Fig. 5F,G), indicating that this specific MOR population is not mandatory for OIH.

Morphine-3-glucuronide binds to and activates MOR. Morphine-3-glucuronide has been characterized as a weak **partial** MOR agonist in transfected cells²⁵. We first investigated M3G binding to membranes from MOR-transfected HEK293 cells. M3G displaced [³H]-diprenorphine binding, although with a lower affinity as compared to cold DAMGO, morphine or fentanyl (Supplementary Table S1, Fig. 6A). In addition, M3G displaced

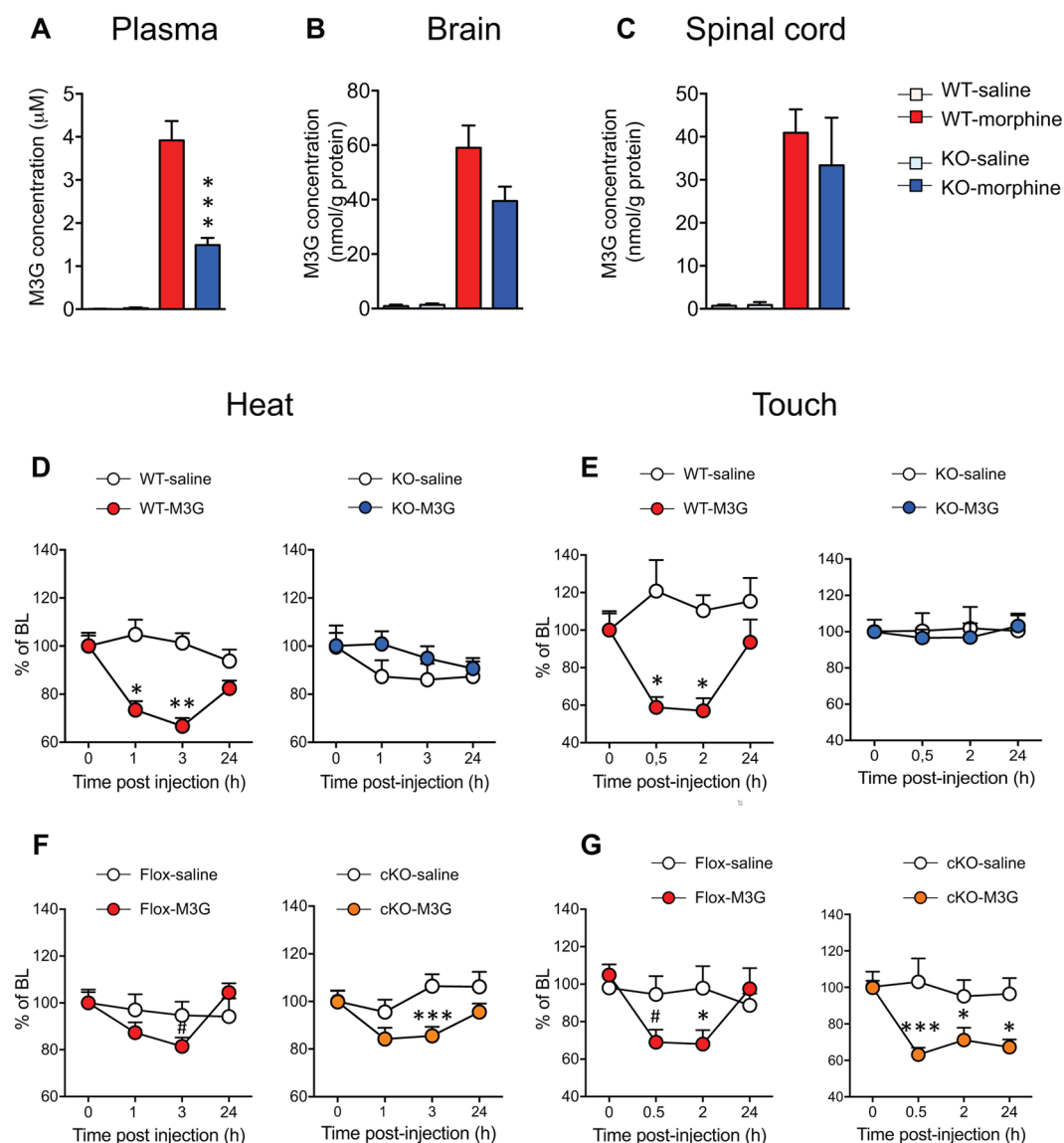


Figure 5. MOR KO mice show no morphine-3-glucuronide-induced hyperalgesia. M3G concentration in mouse plasma (A), brain (B) and spinal cord (C) 2 hr following 10 mg/kg morphine administration. M3G was quantified using LC-MS/MS. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. $n = 9-11$ mice/group. *** $p < 0.001$ in KO mice as compared to WT mice. (D,E) Acute M3G induces heat and touch hyperalgesia in WT but not KO mice. ($n = 9-10$ /group) one-way ANOVA, Newman-Keuls test * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to baseline (BL). (F,G) Acute M3G induces heat and touch hypersensitivity in MOR Flox and cKO mice ($n = 6-9$ /group) one-way ANOVA, Newman-Keuls test # $0.05 < p < 0.1$; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ compared to baseline (BL). Detailed statistical analyses are presented in Supplementary Table S6.

[^{3} H]-DAMGO binding to brain homogenates from WT mice. The affinity for M3G-induced displacement of [^{3} H]-DAMGO binding was $1.4 \mu\text{M}$ as compared to nanomolar affinities for DAMGO, morphine and fentanyl (Supplementary Table S1, Fig. 6B), indicating that M3G binds to MOR receptor expressed in brain cells. No specific [^{3} H]-DAMGO binding was observed in brain homogenates from MOR KO mice (data not shown). We then determined whether M3G could activate MOR by comparing G-protein activation in brain from WT and MOR KO mice. We used the [^{35} S]-GTP γ S binding assay on brain membranes in which MOR activation provokes [^{35} S]-GTP γ S binding to G-proteins. Morphine and DAMGO MOR-selective agonists as well as M3G activated MOR in WT brain membranes (Supplementary Table S1, Fig. 6C). In contrast, none of the agonists induced [^{35} S]-GTP γ S binding to KO brain membranes (Fig. 6D). The blockade of M3G-evoked [^{35} S]-GTP γ S signal to WT membranes by the MOR selective antagonist CTOP confirmed the MOR selectivity (Supplementary Table S1, Fig. 6E). Therefore our results on the selective activation of MOR by M3G corroborate *in vivo* MOR-dependent M3G hyperalgesia. We further investigated M3G-induced MOR signalling in HEK-293 cells stably expressing MOR. We observed that M3G displayed a weak MOR agonist activity on adenylate cyclase (Supplementary Table S1), which was blocked by naloxone (Fig. 6F), as well as in a label free assay of dynamic mass redistribution

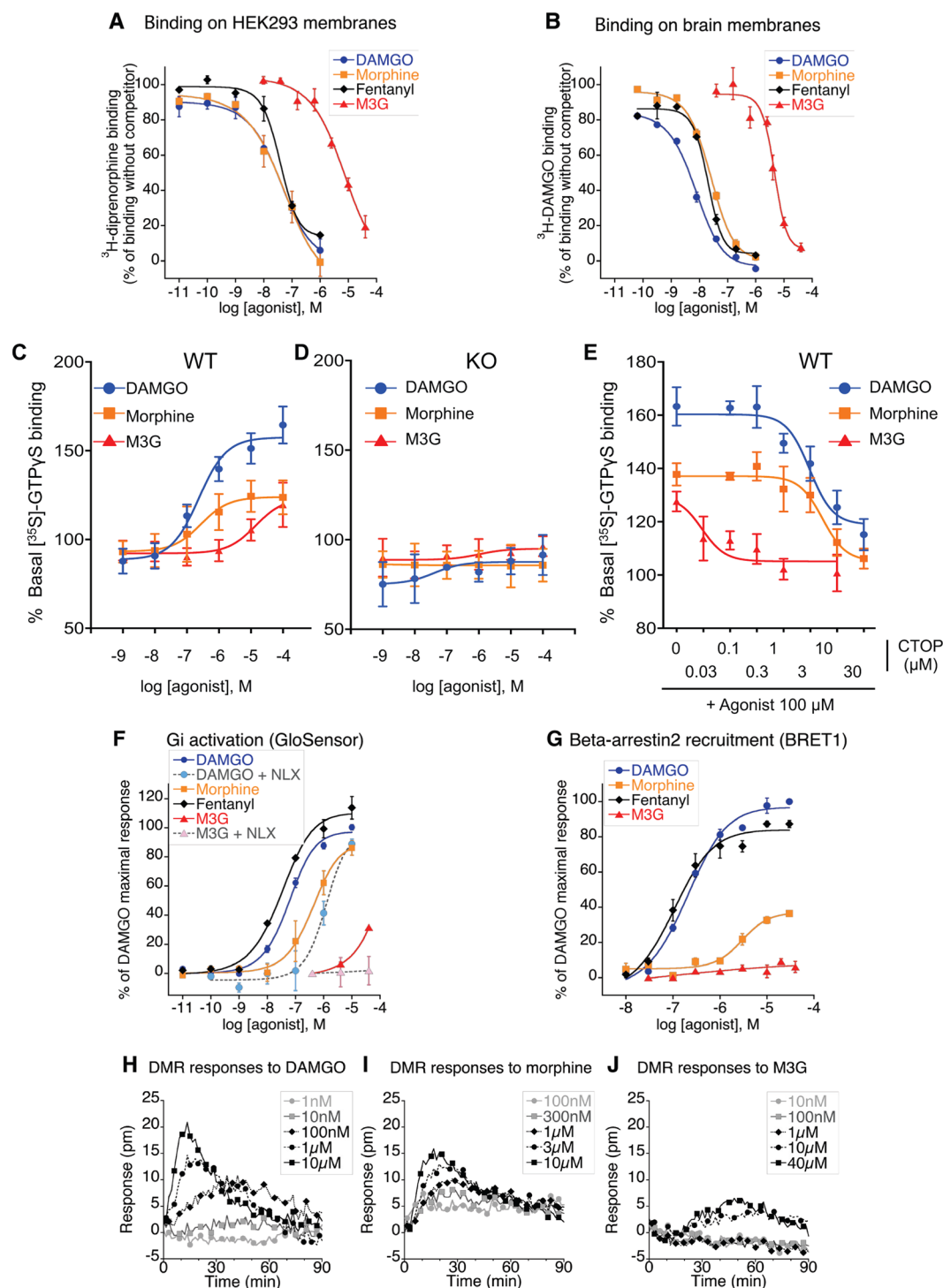


Figure 6. M3G binding and signaling to MOR (**A,B**) [^3H]-diprenorphine binding on membranes from MOR expressing HEK293-Glo cells (**A**) and [^3H]-DAMGO binding on brain membranes preparations from WT mice (**B**). Membranes were incubated with increasing doses of DAMGO, morphine, fentanyl or M3G in assay buffer containing a fixed dose of opioid radioligand. 100% represents maximal radioligand binding in the absence of competitor. Results are presented as means $\pm$ SEM of 2 or 3 experiments. (**C–E**) MOR agonist-induced [^{35}S]-GTP γ S binding to brain membranes preparations from WT (**C**) or KO mice (**D**). Membranes were incubated with increasing doses of DAMGO, morphine or M3G agonists (10^{-9} to 10^{-4}M) in assay buffer containing [^{35}S]-GTP γ S. Basal level (100%) represents [^{35}S]-GTP γ S binding in the absence of agonist. DAMGO, morphine and M3G significantly stimulated [^{35}S]-GTP γ S binding to membranes from WT but not KO mice. Results are presented as means $\pm$ SEM of 3–5 experiments on 3 independent membrane preparations per genotype. (**E**) The selective MOR antagonist CTOP inhibits DAMGO, morphine and M3G-induced [^{35}S]-GTP γ S binding to membranes from WT mice. Brain membranes from WT mice were incubated with increasing doses of the mu opioid antagonist CTOP combined with 100uM of DAMGO, morphine or M3G. Activation results are

presented as means $\pm$ SEM of 6–10 experiments from 3 independent membrane preparations. (F) Effect of increasing concentrations of DAMGO, morphine, fentanyl and M3G on forskolin-stimulated cAMP production in HEK293 stably expressing GloSensor and MOR receptor. In the cases indicated, 1 μ M of naloxone had been added to the cells 15 min prior to the agonist. Dose–response curves were normalised to maximal DAMGO activity. Evaluations were performed three times in duplicate for M3G, two times in duplicates for other agonists. Results are presented as means $\pm$ SEM. (G) eYFP-labelled Beta-arrestin-2 translocation to Rluc-MOR in HEK293 cells after 5 to 10 min of cells activation by DAMGO, morphine, fentanyl or M3G at 37 °C. Agonist specific BRET1 ratio were determined by subtracting BRET1 ratio of non activated cells, and normalised to maximal DAMGO-triggered effect. Presented results are means $\pm$ SEM of 2 to 4 experiments. (H–J) Dynamic mass redistribution (DMR) signals observed in HEK293-Glo-cells after activation by various concentrations of DAMGO, morphine or M3G. Baseline of buffer-treated cells has been subtracted. Evaluations were performed three times in duplicate or triplicates. Presented figures show a representative experiment.

(DMR; Fig. 6J). However, the peak of M3G action in DMR assay appeared to occur later than with DAMGO and morphine (Fig. 6H,I), suggesting that this morphine metabolite could activate slightly different signalling pathways than classical opioid agonists. Moreover, we observed no beta-arrestin2 recruitment in MOR-HEK293 cells with M3G, while DAMGO, fentanyl and morphine (although with a lower potency) displayed significant beta-arrestin2 recruitment (Supplementary Table S1; Fig. 6G). Altogether, our data indicate that M3G significantly interacts with and signals through MOR *in vitro* although with a weak potency, and implicate MOR for OIH *in vivo*.

Discussion

Our results obtained with two different MOR KO mouse lines and two repeated morphine schedules reveal that MOR is required for morphine-induced hyperalgesia. They confirm and extend other findings obtained with different repeated morphine administration schedules²⁶. The lack of OIH in global KO mice was revealed here by using tail immersion, pressure and cold plate assays for heat, mechanical and cold hypersensitivities while in this previous study²⁶ tail immersion, hot plate and von Frey filaments have been employed. Additionally, we show MOR requirement in OIH under a neuropathic condition using cold and mechanical sensitivity tests. Corder *et al.*²⁶ did not observe OIH when assessing heat and mechanical modalities following morphine administered 7 days post-unilateral chronic constriction injury. We could detect OIH in WT mice receiving repeated morphine starting 14 days post-pSNL when testing for cold and touch hypersensitivity, but not for heat response. This suggests that the cold and mechanical sensitivity may be more affected by chronic morphine in neuropathic condition, and OIH was absent in nerve-injured MOR KO mice. Altogether this indicates that MOR is mandatory for OIH in both basal and neuropathic conditions.

It has been proposed that analgesia and OIH may be induced by specific isoforms of MOR, such as a 6TM (6-transmembrane domain) isoform, discovered since the initial MOR characterization as a 7TM receptor^{27–29}. Indeed, the activation of the 6TM MOR-1K isoform lacking the N-terminal region and first TM domain induces excitatory cellular effects by activating Gs while activation of the 7TM receptor inhibits neurons via Gi activation³⁰, relating the 6TM hypothesis to earlier works on the excitatory mechanisms for OIH^{31,32}. Moreover spinal silencing of the 6TM MOR-1K variant in CXB7/ByJ mice led to decreased morphine hyperalgesia, suggesting that the Gs coupling of this 6TM MOR form could be important for OIH development^{29,33}. Our study shows that OIH is abolished in both MOR KO mice harboring a Neo cassette insertion in exon-2²⁰ and MOR-CMV-KO mice lacking TM2-7²¹ and so lacking all TM7 and TM6 potential isoforms. This indicates that TM2-7 are necessary for morphine-induced hyperalgesia and leaves open 7TM and 6TM mechanisms for OIH.

Our results document that OIH developed similarly in both female and male WT mice and was absent in MOR KO mice of both sexes, showing no sex-influence for MOR implication in OIH under our experimental conditions. Similarly, we found no sex difference for basal nociception and morphine analgesia. Sex is known to be an important factor influencing pain and analgesia although dependent upon genetic and environmental factors^{16,17,34}. Furthermore, sex-dependent involvement of spinal microglia and T lymphocytes have been shown to control inflammatory and neuropathic hypersensitivity^{35,36}. Previously OIH was shown to be more pronounced in female than male rats when using low sub-analgesic morphine doses³⁷ while in morphine-infused mice there was no sex difference³⁸, or the sex difference depended on morphine dose and genetic background^{39,40}. We can conclude that under our experimental conditions the role of MOR in OIH investigated through the comparison of WT and KO animals was apparent in both female and male mice, strengthening the conclusion on MOR implication. Along with congruent recent findings²⁶ and previous studies that indicated some downstream pathways associated with OIH and exhibiting MOR dependency (see in ref. 4, 5), our results demonstrate that TLR4 is not the sole mandatory receptor in OIH.

Opioid-induced hyperalgesia may be distinguished from withdrawal-induced pain in that withdrawal reaction is produced by the abrupt cessation of opioid administration whereas OIH is a state of pain sensitivity that may last longer. We have shown the MOR requirement in the long-term OIH as hyperalgesia lasts for 12 days after morphine arrest in the non-neuropathic pain paradigm and is abolished in the KO mice (Fig. 2). In the neuropathic model, hypersensitivity was investigated only on the day post morphine cessation. Whether this hyperalgesia that follows nerve injury and chronic morphine treatment would be withdrawal-induced hyperalgesia, or rather long-lasting OIH caused by activation of opponent nociceptive processes, remains to be determined as well as the common and distinct molecular and cellular adaptations underlying the two types of hypersensitivity responses. Multiple mechanisms have been shown to contribute to both opioid-induced hypersensitivities^{4–6,41,42}. They include amongst others the pronociceptive actions of low morphine levels and of opioid metabolites,

excitatory mechanisms in MOR-expressing cells and at some sites of the pain control system as well as pronociceptive anti-opioid and neuroimmune processes. One cause of OIH was shown to be due to low residual morphine levels following morphine cessation, as acutely administered low morphine levels similar to those found two days after cessation of morphine produced hyperalgesia⁴³. This mechanism was described to be opioid-dependent as OIH was reversed by the opioid antagonist naloxone⁴³, and may thus contribute to OIH in our experiments. Morphine-3-glucuronide is the main morphine metabolite and was reported to mediate hyperalgesia. The plasma concentrations of morphine and M3G peak at 30 min and 3 hrs post-administration in mice⁴⁴ and humans⁴⁵, respectively. Morphine and M3G levels remain stable upon chronic morphine administration⁴⁶, indicating that chronic treatments do not lead to morphine or M3G accumulation that would trigger pain. Our data reveal that acute M3G decreases nociceptive levels, at a lower dose than previously described⁹. In addition, we show that MOR is required for M3G-induced hyperalgesia, suggesting that M3G-MOR may mediate OIH.

Both MOR and TLR4 have been identified as OIH targets for morphine and M3G^{4,5,47}, and our present data indicate that MOR is required for M3G-induced hyperalgesia. Morphine-3-glucuronide has been characterized as a weak MOR ligand and partial agonist. It displaces [3 H]-DAMGO binding to guinea-pig brain homogenates with a K_i of 0.36 μ M as compared to the K_i of 0.0018 μ M reported for morphine⁴⁸. A weak affinity, as assessed by [3 H]-naloxone binding displacement to human MOR expressed in HEK293 cells, was shown (K_i 6 μ M), together with an 8 μ M EC₅₀ for Gi activation as compared to 0.05 μ M for DAMGO and 0.015 μ M for morphine and a bias toward b-arrestin2 recruitment as compared to morphine in MOR-transfected HEK293 cells^{25,49}. Our study confirmed the weak affinity for binding to MOR expressed both on MOR-transfected HEK293 cells and in mouse brain and indicate that M3G is a partial agonist as it is unable to elicit a maximal 100% response in several signaling assays.

Following morphine administration, micromolar M3G concentrations are found in blood (our results and ref. 44). We recorded similar M3G levels in brain and spinal cord of WT and KO animals that can activate MOR to produce hyperalgesia in the WTs. The cause for the lower M3G levels in the plasma of KO mice than plasma from WT mice, while M3G contents were similar in WT and KO brain and spinal cord, may be further explored. The difference in plasma M3G may be due to alterations in morphine metabolism⁴⁴ by glucuronyl transferases⁵⁰, pharmacokinetics, passage through the blood-brain barrier through ATP-binding cassette transporters⁵¹ or organic anion transporting polypeptides⁵², as well as elimination⁴⁴. Altogether our results suggest that some differences in M3G signalling compared to other opioid agonists could explain why this molecule displays hyperalgesic rather than analgesic activity. Besides, M3G was shown to display low affinity binding to TLR4 and to induce cellular effects distinct from the classical TLR4 activator LPS. In the HEK-Blue-TLR4 Secreted alkaline phosphatase (SEAP) signalling assay, M3G weakly activates TLR4 but also partly inhibits LPS-induced TLR4 activation²⁴. Furthermore M3G does not elicit classical LPS-induced activation markers in human and mouse macrophages²⁴, while morphine effects on macrophages were reported to be MOR-dependent and independent^{53,54}. In addition, the investigation of TLR4 involvement in OIH by using TLR4 knockout mice led to conflicting results^{4,9,11,13,14}.

We analysed spinal TLR4 expression level in WT and KO animals and found comparable TLR4 levels in WT and MOR KO animals, indicating that MOR gene inactivation does not alter TLR4 expression in a major way. In addition, chronic morphine did not elevate TLR4 levels in either WT or MOR KO mice, showing that OIH does not require TLR4 up-regulation while not excluding potential MOR-TLR4 interactions in OIH. Interestingly, morphine elevated TNF- α expression in macrophages in mice, and TNF- α was shown to stimulate NF- κ B activation and SEAP production in a TLR4-independent manner in the HEK-Blue-TLR4 reporter cells, implicating macrophage TNF- α as a novel mediator for OIH⁵⁵. Also, morphine was found to activate NF- κ B in a MOR-dependent fashion in microglia⁵⁶ and to increase Brain-Derived Neurotrophic factor (BDNF) in microglia in a TLR4-independent way¹³. In contrast, spinal microglia were found to be activated in MOR KO mice displaying no OIH after morphine treatment, suggesting no correlation between spinal microglia activation and OIH²⁶. Nonetheless, in this study the spinal microglia activation state was not documented in MOR KO mice in the absence of morphine and other papers show Oprm1 expression in microglia^{57,58}, precluding a definitive conclusion on this point.

Recently, a novel OIH mechanism dependent on MOR expressed by nociceptors has been shown, based on targeted *Oprm1* gene inactivation in Trpv1-Cre positive cells²⁶. OIH is absent in these MOR-Trpv1 cKO mice²⁶ while we find a maintained OIH in MOR-Nav1.8 cKO mice. Collectively this suggests that MOR on Trpv1-positive/Nav1.8-negative cells is implicated in OIH. In the DRGs, Nav1.8 and Trpv1 neurons only partially overlap. Lagerström *et al.*⁵⁹ has shown that Nav1.8-Cre + DRG neurons include 67% Trpv1-expressing neurons while Trpv1 neurons comprise 76% Nav1.8-expressing cells. Also, based on single-cell transcriptomics, Usoskin *et al.* have classified DRG neurons into 11 eleven types⁶⁰. MOR is expressed in one subclass of Nav1.8-high-Trpv1-low neurons, in one subclass of Trpv1-high-Nav1.8-low neurons, and in three subclasses of double Nav1.8-Trpv1 neurons belonging to the peptidergic or non-peptidergic neurons. MOR displays also a low expression in one subclass of neurofilament-positive neurons. The role of MOR expressed by these different subclasses of peripheral neurons needs to be further investigated. Mechanisms for OIH also include descending pain facilitation from rostral ventromedial medulla (RVM)⁶¹. Finally, neuron-microglia interactions in reward and other central circuits were shown important for injury-induced pain and tolerance⁶² and might in that respect participate in OIH.

In conclusion, morphine-induced hyperalgesia was absent in MOR KO mice, highlighting MOR requirement on OIH. Taken together, the present and previous studies suggest a role for specific MOR populations^{26,61,63}, isoforms³³ or signalling⁶⁴ at some nervous system sites that require further investigation.

The MOR-dependent mechanisms may involve the morphine metabolite M3G as M3G-hyperalgesia is also lost in MOR KO animals. Furthermore, our results on MOR in OIH clearly show that TLR4 is not the sole OIH mediator, and the relationships between these two receptors need to be further explored. Targeting biased signalling at MOR⁶⁵ may help designing novel therapeutic analgesic strategies devoid of opioid side effects including OIH. Finally, the crucial role of MOR shown here justifies strategies based on MOR delta-opioid receptor

heterodimers⁶⁶, MOR-chemokine receptor and MOR beta-2-adrenergic receptor cross talk^{41,67}, or putative MOR - TLR4 functional interactions to attenuate analgesic tolerance and OIH.

Methods

Animals and ethical statement. All the experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 22 September 2010 (directive 2010/63/UE), under the guidelines of the Committee for Research and Ethical issues of IASP published in PAIN, 1983; 16:109-110 and were approved by the local ethical committee (Com'Eth, Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale IGBMC-ICS, licence N° 17) with the agreement number 00876-02. Mice were housed under standard light, temperature and humidity conditions (12 h light-dark cycle, 21 ± 1 °C, $55 \pm 10\%$ humidity). Cage bedding was from Anibed (Pontvallain, France; reference AB3) and food from SAFE (Augy, France; reference D03). Water (autoclaved tap water) was available ad libitum. Mice were kept group-housed at 2–4/cage. In each group equal numbers of male and female mice were used, aged of 10–16 weeks. Mice were habituated to their experimental environment and handled for one week before starting the experiments. Particular efforts were made to minimize the number of mice and the pain they experienced. Behavioral tests were performed blind to the genotype and treatment. Studies are reported following the ARRIVE Guidelines for reporting experiments involving animals⁶⁸. Mice lacking mu opioid receptors (conventional MOR KO mice²⁰) had been generated by homologous recombination as described in Supplemental Fig. 1A. These were compared to their wild type (WT) littermates for behavioral and molecular studies. Behavioral results were analyzed on grouped males and females except for the female-male separate analysis shown in Fig. 3. We used a second MOR KO mouse line lacking whole *Oprm1* gene exons 2–3, obtained by crossing MOR-flox mice with CMV-Cre mice²¹, see Supplementary Fig. 1C. These mice are named MOR-CMV throughout the study. MOR-CMV KO mice were compared to their *Oprm1*-gene floxed littermates (MOR-flox mice) in experiments shown in Fig. 1D. The genetic background of all mice was 50% C57/BL6J:50% 129svPas.

Behavioral testing. Nociception assays were performed as previously described²¹. To determine heat nociceptive thresholds, the tail immersion test was performed by immersing half of the tail in a 48 °C water-bath. The latency until tail withdrawal was recorded, with a 20 s cut-off latency to avoid tissue damage. Cold allodynia was determined with the cold plate apparatus (Bioseb, Vitrolles, France). Each mouse was placed on the plate (5 °C) for a 5 min period, and the number of paw lifts was counted. Nociception to pressure was measured with the Pressure Application Measurement device (Ugo Basile, Milano, Italia). Briefly, a progressive pressure was applied manually onto the tail and pressing was stopped when a nociceptive reaction was observed. The pressure value at the reaction time was automatically recorded. Sensitivity to touch was determined by using Von Frey filaments applied under the hind paw of the mouse and following the Up and down method as described²¹.

Drugs and treatments. Morphine chlorhydrate (Francopia, Gentilly, France) in saline solution (NaCl 0.9%) or saline control solution were injected intraperitoneally (ip) using 100 µl solution per 10 g mouse body weight. Three different repeated morphine administration protocols were used. The first one is shown in Fig. 1A. Following baseline nociception measures, all mice received 3 mg/kg morphine on day 1 (d1) to induce analgesia. Once analgesia has been scored, mice were randomly distributed into 2 groups, the saline control group and the morphine group injected on the first day with 17 mg/kg morphine (to complete the dose up to 20 mg/kg) or saline, and on the 6 following days with 20 mg/kg morphine. The last day (d8), before morphine injection, nociceptive thresholds were determined in order to measure morphine hyperalgesia and then, mice received a morphine dose (3 mg/kg) to evaluate morphine analgesic tolerance. In the second protocol (see Supplementary Fig. S2), mice received 60 mg/kg repeated morphine once a day during 4 days. The overall design of the 2 protocols is similar, with morphine injections at 3 mg/kg on d1 and d8 or d5 to measure analgesic tolerance, respectively. In both protocols, nociceptive thresholds were scored on d5 or d8, before last morphine dose, to evaluate morphine-induced hyperalgesia. Morphine acute effects (analgesia and analgesic tolerance) were measured 45 min after 3 mg/kg morphine administration, and hyperalgesia was measured 20–22 hours following daily morphine (20 or 60 mg/kg). At the end of both repeated morphine treatments, mice were tested with tail immersion test (+d4, +d7, +d11, and +d15 post-treatment) to measure the persistence of hyperalgesia (Fig. 2A). In both protocols, basal nociceptive levels were recovered at +d15 post morphine cessation.

The third protocol was assayed on neuropathic mice (Fig. 4). Neuropathic pain was induced by partial ligation of the left common sciatic nerve (pSNL) by 7–0 braid silk suture under ketamine/xylazine anesthesia (100/10 mg/kg mixture; ketamine, Virbac, Carros, France; xylazine, Rompun, Bayer Healthcare, Puteaux, France) according to the method described previously⁶⁹. Nociceptive reactions at baseline and on day 14 post-pSNL were scored as described above. From day 15, the mice were then administered 20 mg/kg morphine or the saline control solution for 7 consecutive days. Cold, heat and mechanical sensitivities were scored the next morning following the last morphine dose (d8) for OIH assessment.

For the analysis of morphine metabolism, mice were injected ip with 10 mg/kg morphine or 100 µl saline control solution, and tissues collected 2 hr later.

Morphine-3-beta-D-glucuronide (M3G; Sigma Aldrich, St Louis, USA) at 5 mg/kg in saline or a saline control solution were injected ip in naive mice. Hypersensitivity induced by M3G was measured by using the Von Frey test (0.5, 2 and 24 hr post-injection) and the tail immersion test (48 °C; 1, 3 and 24 hr post-injection), respectively as described above.

Animals were allocated to experimental groups according to gender (male or female) and genotype. Littermates of the same sex were randomly assigned to the experimental groups. The number of animals per group was designed in accordance with previous similar studies^{21,70}. The results shown were obtained from 2–4 cohorts/group/experiment.

Preparation of plasma and tissues for M3G determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Plasma was prepared from blood collected in lithium-heparin tubes (BD, ref 367526) by centrifugation at $1300 \times g$ for 15 min. Supernatant was collected into low-binding microtubes. Brains and spinal cords were homogenized with an Ultra Turrax (Ika, Staufen, Germany) in 1 ml of H_2O , respectively. The homogenates were then sonicated (2 times 10 s, 90 W) with a Vibra Cell apparatus (Sonics, Newtown, USA) and centrifuged ($14,000 \times g$, 30 min). Supernatant was recovered and the concentration of proteins was determined using the Bradford method (Protein Assay, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). In order to quantify morphine and M3G in brain and spinal cord (300 μ l) of each extract were acidified with 500 μ l of 0.5% formic acid (v/v). Plasma (100 μ l) was acidified with 500 μ l of 0.5% formic acid (v/v). After centrifugation ($14,000 \times g$, 15 min, $4^\circ C$), supernatants were collected prior to solid phase extraction (SPE). The SPE procedure was performed with a positive pressure manifold (Thermo Electron, Courtaboeuf, France). HyperSep PGC SPE-cartridges (1cc, 25 mg, Thermo Electron) were first activated with 1 ml of acetonitrile (ACN) and then washed with 2 ml of H_2O /formic acid 0.1% (v/v). Samples were loaded on SPE-cartridges. Cartridges were dried 1 min under vacuum, and were washed with 1 ml of H_2O /formic acid 0.1% (v/v). Prelution was performed with 1 ml of ACN 2%/H₂O 97.9%/formic acid 0.1% (v/v/v). Elution was performed with 800 μ l of ACN 20%/H₂O 79.9%/formic acid 0.1% (v/v/v). Eluates were then collected in low binding 1.5 ml tubes and centrifuged ($14,000 \times g$, 10 min, $4^\circ C$). Supernatants were dried under vacuum prior to MS analysis (see below). Eluates were resuspended in 100 μ l H_2O /formic acid 0.1% (v/v) and 10 μ l was injected on the LC-MS/MS.

Quantitative LC-MS/MS instrumentation and analytical conditions. LC-analyses were used to determine the presence of morphine, M3G in the selected reaction monitoring mode (SRM). Analyses were performed on a Dionex Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) coupled with a triple quadrupole Endura (Thermo Scientific). The system was controlled by Xcalibur 2.0 software (Thermo Scientific). Samples were loaded into a column Accucore C18 RP-MS column (ref. 17626–102130; 100×2.1 mm 2.6 μ m, Thermo Scientific) heated at $40^\circ C$. Dried samples were dissolved in 100 μ l of 0.1% formic acid (v/v) and 10 μ l of solution was injected. Elution were performed at 400 μ l/min of buffers A/B. Buffer A corresponded to ACN 1%/H₂O 98.9%/formic acid 0.1% (v/v/v), whereas buffer B was ACN 99.9%/formic acid 0.1% (v/v). After 3 min of 1% of buffer B, a linear gradient of 1–60% of solvent B was applied over 8 min and followed by a washing step (1 min at 99% of solvent B) and an equilibration step (1 min of 1% of buffer B). Qualitative analysis and quantification were performed in SRM. For ionization, 3500 V of liquid junction voltage and $342^\circ C$ capillary temperature were applied. The selectivity for both Q1 and Q3 was set to 0.7 Da (FWHM). The collision gas pressure of Q2 was set at 2 mTorr of argon. For morphine and M3G, the selection of the monitored transitions and the optimization of the collision energy were manually determined. The transitions and the corresponding collision energies (CE) used were the following: m/z 286.2 $\rightarrow$ m/z 147.0 (CE = 57 eV), m/z 286.2 $\rightarrow$ m/z 173.1 (CE = 46 eV), m/z 286.2 $\rightarrow$ m/z 201.1 (CE = 38 eV) for morphine; m/z 462.2 $\rightarrow$ m/z 286.2 (CE = 49 eV) for M3G. m/z 289.2 $\rightarrow$ m/z 155.1 (CE = 33 eV), m/z 289.2 $\rightarrow$ m/z 165.2 (CE = 39 eV), m/z 289.2 $\rightarrow$ m/z 201.1 (CE = 25 eV) for d3-morphine; m/z 465.2 $\rightarrow$ m/z 289.2 (CE = 30 eV) for d3-M3G. Identification of the compounds was based on precursor ion, selective fragment ions and retention times obtained for deuterated internal standards (d3-morphine and d3-M3G).

Radioligand binding assays. WT or KO mice brains were homogenized in 10 volumes ice-cold 50 mM Tris/1 mM EDTA/0.25 M sucrose (pH 7.4) and centrifuged at $4^\circ C$ for 10 min at 500 g. Supernatants were centrifuged at $4^\circ C$ for 15 min at 100,000 g and the pellets were suspended in 5 volumes of 50 mM Tris/1 mM EDTA/0.25 M sucrose buffer (pH 7.4). Aliquots were kept at $-80^\circ C$ until use. For binding assays, 80 μ g of proteins were incubated for 1 h at $25^\circ C$ with 3.5 nM [^3H]-DAMGO (Perkin Elmer, Boston, USA) and increasing concentrations of compounds to be tested, in a final volume of 0.5 mL of 50 mM Tris/1 mM EDTA assay buffer (pH 7.4). Non-specific binding was defined in the presence of 10 μ M naloxone. Membrane-bound radioactivity was separated from free radioligand by rapid filtration on Whatman GF/B glass fiber filters, using a Brandel harvester. Radioactivity was quantified by liquid scintillation counting using a TRI-CARB Packard counter.

Membranes from HEK293 cells selected for stable expression of both GloSensor and human MOR were obtained as previously reported⁷¹. 20 μ g of membrane proteins were incubated (1 h at $25^\circ C$) with 0.7 nM [^3H]-diprenorphine (PerkinElmer) and compounds to be tested, in a final volume of 0.2 mL of 50 mM Tris/1 mM EDTA buffer (pH 7.4). Non-specific binding was defined with 1 μ M naloxone. After rapid filtration using a Unifilter-96 Filtermate Cell Harvester (Perkin Elmer), membrane-bound radioactivity was counted in a TopCountNTX microplate counter (Packard).

Data were analyzed using Kaleidagraph software (Synergy Software, Reading, PA, USA). Two or three independent assays were performed in duplicates. Specific binding was converted in percentage of the maximal specific binding without competitor, defined at 100%. IC50s were converted in Ki values using the Cheng-Prusoff equation.

cAMP accumulation assay. cAMP responses were examined by using the GloSensorTM cAMP assay according to manufacturer recommendations (Promega, Madison WI, USA) with a few modifications. Stable HEK293-Glo-MOR cells were suspended (10^6 cells per ml) in physiological Hepes buffer (10 mM HEPES, 0.4 mM NaH_2PO_4 , 137.5 mM NaCl, 1.25 mM $MgCl_2$, 1.25 mM $CaCl_2$, 6 mM KCl, 5.6 mM glucose and 1 mg/ml bovine serum albumin, pH 7.4) supplemented with 1 mM D-Luciferin (Synchem UG & Co., Felsberg, Germany). Following a luciferin-loading time of 2 h at $25^\circ C$, 100,000 cells per well were distributed in white 96-well plates. Kinetic recordings of the luminescence level were acquired using a FlexStation III microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) at $25^\circ C$: Hepes buffer or 1 μ M naloxone were added at time $t = 10$ min, various concentrations of agonists were injected at $t = 25$ min, 0.125 μ M of forskolin (Sigma Aldrich) was added at $t = 35$ min and readings were pursued for 2 h. The presence of 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine prevented cAMP

degradation by phosphodiesterases. Two to four independent assays were performed in duplicates and data were analyzed using Kaleidagraph software to provide EC₅₀ values.

Beta-Arrestin-2 recruitment. Assay was done as described⁷² with a few modifications. Briefly, HEK293 cells stably expressing eYFP-tagged beta-arrestin-2 were transfected with a plasmid encoding Rluc8-MOR. One day after transfection, cells were seeded in white 96-well plates and grown for one more day. Culture medium was replaced by Hepes buffer on the assay day (see cAMP accumulation assay description). After 40 min equilibration at 37 °C, 5 μM Coelenterazine H (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) was added (10 min before BRET1 end-point recording), followed by compounds to be tested (5 min before BRET1 signal recording). Signals were acquired in a VictorLight apparatus (Perkin Elmer) at 37 °C. A “BRET ratio” corresponding to the signal in the “acceptor channel” (band-pass filter 510–560 nm) divided by the signal in the “donor channel” (band-pass filter 435–485 nm) was calculated. Drug-induced BRET was determined (BRET1 ratio of drug-activated cells minus BRET1 ratio of buffer-treated cells) and normalised to the maximum of DAMGO-induced BRET, defined as 100%. Two or three independent experiments were performed in duplicates and data were analyzed using Kaleidagraph software to provide EC₅₀ values.

Dynamic Mass Redistribution (DMR) assay. The DMR assay was performed on stable HEK293-Glo-MOR cells as described⁷³. Cells were seeded (30 μL per well of a 300,000 cells/mL suspension) onto a Cellular Label-free 384-well microplate (Perkin Elmer) previously coated with collagen from rat tail (Sigma Aldrich) and containing 10 μL medium per well. Plate was let in a hood at room temperature for 30 min before overnight incubation at 37 °C in a humidified CO₂ incubator. The day of the assay, four careful washes of the cell layer with Hepes buffer (see “cAMP accumulation” description) were done, after which the plate was let to equilibrate with 30 μL per well Hepes buffer for 2 h in a EnSpire 2300 Multimode Plate Reader (Perkin Elmer). DMR was then monitored in the apparatus at room temperature before and after compound addition (10 μL added per well). Three independent experiments were done in duplicate or triplicates. For results representation, kinetic curves of control conditions (buffer-treated cells) were subtracted.

Agonist-stimulated [³⁵S]-GTPγS binding assay. DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin; Sigma Aldrich, St Louis, USA), morphine, M3G and CTOP ([H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂]; Sigma Aldrich, St Louis, USA) were used in [³⁵S]-GTPγS binding assay to measure G protein activation following receptor stimulation. Brain membranes were prepared from WT and conventional KO mice as previously described²¹. Membrane preparations from brain were incubated for 1 h at 25 °C with increasing concentrations (10^{−9} to 10^{−4} M) of agonists (DAMGO, Morphine or M3G) in the assay buffer containing 30 μM GDP and 0.1 nM [³⁵S]-GTPγS (NEG030H, PerkinElmer, Courtaboeuf, France). Basal [³⁵S]-GTPγS binding was determined in the absence of agonist, and non-specific binding by replacing [³⁵S]-GTPγS by cold GTPγS. For the experiment with the mu antagonist CTOP, WT brain membranes were incubated with a fixed dose of DAMGO, morphine and M3G (10^{−4} M) and with increasing concentrations of CTOP (0 to 30 μM) to assess the specific activation of mu-receptor by these agonists. Stimulated specific binding was converted in percentage of basal specific binding, defined as 100%. Data were analyzed using Prism 6 Graphpad software. Four to ten independent assays were performed on three distinct membrane preparations per genotype. Stimulation (%), EC₅₀s and IC₅₀s were calculated for each experiment and averaged.

Quantitative RT-PCR. Mouse cohorts independent from those used for the behavioral tests were treated with chronic morphine or saline as described in Supplemental Fig. 3A. Spinal cords (L4–L6) were collected on d5 18 h after the last 60 mg/kg morphine dose. They were deeply frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C. Quantitative RT-PCR was performed as described⁷⁰. Briefly, total RNA was extracted with TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). RNA concentration was determined with a ND-1000 Nanodrop spectrophotometer and 1 μg of total RNA was reverse-transcribed in a final volume of 20 μL. Real time PCR was done in triplicate on cDNA with the Light-Cycler-480 (Roche, Mannheim, Germany). To determine hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT*), mu opioid receptor (*Oprm1*) and Toll like Receptor 4 (*TLR4*) transcript expression levels, the following primers were used: GGTCTTTTTCACCAGCAAGCT (*HPRT* forward), TGACACTGGTAAAACAATGCA (*HPRT* reverse); GAGCCACAGCCTGTGCCCT (*Oprm1* forward), CGTGCTAGTGGCTAAGGCATC (*Oprm1* reverse); AAGAACATAGATCGAGCTTCAACCC (*TLR4* forward), GCTGTCCAATAGGGAAGCTTCTAGAG (*TLR4* reverse). Relative expression ratios (TLR4 in KO saline vs in WT saline; TLR4 in WT morphine vs in WT saline; TLR4 in KO morphine vs in KO saline and Mu in WT morphine vs in WT saline) were calculated by using *HPRT* as the reference gene and the 2^{−ΔΔC_T} method to determine gene expression levels.

Statistical analysis. All data are presented as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using the Statistica 12 software (StatSoft, Tulsa OK, USA). For behavioral studies one, two or three-way repeated measures ANOVAs were performed followed by Newman-Keuls *post hoc* analysis. Results for persistence of hyperalgesia and M3G induced hyperalgesia are represented as % of baseline. RT-qPCR data were analyzed for individual group differences with a one-way ANOVA. *P* < 0.05 was considered significant.

Data availability statement. All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files).

References

- Wolkerstorfer, A., Handler, N. & Buschmann, H. New approaches to treating pain. *Bioorg Med Chem Lett* **26**, 1103–1119 (2016).
- Gaveriaux-Ruff, C. Opiate-induced analgesia: contributions from mu, delta and kappa opioid receptors mouse mutants. *Curr Pharm Des* **19**, 7373–7381 (2013).
- Trang, T. *et al.* Pain and Poppies: The Good, the Bad, and the Ugly of Opioid Analgesics. *J Neurosci* **35**, 13879–13888 (2015).
- Roeckel, L. A., Le Coz, G. M., Gaveriaux-Ruff, C. & Simonin, F. Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. *Neuroscience* **338**, 160–182 (2016).
- Rivat, C. & Ballantyne, J. The dark side of opioids in pain management: basic science explains clinical observation. *Pain reports* **1**, e570 (2016).
- Arout, C. A., Edens, E., Petrakis, I. L. & Sofuoglu, M. Targeting Opioid-Induced Hyperalgesia in Clinical Treatment: Neurobiological Considerations. *CNS Drugs* **29**, 465–486 (2015).
- Hutchinson, M. R. *et al.* Exploring the neuroimmunopharmacology of opioids: an integrative review of mechanisms of central immune signaling and their implications for opioid analgesia. *Pharmacol Rev* **63**, 772–810 (2011).
- Lewis, S. S. *et al.* Evidence that intrathecal morphine-3-glucuronide may cause pain enhancement via toll-like receptor 4/MD-2 and interleukin-1beta. *Neuroscience* **165**, 569–583 (2010).
- Due, M. R. *et al.* Neuroexcitatory effects of morphine-3-glucuronide are dependent on Toll-like receptor 4 signaling. *J Neuroinflammation* **9**, 200 (2012).
- Bai, L. *et al.* Toll-like receptor 4-mediated nuclear factor-kappaB activation in spinal cord contributes to chronic morphine-induced analgesic tolerance and hyperalgesia in rats. *Neurosci Bull* **30**, 936–948 (2014).
- Johnson, J. L. *et al.* Codeine-induced hyperalgesia and allodynia: investigating the role of glial activation. *Transl Psychiatry* **4**, e482 (2014).
- Ellis, A. *et al.* Morphine amplifies mechanical allodynia via TLR4 in a rat model of spinal cord injury. *Brain Behav Immun* **58**, 348–356 (2016).
- Ferrini, F. *et al.* Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl(-) homeostasis. *Nat Neurosci* **16**, 183–192 (2013).
- Mattioli, T. A. *et al.* Toll-like receptor 4 mutant and null mice retain morphine-induced tolerance, hyperalgesia, and physical dependence. *PLoS One* **9**, e97361 (2014).
- Skolnick, P., Davis, H., Arnelle, D. & Deaver, D. Translational potential of naloxone and naltrexone as TLR4 antagonists. *Trends Pharmacol Sci* **35**, 431–432 (2014).
- Mogil, J. S. Perspective: Equality need not be painful. *Nature* **535**, S7 (2016).
- Melchior, M., Poisbeau, P., Gaumond, I. & Marchand, S. Insights into the mechanisms and the emergence of sex-differences in pain. *Neuroscience* **338**, 63–80 (2016).
- Doyle, H. H. & Murphy, A. Z. Sex differences in innate immunity and its impact on opioid pharmacology. *J Neurosci Res* **95**, 487–499 (2017).
- Rosen, S., Ham, B. & Mogil, J. S. Sex differences in neuroimmunity and pain. *J Neurosci Res* **95**, 500–508 (2017).
- Matthes, H. W. *et al.* Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* **383**, 819–823 (1996).
- Weibel, R. *et al.* Mu opioid receptors on primary afferent nav1.8 neurons contribute to opiate-induced analgesia: insight from conditional knockout mice. *PLoS One* **8**, e74706 (2013).
- Fukagawa, H., Koyama, T., Kakuyama, M. & Fukuda, K. Microglial activation involved in morphine tolerance is not mediated by toll-like receptor 4. *J Anesth* **27**, 93–97 (2013).
- Corder, G. *et al.* Constitutive mu-opioid receptor activity leads to long-term endogenous analgesia and dependence. *Science* **341**, 1394–1399 (2013).
- Khabbazi, S., Xie, N., Pu, W., Goumon, Y. & Parat, M. O. The TLR4-Active Morphine Metabolite Morphine-3-Glucuronide Does Not Elicit Macrophage Classical Activation *In Vitro*. *Front Pharmacol* **7**, 441 (2016).
- Frolich, N. *et al.* Distinct pharmacological properties of morphine metabolites at G(i)-protein and beta-arrestin signaling pathways activated by the human mu-opioid receptor. *Biochem Pharmacol* **81**, 1248–1254 (2011).
- Corder, G. *et al.* Loss of mu opioid receptor signaling in nociceptors, but not microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesia. *Nat Med* **23**, 164–173 (2017).
- Law, P. Y., Reggio, P. H. & Loh, H. H. Opioid receptors: toward separation of analgesic from undesirable effects. *Trends Biochem Sci* **38**, 275–282 (2013).
- Pasternak, G. W. & Pan, Y. X. Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacol Rev* **65**, 1257–1317 (2013).
- Convertino, M. *et al.* mu-Opioid receptor 6-transmembrane isoform: A potential therapeutic target for new effective opioids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **62**, 61–67 (2015).
- Gris, P. *et al.* A novel alternatively spliced isoform of the mu-opioid receptor: functional antagonism. *Mol Pain* **6**, 33 (2010).
- Crain, S. M. & Shen, K. F. Ultra-low concentrations of naloxone selectively antagonize excitatory effects of morphine on sensory neurons, thereby increasing its antinociceptive potency and attenuating tolerance/dependence during chronic cotreatment. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 10540–10544 (1995).
- Crain, S. M. & Shen, K. F. Neuraminidase inhibitor, oseltamivir blocks GM1 ganglioside-regulated excitatory opioid receptor-mediated hyperalgesia, enhances opioid analgesia and attenuates tolerance in mice. *Brain Res* **995**, 260–266 (2004).
- Oladosu, F. A. *et al.* Mu Opioid Splice Variant MOR-1K Contributes to the Development of Opioid-Induced Hyperalgesia. *PLoS One* **10**, e0135711 (2015).
- Machelska, H. & Celik, M. O. Recent advances in understanding neuropathic pain: glia, sex differences, and epigenetics. *F1000Res* **5**, 2743 (2016).
- Sorge, R. E. *et al.* Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat Neurosci* **18**, 1081–1083 (2015).
- Taves, S. *et al.* Spinal inhibition of p38 MAP kinase reduces inflammatory and neuropathic pain in male but not female mice: Sex-dependent microglial signaling in the spinal cord. *Brain Behav Immun* **55**, 70–81 (2016).
- Holtman, J. R. Jr. & Wala, E. P. Characterization of morphine-induced hyperalgesia in male and female rats. *Pain* **114**, 62–70 (2005).
- Arout, C. A., Caldwell, M., Rossi, G. & Kest, B. Spinal and supraspinal N-methyl-D-aspartate and melanocortin-1 receptors contribute to a qualitative sex difference in morphine-induced hyperalgesia. *Physiol Behav* **147**, 364–372 (2015).
- Juni, A., Klein, G., Kowalczyk, B., Ragnauth, A. & Kest, B. Sex differences in hyperalgesia during morphine infusion: effect of gonadectomy and estrogen treatment. *Neuropharmacology* **54**, 1264–1270 (2008).
- Juni, A. *et al.* Sex-specific mediation of opioid-induced hyperalgesia by the melanocortin-1 receptor. *Anesthesiology* **112**, 181–188 (2010).
- Melik Parsadaniantz, S., Rivat, C., Rostene, W. & Reaux-Le Goazigo, A. Opioid and chemokine receptor crosstalk: a promising target for pain therapy? *Nat Rev Neurosci* **16**, 69–78 (2015).
- Thomas, J., Mustafa, S., Johnson, J., Nicotra, L. & Hutchinson, M. The relationship between opioids and immune signalling in the spinal cord. *Handb Exp Pharmacol* **227**, 207–238 (2015).
- Rubovitch, V., Pick, C. G. & Sarne, Y. Is withdrawal hyperalgesia in morphine-dependent mice a direct effect of a low concentration of the residual drug? *Addict Biol* **14**, 438–446 (2009).

44. Handal, M., Grung, M., Skurtveit, S., Ripel, A. & Morland, J. Pharmacokinetic differences of morphine and morphine-glucuronides are reflected in locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav* **73**, 883–892 (2002).
45. Drewe, J. *et al.* Effect of P-glycoprotein modulation on the clinical pharmacokinetics and adverse effects of morphine. *Br J Clin Pharmacol* **50**, 237–246 (2000).
46. Mignat, C., Jansen, R. & Ziegler, A. Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of morphine and morphine glucuronides in rabbits receiving single and repeated doses of morphine. *J Pharm Pharmacol* **47**, 171–175 (1995).
47. Juni, A., Klein, G. & Kest, B. Morphine hyperalgesia in mice is unrelated to opioid activity, analgesia, or tolerance: evidence for multiple diverse hyperalgesic systems. *Brain Res* **1070**, 35–44 (2006).
48. Mignat, C., Wille, U. & Ziegler, A. Affinity profiles of morphine, codeine, dihydrocodeine and their glucuronides at opioid receptor subtypes. *Life Sci* **56**, 793–799 (1995).
49. Thompson, G. L., Kelly, E., Christopoulos, A. & Canals, M. Novel GPCR paradigms at the mu-opioid receptor. *Br J Pharmacol* **172**, 287–296 (2015).
50. Yang, Z. *et al.* Reverse of Acute and Chronic Morphine Tolerance by Lithocholic Acid via Down-Regulating UGT2B7. *Front Pharmacol* **7**, 404 (2016).
51. Su, W. & Pasternak, G. W. The role of multidrug resistance-associated protein in the blood-brain barrier and opioid analgesia. *Synapse* **67**, 609–619 (2013).
52. Yang, Z. Z. *et al.* siRNA capsulated brain-targeted nanoparticles specifically knock down OATP2B1 in mice: a mechanism for acute morphine tolerance suppression. *Sci Rep* **6**, 33338 (2016).
53. Khabbazi, S., Goumon, Y. & Parat, M. O. Morphine Modulates Interleukin-4- or Breast Cancer Cell-induced Pro-metastatic Activation of Macrophages. *Sci Rep* **5**, 11389 (2015).
54. Wan, J., Ma, J., Anand, V., Ramakrishnan, S. & Roy, S. Morphine potentiates LPS-induced autophagy initiation but inhibits autophagosomal maturation through distinct TLR4-dependent and independent pathways. *Acta Physiol (Oxf)* **214**, 189–199 (2015).
55. Xie, N. *et al.* Activation of mu-opioid receptor and Toll-like receptor 4 by plasma from morphine-treated mice. *Brain Behav Immun* **61**, 244–258 (2017).
56. Gessi, S. *et al.* The activation of mu-opioid receptor potentiates LPS-induced NF- κ B promoting an inflammatory phenotype in microglia. *FEBS Lett* **590**, 2813–2826 (2016).
57. Lavin, Y. *et al.* Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* **159**, 1312–1326 (2014).
58. Denk, F., Crow, M., Didangelos, A., Lopes, D. M. & McMahon, S. B. Persistent Alterations in Microglial Enhancers in a Model of Chronic Pain. *Cell Rep* **15**, 1771–1781 (2016).
59. Lagerstrom, M. C. *et al.* VGLUT2-dependent sensory neurons in the TRPV1 population regulate pain and itch. *Neuron* **68**, 529–542 (2010).
60. Usoskin, D. *et al.* Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci* **18**, 145–153 (2015).
61. Vanderah, T. W. *et al.* Tonic descending facilitation from the rostral ventromedial medulla mediates opioid-induced abnormal pain and antinociceptive tolerance. *J Neurosci* **21**, 279–286 (2001).
62. Cahill, C. M., Walwyn, W., Taylor, A. M., Pradhan, A. A. & Evans, C. J. Allostatic Mechanisms of Opioid Tolerance Beyond Desensitization and Downregulation. *Trends Pharmacol Sci* **37**, 963–976 (2016).
63. Gerhold, K. J., Drdla-Schutting, R., Honsek, S. D., Forsthuber, L. & Sandkuhler, J. Pronociceptive and Antinociceptive Effects of Buprenorphine in the Spinal Cord Dorsal Horn Cover a Dose Range of Four Orders of Magnitude. *J Neurosci* **35**, 9580–9594 (2015).
64. Bobeck, E. N., Ingram, S. L., Hermes, S. M., Aicher, S. A. & Morgan, M. M. Ligand-biased activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 leads to differences in opioid induced antinociception and tolerance. *Behav Brain Res* **298**, 17–24 (2016).
65. Manglik, A. *et al.* Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature* **537**, 185–190 (2016).
66. Gendron, L., Cahill, C. M., von Zastrow, M., Schiller, P. W. & Pineyro, G. Molecular Pharmacology of delta-Opioid Receptors. *Pharmacol Rev* **68**, 631–700 (2016).
67. Samoshkin, A. *et al.* Structural and functional interactions between six-transmembrane mu-opioid receptors and beta2-adrenoreceptors modulate opioid signaling. *Sci Rep* **5**, 18198 (2015).
68. McGrath, J. C., Drummond, G. B., McLachlan, E. M., Kilkeny, C. & Wainwright, C. L. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* **160**, 1573–1576 (2010).
69. Malmberg, A. B. & Basbaum, A. I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* **76**, 215–222 (1998).
70. Gaveriaux-Ruff, C. *et al.* Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia. *Pain* **152**, 1238–1248 (2011).
71. Becker, J. A. *et al.* Ligands for kappa-opioid and ORL1 receptors identified from a conformationally constrained peptide combinatorial library. *J Biol Chem* **274**, 27513–27522 (1999).
72. Michel, G. *et al.* Plasma membrane translocation of REDD1 governed by GPCRs contributes to mTORC1 activation. *J Cell Sci* **127**, 773–787 (2014).
73. Morse, M., Tran, E., Sun, H., Levenson, R. & Fang, Y. Ligand-directed functional selectivity at the mu opioid receptor revealed by label-free integrative pharmacology on-target. *PLoS One* **6**, e25643 (2011).

Acknowledgements

HEK293 cells stably expressing the GloSensor 20 F were from Julien Hanson. We thank the ICS and IGBMC Animal facilities, Alexis Simon, Caroline Pham, Gilles Duval and Djémo Memedov for animal care. We thank Khadija Elhabazi and Katia Befort for helpful discussions. This work has been funded by the European Union Seventh Framework programme (FP7-Health-2013-Innovation) under grant agreement 1602919 (C.G.-R.), by Université de Strasbourg (C.G.-R.); by Frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02 ANR-10-LABX-0030-INRT (C.G.-R.) and by the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (L.A.R.). J.M. and Y.G. were supported by INSERM. F.S. and V.U. were supported by CNRS, Université de Strasbourg and LABEX ANR-10-LABX-0034 Medalis.

Author Contributions

L.A.R. designed and performed experiments, analysed data and wrote the manuscript. V.U., D.R. and J.M. designed and performed experiments and analysed data. A.R. provided a part of the mutant mice. E.A. and H.M. edited the manuscript. J.N.W. provided Nav1.8-Cre animals and critically edited the manuscript. Y.G. and F.S. conceived studies and wrote the manuscript. C.G.-R. conceived studies, supervised the project and wrote the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:[10.1038/s41598-017-11120-4](https://doi.org/10.1038/s41598-017-11120-4)

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Supplementary Figures and Tables

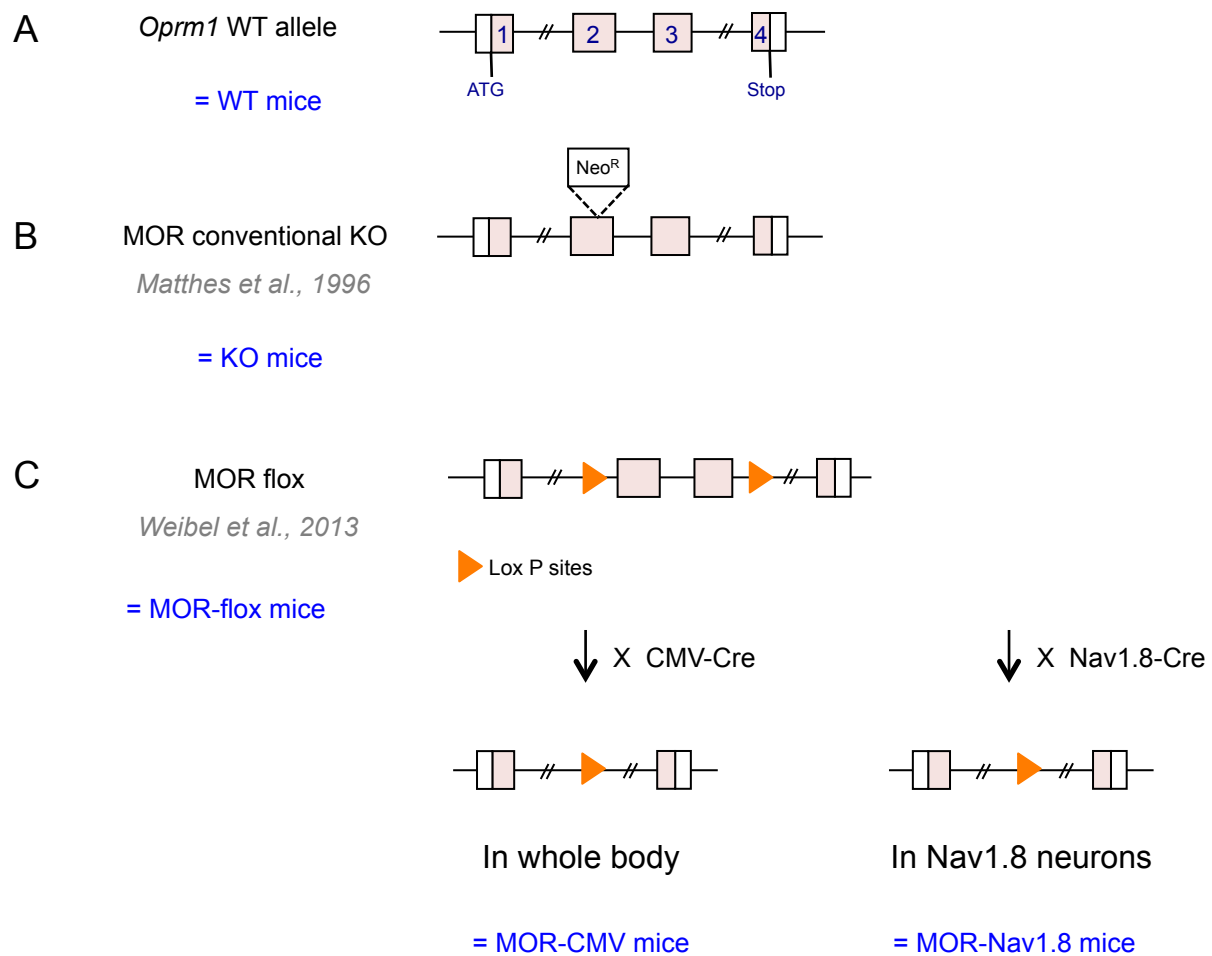
Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptor and the metabolite morphine-3-glucuronide

Laurie-Anne Roeckel, Valérie Utard, David Reiss, Jinane Mouheiche, Hervé Maurin, Anne Robé, Emilie Audouard, John N. Wood, Yannick Goumon, Frédéric Simonin and Claire Gaveriaux-Ruff

Table S1. Comparison of M3G and other MOR agonists in MOR-radioligand binding and signaling assays

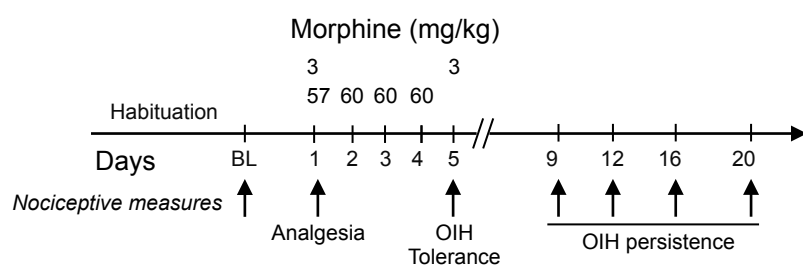
Compound	[³ H]- diprenorphine	[³ H]-DAMGO	[³⁵ S]-GTPγS binding to WT	Inhibition of	Beta-arrestin-2 recruitment
	binding to hMOR	binding to WT	mouse brain membranes	cAMP	in hMOR HEK293 cells
	binding to hMOR	mouse brain		production in	
	in HEK293 cells	membranes		hMOR HEK293	
				cells	
	Ki, nM	Ki, nM	EC ₅₀ , nM	CTOP IC ₅₀ , nM	EC ₅₀ , nM
					% of DAMGO
					effect
DAMGO	9.6 ± 0.1	3.1 ± 0.4	265 ± 82	3140 ± 1202	62 ± 10
Fentanyl	8.6 ± 0.8	5.8 ± 1.0	ND	ND	40 ± 10
Morphine	14 ± 7	7.7 ± 0.9	415 ± 208	3705 ± 1372	422 ± 196
M3G	1272 ± 166	1403 ± 91	14,299 ± 3276	133± 23	2722 ± 557
				> 40,000	Und
					Und

ND, not determined ; Und, undetectable

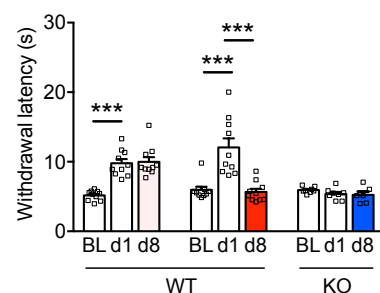


Supplementary Figure S1. The different MOR mutant mouse lines used in the study. (A) *Oprm1* gene WT allele. (B) For generating MOR conventional KO mice, a neomycin resistance cassette (Neo^R) had been inserted in exon 2, causing the receptor gene inactivation. (C) Crossing of mice harboring floxed exons 2-3 with mice expressing the cyclic recombination enzyme (Cre) DNA under the Cytomegalovirus (CMV) promoter control led to ubiquitous MOR gene KO. Crossing with Nav1.8-Cre mice led to *Oprm1* gene inactivation in peripheral Nav1.8 neurons. The abbreviations used throughout the text and figures are written in blue characters. CMV, cytomegalovirus ubiquitous promoter; KO, knockout; MOR, mu opioid receptor; *Oprm1*, gene encoding MOR.

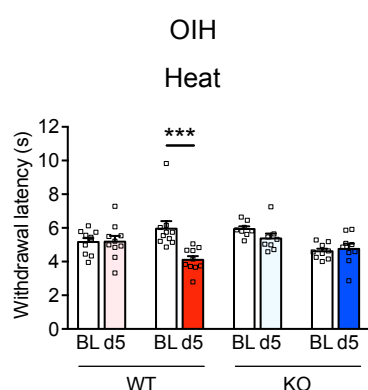
A Experimental design



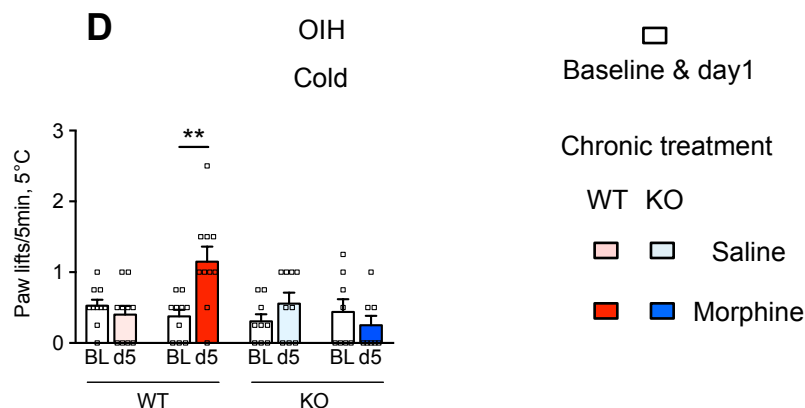
B Analgesic tolerance



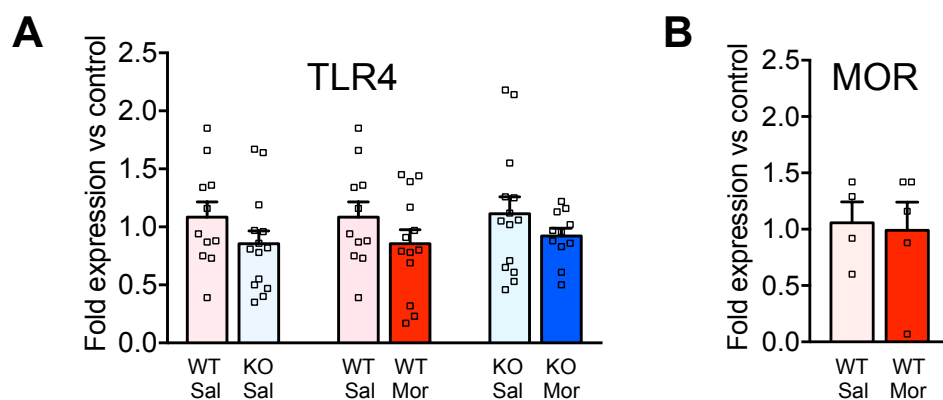
C



D



Supplementary Figure S2. Morphine induced hyperalgesia in WT but not MOR KO mice following a repeated 4 day 60mg/kg treatment. Analgesia, analgesic tolerance and OIH were measured following the protocol described in (A). (B) Analgesia and analgesic tolerance in the 48°C tail immersion test. (C) Heat hyperalgesia in the same test. (D) Cold allodynia measured with the 5°C cold plate test. **, *** p < 0.01, p < 0.001 compared to the corresponding group (ANOVA repeated measures, Newman-Keuls). BL, Baseline. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. n=7-10 mice/group. Detailed statistical analyses are presented in Supplementary Table S7.



Supplementary Figure S3. There is no difference for TLR4 transcript expression in KO mice and WT mice. Mice were treated with repeated morphine (60 mg/kg, 4 days; Mor) or a saline control (Sal) solution following the protocol described in Supplementary figure S2. RNA was extracted from spinal cord, and TLR4 and MOR transcripts quantified by RT-qPCR. **(A)** MOR KO or morphine induced no change in TLR4 mRNA expression. **(B)** Repeated morphine did not change MOR expression as compared to saline controls. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. $n = 4$ -10 mice per group. One-way ANOVA. Detailed statistical analyses are presented in Supplementary Table S8.

Supplementary Table S2. Detailed statistical evaluation for Fig. 1.

One-way ANOVA repeated measures for analgesia and tolerance to analgesia

WT	Pressure
Treatment	F(1,35)=29.751, p<0.001
Time	F(2,70)=124.521, p<0.001
Time x Treatment	F(2,70)=8.216, p<0.001

KO	Pressure
Treatment	F(1,35)=0.64, p=0.42
Time	F(2,70)=0.38, p=0.53
Time x Treatment	F(2,70)=0.80, p=0.37

WT	Heat
Treatment	F(1,46)=19.053, p<0.001
Time	F(2,88)=108.213, p<0.001
Time x Treatment	F(2,88)=5.186, p<0.001

KO	Heat
Treatment	F(1,39)=0.76, p=0.38
Time	F(2,78)=1.457, p=0.23
Time x Treatment	F(2,78)=2.098, p=0.12

MOR-flox	Heat
Treatment	F(1,16)=13.99, p<0.001
Time	F(2,32)=23.301, p<0.001
Time x Treatment	F(2,32)=7.785, p<0.01

CMV-KO	Heat
Treatment	F(1,15)=0.44, p=0.51
Time	F(2,30)=0.046, p=0.83
Time x Treatment	F(2,30)=1.477, p=0.24

Two-way repeated measures ANOVA for hyperalgesia

WT vs KO	Mechanical
Genotype	F(1, 66)=139.98, p<0.001
Treatment	F(1, 66)=16.17, p<0.001
Genotype x Treatment	F(1, 66)=13.34, p<0.001
Time	F(2,132)=149.55, p<0.001
Time x Genotype	F(2,132)=160.37, p<0.001

Time x Treatment	F(2,132)=3.29, p<0.05
Time x Genotype x Treatment	F(2,132)=2.12, p=0.12

WT vs KO	Heat
Genotype	F(1, 85)=0.36, p= 0.54
Treatment	F(1, 85)=12.18, p<0.001
Genotype x Treatment	F(1, 85)=4.69, p<0.05
Time	F(1, 85)=45.262, p<0.01
Time x Genotype	F(1, 85)=20.104, p<0.01
Time x Treatment	F(1, 85)=2.460, p=0.12
Time x Genotype x Treatment	F(1, 85)=4.652, p<0.05

MOR-flox vs MOR-CMV KO	Heat
Genotype	F(1, 31)=1.43, p= 0.24
Treatment	F(1, 31)=6.10, p<0.05
Genotype x Treatment	F(1, 31)=2.43, p=0.12
Time	F(1, 31)=7.672, p<0.01
Time x Genotype	F(1, 31)=9.656, p<0.01
Time x Treatment	F(1, 31)=15.540, p<0.001
Time x Genotype x Treatment	F(1, 31)=4.121, p=0.051

WT vs KO	Cold
Genotype	F(1, 53)=9.47, p<0.01
Treatment	F(1, 53)=5.22, p<0.05
Genotype x Treatment	F(1, 53)=6.14, p<0.05
Time	F(1, 53)=13.029, p<0.001
Time x Genotype	F(1, 53)=17.334, p<0.001
Time x Treatment	F(1, 53)=13.354, p<0.001
Time x Genotype x Treatment	F(1, 53)=8.734, p<0.01

Supplementary Table S3. Detailed statistical evaluation for Figure 2.

Two-way repeated measures ANOVA for persistence of hyperalgesia following cessation from 20mg/kg chronic morphine

WT vs KO	Heat
Genotype	F(1, 45)=21.67, p<0.001
Treatment	F(1, 45)=6.29, p<0.05
Genotype x Treatment	F(1, 45)=24.30, p<0.001
Time	F(4, 180)=1.568, p=0.18
Time x Genotype	F(4, 180)=3.505, p<0.01
Time x Treatment	F(4, 180)=2.88, p<0.05
Time x Genotype x Treatment	F(4, 180)=0.997, p=0.41

Supplementary Table S4. Detailed statistical evaluation for Fig. 3.

Two-way ANOVA repeated measures for analgesia and tolerance to analgesia in WT

WT	Heat
Treatment	F(1,44)=18.20, p<0.001
Gender	F(1,44)=2.04, p=0.16
Treatment x Gender	F(1,44)=0.675, p=0.41
Time	F(2,88)=108.67, p<0.001
Time x Gender	F(2,88)=1.25, p=0.160.29
Time x Treatment	F(2,88)=5.186, p<0. 01
Time x Gender x Treatment	F(2,88)=0.99, p=0.37

WT	Pressure
Treatment	F(1,33)=28.72, , p<0.001
Gender	F(1,33)=0.002, p=0.96
Treatment x Gender	F(1,33)=0.014, p=0.90
Time	F(2,66)=118.702, p<0.001
Time x Gender	F(2,66)=0.163, p=0.84
Time x Treatment	F(2,66)=7.86, p<0. 001
Time x Gender x Treatment	F(2,66)=0.223, p=0.80

Three-way repeated measures ANOVA for hyperalgesia

WT vs KO	Heat
Treatment	F(1, 81)=13.50, p<0.001
Gender	F(1, 81)=1.10, p=0.29
Genotype	F(1, 81)=86.100, p<0.001
Treatment x Gender	F(1, 81)=0.08, p=0.77
Genotype x Treatment	F(1, 81)=3.38, p=0.06
Gender x Genotype	F(1, 81)=1.109, p=0.29
Gender x Genotype x Treatment	F(1, 81)=0.034, p=0.89
Time	F(1,81)=42.401, p<0.001
Time x Gender	F(1,81)=0.038, p=0.84
Time x Treatment	F(1,81)=2.169, p=0.14
Time x Genotype	F(1,81)=17.321, p<0.001
Time x Genotype x Treatment	F(1,81)=3.510, p=0.06
Time x Gender x Treatment	F(1,81)=0.439, p=0.50
Time x Genotype x Gender x Treatment	F(1,81)=0.479, p=0.49

WT vs KO	Pressure
Treatment	F(1, 66)=16.17, p<0.001
Gender	F(1, 66)=0.000, p=0.95
Genotype	F(1, 66)=139.98, p<0.001
Treatment x Gender	F(1, 66)=0.01, p=0.92
Genotype x Treatment	F(1, 66)=13.34, p<0.001

Gender x Genotype	F(1, 66)=0.00, p=0.95
Gender x Genotype x Treatment	F(1, 66)=0.42, p=0.52
Time	F(2,132)=149.55, p<0.001
Time x Gender	F(2,132)=0.46, p=0.63
Time x Treatment	F(2,132)=3.29, p<0.05
Time x Genotype	F(2,132)=160.37, p<0.001
Time x Genotype x Treatment	F(2,132)=2.12, p=0.12
Time x Gender x Treatment	F(2,132)=0.26, p=0.76
Time x Genotype x Gender x Treatment	F(2,132)=1.14, p=0.32

WT vs KO	Cold
Treatment	F(1, 49)=4.92, p<0.05
Gender	F(1, 49)=0.08, p= 0.72
Genotype	F(1, 49)=9.19, p<0.01
Treatment x Gender	F(1, 49)=0.46, p= 0.49
Genotype x Treatment	F(1, 49)=5.98, p<0.01
Gender x Genotype	F(1, 49)=1.24, p= 0.27
Gender x Genotype x Treatment	F(1, 49)=1.38, p= 0.24
Time	F(1,49)=12.48, p<0.001
Time x Gender	F(1,49)=0.49, p=0.48
Time x Treatment	F(1,49)=12.81, p<0.001
Time x Genotype	F(1,49)=16.89, p<0.001
Time x Genotype x Treatment	F(1,49)=8.18, p<0.01
Time x Gender x Treatment	F(1,49)=0.61, p=0.43
Time x Genotype x Gender x Treatment	F(1,49)=1.01, p=0.32

Supplementary Table S5. Detailed statistical evaluation for Fig. 4.

Two-way repeated measures ANOVA for chronic morphine induced hyperalgesia in WT and KO mice under pSNL neuropathic injury.

WT vs KO	Cold
Genotype	F(1, 39)=11.25, p<0.01
Treatment	F(1, 39)=5.47, p<0.05
Genotype x Treatment	F(1, 39)=9.09, p<0.01
Time	F(2,78)=34.814, p<0.001
Time x Genotype	F(2,78)=9.283, p<0.001
Time x Treatment	F(2,78)=1.886, p=0.15
Time x Genotype x Treatment	F(2,78)=6.816, p<0.05

WT vs KO	Heat
Genotype	F(1, 38)=0.19, p=0.66
Treatment	F(1, 38)=0.47, p=0.49
Genotype x Treatment	F(1, 38)=0.12, p=0.72
Time	F(2,76)=78.766, p<0.001
Time x Genotype	F(2,76)=0.191, p=0.82
Time x Treatment	F(2,76)=0.386, p=0.68
Time x Genotype x Treatment	F(2,76)=1.654, p=0.19

WT vs KO	Mechanical
Genotype	F(1, 39)=0.53, p=0.46
Treatment	F(1, 39)=4.43, p<0.05
Genotype x Treatment	F(1, 39)=0.01, p=0.92
Time	F(2,78)=51.542, p<0.001
Time x Genotype	F(2,78)=0.167, p=0.84
Time x Treatment	F(2,78)=0.236, p=0.79
Time x Genotype x Treatment	F(2,78)=0.821, p=0.44

Supplementary Table S6. Detailed statistical evaluation for Fig. 5.

One-way ANOVA repeated measures for M3G-induced hyperalgesia.

WT	Heat
Treatment	F(1, 18)=11.90, p<0.01
Time	F(3,54)=1.435, p=0.24
Time x Treatment	F(3.54)=6.582, p<0.001

WT	Mechanical
Treatment	F(1, 18)=16.76, p<0.001
Time	F(3,54)=0.912, p=0.44
Time x Treatment	F(3.54)=4.389, p<0.01

KO	Heat
Treatment	F(1, 17)=2.01, p=0.17
Time	F(3,51)=0.320, p=0.81
Time x Treatment	F(3.51)=0.486, p=0.69

KO	Mechanical
Treatment	F(1, 17)=0.341, p=0.56
Time	F(3,51)=0.059, p=0.98
Time x Treatment	F(3.51)=0.100, p=0.95

Flox	Mechanical
Treatment	F(1, 12)=0.678, p=0.42
Time	F(3,36)=2.455, p=0.07
Time x Treatment	F(3.36)=2.638, p=0.06

Flox	Heat
Treatment	F(1, 11)=1.447, p=0.25
Time	F(3,33)=2.138, p=0.11
Time x Treatment	F(3.33)=1.785, p=0.16

cKO	Mechanical
Treatment	F(1, 14)=13.016, p<0.01
Time	F(3,42)=2.110, p=0.11
Time x Treatment	F(3.42)=3.325, p<0.05

cKO	Heat
Treatment	F(1, 14)=3.849, p=0.06
Time	F(3,42)=2.055, p=0.12
Time x Treatment	F(3.42)=5.196, p<0.05

Supplementary Table S7. Detailed statistical evaluation for Supplementary Fig. S2.

One-way ANOVA repeated measures in WT or KO for analgesia and tolerance to analgesia

WT	Heat
Treatment	F(1,18)=0.379, p=0.54
Time	F(2,36)=36.394, p<0.001
Time x Treatment	F(2,36)= 15.04, p<0.001

KO	Heat
Treatment	F(1,7)=0.34, p=0.57
Time	F(2,14)=2.057, p=0.12
Time x Treatment	F(2,14)= 1.99, p=0.15

Two-way repeated measures ANOVA for hyperalgesia

WT vs KO	Heat
Genotype	F(1, 33)=0.059, p=0.81
Treatment	F(1, 33)=4.84, p<0.05
Genotype x Treatment	F(1, 33)=2.63, p=0.11
Time	F(1,33)=15.068, p<0.001
Time x Genotype	F(1,33)=5.897, p<0.05
Time x Treatment	F(1,33)=4.119, p=0.051
Time x Genotype x Treatment	F(1,33)=19.825, p<0.001

WT vs KO	Cold
Genotype	F(1, 33)=5.21, p<0.05
Treatment	F(1, 33)=1.16, p=0.28
Genotype x Treatment	F(1, 33)=3.83, p<0.05
Time	F(1,33)=3.059, p=0.08
Time x Genotype	F(1,33)=2.080, p=0.15
Time x Treatment	F(1,33)=1.289, p=0.051
Time x Genotype x Treatment	F(1,33)=19.825, p<0.01

Supplementary table S8. Detailed statistical evaluation for Supplementary Fig. S3.

ANOVA repeated measures for TLR4 mRNA expression in KO and WT mice

WT vs KO	TLR4
Genotype	F(1, 45)=0.15, p=0.69
Treatment	F(1, 45)=2.89, p=0.09
Genotype x Treatment	F(1, 45)=0.02, p=0.88

One way ANOVA for MOR mRNA expression in WT mice

WT morphine vs WT saline	MOR
Treatment	F(1, 8)=0.39, p=0.54

III. Matériels et méthodes supplémentaires

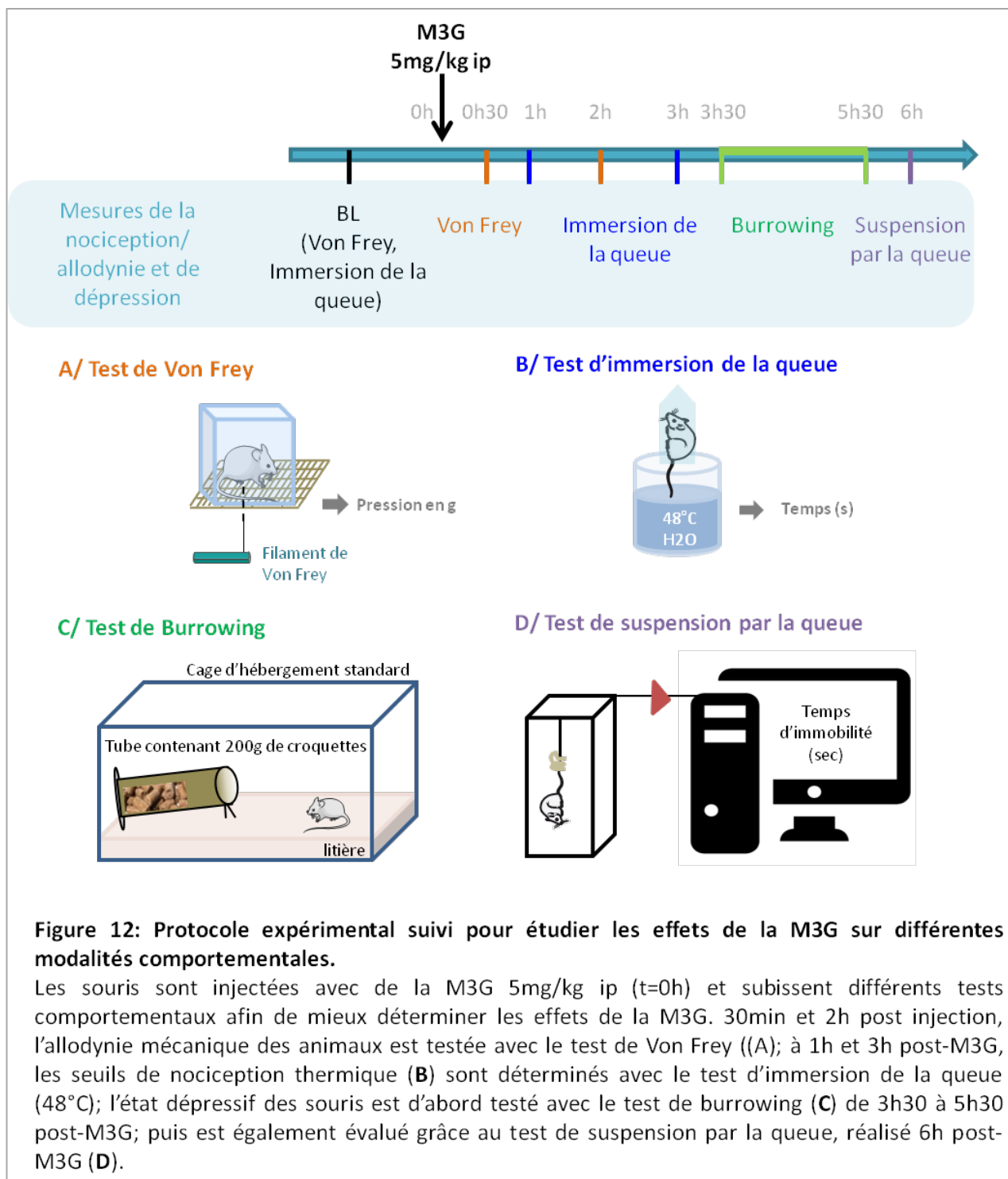
Matériels et méthodes supplémentaires

Les méthodes présentées ici sont celles correspondant aux résultats présentés en supplément du manuscrit Roeckel et al., 2017. Toutes les autres méthodes sont décrites dans le manuscrit.

Protocole expérimental

Le protocole expérimental suivi pour le traitement morphinique précédant les dissections des tissus pour les qPCR est le même que celui décrit dans l'article Roeckel et al., 2017. Brièvement, les souris sont injectées avec de la morphine 60mg/kg ip pendant 4jours et 18h après la dernière injection les animaux sont mis à mort et leurs tissus collectés.

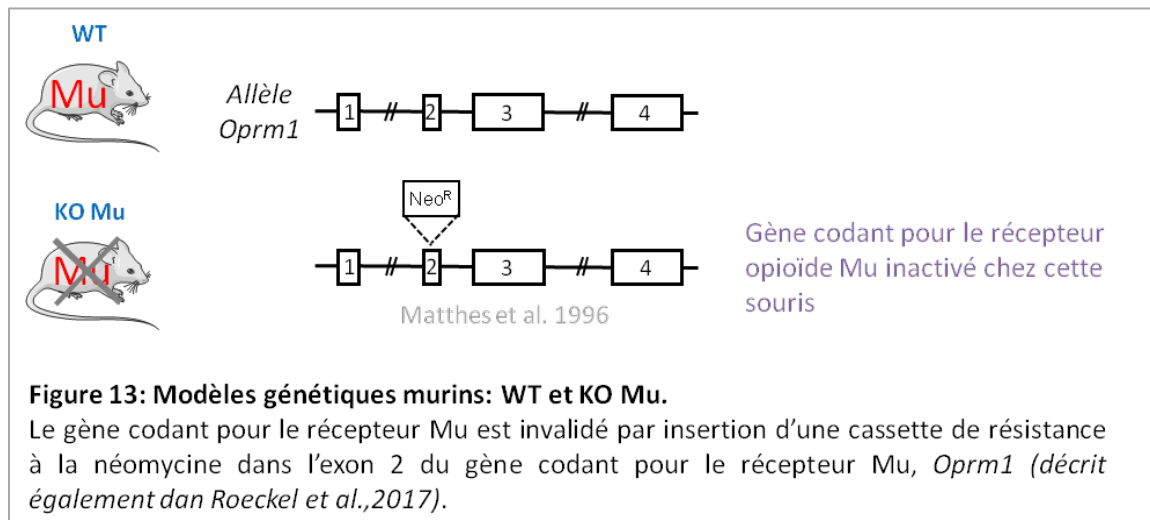
Les détails de la procédure expérimentale suivie pour réaliser les expériences avec le traitement M3G sont décrits dans la [Figure 12](#). Les résultats obtenus avec les tests de Von Frey et d'immersion de la queue sont publiés et décrits dans Roeckel et al., 2017, Figure 5, panneaux D et E.



Modèles murins

Les souris utilisées ici sont toutes de fond génétique mixte : 50% C57Bl6j ; 50% 129svPas.

Les souris Knockouts pour le récepteur Mu ont été générées par recombinaison homologue (Matthes et al., 1996). Les réponses comportementales de ces animaux sont comparées à celles de leurs congénères sauvages WT (Figure 13).



Traitements pharmacologiques

La morphine (chlorhydrate, Francopia) est dissoute dans une solution saline (NaCl 0,9%, Cooper) et injectée par voie intra-péritonéale (ip) dans un volume de 100 µl par 10 grammes de masse corporelle. Le traitement sub-chronique suivi est réalisé par injections quotidiennes de morphine 60 mg/kg pendant 4 jours.

La M3G (Sigma Aldrich) est également dissoute dans une solution saline et injectée comme précédemment décrit pour la morphine, à une dose de 5mg/kg.

Burrowing

Ce test mime une activité que les souris exercent dans la nature, celle de creuser pour se construire un terrier. Une diminution de cette activité est considérée comme un signe de dépression. Avec l'appareillage décrit en Figure 12 C, nous avons essayé de mesurer cette activité spontanée des animaux.

Afin de réaliser ce test, nous avons construit des tubes selon les indications de Deacon et collaborateurs (Deacon, 2006). Ce test est réalisé dans une cage d'hébergement standard des souris afin de ne pas induire un stress supplémentaire.

Concrètement, un tube en plastique d'un diamètre de 6,8cm et mesurant 18cm de long (fabrication IGBMC, tube de provenance Leroy Merlin), comporte une extrémité ouverte et une seconde extrémité

close par un système permettant une circulation de l'air. L'extrémité close repose au sol, alors que l'extrémité ouverte est surélevée par deux pieds (vis de 3 cm). Ce tube est rempli avec 200g de croquettes (croquettes classiquement consommées par les animaux de notre animalerie), et placé au fond de la cage comme représenté dans la [figure 12](#). Durant ce test, les animaux ont accès ad libitum à leur eau de boisson. Le test est commencé 3h30 après injection ip de M3G 5mg/kg aux souris, et se déroule sur une période de 2h. A l'issue de ces 2h, la quantité de croquettes restante dans le tube est pesée.

Suspension par la queue

Le test de la suspension de la queue est un test qui permet de mesurer l'état dépressif des souris, et plus précisément leur état de résignation.

En pratique, la souris est suspendue par la queue à un appareillage qui permet de mesurer l'état d'immobilité des souris en secondes ([Figure 12 D](#)). Ce test a été réalisé avec le système de Bioseb (version 2.20) et dure 6min. Le bout de la queue de la souris est rattaché à l'appareil grâce à un manchon en ruban adhésif. Ce test est inconfortable mais non douloureux pour la souris.

Une augmentation du temps d'immobilité marquera une plus grande résignation des animaux et donc une perte de motivation à échapper à une situation non confortable, et sera interprétée comme un signe de dépression.

Statistiques et représentations des résultats

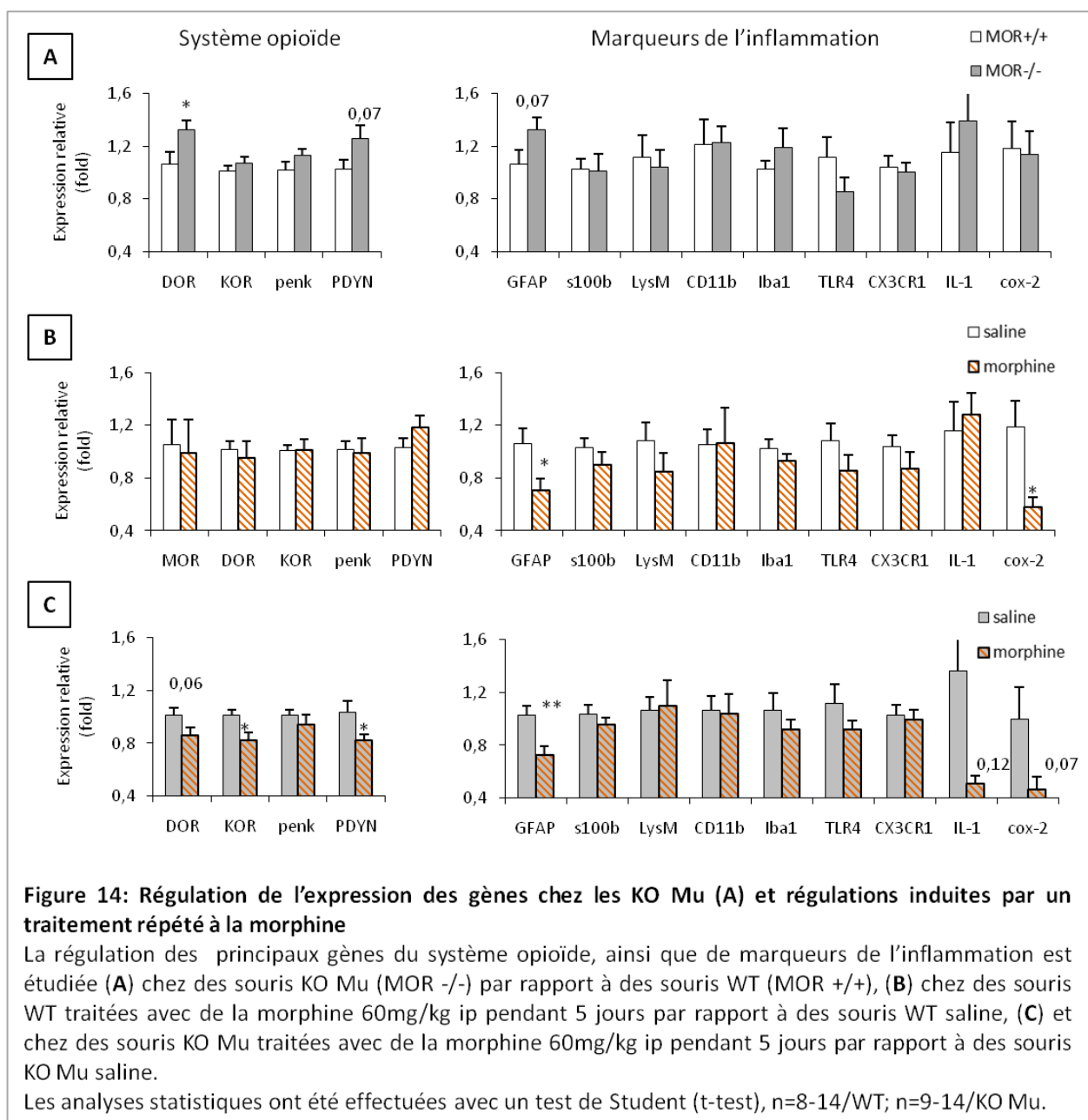
Les résultats sont exprimés sous forme d'histogrammes représentant les moyennes de chaque groupe et la variabilité est exprimée sous forme de SEM (barres d'erreurs).

Les analyses statistiques sont des one-way ANOVA, réalisées avec le logiciel Statistica 12 (Statsoft, Tulsa OK, USA) pour les résultats de suspension par la queue. Ces ANOVA sont complétées d'une analyse post-hoc de type Newman-Keuls. Ces résultats sont présentés dans le [Tableau 1](#). Les analyses statistiques des qPCR et du burrowing ont été réalisées en suivant un test de Student.

IV. Résultats supplémentaires

A. Régulations des gènes du système opioïde et des marqueurs de l'inflammation dans la moelle épinière suite à un traitement répété à la morphine

Nous avons étudié par qRT-PCR (Figure 14) si un traitement prolongé à la morphine (60mg/kg ip pendant 4 jours), entraîne des modifications de l'expression des gènes spinaux codant pour les récepteurs du système opioïde : des récepteurs Mu, Delta et Kappa et des peptides endogènes pro-enképhaline et pro-dynorphine ; ainsi que des marqueurs de l'inflammation comme les marqueurs astrocytaires GFAP et s100b; les marqueurs microgliaux LysM, CD11b, Iba1, TLR4, ou Cx3Cr1, ou encore des marqueurs pro-inflammatoires IL-1 β et cox-2.



Le [panneau A](#) représente les différences d'expression de ces gènes entre les souris KO Mu et les sauvages. On observe qu'il y a une augmentation de l'expression des transcrits du récepteur Delta chez les souris où le gène Oprm1 est inactivé.

De façon similaire, chez les souris KO Mu, on observe une tendance à l'augmentation de l'expression des transcrits pdyn.

Une augmentation non significative de l'expression du gène codant pour GFAP est aussi observée chez les animaux KO Mu comparativement aux individus sauvages.

Chez les souris WT ([panneau B](#)), dans nos conditions, il n'y a aucune régulation du système opioïde observée au niveau de la moelle épinière après un traitement prolongé à la morphine. De façon générale, les régulations du système immunitaire central ne sont pas non plus très nombreuses. On observe cependant une diminution de l'expression des gènes codants pour la GFAP, marqueur de l'activité astrocytaire, l'enzyme médiatrice de l'inflammation cox-2. Ces résultats suggèrent une inhibition de l'activité proinflammatoire de la morphine dans ces conditions, mais ces résultats restent à considérer avec précautions car parmi les 9 marqueurs de l'inflammation étudiés, seulement 2 semblent être régulés.

Chez les souris KO Mu ([panneau C](#)), nous observons des régulations des gènes du système opioïde induite par la morphine, en miroir de ce que nous avons observé dans le [panneau A](#), c'est-à-dire une diminution des transcrits Delta et pdyn. De plus, nous observons aussi une diminution de l'expression du gène codant pour le récepteur Kappa.

Concernant les régulations du système immunitaire, on observe globalement le même type de réponse chez les souris KO Mu que chez les souris WT, c'est-à-dire une diminution de l'expression des transcrits GFAP, et une tendance à la diminution des transcrits cox-2 après traitement prolongé avec de la morphine.

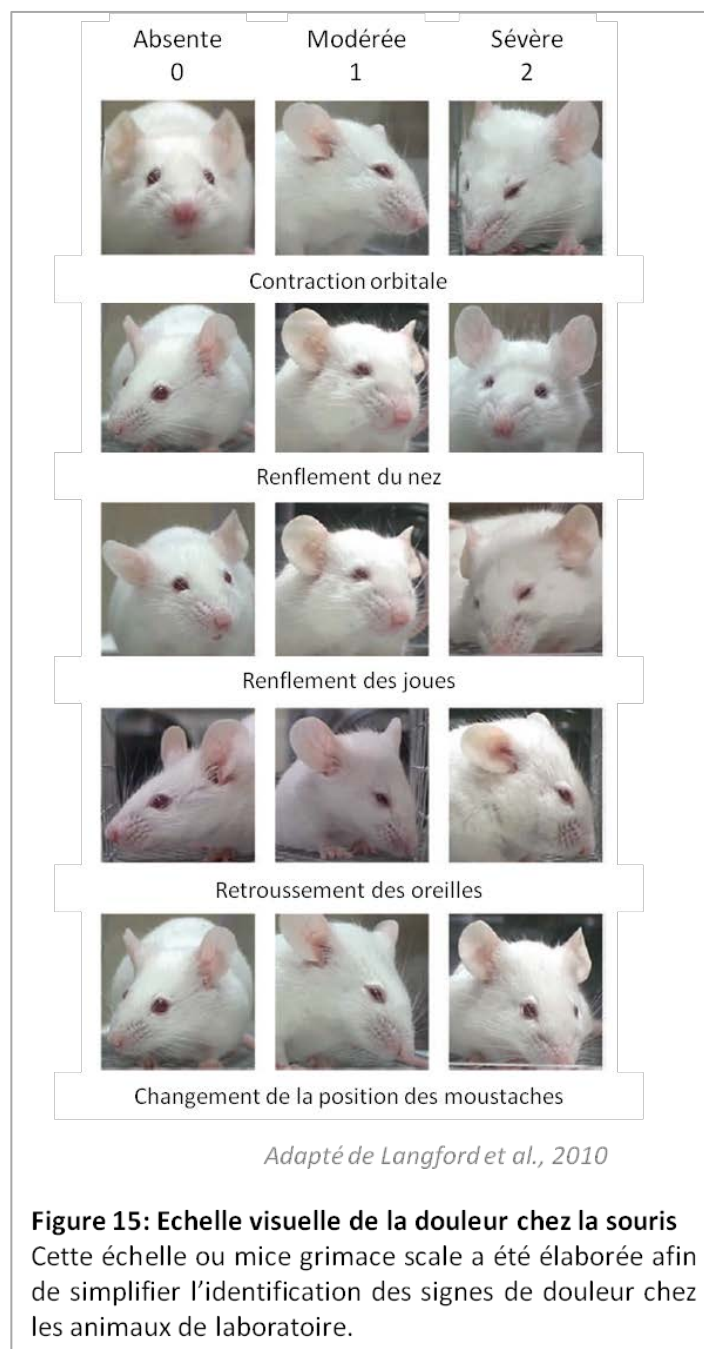
B. Effets de la M3G sur le bien-être

Après administration de la M3G, nous avons observé une forme de mal-être physique chez les animaux. Nous avons voulu mesurer ce mal-être et avons essayé de le faire grâce à l'échelle de mesure de la douleur chez la souris par interprétation des grimaces ou « mice grimace scale » (MGS) (Langford et al., 2010), représentée dans la [Figure 15](#).

Après injection, un expérimentateur non informé du traitement administré aux animaux a scoré les signes faciaux de douleur, comme indiqué dans la [figure 15](#). Cette mesure a été réalisée en direct, aucun enregistrement vidéo n'a été fait. Malheureusement, cela n'a pas permis d'identifier des

différences significatives entre les différents groupes expérimentaux. Il aurait certainement fallu une mise au point préalable des conditions de mesure de ces grimaces. En effet, Miller et Leach ont montré que des différences de scorage pouvaient être obtenues entre un scorage vidéo ou en direct (Miller and Leach, 2015).

L'étude des effets anxiogènes et pro-dépressifs de la M3G n'étant pas l'objectif principal de notre étude, et ne voulant pas augmenter le nombre d'animaux utilisés par soucis d'éthique, nous avons choisi de tester cet aspect sur les animaux traités avec la M3G et qui avaient préalablement participé aux études de la nociception (Von Frey et Immersion de la queue). Cela justifie le délai de 3h30 et 6h post-injection de M3G avant de réaliser les tests d'anxiété et de dépression.



Effets de la M3G sur un comportement associé à de l'anxiété

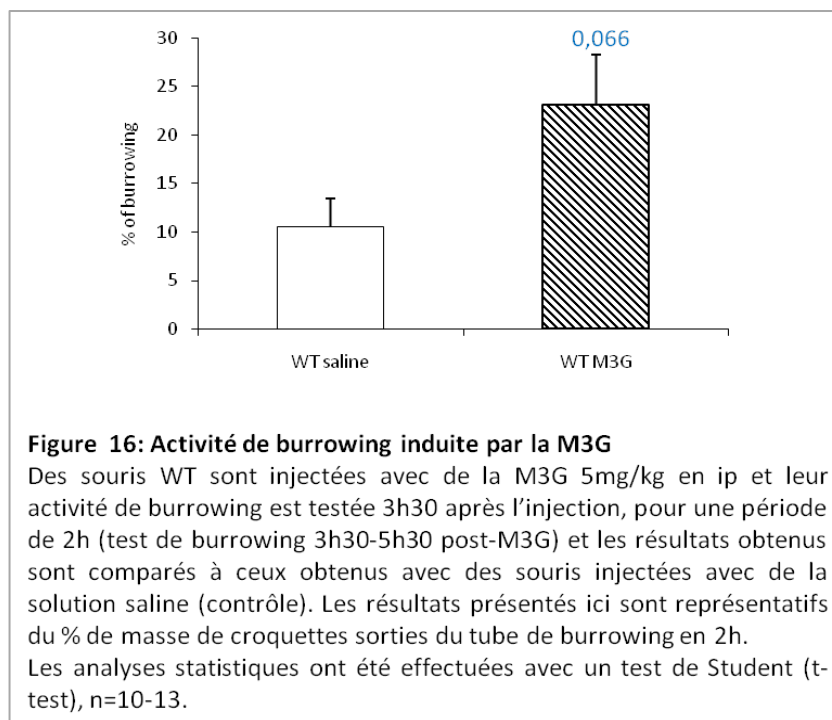
Afin d'étudier l'impact de la M3G sur l'anxiété, nous avons choisi d'utiliser un test mimant une activité naturelle des souris : celle de se construire un terrier. Bien que travaillant avec des animaux de laboratoire, le comportement de construction de terrier et de nid est conservé chez ces animaux, tout comme chez les autres rongeurs domestiqués (Deacon, 2009). Un terrier sert de protection contre un danger mais aussi de lieu de stockage de la nourriture. Dans ce test, un tube rempli de croquettes est placé dans la cage et les souris déplacent les croquettes de façon similaire à un déplacement de terre lorsqu'elles construisent un terrier. Cet aspect est important, car en effet, les souris expulsent les croquettes, sans prêter attention à la nature de ce qu'elles déplacent (Deacon, 2006). Les croquettes

n'ont ici aucun attrait alimentaire. Cela a été confirmé par l'obtention de résultats similaires avec des copeaux de litière ou encore du sable en remplacement des croquettes (Deacon, 2009).

Plusieurs études ont montré une diminution de cette activité chez des animaux pathologiques comme après une inflammation au niveau de la patte par injection de CFA (Andrews et al., 2011); une inflammation du colon (Jirkof et al., 2010) ou encore une ligature du nerf sciatique (Andrews et al., 2012, pour revue, voir Jirkof, 2014).

Les résultats de notre étude ([Figure 16](#)) montrent un effet de la M3G sur l'activité de burrowing. On observe une tendance à l'augmentation de cette activité ($p=0.06$, non significative) chez les animaux ayant reçu de la M3G par rapport aux animaux contrôles traités avec de la solution saline. Ces résultats ont été obtenus chez des animaux sauvages. L'étude a été menée chez des animaux KO Mu, mais l'effectif étant de $n=3$, nous ne pouvons pas conclure sur un éventuel effet du knockout (résultats non présentés). En effet, ce test impliquant une activité spontanée des animaux, la variabilité interindividuelle est grande.

Concernant l'effet de la M3G sur des animaux WT, 3h30 après administration, ces résultats semblent indiquer aucun effet anxiogène, voire même un potentiel effet anxiolytique.



Effets de la M3G sur un comportement associé à de la dépression

Afin d'étudier les effets de la M3G sur un comportement de type dépressif, nous avons utilisé le test de suspension par la queue. Nous avons suivi le protocole publié dans l'étude de Goeldner et collaborateurs (Ayranci et al., 2015; Goeldner et al., 2011). Ce protocole se déroule sur une période de 6 minutes. Les résultats présentés dans la [figure 17, en A,B et C](#) représentent les mêmes informations exprimées de façon différentes. Le [panneau A](#) montre le temps d'immobilité total sur 6 minutes, le [panneau B](#) le temps d'immobilité par tranche de 1 minute et le [panneau C](#) est une représentation du % de temps d'immobilité par minute par rapport au groupe contrôle (mêmes informations que B).

Ce test a pour but de mettre la souris dans une position inconfortable, de laquelle elle va chercher à s'enfuir. Cela se traduit par un faible temps d'immobilité. En condition pathologique et de dépression, les animaux sont résignés et restent statiques plus longtemps (Steru et al., 1985).

Dans nos conditions, nous observons un temps d'immobilité plus important des animaux ayant reçu de la M3G que des animaux contrôles sur la période totale du test ([figure 17A](#)).

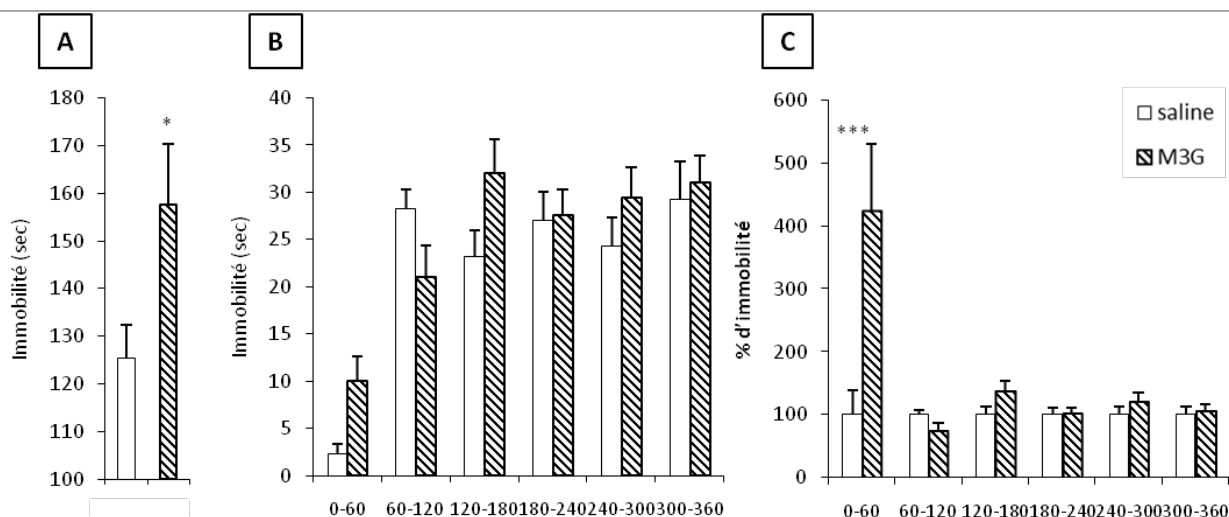


Figure 17: Temps d'immobilité induit par la M3G dans le test de suspension de la queue

Des souris WT sont injectées avec de la M3G 5mg/kg en ip et leur activité de résignation est testée 6h après l'injection avec le test de suspension par la queue et les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus avec des souris injectées avec de la solution saline (contrôle). Les résultats présentés sont représentatifs (A) du temps total d'immobilité en secondes sur la période du test (6 min), (B) du temps d'immobilité en secondes par tranche de 60 secondes, (C) et du pourcentage de temps d'immobilité par rapport au groupe contrôle par tranche de 60 secondes. Les graphiques B et C représentent les mêmes données exprimées de façon différentes.

Les statistiques sont décrites dans le tableau 1. * $p < 0,05$ par rapport au groupe contrôle saline. $n = 7/\text{saline}; 12/\text{M3G}$.

WT	Temps total d'immobilité (sec)
Traitement	F (1,17)=5.62 p=0.045

WT	Temps d'immobilité (sec), par tranche
Traitement	F (1,15)=0.35 p=0.55
Temps	F (5,75)=17.18 p<0.0001
Traitement x temps	F (5,75)=1.90 p=0.10

WT	% d'immobilité par rapport au groupe saline , par tranche
Traitement	F (1,15)=1.96 p=0.18
Temps	F (5,75)=3.57 p=0.005
Traitement x temps	F (5,75)=2.96 p=0.016

Tableau 2: Bilan statistique des résultats du test de suspension de la queue (Figure 17)

L'analyse statistique des résultats représentant le temps total d'immobilité (Figure 16 A) a été réalisée avec un t-test.

Les analyses statistiques des mesures par tranche de temps (temps d'immobilité et % d'immobilité, Figure 16 B et C respectivement) ont été réalisées avec un one-way ANOVA mesures répétées, suivies d'une analyse post-hoc de type Newman-keuls.

Cela met donc en avant un effet pro-dépressif de la M3G qui se traduit dans ce test par une plus grande résignation. Lorsque nous regardons le détail par minute (B et C), nous voyons que la période où la différence d'activité est la plus importante a lieu durant la première minute. En effet, durant cette première minute de test, le temps d'immobilité des souris ayant reçu de la M3G est 4 fois plus important que celui des souris contrôles. Cette première minute correspond à la période où l'activité est la plus importante chez tous les animaux car elle constitue la période d'habituation au test, aux propriétés aversives. Pendant la seconde minute, l'activité diminue significativement. C'est aussi la seule période où l'activité des souris M3G est plus grande que celle des souris contrôles. Cela peut être expliqué par le fait que les souris contrôles aient besoin de récupérer suite l'effort réalisé pendant la première minute (seulement 4 secondes d'immobilité pour 1 minute). Les souris M3G ayant été moins actives, sont moins fatiguées, expliquant ce différentiel d'activité entre les 2 groupes pendant la 2^{ème} minute. Ensuite, de la deuxième à la sixième minute, les temps d'immobilité sont comparables entre les deux groupes, voire légèrement plus faibles chez les souris ayant reçu de la M3G.

A nouveau, les résultats représentés ici sont ceux de souris sauvages. L'expérience a été réalisée avec des souris KO Mu, mais avec un effectif trop faible (n=3) pour conclure, comme précédemment avec le test de burrowing (résultats non présentés).

V. Discussion

A. Régulations des marqueurs de l'inflammation dans la moelle épinière suite un traitement répété à la morphine

Dans nos conditions, il n'y a aucune régulation du système opioïde observée au niveau de la moelle épinière après un traitement prolongé à la morphine chez les animaux WT et de façon plus générale, il y a peu de régulations des gènes du système immunitaire. Pourtant, au vu de certaines publications montrant une activation et /ou une implication du système immunitaire suite à un traitement chronique à la morphine (Ji et al., 2013; Johnson et al., 2014; Johnston et al., 2004; Mohan et al., 2010; Shavit et al., 2005), nous aurions pu nous attendre à de plus amples régulations.

Berta et collaborateurs qui montre que la morphine en aigu uprégule GFAP dans les DRG 2h après l'administration mais non dans la moelle épinière (Berta et al., 2012). Nous avons prélevé la moelle 18h après la dernière des 4 injections de morphine et obtenu une diminution de l'expression de GFAP chez les animaux WT et KO mu. Ce même groupe a également montré une uprégulation de la Matrix Metallopeptidase 9 ou MMP9 induite par la morphine, restreinte aux DRG et non présente dans la moelle (Liu et al., 2012).

De plus, une autre équipe a montré que la codéine augmente l'expression spinale de CD11b (Johnson et al., 2014). De façon très intéressante, Johnston et collaborateurs notent des régulations géniques pour IL-1, IL-6 et TNF α à 2h qui sont absentes à 24h post-morphine chronique (Johnston et al., 2004). Toutes ces différences de résultats peuvent s'expliquer par les divergences entre les protocoles, et montrent aussi que les régulations moléculaires induites par la morphine apparaissent non généralisées à l'ensemble du système nerveux et à tous les protocoles d'administration de morphine.

Dans notre étude, non seulement, les régulations sont peu nombreuses, mais en plus contraires à ce qui est décrit et en faveur d'un effet anti-inflammatoire par régulation négative de GFAP et cox-2 (Horvath et al., 2010; Raghavendra et al., 2002, 2003, 2004). Les différences d'expressions de gènes observées dans nos conditions peuvent être expliquées par nos conditions expérimentales. Tout d'abord, comme déjà abordé, nos animaux ont réalisé une batterie de tests comportementaux avant que leurs tissus soient collectés pour analyses moléculaires. Ensuite, nous avons utilisé un protocole de traitement morphinique à 60mg/kg ip pendant 5 jours alors qu'une multitude de protocoles différents sont décrits dans la littérature. Nous avons réalisé cette étude sur une cohorte de genre mixte (mâle et femelle). Bien que n'ayant pas vu d'effet du sexe dans ces conditions, peut-être que de fines régulations existent mais étant donné l'effectif par sexe (4 à 7), de telles régulations ne sont peut-être pas observables, mais suffisantes pour effacer un effet du traitement lors de notre analyse,

réalisée sans considérer le genre. Enfin, et surtout, nous avons réalisé ces qPCR au jour 6, 18 heures après la dernière injection de morphine. Ces mesures ne sont peut-être juste pas réalisées au moment le plus optimal d'un point de vue cinétique : peut-être qu'à ce moment précis nous sommes à une étape où l'inflammation a chuté, l'activation microgliale est passée, mais l'activation astrocytaire n'est pas encore effective.

De plus, l'absence de détection de régulations par qPCR ne veut pas dire qu'il n'y a pas tout de même une activation de ces facteurs, sans pour autant que leur transcription soit régulée. Afin de confirmer cette hypothèse, il faudrait réaliser des études de phosphorylation des marqueurs gliaux. Une augmentation de la phosphorylation de ces protéines reflèterait de façon plus précise une activation des cellules gliales et du système immunitaire que les mesures de taux de transcrits.

Chez les souris KO Mu nous observons aussi une diminution de l'expression des transcrits GFAP, et une tendance à la diminution des transcrits cox-2 après traitement prolongé avec de la morphine, comme observé chez les souris sauvages. Cela indique que ces régulations ne sont donc pas dépendantes du récepteur Mu.

B. Expression de gènes chez les souris KO Mu

Nos résultats ont montré une augmentation de l'expression des transcrits du récepteur Delta chez les souris où le gène Oprm1 est inactivé, associée à une augmentation de l'expression des transcrits pdyn. Ces résultats seraient à confirmer par des études protéiques (Western blot ou imagerie) et d'activité du récepteur delta (GTPγS35 ou binding) chez ces animaux.

Nous avons également observé une augmentation non significative de l'expression du gène codant pour GFAP chez les animaux KO Mu. Cela suggère une augmentation de l'activité astrocytaire chez les animaux KO Mu. Cette observation serait à confirmer en étudiant l'expression d'autres gènes astrocytaires. En effet, ici nous étudions aussi l'expression de s100b, mais il s'avère que c'est un marqueur astrocytaire non exclusif puisqu'il est également marqueur des oligodendrocytes (Schroeter et al., 2013).

De plus, tous ces résultats seraient à confirmer chez des animaux « Naïfs », c'est-à-dire n'ayant subi aucune batterie de tests comportementaux, ni-même un traitement répété avec injections de solution saline. Ensemble ces éléments stressants ont pu modifier l'expression de ces gènes de façons plus significatives chez les animaux KO que chez les WT menant à l'obtention de telles régulations.

Concernant les régulations du système opioïde, nous avons eu des résultats intéressants suite au traitement morphinique chez les KO Mu (Figure 14 panneau C). Il s'avère que le traitement morphinique induit une diminution de l'expression des transcrits Delta et pdyn (panneau C hachures

oranges vs grises), soit une réponse opposée à ce que l'on obtient chez des KO non traités par rapport aux contrôles WT (histogrammes gris vs blancs) (Figure 14 panneau A). Cette similarité n'est peut-être pas une coïncidence. En effet, c'est peut-être le reflet d'un problème lors de la qPCR ou dans la vie des individus KO du groupe saline impactant l'expression de ces gènes. Si c'est le cas, la diminution d'expression des transcrits Delta et pdyn chez les KO Mu morphine par rapport aux KO Mu saline est peut-être le reflet de ce problème et non d'une régulation induite par le traitement.

Ces résultats ont été obtenus à l'issue d'une seule expérience. A nouveau, il est nécessaire de réitérer cette expérience en minimisant au maximum les facteurs qui pourraient influencer des régulations de gènes, comme les tests comportementaux, pour conclure sur les questions posées.

C. La M3G et l'anxiété

A priori, les résultats obtenus dans notre étude avec le burrowing, ne suggèrent pas d'effet significatif de la M3G sur le bien-être, voir même un effet positif. Seulement, dans la littérature, les animaux ont à disposition dans leur cage un endroit supplémentaire pour s'abriter, comme une petite maison ou encore de quoi se faire un nid (Deacon, 2006). Dans nos conditions, elles ont également de quoi se faire un nid, mais celui-ci n'est pas fait, le matériel est mis à disposition (carré de coton) mais ce sont aux souris de construire ce nid. Au moment où les animaux sont placés dans la cage, deux stratégies se présentent à eux pour s'abriter. Ils pourront soit vider le tube rempli de croquettes, soit construire un nid à partir de carrés de coton encore entiers. Peut-être que la stratégie la plus rapide dans ce cas, dans l'esprit d'une souris, est de vider ce tube pour se loger au fond. Dans ce cas, une augmentation de l'activité de burrowing devrait alors être associée à un état d'anxiété plutôt qu'à une augmentation du bien-être. De plus, les souris en situation de stress ont tendance à creuser de façon intense dans la litière (digging) afin de trouver un moyen de se cacher (Deacon, 2009). Finalement, le fait de vider un tube rempli de croquettes est un comportement assez proche du digging.

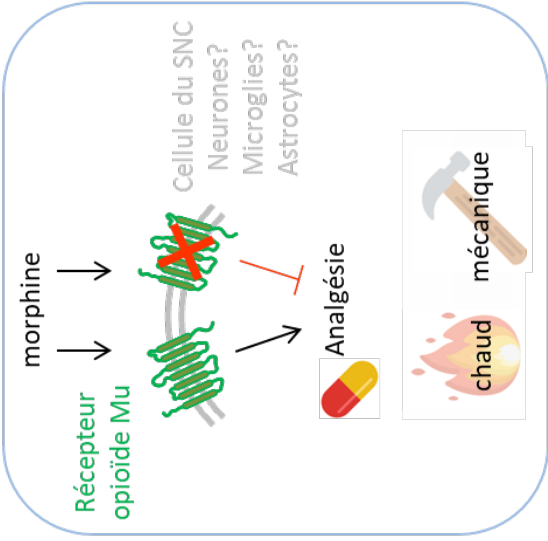
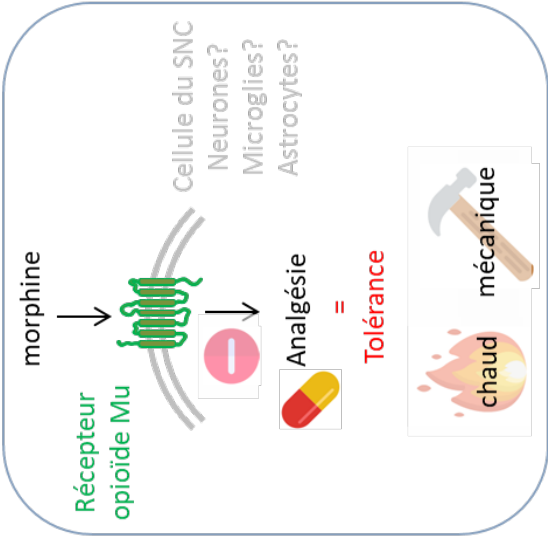
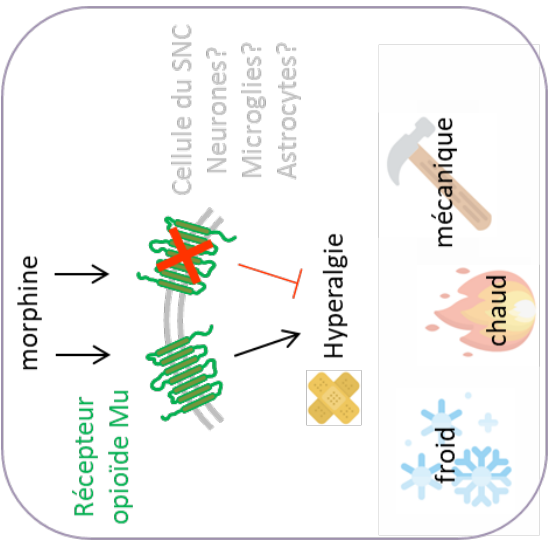
Malheureusement, cette expérience, dans nos conditions, n'est pas concluante et il faudrait la réaliser à nouveau, mais cette fois-ci avec un nid ou un ilot qui pourrait constituer un abri dans la cage expérimentale. La mesure de l'activité de burrowing overnight comme suggéré dans le protocole de Deacon pourrait également donner des informations complémentaires.

D. La M3G et la dépression

L'étude de suspension par la queue, réalisée 5h30 après administration de M3G montre un temps d'immobilité plus important chez les individus traités par rapport aux animaux contrôles. Cela met en évidence un effet pro-dépressif de la M3G, qui se traduit ici par une plus grande résignation face à une

situation aversive. Ces résultats obtenus après un tel délai peuvent paraître surprenant, car tardifs après l'injection. Une autre supposition, plutôt que le développement de symptômes tardifs, serait une persistance de cet effet dépressogène. A ma connaissance, aucune étude n'a exploré les effets de la M3G sur le bien-être. Zhang et collaborateurs propose un éventuel effet anxiogène de la M3G dans leur discussion, bien qu'ils ne l'aient pas testé (Zhang and Schulteis, 2008). Par contre, plusieurs études relatent un effet excitateur de la M3G, comme des secouements de type ébrouements, appelés « wet dog shakes » habituellement observés en situation de sevrage physique à une drogue et donc associé à une situation aversive. La M3G est aussi la cause d'hypersensibilités comme décrit dans Roeckel et al., 2017, ce qui est également une réponse à associer à une aversion. De plus, certains des effets excitateurs de la morphine sont montrés comme étant atténués par un traitement anxiolytique de type midazolam (Bartlett et al., 1994), ce qui renforce l'idée que la M3G puisse être anxiogène. De façon générale, ces études portant sur le bien-être suite à une injection de M3G mériteraient d'être reproduites afin de confirmer ou non de tels résultats. Elles pourraient être complétées par une étude du rôle du récepteur Mu dans ces phénomènes (utilisation du KO Mu), mais aussi par une étude du rôle de TLR4. Enfin, tous ces résultats pourraient être comparés à ceux obtenus dans des expériences de bien être menées de façon similaire chez des animaux traitées de façon chronique avec de la morphine. Cela permettrait d'éclaircir le rôle de ce métabolite morphinique, la M3G, dans les effets indésirables de la morphine chronique.

SCHEMA BILAN



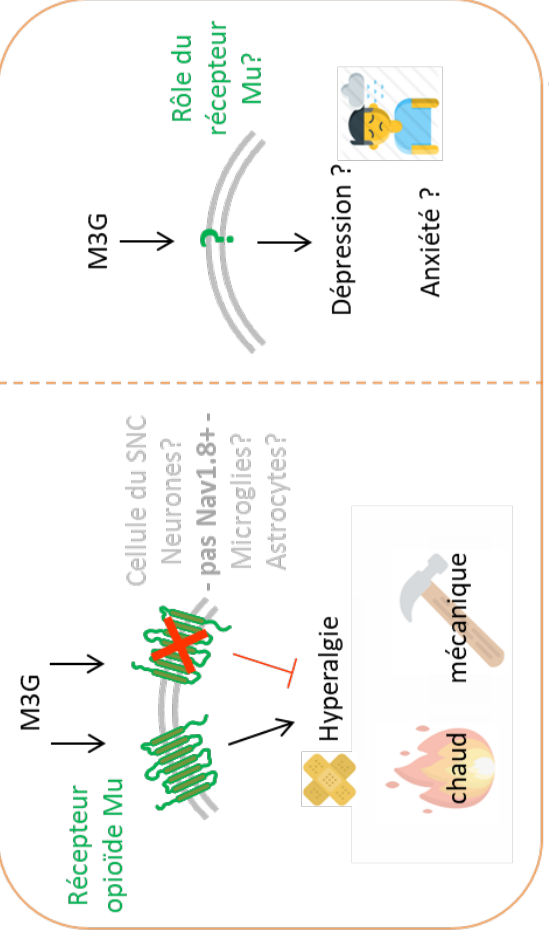
Nociception chronique

Nociception aigue: plusieurs injections

1^{er} jour

Nociception aigue:

WT	KO Mu
+++ cerveau	+ plasma
+++ moelle épinière	+++ moelle épinière
M3G: activation-binding Mu	M3G: binding Mu
+	0
Hyperalgie +++	Hyperalgie 0
Anxiété?	Anxiété?
Dépression?	Dépression?



1^{er} jour (nociception et bien-être)

Effets aigus:

Schéma bilan: Rôles du récepteur opioïde Mu dans les effets hypersensibilisants de la morphine et de son métabolite, la morphine-3-b-glucuronide (M3G)

Projet II:

**Rôles du récepteur opioïde Mu, de l'activation microgliale et
du récepteur Mu microglial dans la nociception**

Projet II: Rôles du récepteur opioïde Mu, de l'activation microgliale et du récepteur Mu microglial dans la nociception

I. Préambule

Les traitements chroniques à la morphine sont désormais décrits comme induisant une production de médiateurs de l'inflammation. La microglie représente un acteur principal de la neuroinflammation. Les travaux préliminaires décrits dans ce projet 2 tentent d'illustrer l'implication microgliale à la fois dans la douleur chronique, mais également dans l'hyperalgie morphinique. Cette annexe est constituée d'une première partie étudiant le rôle du récepteur Mu et des microglies dans l'hyperalgie chez un modèle de douleur neuropathique. L'implication microgliale dans ces phénomènes est étudiée par une approche pharmacologique, combinée à une approche génétique grâce au modèle murin déficient pour le récepteur Mu (KO Mu). Dans un deuxième temps, nous avons développé une approche pour préciser le rôle des récepteurs opioïdes Mu dans la microglie, en générant un modèle de souris knockout conditionnel pour le récepteur Mu dans les microglies (cKO Mu). Cette étude est réalisée dans le cadre d'un consortium européen, GLORIA (**G**lial **o**pioid **r**eceptor **i**nterface in **a**nalgesia), visant à mieux comprendre le rôle des récepteurs opioïdes sur les cellules gliales et à développer de nouvelles drogues induisant moins d'effets indésirables que les opiacés actuellement utilisés en clinique. Les travaux de cette étude sur les cKO sont en cours et les résultats présentés ici sont ceux obtenus jusqu'à avril 2016, date de mon changement de laboratoire. Ces résultats ont été obtenus grâce à un travail collaboratif réalisé avec David Reiss (Ingénieur d'étude) et Hervé Maurin (post-doctorant de l'équipe à cette époque).

II. Matériels et méthodes

Ethique et conditions d'hébergement des animaux

Les expériences sont menées en accord avec la directive européenne du 22 septembre 2010, transcrite en droit français le 1er février 2013. Dans le domaine de la douleur, l'expérimentateur se doit de suivre une ligne de conduite dictée par le comité de recherche et d'éthique de l'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur (IASP) qui vise à minimiser la douleur de l'animal. Les protocoles ont été approuvés par le comité local d'éthique (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale IGBMC-ICS Com'Et N°17) avec le numéro d'agrément 00876-02. Les souris sont hébergées en cage de 2 à 5 animaux dans un environnement calme, à température ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) et humidité ($55 \pm 10\%$) contrôlées, avec des cycles de lumière (100 lux) /obscurité de 12 heures, et disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Les groupes d'expérimentation comprennent des animaux âgés de 10 à 18 semaines, mâles et femelles, et sont constitués de 8 à 10 souris.

Modèles murins

Les souris utilisées ici sont toutes de fond génétique mixte : 50% C57Bl6j ; 50% 129svPas.

L'étude sur la neuropathie et l'étude du rôle des microglies par une approche pharmacologique utilise des souris Knockout conventionnel ou global pour le récepteur Mu (KO Mu). Ces souris n'exprimant plus le récepteur ont été générées par recombinaison homologue (Matthes et al., 1996). Les réponses comportementales de ces animaux sont comparées à celles de leurs congénères sauvages WT ([Figure 18 A](#)).

L'étude sur le rôle du récepteur Mu dans les microglies est réalisée grâce à des souris cKO pour le récepteur Mu dans la microglie. Ces souris sont obtenues par croisement de souris dont les exons 2 et 3 du gène codant pour le récepteur Mu (*Oprm1*) est floxé (Weibel et al., 2013) avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur codant pour le marqueur microglial Cx3Cr1 (Goldmann et al., 2013). Un tel croisement permet l'obtention de souris où les exons 2 et 3 du gène *Oprm1* est excisé dans les microglies et donc de souris dont le gène codant pour Mu est inactivé dans les cellules microgliales (cKO Mu) ([Figure 18 B](#)).

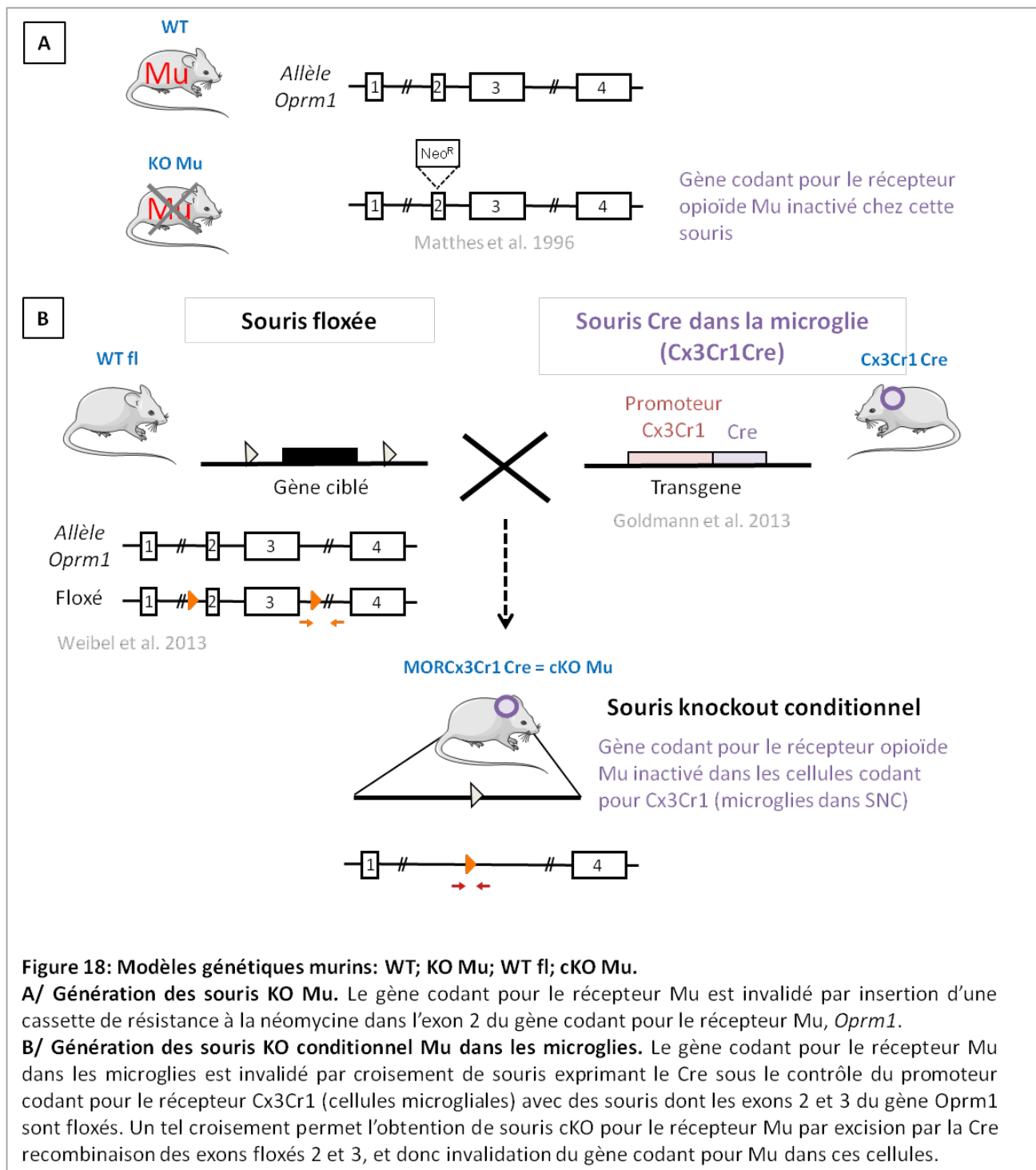


Figure 18: Modèles génétiques murins: WT; KO Mu; WT fl; cKO Mu.

A/ Génération des souris KO Mu. Le gène codant pour le récepteur Mu est invalidé par insertion d'une cassette de résistance à la néomycine dans l'exon 2 du gène codant pour le récepteur Mu, *Oprm1*.

B/ Génération des souris KO conditionnel Mu dans les microglies. Le gène codant pour le récepteur Mu dans les microglies est invalidé par croisement de souris exprimant le Cre sous le contrôle du promoteur codant pour le récepteur Cx3Cr1 (cellules microgliales) avec des souris dont les exons 2 et 3 du gène *Oprm1* sont floxés. Un tel croisement permet l'obtention de souris cKO pour le récepteur Mu par excision par la Cre recombinaison des exons floxés 2 et 3, et donc invalidation du gène codant pour Mu dans ces cellules.

Traitements pharmacologiques

La morphine (chlorhydrate, Francopia) est dissoute dans une solution saline (NaCl 0,9%, Cooper) et injectée par voie intra-péritonéale (ip) dans un volume de 100 µl par 10 grammes de masse corporelle.

Le traitement chronique est réalisé par injections quotidiennes de morphine 20 mg/kg.

La minocycline (hydrochloride, M9511, Sigma) est donnée dans l'eau de boisson des souris, ad libitum.

La minocycline est dissoute à 0,3 mg/ml dans de l'eau filtrée. La consommation moyenne journalière

d'eau d'une souris étant de 6 ml, on estime que les souris reçoivent une dose de 60 mg/kg/jour pour une masse corporelle moyenne de 30 g.

Le lipopolysaccharide (LPS, L3125, Sigma Aldrich) est, comme la morphine précédemment, dissout dans une solution saline (NaCl 0,9%, Cooper) et injectée par voie intra-péritonéale (ip) dans un volume de 100 µl par 10 grammes de masse corporelle, à une dose de 1mg/kg, une fois (j1).

Modèle neuropathique

La douleur neuropathique est induite par une ligature partielle du nerf sciatique (pSNL) (Seltzer et al., 1990). Les souris sont anesthésiées par i.p. de kétamine 10 % / xylazine 5 % diluées dans de la solution saline, au dosage de 10 ml/kg. Afin de limiter la sécheresse oculaire, de l'Ocrygel® (TVM, Thérapeutique Vétérinaire Moderne) est appliqué sur les yeux. La surface de la patte gauche est rasée, puis incisée afin d'atteindre le nerf sciatique. Celui-ci est isolé et ligaturé à hauteur de 30 à 40 % de son diamètre total, à l'aide d'un fil de soie (C6-70B2, 7-0, Nastume Seisakusho). La plaie est désinfectée avec de la Dermidine® (MP Labo), puis suturée avec du fil non résorbable en propylène (F2805, 5-0, Ethicon). Les souris sont placées sur une plaque chauffante (Kunts Instruments) à 38°C jusqu'au réveil.

Comportement

Les expériences sont effectuées en aveugle, on ne connaît ni le génotype des animaux ni le traitement administré au moment de la réalisation des tests.

Habitude

Le stress est un facteur qui régule le système opioïde et des séances d'habitude sont nécessaires pour minimiser ce facteur stress. L'habitude à l'environnement (pièce, matériels, luminosité) et à l'expérimentateur se fait sur 3 jours, pendant lesquels les animaux sont sortis de leur cage et manipulés tous les jours.

L'habitude à la plaque froide, se fait par isolement des souris dans des boîtes en plexiglas transparent (9 x 9 x 7 cm; fabrication IGBMC) sur la plaque (Bioseb) à température ambiante, pendant 10 min. Cela permet l'habitude de l'animal au cloisonnement ainsi qu'au contact de la plaque.

L'habitude au test d'immersion de la queue nécessite un apprentissage de la souris à entrer dans un tube de contention. La queue de la souris est ensuite immergée à 50% dans un bain-marie à température ambiante afin d'acclimater la souris au contact de l'eau.

L'habitude aux tests plantaires (Hargreaves ; Von Frey) se fait avant chaque mesure. Elle consiste à isoler les souris dans les boîtes en plexiglas décrites pour la plaque froide, sur une plaque en verre, pendant 2h pour le test de Hargreaves, et sur une grille métallique, pendant 10 min pour le test de Von Frey.

Tests des sensibilités thermiques

- **Sensibilité au froid**

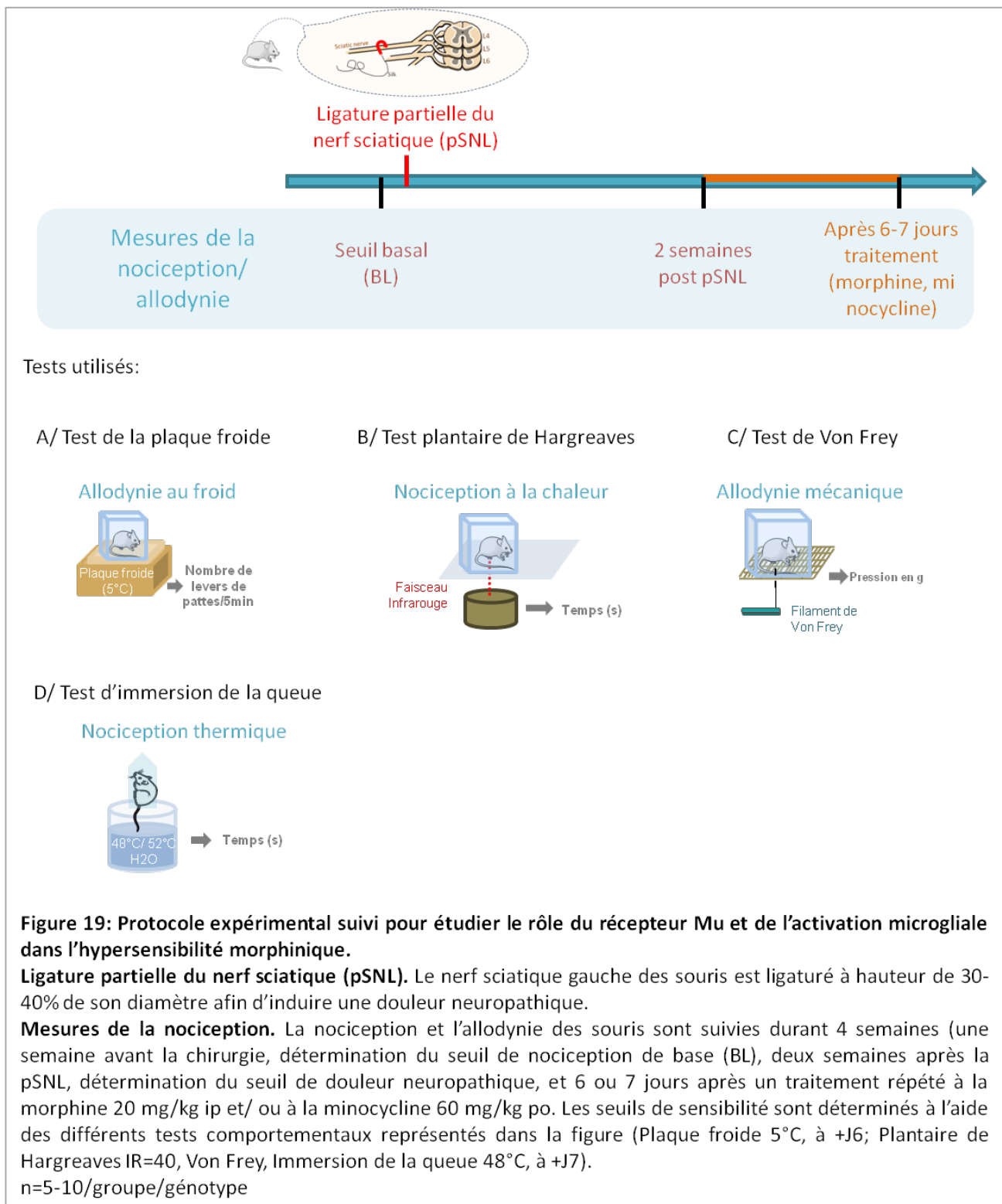
Test de la plaque froide (Figures 19A et 20)

Ce test est réalisé en isolant l'animal pendant 5 min. dans une boîte en plexiglas transparent, sur une plaque froide à 5°C (Bioseb). Chaque réponse au froid de l'animal (léchage, secouement ou retrait d'une patte) est notée, et ces valeurs sont additionnées et scorées pour chaque patte sur la période de 5 min. A chaque expérience, le score est mesuré une fois.

- **Sensibilité au chaud**

Test plantaire de Hargreaves (Figures 19B et 21)

Pour ce test, les souris sont isolées dans les boîtes en plexiglas transparent, et l'intensité lumineuse de la pièce est baissée à 40 lux. Après 2h d'habituation, le test est réalisé en appliquant un faisceau infrarouge (IR=40, Bioseb), sous la plante de chaque patte arrière de la souris. Dès que la souris retire sa patte, le faisceau est interrompu et le temps de latence (en sec.) est scoré automatiquement. Le « cut-off » est fixé à 20 sec afin de ne pas endommager les tissus. A chaque expérience, les latences sont mesurées 3 fois.



Test d'immersion de la queue (Figures 19D et 23)

La souris est maintenue immobile dans un cylindre de 3 cm de diamètre et 11 cm de long (type tube Falcon 50 ml), de façon à ce que seule la queue de l'animal soit mobile. La queue est alors immergée dans un bain d'eau à 48°C. Le temps de latence avant le retrait de la queue est mesuré en secondes. La durée maximale d'immersion de la queue (cut-off) est fixée à 20 sec afin de ne pas léser les tissus. A chaque expérience, les latences sont mesurées 3 fois.

- **Sensibilité mécanique**

Test de Von Frey (Figures 19C et 22)

La souris est placée sur une grille métallique et isolée dans une boîte en plexiglas (décrite plus haut). Le test consiste en l'application de filaments de Von Frey en nylon (Bioseb) de différentes épaisseurs, correspondant à différentes pressions (0,008-2,75 g), sur la plante des pattes arrières de l'animal. La méthode suivie lors de nos expériences est celle du « Up and Down ». Le premier filament appliqué sous la patte est celui de 0,4 g, si la souris montre une réaction nociceptive (lever de patte ou léchage), le filament de pression inférieure est appliqué. Au contraire, si la souris ne réagit pas à cette pression, le filament de valeur supérieure est testé. Le test se finit lorsque 4 valeurs sont testées après la première réaction de la souris. Le seuil de sensibilité mécanique est calculé à l'aide d'un programme Excel. A chaque expérience, le seuil de sensibilité est mesuré une fois.

Tous les tests comportementaux sont réalisés à la fois sur la patte opérée (ipsilatérale), et non opérée (contralatérale).

Induction de l'activation microgliale

Avec l'idée de stimuler l'activité microgliale et donc d'augmenter l'activité du promoteur Cx3cr1 et en conséquence l'expression de la Cre recombinase, un traitement avec du lipopolysaccharide (LPS) ip à 1mg/kg a été administré aux souris destinées aux études d'expression de gènes par qRT-PCR (Figures 24 et 25). L'injection de LPS induit une réponse immunitaire massive. En pratique, les souris sont injectées avec du LPS 1mg/kg ip au jour 1 et sont sacrifiées et disséquées au jour 7 (soit 6 jours après l'injection de LPS) (inspiré du protocole d'induction de (Goldmann et al., 2013)).

Notre intention est de détecter le knockout conditionnel du récepteur Mu dans les microglies, cette population n'étant pas majoritaire, il faut « booster » le système et l'activation microgliale pour observer cette délétion sur tissu non purifié (i.e. cerveau total versus purification de microglies). Cette activation nécessite un certain temps qui justifie cette latence de 6 jours après l'injection avant de disséquer les tissus.

Dissection

Les animaux sont sacrifiés par asphyxie au dioxyde de carbone. La moelle épinière (SC), les ganglions rachidiens dorsaux (DRG), les bulbes olfactifs (OB), l'hippocampe (Hip), le cortex frontal (FCx), le caudé putamen (CPu), le noyau accumbens (NAc) et le tronc cérébral (BS) sont isolés et conservés à -80°C jusqu'à extraction de l'ARN total.

Extraction de l'ARN total

Les tissus sont homogénéisés dans 800 µl de Trizol (TR 118, Molecular Research Center) grâce à un Polytron (Pt1-600E ; Bioblock Scientific). On ajoute 160 µl de chloroforme avant agitation et centrifugation 10 min à 13 000 g (4°C). La phase aqueuse est extraite et l'ARN est précipité par ajout de 400 µl d'isopropanol. Les tubes sont ensuite placés à -20°C pendant une nuit, avant d'être centrifugés 15 min à 13 000 g (4°C). Le culot d'ARN formé est lavé avec 1 ml d'éthanol (75%), centrifugé 15 min à 13 000 g (4°C) et séché. L'ARN extrait est alors dissout dans 30 µl d'eau RNase-free. La concentration en ARN de chaque échantillon est mesurée par spectrophotométrie, en déterminant la densité optique à 260 nm (spectrophotomètre Nanodrop® ND-1000, Thermo Scientific).

Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)

La rétro-transcription est faite selon les indications du fabricant (Invitrogen). Pour cela, 1 µg d'ARN total est incubé avec 1 µl de transcriptase inverse (200U/µl, Invitrogen), 1 µg d'oligodT à 1µg/µl, 1 µl de déoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) à 10 mM, 2µl de dithiothréitol (DTT) à 1M, et 4 µl tampon Super Script Reaction Mix 5x, dans un volume final de 20 µl. Les solutions sont incubées selon la séquence suivante : 5 minutes à 65°C, 50 minutes à 42°C, 15 minutes à 70°C. Les ADNc sont conservés à -20°C.

PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)

Les ADNc (0,25 µl) sont mis en présence de 0.2 µM d'amorces spécifiques des gènes étudiés ([Tableau 3](#)), de 6.25 µl de Supermix (iQ mix, SYBR Green, Biorad) dans un volume final de 12.5 µl. Après une première dénaturation de 3 minutes à 95°C, les ADNc sont soumis à 40 cycles d'amplification (dénaturation à 95°C 15 secondes, hybridation 60 °C 15 secondes, élongation 72°C 30 secondes). Le Light Cycler 480 (Roche) mesure la fluorescence en temps réel et permet d'obtenir des courbes d'amplification des produits PCR. Chaque qRT-PCR est réalisée en triplicat. La méthode des $\Delta\Delta C_t$: différence (CT gène d'intérêt – CT gène de référence) des souris testées - (CT gène d'intérêt – CT gène de référence) des souris naïves est utilisée pour calculer les variations d'expression des gènes étudiés (Weibel et al., 2013).

Tableau 3: Amorces oligonucléotides utilisées pour la qRT-PCR

Gènes	Nom du gène	Séquence (5'-3') des amorces	
		Sens	Antisens
Gène référence	Hprt	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	TGACACTGGTAAAACAATGCA
Récepteur opioïde Mu	Oprm1	GAGCCACAGCCTGTGCCCT	CGTGCTAGTGGCTAAGGCATC
Cellule microgliale	Cx3Cr1	AAGTTCCTTCCCATCTGCT	GGACAGGAAGATGGTTCCAA

Statistiques et représentations des résultats

Les résultats sont exprimés sous forme d'histogrammes représentant les moyennes de chaque groupe et la variabilité est exprimée sous forme de SEM (barres d'erreurs).

Les analyses statistiques sont des 2way ANOVA mesures répétées de la variance, réalisées avec le logiciel Statistica 12 (Statsoft, Tulsa OK, USA). Ces ANOVA sont complétées d'une analyse post-hoc de type Newman-Keuls. Les résultats des analyses statistiques des tests comportementaux sont présentés dans les [Tableaux 4; 5 ; 6; 7](#).

III. Résultats

A. Hypersensibilité neuropathique induite par la pSNL

Deux semaines après la pSNL, la plaie induite par la chirurgie est cicatrisée chez tous les animaux. Les animaux ont une bonne mobilité de la patte opérée. Nous n'avons pas observé non plus de perte de poids significative chez les souris, qui aurait pu être un signe de mal-être induit par la chirurgie. Il n'y a plus de rougeur visible, signe de la résorption de l'inflammation locale induite par les lésions tissulaires générées par la chirurgie afin d'atteindre le nerf. Cette inflammation est décrite dans la littérature comme subsistant quelques jours (environ une semaine) après ce type de chirurgie. De ce fait, une hypersensibilité mesurée deux semaines après la pSNL serait d'origine neuropathique et non inflammatoire.

L'hypersensibilité à deux semaines est mesurée grâce à des tests de nociception/allodynie plantaire comme le test de la plaque froide, le test plantaire de Hargreaves et le test de Von Frey. Nous avons aussi cherché à explorer une éventuelle sensibilisation généralisée de l'animal induite par la pSNL en testant la nociception au niveau de la queue grâce au test d'immersion de la queue. Cette généralisation de la sensibilisation est également explorée en mesurant les seuils nociceptifs au niveau de la patte contralatérale, non opérée (détails dans la [Figure 19](#)).

Les souris WT présentent, deux semaines après la pSNL, au niveau de la patte lésée (ipsilatéral), une hypersensibilité au froid ([Figure 20; tableau 4](#)), au chaud ([Figure 21; tableau 5](#)), et mécanique ([Figure 22; tableau 6](#)), qui se traduit respectivement par une augmentation du nombre de levers de pattes au contact de la plaque froide (5°C/5min), une diminution de la latence (en secondes) avant retrait de la patte suite à une exposition à un rayon chauffant, et une diminution de la pression (en grammes) nécessaire à appliquer sous la surface de la patte pour entraîner un retrait de la patte (résultats également publié dans Roeckel et al., 2017; figure 4).

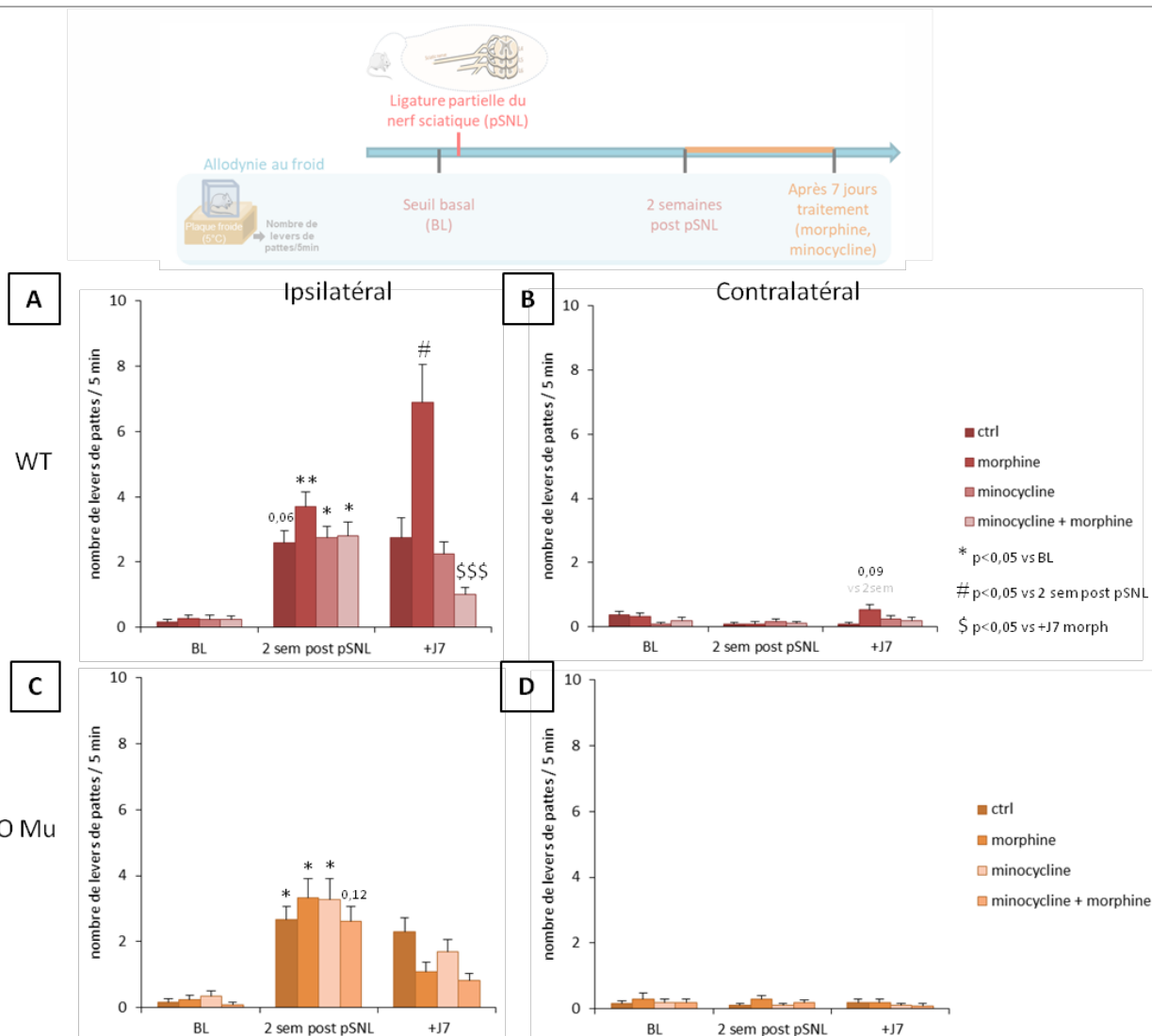


Figure 20: Sensibilité au froid au niveau de la patte après neuropathie chez les souris KO Mu et effets de traitements répétés à la morphine et à la minocycline.

Deux semaines après la chirurgie (2 sem post pSNL), la sensibilité des animaux au niveau de leur patte lésée (pSNL; ipsilatéral; panneaux A et C), ainsi que la sensibilité de leur patte non lésée (contralatéral; panneaux B et D) est déterminée et comparée à leur sensibilité respective avant la chirurgie (BL).

Dès que l'hypersensibilité neuropathique est installée (2 semaines), les animaux sont traités avec de la morphine et de la minocycline. Un groupe reçoit de la morphine 20mg/kg ip afin d'étudier le développement d'hyperalgie morphinique en conditions neuropathiques. Un second groupe reçoit de la minocycline dans l'eau de boisson à une dose proche de 60mg/kg afin d'étudier si la minocycline peut atténuer l'hypersensibilité neuropathique. Un troisième groupe reçoit un cotraitement à base de morphine 20mg/kg ip et de minocycline 60mg/kg po afin d'étudier le rôle de la microglie dans l'hyperalgie morphinique. Enfin un dernier groupe contrôle (ctrl) reçoit des injections de solution saline ip et de l'eau de boisson. Les panneaux A et B correspondent aux résultats obtenus chez les animaux WT et les panneaux C et D à ceux obtenus chez les KO Mu.

Seuls les $p < 0,20$ sont représentés ; $n = 8-10$ /groupe de traitement/ génotype

Tableau 4: Bilan statistique des résultats de plaque froide : One way ANOVA mesures répétées, analyse post-hoc Newman-keuls.

WT	Ipsilatéral (A)
Traitement	F (3,39)=7.90 p<0.0001
Temps	F (2,78)=32.95 p<0.0001
Traitement x temps	F (6,78)=4.61 p<0.0001

WT	Contralatéral (B)
Traitement	F (3,41)=0.90 p=0,44
Temps	F (2,82)=2.45 p=0,09
Traitement x temps	F (6,82)=1.76 p=0,11

KO Mu	Ipsilatéral (C)
Traitement	F (3,37)=0.94 p=0.42
Temps	F (2,74)=22.12 p<0.0001
Traitement x temps	F (6,74)=0.88 p=0.50

KO Mu	Contralatéral (D)
Traitement	F (3,37)=0.97 p=0.41
Temps	F (2,74)=0.17 p=0.83
Traitement x temps	F (6,74)=0.13 p=0.99

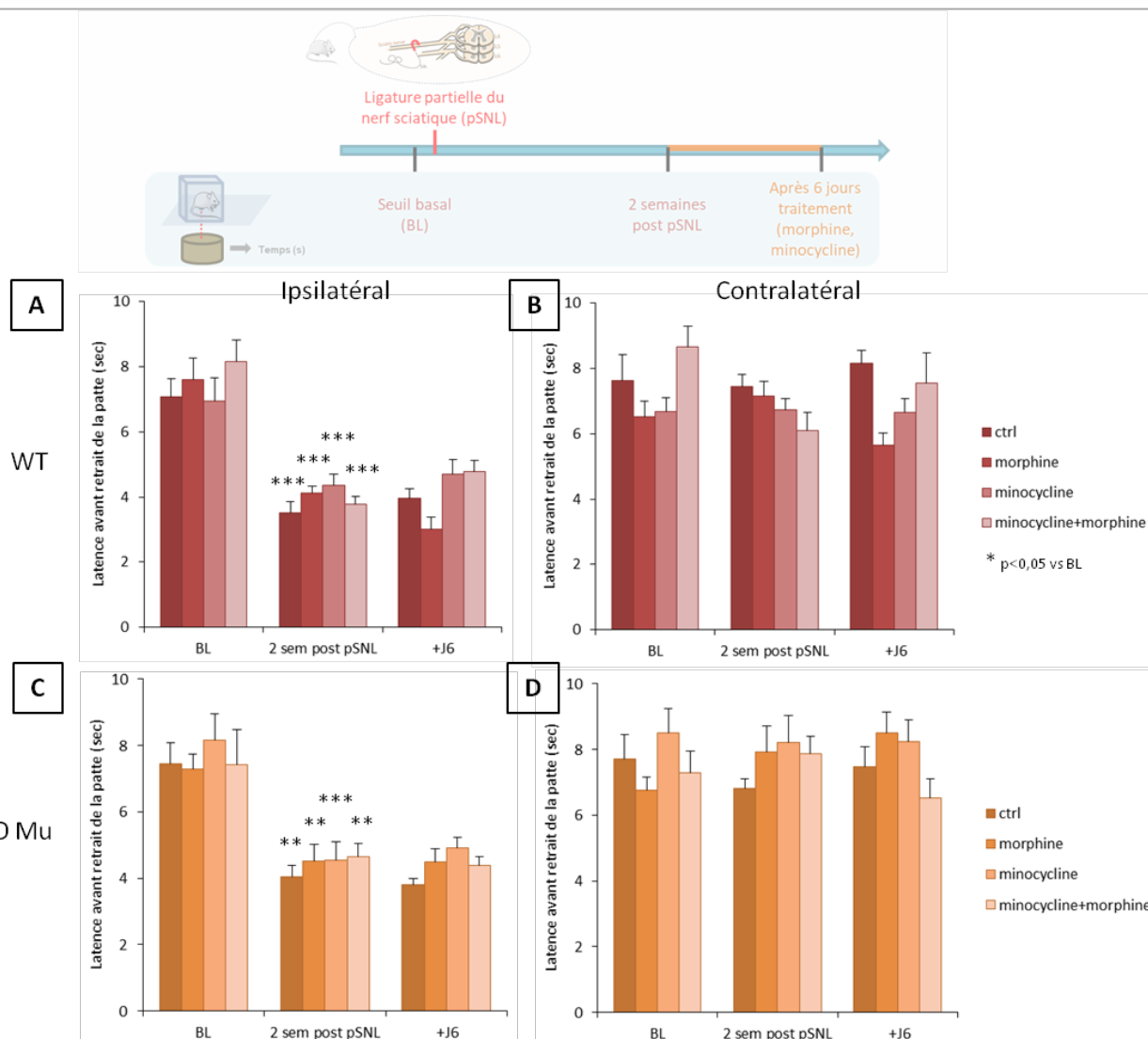


Figure 21: Sensibilité au chaud au niveau de la patte après neuropathie chez les souris KO Mu et effets de traitements répétés à la morphine et à la minocycline.

Seuls les $p < 0,20$ sont représentés ; $n = 8-10$ /groupe de traitement/ génotype

Tableau 5: Bilan statistique des résultats du test plantaire de Hargreaves : One way ANOVA mesures répétées, analyse post-hoc Newman-Keuls.

WT	Ipsilatéral (A)
Traitement	F (3,37)=0.64 p=0.59
Temps	F (2,74)=61.28 p<0.0001
Traitement x temps	F (6,74)=3.54 p=0.19

WT	Contralatéral (B)
Traitement	F (3,36)=1.20 p=0,32
Temps	F (2,72)=0.29 p=0.74
Traitement x temps	F (6,72)=2.10 p=0,06

KO Mu	Ipsilatéral (C)
Traitement	F (3,37)=0.48 p=0,69
Temps	F (2,74)=43.03 p<0.0001
Traitement x temps	F (6,74)=0.16 p=0,98

KO Mu	Contralatéral (D)
Traitement	F (3,37)=0.83 p=0.48
Temps	F (2,74)=0.02 p=0.87
Traitement x temps	F (6,74)=0.75 p=0.60

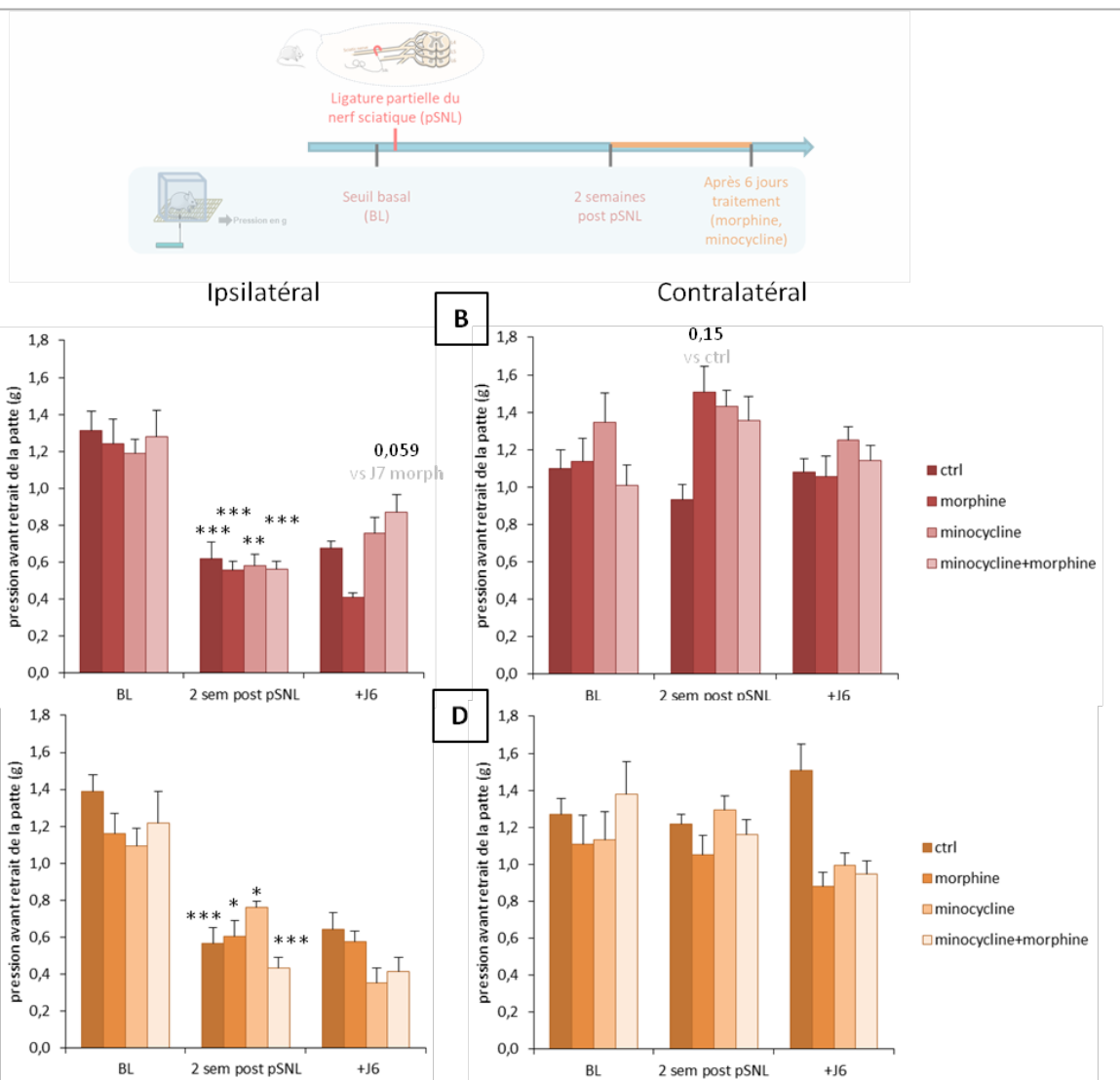


Figure 22: Sensibilité mécanique au niveau de la patte après neuropathie chez les souris KO Mu et effets de traitements répétés à la morphine et à la minocycline.

Seuls les $p < 0,20$ sont représentés ; $n = 8-10$ /groupe de traitement/ génotype

Tableau 6: Bilan statistique des résultats du test plantaire de Von Frey : One way ANOVA mesures répétées, analyse post-hoc Newman-Keuls.

WT	Ipsilatéral (A)
Traitement	F (3,38)=1.33 p=0.27
Temps	F (2,76)=47.15 p<0.0001
Traitement x temps	F (6,76)=1.15 p=0.33

WT	Contralatéral (B)
Traitement	F (3,36)=2.35 p=0,08
Temps	F (2,72)=2.29 p=0.10
Traitement x temps	F (6,72)=1.12 p=0,35

KO Mu	Ipsilatéral (C)
Traitement	F (3,34)=1.47 p=0,23
Temps	F (2,68)=43.69 p<0.0001
Traitement x temps	F (6,74)=1.26 p=0,28

KO Mu	Contralatéral (D)
Traitement	F (3,33)=1.63 p=0.20
Temps	F (2,66)=2.13 p=0.12
Traitement x temps	F (6,66)= 1.06 p=0.39

Par contre, en contralatéral, aucune hypersensibilité au froid, au chaud ou mécanique n'est détectée –Figures 20, 21,22, panneaux B, non publiés-. Nos conditions ne permettent donc pas de mesurer une sensibilisation généralisée de la neuropathie au niveau contralatéral. Cette non-généralisation de la sensibilisation est confirmée par l'absence d'hypersensibilité mesurée au niveau de la queue avec le test d'immersion de la queue (Figure 23; tableau 6), à 48°C (panneau A). A 52°C, les résultats sont différents, et montrent soit une tendance, soit une diminution significative du temps de latence avant retrait de la queue 2 semaines post-pSNL (panneau B). Cela traduit une hypersensibilité des animaux, suggérant une éventuelle sensibilisation généralisée induite par la neuropathie au niveau de la patte (Figure 23; tableau 6 ; panneau A).

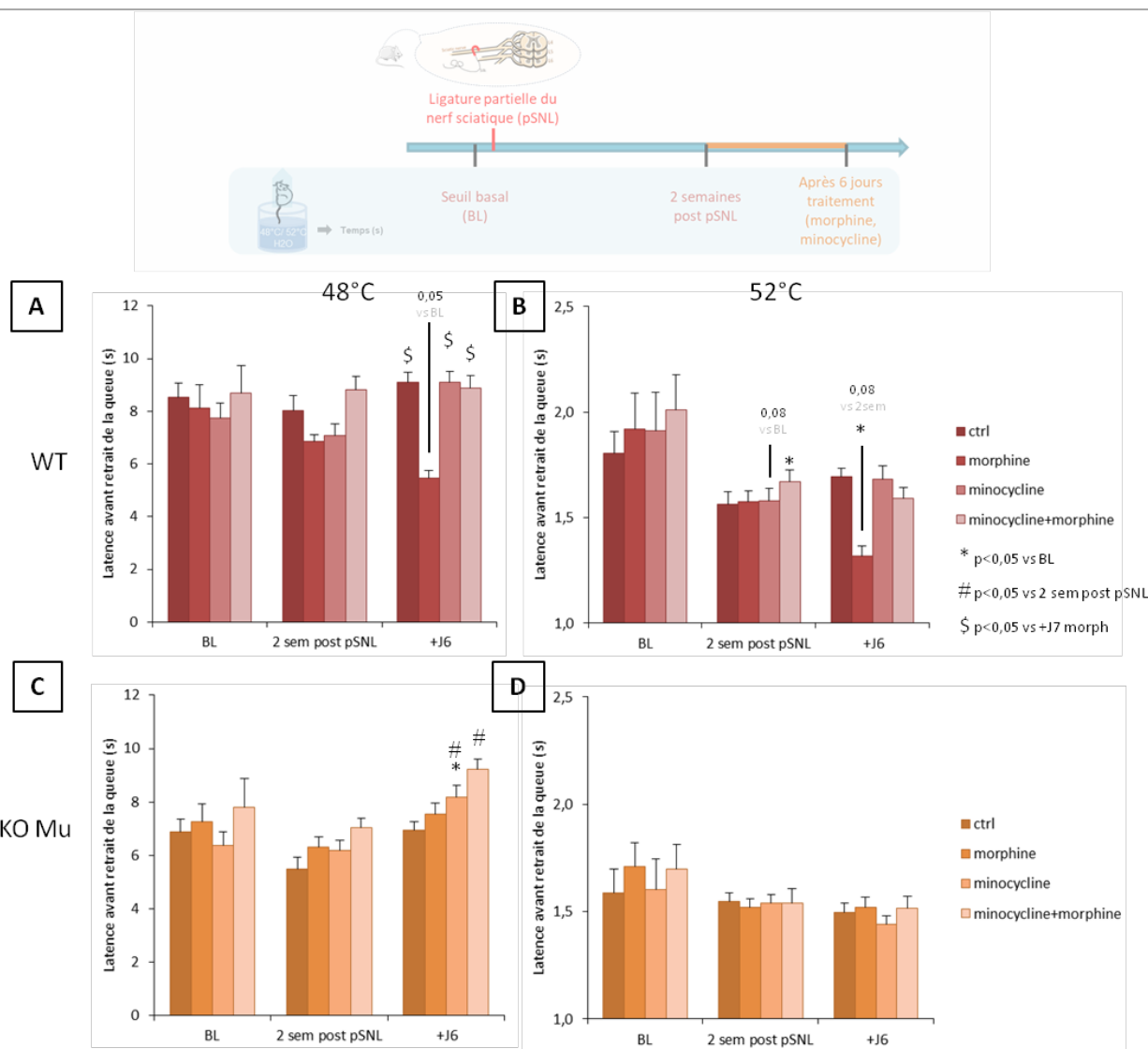


Figure 23: Sensibilité thermique au niveau de la queue chez les souris KO Mu et effets de traitements répétés à la morphine et à la minocycline.

Seuls les $p < 0,20$ sont représentés ; $n = 5-10$ /groupe de traitement/ génotype

Tableau 7: Bilan statistique des résultats du test plantaire de Von Frey : One way ANOVA mesures répétées, analyse post-hoc Newman-Keuls.

WT	48°C (A)
Traitement	F (3,38)=2.35 p=0.08
Temps	F (2,76)=0.98 p=0.37
Traitement x temps	F (6,76)=2.01 p=0.07

WT	52°C (B)
Traitement	F (3,38)=1.35 p=0,27
Temps	F (2,76)=15.79 p<0.0001
Traitement x temps	F (6,76)=1.36 p=0,24

KO Mu	48°C (C)
Traitement	F (3,37)=1.20 p=0,32
Temps	F (2,74)=14.07 p<0.0001
Traitement x temps	F (6,74)=1.07 p=0,38

KO Mu	52°C (D)
Traitement	F (3,31)=0.58 p=0.62
Temps	F (2,62)=5.01 p<0.01
Traitement x temps	F (6,66)= 0.45 p=0.84

Chez les KO Mu, au niveau de la patte opérée, nous observons exactement le même type de phénotype nociceptif au froid, au chaud et mécanique, c'est-à-dire une hypersensibilité neuropathique (Figures 20, 21, 22, panneaux C) et l'absence de sensibilisation généralisée en contralatéral (Figures 20, 21, 22, panneaux D), et en immersion de la queue à 48°C et 52°C (Figure 23, panneaux C et D). Les animaux knockouts ne présentent pas d'hypersensibilité au niveau de la queue à 52°C 2 semaines post-pSNL. Ces résultats diffèrent donc de ceux obtenus avec les animaux WT.

B. Effets d'un cotraitement à base de minocycline et de morphine sur la neuropathie

Ensuite, ces animaux sont traités pharmacologiquement pendant une semaine comme décrit dans le matériel et méthodes (Figure 19).

Les animaux WT ayant reçu pendant 7 jours de la morphine 20mg/kg ip présentent une hypersensibilité au froid accrue (Figure 20). De façon très intéressante, on a observé que la coadministration d'un inhibiteur microglial -la minocycline- dans l'eau de boisson, permet de contrer le développement de cette hypersensibilité morphinique. Cela démontre l'implication des cellules gliales dans le développement de l'hyperalgie morphinique. Par contre, la minocycline seule ne permet pas de diminuer l'hypersensibilité induite par la neuropathie (Figure 20).

Avec le test de Von Frey, bien que les résultats ne soient pas significatifs ($p=0.37$), le traitement morphinique aurait également tendance à entraîner une hypersensibilité, qui serait réversée par la coadministration de minocycline (non significatif, $p=0.059$; Figure 22 panneau A).

Avec le test plantaire de Hargreaves, aucune hyperalgie morphinique n'est observée, et de ce fait, aucun effet protecteur du cotraitement à la minocycline n'est montré (Figure 21, panneau A).

En ce qui concerne les résultats obtenus avec le test d'immersion de la queue, nous observons une tendance à l'hyperalgie morphinique, non significative ($p=0.055$), à 48°C, voir une hyperalgie à 52°C, également réversées par le cotraitement minocycline-morphine.

En contralatéral, aucune régulation induite par les traitements pharmacologiques n'est significative. Cependant, on note une grande variabilité des seuils de nociception mais qui semble être indépendante des traitements administrés.

Chez les KO Mu, comme déjà décrit récemment dans notre article, on n'observe pas d'hyperalgie morphinique, ni en ipsilatéral, ni en contralatéral, que ce soit avec le test de la plaque froide ou les autres tests utilisés, mettant en évidence le rôle primordial du récepteur Mu dans le développement de ce phénomène (Roedel et al., 2017). De plus, la minocycline seule ne semble pas avoir d'effet analgésique sur la neuropathie.

Ces résultats confirment l'implication du récepteur opioïde Mu dans l'hyperalgie morphinique, et montrent aussi que les microglies sont des acteurs importants de ce phénomène. Cela nous a conduits à mener une étude plus précise du rôle des récepteurs opioïdes Mu sur les microglies dans l'hyperalgie morphinique.

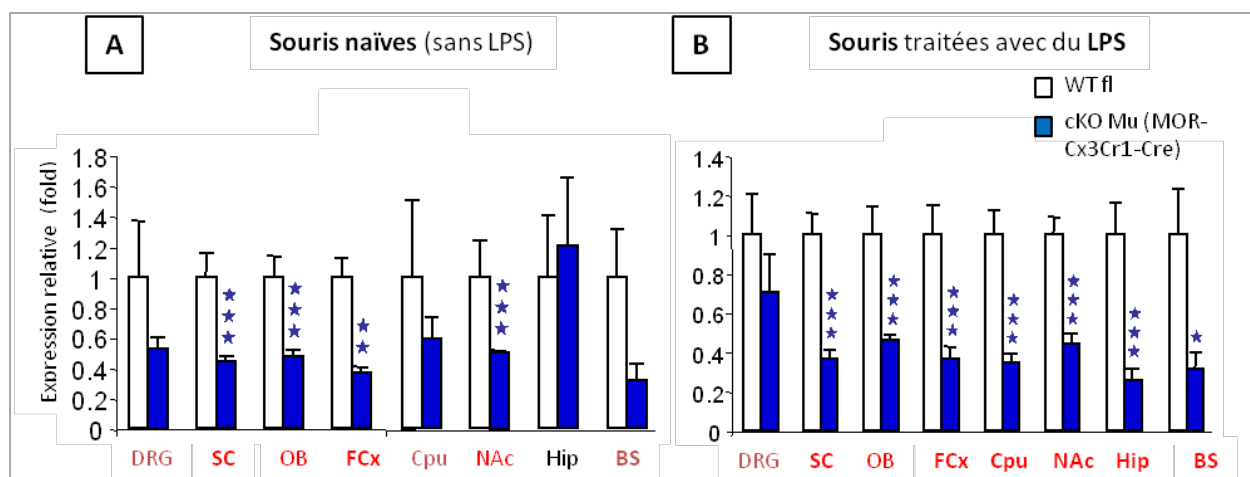
C. Caractérisation d'un knockout conditionnel Mu dans les microglies (MOR-Cx3Cr1-Cre)

Afin de mieux comprendre le rôle de ce récepteur au niveau de la microglie, nous avons généré un modèle murin dépourvu du récepteur Mu au niveau microglial. Ces souris ont été obtenues par croisements de souris ayant les exons 2 et 3 du gène codant pour Oprm1 floxés (WT fl) avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur microglial, Cx3Cr1 (cf [matériel et méthodes](#) et [Figure 18](#)).

Avant d'obtenir des souris utilisables à des fins expérimentales et dont la mutation est stable, il a fallu de nombreux mois de croisements de souris. Cela a nécessité de suivre des règles strictes de généalogie, avec des nombres importants de souris pour être certains de générer une population de mutants assez importante afin d'éviter au maximum la consanguinité de nos cKO et une dérive rapide du génotype. La moindre erreur de croisement pouvait mener à une perte de temps considérable et à un retour en arrière dans les croisements. Toutes ces étapes ne seront pas décrites ici, mais à titre indicatif, entre les premiers croisements et l'obtention de souris cKO utilisables en expérimentation, il a fallu deux longues années.

Ensuite, une fois les souris disponibles, il a fallu les caractériser. Cela a commencé par une caractérisation par qRT-PCR et l'étude de l'expression des gènes codants pour Cx3Cr1 et le récepteur Mu.

Chez des souris naïves, n'ayant subi aucun traitement, on voit que les souris qui expriment la Cre (cKO Mu, MOR-Cx3Cr1-Cre), présentent une réduction d'expression de Cx3Cr1 dans quasiment toutes les régions du système nerveux étudiées ([Figure 24A](#) ; moelle épinière SC, bulbes olfactifs OB, cortex frontal FCx, et noyau accumbens NAc; tendances non significatives pour les ganglions rachidiens DRG, le caudé putamen CPU et le tronc cérébral BS). Seul l'hippocampe Hip ne présente pas de diminution d'expression de Cx3Cr1.



Expériences réalisées avec David Reiss et Hervé Maurin

Figure 24: Expression des ARNm codants pour Cx3Cr1 chez des souris WT et cKO Mu dans différentes régions du système nerveux central, avec ou sans activation microgliale (LPS)

L'expression relative des ARNm codants pour le marqueur microglial Cx3Cr1 est mesurée chez des souris où le gène codant pour la Cre recombinase a été inséré sous le contrôle du promoteur de Cx3Cr1 (cKO Mu; MOR-Cx3Cr1-Cre) dans les ganglions rachidiens dorsaux (DRG), au niveau périphérique, et également dans le système nerveux central, dans la moelle épinière (SC), les bulbes olfactifs (OB), le cortex frontal (FCx), le caudé putamen (Cpu), le noyau accumbens (NAc), l'hippocampe (Hip) et le tronc cérébral (BS). Cette expression est mesurée chez des souris naïves, n'ayant subi aucun traitement (A), mais également chez des souris où nous avons stimulé l'activation microgliale avec du lipopolysaccharide (LPS) (B). n=8-9/ groupe pour les souris traitées au LPS et n=5-6/ groupe pour les souris naïves. Analyses statistiques de type one-way ANOVA.

Nous avons aussi étudié l'expression du transcrit du récepteur Mu chez des souris naïves. Dans ces conditions, nous n'observons une diminution significative des ARNm Mu que dans la moelle épinière, le cortex frontal et le tronc cérébral (Figure 25A), malgré le fait que la Cre soit exprimée dans toutes ces régions comme on peut le voir avec la Figure 24A.

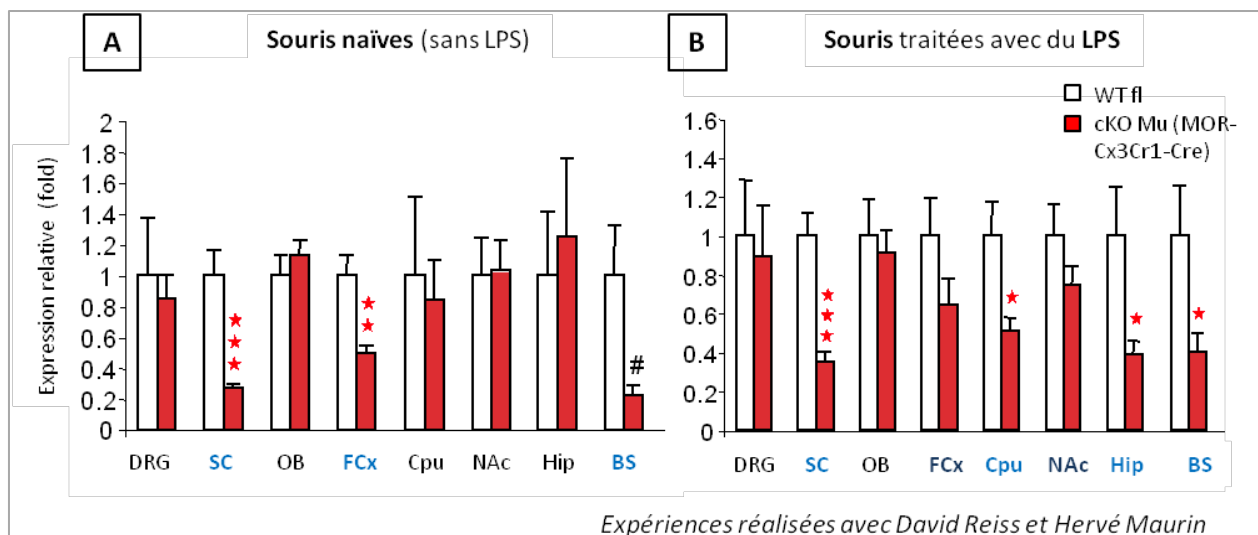


Figure 25: Expression des ARNm codants pour Oprm1 chez des souris WT et cKO Mu dans différentes régions du système nerveux central, avec ou sans activation microgliale (LPS)

L'expression relative du gène codant pour le récepteur opioïde Mu (Oprm1) est mesurée chez des souris où ce gène a été délété dans les cellules microgliales (cKO Mu; MOR-Cx3Cr1-Cre) dans les ganglions rachidiens dorsaux (DRG), au niveau périphérique, et également dans le système nerveux central, dans la moelle épinière (SC), les bulbes olfactifs (OB), le cortex frontal (FCx), le caudé putamen (Cpu), le noyau accumbens (NAc), l'hippocampe (Hip) et le tronc cérébral (BS). Cette expression est mesurée chez des souris naïves, n'ayant subi aucun traitement (A), mais également chez des souris où nous avons stimulé l'activation microgliale avec du lipopolysaccharide (LPS) (B). n=8-9/ groupe pour les souris traitées au LPS et n=5-6/ groupe pour les souris naïves. Analyses statistiques de type one-way ANOVA.

Afin de mieux voir l'effet de notre cKO sur l'expression du récepteur opioïde Mu, nous avons stimulé l'activité microgliale en utilisant du lipopolysaccharide (LPS). Le LPS est un agoniste des Toll Like récepteurs 4 (TLR4), présents à la surface des microglies et des macrophages (Grace et al., 2014). Ainsi, en traitant les souris par injections ip de LPS, on induit une activation des cellules microgliales mais aussi une potentielle augmentation de leur nombre (Ji et al., 2013). Les résultats obtenus après traitement au LPS sont présentés en Figure 24B et 25B.

Un tel traitement permet d'induire une activation microgliale qui se traduit par une augmentation de l'expression du marqueur Cx3Cr1. L'insertion de la Cre sous le contrôle du promoteur Cx3Cr1 affecte l'expression de ce gène Cx3Cr1, comme on a pu le voir dans la figure 24 A, puisque les souris Cx3Cr1-Cre sont hétérozygotes pour la Cre au niveau du gène Cx3cr1 (Goldmann et al., 2013).

Le traitement au LPS, induisant une activation microgliale permet de mettre en évidence de façon plus marquée l'efficacité de notre cKO, c'est-à-dire l'excision d'une partie du gène codant pour Mu menant à une diminution du taux de transcrits Mu (Figure 25 B)

IV. Suite du projet (en cours depuis avril 2016)

Amorcé début 2016

Nous avons essayé de compléter notre étude par une vérification plus précise du knockout conditionnel. Cela a consisté à purifier des microglies à partir d'un cerveau murin cKO. La méthode de purification que nous avons testée implique une dissociation mécanique des cellules et un premier tri par gradient de densité cellulaire (gradient de Percoll). Afin de vérifier cette purification, nos échantillons sont triés par cytométrie en flux. Cette étape permet également d'affiner le premier tri cellulaire, en éliminant les cellules mortes ou de nature non microgliale de l'échantillon (comme les macrophages par exemple). A l'issue de cette étape, le nombre de cellules restantes est considérablement diminué. A partir de ces cellules microgliales purifiées, nous avons réalisé une extraction d'ARN, une rétrotranscription suivie d'une qRT-PCR afin de mesurer les taux d'ARN codants pour Mu dans ces cellules. Si le knockout est fonctionnel, on s'attend à ne plus détecter d'ARN codants pour Mu dans notre échantillon microglial. J'ai participé à ces expériences, mais depuis avril 2016, d'autres optimisations ont sans doute été nécessaires.

Stratégie prévue au moment de mon départ

Ensuite, l'étude comportementale pourra être réalisée. Dans un premier temps, il faudra s'assurer que ce cKO n'induit pas de changement des « comportements de base » des animaux. Cela va se traduire par un phénotypage allant du suivi de poids, des capacités de reproduction, de la viabilité, au suivi de température en passant par des tests d'anxiété, de dépression ou encore de mémoire.

Puis l'étude de la nociception chez ces animaux sera réalisée. La nociception de base sera étudiée, mais aussi l'évolution de la nociception dans des modèles de douleurs chroniques (neuropathique, inflammatoire, chimique).

Enfin, leur réponse aux opiacés sera étudiée afin de déterminer le rôle de cette population de récepteur Mu dans les phénomènes d'hyperalgie et de tolérance.

Ce travail est poursuivi au laboratoire depuis mon départ.

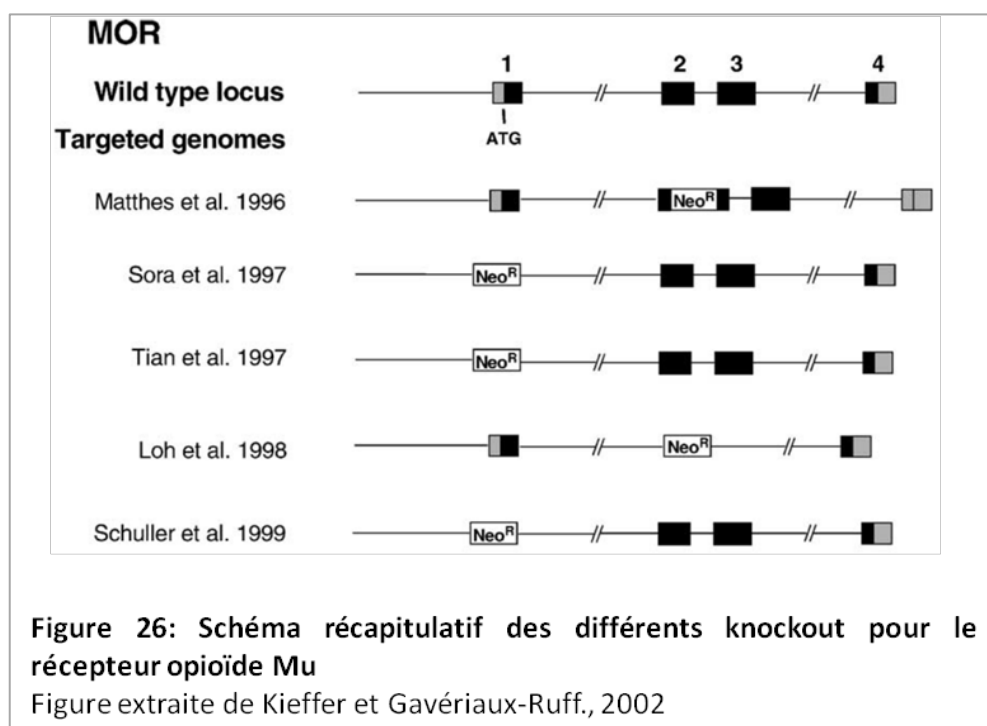
V. Discussion

Par ces approches, nous avons montré que les microglies jouent un rôle important dans l'hyperalgie morphinique. Désormais, il reste à déterminer quel est le rôle exact du récepteur Mu exprimé sur les cellules gliales dans le développement de ce phénomène. La réponse à cette question sera peut-être apportée grâce au modèle de knockout conditionnel (cKO; MOR-Cx3Cr1-Cre) que notre équipe a généré.

Cette étude a également permis de soulever différents aspects qui n'avaient pas encore été étudiés.

A. Rôle du récepteur opioïde Mu dans les réponses antinociceptives basales

Cette étude, en plus d'explorer le rôle du récepteur Mu dans les réponses à différents traitements pharmacologiques, a permis de caractériser plus précisément le rôle de ce récepteur dans les réponses nociceptives de base. En effet, différentes études avaient déjà étudié son éventuelle implication dans les réponses à des tests de nociception ou d'allodynie thermique et mécanique (Figure 9), mais ces résultats étaient parfois variables suivant les études. Ces divergences peuvent être expliquées par l'utilisation de différents modèles de knockouts Mu utilisés. Alors que l'étude de Matthes et collaborateurs, publiée en 1996 utilise un modèle d'inactivation du récepteur Mu par insertion d'une cassette codant pour la néomycine dans l'exon 2 (également le knockout que nous avons utilisé pour notre étude), les études menées par Sora (1997), Tian (1997), et Schuller (1999), et leurs collaborateurs respectifs ont utilisé un modèle de délétion de l'exon 1, et enfin Loh (1998) et collaborateurs ont quant à eux utilisé un knockout Mu où les exons 2 et 3 sont délétés (Kieffer and Gavériaux-Ruff, 2002; Loh et al., 1998; Matthes et al., 1996; Schuller et al., 1999; Sora et al., 1997; Tian et al., 1997) (Figure 26)



Notre étude montre que le récepteur mu n'est pas impliqué dans les réponses nociceptives au chaud (immersion de la queue) et les réponses allodyniques mécaniques (Von Frey), comme préalablement décrit avec le même modèle de knockout Mu (Gavériaux-Ruff et al., 2008). Nous avons aussi étudié l'effet du knockout sur la sensibilité au test plantaire de Hargreaves, et à nouveau, nous n'avons aucune différence de sensibilité à ce test dans nos conditions. Pourtant, une étude préalable de Qiu et collaborateurs avait montré une hypersensibilité des KO Mu à ce test par rapport aux contrôles WT (Qiu et al., 2000). Leur étude a certes été réalisée avec le même test plantaire, mais l'intensité testée était de 50IR alors qu'elle est de 40IR chez nous. De plus, leur modèle de knockout est celui où l'exon 1 (Sora et al., 1997) est délété alors que nous utilisons le modèle d'inactivation de l'exon 2.

Il est intéressant aussi de noter que parmi toutes ces études, aucune n'a étudié les réponses au froid des animaux KO Mu en utilisant la plaque froide. Weibel et al. 2013, en mesurant la sensibilité au froid par tail immersion à 5°C, fig. 3D, n'ont pas mesuré de différence entre WT et KO mu. Mansikka et al. 2004, n'ont pas non plus trouvé de différence entre WT et KO mu dans le test à l'acétone. Par notre étude, nous confirmons que le récepteur Mu, dans nos conditions, n'est pas impliqué dans les réponses allodyniques au froid, puisque ces animaux présentent une réponse de base comparable aux souris sauvages (Figure 20 BL).

Ces différences pour générer les knockouts, mais aussi l'étude ou non de l'effet du sexe, les conditions plus ou moins stressantes d'hébergement des animaux ou encore l'âge des animaux sont autant de facteurs qui rendent l'interprétation des études comportementales délicate. Ce qui semble acté est le fait que le récepteur Mu n'intervienne ni dans le ressenti de la nociception thermique au niveau de la queue, ni dans l'allodynie mécanique au niveau des pattes, car tous les résultats obtenus jusqu'à ce jour convergent tous vers l'idée que le knockout n'impacte pas les réponses à ces tests, ou alors les impacte de manière mineure (voir figure 9 pour un résumé).

B. Rôle du récepteur opioïde Mu dans un modèle de ligature partielle du nerf sciatique

Concernant la caractérisation du knockout Mu en conditions pathologiques de nociception, les études déjà publiées présentent des résultats également divergents. Suite à une induction de douleur inflammatoire par injection d'adjuvant complet de Freund (CFA) chez une souris knockout Mu et une souris WT, Qiu et collaborateurs ont montré une réduction de la cinétique de récupération de la douleur inflammatoire avec le test plantaire de Hargreaves. Ils ont observé le développement d'une hypersensibilité comparable à celle des WT, mais les souris KO atteignent des seuils de sensibilité comparables à ceux en conditions basales dès 96h post-CFA, alors que les animaux WT nécessitent 144h post-CFA pour atteindre ce seuil (Qiu et al., 2000). D'autres études sur la nociception thermique d'origine inflammatoire post-CFA ont été réalisées (Gavériaux-Ruff et al., 2008; Gendron et al., 2007),

et ne montrent aucune différence de sensibilité des KO Mu, ni même de cinétique dans la récupération post-CFA par rapport aux WT. Cependant, une étude plus récente montre que les souris KO Mu présentent une hyperalgie mécanique qui subsiste plus longtemps que chez les WT après injection de CFA (Walwyn et al., 2016). 25 jours post-CFA, ils montrent que les animaux KO n'ont toujours pas récupéré, alors que les WT semblent déjà avoir récupéré au jour 20.

Le développement de douleurs d'origines chimiques a aussi été étudié chez ce knockout, révélant une hypersensibilité induite par la formaline (Martin et al., 2003) d'une part, et une diminution ou pas de différence de la sensibilité viscérale induite par injection intra péritonéale dans l'abdomen (Sora et al., 1999; Weibel et al., 2013).

Enfin, des études se sont aussi penchées sur le rôle que pouvait exercer le récepteur Mu dans les réponses à des douleurs d'origine neuropathiques. La neuropathie peut être induite par différents facteurs comme, par exemple, une lésion du nerf sciatique ou une lésion de la moelle épinière, ça peut-être une conséquence d'une autre pathologie comme le diabète ou l'alcoolisme, ou encore être une conséquence d'un traitement comme la chimiothérapie.

Concernant les douleurs neuropathiques, on pourrait s'attendre à ce que Mu joue un rôle dans le développement de cette pathologie. En effet, il a été montré qu'après une lésion du nerf sciatique, la distribution et l'expression du récepteur Mu était modifiée au niveau du nerf lésé. Après une constriction chronique du nerf sciatique (CCI), le nombre de récepteurs Mu exprimés au niveau des ganglions rachidiens dorsaux (DRG) vers lesquels projettent le nerf lésé est largement augmenté (Schmidt et al., 2013). L'administration locale d'agonistes Mu au niveau de la lésion permet, quant à elle, de diminuer significativement la douleur neuropathique induite par le CCI (Truong et al., 2003). En parallèle, d'autres équipes ont démontré qu'il y avait une diminution de l'expression de Mu au niveau des DRGs et de la moelle épinière après une telle lésion (Obara et al., 2009; Pol et al., 2006).

Afin d'explorer le rôle de ce récepteur dans le développement de la neuropathie, le knockout Mu a été utilisé. Il a été montré que les seuils d'allodynie mécanique étaient affectés aussi bien chez les WT que chez les KO Mu, suite à une chirurgie de type « cuff » qui consiste à placer un manchon de polyéthylène autour du nerf sciatique (Bohren et al., 2010).

Dans notre étude, le modèle de lésion du nerf sciatique est différent et consiste à ligaturer environ 30% du diamètre du nerf sciatique avec un fil de soie, mais permet de renforcer les résultats de Bohren et collaborateurs, à savoir l'absence d'effet du knockout Mu sur l'allodynie mécanique en condition de neuropathie (Figure 22 et publié dans Roeckel et al., 2017, figure 4C). Notre étude permet aussi d'élargir ces conclusions à des tests étudiants d'autres modalités comme la nociception thermique au chaud (test plantaire de Hargreaves Figure 21; publié dans Roeckel et al., 2017) et au froid (plaque froide ; publié dans Roeckel et al., 2017 figure 4D ; et Figure 20). Mansikka et collaborateurs ont aussi étudié ces différentes modalités chez les KO Mu, mais leurs résultats sont différents de ceux décrits

dans notre étude (Mansikka et al., 2004). En effet, ils se sont aussi intéressés aux variations des seuils de nociception thermique au chaud (modèle proche du test plantaire de Hargreaves), au froid (test de la goutte d'acétone), et mécanique (test de Von Frey), induites par un modèle de neuropathie de type transection du nerf spinal L5. Avec le test de Von Frey, ils ont noté une plus grande sensibilité en ipsilatéral chez les animaux KO Mu par rapport aux animaux WT, et aussi une sensibilisation chez les animaux KO Mu uniquement. Cette hypersensibilité contralatérale des KO Mu est comparable à l'hypersensibilité observée en ipsilatéral chez les WT. Toujours avec le test de Von Frey, les auteurs précisent que les WT ne présentent une hypersensibilité en contralatéral qu'avec le plus fort stimulus, c'est-à-dire avec le filament correspondant à la plus forte pression en grammes. Le test de Von Frey est un test d'allodynie mécanique et pas de nociception, mais ici, en appliquant un filament correspondant à une forte pression (4.43g), cela correspond peut-être plus à un stimulus nociceptif qu'allodynique. La méthode de mesure du test de Von Frey que nous avons utilisée est différente de celle décrite dans l'article de Mansikka. En effet, nous utilisons la méthode du «up and down» qui consiste à appliquer des filaments correspondant à des pressions croissantes tant que l'animal ne réagit pas, et dès qu'une réaction est observée, la pression appliquée est diminuée jusqu'à que l'animal ne réagisse plus en contact du filament, et ainsi de suite, pendant 10 applications. La séquence d'application des différents filaments permet ainsi de calculer un seuil d'allodynie moyen. La méthode utilisée par le groupe de Mansikka consiste à appliquer 5 fois de suite un filament d'une pression fixe, avant de passer à un filament correspondant à une pression plus importante et ainsi de suite, et au final, le % de réponse à chaque pression est déterminé. De plus, leur chirurgie neuropathique est différente de la nôtre (transection vs pSNL). Enfin, leur étude est réalisée sur le modèle de knockout décrit par Sora et collaborateurs en 1997 (Sora et al., 1997), consistant à insérer une cassette codant pour la Néomycine dans l'exon 1 d'*Oprm1*, alors que nous utilisons le modèle décrit par Matthes et collaborateurs en 1996 (Matthes et al., 1996), généré par insertion d'une cassette codant pour la Néomycine dans l'exon 2 d'*Oprm1* (pour récapitulatif, [Figure 26](#)). Ensemble, ces éléments sont peut-être responsables des différences observées dans nos deux études.

Par contre, nos résultats d'allodynie au froid et de nociception au chaud au niveau de la patte confirment ceux déjà décrits dans cette étude de Mansikka (Mansikka et al., 2004), à savoir le développement d'une hypersensibilité comparable en ipsilatéral chez les WT et les KO Mu, ainsi que l'absence de sensibilisation en contralatéral.

Tous ces résultats divergents montrent bien que malgré le fait d'utiliser un modèle d'induction de douleur à priori comparable, la modalité nociceptive testée peut révéler une sensibilité différente, et

soulève l'importance d'étudier différentes modalités, dans la mesure du possible, lors de la caractérisation d'un modèle génétique.

C. Hyperalgie induite par un traitement répété à la morphine

En clinique, la morphine est utilisée uniquement pour pallier à des douleurs intenses, et son utilisation à long terme est limitée par le développement de la tolérance à l'analgésie et l'hyperalgie morphinique (Elhabazi et al., 2012). Nous avons examiné si nous pouvions détecter ces phénomènes chez des souris pSNL traitées avec de la morphine (20 mg/kg/jour pendant 6 ou 7 jours).

Les mesures réalisées après 7 ou 6 jours de traitement répété permettent d'observer une aggravation significative de l'hyperalgie dans le groupe traité avec la morphine seule pour les tests de la plaque froide (Figure 20) et de Von Frey (Figure 22; Roeckel et al., 2017, figure 4C). Concernant les résultats obtenus après un traitement répété à la morphine avec le test de Von Frey, on observe une hyperalgie significative dans la figure 4 de l'article publié, alors que cette hypersensibilité n'est pas significative dans la figure 22. Les résultats présentés dans les deux cas sont pourtant ceux obtenus avec les mêmes groupes d'individus. La raison de ces résultats divergents est due aux analyses statistiques réalisées: bien que les deux analyses soient des ANOVA mesures répétées, complétées par une analyse post-hoc de type Newman-Keuls, les groupes analysés ne sont pas les mêmes. En effet, dans l'article, nous avons fait le choix de ne pas représenter les résultats de minocycline et de faire une analyse groupée des WT et KO Mu. Dans l'étude complémentaire décrite dans le manuscrit de thèse, les résultats de minocycline sont décrits et les analyses sont faites par génotype. De plus, nous avons constaté dans les figures 20, 21, 22, et 23 que les seuils de nociception sont assez variables au cours du temps et entre les groupes. Ces variations sont certainement explicables par le fait que les animaux sont des deux sexes, qu'ils ont tous réalisé un grand nombre de tests comportementaux (Von Frey, Hargreaves, Plaque froide et Immersion de la queue), et qu'ils ont subi une chirurgie où la variabilité interindividuelle de la lésion générée peut-être importante.

D'autre part, l'hypersensibilité provoquée par les opiacés est délicate à observer (Horvath et al., 2010). Il conviendrait d'essayer d'autres conditions expérimentales pour induire une hyperalgie plus importante. En effet, dans notre traitement répété, la morphine était administrée quotidiennement à 20 mg/kg, alors que dans d'autres travaux des dosages plus élevés ou biquotidiens ont été utilisés (Elhabazi et al., 2012). De plus, le fait d'utiliser des animaux ayant leurs seuils de nociception déjà abaissés rend la détection d'une hyperalgie morphinique d'autant plus difficile.

Cependant, l'hyperalgie observée chez les WT avec la plaque froide et le Von Frey n'est pas retrouvée chez les souris KO traitées avec la morphine seule (Figure 20 et Roeckel et al., 2017). Cela suggère que

les récepteurs mu sont impliqués dans le développement de l'hyperalgie induite par la morphine chez les animaux neuropathiques.

Il est intéressant de noter que dans notre étude, nous n'avons pas observé d'hyperalgie morphinique post-pSNL avec le test de nociception thermique plantaire de Hargreaves. Ces résultats sont d'autant plus intéressants puisqu'ils sont similaires à ceux observés dans l'article de Corder et collaborateurs (Corder et al., 2017). Cela appuie à nouveau le fait qu'il est important d'étudier différentes modalités, et prouve aussi que les modalités thermiques, au chaud, ou au froid, mécaniques ou chimiques ne sont pas régies par les mêmes phénomènes.

D. Rôle des microglies dans la douleur neuropathique post-pSNL et l'hyperalgie morphinique

Afin d'étudier le rôle des microglies dans la douleur neuropathique, nous avons choisi de traiter nos animaux avec un composé décrit comme étant un inhibiteur microglial, la minocycline.

Effets de la minocycline seule

De par son action inhibitrice de l'activité des microglies, la minocycline possède des propriétés anti-inflammatoires. La microglie est impliquée dans le développement des douleurs chroniques, et la littérature suggère l'implication de ces cellules dans le développement de l'hyperalgie et de la tolérance à la morphine (Mika et al., 2013). Dans nos expériences, nous avons donné la minocycline dans l'eau de boisson des souris pendant 7 jours, seule ou en combinaison avec la morphine. De manière générale, nos résultats montrent que la minocycline seule n'a pas d'effet sur les souris neuropathiques WT et KO.

L'équipe de Mika a pourtant montré un effet analgésique de la minocycline (Mika et al., 2007). Dans cette étude, le traitement à la minocycline avait commencé avant la lésion du nerf sciatique et non deux semaines après comme dans notre protocole. Cela suggère que l'inhibition microgliale doit précéder la lésion pour obtenir une analgésie avec la minocycline, et donc que l'activité microgliale est impliquée dans l'initiation de la neuropathie et que son inhibition une fois la neuropathie instaurée n'a pas d'effet significatif. Cela appuie les résultats des études qui montrent une activation microgliale très précoce dans l'initiation de la douleur chronique (pour revue, Grace et al., 2014). Un tel traitement ne pourrait donc pas être utilisé à titre curatif d'une neuropathie.

Effets du cotraitement minocycline+morphine

Dans nos expériences, lorsque les souris sont traitées de manière répétée avec la combinaison morphine-minocycline, on observe une diminution de l'effet pro-algique de la morphine avec le test

de la plaque froide (Figure 20). Ces résultats ont été confirmés avec les tests de nociception au chaud d'immersion de la queue (Figure 23), et d'allodynie mécanique de Von Frey (tendance non significative, Figure 22), mais pas avec le test plantaire de Hargreaves (Figure 21). Avec le test plantaire de Hargreaves, nous n'avons pas non plus réussi à montrer une hyperalgie morphinique dans nos conditions de neuropathie. Notons que le protocole suivi dans cette expérience est lourd, impliquant une chirurgie neuropathique, un traitement morphinique par injection, un traitement à la minocycline dans l'eau de boisson et 4 tests comportementaux de nociception. Tous ces éléments sont autant de facteurs qui rendent l'expérience lourde pour les animaux. Certains tests peuvent également interférer sur les résultats obtenus pour d'autres modalités. De plus, comme déjà abordé, les animaux sont neuropathiques et ont donc leurs seuils de nociception abaissés au niveau de la patte opérée. Le fait que ces seuils soient considérablement affectés fait qu'il est difficile d'observer une hypersensibilité induite par la morphine, d'une part. D'autre part, lorsqu'une hyperalgie morphinique, ou une tendance est observée dans un test, cela signifie que l'hypersensibilité est très forte. Pour ces raisons, le fait que l'administration d'un cotraitement à base de minocycline ne permette pas de contrer l'hyperalgie est peut-être dû au fait que le contexte douloureux est trop important pour que la minocycline puisse avoir un effet protecteur. Pour résumer, il y avait de trop nombreux facteurs intervenant dans cette expérience et afin de mieux définir cet effet protecteur de la minocycline, il faudrait réitérer ces tests, avec le même protocole de coadministration de morphine et de minocycline, mais en réalisant moins de tests sur les mêmes animaux, affectant potentiellement les seuils de nociception.

Une étude réalisée par Cui et collaborateurs a montré que la minocycline atténue de façon dose dépendante la tolérance à l'analgésie morphinique avec le test d'immersion de la queue à 50°C (Cui et al., 2008). Ils ont montré aussi que la minocycline permet de diminuer cet effet tolérogène de la morphine lorsqu'elle est donnée précocement, soit avant le développement de la tolérance. Lorsque celle-ci est déjà en place, le fait de commencer un traitement à base de minocycline ne permet pas de diminuer la tolérance morphinique.

Malgré ces critiques, et d'éventuels compléments d'expérimentations à réaliser, nos résultats montrent bien un effet protecteur de la minocycline lorsqu'elle est associée à la morphine. Nos résultats suggèrent donc que l'activation de la microglie participe au développement de ces phénomènes. En effet, comme décrit dans la Figure 4, la microglie, lorsqu'elle est activée, produit des molécules pro-inflammatoires qui vont sensibiliser les neurones et mener à une perception plus importante de la douleur.

Dans notre étude, avant de commencer les traitements pharmacologiques, nous avons attendu que les animaux présentent une hypersensibilité de nature neuropathique. La neuropathie est considérée comme une douleur chronique et il est largement décrit que les douleurs chroniques induisent une activation gliale. Cela signifie que nous avons commencé un traitement pharmacologique (morphine-minocycline) chez des animaux où l'activité gliale est déjà élevée. L'ajout d'un traitement répété à la morphine à ce contexte neuropathique a peut-être potentialisé ou maintenu un état d'activation des microglies. Il aurait donc été possible qu'un tel traitement sur des animaux non douloureux n'induisse pas une activation microgliale aussi conséquente. De ce fait, un tel cotraitement à la minocycline n'aurait peut-être pas eu un effet protecteur aussi important.

L'étude de Hayashi et collaborateurs, montre l'effet protecteur d'un cotraitement morphine-minocycline sur l'OIH, avec une diminution de la nociception morphinique en Von Frey lorsque les animaux sont traités avec de la minocycline (Hayashi et al., 2016). Ces résultats sont similaires aux nôtres, mais en conditions non neuropathique. Cette étude permet donc de lever ce doute et démontre que la morphine à elle seule induit une activation microgliale. Aussi, il serait intéressant de voir si ces résultats sont confirmés dans d'autres contextes de douleurs chroniques.

Des études ont partiellement exploré le rôle des microglies dans l'OIH en conditions de douleur chronique (pour résumé, tableau 2 de Roeckel et al., 2016). Plusieurs études ont porté sur le rôle protecteur d'inhibiteurs de l'inflammation sur l'OIH (11 sur 14 études du tableau 2 de Roeckel et al., 2016). Deux études ont été menées avec des inhibiteurs gliaux comme la propentofylline et la pentoxifylline en association avec de la morphine, rapportant les effets protecteurs de ces inhibiteurs sur l'OIH (Liang et al., 2008; Raghavendra et al., 2004). L'étude de Liang et collaborateurs montre que l'OIH est diminuée par un traitement à la pentoxifylline chez des souris ayant la patte lésée par une incision. Cela étend donc les résultats protecteurs d'un tel cotraitement inhibiteur glial-morphine sur l'OIH à une situation de douleur induite par une incision. Cependant, cela ne permet pas de déterminer le rôle précis des microglies dans ce phénomène, la pentoxifylline étant un inhibiteur non spécifique des microglies (Harada et al., 2013)

En conclusion, ces résultats sont plutôt encourageants d'un point de vue clinique. Il serait envisageable d'associer un traitement à la minocycline à un traitement morphinique chez des patients douloureux chroniques afin de réduire les hypersensibilités morphiniques. En effet, la minocycline est un médicament déjà utilisé en clinique pour son indication primaire d'antibiotique et ses effets indésirables sont connus, ce qui rendrait une éventuelle utilisation clinique facilitée.

E. Knockout du récepteur Mu dans les microglies

Les résultats obtenus dans les parties décrites précédemment (étude préliminaire pharmacologique), ainsi que certaines études (Ghazvini et al., 2015; pour revue, Hameed et al., 2010) nous incitent à proposer que le récepteur Mu exprimé sur les cellules microgliales pourrait jouer un rôle dans les effets hypersensibilisants de la morphine telles l'hyperalgie et la tolérance à l'analgésie. Pour étudier cette question, nous avons généré des souris knockout conditionnel pour le récepteur Mu dans les microglies (cKO; MOR-Cx3Cr1-Cre). Nous avons vu que l'expression de la Cre sous le promoteur de Cx3Cr1 altère l'expression de ce gène (Figure 24A). En ce qui concerne l'expression du récepteur Mu, nous n'avons pas vu d'effet significatif du cKO, c'est-à-dire une diminution de l'expression du gène codant pour le récepteur, excepté pour quelques régions (Figure 25A). Pour que le cKO soit visible dans de telles conditions, c'est-à-dire sur une région « entière » et non sur microglies purifiées et en conditions basales ou sans activation microgliale préalable, il faut à la fois qu'il y ait beaucoup de microglies dans la région étudiée, mais aussi qu'une proportion considérable des récepteurs Mu exprimés dans cette région soit spécifiquement exprimée par les microglies. Les résultats de la Figure 25A montrent que ce n'est pas le cas. Il a donc fallu trouver un système pour mettre en évidence le cKO sur échantillons de cerveaux. Nous avons suivi la méthode utilisée par Goldmann et collaborateurs avec leur cKO utilisant aussi Cx3Cr1-Cre, consistant à induire une activation microgliale avec du LPS afin de mieux observer le cKO (Goldmann et al., 2013). Les microglies sont considérés comme les phagocytes du cerveau et exercent des fonctions proches des macrophages dans le système nerveux central (Grace et al., 2014). Le marqueur Cx3Cr1 est un marqueur d'activation microgliale et donc, en situation de neuroinflammation, on observe une augmentation de l'expression de ce marqueur qui traduit soit une augmentation du nombre de cellules et/ou une augmentation de l'activation des microglies (Taves et al., 2013). Dans notre modèle, la Cre recombinase étant sous le contrôle du promoteur Cx3Cr1, plus Cx3Cr1 sera exprimé, plus la Cre sera active. Ainsi, en traitant nos souris avec du LPS, on booste l'activité microgliale et l'activité de notre Cre et donc l'inactivation de Mu dans les microglies. De plus, en utilisant du LPS, on va aussi induire une neuroinflammation et une augmentation du nombre de microglies activées et de ce fait augmenter la proportion de récepteurs Mu microgliaux par rapport au reste de la population Mu. Par ces différents facteurs, le cKO devient observable dans la quasi-totalité des régions du système nerveux testées, avec une diminution de l'expression du récepteur Mu visible par qPCR (Figure 25B).

Désormais, il faut confirmer le cKO suite à une purification microgliale, et réalisation d'une qRT-PCR sur ces cellules triées afin d'estimer l'efficacité d'inactivation du gène codant pour le récepteur Mu dans ce modèle.

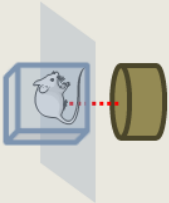
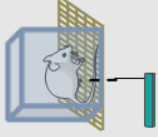
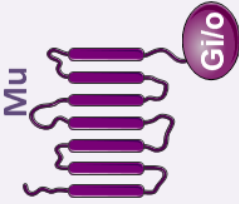
Test comportemental		Plaque froide Allodynie au froid	Hargreaves Nociception à la chaleur	Von Frey Allodynie mécanique	Immersion de la queue Nociception thermique
Modalité testée					
Récepteur opioïde 	Implication en BL	-	-	-	-
	Implication dans la neuropathie post-pSNL	-	-	-	-
	Implication dans l'hyperalgie morphinique	+	+	+	- ?
Microglies 	Implication dans le maintien de la neuropathie (pSNL)	-	-	-	-
	Implication dans l'hyperalgie morphinique	+	+	+	Pas d'hyperalgie morphinique

Schéma bilan: Rôle du récepteur opioïde Mu et des microglies dans l'hypersensibilité post-pSNL et l'hyperalgie morphinique

CONCLUSIONS DU CHAPITRE I

(projets I et II)

CONCLUSIONS DU CHAPITRE I (projets I et II)

La morphine est métabolisée principalement en M3G qui est un composé dénué de propriétés analgésiques et qui au contraire induit une hypersensibilité aiguë. La morphine entraîne également ce type d'hypersensibilité mais en situation chronique, c'est-à-dire après un traitement prolongé ou répété, ou bien après administration d'une très forte dose. Cet effet hyperalgésiant n'est pas observé en aigu, mais lorsque l'effet analgésique de la morphine s'est estompé (dans nos conditions, 20 à 24h minimum après la dernière injection de morphine). Lorsque la morphine est administrée de façon systémique comme dans notre étude, l'essentiel de la métabolisation se fait en périphérie, grâce au foie. La M6G produite par le foie va alors pouvoir exercer ses effets analgésiques en périphérie, par activation du récepteur Mu, mais aussi au niveau central après franchissement de la barrière hémato encéphalique (BHE). Pour la M3G, la situation est différente. En effet, elle est aussi essentiellement produite en périphérie, mais contrairement à la M6G, elle ne posséderait pas les propriétés de franchir le BHE (De Gregori et al., 2012).

La M3G va pouvoir activer les cellules du système immunitaire via TLR4 (Lewis et al., 2010), ce qui va progressivement entraîner une sensibilisation périphérique qui contribue au développement de l'hyperalgie. Les cellules du système immunitaire expriment aussi le récepteur Mu (Labuz et al., 2016) et leur potentielle activation par la M3G va elle aussi pouvoir contribuer au développement de l'hyperalgie. Au cours du traitement, l'inflammation va être telle qu'elle va pouvoir masquer l'analgésie induite par une administration de morphine et cela peut constituer une hypothèse de cause de la tolérance à l'analgésie. Grâce à notre étude, on a montré que le récepteur Mu joue un rôle essentiel dans l'hyperalgie morphinique, mais aussi et surtout dans l'hyperalgie induite par la M3G. En effet, on a pu voir que les souris chez qui ce récepteur est absent ne développent pas d'hypersensibilité morphinique ou à la M3G. Cela montre que le TLR4 n'est pas le seul médiateur de ces hypersensibilités. De plus, deux études ont montré que des animaux TLR4 KO développent une hyperalgie morphinique. Ensemble, ces résultats suggèrent une potentielle interaction fonctionnelle entre les récepteurs Mu et TLR4 qui pourraient être à l'origine de l'hyperalgie aux opiacés.

Afin de mieux comprendre le rôle du récepteur Mu, nous avons testé l'effet de la M3G, après injection systémique via voie intra péritonéale, sur des souris qui n'expriment pas le récepteur Mu dans des neurones périphériques Nav1.8. Ces neurones représentent près de 70% des nocicepteurs périphériques (Stirling et al., 2005) et présentent une proportion élevée (environ 75%) du nombre de récepteurs Mu exprimés dans les DRG (Weibel et al., 2013).

La morphine étant métabolisée essentiellement en périphérie et dans le cerveau et la M3G ne franchissant pas la BHE, le but de cette expérience était donc d'explorer le rôle des récepteurs Mu exprimés sur ces neurones dans les effets hypersensibilisants de la M3G. Ces expériences nous ont montré que l'hypersensibilité à la M3G est maintenue chez ces knockouts conditionnels et indique que ce ne sont pas les récepteurs Mu des neurones Nav1.8 + qui sont à l'origine de cette hypersensibilité. Comme déjà discuté dans l'article, ces neurones ne représentent qu'une partie des nocicepteurs périphériques et on ne peut pas exclure le fait que le récepteur Mu présent sur d'autres populations neuronales puisse être à l'origine de cette hypersensibilité, ou bien même le récepteur Mu sur des cellules non neuronales. De plus, il ne faut pas oublier qu'une partie de la morphine administrée va franchir la BHE et être métabolisée dans le système nerveux central. A ce moment-là, de la M3G est également produite et pourra induire ses effets hypersensibilisants grâce à une action centrale. Mais cela ne permet pas d'expliquer l'hyperalgie induite par la M3G après administration systémique. Une autre hypothèse peut aussi être mise en évidence, celle de l'intervention d'un autre système que le système opioïde ou les TLR. En effet, les études d'affinité de la M3G pour TLR4 indiquent une affinité faible (Khabbazi et al., 2016), tout comme ce que nous avons obtenu pour le récepteur Mu (Roedel et al., 2017). Ce métabolite pourrait donc avoir une autre cible, pour laquelle il aurait une affinité plus grande, et qui interagirait avec les récepteurs Mu et TLR4 dans le cas de l'hyperalgie.

Les résultats complémentaires à l'étude publiée, obtenus avec le test de suspension par la queue ou le test de burrowing afin de mesurer le bien-être des animaux après injection de M3G montrent un effet du métabolite. La M3G induisant une réponse immunitaire cela peut expliquer les effets sur l'anxiété et la dépression. En effet, il a été montré qu'il y avait une augmentation de l'inflammation et de l'expression de ses marqueurs chez des individus déprimés (pour revues, Allison and Ditor, 2014; Jeon and Kim, 2017).

Par cette étude, nous avons aussi confirmé le rôle du récepteur Mu dans l'hypersensibilité morphinique, en conditions de douleur chronique de type neuropathique. Nous avons également cherché à explorer le rôle des microglies dans l'hyperalgie morphinique grâce à l'utilisation d'un inhibiteur microglial, la minocycline ([Projet II](#)). Nous avons montré, dans nos conditions, que l'inhibition de l'activation microgliale, deux semaines après induction de la neuropathie, ne permet pas de diminuer l'effet nociceptif de la pSNL. Cela suggère que l'activation microgliale ne contribue plus de façon significative, à ce moment précis, à l'hypersensibilité neuropathique. Par contre, il a été montré qu'un prétraitement avec un inhibiteur microglial permet de diminuer le développement de l'hypersensibilité neuropathique (Mika et al., 2007). Cela appuie l'hypothèse que la microglie joue un

rôle précoce dans le développement de la douleur chronique (Grace et al., 2014). Il serait intéressant de tester si un traitement identique à celui que nous avons suivi, mais utilisant cette fois un inhibiteur astrocytaire, permettrait d'observer une diminution de l'hypersensibilité neuropathique. De tels résultats permettraient de confirmer la cinétique différentielle d'activation des microglies et des astrocytes.

En parallèle, nous avons aussi étudié le rôle de cette activité microgliale dans l'hyperalgie morphinique en conditions de douleur neuropathique. Pour cela, les souris ont reçu un cotraitement de 7 jours avec de la morphine et de la minocycline. Chez ces animaux, nous avons montré que l'inhibition microgliale permettait de diminuer les allodynies morphiniques au froid et mécanique. Pour la nociception au chaud, il est difficile de conclure avec les résultats obtenus dans cette expérience (pas d'hyperalgie morphinique majeure, comme dans Corder et al. 2017). Cela indique tout de même que l'hyperalgie morphinique est une conséquence de l'activation microgliale puisque lorsque celle-ci est inhibée, nous n'observons pas d'hyperalgie. Désormais, nous étudions (en cours) de façon plus précise le rôle du récepteur Mu sur les microglies dans les effets secondaires de la morphine, telles la tolérance à l'analgésie et l'hyperalgie morphinique.

Bibliographie :

- Aguzzi, A., and Zhu, C. (2017). Microglia in prion diseases. *J. Clin. Invest.* *127*, 3230–3239.
- Akil, H., Owens, C., Gutstein, H., Taylor, L., Curran, E., and Watson, S. (1998). Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend.* *51*, 127–140.
- Allette, Y.M., Kim, Y., Randolph, A.L., Smith, J.A., Ripsch, M.S., and White, F.A. (2017). Decoy peptide targeted to Toll-IL-1R domain inhibits LPS and TLR4-active metabolite morphine-3 glucuronide sensitization of sensory neurons. *Sci. Rep.* *7*, 3741.
- Allison, D.J., and Ditor, D.S. (2014). The common inflammatory etiology of depression and cognitive impairment: a therapeutic target. *J. Neuroinflammation* *11*, 151.
- Andersen, G., Christrup, L., and Sjøgren, P. (2003). Relationships among morphine metabolism, pain and side effects during long-term treatment: an update. *J. Pain Symptom Manage.* *25*, 74–91.
- Andersson, D.A., Chase, H.W.N., and Bevan, S. (2004). TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 5364–5369.
- Andrews, N., Harper, S., Issop, Y., and Rice, A.S.C. (2011). Novel, nonreflex tests detect analgesic action in rodents at clinically relevant concentrations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1245*, 11–13.
- Andrews, N., Legg, E., Lisak, D., Issop, Y., Richardson, D., Harper, S., Pheby, T., Huang, W., Burgess, G., Machin, I., et al. (2012). Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* *16*, 485–495.
- Ayranci, G., Befort, K., Lalanne, L., Kieffer, B.L., and Lutz, P.-E. (2015). Dissociation of heroin-induced emotional dysfunction from psychomotor activation and physical dependence among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl.)* *232*, 1957–1971.
- Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* *211*, 39–50.
- Bartlett, S.E., Cramond, T., and Smith, M.T. (1994). The excitatory effects of morphine-3-glucuronide are attenuated by LY274614, a competitive NMDA receptor antagonist, and by midazolam, an agonist at the benzodiazepine site on the GABAA receptor complex. *Life Sci.* *54*, 687–694.
- Basbaum, A.I. (1974). Effects of central lesions on disorders produced by multiple dorsal rhizotomy in rats. *Exp. Neurol.* *42*, 490–501.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* *139*, 267–284.
- Bennett, G.J., and Xie, Y.K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* *33*, 87–107.
- Berta, T., Liu, T., Liu, Y.-C., Xu, Z.-Z., and Ji, R.-R. (2012). Acute morphine activates satellite glial cells and up-regulates IL-1 β in dorsal root ganglia in mice via matrix metalloprotease-9. *Mol. Pain* *8*, 18.
- Bilimoria, P.M., and Stevens, B. (2015). Microglia function during brain development: New insights from animal models. *Brain Res.* *1617*, 7–17.

- Boerner, U. (1975). The metabolism of morphine and heroin in man. *Drug Metab. Rev.* 4, 39–73.
- Bohren, Y., Karavelic, D., Tessier, L.-H., Yalcin, I., Gavériaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., Freund-Mercier, M.-J., and Barrot, M. (2010). Mu-opioid receptors are not necessary for nortriptyline treatment of neuropathic allodynia. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 14, 700–704.
- Bonizzi, G., and Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25, 280–288.
- Breivik, H., Eisenberg, E., O'Brien, T., and OPENMinds (2013). The individual and societal burden of chronic pain in Europe: the case for strategic prioritisation and action to improve knowledge and availability of appropriate care. *BMC Public Health* 13, 1229.
- Brownstein, M.J. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5391–5393.
- Cartier, N., Lewis, C.-A., Zhang, R., and Rossi, F.M.V. (2014). The role of microglia in human disease: therapeutic tool or target? *Acta Neuropathol. (Berl.)* 128, 363–380.
- Chan, H.C.S., McCarthy, D., Li, J., Palczewski, K., and Yuan, S. (2017). Designing Safer Analgesics via μ -Opioid Receptor Pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 1016–1037.
- Charbogne, P., Kieffer, B.L., and Befort, K. (2014). 15 years of genetic approaches in vivo for addiction research: Opioid receptor and peptide gene knockout in mouse models of drug abuse. *Neuropharmacology* 76 Pt B, 204–217.
- Chen, Z., and Trapp, B.D. (2016). Microglia and neuroprotection. *J. Neurochem.* 136 Suppl 1, 10–17.
- Chen, Z.W., and Wang, M.S. (1995). Effects of nerve growth factor on crushed sciatic nerve regeneration in rats. *Microsurgery* 16, 547–551.
- Chinachoti, T., Nilrat, P., and Samarnpiboonphol, P. (2013). Nausea, vomiting and pruritus induced by intrathecal morphine. *J. Med. Assoc. Thail. Chotmaihet Thangphaet* 96, 589–594.
- Christrup, L.L. (1997). Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 41, 116–122.
- Coller, J.K., Christrup, L.L., and Somogyi, A.A. (2009). Role of active metabolites in the use of opioids. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 65, 121–139.
- Colton, C.A. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* 4, 399–418.
- Corder, G., Tawfik, V.L., Wang, D., Sypek, E.I., Low, S.A., Dickinson, J.R., Sotoudeh, C., Clark, J.D., Barres, B.A., Bohlen, C.J., et al. (2017). Loss of μ opioid receptor signaling in nociceptors, but not microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesia. *Nat. Med.* 23, 164–173.
- Cornejo, F., and von Bernhardi, R. (2016). Age-Dependent Changes in the Activation and Regulation of Microglia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 949, 205–226.
- Cui, Y., Liao, X.-X., Liu, W., Guo, R.-X., Wu, Z.-Z., Zhao, C.-M., Chen, P.-X., and Feng, J.-Q. (2008). A novel role of minocycline: attenuating morphine antinociceptive tolerance by inhibition of p38 MAPK in the activated spinal microglia. *Brain. Behav. Immun.* 22, 114–123.

- De Gregori, S., De Gregori, M., Ranzani, G.N., Allegri, M., Minella, C., and Regazzi, M. (2012). Morphine metabolism, transport and brain disposition. *Metab. Brain Dis.* 27, 1–5.
- Deacon, R.M.J. (2006). Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat. Protoc.* 1, 118–121.
- Deacon, R.M.J. (2009). Burrowing: a sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents. *Behav. Brain Res.* 200, 128–133.
- Decosterd, I., and Woolf, C.J. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87, 149–158.
- Dello Russo, C., Lisi, L., Tentori, L., Navarra, P., Graziani, G., and Combs, C.K. (2017). Exploiting Microglial Functions for the Treatment of Glioblastoma. *Curr. Cancer Drug Targets* 17, 267–281.
- Drolet, G., Dumont, E.C., Gosselin, I., Kinkead, R., Laforest, S., and Trottier, J.F. (2001). Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 25, 729–741.
- Due, M.R., Piekarz, A.D., Wilson, N., Feldman, P., Ripsch, M.S., Chavez, S., Yin, H., Khanna, R., and White, F.A. (2012). Neuroexcitatory effects of morphine-3-glucuronide are dependent on Toll-like receptor 4 signaling. *J. Neuroinflammation* 9, 200.
- Elhabazi, K., Trigo, J.M., Mollereau, C., Moulédous, L., Zajac, J.-M., Bihel, F., Schmitt, M., Bourguignon, J.J., Meziane, H., Petit-demoulière, B., et al. (2012). Involvement of neuropeptide FF receptors in neuroadaptive responses to acute and chronic opiate treatments. *Br. J. Pharmacol.* 165, 424–435.
- Ferrini, F., Trang, T., Mattioli, T.-A.M., Laffray, S., Del’Guidice, T., Lorenzo, L.-E., Castonguay, A., Doyon, N., Zhang, W., Godin, A.G., et al. (2013). Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl⁻ homeostasis. *Nat. Neurosci.* 16, 183–192.
- Filliol, D., Ghozland, S., Chluba, J., Martin, M., Matthes, H.W., Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Dierich, A., LeMeur, M., et al. (2000). Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat. Genet.* 25, 195–200.
- Frölich, N., Dees, C., Paetz, C., Ren, X., Lohse, M.J., Nikolaev, V.O., and Zenk, M.H. (2011). Distinct pharmacological properties of morphine metabolites at G(i)-protein and β -arrestin signaling pathways activated by the human μ -opioid receptor. *Biochem. Pharmacol.* 81, 1248–1254.
- Fukagawa, H., Koyama, T., Kakuyama, M., and Fukuda, K. (2013). Microglial activation involved in morphine tolerance is not mediated by toll-like receptor 4. *J. Anesth.* 27, 93–97.
- Gavériaux-Ruff, C. (2013). Opiate-induced analgesia: contributions from mu, delta and kappa opioid receptors mouse mutants. *Curr. Pharm. Des.* 19, 7373–7381.
- Gavériaux-Ruff, C., Karchewski, L.A., Hever, X., Matifas, A., and Kieffer, B.L. (2008). Inflammatory pain is enhanced in delta opioid receptor-knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2558–2567.
- Gendron, L., Pintar, J.E., and Chavkin, C. (2007). Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia. *Neuroscience* 150, 807–817.

- Ghazvini, H., Rezayof, A., Ghasemzadeh, Z., and Zarrindast, M.-R. (2015). μ -Opioid and N-methyl-D-aspartate receptors in the amygdala contribute to minocycline-induced potentiation of morphine analgesia in rats. *Behav. Pharmacol.* *26*, 383–392.
- Goeldner, C., Lutz, P.-E., Darcq, E., Halter, T., Clesse, D., Ouagazzal, A.-M., and Kieffer, B.L. (2011). Impaired emotional-like behavior and serotonergic function during protracted abstinence from chronic morphine. *Biol. Psychiatry* *69*, 236–244.
- Goldmann, T., Wieghofer, P., Müller, P.F., Wolf, Y., Varol, D., Yona, S., Brendecke, S.M., Kierdorf, K., Staszewski, O., Datta, M., et al. (2013). A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nat. Neurosci.* *16*, 1618–1626.
- Grace, P.M., Hutchinson, M.R., Maier, S.F., and Watkins, L.R. (2014). Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 217–231.
- Hameed, H., Hameed, M., and Christo, P.J. (2010). The effect of morphine on glial cells as a potential therapeutic target for pharmacological development of analgesic drugs. *Curr. Pain Headache Rep.* *14*, 96–104.
- Harada, S., Nakamoto, K., and Tokuyama, S. (2013). The involvement of midbrain astrocyte in the development of morphine tolerance. *Life Sci.* *93*, 573–578.
- Hawkins, K.N., Knapp, R.J., Lui, G.K., Gulya, K., Kazmierski, W., Wan, Y.P., Pelton, J.T., Hruby, V.J., and Yamamura, H.I. (1989). [3H]-[H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂] ([3H]CTOP), a potent and highly selective peptide for mu opioid receptors in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *248*, 73–80.
- Hayashi, Y., Morinaga, S., Zhang, J., Satoh, Y., Meredith, A.L., Nakata, T., Wu, Z., Kohsaka, S., Inoue, K., and Nakanishi, H. (2016). BK channels in microglia are required for morphine-induced hyperalgesia. *Nat. Commun.* *7*, 11697.
- Horvath, R.J., Romero-Sandoval, E.A., and De Leo, J.A. (2010). Inhibition of microglial P2X₄ receptors attenuates morphine tolerance, Iba1, GFAP and mu opioid receptor protein expression while enhancing perivascular microglial ED2. *Pain* *150*, 401–413.
- Houmes, R.J., Voets, M.A., Verkaaik, A., Erdmann, W., and Lachmann, B. (1992). Efficacy and safety of tramadol versus morphine for moderate and severe postoperative pain with special regard to respiratory depression. *Anesth. Analg.* *74*, 510–514.
- Hughes, V. (2012). Microglia: The constant gardeners. *Nature* *485*, 570–572.
- Hutchinson, M.R., Northcutt, A.L., Chao, L.W., Kearney, J.J., Zhang, Y., Berkelhammer, D.L., Loram, L.C., Rozeske, R.R., Bland, S.T., Maier, S.F., et al. (2008). Minocycline suppresses morphine-induced respiratory depression, suppresses morphine-induced reward, and enhances systemic morphine-induced analgesia. *Brain. Behav. Immun.* *22*, 1248–1256.
- Hutchinson, M.R., Zhang, Y., Shridhar, M., Evans, J.H., Buchanan, M.M., Zhao, T.X., Slivka, P.F., Coats, B.D., Rezvani, N., Wieseler, J., et al. (2010). Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain. Behav. Immun.* *24*, 83–95.
- Ide, S., Minami, M., Uhl, G.R., Satoh, M., Sora, I., and Ikeda, K. (2011). (-)-Pentazocine induces visceral chemical antinociception, but not thermal, mechanical, or somatic chemical antinociception, in μ -opioid receptor knockout mice. *Mol. Pain* *7*, 23.

- Jankowski, M.P., Rau, K.K., and Koerber, H.R. (2017). Cutaneous TRPM8-expressing sensory afferents are a small population of neurons with unique firing properties. *Physiol. Rep.* 5.
- Jassam, Y.N., Izzy, S., Whalen, M., McGavern, D.B., and El Khoury, J. (2017). Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. *Neuron* 95, 1246–1265.
- Jeon, S.W., and Kim, Y.-K. (2017). Inflammation-induced depression: Its pathophysiology and therapeutic implications. *J. Neuroimmunol.* 313, 92–98.
- Ji, R.-R., and Suter, M.R. (2007). p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol. Pain* 3, 33.
- Ji, R.-R., Gereau, R.W., Malcangio, M., and Strichartz, G.R. (2009). MAP kinase and pain. *Brain Res. Rev.* 60, 135–148.
- Ji, R.-R., Berta, T., and Nedergaard, M. (2013). Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* 154 Suppl 1, S10-28.
- Jirkof, P. (2014). Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *J. Neurosci. Methods* 234, 139–146.
- Jirkof, P., Cesarovic, N., Rettich, A., Nicholls, F., Seifert, B., and Arras, M. (2010). Burrowing behavior as an indicator of post-laparotomy pain in mice. *Front. Behav. Neurosci.* 4, 165.
- Johnson, J.L., Rolan, P.E., Johnson, M.E., Bobrovskaya, L., Williams, D.B., Johnson, K., Tuke, J., and Hutchinson, M.R. (2014). Codeine-induced hyperalgesia and allodynia: investigating the role of glial activation. *Transl. Psychiatry* 4, e482.
- Johnston, I.N., Milligan, E.D., Wieseler-Frank, J., Frank, M.G., Zapata, V., Campisi, J., Langer, S., Martin, D., Green, P., Fleshner, M., et al. (2004). A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 7353–7365.
- Joshi, N., and Singh, S. (2017). Updates on immunity and inflammation in Parkinson disease pathology. *J. Neurosci. Res.*
- Kalsbeek, M.J.T., Mulder, L., and Yi, C.-X. (2016). Microglia energy metabolism in metabolic disorder. *Mol. Cell. Endocrinol.* 438, 27–35.
- Khabbazi, S., Xie, N., Pu, W., Goumon, Y., and Parat, M.-O. (2016). The TLR4-Active Morphine Metabolite Morphine-3-Glucuronide Does Not Elicit Macrophage Classical Activation In Vitro. *Front. Pharmacol.* 7, 441.
- Kieffer, B.L., and Gavériaux-Ruff, C. (2002). Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog. Neurobiol.* 66, 285–306.
- Labella, F.S., Pinsky, C., and Havlicek, V. (1979). Morphine derivatives with diminished opiate receptor potency show enhanced central excitatory activity. *Brain Res.* 174, 263–271.
- Labuz, D., Celik, M.Ö., Zimmer, A., and Machelska, H. (2016). Distinct roles of exogenous opioid agonists and endogenous opioid peptides in the peripheral control of neuropathy-triggered heat pain. *Sci. Rep.* 6, 32799.

- Lahti, R.A., VonVoigtlander, P.F., and Barsuhn, C. (1982). Properties of a selective kappa agonist, U-50,488H. *Life Sci.* *31*, 2257–2260.
- Lalley, P.M. (2008). Opioidergic and dopaminergic modulation of respiration. *Respir. Physiol. Neurobiol.* *164*, 160–167.
- Langford, D.J., Bailey, A.L., Chanda, M.L., Clarke, S.E., Drummond, T.E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., Lacroix-Fralish, M.L., et al. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat. Methods* *7*, 447–449.
- Latremoliere, A., and Woolf, C.J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* *10*, 895–926.
- Laux-Biehlmann, A., Mouheiche, J., Vérièpe, J., and Goumon, Y. (2013). Endogenous morphine and its metabolites in mammals: history, synthesis, localization and perspectives. *Neuroscience* *233*, 95–117.
- Lee, H., Im, J., Won, H., Nam, W., Kim, Y.O., Lee, S.W., Lee, S., Cho, I.-H., Kim, H.-K., Kwon, J.-T., et al. (2017). Effects of tianeptine on symptoms of fibromyalgia via BDNF signaling in a fibromyalgia animal model. *Korean J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Korean Physiol. Soc. Korean Soc. Pharmacol.* *21*, 361–370.
- Lewis, S.S., Hutchinson, M.R., Rezvani, N., Loram, L.C., Zhang, Y., Maier, S.F., Rice, K.C., and Watkins, L.R. (2010). Evidence that intrathecal morphine-3-glucuronide may cause pain enhancement via toll-like receptor 4/MD-2 and interleukin-1beta. *Neuroscience* *165*, 569–583.
- Liang, D., Shi, X., Qiao, Y., Angst, M.S., Yeomans, D.C., and Clark, J.D. (2008). Chronic morphine administration enhances nociceptive sensitivity and local cytokine production after incision. *Mol. Pain* *4*, 7.
- Liu, Y.-C., Berta, T., Liu, T., Tan, P.-H., and Ji, R.-R. (2012). Acute morphine induces matrix metalloproteinase-9 up-regulation in primary sensory neurons to mask opioid-induced analgesia in mice. *Mol. Pain* *8*, 19.
- Loh, H.H., Liu, H.C., Cavalli, A., Yang, W., Chen, Y.F., and Wei, L.N. (1998). mu Opioid receptor knockout in mice: effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *54*, 321–326.
- Lötsch, J. (2009). Pleiotropic effects of morphine-6beta-glucuronide. *Anesthesiology* *110*, 1209–1210.
- Mansikka, H., Zhou, L., Donovan, D.M., Pertovaara, A., and Raja, S.N. (2002). The role of mu-opioid receptors in inflammatory hyperalgesia and alpha 2-adrenoceptor-mediated antihyperalgesia. *Neuroscience* *113*, 339–349.
- Mansikka, H., Zhao, C., Sheth, R.N., Sora, I., Uhl, G., and Raja, S.N. (2004). Nerve injury induces a tonic bilateral mu-opioid receptor-mediated inhibitory effect on mechanical allodynia in mice. *Anesthesiology* *100*, 912–921.
- Martin, M., Matifas, A., Maldonado, R., and Kieffer, B.L. (2003). Acute antinociceptive responses in single and combinatorial opioid receptor knockout mice: distinct mu, delta and kappa tones. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 701–708.

- Matthes, H.W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dollé, P., et al. (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383, 819–823.
- Mattioli, T.A., Leduc-Pessah, H., Skelhorne-Gross, G., Nicol, C.J.B., Milne, B., Trang, T., and Cahill, C.M. (2014). Toll-like receptor 4 mutant and null mice retain morphine-induced tolerance, hyperalgesia, and physical dependence. *PLoS One* 9, e97361.
- Mehendale, S.R., and Yuan, C.-S. (2006). Opioid-induced gastrointestinal dysfunction. *Dig. Dis. Basel Switz.* 24, 105–112.
- Mélik Parsadaniantz, S., Rivat, C., Rostène, W., and Réaux-Le Goazigo, A. (2015). Opioid and chemokine receptor crosstalk: a promising target for pain therapy? *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 69–78.
- Mick, G., Perrot, S., Poulain, P., Serrie, A., Eschaliér, A., Langley, P., Pomerantz, D., and Ganry, H. (2013). Impact sociétal de la douleur en France : résultats de l'enquête épidémiologique National Health and Wellness Survey auprès de plus de 15 000 personnes adultes. *Douleurs Eval. - Diagn. - Trait.* 14, 57–66.
- Mickle, A.D., Shepherd, A.J., and Mohapatra, D.P. (2015). Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 131, 73–118.
- Mignat, C., Wille, U., and Ziegler, A. (1995). Affinity profiles of morphine, codeine, dihydrocodeine and their glucuronides at opioid receptor subtypes. *Life Sci.* 56, 793–799.
- Mika, J. (2008). Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness. *Pharmacol. Rep.* 60, 297–307.
- Mika, J., Osikowicz, M., Makuch, W., and Przewlocka, B. (2007). Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 560, 142–149.
- Mika, J., Wawrzczak-Bargiela, A., Osikowicz, M., Makuch, W., and Przewlocka, B. (2009). Attenuation of morphine tolerance by minocycline and pentoxifylline in naive and neuropathic mice. *Brain. Behav. Immun.* 23, 75–84.
- Mika, J., Zychowska, M., Popiolek-Barczyk, K., Rojewska, E., and Przewlocka, B. (2013). Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 716, 106–119.
- Miller, A.L., and Leach, M.C. (2015). The Mouse Grimace Scale: A Clinically Useful Tool? *PLoS One* 10, e0136000.
- Mogil, J.S. (2009). Animal models of pain: progress and challenges. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 283–294.
- Mohan, S., Davis, R.L., DeSilva, U., and Stevens, C.W. (2010). Dual regulation of mu opioid receptors in SK-N-SH neuroblastoma cells by morphine and interleukin-1 β : evidence for opioid-immune crosstalk. *J. Neuroimmunol.* 227, 26–34.
- Montague, K., and Malcangio, M. (2017). The Therapeutic Potential of Monocyte/Macrophage Manipulation in the Treatment of Chemotherapy-Induced Painful Neuropathy. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 397.

- Nadal, X., La Porta, C., Andreea Bura, S., and Maldonado, R. (2013). Involvement of the opioid and cannabinoid systems in pain control: new insights from knockout studies. *Eur. J. Pharmacol.* *716*, 142–157.
- Nazemi, S., Manaheji, H., Zaringhalam, J., Sadeghi, M., and Haghparast, A. (2012). Post-injury repeated administrations of minocycline improve the antinociceptive effect of morphine in chronic constriction injury model of neuropathic pain in rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *102*, 520–525.
- Ndong, C., Landry, R.P., DeLeo, J.A., and Romero-Sandoval, E.A. (2012). Mitogen activated protein kinase phosphatase-1 prevents the development of tactile sensitivity in a rodent model of neuropathic pain. *Mol. Pain* *8*, 34.
- Negus, S.S., Gatch, M.B., Mello, N.K., Zhang, X., and Rice, K. (1998). Behavioral effects of the delta-selective opioid agonist SNC80 and related compounds in rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *286*, 362–375.
- Obara, I., Parkitna, J.R., Korostynski, M., Makuch, W., Kaminska, D., Przewlocka, B., and Przewlocki, R. (2009). Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. *Pain* *141*, 283–291.
- Pan, Y., Thapa, D., Baldissera, L., Argunhan, F., Aubdool, A.A., and Brain, S.D. (2017). Relevance of TRPA1 and TRPM8 channels as vascular sensors of cold in the cutaneous microvasculature. *Pflugers Arch.*
- Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., and Gan, W.-B. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* *155*, 1596–1609.
- Pol, O., Murtra, P., Caracuel, L., Valverde, O., Puig, M.M., and Maldonado, R. (2006). Expression of opioid receptors and c-fos in CB1 knockout mice exposed to neuropathic pain. *Neuropharmacology* *50*, 123–132.
- Pradhan, A.A., Befort, K., Nozaki, C., Gavériaux-Ruff, C., and Kieffer, B.L. (2011). The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* *32*, 581–590.
- Prinz, M., and Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 300–312.
- Prinz, M., Erny, D., and Hagemeyer, N. (2017). Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nat. Immunol.* *18*, 385–392.
- Qiu, C., Sora, I., Ren, K., Uhl, G., and Dubner, R. (2000). Enhanced delta-opioid receptor-mediated antinociception in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur. J. Pharmacol.* *387*, 163–169.
- Raghavendra, V., Rutkowski, M.D., and DeLeo, J.A. (2002). The role of spinal neuroimmune activation in morphine tolerance/hyperalgesia in neuropathic and sham-operated rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 9980–9989.
- Raghavendra, V., Tanga, F., and DeLeo, J.A. (2003). Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *306*, 624–630.

- Raghavendra, V., Tanga, F.Y., and DeLeo, J.A. (2004). Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur. J. Neurosci.* 20, 467–473.
- Rawls, S.M., Hewson, J.M., Inan, S., and Cowan, A. (2005). Brain delta2 opioid receptors mediate SNC-80-evoked hypothermia in rats. *Brain Res.* 1049, 61–69.
- Reiss, D., Ceredig, R.A., Secher, T., Boué, J., Barreau, F., Dietrich, G., and Gavériaux-Ruff, C. (2017). Mu and delta opioid receptor knockout mice show increased colonic sensitivity. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 21, 623–634.
- Rivat, C., and Ballantyne, J. (2016). The dark side of opioids in pain management: basic science explains clinical observation. *PAIN Rep.* 1, e570.
- Roeckel, L.-A., Le Coz, G.-M., Gavériaux-Ruff, C., and Simonin, F. (2016). Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. *Neuroscience* 338, 160–182.
- Roeckel, L.-A., Utard, V., Reiss, D., Mouheiche, J., Maurin, H., Robé, A., Audouard, E., Wood, J.N., Goumon, Y., Simonin, F., et al. (2017). Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. *Sci. Rep.* 7, 10406.
- Saraiva, J., Oliveira, S.M., Rocha-Sousa, A., and Leite-Moreira, A. (2004). Opioid receptors and preconditioning of the heart. *Rev. Port. Cardiol. Orgao Of. Soc. Port. Cardiol. Port. J. Cardiol. Off. J. Port. Soc. Cardiol.* 23, 1317–1333.
- Schmidt, W.K., Tam, S.W., Sholtzberger, G.S., Smith, D.H., Clark, R., and Vernier, V.G. (1985). Nalbuphine. *Drug Alcohol Depend.* 14, 339–362.
- Schmidt, Y., Gavériaux-Ruff, C., and Machelska, H. (2013). μ -Opioid receptor antibody reveals tissue-dependent specific staining and increased neuronal μ -receptor immunoreactivity at the injured nerve trunk in mice. *PloS One* 8, e79099.
- Schroeter, M.L., Sacher, J., Steiner, J., Schoenknecht, P., and Mueller, K. (2013). Serum S100B represents a new biomarker for mood disorders. *Curr. Drug Targets* 14, 1237–1248.
- Schuller, A.G., King, M.A., Zhang, J., Bolan, E., Pan, Y.X., Morgan, D.J., Chang, A., Czick, M.E., Unterwald, E.M., Pasternak, G.W., et al. (1999). Retention of heroin and morphine-6 beta-glucuronide analgesia in a new line of mice lacking exon 1 of MOR-1. *Nat. Neurosci.* 2, 151–156.
- Schwartz, E.S., La, J.-H., Scheff, N.N., Davis, B.M., Albers, K.M., and Gebhart, G.F. (2013). TRPV1 and TRPA1 antagonists prevent the transition of acute to chronic inflammation and pain in chronic pancreatitis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 5603–5611.
- Seltzer, Z., Dubner, R., and Shir, Y. (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43, 205–218.
- Shavit, Y., Wolf, G., Goshen, I., Livshits, D., and Yirmiya, R. (2005). Interleukin-1 antagonizes morphine analgesia and underlies morphine tolerance. *Pain* 115, 50–59.
- Skolnick, P., Davis, H., Arnette, D., and Deaver, D. (2014). Translational potential of naloxone and naltrexone as TLR4 antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 431–432.

- Sora, I., Takahashi, N., Funada, M., Ujike, H., Revay, R.S., Donovan, D.M., Miner, L.L., and Uhl, G.R. (1997). Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 1544–1549.
- Sora, I., Li, X.F., Funada, M., Kinsey, S., and Uhl, G.R. (1999). Visceral chemical nociception in mice lacking mu-opioid receptors: effects of morphine, SNC80 and U-50,488. *Eur. J. Pharmacol.* *366*, R3-5.
- Sorge, R.E., Mapplebeck, J.C.S., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J.K., Martin, L.J., Austin, J.-S., Sotocinal, S.G., Chen, D., et al. (2015). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat. Neurosci.* *18*, 1081–1083.
- Sridharan, K., and Sivaramakrishnan, G. (2017). Drugs for Treating Opioid-Induced Constipation: A Mixed Treatment Comparison Network Meta-analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. *J. Pain Symptom Manage.*
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., and Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* *85*, 367–370.
- Stirling, L.C., Forlani, G., Baker, M.D., Wood, J.N., Matthews, E.A., Dickenson, A.H., and Nassar, M.A. (2005). Nociceptor-specific gene deletion using heterozygous NaV1.8-Cre recombinase mice. *Pain* *113*, 27–36.
- Taves, S., Berta, T., Chen, G., and Ji, R.-R. (2013). Microglia and spinal cord synaptic plasticity in persistent pain. *Neural Plast.* *2013*, 753656.
- Tian, M., Broxmeyer, H.E., Fan, Y., Lai, Z., Zhang, S., Aronica, S., Cooper, S., Bigsby, R.M., Steinmetz, R., Engle, S.J., et al. (1997). Altered hematopoiesis, behavior, and sexual function in mu opioid receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* *185*, 1517–1522.
- Tremblay, M.-È. (2011). The role of microglia at synapses in the healthy CNS: novel insights from recent imaging studies. *Neuron Glia Biol.* *7*, 67–76.
- Truong, W., Cheng, C., Xu, Q.-G., Li, X.-Q., and Zochodne, D.W. (2003). Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. *Ann. Neurol.* *53*, 366–375.
- Ueda, H., and Inoue, M. (2001). [Animal models and peripheral nociception tests for the study of neuropathic pain]. *Nihon Yakurigaku Zasshi Folia Pharmacol. Jpn.* *118*, 89–95.
- Volkers, L., Mechoukhi, Y., and Coste, B. (2015). Piezo channels: from structure to function. *Pflugers Arch.* *467*, 95–99.
- Walwyn, W.M., Chen, W., Kim, H., Minasyan, A., Ennes, H.S., McRoberts, J.A., and Marvizón, J.C.G. (2016). Sustained Suppression of Hyperalgesia during Latent Sensitization by μ -, δ -, and κ -opioid receptors and α 2A Adrenergic Receptors: Role of Constitutive Activity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *36*, 204–221.
- Wang, X.-W., Li, T.-T., Zhao, J., Mao-Ying, Q.-L., Zhang, H., Hu, S., Li, Q., Mi, W.-L., Wu, G.-C., Zhang, Y.-Q., et al. (2012). Extracellular signal-regulated kinase activation in spinal astrocytes and microglia contributes to cancer-induced bone pain in rats. *Neuroscience* *217*, 172–181.
- Webster, L.R. (2017). Risk Factors for Opioid-Use Disorder and Overdose. *Anesth. Analg.* *125*, 1741–1748.

- Weibel, R., Reiss, D., Karchewski, L., Gardon, O., Matifas, A., Filliol, D., Becker, J.A.J., Wood, J.N., Kieffer, B.L., and Gaveriaux-Ruff, C. (2013). Mu opioid receptors on primary afferent nav1.8 neurons contribute to opiate-induced analgesia: insight from conditional knockout mice. *PLoS One* 8, e74706.
- Williams, J.T., Christie, M.J., and Manzoni, O. (2001). Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol. Rev.* 81, 299–343.
- Xie, N., Gomes, F.P., Deora, V., Gregory, K., Vithanage, T., Nassar, Z.D., Cabot, P.J., Sturgess, D., Shaw, P.N., and Parat, M.-O. (2017). Activation of μ -opioid receptor and Toll-like receptor 4 by plasma from morphine-treated mice. *Brain. Behav. Immun.* 61, 244–258.
- Yang, C.-N., Shiao, Y.-J., Shie, F.-S., Guo, B.-S., Chen, P.-H., Cho, C.-Y., Chen, Y.-J., Huang, F.-L., and Tsay, H.-J. (2011). Mechanism mediating oligomeric A β clearance by naïve primary microglia. *Neurobiol. Dis.* 42, 221–230.
- Zhang, J., and De Koninck, Y. (2006). Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J. Neurochem.* 97, 772–783.
- Zhang, Z., and Schulteis, G. (2008). Withdrawal from acute morphine dependence is accompanied by increased anxiety-like behavior in the elevated plus maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 89, 392–403.
- Zhang, X., Wang, J., Yu, T., Du, D., and Jiang, W. (2015). Minocycline can delay the development of morphine tolerance, but cannot reverse existing tolerance in the maintenance period of neuropathic pain in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 42, 94–101.
- Zhuang, Z.-Y., Gerner, P., Woolf, C.J., and Ji, R.-R. (2005). ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain* 114, 149–159.
- Zychowska, M., Rojewska, E., Kreiner, G., Nalepa, I., Przewlocka, B., and Mika, J. (2013). Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. *J. Neuroimmunol.* 262, 35–45.

CHAPITRE II :

**Interactions entre les systèmes opioïde et cannabinoïde
dans l'antinociception, le sevrage, la récompense et des
comportements naturels.**

CHAPITRE II : Interactions entre les systèmes opioïde et cannabinoïde dans l'antinociception, le sevrage, la récompense et des comportements naturels.

PREFACE

Ce chapitre II présente les études réalisées depuis avril 2016, soit lors de ma seconde partie de thèse, au Laboratoire de Neurosciences cognitives et Adaptatives (LNCA), dans l'équipe Neuroadaptations induites par les psychostimulants, et sous la direction de Katia Befort. Ce travail étudie les interactions entre systèmes opioïdes et cannabinoïdes dans la dépendance physique, la nociception et le bien-être.

Ce chapitre II de thèse est composé de deux projets, dont les résultats feront l'objet de publications. Le projet III porte sur la caractérisation comportementale d'un agoniste sélectif du récepteur CB1, l'arachidonyl-2-chloroethylamide ou ACEA, et le rôle des récepteurs opioïdes Mu et Delta dans ces réponses. Le manuscrit en préparation est présenté dans la partie III de ce chapitre.

Cette caractérisation des effets d'un tel agoniste CB1 sur la nociception et des comportements associés au bien-être, nous a permis d'entreprendre de plus amples études utilisant ce composé. En effet, par la suite, nous avons étudié l'effet d'un prétraitement ACEA sur l'antinociception morphinique et les comportements associés à l'addiction morphinique, et avons complété les résultats comportementaux observés avec des études mécanistiques de régulations de gènes des systèmes opioïdes, cannabinoïdes et de l'inflammation ainsi que des études d'expression et d'activité des récepteurs CB1 et/ou Mu. L'objectif général étant de déterminer les avantages thérapeutiques d'un tel cotraitement et de montrer les interactions entre les systèmes opioïdes et cannabinoïdes. Les résultats de cette étude sont présentés dans le projet IV.

Comme pour le chapitre I, l'introduction de ce chapitre est générale aux projets III et IV, et complémentaire de ce qui a déjà été décrit dans le chapitre I. Les matériels et méthodes, descriptions des résultats et discussions sont propres à chaque projet.

INTRODUCTION

I. Généralités sur l'addiction aux opiacés

A. Définitions, chiffres et enjeux sociétaux

L'addiction est une maladie psychiatrique chronique et complexe, qui s'installe lentement et progressivement. A cause de sa complexité, il est parfois difficile de l'identifier clairement. Classiquement, elle est définie comme une consommation compulsive de substances, une perte de contrôle de la consommation malgré les effets néfastes et une rechute qui se caractérise par une reprise de la consommation même après de longues périodes d'abstinence (Maldonado, 2010).

Afin de simplifier la mise en place du diagnostic clinique, et d'utiliser des protocoles rigoureux et reproductibles, deux méthodes principales de classification ont été proposées :

- l'association américaine de psychiatrie a élaboré un manuel diagnostic et statistique des troubles mentaux appelé DSM (diagnostic and statistical manual of mental disorders). Plusieurs versions ont été rédigées, la dernière date de 2013 et correspond au DMS-V.
- l'organisation mondiale de la santé (OMS), a proposé une classification internationale des maladies ou CIM. La dernière version remonte à 2008, et porte le nom de CIM-10. La CIM-11 est programmée pour 2018.

En psychiatrie, et plus particulièrement dans le domaine de l'addiction, la classification la plus utilisée est celle du DSM. Cependant, il est important de noter que le DSM-V et le DSM-IV comportent des points de discorde. En effet dans l'ancienne version, le DSM-IV, une distinction était faite entre les notions d'abus et de dépendance, caractéristiques de l'addiction. Dans la dernière version, le DMS-V, ces distinctions ne sont plus présentes et sont regroupées sous le nom de «troubles liés à l'usage de substances».

Afin d'être les plus exhaustifs possible, nous avons choisi de décrire les critères du DSM-IV, et de discuter des révisions du DSM-V dans le paragraphe suivant.

Le DSM-IV définit trois types d'utilisation des substances psychoactives, qui sont l'**usage**, l'**abus** et la **dépendance**.

L'**usage** est une consommation n'entraînant aucune complication somatique, ou dommage psychique.

L'**abus** est une utilisation inadéquate menant à une souffrance cliniquement significative ou à un dysfonctionnement.

Selon le DSM-IV, elle est caractérisée par la présence d'une des manifestations suivantes au cours d'une période de 12 mois:

1. Usage récurrent d'une substance résultant à une incapacité à remplir des obligations quotidiennes majeures au travail ou à la maison.

Exemples: absentéisme répété ; baisse des performances; négligences répétées.

2. Utilisation récurrente d'une substance dans des situations dangereuses.

Exemples: conducteur de véhicules ou manutentionnaire de machines dangereuses.

3. Problèmes légaux répétés induits par la consommation de substances.

Exemple: arrestation pour comportement suspect suite à la consommation de substances.

4. Persistance de la consommation de substances malgré un déficit d'interactions sociales, des problèmes relationnels causés ou exacerbés par cette consommation.

Exemples: disputes avec ses proches liés à l'état d'intoxication, violences physiques par perte de contrôle.

La **dépendance** à une substance, est une utilisation qui mène également à un dysfonctionnement ou une détresse, et elle est caractérisée par au moins trois des manifestations suivantes sur une période de 12 mois :

1. Tolérance à la substance qui se traduit par la nécessité de doses plus importantes pour obtenir l'effet désiré.

2. Syndrome de sevrage qui se caractérise par la nécessité de devoir reprendre d'une substance afin d'éviter les symptômes du sevrage.

3. Augmentation du dosage ou de la durée des prises de la substance.

4. Efforts infructueux d'arrêt ou de diminution de la consommation.

5. Chronophagie importante en faveur de recherche de la substance, de sa consommation ou de la récupération de ses effets.

6. Abandon ou diminution de nombreuses activités sociales ou de loisirs en raison de l'utilisation de la substance.

7. Persistance de la consommation malgré l'apparition d'un problème physique ou psychologique causé ou exacerbé par la consommation de cette substance.

Comme évoqué précédemment, le DSM-V ne fait plus la distinction entre abus et dépendance. Plusieurs raisons sont à l'origine de cette reconsidération de la classification. L'abus était initialement considéré comme un ensemble de symptômes annonciateurs de la dépendance, mais cette considération a depuis été remise en cause par plusieurs études (Grant et al., 2001; Schuckit et al., 2001, 2008). Ensuite, le diagnostic de l'abus serait difficilement reproductible comparativement à celui de la dépendance (Hasin and Beseler, 2009). De plus, le DSM-V ajoute un critère de diagnostique qui est le *craving*, c'est-à-dire le fort désir de consommer la substance. Il y a donc 11 critères dans cette nouvelle version du DSM.

A partir de ces critères d'abus ou de dépendance décrits dans le DSM-IV, et complétés par le *craving* dans le DSM-V, il est possible de déterminer la sévérité de la pathologie. L'occurrence de 2-3 symptômes est considérée comme un stade léger, celle de 4-5 symptômes comme un stade modéré, alors que l'occurrence de plus de 5 de ces symptômes est plutôt considérée comme un stade sévère d'addiction. De plus, il est important de noter que l'âge de la première consommation, ainsi que l'existence parallèle d'une pathologie psychiatrique constituent des facteurs de risque de la dépendance, pouvant influencer également le degré d'addiction (Camí and Farré, 2003).

Ces critères permettent d'établir un diagnostic universel de l'addiction, mais il est important de souligner que chaque substance d'abus possède ses caractéristiques propres, dépendantes du mode d'administration et des doses utilisées.

Le degré d'addiction peut être tel que le patient perd tout contrôle de sa consommation, ce qui peut mener à des overdoses parfois fatales. Dans ce contexte, les personnes dépendantes aux opiacés présentent une surmortalité importante par rapport aux consommateurs d'autres drogues (Warner et al., 2011; pour revue, Chou et al., 2015).

De façon générale, la consommation de substances induisant une dépendance est un problème considérable de notre société. Ces substances incluent les drogues illicites (ex : cocaïne, amphétamines, cannabis, ecstasy), mais aussi l'alcool et le tabac. Ensemble, la consommation de ces composés participe au développement d'une grande majorité des pathologies responsables de la mortalité mondiale (Degenhardt et al., 2013; Rehm et al., 2006). Un rapport de 2015 du centre européen pour les drogues et l'addiction aux drogues indique qu'au moins un quart de la population européenne a déjà consommé une drogue illégale, et 4 % de la population européenne est considérée comme dépendante à l'alcool ou aux drogues (Wittchen et al., 2011). D'après un rapport de l'organisation mondiale de la santé (WHO) de 2012, le tabac, à lui seul, tue plus d'européens que n'importe quel autre facteur de risque. Sans compter l'implication de ces substances dans de nombreux décès, il est également important de noter que les répercussions sont bien plus vastes. En effet, le coût sociétal de la consommation de ces substances est énorme, tout d'abord à cause de la comorbidité associée à leur consommation, mais aussi à cause de leurs effets invalidants. Comme décrit par le DSM, un patient souffrant d'addiction va être amené à s'isoler progressivement et à cesser la plus grande partie de ses activités sociales et professionnelles. Ainsi, cette partie de la société a tendance à se marginaliser. L'étude réalisée par Barrio et collaborateurs, portant sur près de 43 publications, permet d'estimer le coût européen moyen de ces consommations d'abus à 0,1-0,4% du PIB pour les drogues illicites; 0,3-1,2% du PIB pour le tabac et 2-3% du PIB pour l'alcool (Barrio et al., 2017). Ce qui est particulièrement alarmant est le fait que la consommation de drogues illicites a considérablement augmenté ces dix dernières années (United nations office on drugs and crime,

UNODC, 2017), et particulièrement la consommation d'opiacés et de cannabis. La consommation de ces substances et leur revente étant illicite, cette hausse de la consommation favorise le développement du marché noir et de la criminalité associée au trafic de drogue. En effet, le trafic de drogues est associé à près de 35% des affaires de crime organisé, et les revenus générés par ces activités servent massivement à financer le terrorisme et l'achat d'armes. De ce fait, la consommation de drogues illicites génère un nombre inestimable de victimes directes, mais aussi indirectes.

Ces dernières années, les opioïdes et cannabinoïdes de synthèse ont vu leur production grimper en flèche (d'après le rapport de 2017 de l'UNODC, basé sur le nombre de saisies ; www.unodc.org/wdr2017). Cela n'est pas sans conséquence: ces analogues sont souvent bien plus puissants et donc associés à l'apparition d'un plus grand nombre d'effets secondaires, et possèdent parfois un potentiel addictogène plus important.

Mieux comprendre l'addiction et la dépendance aux drogues, et ainsi permettre de trouver des solutions pour les patients, doit aujourd'hui représenter une priorité.

B. Traitements de la dépendance aux opiacés

Actuellement, une approche multidisciplinaire est utilisée pour prendre en charge l'addiction et la dépendance aux drogues. Elle fait intervenir un consortium de professionnels de la santé comme des psychologues, des psychiatres, des médecins, infirmiers et des travailleurs sociaux. Le but est d'établir un profil du patient précisant son mode de consommation (voie d'administration) afin de mieux définir les risques, mais aussi de limiter au maximum le développement de risques infectieux associés (VIH, hépatites). Ensuite, la prise en charge thérapeutique est envisagée.

Comme évoqué précédemment, les opiacés induisent une forte dépendance et sont surtout responsables du plus grand nombre de décès par overdoses (Warner et al., 2011; pour revue, Chou et al., 2015). Les traitements actuels reposent principalement sur l'utilisation de substituts aux opiacés (TSO), représentés par la buprénorphine (Subutex®) et la méthadone (Méthadone®) (recommandations de la Haute Autorité de Santé, HAS, 2004).

Les opiacés possèdent des effets récompensants et euphorisants qui sont médiés par le récepteur opioïde Mu (Matthes et al., 1996; pour plus de détails sur la composition du système opioïde, cf [Chapitre I, Introduction, III. Le système opioïde](#)). Parmi les opiacés, l'héroïne est considérée comme étant la molécule au plus fort potentiel de dépendance. L'héroïne a été synthétisée en 1894, par diacétylation de la morphine. D'un point de vue pharmacocinétique, l'héroïne ($t_{1/2}=3\text{min}$; Jenkins et al., 1994) franchit très rapidement la barrière hématoencéphalique (BHE), de par sa lipophilie, ce qui lui permet d'atteindre des taux cérébraux élevés d'opiacés, contrairement à d'autres molécules moins lipophiles, comme la morphine ($t_{1/2}=19\text{min}$; Jenkins et al., 1994), qui subiront l'effet du métabolisme en périphérie avant d'atteindre le cerveau et seront présentes en concentration cérébrale inférieure.

Une fois la BHE franchit, l'héroïne est rapidement dé-acétylée en 6-monoacétyl-morphine (6-MAM), et en morphine. La morphine résiduelle est alors à son tour métabolisée en M6G et M3G comme décrit dans le [Chapitre 1, Introduction, IV. Rôle du métabolite de la morphine, la morphine-3-b-glucuronide dans l'hyperalgie morphinique](#). Il est admis que l'héroïne possède une faible affinité pour le récepteur opioïde Mu par rapport à ses métabolites (Selley et al., 2001). De ce fait, elle est considérée comme une « pro-drogue » qui permettrait d'atteindre des concentrations cérébrales plus importantes de morphine ou de 6-MAM (Andersen et al., 2009; Selley et al., 2001). Pour l'ensemble de ses raisons, l'héroïne est décrite comme induisant un « effet flash » (Rook et al., 2006). Au contraire, d'autres drogues possèdent une pharmacocinétique plus lente. C'est le cas de la buprénorphine et de la méthadone administrées per os ou par voie sublinguale. De par leur cinétique plus lente, une seule prise par jour permet de limiter le développement de sevrage, tout en étant dénué d'effet euphorisant, ce qui justifie leur utilisation comme traitements de substitution (HAS, 2004). En France, la buprénorphine représente 80% des prescriptions de TSO contre 20% pour la méthadone. Tous deux possèdent une longue durée d'action (Ferrari et al., 2004) et diminuent le craving (Fudala et al., 2003; Shi et al., 2007). La buprénorphine est un ligand mixte des récepteurs opioïdes : c'est un agoniste partiel du récepteur opioïde Mu et un antagoniste du récepteur Kappa (Khanna and Pillarisetti, 2015).

A cause de son activité sur le récepteur Kappa, son utilisation peut être associée à des troubles de l'anxiété (pour principaux effets de l'activation des récepteurs opioïdes, cf [Figure 5](#)). La méthadone, quant à elle, est un agoniste sélectif du récepteur opioïde Mu et son utilisation n'est donc pas associée à des troubles dysphoriques, mais peut-être associée à une dépression respiratoire de par sa sélectivité pour le récepteur Mu (Chavoustie et al., 2017).

D'autres traitements que les TSO, ciblant également le système opioïde, ont été développés pour lutter contre la dépendance aux opiacés. Citons comme exemple la naltrexone (NTX), qui est un agoniste non sélectif des trois récepteurs opioïdes et qui possède une demi-vie longue ($t_{1/2}=4h$; (Ornellas and Chavez, 2011)). Cependant, son utilisation semble moins efficace que les TSO, comme la méthadone ou la buprénorphine (Ahmadi, 2003; Ahmadi and Ahmadi, 2003). Néanmoins, l'utilisation d'implants sous-cutanés permettant une libération de NTX prolongée sur une période de 15 jours permet d'obtenir des résultats de sevrage encourageants (Hulse et al., 2009; Tiihonen et al., 2012). La naloxone, un autre antagoniste non sélectif des récepteurs opioïdes est plutôt utilisé pour le traitement des surdosages opiacés car il possède une demi-vie courte (60 min) par rapport à la naltrexone (Clarke et al., 2005; Pace et al., 1979).

L'usage de ces traitements de substitution a permis de diminuer la mortalité globale par overdose et également de diminuer les risques infectieux associés (VIH), et a également permis une réintégration sociale de ces patients (Caplehorn et al., 1996; Metzger et al., 1993).

Cependant, cela a aussi mené au développement d'une autre forme de consommation d'abus, liée cette fois-ci à la primodépendance et à la consommation inappropriée des TSO eux-mêmes. A l'heure actuelle, la primo-prescription de TSO peut-être réalisée par tous les médecins et la part de prescriptions de TSO en France réalisée par les psychiatres est minime (Revnaud-Maurupt et al., 2005). Pourtant, au vu de la complexité de cette pathologie, et de la comorbidité associée, une prise en charge faisant intervenir une équipe pluridisciplinaire reste la plus appropriée.

C. Comorbidité de l'addiction

La comorbidité est définie comme la présence, simultanée ou non, d'au minimum deux pathologies chez un même individu au cours d'une période donnée (Cerdá et al., 2008).

Les drogues d'abus sont souvent associées au développement de diverses pathologies. Pour ces raisons, la description des risques de comorbidité de l'addiction que nous ferons ici ne sera donc pas exhaustive.

Alors que certaines drogues se fument, d'autres se consomment par injections. Ce mode de consommation représente à lui seul un risque important pour la santé des consommateurs et peut induire des maladies associées. En effet, les risques de transmission de maladies par voie sanguine sont aujourd'hui bien décrits et les organismes de santé publique visent à prévenir au maximum les consommateurs de ces risques. Concrètement, le risque de contracter une telle maladie se présente chez les sujets qui s'injectent des substances dans des conditions sanitaires médiocres et qui ne respectent pas la règle d'usage unique des seringues. Les maladies les plus représentées dans ce contexte, sont les hépatites et le VIH. Ces maladies sont d'autant plus virulentes chez les sujets affaiblis. Nous avons vu que les traitements répétés avec des agonistes des récepteurs Mu, comme la morphine, mènent à des dérégulations du système immunitaire ([Chapitre I; Introduction, IV](#)) et la consommation chronique de telles substances faciliterait donc ces pathologies en cas d'exposition au pathogène.

L'addiction est associée à d'autres types de comorbidité comme la dépression. Les patients souffrant d'addiction à des substances psychoactives sont dépressifs dans 14.5% des cas alors que le pourcentage de patients dépressifs dans la population générale représente 7.2% (Grant et al., 2004, d'après l'étude du National Epidemiologic Survey on Alcohol and related conditions –NESARC-). Les individus souffrant d'addiction sont donc 2 fois plus dépressifs que les autres sujets. Réciproquement, 19.2% des patients dépressifs présentent une dépendance, alors que seulement 4.1% de la population générale est considérée dépendante. Ces chiffres indiquent qu'il y a un vrai lien entre ces deux

pathologies et que les sujets dépressifs sont à considérer avec précaution au vu des risques d'addiction accrus auxquels ils sont exposés.

Enfin, un autre risque de comorbidité à l'addiction élevé est l'hypersensibilité qui se marque soit par une allodynie ou une diminution des seuils de nociception. Nous avons déjà abordé cet aspect dans le [Chapitre I](#), lorsque nous avons montré qu'un traitement répété avec des opiacés entraînait l'apparition d'hypersensibilités appelées aussi hyperalgies. Dans le [Chapitre I](#), ces hypersensibilités étaient présentées comme une conséquence thérapeutique, à savoir la prise en charge de la douleur par les opiacés. Seulement, dans un contexte d'addiction, il y a aussi une exposition répétée à ces opiacés, et les conséquences sont donc similaires, à savoir le développement d'hypersensibilités.

Bien que d'autres associations thérapeutiques existent, ciblant d'autres systèmes que le système opioïde, pour soulager la douleur (Kremer et al., 2016; Roeckel et al., 2017), les consommateurs habituels d'opiacés représentent des populations difficiles à prendre en charge sur le plan de la douleur du fait des hypersensibilités auxquels ils sont sujets

D. Modèles précliniques de la dépendance et de la dépression

Dans cette partie, nous axerons notre étude sur les principaux modèles utilisés pour étudier l'impact des opiacés et cannabinoïdes dans les processus émotionnels induits par ces drogues.

1. Modèles de dépendance

La modélisation de la dépendance chez l'animal, et plus particulièrement le rongeur, est complexe.

A ce jour, un modèle simple et classiquement utilisé à une **administration passive de drogues**.

L'expérimentateur administre de différentes façons (injections, mini-pompes, voie orale) la drogue à l'animal, sous des durées et des fréquences variables selon les études. Ce modèle permet d'étudier les effets pharmacologiques directs des drogues, tout en étant simple à mettre en œuvre. Les données utilisant ce modèle d'administration sont nombreuses dans la littérature. La simplicité de sa mise en place représente un grand avantage expérimental, et son utilisation permet tout de même d'étudier certains aspects de l'addiction. Par exemple, il a été montré qu'un traitement répété aux opiacés (morphine), administré par un expérimentateur, permet d'entraîner une dépendance physique forte (Matthes et al., 1996).

Ce modèle ne prend pas en compte la volonté de consommation de l'individu. Pourtant l'aspect motivationnel de la consommation est un facteur très important de la dépendance et négliger cet aspect entraîne des adaptations et des réponses du système nerveux différentes de celles qui auraient été obtenues lors d'une consommation volontaire (Jacobs et al., 2003).

Afin d'étudier les propriétés renforçantes de la prise de drogues, un modèle plus complexe a été élaboré. Ce modèle est celui de la **préférence de place conditionnée** ou CPP (Tzschentke, 1998). Il est composé de deux compartiments aux dimensions identiques, mais dont l'aspect est intentionnellement différent afin que l'animal puisse facilement distinguer le premier compartiment du second. Un compartiment va être systématiquement associé à l'administration de drogues, alors que le second est associé à l'administration de la solution contrôle. Ce test a pour objectif de tester l'effet récompensant, ou à l'inverse, aversif, d'une drogue. En effet, après plusieurs jours de traitement, si l'animal a été traité avec une drogue aux propriétés récompensantes, alors, lorsqu'il sera remis dans le contexte de la CPP, sans réexposition à la drogue, il passera plus de temps dans le compartiment où la drogue était classiquement administrée. Inversement, l'animal cherchera à éviter un compartiment s'il a été associé à l'administration d'une drogue aux propriétés aversives.

Le troisième modèle classiquement utilisé est celui de l'**auto-administration**. Dans ce test, l'animal est maître de sa consommation. Ce test, reposant sur un système opérant où le temps d'apprentissage est plus ou moins long, nécessite un protocole expérimental lourd, mais c'est aussi le modèle le plus

puissant pour étudier la volonté de recherche d'une drogue. Il faut distinguer les protocoles d'auto-administration reposant sur une consommation volontaire donnée dans l'eau de boisson, ou alors par injection de composés suite à une chirurgie lourde. Le second type de protocoles consiste à placer des animaux, préalablement implantés avec un cathéter dans la veine jugulaire, dans une boîte d'auto-administration. Les animaux vont soit devoir appuyer sur un levier, soit devoir placer leur nez dans un orifice, afin d'obtenir une injection intraveineuse de drogue (FR, fixed ratio). Si la drogue possède des propriétés récompensantes, l'animal va répéter ce comportement pour «chercher sa dose», et ainsi, il intervient volontairement dans la prise de drogue. Les animaux sont donc face à un conditionnement opérant, décrit historiquement par Skinner.

Il est aussi possible de déterminer l'état de motivation d'un animal dans ce test, en augmentant le nombre de stimuli nécessaires avant d'obtenir une injection. L'utilisation d'un « ratio progressif » apprend à l'animal qu'il doit, au sein d'une même session, augmenter les appuis sur levier ou visites à l'orifice pour obtenir la dose (Salamone and Correa, 2002), jusqu'à obtention de la récompense. L'utilisation d'un tel protocole chez le rongeur, sur plusieurs jours, mène à une consommation escaladante de drogues. Cela reflète la perte de contrôle en faveur d'une consommation impulsive et excessive observée chez l'Homme (exemple de l'héroïne dans l'article de Ahmed et al., 2000). Des modèles plus élaborés ont été réalisés permettant d'évaluer à la fois la motivation malgré l'échec (en ne délivrant pas de drogue pendant une période alors que l'animal réalise le comportement opérant), l'augmentation de la motivation (en utilisant un ratio progressif), ou encore la motivation à obtenir la substance malgré l'association à un événement négatif (expositions à des chocs électriques) (Berger and Whistler, 2011; Deroche-Gamonet et al., 2004).

2. Modèles de dépression

L'OMS définit la dépression comme « un trouble mental courant, caractérisé par de la tristesse, une perte d'intérêt ou de plaisir, un sentiment de culpabilité qui peut être associé à une perte d'estime de soi, mais qui peut aussi être caractérisé par des troubles du sommeil ou de l'appétit, une sensation de fatigue et un manque de concentration. » Cette définition fait part d'une pathologie très complexe, au profil relativement différent d'un individu à un autre. Notons qu'un des signes qui semble être récurrent en cas de dépression est la résignation.

La dépression est donc particulièrement difficile à modéliser chez le rongeur. Cependant, certains aspects comme la résignation sont étudiés individuellement. Les tests de **suspension par la queue** (décrit dans le [chapitre I, Projet I](#); Steru et al., 1985), de **nage forcée** (Porsolt et al., 1978) ou de la vaporisation de solution sucrée (**splash test**; Santarelli et al., 2003; Yalcin et al., 2008, 2011) étudient cette modalité. Les tests de suspension caudale et de nage forcée reposent sur le même principe:

placer l'animal dans une situation aversive de laquelle il va chercher à fuir en condition non pathologique. En cas de comportement de type dépressif, l'animal va plus vite être résigné et va passer plus de temps à attendre que la situation passe plutôt que de fuir (plus de temps d'immobilité pendant les tests). Le splash test, quant à lui, repose sur un comportement naturel important chez les rongeurs qui est celui de se toiletter. Dans le cadre de ce test, une solution de sucrose est vaporisée sur le pelage dorsal de l'animal qui va très rapidement tout faire pour éliminer les résidus de sucre. En condition pathologique de type dépressif, l'animal portera moins d'importance à son hygiène et cela se traduira par une diminution du temps et de l'activité de toilettage, ou encore une plus grande latence avant le premier toilettage après pulvérisation. D'une certaine façon, ce test étudie aussi la résignation de l'animal, non pas à fuir, mais à prendre soin de lui.

Il existe d'autres tests de dépression comme la mise en échec social (Berton et al., 2006) ou encore le test mixte d'anxiété-dépression de la suppression de prise alimentaire induite par la nouveauté (Santarelli et al., 2003).

Notons que les tests de suspension caudale et de nage forcée peuvent être responsables de la détection de faux positifs. En effet, ces tests sont basés sur la détection d'une activité, de ce fait, une drogue ayant un effet hyperlocomoteur pourra entraîner une hausse des performances dans ces tests qui ne sera peut-être pas associée à un effet antidépresseur. Pour ces raisons, le splash test semble être un bon compromis pour tester les effets antidépresseurs de drogues agissant sur la locomotion.

II. Le système opioïde

La composition, ainsi que les principaux rôles du système opioïde ont été décrits dans le [Chapitre I, Introduction](#). De même, l'intégralité du [chapitre I](#) porte sur l'implication du récepteur opioïde Mu dans la nociception. Pour ces raisons, ces aspects ne seront pas abordés dans ce chapitre II. Ici, nous nous focaliserons donc sur les rôles décrits des récepteurs opioïdes dans la dépendance, la récompense et le bien-être.

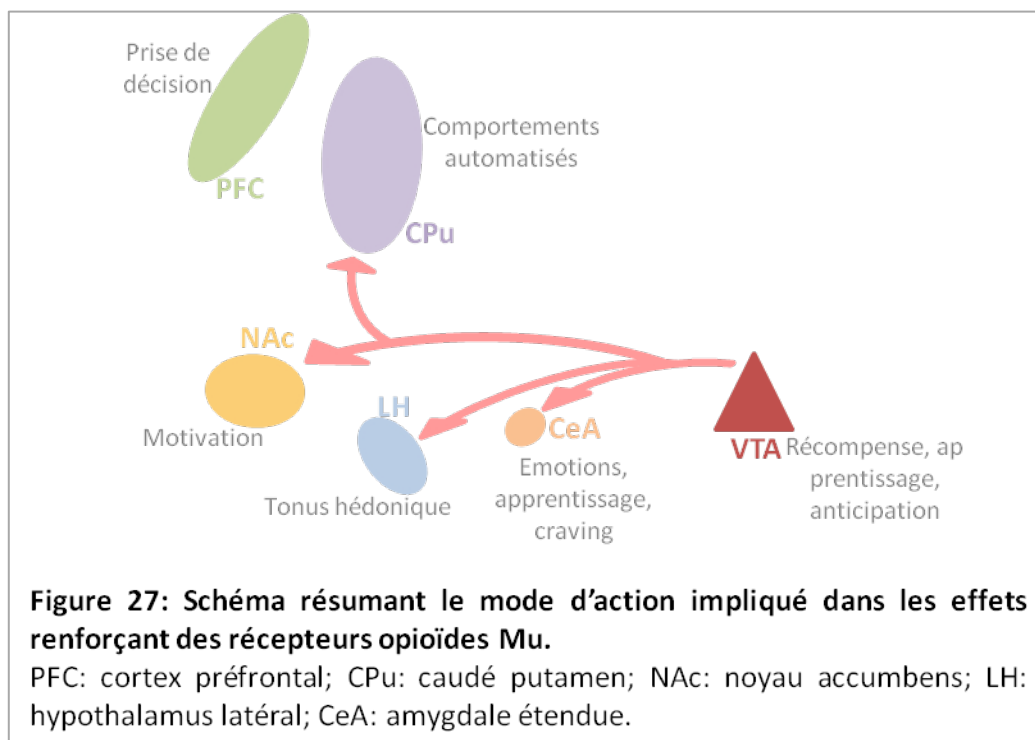
A. Les récepteurs opioïdes et la dépendance

Le récepteur opioïde Mu a été montré comme responsable des effets renforçant de la morphine grâce au modèle de knockout pour le récepteur Mu. Chez ces animaux, la morphine ne possède aucune propriété récompensante, et n'induit pas de sevrage après un traitement chronique (Matthes et al., 1996).

D'un point de vue mécanistique, l'activation du récepteur Mu induit l'activation de la voie dopaminergique mésocorticolimbique. L'aire tegmentale ventrale (VTA) est une structure importante

de cette voie et possède de nombreuses projections vers des régions cérébrales impliquées dans la régulation de la dépendance et des émotions qui sont associées à cette dépendance (Figure 27).

En pratique, les agonistes Mu entraînent la libération de dopamine suite à l'activation des récepteurs exprimés dans le noyau accumbens (NAc) (Hirose et al., 2005; Yoshida et al., 1999). La dopamine va activer en cascade différentes régions comme résumé dans la Figure 27. En parallèle, les récepteurs Mu présents dans la VTA vont avoir une action désinhibitrice en bloquant l'activité GABAergique (Johnson and North, 1992). En effet, dans la VTA, le récepteur Mu est majoritairement exprimé en présynaptique, au niveau des neurones GABA inhibiteurs du système dopaminergique (Steffensen et al., 2006).



Les agonistes du récepteur Mu sont décrits comme étant les opiacés qui possèdent les plus importantes propriétés renforçantes (Devine and Wise, 1994; Matthes et al., 1996).

La dépendance et la tolérance aux opiacés semblent être des phénomènes liés d'un point de vue mécanistique. En effet, de nombreuses études ont montré qu'en bloquant un phénomène, le second l'était également (Ghavimi et al., 2018; Habibi-Asl et al., 2014; Mansouri et al., 2017). La tolérance et la dépendance seraient la conséquence d'une exposition répétée aux opiacés (exemple ici d'agonistes Mu), qui induiraient un découplage du récepteur opioïde de la protéine Gi (Williams et al., 2013), mais aussi une downrégulation de ces récepteurs (Dravolina et al., 1999; Rothman et al., 1991). Cela a pour

conséquence de devoir augmenter les doses à administrer pour induire l'effet désiré. En parallèle, une activation, complétée d'une potentialisation des récepteurs glutamatergiques de type ionotrope N-méthyl-D-aspartate, ou NMDA a été mise en évidence (González et al., 1997; Martini and Whistler, 2007; Rothman et al., 1991; Wang et al., 1999). Ensemble, ces phénomènes sont responsables d'un influx d'ions calciques, et de l'augmentation des concentrations Ca^{2+} intracellulaires. La hausse des concentrations calciques est responsable de nombreux phénomènes dont certains ont été décrits dans le [chapitre I](#), à savoir une hyperpolarisation des cellules ou encore une augmentation de l'exocytose de neurotransmetteurs excitateurs comme le glutamate ([Figure 4](#)). La dépendance et la tolérance sont toutes deux associées à une augmentation de la production de composés proinflammatoires comme le NO ou encore des cytokines proinflammatoires (Abdel-Zaher et al., 2013; Lin et al., 2010; Liu et al., 2011).

Les phénomènes sous-jacents à la tolérance ou à la dépendance semblent communs, le seul problème est que souvent les études tissulaires réalisées ne concernent pas les mêmes régions du système nerveux central. En effet, la tolérance est associée aux effets analgésiques de la morphine et la principale région étudiée dans ce contexte est la moelle épinière alors que la dépendance est associée à une consommation excessive, régit par les régions supra spinales décrites dans la [figure 27](#). D'autres régions sont également impliquées, ce schéma n'étant que représentatif de la principale mécanistique impliquée.

Les études précliniques ont permis de montrer que des traitements morphiniques administrés passivement permettaient d'induire une dépendance physique chez les rongeurs, mise en évidence soit après un sevrage spontané (Georges et al., 1999), soit après un sevrage précipité par injection d'un antagoniste opioïde comme la naloxone (Matthes et al., 1996). Dans le paragraphe précédent, nous avons vu que de nombreuses neuro-adaptations étaient impliquées dans la mise en place de la dépendance. La consommation répétée d'opiacés permet d'empêcher le développement de symptômes liés à une situation de manque et l'activation du récepteur Mu permet de masquer les effets indésirables liés à une suractivation du système glutamatergique excitateur (Koob, 1992). Comme déjà évoqué, le système opioïde est perturbé suite à la désensibilisation des récepteurs Mu et à leur découplage de la protéine Gi. Le tonus opioïde endogène n'est donc plus assez performant pour masquer à lui seul les effets indésirables excitateurs, d'où la nécessité de devoir consommer des doses toujours plus importantes d'opiacés. En situation de sevrage, soit la drogue n'est plus donnée, soit l'activation du système opioïde est bloquée (sevrage précipité) et à ce moment-là, une multitude de signes physiques dits de sevrage surviennent. Chez l'Homme les signes de sevrage opiacés sont, par exemple, des tremblements, une ptose, des vomissements, des douleurs, des diarrhées, la transpiration (Loimer et al., 1989). Des signes de sevrage aux opiacés assez similaires peuvent être

mesurés chez la souris, à savoir des tremblements des pattes et du corps, des ébrouements, des sauts, une ptose, ou une piloérection (Berrendero et al., 2003).

Le récepteur opioïde Delta est également responsable d'effets renforçants, mais il est important de noter que ses propriétés renforçatrices sont beaucoup plus faibles que celles du récepteur opioïde Mu. En effet, l'étude de Devine et collaborateurs a montré par microdialyse que les agonistes Delta sont mille fois moins puissants pour induire une libération de dopamine que les agoniste Mu (Devine and Wise, 1994). Ces résultats sont complétés par une étude d'auto-administration intracérébrale d'agonistes mu ou delta, où, à nouveau, la puissance des agonistes Delta pour induire une telle auto-administration est bien inférieure à celles des agonistes Mu (Devine and Wise, 1994).

Cependant, le récepteur opioïde Delta semble participer également aux effets renforçants des agonistes Mu. En effet, il a été montré que les récepteurs Mu et Delta étaient activés dans le Nac suite à un tel traitement, et en réponse, induisaient la production de dopamine (Hirose et al., 2005; Yoshida et al., 1999). Les mécanismes dopaminergiques participant aux effets récompensants et renforçateurs des agonistes Mu décrits dans la partie précédente semblent comparables à ceux engagés dans la dépendance aux agonistes Delta. Dans ce contexte de dépendance, les récepteurs opioïdes Mu et Delta semblent interagir pour induire leurs effets renforçateurs. L'étude de Hutcheson et collaborateurs, réalisée sur des souris déficientes pour le récepteur opioïde Mu, a permis de montrer que l'agoniste sélectif du récepteur opioïde Delta, la deltorphine II, perd ses propriétés renforçatrices lorsque le récepteur Mu n'est pas fonctionnel (Hutcheson et al., 2001). Cela suggère donc une activité croisée des récepteurs Mu et Delta (Scherrer et al., 2004). De façon complémentaire, il a été montré qu'un traitement morphinique induit moins d'effets récompensants chez les souris KO pour le récepteur opioïde Delta que chez les contrôles WT (Chefer and Shippenberg, 2009). Ces résultats chez les KO Delta sont complétés par une atténuation de la tolérance à l'analésie morphinique (Xie et al., 2009).

Ensemble, ces résultats montrent que l'activation du récepteur opioïde Mu est principalement responsable des effets tolérogènes et de la dépendance induite par la morphine (Chefer and Shippenberg, 2009), mais les récepteurs opioïdes Delta semblent jouer un rôle important dans la régulation de ces phénomènes, peut-être par l'intermédiaire de la formation d'hétérodimères entre les récepteurs Mu et Delta (Xie et al., 2009). De par ces interactions, probablement sous la forme d'hétérodimères (Massotte, 2015), et l'implication du récepteur Delta dans la régulation des émotions, comme l'anxiété ou la dépression, son implication dans la comorbidité associée aux traitements opiacés paraît évidente (Filliol et al., 2000).

Le rôle potentiel du récepteur kappa dans ces effets sera discuté plus bas.

B. Les récepteurs opioïdes et la récompense

Il est désormais bien connu que le système opioïde est impliqué dans la récompense à d'autres substances que les opiacés (Charbogne et al., 2014; Contet et al., 2004). Plus particulièrement, le récepteur opioïde Mu a été décrit comme étant impliqué dans la récompense à des substances comme la nicotine (Berrendero and Maldonado, 2002), l'éthanol (Hall et al., 2001), la cocaïne (Hall et al., 2004) ou le THC (cf [Chapitre II](#); [Introduction IV.B.2](#)). Dans ce paragraphe, nous nous concentrerons uniquement sur la description du rôle du système opioïde dans la récompense aux opiacés.

Le récepteur opioïde Mu est le récepteur opioïde responsable de nombreux effets récompensants dont ceux de la morphine. Les souris soumises à un protocole de conditionnement de préférence de place (CPP) sous un traitement morphinique, présentent à l'issue du test, une préférence de place pour le compartiment associé à l'administration de morphine, effet bloqué par l'administration d'un antagoniste opioïde de type naloxone (Zarrindast et al., 2003) ou naltrexone (Olmstead and Burns, 2005). La nécessité du récepteur Mu dans ces effets récompensants de la morphine a été confirmée par l'utilisation de souris knockouts pour ce récepteur, où les effets récompensants sont absents (Sora et al., 2001; Matthes et al., 1996). La naloxone, administrée seule, lors d'un protocole de CPP, induit une aversion ou CPA (Olmstead and Burns, 2005; pour revue, Tzschentke, 2007). Le rôle du récepteur opioïde Mu dans ces effets aversifs de la naloxone est discuté. Les études de CPA naloxone chez les souris KO Mu indiquent soit une diminution de la CPA (Skoubis et al., 2001), ou aucun effet (Ide et al., 2004). Les divergences observées dans ces études peuvent être dues à des différences de doses de NLX administrées, à savoir une dose 10 fois plus importante dans l'étude de Skoubis qui observe une diminution de la CPA chez les KO Mu. Mais une autre explication peut aussi reposer sur la différence de modèles knockouts utilisés dans les deux études, avec des fonds génétiques différents. Alors que l'étude de Sora et collaborateurs utilise le modèle de knockout Mu par insertion d'une cassette de résistance à la néomycine dans l'exon 1 (Sora et al., 1997); Skoubis et son équipe utilise le modèle généré par insertion d'une cassette à la néomycine dans l'exon 2 d'Oprm1 (Matthes et al., 1996) ([Figure 26](#)). La naloxone étant un antagoniste non spécifique des récepteurs opioïdes, ces résultats suggèrent l'implication d'un autre récepteur du système opioïde que le récepteur Mu dans l'aversion aux ligands opiacés.

Le récepteur opioïde Delta est également impliqué dans les réponses comportementales associées à la récompense, et comme pour le récepteur opioïde Mu, l'activation du récepteur Delta par des ligands sélectifs mène à des effets récompensants. Ainsi, le SNC 80 peut induire une CPP, bloquée par l'antagoniste Delta sélectif, la naltrindole (Longoni et al., 1998).

Les études de conditionnement de place avec un agoniste du récepteur opioïde Kappa, le U50-480, révèlent un effet aversif de ce composé, associé à une CPA (Zannas et al., 2017). Le récepteur Kappa a été montré comme étant responsable de cette aversion, puisque les souris KO Kappa ne présentent plus de CPA suite à l'administration de cet agoniste (Simonin et al., 1998). De façon générale, La signalisation Kappa est décrite comme étant associée à des effets dysphoriques ou de CPA (Bruijnzeel, 2009; Koob, 2008; Lutz and Kieffer, 2013), et l'activation du système dynorphine-Kappa est associée à des situations de stress et de recherche de drogue (Bruchas et al., 2010; Knoll and Carlezon, 2010). Ces résultats montrent que sur le plan émotionnel, il y a un équilibre régit par une balance mu-delta versus kappa.

C. Les récepteurs opioïdes et le bien-être

Le système opioïde joue un rôle important dans la régulation des émotions et est associé à des pathologies telles la dépression (pour revue, Lutz and Kieffer, 2013). Les trois récepteurs opioïdes, Mu, delta et Kappa sont impliqués, d'une façon ou d'une autre dans les troubles dépressifs. De façon générale, l'activation des récepteurs opioïdes Mu et Delta est associée à des effets antidépresseurs alors que l'activation du récepteur opioïde Kappa induit des comportements de types dépressifs. Ainsi, plusieurs études précliniques ont montré que les traitements avec des agonistes Kappa induisent des comportements pro-dépressifs (Carlezon et al., 2006; Ebner et al., 2010). Inversement, les traitements avec des antagonistes de ce récepteur induisent un effet antidépresseur, souvent mis en évidence par une diminution du temps d'immobilité dans le test de nage forcée (Mague et al., 2003; Reindl et al., 2008). Knoll et collaborateurs ont montré que l'antagonisme du récepteur Kappa dans l'amygdale basolatérale induit des effets antidépresseurs, mais pas dans d'autres régions comme le striatum ou le noyau central de l'amygdale (CeA)(Knoll et al., 2011). Cette dernière est pourtant une région impliquée dans le stress et les comportements associés à l'anxiété (Gilpin et al., 2015). Cela suggère la participation de récepteurs de régions spécifiques dans ces effets sur la dépression. L'étude de Simonin et collaborateurs réalisée chez les souris knockouts pour le récepteur Kappa ne montrent pas de modification des comportements associés à l'anxiété dans les tests de labyrinthe en croix surélevé ou de labyrinthe circulaire (Simonin et al., 1998).

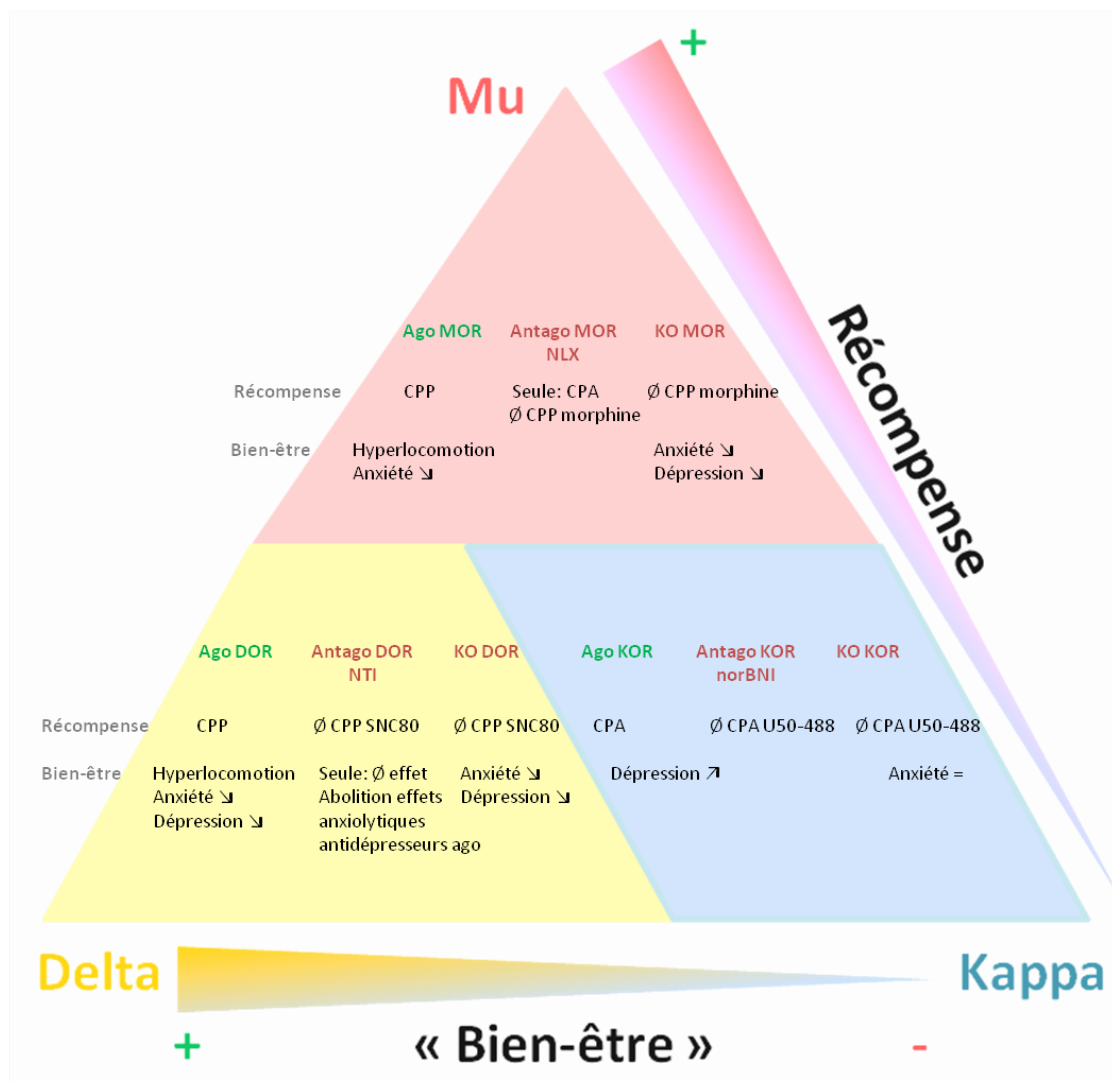
A l'opposé, l'activation des récepteurs opioïdes Mu est plutôt associé à des comportements de type antidépresseur, comme décrit avec la morphine (Besson et al., 1996; Tejedor-Real et al., 1995). Par contre, l'étude sur les comportements d'anxiété chez les KO Mu, réalisée par Filliol et collaborateurs rapportent des conclusions différentes quant au rôle du récepteur Mu dans ce phénomène (Filliol et al., 2000). En effet, dans cette étude, il est montré que ces souris KO Mu sont moins anxieuses que les contrôles WT dans les tests de nage forcée, light-dark et de labyrinthe en croix surélevé. Les approches

pharmacologiques rapportent une participation du récepteur Mu dans des effets antidépresseurs, alors que l'approche par KO prône plutôt un effet anxiogène de ce récepteur. Ces divergences peuvent être accordées à des mécanismes compensatoires chez les KO Mu ([cf discussion projet III](#)).

La littérature rapportant des effets antidépresseurs des agonistes Delta est, quant à elle, beaucoup plus importante. Les agonistes Delta induisent des effets antidépresseurs et anxiolytiques dans différents tests, comme « l'open field », le labyrinthe en croix surélevé, le test de nage forcée, où le test de conditionnement à la peur (fear conditioning)(Broom et al., 2002; Hudzik et al., 2011; Naidu et al., 2007; Richards et al., 2016; Saitoh et al., 2004; Torregrossa et al., 2006). La spécificité du rôle du récepteur Delta dans ces phénomènes a été vérifiée par l'utilisation de l'antagoniste naltrindole (NTI), qui bloque les effets anxiolytiques et antidépresseurs des agonistes Delta (Broom et al., 2002; Hudzik et al., 2011; Naidu et al., 2007; Saitoh et al., 2004). Les récepteurs Mu et Kappa ne semblent pas participer aux effets antidépresseurs/anxiolytiques de ces composés puisque l'antagonisme de ces récepteurs ne bloque pas ces effets (Saitoh et al., 2004). Le potentiel de ces agonistes est tel qu'un composé en particulier, le AZD2327, un agoniste sélectif du récepteur Delta, aux propriétés anxiolytiques et antidépresseurs montrées chez le rongeur, passe le cap des essais cliniques (Richards et al., 2016). Chez les animaux knockouts pour le récepteur Delta, un phénotype anxio-dépressif a été mis en évidence (Filliol et al., 2000), marqué par de moins bonnes performances dans les tests de labyrinthe en croix surélevé, nage forcée et light-dark par rapport aux souris WT. Le NTI, antagoniste du récepteur Delta, administré seul, ne possède aucune propriété modulatrice des phénomènes anxio-dépressifs (Broom et al., 2002; Saitoh et al., 2004; Torregrossa et al., 2006).

Cette même étude de Koek et collaborateurs s'est également intéressée aux effets de la morphine sur la thermorégulation (Koek et al., 2012). Alors que les souris ont une température avoisinant les 38°C en conditions basales, dès 15 minutes post-injection de morphine on observe une chute considérable de la température des animaux. Cette hypothermie est dose dépendante et peut atteindre -4°C. Le pic d'hypothermie est atteint entre 60 et 90 minutes post-injection et progressivement la température physiologique, de 38°C, est retrouvée. Ces effets sont similaires chez les adolescents et les adultes. Dans le contexte d'un traitement répété à la morphine, il a été montré que l'hypothermie est marquée au premier jour et au cours du traitement, celle-ci s'atténue, jusqu'à disparaître au jour 4 (Yuill et al., 2017). Une tolérance à ce phénomène semble se mettre en place. Cependant, dans cette étude, la chute de température corporelle après la première injection de 10mg/kg de morphine est tout de même de 6°C.

La morphine est aussi associée à un autre effet indésirable qui est la perte de poids. Selon le fond génétique des souris, l'effet est plus ou moins marqué. En effet, Lutz et collaborateurs (Lutz et al., 2013) montrent que les souris B6J et B6N ne perdent presque pas de poids après administration de morphine selon un traitement avec des doses escaladantes allant de 20mg/kg à 100mg/kg pendant 6 jours, alors que les souris de fond génétique BALBc présentent une perte de poids de l'ordre de 12%. Par contre, les souris contrôles de chacun de ces génotypes prennent du poids au cours du temps, mais pas les souris traitées. Cela met en avant un point essentiel dans le suivi du poids des animaux. Il est bien de comparer le poids de chaque animal avant et pendant un traitement, mais il est aussi important de comparer le poids d'un animal traité à la courbe d'évolution des poids qu'il devrait suivre selon son âge. L'âge est évidemment un facteur à prendre en compte dans ces effets sur le poids. Dans l'étude de Lutz et collaborateurs, les animaux sont jeunes puisque le début du traitement commence à l'âge de 30 jours, donc les progressions de poids sont très importantes vu que les animaux sont en plein développement.



D'après Lutz et Kieffer 2013

Figure 28 : Bilan des rôles des différents récepteurs opioïdes dans la récompense et le bien-être.

CPP= place préférence; CPA= place aversion; Ø = « absence de »; ago=agoniste; antago=antagoniste; ↑= augmentation; ↓= diminution

MOR, DOR, KOR= respectivement récepteur opioïde Mu, Delta et Kappa

La [figure 28](#) résume les principaux rôles de chacun des récepteurs opioïdes Mu, Delta et Kappa dans la récompense et le bien-être selon la nature des approches utilisées, c'est-à-dire, une activation par un agoniste, ou une inactivation de chaque récepteur par antagonisme ou knockout.

III. Le système cannabinoïde

Les premières descriptions d'usage des extraits de cannabis, de la plante *Cannabis sativa*, à but thérapeutique, remontent à près de 2000 ans (Mikuriya, 1969). Leur usage s'est généralisé durant la première moitié du 19^{ème} siècle, lorsque plusieurs compagnies pharmaceutiques ont développé la production d'extraits de cannabis pour soigner divers maux allant de la douleur, à l'insomnie en passant par l'asthme (Russo, 2013). Cependant, l'usage thérapeutique du cannabis a quasiment totalement disparu durant les années 1950 à cause de la variabilité des effets thérapeutiques selon les patients, et les effets indésirables auxquels il est associé comme l'anxiété et les troubles cognitifs ou de la dépendance (Giron and Befort, 2016). Pour ces raisons, l'usage de cannabis thérapeutique a été soumis à des lois restreignant son usage. L'arrêt de son utilisation a aussi été possible grâce à l'apparition de nouveaux traitements de synthèse, aux effets plus contrôlés, comme l'aspirine ou les barbituriques pour traiter ces pathologies (Russo, 2013). Dans les années 1960, le principal composé psychoactif du cannabis, le Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) a été isolé et synthétisé par Mechoulam et ses collaborateurs (Mechoulam and Gaoni, 1965). Cette découverte a entraîné un grand intérêt de la communauté scientifique, qui a alors cherché à comprendre le fonctionnement des molécules présentes dans le cannabis. Il est désormais accepté que le THC est responsable de la majorité des effets du cannabis, mais d'autres substances actives ont été décrites (Carlini et al., 1970). En outre, le cannabidiol (CBD) représente près de 40% des constituants des extraits de cannabis, et est dépourvu d'effet psychoactif (Zuardi et al., 1982).

Depuis, de nombreux composés, agonistes ou antagonistes, des récepteurs cannabinoïdes ont été synthétisés permettant de mieux comprendre le rôle du système cannabinoïde en situations physiologiques et pathologiques (Pertwee, 2010).

A. Composition et fonctionnement

Le système cannabinoïde (CB) est un système neuromodulateur tout comme le système opioïde. Il est composé de récepteurs couplés aux protéines G inhibitrices ; les récepteurs CB1 et CB2 (Befort, 2015; Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993). Ces récepteurs sont décrits comme étant exprimés par les cellules du système nerveux mais aussi par les cellules du système immunitaire. Dans le cas d'une expression neuronale, ces récepteurs sont présents au niveau présynaptique (Ohno-Shosaku and Kano, 2014).

L'activation de ces récepteurs est à l'origine de l'induction d'un signal intracellulaire inhibiteur ([Figures 29 et 30](#))(Dhopeswarkar and Mackie, 2014), similaire à celui décrit préalablement pour les récepteurs du système opioïde dans la [figure 6](#).

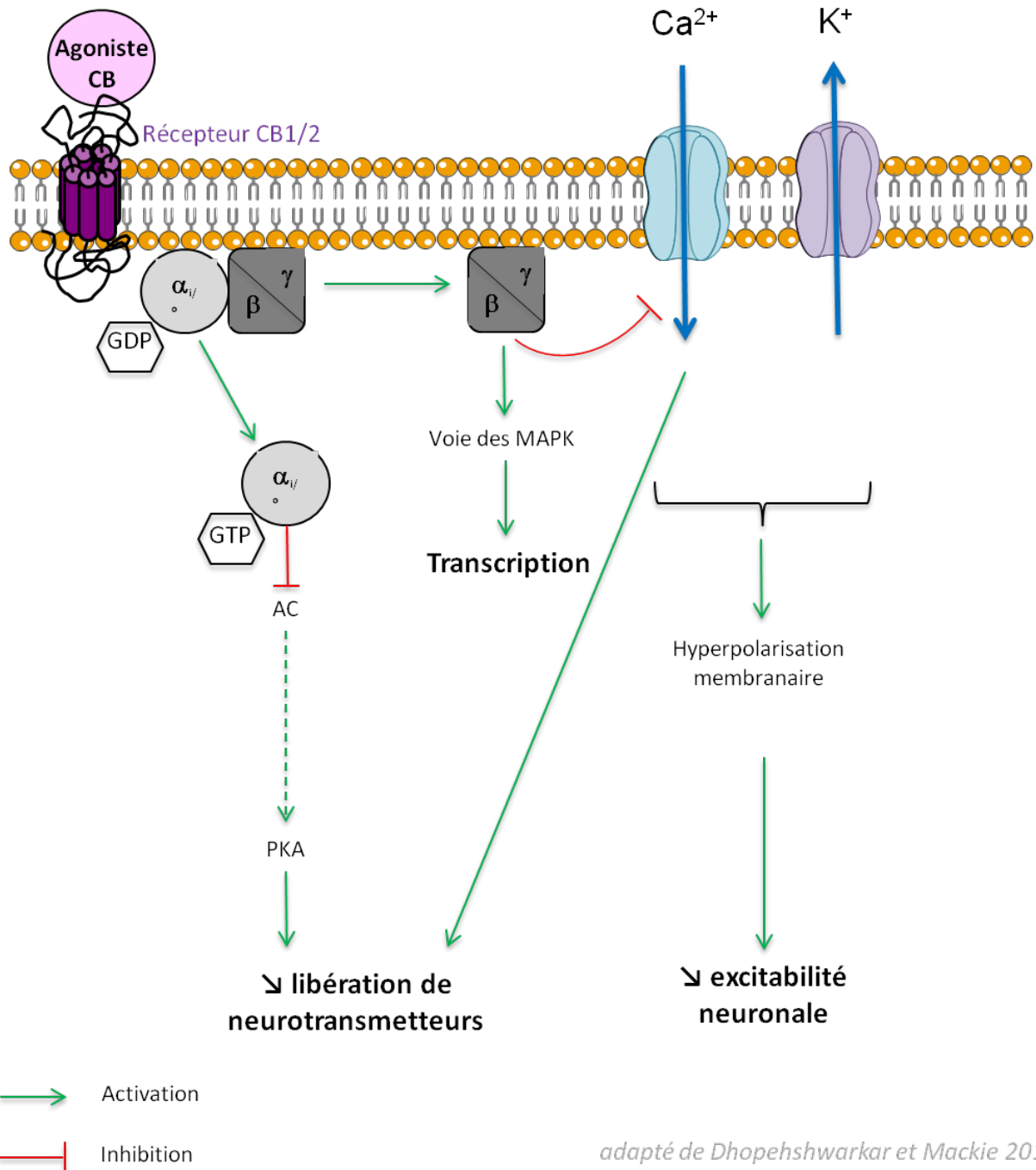


Figure 29 : Signalisation intracellulaire après activation des récepteurs cannabinoïdes CB1 ou CB2.

L'activation des récepteurs cannabinoïdes (CB) induit une inhibition de l'activité adénylate cyclase (AC), une diminution de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et donc de l'activation AMPC-dépendante de la protéine kinase A (PKA). Cela mène à une diminution de la transcription de certains gènes et de l'activité des canaux potassiques (K⁺). En parallèle une activation de la voie des Mitogen-activated protein kinases ou MAPK module aussi la régulation de l'expression génique.

L'activation de ces récepteurs induit donc une inhibition de l'activité de la cellule hôte. Le système cannabinoïde possède des ligands endogènes qui sont des neuromodulateurs lipidiques : l'anandamide (N-arachidonoyl-ethanolamide) encore appelée AEA, et le 2-AG (2-arachonoylglycerol). Ces endocannabinoïdes sont synthétisés au niveau postsynaptique à partir de phospholipides membranaires (Figure 30). Parmi les mécanismes bien décrits concernant l'anandamide, le N-arachidonoyl-phosphotidylethanolamine, ou NAPE, exprimé à la surface membranaire est hydrolysé par la NAPE-phospholipase D (NAPE-PLD) après une transacylation afin de donner le ligand anandamide qui pourra être sécrété au niveau de la fente synaptique et exercer son action en activant les récepteurs CB (Liu et al., 2008). Pour le 2-AG, le procédé est assez similaire: des phospholipides membranaires sont dans un premier temps transformés en diacylglycérol (DAG) par la phospholipase C (PLC), puis la DAG lipase (DAGL) synthétise le 2-AG à partir du DAG (Ahn et al., 2008). La dégradation de ces composés se fait suite à une hydrolysatation par la fattyacid amide hydrolase (FAAH) pour l'anandamide (Cravatt et al., 2004), et la monoacylglycerol lipase (MGL) qui est une 2-AG hydrolase pour la 2-AG (Dinh et al., 2002).

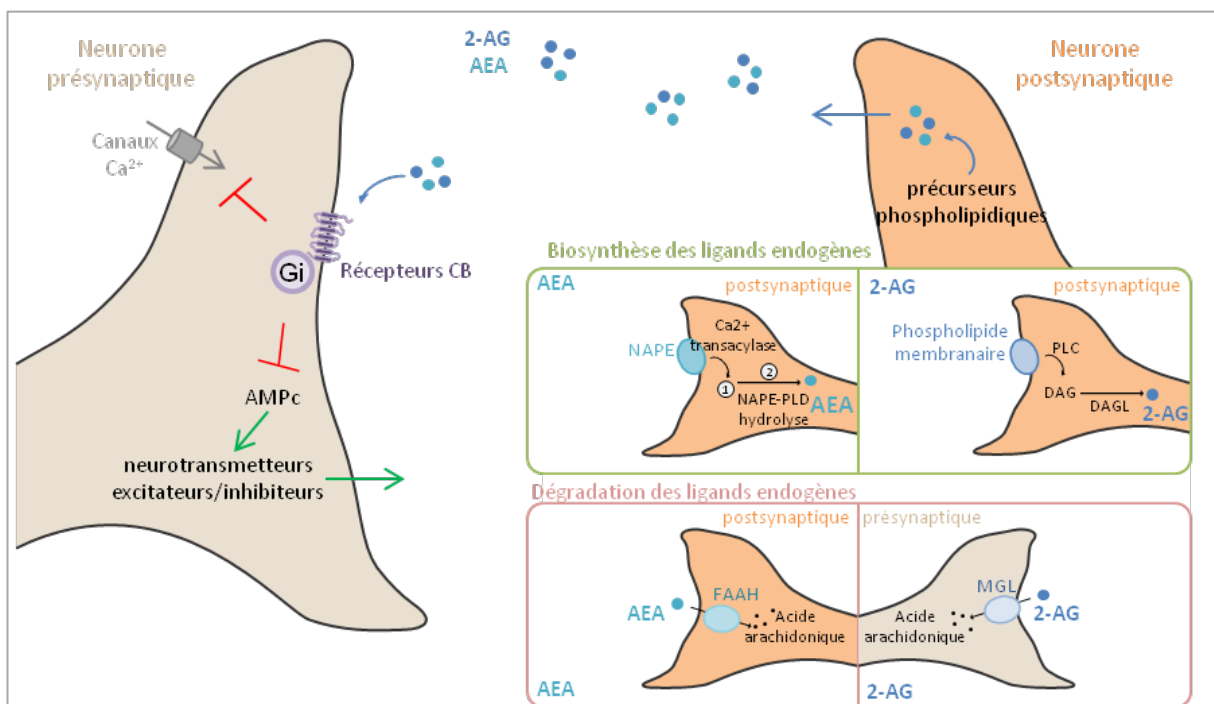


Figure 30: Le système cannabinoïde, ses principaux composants, leur biosynthèse et leur biodégradation.

CB= cannabinoïde; 2-AG= 2-arachonoylglycerol; AEA= anandamide ou N-arachodonoyl-ethanolamide; AMPc= adénosine monophosphate cyclique; NAPE= N-arachidonoyl-phosphotidylethanolamine; PLD= phospholipase D; PLC= phospholipase C; DAG= diacylglycérol; DAGL= diacylglycérol lipase; FAAH= Fatty acid amide hydrolase; MGL= Monoacylglycerol lipase

La répartition des récepteurs CB1 et CB2 est assez hétérogène. En effet, on retrouve une bien plus importante densité cérébrale de récepteurs CB1 que de récepteurs CB2 (Befort, 2015; Panagis et al., 2014; Pertwee, 2010). Le récepteur CB1 est largement exprimé dans le SNC et plus particulièrement dans les régions impliquées dans la régulation de la nociception, de la récompense ou encore de la prise alimentaire. Le récepteur CB2, quant à lui, était initialement considéré comme un récepteur exclusivement périphérique (Mackie, 2005; Maldonado et al., 2006, 2011), impliqué dans les régulations des réponses immunitaires (Basu and Dittel, 2011). Il s'avère que le récepteur CB2 est également exprimé au niveau central mais de façon très faible. Dans le SNC, il est notamment exprimé dans des régions impliquées dans la mémoire, ou l'addiction comme l'hippocampe, le striatum ou la VTA (Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006; Wotherspoon et al., 2005; Zhang et al., 2014, 2017). Son expression dans ces régions suggère sa participation dans les phénomènes régissant la dépendance, mais le récepteur CB2 reste à ce jour nettement moins étudié que le récepteur CB1 dans ce contexte. Son rôle dans la nociception est plus étudié. L'activation du récepteur CB2 est associée à des effets anti-inflammatoires (Ashton and Glass, 2007; Lopez-Rodriguez et al., 2016; Toguri et al., 2014; Turcotte et al., 2016). Ces effets anti-inflammatoires pourraient expliquer les effets antinociceptifs des traitements agonistes CB2. De par leur expression majoritaire au niveau périphérique, les effets analgésiques induits par les traitements CB2 étaient supposés être la conséquence d'effets périphériques (Romero et al., 2013). Cependant, plusieurs études ont montré que l'administration d'agonistes CB2 au niveau central mène également à l'obtention d'une analgésie (Curto-Reyes et al., 2010; Hsieh et al., 2011).

A ce jour, un grand nombre de ligands du système cannabinoïde ont été décrits, cependant, seulement une faible proportion de ces ligands est couramment utilisée dans les études précliniques. Ces principaux ligands sont décrits dans le [tableau 8](#).

Nom du composé	Nature agoniste/antagoniste	Sélectivité
Δ-9-tétrahydrocannabinol (THC)	agoniste	CB1-CB2 (Ki CB1=5.05nM ~ Ki CB2=3.13nM)
WIN 55,212-2	agoniste	CB1-CB2 (Ki CB1=1.89nM > Ki CB2=0.28nM)
Anandamide	agoniste	CB1-CB2 (Ki CB1=61nM < Ki CB2=279nM)
2-AG	agoniste	CB1-CB2 (Ki CB1=58.3nM < Ki CB2=145nM)
HU-210	agoniste	CB1-CB2 (Ki CB1=0.06nM < Ki CB2=0.17nM)
CP 55,940	agoniste	CB1-CB2 (Ki CB1=0.5nM = Ki CB2=0.69nM)
ACEA	agoniste	CB1 (Ki CB1=1.4nM << Ki CB2= 2000nM)
JWH 133	agoniste	CB2 (Ki CB1=677nM >> ki CB2 =3.4nM)
AM 251	agoniste inverse	CB1 (Ki CB1=7.49nM << Ki CB2= 2290nM)
SR141716A ou rimonabant	agoniste inverse	CB1 (Ki CB1~10nM << Ki CB2~500nM)
AM 630	agoniste inverse	CB2 (Ki CB1=5152nM >> Ki CB2= 31.2 nM)
Cannabinol	antagoniste/agoniste	CB1-CB2 (Ki CB1~200nM = Ki CB2~100nM)
Cannabidiol	antagoniste/agoniste	CB1-CB2 (Ki CB1~4000nM = Ki CB2~3000nM)

Tableau 8 : Principaux ligands des récepteurs CB1 et CB2 utilisés dans la littérature
pour revues, Pertwee, 1999; Pertwee et al., 2008

Ces ligands sont de différentes natures: agonistes, antagonistes ou agonistes inverses des récepteurs CB et/ou CB2. La majorité des ligands aux propriétés agonistes ne sont pas spécifiques d'un récepteur en particulier, mais activent à la fois le récepteur CB1 et le récepteur CB2 (Pertwee, 2008). Néanmoins, quelques ligands semblent avoir une spécificité pour l'un ou l'autre récepteur. L'ACEA (arachidonyl-2-chloroethylamide) est considéré comme un agoniste hautement sélectif du récepteur CB1 (Andres-Mach et al., 2015; Hillard et al., 1999; Rutkowska and Fereniec-Gołbiewska, 2006). L'ACEA possède une affinité 1400 fois plus importante pour le récepteur CB1 que pour le récepteur CB2 (Hillard et al.,

1999), soit un K_i de 1.4nM pour CB1, contre un K_i supérieur à 2000nM pour CB2. A cause de cette faible affinité pour le récepteur CB2, nous avons choisi dans le [tableau 8](#) de mentionner une spécificité de l'ACEA pour CB1, tout en précisant que l'affinité pour CB1 est nettement plus importante que pour CB2 (CB1>>CB2). A titre de comparaison, le WIN55,212 est également considéré comme étant un agoniste du récepteur CB1 (Molaei et al., 2016; Song et al., 2014), mais son ratio d'affinité CB1/CB2 est pourtant en faveur d'une sélectivité plus importante pour CB2 que CB1 (Pertwee, 2008). Pour ces raisons, il devrait plutôt être considéré comme un agoniste mixte.

Concernant le récepteur CB2, le JWH-133 est considéré comme étant un de ses agonistes sélectifs (Baker et al., 2000; Correa et al., 2005; Pertwee, 1999), avec une affinité 200 fois plus importante pour CB2 que pour CB1 (Huffman et al., 1999; Soethoudt et al., 2017).

Le principal antagoniste des récepteurs CB utilisé est le rimonabant, parfois cité sous le nom de SR141716A. Il s'avère que cette molécule est décrite comme un agoniste inverse spécifique du récepteur CB1. Contrairement aux antagonistes possédant une activité neutre, ou inhibitrice du récepteur sur lequel ils se lient, le rimonabant induit un effet pharmacologique opposé aux autres agonistes CB1 (Rinaldi-Carmona et al., 1994), à savoir une hyperalgie (Richardson et al., 1997), une augmentation de l'activité locomotrice (Bass et al., 2002), ou une diminution de la consommation alimentaire (Colombo et al., 1998; Verty et al., 2004).

B. Le système cannabinoïde et la dépendance

Les récepteurs cannabinoïdes, cibles du cannabis, sont décrits comme participant au développement de la dépendance aux drogues d'abus (Zimmer, 2015).

Cependant, les composés pour lesquels la participation de ce système est la plus décrite restent les cannabinoïdes. Les études de sevrage du THC précipité avec du rimonabant, montrent que le système cannabinoïde et plus particulièrement le récepteur CB1 est impliqué dans la dépendance physique au cannabis, le THC étant le principal composé psychoactif du cannabis. Dans ces études, le THC administré pendant plusieurs jours induit une dépendance physique mise en évidence par l'apparition de signes de sevrage lors de l'administration de l'antagoniste (Célérier et al., 2006; Hutcheson et al., 1998; Soria et al., 2004), comme précédemment décrit avec le système opioïde. Cependant, les signes de sevrage sont moins nombreux et intenses que ceux observés avec le sevrage aux opiacés, voire même différents. Par exemple, en cas de sevrage aux opiacés, les animaux sautent pour chercher à fuir de l'enceinte du test (Goeldner et al., 2011; Matthes et al., 1996). Ce signe n'apparaît pas chez les animaux en sevrage cannabinoïde (Soria et al., 2004).

De plus, il a été montré que le système endocannabinoïde, et plus particulièrement le récepteur CB1, sont impliqués dans la dépendance à la morphine (cf [Chapitre II; Introduction IV.C.A](#)), et à l'éthanol, comme démontré par des études de sevrage chez des souris knockouts pour ce récepteur (Ledent et

al., 1999; Racz et al., 2003). Les études pharmacologiques utilisant le rimonabant, antagoniste du récepteur CB1, montrent quant à elles, que ce récepteur participe à la dépendance à la morphine, à l'héroïne, à l'éthanol, à la nicotine et à la cocaïne, en induisant une diminution du comportement d'auto administration de ces drogues chez les rongeurs (pour revue, Maldonado et al., 2006).

Néanmoins, le système endocannabinoïde n'est pas uniquement impliqué dans l'addiction et la dépendance aux drogues. D'autres catégories de comportements addictifs sont actuellement le sujet de nombreux débats auprès des organismes de santé publique, comme les troubles alimentaires, les addictions aux jeux d'argent, aux jeux vidéo ou encore au sport. Les pratiques excessives de ces activités sont considérées comme des addictions car, tout comme pour les consommateurs de drogues, ces patients souffrent progressivement d'isolement, leur quotidien est affecté par ces pratiques, et lorsqu'ils sont privés soudainement de ces activités, les patients développent des comportements d'agressivité dans le but de pouvoir à nouveau pratiquer leur activité addictive. Dans le contexte du sport, des équipes ont cherché à modéliser la pratique de l'exercice physique non contrainte chez les modèles animaux. Un modèle consiste à laisser à la disposition des animaux dans leur environnement de vie, des roues d'activité dites « running wheels» (Sherwin, 1998). Les animaux prennent plaisir à courir avec ces roues et une utilisation progressive a été mise en évidence chez les animaux qui ont accès à un tel dispositif (Novak et al., 2012). Cependant, les souris knockouts pour le récepteur CB1 présentent une utilisation de ces roues amoindrie par rapport aux animaux WT, et cette diminution n'est pas la conséquence d'un déficit de locomotion induit par le KO, mais semblerait bien être la conséquence d'une diminution de la motivation à réaliser cette tâche (Chaouloff et al., 2011; Dubreucq et al., 2010).

Le système cannabinoïde participe donc au développement de la dépendance à de nombreuses drogues, mais aussi à des pratiques addictives.

C. Le système cannabinoïde et la récompense

L'activation des récepteurs CB est associée à des effets récompensants, notamment mis en évidence par le test de préférence de place conditionnée (CPP). Ces propriétés récompensantes sont particulièrement décrites pour les agonistes CB1, ou les agonistes mixtes CB1-CB2. Comme évoqué dans la partie précédente, ces agonistes induisent une dépendance physique marquée par l'apparition de signes de sevrage physique en cas d'arrêt brutal de la prise de ces composés. Les effets récompensants dont sont responsables ces agonistes participent au fait que les usagers aient envie de réitérer leur expérience de consommation et donc participe au phénomène d'addiction et à la mise en place de la dépendance. Le cannabis étant la drogue la plus consommée par les adolescents, et cette

pratique étant un problème de santé publique majeur à cause des conséquences d'une telle consommation sur le développement cérébral de ces usagers, de nombreuses équipes scientifiques ont voulu comprendre par quel moyen les cannabinoïdes induisent leurs effets récompensants. Le THC étant le principal composé psychoactif du cannabis, la majorité des études sur la récompense lui ont donc été consacrées. Les résultats de ces études sont assez contradictoires et le THC ne semble pas posséder de propriétés récompensantes dans toutes les circonstances. Nous avons choisi de réaliser une figure qui synthétise les principaux résultats obtenus en fonction de la dose de THC chez le rat et la souris ([Figure 31](#)). Dans cette figure, nous voyons que la caractérisation des effets du THC dans le test de CPP chez le rat a été faite avec de nombreuses doses, et cela nous permet de distinguer une fourchette de doses possédant des propriétés récompensantes, comprise entre 0,075 mg/kg et 0,37mg/kg (Braida et al., 2004a; Ji et al., 2006; Le Foll et al., 2006). Cela correspond à des doses relativement faibles, surtout lorsqu'elles sont comparées à celles utilisées dans les études précliniques pour étudier les effets antinociceptifs du THC (exemple Cox et collaborateurs doses THC 1, 2, 4 mg/kg ip, Cox and Welch, 2004). Aux doses plus élevées, de 1 ; 1,5 et 6mg/kg, les auteurs décrivent un effet aversif du THC (Braida et al., 2004b; Cheer et al., 2000; Mallet and Beninger, 1998).

En analysant tous ces résultats, on pourrait conclure que le THC possède des propriétés récompensantes doses dépendantes, avec une gamme de concentration «en cloche ». Cependant, en regardant ces résultats de plus près, on constate que les études de Cheer et collaborateurs et Mallet et collaborateurs n'observent jamais aucun effet récompensant du THC dans leurs conditions. Réciproquement, Le Foll et collaborateurs n'observent aucun effet aversif du THC dans leur étude, et pourtant ils testent également la dose de 1mg/kg décrite comme aversive par les auteurs précédents. Seule l'étude de Braida et son équipe montre à la fois des propriétés récompensantes et aversives du THC chez leurs animaux. Toutes ces études sont réalisées chez le rat, mais les souches utilisées sont différentes, ce qui pourrait participer à expliquer ces résultats divergents. Ensemble ces études montrent que les effets récompensants du THC restent difficiles à interpréter. Cependant, il est important de noter que des doses inférieures à 1mg/kg seraient plutôt associées à une préférence de place alors que des doses supérieures à 1mg/kg sont plutôt à associer à une aversion.

La deuxième partie de la [figure 31](#) résume les principaux résultats obtenus en conditionnement de place chez la souris, également après administration de THC. La gamme de concentrations testée est moins conséquente en termes de nombre de doses testées (5 doses) mais s'étend sur une large fourchette (0,5-20mg/kg). Le métabolisme de la souris étant différent de celui du rat, il n'est pas possible de transposer les résultats observés avec une certaine dose chez le rat à la souris. Cette analyse complémentaire chez la souris est donc particulièrement intéressante. Le schéma représenté en bas à gauche de la figure synthétise les différents résultats obtenus après CPP sans primo-injection de THC, alors que le schéma de droite montre les résultats obtenus après une primo-injection de THC, ce qui correspond à l'acquisition d'un comportement de type CPP chez des individus ayant déjà été exposés à la drogue.

Les résultats des 6 études sans primo-injection montrent que le THC ne possède aucun effet récompensant, mais par contre est associé à des comportements d'aversion à 5 et 20mg/kg (Célérier et al., 2006; Cheng et al., 2004; Hutcheson et al., 1998; Soria et al., 2004; Valjent and Maldonado, 2000; Zimmer et al., 2001).

Après primo-injection, le THC induit de la CPP à la dose de 1mg/kg mais pas à la dose supérieure de 5mg/kg ([Figure 31](#)).

D'autres agonistes du récepteur CB1 ont été étudiés avec le test de CPP chez le rongeur. Les résultats obtenus sont assez similaires à ceux précédemment décrits pour le THC. Pour le WIN55,212 par exemple, une préférence de place est plutôt observée pour des doses faibles, et une aversion à des doses supérieures à 1mg/kg (pour revue, Tzschentke, 2007).

Tout comme pour le THC, une injection de WIN55,212 préalablement à la CPP (ou primo-injection), permet d'induire une CPP qui n'était pas présente sans cette primo-injection (Castañé et al., 2004). Pour le HU-210, une étude a montré que ce composé est dépourvu d'effet récompensant chez le rat, mais au contraire, induit une aversion (Cheer et al., 2000). L'anandamide, quant à lui, n'induit pas de CPP ni de CPA chez le rat, à des doses allant de 0 à 16mg/kg (Mallet and Beninger, 1998). Cela indique que ces composés ont des effets différents les uns des autres, dépendants de dosages précis. De plus, ces effets sont variables d'une espèce de rongeur à l'autre (rat versus souris).

Ces comportements de préférence de place ou d'aversion induits par les agonistes CB1 ont été montrés comme étant la cause de l'activation des récepteurs CB1. Chez les animaux où le récepteur CB1 est rendu non fonctionnel par antagonisme, ces effets des agonistes CB1 ne sont pas retrouvés. La coadministration de rimonabant pendant la phase de conditionnement de la CPP au THC induit une perte des effets récompensants du THC aux doses faibles, mais aussi une perte des effets aversifs aux doses élevées (Brida et al., 2004). De façon similaire, avec d'autres agonistes CB1 comme le CP55,940, ou le WIN55,212, l'utilisation de rimonabant bloque la CPP et la CPA (Brida et al., 2001; Chaperon et al., 1998; Manzanedo et al., 2004).

Concernant le SR141716A ou rimonabant, de nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer si ce composé agoniste inverse du récepteur CB1, possède des propriétés aversives ou récompensantes. La plupart des études décrivent le rimonabant comme étant inerte dans le test de CPP (Brida et al., 2001, 2004b; Chaperon et al., 1998; Singh et al., 2004). Cependant, Cheer et collaborateurs montrent que le rimonabant induit des effets récompensants aux doses de 0,25 ; 0,5 ; 2 et 3mg/kg chez le rat (Cheer et al., 2000). L'équipe de Hutcheson, quant à elle, montre plutôt un effet aversif du rimonabant chez la souris à une dose de 2,5mg/kg, et une absence d'effet à des doses supérieures (5 ou 10mg/kg ip) (Hutcheson et al., 1998). Comme longuement discuté avec le THC, les ligands CB1 possèdent des effets dysphoriques qui restent encore mal compris et de plus amples études de ces phénomènes restent encore à réaliser pour mieux définir les effets de ces ligands.

De façon intéressante, il faut noter que l'agoniste CB2 JWH133 n'entraîne ni CPP ni CPA aux doses testées chez la souris, et ne permet pas de mesurer d'auto-administration chez des souris qui par ailleurs sont capables de s'auto-administrer de la cocaïne. Ces résultats indiquent l'absence d'un rôle direct de CB2 dans les effets renforçants des cannabinoïdes (Xi et al., 2011).

D. Le système cannabinoïde et la douleur

Il est désormais bien décrit que le système cannabinoïde joue un rôle dans la régulation de la nociception (Zimmer, 2015).

En conditions basales, c'est-à-dire sans modèle de nociception induite, les résultats concernant la perception de la nociception chez les animaux knockouts pour le récepteur CB1 sont contradictoires. Différentes études ont montré que les souris KO CB1 ont une nociception inchangée par rapport aux contrôles WT. En effet, avec les tests de la plaque chaude ou d'immersion de la queue, testant la nociception thermique au chaud, ou encore avec les tests de pression de la queue, testant la nociception mécanique, ou bien le test d'étirements abdominaux induits par l'acide acétique, testant la douleur chimique, les animaux WT et KO CB1 présentent des réponses nociceptives comparables (Ledent et al., 1999; Miller et al., 2011; Valverde et al., 2001). Par contre, Zimmer et collaborateurs ont montré des résultats différents avec leur modèle de KO CB1 (Zimmer et al., 1999). Dans leur étude, les animaux KO CB1 sont hypoalgésiques par rapport aux WT dans les tests de la plaque chaude et de la formaline. Cependant, avec le test de retrait de la queue après exposition à un rayon chauffant, les KO CB1 présentent des seuils de nociception comparables aux WT. Comme précédemment avec les souris knockouts pour le récepteur opioïde Mu ([Figure 9](#)), l'implication du récepteur CB1 dans la perception de la douleur est discutée.

De nombreuses études ont montré que l'utilisation d'agonistes CB permet de diminuer les seuils de nociception en conditions de douleur chronique. Le WIN55,212 diminue l'hypersensibilité neuropathique induite par des lésions nerveuses mécaniques (SNI) (Guindon et al., 2007), les neuropathies associées au diabète (Doğrul et al., 2004), mais aussi par les neuropathies induites par les traitements de type chimiothérapie comme le paclitaxel (Pascual et al., 2005), ou la cisplatine (Vera et al., 2007). Les agonistes ayant une activité mixte CB1-CB2, comme le HU-210 permettent aussi de soulager les douleurs neuropathiques (Liang et al., 2007; Rahn et al., 2007), suggérant aussi un rôle protecteur de l'activation de CB2 dans la douleur. Ce rôle protecteur a été confirmé par l'utilisation d'agonistes spécifiques pour CB2, tel le JWH-133, qui présente une activité analgésique en condition de ligature de nerf sciatique (Yamamoto et al., 2008) ou de neuropathie induite par le paclitaxel (Rahn et al., 2008). La douleur neuropathique n'est pas la seule à être soulagée par les agonistes cannabinoïdes. En effet, ces traitements permettent également de diminuer les douleurs inflammatoires. Il a été montré que les agonistes mixtes CB1-CB2, comme le WIN55,212 induisent une diminution de la nociception dans le test de la formaline (Burgos et al., 2010). L'agoniste mixte CB1-CB2 HU-210, exerce aussi une action inhibitrice de l'inflammation (Elmes et al., 2005). Les agonistes spécifiques CB2 régulent négativement l'inflammation et donc la douleur associée lorsqu'ils sont administrés de façon locale (Quartilho et al., 2003), mais aussi de façon systémique (Hanus et al., 1999;

Nackley et al., 2003). Etant donné l'implication du récepteur CB2 dans la régulation du système immunitaire (Basu and Dittel, 2011; Cabral and Griffin-Thomas, 2009), il est peu surprenant que de tels agonistes permettent de soulager les douleurs inflammatoires.

Afin d'appuyer le fait que les récepteurs cannabinoïdes sont bien impliqués dans l'antinociception induite par ces agonistes, des études ont montré que l'utilisation d'antagonistes CB permet de réverser l'analgésie produite. En situation de douleur chronique neuropathique induite par une constriction (CCI), l'inhibiteur de la recapture de l'anandamide, l'AM404 en systémique, induit une antinociception mécanique et thermique au niveau de la patte opérée. Cette analgésie est donc associée à une augmentation du taux endogène d'anandamide, qui en conséquence induit une activation plus importante des récepteurs CB. L'administration de rimonabant bloque l'effet analgésique de l'AM404, à la fois pour la modalité mécanique, et la modalité thermique (La Rana et al., 2006). Palazzo et collaborateurs ont confirmé ces résultats, à savoir une inhibition de l'analgésie induite par l'AM404 suite à un traitement avec du rimonabant (Palazzo et al., 2006). Ils ont aussi montré, dans ce contexte, un effet analgésiant du WIN55,212, également bloqué par le rimonabant. Ensemble, ces exemples précis démontrent que cette analgésie est médiée par les récepteurs cannabinoïdes et même plus précisément par le récepteur CB1, le rimonabant étant un de ses ligands. L'absence d'effet analgésique des agonistes CB1 chez les souris KO CB1 permet de confirmer ces résultats (Ledent et al., 1999).

Les études d'antinociception réalisées chez les souris KO CB2 sont peu nombreuses. L'étude de Li et collaborateurs ne montre aucune différence de nociception mécanique basale, ou de nociception post-PSNL ou post-CFA chez les souris KO CB2 par rapport aux souris WT (Li et al., 2017).

Les effets antinociceptifs de tels agonistes sont donc clairs en conditions de douleur chronique, mais ce n'est pas le cas en situation non pathologique, sans douleur préalablement induite. En effet, dans ce contexte, plusieurs études ont montré que les agonistes CB1 n'induisent aucune régulation des seuils nociceptifs. Citons comme exemple l'étude de Palazzo et collaborateurs, décrites dans le paragraphe précédent (Palazzo et al., 2006). Comme abordé préalablement, les auteurs ont étudié l'effet analgésique du WIN55,212 ou de l'AM404 dans un modèle de douleur neuropathique induite par CCI. Ils ont montré une analgésie au niveau de la patte CCI, qui correspond en réalité à un effet antihyperalgésiant. Par contre, en contralatéral, ni le WIN55,212, ni l'AM404 n'induisent de régulation des seuils nociceptifs, pour des tests de nociception thermique et mécanique. De façon similaire, Suplita et collaborateurs ne montrent aucun d'effet antinociceptif du THC ou du WIN55,212 avec le test de retrait de la queue en conditions basales (Suplita et al., 2008). De même, les agonistes spécifiques pour le récepteur CB1 et CB2 respectivement, l'ACEA et le JWH133, à des doses de 1 et 5mg/kg ip, n'induisent pas d'antinociception en contralatéral dans un modèle de douleur

ostéoarthritique, alors qu'ils induisent un effet antihyperalgésiant au niveau de la patte contralatérale (La Porta et al., 2015). Cependant, ces résultats sont contradictoires avec ceux publiés par Vera et collaborateurs, montrant un effet antinociceptif du WIN55,212 dans le test plantaire de Hargreaves (Vera et al., 2013), également en contralatéral. Il est important de souligner que cet effet antinociceptif du WIN55,212 n'est observé dans l'étude de Vera, qu'avec la dose de 5mg/kg ip et pas avec la dose inférieure de 1mg/kg. De plus, dans ce même test, ni l'ACEA, ni le JWH133 ne permettent d'augmenter les seuils de nociception des animaux testés. Les résultats de cette étude montrent que chaque agoniste, en fonction des doses utilisées, pourra induire une réponse comportementale différente. Cheng et collaborateurs, chez des souris naïves, sans modèle de douleur induite, ont montré un effet analgésique du THC avec le test d'immersion de la queue à 50°C (Cheng et al., 2004) chez des souris C57Bl6. Cependant, cet effet analgésique est observé uniquement avec la dose testée la plus élevée, à savoir 10mg/kg, mais aucun effet n'est observée avec la dose de 5mg/kg, comme précédemment avec le WIN55,212, dans l'étude de Vera et collaborateurs. De même, l'équipe de Célérier montre une analgésie induite par le THC 10 et 20mg/kg avec le test d'immersion de la queue à 50°C et le test de la plaque chaude, mais aucun effet antinociceptif avec la dose de 5mg/kg de THC (Célérier et al., 2006). Zimmer et collaborateurs montrent également un effet analgésique du THC chez la souris à forte dose (20mg/kg ip), pour les tests de la plaque chaude d'immersion de la queue (Zimmer et al., 2001). Ces résultats suggèrent la nécessité d'assez fortes doses d'agonistes CB1 pour induire une analgésie chez des animaux naïfs.

Une autre étude mentionne une analgésie induite par le THC et le CP55,940 (agoniste mixte CB1-CB2) et l'anandamide (Houser et al., 2000) avec le test de retrait de la queue. L'administration des agonistes dans cette étude se fait par injection intrathécale, et les mesures sont faites à différents temps post-injection: 10 et 30 minutes. Avec le THC et le CP55,940, ils observent une analgésie aux différents temps, par contre, avec l'anandamide, l'analgésie n'est observable qu'à 10 minutes. Cela montre que chaque agoniste a sa propre cinétique d'action. Cette étude montre une analgésie des différents agonistes CB, sans douleur induite préalablement, mais avec un protocole d'administration intrathécal et donc central. Cela suggère également que la voie d'administration joue un rôle important dans les effets comportementaux observés.

Par différents aspects, nous avons vu que les récepteurs opioïdes et cannabinoïdes partageaient des similarités fonctionnelles. Dans le cadre de l'antinociception, les agonistes CB1 utilisés de façon répétée perdent de leur potentiel analgésique, comme préalablement décrit pour les agonistes du récepteur opioïde Mu. C'est ce que l'on appelle la tolérance à l'analgésie. La tolérance à l'analgésie cannabinoïde et plus particulièrement au THC, se développe après un traitement chronique, ou avec de fortes doses de THC. Les études de Célérier, Soria, et Zimmer ont mis en évidence une tolérance

analgésique au THC en suivant un protocole consistant à administrer du THC 20mg/kg ip 2 fois par jour pendant 5 jours à des souris (Célérier et al., 2006; Soria et al., 2004; Zimmer et al., 2001). La tolérance est révélée par les tests d'immersion de la queue et de la plaque chaude dans ces études, chez des souris de souche CD1 et C57Bl6. Les phénomènes sous-jacents à cette tolérance sembleraient être similaires à ceux décrits pour les récepteurs opioïdes Mu et plus généralement les RCPG, à savoir une désensibilisation et un découplage du récepteur ciblé, menant à une perte de sa fonctionnalité et donc à une diminution des effets induits par ses agonistes (Garzón et al., 2009).

E. Le système cannabinoïde et le bien-être

Un des premiers signes de bien-être est la prise de poids et la consommation alimentaire. Les récepteurs cannabinoïdes sont impliqués dans la régulation de la masse corporelle et de l'appétit. Les études chez les rongeurs knockouts pour le récepteur CB1 montrent que ces individus sont « protégés » de l'obésité par rapport à leurs homologues WT. En effet, ces souris présentent une diminution de la prise du poids au cours du temps, associée à une proportion de tissus gras amoindrie par rapport aux WT, qui est la conséquence d'une diminution de la prise alimentaire (Cota et al., 2003; Ravinet Trillou et al., 2004). Le rôle de ce récepteur dans la prise alimentaire et la prise de poids a été confirmé par des études utilisant le rimonabant. En bloquant le récepteur CB1, une perte de poids, associée à une diminution de la prise alimentaire a été observée (Dore et al., 2014; Vickers and Kennett, 2005). Les propriétés anorexigènes du rimonabant ont été testées en clinique (Curioni and André, 2006), mais à cause des effets secondaires induits par ce composé comme l'anxiété ou la dépression (Christensen et al., 2007), ces traitements ont été suspendus.

Les études utilisant des agonistes CB1 indiquent que l'administration de THC 10 et 20mg/kg induit chez la souris une perte de poids assez conséquente les premiers jours de traitements (Hutcheson et al., 1998; Soria et al., 2004). Dès la première administration de THC, les animaux perdent du poids, un peu plus de 1 gramme. Cependant, il est important de mentionner que le poids de départ de ces souris est compris entre 22 et 26g, ce qui, au final ne représente une perte de poids correspondant à moins de 5% du poids de départ. De plus, cette perte de poids est transitoire et de très courte durée, puisque dès le 3^{ème} jour de traitement, les animaux retrouvent leur poids de départ. Par contre, au cours d'un traitement de 6 jours avec du THC 10 ou 20mg/kg, les animaux ne semblent pas prendre plus de poids par rapport à leur poids de départ (Hutcheson et al., 1998).

Le récepteur CB2 est également impliqué dans la régulation du poids. En effet, chez les souris KO CB2, un phénotype d'obésité lié à l'âge a été mis en évidence, associé à une augmentation de la consommation alimentaire, et du poids (Agudo et al., 2010). Le rôle de CB2 dans la prise de poids a également été confirmé par des approches pharmacologiques, où un traitement avec un agoniste CB2 protège de l'obésité des souris prédisposées à cette pathologie (Verty et al., 2015).

De façon assez comparable, les traitements avec des agonistes des récepteurs CB1 sont décrits comme induisant une hypothermie transitoire. Deux études utilisant le même protocole de traitement visant à administrer du THC 20mg/kg en ip, 2 fois par jour, mettent en évidence une hypothermie chez des souris CD1 et C57Bl6, pendant les 2 premiers jours de traitement (Soria et al., 2004; Zimmer et al., 2001). Comme pour la perte de poids décrite dans le paragraphe précédent, cette hypothermie disparaît dès le 3^{ème} jour de traitement répété au THC. Mais contrairement à la perte de poids, cette hypothermie est assez conséquente et particulièrement chez les souris de souche C57Bl6 qui présentent une diminution de leur température de près de 5°C (Zimmer et al., 2001).

En plus d'être associée à une hypothermie, ou une perte de poids, l'administration de THC est également responsable d'un effet hypolocomoteur, dose dépendant (Ledent et al., 1999; Mallet and Beninger, 1998; McGregor et al., 1998; Monory et al., 2007). Cet effet hypolocomoteur du THC est la conséquence d'un effet cataleptique de la drogue (Monory et al., 2007).

Chez les souris knockouts pour le récepteur CB1, les résultats obtenus concernant la locomotion sont contradictoires. Le groupe de Zimmer utilise le modèle de knockout CB1 généré sur des souris de fond génétique C57Bl6 (Zimmer et al., 1999), alors que le groupe de Maldonado utilise un modèle généré sur des souris de fond CD1 (Ledent et al., 1999; Martin et al., 2000). Pourtant, les études de Zimmer et Martin s'accordent sur le fait que le knockout du récepteur CB1 induit une diminution de la locomotion chez leurs animaux C57Bl6 et CD1 respectivement. Par contre, l'étude de Ledent montre que ce knockout n'a aucune influence sur l'activité locomotrice. Les études de Ledent et Martin, réalisées dans le même laboratoire présentent donc des résultats divergents sur la locomotion de leurs souris KO CB1. L'hypothèse formulée par Martin et collaborateurs pour expliquer cette différence est le fait que le test n'ait pas été réalisé dans les mêmes boîtes de mesure, et ils suggèrent donc un effet boîte dépendant.

Enfin, les traitements agonistes ou antagonistes des récepteurs CB sont aussi associés à des troubles de l'humeur, de l'anxiété ou de la dépression. Comme déjà abordé précédemment, le rimonabant testé en clinique pour soigner les troubles de l'obésité a été associé à des cas de dépression, et à un risque de suicide accru (Moreira and Crippa, 2009). Les études menées chez le rongeur montrent un effet du THC sur l'anxiété. A la dose de 0.3mg/kg précisément, le THC induit un effet anxiolytique mis en évidence avec le test du light-dark (Berrendero and Maldonado, 2002; Valjent et al., 2002). Par contre, à des doses inférieures de l'ordre de 0,003 ; 0,1 ; 1 ou 2,5mg/kg de THC, aucune modification du comportement dans le test du light-dark n'est observée, alors qu'à la dose de 5mg/kg le THC induit un

effet anxiogène dans ce même test (Valjent et al., 2002). De façon similaire, il a été montré que le THC 10 ou 20mg/kg induit un comportement anxieux dans le test en croix surélevé (Onaivi et al., 1995). Par leur étude, Célérier et son équipe mettent en évidence les effets opposés induits par le THC en fonction de la dose testée (Célérier et al., 2006). Ils montrent qu'à la dose de 0,2mg/kg le THC induit des réponses associées à un effet anxiolytique dans les tests du «light-dark», de l'«open field», où du labyrinthe en croix surélevé. A l'opposé, ces tests indiquent un effet anxiogène du THC 7,5mg/kg. Ces effets divergents en fonction des doses administrées montrent que la régulation des troubles de l'humeur par les agonistes cannabinoïdes est dépendante de dosages très précis. C'est ce que nous avons déjà vu précédemment pour les réponses au test de CPP. Cette coïncidence des résultats aux tests d'anxiété et de préférence de place n'est finalement pas surprenante sachant que les situations d'anxiété sont aversives, et de ce fait tout individu va chercher à fuir ou éviter une réexposition à une telle situation. C'est exactement ce que la littérature décrit avec les fortes doses de THC, associées à un comportement de type anxieux et à une aversion dans le test de CPP. Ce phénomène de fuite ou d'aversion associé à l'anxiété a aussi été mise en évidence suite à l'administration de HU-210, dans le test de retrait défensif chez le rat (Rodríguez de Fonseca et al., 1997; Valverde and Torrens, 2012).

IV. Interactions entre systèmes cannabinoïde et opioïde

Les systèmes opioïdes et cannabinoïdes ont des fonctionnements très similaires, de par la nature de leurs récepteurs inhibiteurs, mais aussi l'expression de ces récepteurs dans les mêmes organes ou systèmes, voir même leur colocalisation cellulaire. En effet, il a été montré que les récepteurs CB2 sont exprimés par les cellules du système immunitaire, comme les monocytes, les cellules NK ou les lymphocytes B (Galiègue et al., 1995). Le récepteur opioïde Mu est lui aussi décrit comme étant exprimé par les cellules du système immunitaire périphérique (Chuang et al., 1995). Au niveau du système nerveux, les récepteurs Mu et CB1 colocalisent dans les DRG et la moelle épinière (Hohmann and Herkenham, 1999; Salio et al., 2001). En plus d'être exprimés dans les mêmes régions, les récepteurs cannabinoïdes et opioïdes sont impliqués dans les mêmes pathologies comme la douleur chronique, la dépendance ou encore les troubles alimentaires. Ces implications complémentaires ont été mises en évidence par des études comportementales précliniques, dont certaines sont décrites dans les paragraphes suivants.

A. Interactions dans la nociception

1. Résultats d'études de traitements opioïdes chez des animaux où les récepteurs CB1 sont bloqués ou inactivés

Comme déjà énoncé précédemment, les récepteurs opioïdes et cannabinoïdes sont des médiateurs de l'information douloureuse, en conditions pathologiques ou non. Diverses études ont été menées afin d'explorer le rôle des récepteurs cannabinoïdes dans l'antinociception aux opiacés, ou inversement, le rôle des récepteurs opioïdes dans les effets analgésiques des cannabinoïdes. Plusieurs études ont testé les effets antinociceptifs des opiacés chez des souris knockouts pour le récepteur CB1 (Ledent et al., 1999; Miller et al., 2011; Valverde et al., 2000). En conditions basales, sans modèle de douleur induite, la morphine possède des propriétés analgésiques comparables chez les animaux WT et KO CB1 avec les tests de nociception thermique au chaud de la plaque chaude (Ledent et al., 1999; Miller et al., 2011) et d'immersion de la queue (Ledent et al., 1999, data pas présentées dans leur article mais discutés). Miller et collaborateurs ont testé plusieurs doses de morphine de 1 à 32 mg/kg et les effets analgésiques restent comparables quel que soit la dose administrée (Miller et al., 2011). Ces études montrent que le récepteur CB1 ne semble pas intervenir dans les effets antinociceptifs de la morphine. Cependant, dans leur article, Miller et ses coéquipiers ont aussi testé l'effet du SR141716A sur l'antinociception morphinique. Ils présentent ici le SR141716A (rimonabant) comme un antagoniste CB1. Le rimonabant 3mg/kg est administré 30 min avant l'injection de morphine 32mg/kg et le test de la plaque chaude à 56°C est réalisé 30 min après le traitement morphinique. Dans ces conditions, le rimonabant induit une diminution de l'antinociception chez les animaux KO CB1 par rapport aux contrôles WT. Ces résultats sont assez surprenants étant donné que les animaux KO CB1 présentent

une réponse analgésique à la morphine similaire aux animaux WT. Un élément d'argumentation sur ces différences entre le blocage pharmacologique et génétique de CB1 est peut-être simplement dû à la nature du rimonabant. En effet, de tels résultats suggèrent un effet du rimonabant indépendant de CB1, comme cela l'a déjà été proposé (Raffa and Ward, 2012; Seely et al., 2012; Zádor et al., 2012). De plus, rappelons que beaucoup d'études utilisent le rimonabant comme antagoniste du récepteur CB1 mais ce composé possède des propriétés agonistes inverses (Tableau 7). Ainsi, son utilisation ne peut pas être directement comparée aux effets observés chez les KO CB1. La diminution de l'analgésie morphinique induite par le rimonabant pourrait être associée à son activité d'agoniste inverse. Cependant, les auteurs ont pris le soin de tester le composé seul, et ont montré que celui-ci est dépourvu d'effets sur la nociception dans leurs conditions expérimentales. Ainsi, une autre explication serait que le knockout du récepteur CB1 induise des adaptations développementales, de types compensatoires, qui masqueraient le rôle du récepteur CB1 dans l'analgésie morphinique. De telles compensations et des modifications du système opioïde ont été mises en évidence chez les souris KO CB1 et sont discutés dans la revue Befort et al., 2015, au niveau du striatum. Par contre, aucune régulation des taux de transcrits des récepteurs Mu, Delta et Kappa ne semble intervenir au niveau de la moelle épinière et des DRG des souris KO CB1 (Pol et al., 2006). Cela n'exclut pas le fait que d'autres compensations puissent intervenir.

Ce cas précis indique qu'il est important de toujours compléter les études par utilisation de knockout avec des études pharmacologiques dans la mesure du possible. Ces résultats sont nuancés par ceux obtenus par Cox et Welch, où le rimonabant n'induit aucun effet sur l'analgésie morphinique, après administration sous-cutanée, chez le rat dans un test de nociception mécanique (Randall Sellito), en conditions arthritiques ou non (Cox and Welch, 2004).

Des études comparables ont été réalisées avec un antagoniste du récepteur CB2, l'AM630, testé en coadministration avec de la morphine (da Fonseca Pacheco et al., 2008; Pacheco et al., 2009). Dans un protocole d'administration en périphérie, au niveau de la patte chez le rat, l'AM630 diminue légèrement l'analgésie morphinique avec un test de nociception mécanique (Randall Sellito) (da Fonseca Pacheco et al., 2008). Par contre, après administration centrale par injection intra cérébro ventriculaire ou icv, cet antagoniste CB2 n'induit aucun effet sur l'antinociception morphinique (Pacheco et al., 2009). Ces résultats suggèrent que le récepteur CB2 périphérique intervient également dans l'antinociception morphinique.

Ces interactions particulières entre les récepteurs opioïdes et CB1 dans l'antinociception semblent spécifiques au récepteur Mu. En effet, le cotraitement avec des antagonistes CB1 (ou agonistes inverses) n'induit pas de modification des effets antinociceptifs d'agonistes des récepteurs Delta ou

Kappa, comme le SNC80 ou la bremazocine réciproquement, après administration périphérique ou centrale (da Fonseca Pacheco et al., 2008; Pacheco et al., 2009). Ces résultats sont complétés par l'absence de régulations de l'analgésie d'agonistes Delta ou Kappa chez les souris KO CB1 (Valverde et al., 2000).

2. Résultats d'études de traitements CB chez des animaux où les récepteurs opioïdes sont bloqués ou inactivés

Les interactions des systèmes opioïde et cannabinoïde dans la nociception ont aussi été mises en évidence par le blocage des effets antinociceptifs du THC par des antagonistes opioïdes. Une étude dans un modèle de nociception de type arthritique chez le rat a montré que la NLX diminue l'antinociception induite par le THC dans le test mécanique de Randall Sellito (Cox and Welch, 2004). Ces résultats ont été observés à la fois chez les rats douloureux chroniques et chez les rats naïfs. Ensuite, dans ces mêmes modèles ils ont testé les effets des antagonistes Delta et Kappa, NTI et norBNI respectivement, sur l'antinociception induite par le THC. Le NTI, dans les deux cas, ne modifie pas l'analgésie THC dépendante. Par contre, le norBNI diminue cette antinociception chez les rats douloureux uniquement. Ici, aucun antagoniste spécifique du récepteur Mu n'a été testé, mais par déduction, les effets de la NLX, inhibant l'antinociception chez les rats naïfs, semblent être médiés par le récepteur opioïde Mu. Ces résultats montrent aussi que le récepteur Kappa participe à l'antinociception du THC dans ce modèle d'arthrite chez le rat.

Une autre étude chez le rat, basée sur un traitement avec du WIN55,212 ne montre pas de régulation de l'analgésie par la NLX, alors que le rimonabant, antagoniste contrôle, permet de supprimer l'effet antinociceptif du WIN55,212 (Paquette et al., 2005). De façon similaire, la naloxone ne permet pas de bloquer l'analgésie induite par le THC après administration intrathécale (Welch and Stevens, 1992).

Ces études montrent qu'il semble y avoir une participation des récepteurs opioïdes dans les effets antinociceptifs des agonistes CB, mais ces interactions ne sont toujours pas claires à l'heure actuelle et nécessitent de plus amples investigations.

3. Potentialisation de l'analgésie lors de cotraitements avec des agonistes CB et opioïdes

Les cotraitements composés d'agonistes cannabinoïdes et opioïdes sont décrits comme ayant de fortes propriétés analgésiques. La combinaison de doses subanalgésiques de cannabinoïdes et de morphine permet d'obtenir un effet antinociceptif (Smith et al., 2007) après administrations systémiques. A des doses plus élevées, décrites comme induisant une analgésie, l'utilisation d'un tel cotraitement permet de potentialiser les effets analgésiques (Cichewicz et al., 1999; Finn et al., 2004; Pugh et al., 1996; Smith

et al., 1998; Yesilyurt et al., 2003). Toutes ces études ont été réalisées avec des cotraitements de THC et de morphine, administrées soit par voie per os (Cichewicz et al., 1999; Smith et al., 1998), intraveineuse (Finn et al., 2004; Reche et al., 1996), intrathécale (Pugh et al., 1996), intrapéritonéale (Finn et al., 2004) ou sous-cutanée (Smith et al., 1998). Une étude de Wilson et collaborateurs a également montré qu'un prétraitement de HU-210, un agoniste mixte CB1-CB2, administré dans la PAG, permet d'augmenter l'effet antinociceptif de la morphine (Wilson et al., 2008). Tous ces résultats montrent que quel que soit le mode d'administration des agonistes CB, ils permettent de potentialiser l'effet analgésique de la morphine. Les protocoles de cotraitement utilisés sont basés sur ce que nous appellerons un « prétraitement à court terme », c'est-à-dire une injection de CB précédant l'administration de morphine, dans un laps de temps relativement court (moins de 2h)(Cichewicz et al., 1999; Reche et al., 1996; Wilson et al., 2008); ou bien sur des protocoles de coadministration où les 2 composés sont administrés en même temps. De tels protocoles permettent donc de mettre en évidence les interactions directes ou à court terme entre les systèmes opioïdes et cannabinoïdes. Notons également que la majorité de ces études sont réalisées avec des tests mesurant la nociception thermique au chaud comme les tests de la plaque chaude (Reche et al., 1996) ou de retrait de la queue (Smith et al., 1998; Reche et al., 1996; Pugh et al., 1996; Yesilyurt et al., 2003), à savoir le test d'immersion de la queue, ou le test de retrait de la queue suite à une exposition à un rayon chauffant.

Lors d'un cotraitement prolongé avec des agonistes cannabinoïdes et opioïdes, il a été montré que le développement de la tolérance à l'analgésie était atténué, particulièrement lorsque le traitement est établi à partir de doses subanalgésiques (Smith et al., 2007). La tolérance à l'analgésie est généralement observée lors d'un traitement répété avec des opiacés à des doses élevées, ou du moins effectives, mais ne sont pas décrites lors de l'utilisation de doses faibles. Cela s'explique par le fait que la tolérance est la conséquence de plusieurs phénomènes tels qu'une désensibilisation du récepteur Mu, un découplage du récepteur de sa protéine G inhibitrice, une phosphorylation des récepteurs Mu rendus alors inactifs, ou une internalisation des récepteurs (pour revue, cf Williams et al., 2013). Tous ces phénomènes sont la conséquence d'une sollicitation importante des récepteurs et donc sont inexistantes lorsque les doses utilisées sont faibles. Cette théorie liant la tolérance aux opiacés à la désensibilisation des récepteurs est mise en évidence dans l'article de Smith et collaborateurs, qui montrent que dans le cas précis d'un cotraitement avec de « low doses » de THC et de morphine, il n'y a pas de désensibilisation du récepteur Mu dans la moelle épinière ou dans la PAG (Smith et al., 2007). Cependant, il a été montré qu'un cotraitement THC-morphine avec des doses effectives, cette fois-ci, permet également de réduire la tolérance à l'analgésie (Cichewicz and Welch, 2003). L'hypothèse formulée par les auteurs est que le THC pourrait faciliter le couplage du récepteur Mu et la transduction du signal intracellulaire, ce qui conduirait à une diminution de la désensibilisation.

Ces résultats montrant un effet potentialisateur de l'analgésie suite à un cotraitement CB-morphine, obtenus chez le rongeur, sont appuyés par des études réalisées chez le singe rhésus, où cette potentialisation est également bien marquée (Li et al., 2008; Maguire and France, 2014; Maguire et al., 2013).

Afin d'appuyer le fait que cette potentialisation est bien médiée par les récepteurs opioïdes et cannabinoïdes, des études ont complété leur approche par l'utilisation d'antagonistes de chaque système. L'utilisation d'antagonistes non spécifiques des récepteurs opioïdes, comme la naloxone a permis de montrer que ces récepteurs sont directement impliqués (Cichewicz et al., 1999; Reche et al., 1996). De même, l'utilisation du rimonabant permet de montrer que les récepteurs CB1 sont aussi impliqués dans cette potentialisation puisque lorsque l'on bloque son activité, la potentialisation est abolie (Reche et al., 1996; Smith et al., 1998). Ces résultats semblent assez évidents, sachant que la morphine d'une part et le THC, sont des agonistes des récepteurs opioïdes Mu et CB1 respectivement. Par contre, en ce qui concerne le rôle des autres récepteurs du système opioïde, comme les récepteurs Delta ou Kappa, les résultats sont plus contradictoires. Alors que l'étude de Cichewicz et collaborateurs ne montre aucun effet des antagonistes Delta et Kappa, naltrindole (NTI), et norbinaltrophimine (norBNI) (Cichewicz et al., 1999) sur l'analgésie induite par le THC, Reche et collaborateurs montrent un effet inhibiteur du norBNI administré en intrathécal, mais aucun effet du NTI (Reche et al., 1996), et Pugh et collaborateurs montrent, quant à eux, un rôle inhibiteur à la fois du NTI et du norBNI par voie it (Pugh et al., 1996).

Enfin, la potentialisation de l'analgésie par l'utilisation de « low doses » d'antagonistes semble comparable à celle déjà décrite lors de traitements opiacés. L'étude de Paquette et Olmstead, montre que l'administration de faibles doses de naltrexone (NTX), permet de potentialiser l'effet analgésique du WIN55,212 chez le rat (Paquette et al., 2005). Ces résultats sont similaires à ceux décrits par Crain et Shen, à savoir que l'administration de faibles doses de NTX permet d'augmenter le potentiel analgésique de la morphine (Crain and Shen, 1995; Shen and Crain, 1997).

Ensemble, ces différents résultats montrent qu'il y a, de toute évidence, une interaction des systèmes opioïdes et cannabinoïdes dans les effets antinociceptifs des agonistes CB et opioïdes.

B. Interactions dans les effets récompensants

1. Résultats d'études de traitements opioïdes chez des animaux où les récepteurs CB1 sont bloqués ou inactivés

De nombreuses études ont été réalisées pour tester les effets d'antagonistes cannabinoïdes sur les effets récompensants des opiacés et plus particulièrement de la morphine. Quelques-uns de ces résultats sont décrits dans le [tableau 9](#).

Ce tableau résume en quelques lignes la complexité actuelle d'interprétation des résultats de CPP morphine après antagonisme CB. Cependant, ces études montrent que l'utilisation d'antagonistes CB1 (ou plutôt d'agonistes inverses CB1), comme le rimonabant ou l'AM 251, pendant la phase d'acquisition de la CPP, c'est-à-dire pendant la phase de conditionnement à la morphine, permet de diminuer la préférence de place induite par la morphine. Cela signifie que la morphine, lorsqu'elle est coadministrée avec un antagoniste CB1 perd de ses propriétés récompensantes. Par contre, lorsque l'antagoniste CB1 est administré au moment du post-conditionnement, c'est-à-dire lorsque l'effet récompensant de la morphine est acquis, au moment de l'expression de la CPP, les résultats sont plus divergents. Il y aurait, à priori, un effet dose dépendant de l'altération de la CPP morphinique induite par un antagoniste CB1. En effet, les études sur la souris de Mas-Nieto et collaborateurs, et de Navarro et collaborateurs sont divergentes, montrant respectivement aucun effet du SR141716A administré ip à 1mg/kg et une diminution de la CPP après administration de SR141716A 3mg/kg ip (Mas-Nieto et al., 2001; Navarro et al., 2001). Notons également que dans ces deux études, les doses de morphine utilisées pour induire la CPP sont différentes. L'étude de Singh et al., 2004 chez le rat confirme le fait que la diminution de la CPP morphinique induite par un antagoniste CB1 est dose dépendant puisque, pour un conditionnement avec une même dose de morphine à 10mg/kg ip, le rimonabant induit une diminution de la CPP à une dose de 3mg/kg ip, mais pas à des doses de 0,1 ou 0,5mg/kg.

Opiacé	Antagoniste CB	Protocole administration antagoniste	Modèle animal	Effets sur CPP ou CPA	Référence
Morphine 10mg/kg ip	AM 251 5mg/kg ip	15 min avant chaque injection de morphine (cdt)	souris	⋮ CPP	Zhang et al., 2016 27461790
Morphine 5mg/kg sc	AM 251 15 ; 45; 90μmol/m 0.5μl intra Nac	5 min avant chaque injection de morphine (cdt)	rat	⋮ CPP	Karimi 2013 23523958
		5 min avant post cdt		CPP =	
Morphine 6mg/kg sc	AM 251 60 ; 90; 120ng intra CeA	avant chaque injection de morphine (cdt)	rat	⋮ CPP	Rezayof 2011 21262285
		avant post cdt		⋮ CPP	
Morphine 3mg/kg sc	SR141716A 5; 10 mg/kg ip	avant chaque injection de morphine (cdt)	souris	⋮ CPP	Mas-Nieto 2001
	SR141716A 1 mg/kg ip			CPP =	
Morphine 4mg/kg sc	SR141716A 0.1 mg/kg ip	avant chaque injection de morphine (cdt)	rat	⋮ CPP	Singh 2004 15488486
Morphine 10mg/kg ip	SR141716A 0.1 ; 0.5 mg/kg ip			CPP =	
	SR141716A 3 mg/kg ip			⋮ CPP	
Morphine 5mg/kg sc	SR141716A 3 mg/kg ip	avant post cdt	souris	⋮ CPP	Navarro 2001 11438610

Tableau 9 : Illustration de la variabilité des résultats obtenus dans la littérature concernant les effets d'un cotraitement morphine-antagoniste CB dans le test de préférence de place.

Liste non exhaustive, pour revue et références complémentaires, voir Tzschentke, 2007.

De plus, la région d'administration de l'antagoniste CB1 semble également jouer un rôle important puisqu'une administration dans le Nac n'induit pas de régulation de la CPP, alors qu'une administration intra-CeA diminue la CPP morphinique (Karimi et al., 2013; Rezayof et al., 2011).

Ces approches pharmacologiques sont complétées par l'utilisation d'animaux knockouts pour le récepteur CB1. Il a été montré qu'un traitement de 6 jours avec de la morphine 5mg/kg administrée

en sous-cutanée n'induit pas de CPP chez les souris KO CB1 alors que ce traitement induit une CPP chez les contrôles WT (Martin et al., 2000). Ces résultats sont nuancés par ceux obtenus par Rice et collaborateurs, qui montrent que les animaux KO CB1 présentent une CPP comparable aux WT après un traitement morphinique à 4 ou 8 mg/kg ip (Rice et al., 2002). Les différences obtenues dans ces études peuvent être expliquées par la nature du fond génétique différent des souris utilisées.

2. Résultats d'études de traitements CB chez des animaux où les récepteurs opioïdes sont bloqués ou inactivés

Les résultats de la partie précédente nous ont montré que les récepteurs CB1 interviennent dans les effets récompensants de la morphine. Cette partie vise à montrer que l'inverse est également vrai.

Les effets récompensants du THC ont été testés chez des souris knockouts pour les différents récepteurs du système opioïde: Mu, Delta et Kappa (Ghozland et al., 2002). Nous avons vu dans les paragraphes précédents que le THC nécessitait une primo-injection pour induire de la CPP ([Chapitre II ; III.C](#)). Après une telle primo-injection de THC, les souris WT présentent une CPP, retrouvée également chez les animaux KO Delta et KO Kappa, mais pas chez les souris KO Mu. Dans cette même étude, ils montrent que le THC 5mg/kg induit une CPA chez les animaux WT, également observée chez les KO Delta et KO Mu, mais qui est absente chez les souris KO Kappa. Cela suggère l'implication du récepteur Mu dans les effets récompensants du THC, et l'implication du récepteur Kappa dans les effets aversifs du THC. Egalement dans un modèle de knockout, mais cette fois-ci de souris doubles knockouts pour les récepteurs Mu et Delta, il a été montré que les propriétés récompensantes du THC étaient amoindries, soulignant un rôle du récepteur Mu dans ces effets (Castañé et al., 2003).

De façon physiologique, la dynorphine est un agoniste ayant une forte affinité pour le récepteur Kappa (Akil et al., 1998). Pour cette raison, l'étude des effets du THC chez des souris KO pour la prodynorphine, vise à étudier de façon indirecte le rôle de l'activité endogène du récepteur Kappa. Zimmer et collaborateurs ont montré que chez ces animaux, le THC n'induit pas de CPA (Zimmer et al., 2001).

De façon moins spécifique, l'administration de naloxone, antagoniste non spécifique des récepteurs opioïdes, pendant le conditionnement au THC, bloque la CPP induite classiquement par le THC (Baird et al., 2004). Les auteurs comparent les effets inhibiteurs de la naloxone sur la CPP induite par le THC, aux effets inhibiteurs du rimonabant, suggérant une implication aussi importante du système opioïde que du cannabinoïde dans ce phénomène.

Tous ces résultats démontrent que le système opioïde joue un rôle primordial dans les régulations des effets récompensants et aversifs induits par le THC.

Ces liens très étroits entre systèmes opioïde et cannabinoïde dans les effets récompensants du THC peuvent être mis en relation avec des interactions assez similaires dans la régulation de l'anxiété induite par le THC.

Dans la partie concernant le rôle du système cannabinoïde dans le bien-être ([Chapitre II; III.E](#)), nous avons vu que le THC induit un effet anxiolytique mis en évidence dans le test du light-dark (Berrendero and Maldonado, 2002; Valjent et al., 2002). Cet effet anxiolytique du THC, observé uniquement avec la dose de 0,3mg/kg, semblerait être médié par les récepteurs opioïdes Mu et Delta, puisque l'administration d'antagonistes de ces récepteurs permet de bloquer cet effet (Berrendero and Maldonado, 2002). Le récepteur Kappa, quant à lui, ne semble pas intervenir dans ces effets puisque l'administration de norBNI n'induit aucune modulation du potentiel anxiolytique du THC 0,3mg/kg. Dans le contexte de l'anxiété, seuls les récepteurs Mu et Delta semblent intervenir, mais pas le récepteur Kappa.

3. Effets de cotraitements avec des agonistes CB et opioïdes

A notre connaissance, une seule étude s'est intéressée à l'effet d'un prétraitement prolongé sur la CPP morphinique. Cette étude a consisté à traiter des souris pendant 3 semaines avec du THC 10mg/kg ip, puis les auteurs ont respecté une période de sevrage au THC de 3 jours, durant lesquelles les animaux n'ont reçu aucune drogue, et ensuite les souris ont été exposées à un protocole de CPP morphinique (Valverde et al., 2001). Les doses de morphine testées ici étaient de 0,5mg/kg ou 2mg/kg. A la plus faible dose de morphine, aucune CPP n'est observée, chez les souris prétraitées ou non. L'utilisation d'une telle dose de morphine dénuée d'effet récompensant aurait permis de mettre en évidence un effet potentialisateur des effets récompensants du THC. Dans ces conditions, le THC ne semble donc pas avoir d'effet potentialisateur de la CPP morphinique. Avec la dose de 2mg/kg de morphine, les auteurs ont montré que les animaux qui n'avaient pas subi de prétraitement développaient un comportement de type CPP. Par contre, les animaux prétraités au THC ne développent pas ce comportement. Dans ces conditions, le THC aurait donc un effet inhibiteur de la CPP morphinique. Cependant, un élément important est à mentionner dans ces expériences : les souris ont subi une période de sevrage de 3 jours entre le traitement THC et le traitement morphinique. Ce sevrage doit certainement avoir des conséquences sur les expériences de CPP morphinique qui succèdent

Il y a donc des interactions entre les systèmes opioïde et cannabinoïde dans la récompense, mais au vu de la diversité des résultats décrits en fonction des contextes, des doses administrées et des protocoles suivis, il est difficile de conclure clairement sur la nature de ces interactions et de proposer un mécanisme précis.

C. Interactions dans la dépendance physique

En préclinique, les phénomènes de dépendance physique sont mis en évidence grâce à des modèles de sevrage, soit après arrêt du traitement, ou après précipitation avec un antagoniste des récepteurs impliqués dans cette dépendance. Dans les parties précédentes, nous avons vu que classiquement, un sevrage aux opiacés est précipité par administration d'un antagoniste opiacé ([Chapitre II; II.A](#)). De même, un sevrage aux cannabinoïdes est classiquement décrit comme étant précipité par un antagoniste cannabinoïde ([Chapitre II; III.B](#)). Pourtant, dans cette partie, nous verrons que ce phénomène de sevrage peut-être précipité par l'utilisation d'un antagoniste du système voisin, et que dans ces conditions, les animaux knockouts peuvent présenter un sevrage altéré par rapport aux contrôles WT.

1. Résultats d'études de traitements opioïdes chez des animaux où les récepteurs CB1 sont bloqués ou inactivés

Chez les souris knockouts pour le récepteur CB1 traitées avec un protocole morphinique décrit préalablement comme induisant une dépendance physique, l'administration de naloxone induit un sevrage précipité moins marqué que chez les animaux WT (Ledent et al., 1999; Lichtman et al., 2001). L'étude de Martin et collaborateurs apporte des éléments qui permettent de nuancer le fait que le récepteur CB1 soit nécessaire au sevrage morphinique (Martin et al., 2000). En effet, dans leur étude, les souris KO CB1 présentent des signes d'aversion au sevrage comparable à ceux obtenus chez les souris WT. Notons que les études de Martin et Ledent sont réalisées au sein de la même équipe et que ces deux études présentaient déjà des résultats divergents en locomotion chez les KO CB1. Ici, pour expliquer cette divergence d'aversion au sevrage, Martin et collaborateurs mettent en avant le fait que leur sevrage est précipité avec une dose de NLX à 0,1mg/kg alors que l'étude de Ledent précipitait le sevrage avec une dose de NLX 10 fois plus élevée, soit de 1mg/kg. Ils précisent que la dose de 0,1mg/kg est largement suffisante pour induire un sevrage au vu de leurs résultats et que la dose de 1mg/kg semble être trop importante. De plus, l'étude de Lichtman et collaborateurs montrent, certes, une diminution des signes de sevrage morphinique précipité à la naloxone chez les KO CB1, mais ils précisent que le sevrage n'est pas aboli chez ces animaux, mais permet l'obtention d'un résultat intermédiaire entre le sevrage obtenu chez les WT et les souris KO Mu. Ensemble, ces résultats indiquent que le récepteur CB1 participe à la mise en place de la dépendance physique à la morphine, mais que son inactivation n'est pas suffisante pour empêcher ce phénomène.

Ces informations sont complétées par des études de blocage pharmacologique du récepteur CB1 avec le rimonabant chez des souris WT rendues dépendantes à la morphine. Ici, la question posée par les

auteurs est différente. En effet, une telle approche permet d'étudier si le récepteur CB1 participe au sevrage morphinique et à l'aversion observée lors du sevrage. Comme précédemment les résultats obtenus sont contradictoires. Alors que deux études montrent un sevrage précipité au rimonabant chez des animaux dépendants à la morphine (Navarro et al., 1998, 2001), une autre étude montre que le rimonabant n'induit pas de sevrage morphinique (Lichtman et al., 2001). Cependant, même dans les deux études de Navarro, il est important de mentionner le fait qu'il y a un sevrage, mais beaucoup moins important que celui classiquement décrit suite à l'administration d'un antagoniste opioïde.

Ensemble, les approches par knockouts CB1 et antagonisme CB1 démontrent que ce récepteur participe à la dépendance physique à la morphine, mais qu'il n'est pas essentiel.

2. Résultats d'études de traitements CB chez des animaux où les récepteurs opioïdes sont bloqués ou inactivés

Dans la même étude de Lichtman et collaborateurs, une approche réciproque a été étudiée chez les souris KO Mu, à savoir traiter les souris avec différentes doses de THC pendant 5 jours avant d'administrer du rimonabant pour évaluer la nécessité du récepteur Mu dans la mise en place de la dépendance physique (Lichtman et al., 2001). Cette étude permet d'exposer un effet dose dépendant. A la dose de THC 10mg/kg, les animaux WT et KO Mu présentent un sevrage précipité au rimonabant comparable, signifiant que le récepteur Mu ne participe pas au sevrage. Pourtant, avec les doses de 30 et 100mg/kg de THC, les signes de sevrage précipité au rimonabant sont moindres chez les KO Mu par rapport aux WT. Les doses de 30 et 100mg/kg sont très élevées, et nous avons vu précédemment que des doses au-dessus du mg/kg sont associées à des comportements aversifs dans le test de CPP (Figure 31). Cela indique que le récepteur Mu intervient dans la dépendance physique au THC après administration de très fortes doses. De plus, il est utile d'ajouter que même avec ces fortes doses de THC, le sevrage est simplement diminué chez les KO Mu, et pas aboli. Ghozland et collaborateurs ont élargi leurs recherches à l'étude de l'implication des récepteurs Delta et Kappa en plus du récepteur Mu, également par des approches de knockouts (Ghozland et al., 2002). Ici le protocole de THC suivi consistait à administrer du THC 20mg/kg 2 fois par jour pendant 6 jours. Dans ces conditions, tous les animaux présentent un sevrage précipité au rimonabant d'amplitude comparable, montrant que ni les récepteurs opioïdes Mu, ni les Delta et Kappa ne participent à la mise en place de la dépendance physique au THC.

Lichtman et son équipe, toujours dans la même étude, ont cherché à confirmer les résultats obtenus chez les knockouts par blocage pharmacologique avec la NLX (Lichtman et al., 2001). Concrètement, les animaux sont rendus tolérants au THC grâce à un protocole d'administration s'étendant sur 5 jours,

à raison d'une injection par jour de THC 10mg/kg. A l'issue de ce traitement, de la NLX 1 ou 5mg/kg est administrée afin d'étudier le rôle des récepteurs opioïdes dans le sevrage THC. Comme attendu chez les KO Mu, la NLX 1 et 5mg/kg n'induit pas de sevrage. L'absence de sevrage THC précipité à la NLX avait déjà été rapportée il y a de nombreuses années chez le singe (Beardsley et al., 1986), et les pigeons (McMillan, 1971). A nouveau, ces résultats sont nuancés par ceux obtenus avec un autre agoniste mixte CB1-CB2, le HU-210, où un sevrage précipité à la NLX a été décrit (Navarro et al., 2001). Cependant, les résultats de cette étude ne peuvent pas être directement comparés à ceux des précédentes études citées. En effet, non seulement le composé utilisé n'est pas le même, mais en plus, le protocole est très différent puisqu'il s'étend sur une période de 14 jours alors que dans l'étude de Lichtman, l'administration de THC était limitée à 5 jours. Les différences observées pourraient venir soit de la durée du traitement nécessaire pour induire l'activation des deux systèmes opioïde et cannabinoïdes, ou du fait que CB2 puisse être impliqué dans ces adaptations.

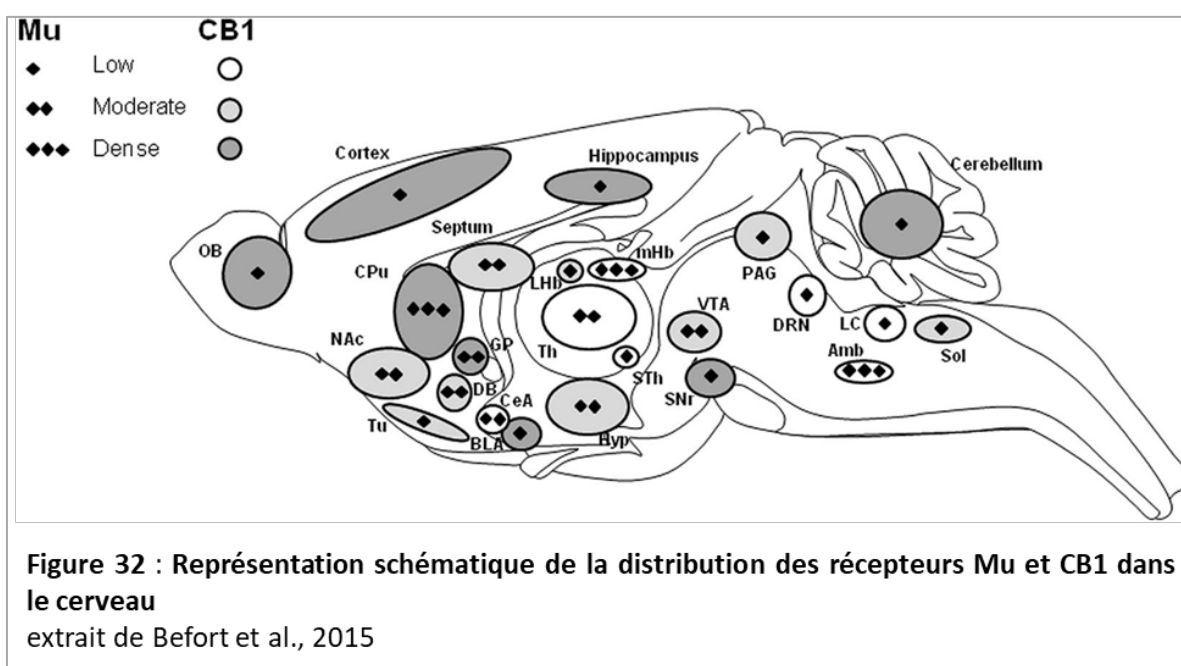
Ces approches pharmacologiques confirment le rôle mineur des récepteurs opioïdes dans la dépendance physique aux agonistes CB1.

3. Effets d'un prétraitement CB sur le sevrage aux opiacés

A notre connaissance, une seule étude s'est intéressée aux effets d'un prétraitement CB sur le sevrage aux opiacés, celle de Valverde et collaborateurs (Valverde et al., 2001). Dans leur étude, avec le même protocole, ils s'étaient également intéressé aux effets d'un tel prétraitement sur les effets récompensants de la morphine ([Chapitre II; IV.B.3](#)). Pour rappel, les souris sont traitées pendant 3 semaines avec du THC 10mg/kg, une période de 3 jours de sevrage est respectée, avant de suivre un protocole pour rendre les souris dépendantes à la morphine (doses escaladantes 10-100mg/kg pendant 5 jours). A l'issue de ces 5 jours, le sevrage morphinique est précipité à la NLX. De façon très intéressante, les auteurs montrent que les animaux ayant reçu le prétraitement THC présentent un sevrage moins fort que les autres. Cela insinue que le fait de stimuler les récepteurs CB en amont d'un traitement morphinique permet de prévenir le sevrage, ou plutôt de rendre le sevrage plus doux. Cette étude utilise un protocole expérimentant une période de sevrage de 3 jours entre le traitement THC et le traitement morphinique, ce qui rend les résultats difficilement interprétables du point de vu des effets du prétraitement THC sur la dépendance morphinique. De plus, cette étude étant la seule à étudier les interactions CB-opioïde de cette façon, il est difficile de conclure sur un éventuel effet protecteur d'un prétraitement CB sur le sevrage morphinique.

D. Interactions moléculaires

Les études décrivant des interactions moléculaires entre les systèmes opioïde et cannabinoïde sont peu nombreuses. Cependant, il a été montré que les récepteurs de ces systèmes colocalisent dans le système limbique et la PAG (Mailleux and Vanderhaeghen, 1992; Romero et al., 1998), dans les nocicepteurs au niveau de la moelle épinière (Hohmann et al., 1999). Ces colocalisations ne reflètent en réalité que l'expression des récepteurs opioïdes, d'une part et cannabinoïdes, d'autre part, dans ces structures. Les niveaux d'expression des récepteurs Mu et CB1 dans les différentes régions du cerveau sont résumés dans la [figure 32](#) extraite de la revue Befort et al., 2015.



Une approche in vitro utilisant des cellules HEK cotransfectées avec les récepteurs CB1 et Mu montrent des interactions directes entre les deux récepteurs par BRET (Rios et al., 2006). Les interactions du récepteurs CB1 ne se limitent pas à des interactions avec le récepteur Mu, puisque des interactions de CB1 avec les récepteurs Delta et Kappa ont également été mises en évidence dans cette étude. Ces interactions démontrent que ces interactions entre récepteurs peuvent aboutir à des modulations des réponses comportementales et suggèrent de plus amples études d'interactions moléculaires de ces systèmes.

Etant donné la diversité de résultats obtenus et les contextes divergents dans lesquels ils ont été obtenus, nous avons choisi de synthétiser les principales informations décrites dans cette introduction concernant les interactions entre systèmes opioïdes et cannabinoïde dans un [schéma bilan](#).

SCHEMA BILAN

	 KO CB1	 Antagoniste CB1 Rimonabant	 KO Mu	 Antagoniste opioïde NTX NLX
Nociception	BL			
Analgésie	+agoniste CB	= ou ↗	=	=
	+agoniste Mu	↘	N.D.	= ou ↘
Récompense CPP	+agoniste CB	↘	↘	↘
	+agoniste Mu	= ou ↘	↘	↘
Sevrage précipité	+agoniste CB	↘	= ou ↘	Antagoniste opioïde= Sevrage précipité Mu et CB1
	+agoniste Mu	= ou ↘	↘	

↘ diminution; ↗ augmentation; ↘ perte d'effet; = pas de régulation; N.D. non déterminé

Schéma bilan des principaux résultats comportementaux décrits dans la littérature suite à des traitements CB/morphine chez des animaux knockouts, où chez qui l'activité des récepteurs Mu ou CB1 est inhibée.

Projet III :

Caractérisation comportementale de l'agoniste du récepteur

CB1: ACEA et rôle du système opioïde dans ces réponses.

Projet III : Caractérisation comportementale de l'agoniste du récepteur CB1: ACEA et rôle du système opioïde dans ces réponses.

I. Préambule

L'objectif principal du projet de thèse (Chapitre II) est de démontrer les intérêts thérapeutiques de l'utilisation d'un traitement combiné composé d'un agoniste spécifique CB1 et de morphine sur l'antinociception et les comportements associés à l'addiction, dans un modèle préclinique murin. Mais avant d'entreprendre une étude utilisant une association pharmacologique de ce type, les effets propres de chacune de ces drogues doivent être connus.

Dans le chapitre I, et dans l'introduction du chapitre II, nous avons vu que les effets nociceptifs, ainsi que les effets associés aux comportements d'addiction de la morphine, sont relativement bien décrits dans la littérature, ce qui n'est pas le cas des agonistes du système cannabinoïde. En effet, dans l'introduction de ce chapitre II, nous avons vu que la grande majorité des études ont été réalisées suite à l'administration d'agonistes mixtes CB1-CB2, dont le principal représentant est le THC. Les effets centraux observés suite à de tels traitements étaient souvent associés à des effets CB1 dépendants puisqu'il était décrit que le récepteur CB1 était le seul représentant des récepteurs CB exprimé au niveau cérébral. Jusque dans les années 2000, l'expression du récepteur CB2 était considérée comme exclusivement périphérique. Depuis, il a été démontré que ce récepteur CB2 était également exprimé au niveau central ce qui soulève un intérêt particulier de distinguer les effets des agonistes CB1 de ceux des agonistes CB2.

De plus, nous avons vu que les résultats des études de comportement, aussi bien antinociceptif que sur la récompense ou encore le sevrage sont assez divergents. L'utilisation d'un composé spécifique du récepteur CB1 permettrait peut-être de mieux définir les effets des cannabinoïdes dans de tels comportements et par comparaison à l'effet d'agoniste sélectifs CB2, de distinguer des effets propres à chacun de ces récepteurs.

Dans ce contexte, l'arachidonyl-2-chloroethylamide ou ACEA, est considéré comme étant un des agonistes les plus sélectifs pour CB1. Les études réalisées avec cet agoniste sont assez peu nombreuses, et aucune étude comportementale n'a été réalisée visant à établir sa caractérisation chez la souris. Pour ces différentes raisons, nous avons exploré quels sont les effets de cet agoniste sur différentes réponses comportementales comme

- la nociception thermique,

- des comportementaux de bien-être tels que prendre soin de soi, le suivi de l'évolution du poids des animaux, ou des comportements d'évitement face à une situation anxiogène,
- des comportements du type sevrage.

De plus, nous avons vu que les agonistes CB peuvent posséder des effets différentiels en fonction de la chronicité de leur utilisation ou non. Cet effet a surtout été mis en évidence lors des tests de préférence de place conditionnée au THC, où un effet aversif est mesuré lorsque le conditionnement n'est pas précédé d'une primo-injection de drogue. Cela suggère un effet aversif du THC lors de la première administration qui laisse progressivement place à un effet récompensant ([Figure 31](#)). Cette dualité d'effets peut être propres au THC, ou bien être un effet de l'activation spécifique du récepteur CB1. Cette étude vise à répondre à cette question.

Afin de compléter notre étude, nous avons également exploré les rôles des récepteurs opioïdes Mu et Delta dans ces effets. Le récepteur Mu étant un médiateur de la nociception ([chapitre I](#)) et le récepteur Delta étant impliqué dans la régulation des phénomènes anxio-dépressifs ([introduction chapitre II](#)), leur activation pourrait être à l'origine de certains des effets étudiés de l'ACEA.

Ainsi, cette étude repose sur l'utilisation d'approches pharmacologiques, comme l'utilisation d'un agoniste spécifique du récepteur CB1, et d'antagonistes des récepteurs opioïdes, ainsi que sur l'utilisation d'approches de knockout des récepteurs opioïdes Mu et Delta.

II. Article: Etudes des réponses comportementales de l'agoniste ACEA du récepteur cannabinoïde CB1, et rôle des récepteurs opioïdes Mu et Delta dans ces réponses (Roeckel et al., en soumission)

Behavioral characterization of the CB1 agonist ACEA in Mu and Delta opioid knockout mice

Roeckel LA, Massotte D, Befort K

Behavioral characterization of the CB1 agonist ACEA in Mu and Delta opioid knockout mice

Abstract

Opioid and cannabinoid systems contribute to behavioral effects of emotional responses but the interaction between the two is still unclear. Opioids are powerful analgesics but long-term use is associated with disruptions in emotional processing. Cannabinoids are less effective to induce analgesia but they are associated to fewer side effects compared to opioids. Despite obvious interactions between opioid and cannabinoid receptors, the role of Mu (MOR) and Delta opioid receptors (DOR) in specific CB1 agonist behavioral responses is not well established.

The aim of our study is to characterize addictive-related behavioral effects of a selective CB1 agonist, arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA) in mice, on nociception, naturalistic behaviors and naloxone-precipitated withdrawal, and to determine the involvement of MOR and DOR in these responses.

We first established the absence of analgesic properties of ACEA (3mg/kg, ip) in the tail immersion test. We showed a biphasic effect of ACEA on depressive like behavior, with a prodepressive state induced by the first injection (day1), and a shift to an antidepressive effect (day3). This effect was abolished in MOR knockout (KO) mice. Oppositely, no implication of DOR was observed either using KO or pharmacological blockade with the specific DOR antagonist naltrindole. No effect of ACEA treatment was detected in the light-dark test. We analysed the effect of naloxone, a non-specific opioid antagonist, following ACEA treatment (5d) on withdrawal signs in WT, MOR and DOR KO mice and observed a similar range of withdrawal in all genotypes. This observation confirms a direct participation of opioid receptors in CB1 withdrawal. Altogether, targeting specifically CB1 receptors for developing therapies based on a combination of opiate and cannabinoid agonists opens new strategies.

Keywords

ACEA, Depression, Nociception, Withdrawal, Naltrindole, Naloxone, Cannabinoid, Opioid receptor, morphine

Introduction

Opioid and cannabinoid receptors are involved in similar behavioral responses. Pharmacological activation of either opioid or cannabinoid receptors induces antinociception (for review, Nielsen et al., 2017). These systems are also involved in reward and dependence (for review, Scavone et al., 2013; Tzschentke, 2007). These similar behavioral effects may be the consequence of their colocalization in many regions of the central nervous system, or the consequence of a common mechanism of activation. Indeed, opioid receptors known as Mu (MOR), Delta (DOR) and Kappa (KOR) and cannabinoid type 1 (CB1) and 2 (CB2) receptors are all coupled to inhibitory G proteins. Receptors of these two systems are largely expressed in the central nervous system. Whereas the distribution in the CNS of MOR, DOR and KOR (Erbs et al., 2015; Le Merrer et al. 2009), and the distribution of the CB1 receptor are well described in the literature (Befort, 2015), the CB2 receptor was first reported expressed in immune cells (Mackie, 2008; Maldonado et al., 2011). However, recent studies have shown the central expression of CB2 (Onaivi et al., 2006; Zhang et al., 2014, 2017) and confirmed its involvement in many pathological states such as neuroinflammation and hypersensitivity (for review, Dhopeshwarkar and Mackie, 2014).

Furthermore, MOR and CB1 receptors colocalize in the spinal cord, a region of the central nervous system involved in antinociception (Bushlin et al., 2012; Rodriguez et al., 2001; Salio et al., 2001). They are also coexpressed in other areas of the brain involved in the transduction of nociception (Cichewicz, 2004).

This coexpression suggests potential interactions between the systems, supported by behavioral regulations observed in knockout models or by pharmacological approaches (for review, Befort, 2015; Fattore et al., 2005; Maldonado et al., 2011).

Using a combination of opioid (MOR) and cannabinoid agonists could lead to a better analgesia (Cichewicz and Welch, 2003; Finn et al., 2004; Smith et al., 2007) associated with fewer side effects (Valverde et al., 2001), but the need to better characterize cannabinoid effects is essential. There are many agonists for the cannabinoid system, but most of the behavioral studies exploring the role of CB activation have been performed using the primary phytocannabinoid in the cannabis plant, D9-Tetrahydrocannabinol or THC.

THC, a partial agonist targeting both CB1 and CB2, is responsible of the psychoactive properties of cannabis. More specific agonists for either the CB1 receptor or the CB2 receptor have been described (Pertwee, 2010), including arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA) and JWH-133, respectively. Because of the recent description of CB2 in the brain, it is now important to distinguish specific roles of CB receptors in the behavioral aspects such of nociception, emotions and withdrawal.

The majority of studies examining behavioral effects of opioids focus on MOR because of the potent analgesic properties of MOR agonists, such as morphine, and the clinical applications of these drugs. Genetic knockout studies have confirmed an interaction between opioid and cannabinoid systems on several

behavioral measures. For example, genetic inactivation of MOR (MOR KO) decreases physical dependence induced by chronic THC administration (Ghozland et al., 2002; Lichtman et al., 2001) and reduces the reinforcing properties of THC (Ghozland et al., 2002). Inversely, inactivation of CB1 receptors inhibits the rewarding properties of morphine (Ledent et al., 1999; Lichtman et al., 2001; Martin et al., 2000). Moreover, pharmacological blockade of either opioid or cannabinoid systems using selective antagonists results in attenuation or an abolishment of behavioral responses induced by an agonist of the other system.

Opioid and cannabinoid systems also interact to alter behaviors related to emotional processing. Despite the fact that these systems are interacting is accepted, the precise mechanisms involved are still under scrutiny. In this study, we explored the possible interactions and cross-talk between opioid and cannabinoid systems by investigating the effect of the selective CB1 agonist, ACEA, on nociception, anxiodepressive-related behaviors and withdrawal in MOR or DOR deficient mice. We examined the consequences of both acute and repeated ACEA treatments on opioid-mediated effects in order to assess putative biphasic properties of this agonist.

Material and methods

Animals

All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 22 September 2010 (directive 2010/63/UE), under the guidelines of the Committee for Research and Ethical issues of IASP published in PAIN, 1983; 16:109-110 and were approved by the local ethical committee (CREMEAS, Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg) with the agreement number # 2015012815549365 Apafis #169. Mice were housed under standard light, temperature and humidity conditions (12 h light-dark cycle, 22 ± 2 °C, $55 \pm 10\%$ humidity). Mice were group-housed at 2–5/cage with ad libitum access to food and water. In each group, equal numbers of male and female mice were used, aged of 12–24 weeks. Mice were habituated to their experimental environment and handled for one week before starting the experiments. Particular efforts were made to minimize the number of mice and the pain they experienced. Behavioral tests were performed blind to the genotype and treatment. Studies are reported following the ARRIVE Guidelines for reporting experiments involving animals. Mice lacking Mu or Delta opioid receptors (MOR KO mice and DOR KO mice Matthes et al., 1996; Filliol et al., 2000) were generated by homologous recombination as described in Supplemental Figure 1. They were compared to their wild type (WT) littermates for behavioral studies. Behavioral results were analyzed on grouped males and females. The genetic background of all mice was 50% C57/BL6J:50% 129svPas.

Drugs and treatments

The CB1 agonist ACEA (Tocris, Biotechne) in ethanol solution) was dissolved in saline solution (NaCl 0.9%) as recommended by the manufacturer to obtain 0.15; 3 or 5mg/kg. ACEA or vehicle solution (ethanol 6%) was injected intraperitoneally (ip) using 100 µl solution per 10 g mouse bodyweight. Fresh working solutions were prepared daily. Injections of ACEA or vehicle solutions were performed 45 minutes before tail immersion, or splash experiments, 35 minutes before the light-dark experiments and 1h30min before precipitated withdrawal. For repeated treatments, mice received ACEA or control vehicle solution once a day for 5 days, at the same hour each day to ensure a fixed interval of 24 hours between injections.

Naloxone (NLX), a non selectif opioid antagonist, and Naltrindole (NTI), a selectif delta opioid antagonist (Sigma), were dissolved in saline solution to obtain final concentration of 1 mg/kg and 2.5mg/kg, respectively. Saline injections were used as controls.

Tail immersion test

The tail immersion test was used to measure the variation of thermal nociceptive thresholds induced by ACEA.

Tail immersion testing was performed at 47°C. This test consists of measuring the latency before tail withdrawal, acutely or not, after ACEA injections (45 minutes or 23 hours respectively). Acute measures were used to evaluate a potential analgesic effect of ACEA while subchronic measures were performed to analyze hypersensitivity induced by repeated treatment (Roeckel et al., 2017).

We tested an eventual dose response effect to nociception with 0.15; 3 or 5 mg/kg ACEA ip injections. This experiment was repeated twice on two separate cohorts to confirm the results.

Splash test

This test was used to measure the depressive like behavior of mice (Ducottet and Belzung, 2004; Kalueff and Tuohimaa, 2004). The level of grooming reflects the self-care of animals.

It consists of vaporizing a 20% sucrose solution on the back fur of mouse. The sucrose solution dirties the mouse fur because of its viscosity and animals initiate grooming behavior. After applying sucrose solution, the activity of grooming (number of head, body grooming, shakes and scratches) and the time spent for grooming (time of grooming) was recorded in seconds for a period of 5 min. A decrease in grooming, which is a particular feature of mice submitted to stress was used as an index of self-care.

Light-dark test

The light-dark test is used to evaluate anxiety in rodents and was performed as previously described (Takao and Miyakawa, 2006; Shoji et al., 2016). The apparatus was composed of two boxes (20 cm × 20 cm × 25

cm) connected by a tunnel (6x16.5x20 cm) (Goeldner et al., 2011). One compartment was brightly illuminated (<400 lx), whereas the other compartment was dark (7 lx). Mice were placed in the dark compartment, and allowed to move freely in the apparatus for 10 min. The time spent in each compartment and the tunnel was recorded. Mice avoid the light compartment and a decrease of time spent in the dark compartment is a measure of reduced anxiety.

Naloxone-Precipitated withdrawal from ACEA

ACEA (3mg/kg, ip) was administered once a day for 5 days. To evaluate the participation of the opioid system in withdrawal symptoms following this treatment, naloxone (1 mg/kg, ip) was administered 2 h after the last ACEA injection and withdrawal signs were observed for 20 minutes, as described previously (Berrendero et al., 2003). To evaluate the persistence of ACEA-induced withdrawal, another group of animals was tested 7 days (+d12) after the end of ACEA treatment. Control groups received the vehicle solution. A global withdrawal score was calculated, combining several signs: jumping x 0.8; wet dogs shakes x 1; paw tremor x 0.35; ptosis x 1.5; teeth chattering x 1.5; body tremor x 1.5; piloerection x 1.5), somatic withdrawal signs (sum of jumps, paw tremors, wet dog shakes), and signs of discomfort (sum of stretching, genital licks, body tremors).

Data analysis

All data are presented as mean $\pm$ SEM. The effect of ACEA dose in the tail immersion test was analyzed by one-way ANOVA; withdrawal results were analyzed by two-way ANOVA; and all the other results were analyzed with two-way ANOVA repeated measures analysis of variance with time as a repeated factor. Data were further analyzed by Bonferroni post hoc test. Statistical analyses were performed using Graphpad Prism® statistical software (Version 6.0; La Jolla, CA, USA). $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Dose-response of ACEA on heat nociceptive responses

To establish a dose-response effect in the tail-immersion test, we tested four doses of ACEA (0, 0.15, 3, and 5mg/kg). Results are presented in Figure 1A. As MOR preferentially mediates nociceptive response (Matthes et al., 1996), we included mice deficient for this receptor in our analysis. These three doses had no effect on thermal nociception in WT mice. We also observed no significant modification of the nociceptive threshold in MOR KO mice, at any of the doses tested. Because of these results and others described in the

literature showing similar results (La Porta et al., 2015; Vera et al., 2013), we chose to further investigate the effects of ACEA using a subanalgesic dose of 3 mg/kg.

Repeated ACEA treatment and thermal nociception in MOR KO

Figure 1B shows the effects of ACEA on thermal nociceptive thresholds in WT and MOR KO mice at days 1 and 5. Data represent the percentage of the baseline threshold of each animal. In WT mice, ACEA had no effect on nociceptive thresholds, and repetition of treatment over 5 days did not change this result. In MOR KO mice, there was no effect of the ACEA treatment, while ACEA-independent hypersensitivity was observed.

Additionally, we also measured thermal nociceptive thresholds 23 hours after the day 5 injection to evaluate the chronic nociceptive effect of ACEA (Figure 1 C). In this context, in WT and MOR KO mice, we did not observe any variation of the thresholds induced by ACEA.

Overall, ACEA is ineffective at the dose of 3 mg/kg to modulate the nociceptive thresholds in either WT or MOR KO mice.

Effects of acute and repeated ACEA treatments on the Splash test in MOR KO and DOR KO mice

We compared the effect of repeated ACEA treatment in WT mice to both MOR KO and DOR KO mice; we included analyses of DOR KO mice because these animals exhibit deficits in emotional processing (Chu Sin Chung et al., 2015; Filliol et al., 2000). First, there was no modification of the body weight following this treatment in WT, or in mutant mice (Supplemental Figure 3). Behavioral effects in the Splash test were assessed at day 1 and day 3 (Figure 2A). After the first injection of ACEA (d1), we observed a pro-depressive effect in WT and DOR KO mice but not in MOR KO mice. Indeed, there was a significant increase of both occurrence (activity) and time of grooming.

Interestingly, after 3 days of injections (d3), this pro-depressive effect was reversed both in WT and DOR KO mice. By directly comparing vehicle and ACEA-treated mice at d3, a significant anti-depressive effect of ACEA was observed in all genotypes (either with the score of grooming or/and the time of grooming) (Figure 2A). Noticeably, the basal level of anxiety is different across genotypes as it is shown by the comparison of the score of grooming of vehicle treated mice of each genotype at d1. Therefore, across injections, ACEA induced a biphasic effect on depressive like behavior, with a first pro-depressive state that was then replaced by an anti-depressive like behavior in WT and DOR KO mice. In MOR KO, the initial pro-depressive-like behavior was absent. MOR KO and DOR KO mice exhibit opposite anxiogenic and depressive-like profiles, with less anxiety and depression in MOR KO whereas DOR KO are more sensitive (Filliol et al., 2000).

To further explore the contribution of DOR to this effect, we used a delta selective antagonist, Naltrindole (NTI, 2.5mg/kg), on a different cohort of WT mice. There was no regulation of the mouse bodyweight after NTI treatment (Supplemental Figure 3). First, we confirmed on this separate cohort the biphasic effect of ACEA treatment on depressive like behavior, with a decrease of the activity and time of grooming with ACEA at day one, and an increase at day 3. When ACEA is preceded by a NTI injection, at day 1 there is a decrease of the time of grooming, similar to the decrease obtained with ACEA alone. However, the depressive-like behavior was not significantly reversed by the repeated treatment, either for the time or activity of grooming. NTI alone had no significant effect on the splash test response (Figure 2B).

Effect of repeated ACEA in the light-dark paradigm

We studied the effects of ACEA on anxiety, measured with the light-dark paradigm (Figure 3). In WT, MOR KO and DOR KO mice, we observed no difference in the time spent in the dark compartment at baseline, showing no difference in the anxiogenic profile of these mice. Treatment with ACEA, either at d1 or d3, did not change this level in WT mice (Figure 3). These results suggest that the biphasic depressive like behavior induced by ACEA is not correlated to anxiogenic effects. Furthermore, pretreatment with NTI alone had no effect in the light-dark test, and did not change the anxiogenic properties of ACEA. In sum, we observed exactly the same lack of effects of ACEA in DOR KO and MOR KO mice (Figure 3). Altogether, these results show the absence of ACEA effects on anxiety, even after the pharmacological blockade of DOR, or after the constitutive genetic activation of MOR or DOR.

Naloxone-Precipitated ACEA withdrawal in MOR KO and DOR KO

As emotional process may also impact withdrawal responses, we evaluated whether signs of withdrawal could be observed following ACEA treatment when the opioid system would be blocked by a general antagonist, naloxone. Using KO mice, we also explored whether DOR and MOR play a role in ACEA withdrawal. Mice were treated for 5 days with ACEA and pharmacological withdrawal was induced by naloxone injection (see methods) (Figure 4A). In WT mice withdrawal symptoms were increased following a naloxone injection, which did not produce an effect on its own. Naloxone also induced withdrawal following ACEA treatment in both MOR KO and DOR KO mice.

To evaluate the persistence of ACEA treatment on naloxone-precipitated withdrawal, we performed the same measure on a separate cohort of WT mice, 7 days after the end of ACEA treatment (d12) (Figure 4B). At this time point, naloxone did not induce any signs of withdrawal (global score) and even decreased the level compared to vehicle-treated mice.

Discussion

The prototypic compound extracted from cannabis is THC, a partial mixed agonist for CB1 and CB2R, which has been widely studied for antinociception, reward or dependence (for review, Befort, 2015; Lötsch et al., 2017; Tzschentke, 2007). Studies using THC show the involvement of cannabinoid receptors in these behavioral responses, but do not address the specific role of each CB receptor. However, experiments performed with CB1 or CB2 receptors knockout mice give some hints for the specific role of these receptors (for review Befort, 2015; Nadal et al., 2013; Valverde and Torrens, 2012). Contrary to THC, ACEA is a very selective compound for CB1 receptors with a K_i of 1.4nM for CB1, versus a K_i greater than 2000nM for CB2, or 1400 times greater for CB2 compared to CB1 (Hillard et al., 1999). Furthermore, Dang et al., showed that the neurotoxicological effects of ACEA is abolished in CB1 KO animals (Dang et al., 2017). Nevertheless, ACEA direct effects have been poorly explored for nociceptive, emotional or reward aspects. In the present study, we aimed to clarify the effect of direct CB1 activation on antinociception, naturalistic behaviors and withdrawal. We also further explored the potential implication of MOR or DOR in these effects. We show distinct effects of ACEA treatment compared to THC or other CB1 agonists in antinociception. Indeed acute THC, CP55,940, anandamide, or WIN are usually described as analgesics (Stevens and Higgins, 2017). In our conditions, ACEA is devoid of either anti- or pro-nociceptive properties in the tail immersion test. One explanation could be that we use low doses of ACEA in our experiment. Interestingly, Ledent and colleagues showed that THC at 10mg/kg or 20mg/kg induces analgesia in the hot plate test, but in the tail immersion test this effect is absent for the lowest dose tested, that is 10mg/kg (Ledent et al., 1999). These data suggest a dose-dependent and test-dependent analgesic effect of THC, and suggest the need of high dose of cannabinoid to induce analgesia in different paradigms of thermal nociception.

In addition, THC or CB administrations at high dose induce a dose-dependent hypolocomotion associated with catalepsy (Monory et al., 2007). The tests of nociception need the full capacities of animal movements to be efficient. In fact, a decrease of locomotion or catalepsy will induce impaired responses in nociception tests interpreted as antinociception.

Furthermore, it is important to note that many studies show analgesic properties of cannabinoids in pain induced models such as inflammatory pain models or neuropathic pain models, but not in naïve animals (La Porta et al., 2015; Palazzo et al., 2006; Vera et al., 2013). La porta tested the effects of ACEA 1 mg/kg and 5 mg/kg in a mice model of arthritis (MIA) and they show ACEA analgesia in the MIA paw, and no analgesic effect in the contralateral paw for both doses tested (La Porta et al., 2015). Furthermore, studies from Altun et al, or Liu et al. showed antihyperalgesic effects of ACEA with the tail flick and the hot plate tests in rodents under chronic pain (Altun et al., 2015; Liu et al., 2017).

Similarly to opioid analgesics treatments, cannabinoid repeated treatments are associated to tolerance to analgesia (Suplita et al., 2008), leading us to assess the effect of ACEA after repeated administration. Our results show no effect after repeated ACEA treatment in our conditions, consolidating the lack of nociceptive effects of ACEA in naïve mice.

CB1 receptors agonists detained orexigenic properties responsible for weight gain in both human and rodents, and the use of CB1 antagonists enables obese patients to lose weight (Dore et al., 2014; Vickers and Kennett, 2005). Effects of ACEA on mice bodyweight have never been tested before and we were expecting a potential gain of weight following the five day treatment. . No effect on bodyweight was observed in our experiment. Altogether, our results of nociception and bodyweight indicate that the dose of ACEA used in this study is not sufficient to modify these physiological parameters.

Interestingly, an initial dysphoric effect of ACEA was observed; this could be related to what has been observed in several reward studies. The pro-depressive-like behavior after acute cannabinoid injection is not well documented, but is it noteworthy that authors use a CB priming injection before conditioning or self-administration paradigms to obtain reinforcing properties, that could be related to this effect (Célérier et al., 2006; Ghozland et al., 2002; Soria et al., 2004; Valjent and Maldonado, 2000; Valjent et al., 2002). However, no clear explanation is proposed to justify these results. Here we described a biphasic effect of ACEA with a first phase inducing a pro-depressive-like behavior (first injection), lost after several injections (i.e. 3 injections) and replaced by an anti-depressive phase. Our data suggest that this acute pro-depressive like behavior could explain the lack of CB agonist CPP without priming.

MOR and DOR are involved in mood disorders (for review, Lutz and Kieffer, 2013). For example, the genetic inactivation of these receptors leads to anxiolytic and antidepressive-like behavior, and to anxiogenic and pro-depressive like behavior in MOR KO and DOR KO mice respectively. Acute ACEA (day 1) has no pro-depressive properties in MOR KO Mice, whereas we observe this effect in both WT and DOR KO mice. This lack of effect correlates with the decreased depressive-like behavior already described in MOR KO mice. Nevertheless, the anti-depressive-like behavior observed after several ACEA injections in WT and DOR KO mice is also present in MOR KO mice. Taken together, these results suggest that Mu opioid receptor is involved in the initial pro-depressive effect of ACEA. As DOR KO mice are described more depressed and anxiogenic (Filliol et al., 2000), we further investigated the role of this receptor in the depressive-like behavior studied using the splash test.

The results obtained in DOR KO are similar to those obtained in WT after both acute and repeated ACEA; this would exclude a role for delta in this response. To further clarify this, we also used a pharmacological intervention, with a selective antagonist. NTI alone failed to induce depressive-like behavior despite a slight, but not significant, decrease of the time of grooming. When coadministered with ACEA, there was a

significant decrease of the time of grooming at d1, and this decrease seems to persist among the time (day 3, not significant).

In addition, it has previously been shown that ACEA induced anxiogenic state at 5mg/kg but not at 3mg/kg in the elevated plus maze (La Porta et al., 2015). We therefore measured anxiogenic properties of ACEA 3mg/kg using the light-dark test, but observed no difference of the time spent in the dark box, between ACEA and vehicle treated WT animals. THC is rather associated with anxiolytic properties as described in different studies (Berrendero and Maldonado, 2002; Valjent et al., 2002). However, this anxiolytic effect is present for low doses of THC and is replaced by anxiogenic effect with THC at doses greater than 5mg/kg (Célérier et al., 2006; Valjent et al., 2002). These higher doses of THC are associated to hypolocomotion and as mentioned above, catalepsy can modify the responses obtained in many behavioral tests such as the light-dark test, the open field or the elevated plus maze. In the splash test the impact of the activity should be less important on the behavioral responses. Nevertheless, a greater cataleptic effect would also induce a decrease of grooming in this test, but not necessarily associated to depression.

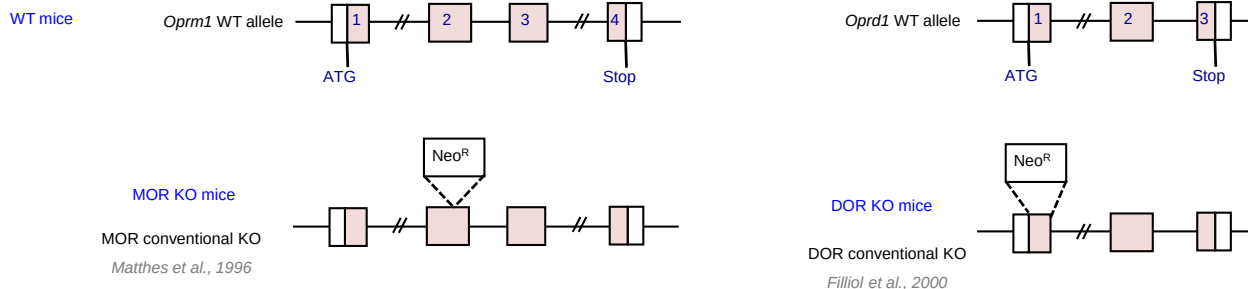
After NTI pretreatment and in MOR KO and DOR KO mice, ACEA does not induce anxiogenic behavior in the light-dark test. Furthermore, NTI alone is also devoid of anxiogenic properties. Although the DOR KO mice show a greater anxiogenic and depressive state compared to WT mice (ref), the pharmacological blockade of DOR does not lead to the same conclusions. Many studies show an antidepressive and an anxiolytic effect of NTI on DOR agonists pro-depressive or anxiogenic effects (Hudzik et al., 2011; Naidu et al., 2007; for review, Jutkiewicz, 2006) but, not when NTI is administered alone (Broom et al., 2002; Saitoh et al., 2004). With our studies, we confirm that pharmacological blockade of DOR does not modulate mood or naturalistic behaviors. The discordances between the results obtained with this pharmacological approach and the DOR KO mice suggest adaptations in knockouts responsible for mood disorders.

Many studies have investigated the interactions between the opioid system and the cannabinoid system in withdrawal, but the direct role of ACEA was not studied. Several teams have shown morphine precipitated withdrawal by cannabinoid antagonist such as SR141716A (Lichtman et al., 2001; Navarro et al., 1998, 2001), or the cannabinoid precipitated withdrawal by naloxone (Navarro et al., 2001), indicating a cross interaction between the two systems in this behavioral response. Also, using genetically modified mice, a decrease of NLX precipitated morphine withdrawal was measured in KO CB1 mice (Ledent et al., 1999; Lichtman et al., 2001; Martin et al., 2000) highlighting a role for the CB1 receptor in morphine physical dependence. The mirrored image of this process, investigating the effect of deletion of the opioid receptors in THC withdrawal precipitated with SR141716A, gave more conflicting results. Following a 5d treatment with THC (20mg/kg), precipitated withdrawal in the three KO mice for the opioid receptors was similar to WT (Ghozland et al., 2002), indicating no implication of opioid receptors in this response. Interestingly, opposite results were obtained using MOR KO mice, with a decrease of withdrawal symptoms compared to

WT at high dose of THC (6d, 30 and 100mg/kg), while no difference could be observed at a lower dose (6d, 10mg/kg) (Lichtman et al., 2001). Taken together, the involvement of MOR in THC withdrawal seems to be dependent on the dose used. Here, we addressed for the first time, the role of MOR and DOR in ACEA precipitated withdrawal with naloxone, using a low dose of ACEA (3 mg/kg, 5d). In all genotypes, blockade of the opioid system with naloxone induced of the appearance of signs of withdrawal, supporting a role of this system in this response. On the other hand, the global score was identical in WT and both KO mice, indicating that none of these receptors are directly involved in this response. We can not exclude a role for kappa opioid receptor (KOR), which needs to be further explored.

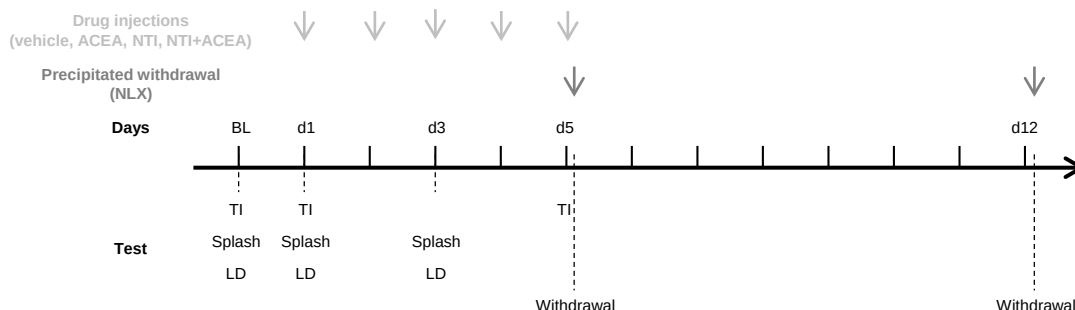
Indeed, KOR has been shown to be involved in negative behaviors induced by THC in the place preference conditioning test. In KO animals for pDyn, an endogenous ligand with high affinity for KOR, or in KOR KO mice, THC does not induce aversion (CPA) anymore (Ghozland et al., 2002; Ledent et al., 1999; Zimmer et al., 2001), suggesting a participation of KOR in the dysphoric effects of THC. However, the role of KOR in THC mood effects is restricted to negative or aversive responses as KOR antagonists has been shown to be ineffective to modulate anxiolytic properties of THC 0.3mg/kg (Berrendero and Maldonado, 2002). Nevertheless, the dose used in our study was rather too low and may not be sufficient to discriminate withdrawal intensity between WT and KO mice. It is noteworthy that the intensity of the withdrawal observed in our study is smaller than the one observed with classical opioid precipitated withdrawal (Berrendero et al., 2003). The differences induced by genotype or KO could be more difficult to reveal in these conditions.

In conclusion, we discriminate for the first time a biphasic effect on depression induced by the CB1 agonist ACEA, with the involvement of MOR in the first pro-depressive phase. Furthermore, we showed combining genetic inactivation and pharmacological approaches that DOR are not implicated in these responses. Moreover, we highlight that naloxone induces precipitated withdrawal of ACEA and this effect does not involves MOR and DOR.



Supplementary figure 1: Knockout models

Homologous recombinations performed to obtain the MOR and DOR KO mice respectively.

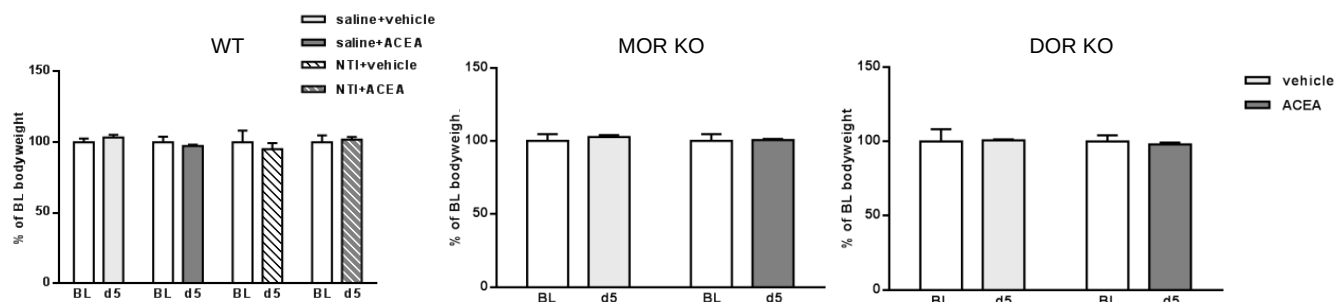


Supplementary figure 2: Experimental design

Representation of the experimental protocols followed to perform injections and tests, and distribution of the mice in the different experimental cohorts.

For WT mice, we tested one cohort, composed of the vehicle and the ACEA groups of treatment, for the tail immersion (TI) test at different time points, and the precipitated withdrawal with naloxone at day5, while another WT cohort performed the precipitated NLX withdrawal at d12, that is 7 days after the end of the 5 days ACEA treatment. An independent cohort, also composed of the vehicle and the ACEA groups of treatment, performed the splash test at d1 and d3, whereas other WT animals, treated for saline+ACEA, NTI+vehicle, or NTI+ACEA were tested for the light-dark test, followed by the splash test at d1 and d3. To conclude, we had 4 cohorts of WT mice in this study.

For MOR and DOR KO mice, we tested one cohort composed of the vehicle and the ACEA groups of treatment, for the precipitated withdrawal with naloxone at day 5. The MOR KO animals of this cohort also performed the tail immersion (TI) test at different time points. An independent cohort of MOR and DOR KO mice, also composed of the vehicle and the ACEA groups of treatment, performed the light dark test, followed by the splash test at d1 and d3. To conclude, we had 3 cohorts for MOR KO and 3 cohorts for DOR KO mice in this study.



Supplementary figure 3: Evolution of the bodyweight during ACEA treatment

The bodyweight of WT mice treated with the vehicle solution, NTI, ACEA and the combination of NTI+ACEA, as the bodyweight of MOR KO and DOR KO mice after either injections of vehicle or ACEA solutions were measured everyday before the daily injection during a period of 5 days.

WT n=11 saline+vehicle; n=20 saline+ACEA; n=7 NTI+vehicle; n=9 NTI+ACEA; MOR KO, n=8 vehicle; n=9 ACEA; DOR KO, n=6 vehicle; n=15 ACEA.

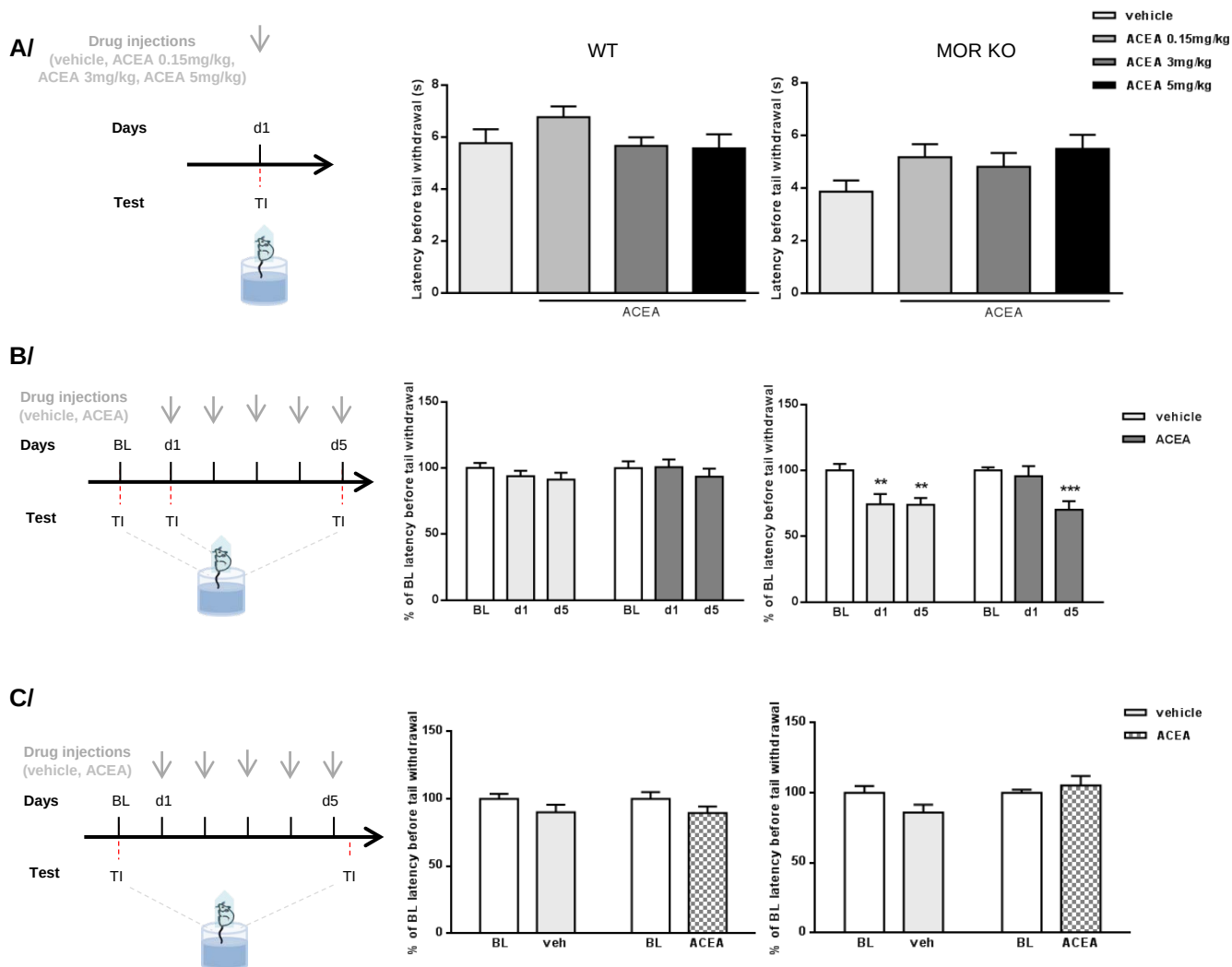


Figure 1: Effect of acute and repeated ACEA on thermal nociceptive thresholds of WT and MOR KO mice.

A/ thermal nociceptive thresholds of WT and MOR KO mice are determined acutely (45min) after injections of vehicle control solution or different doses of ACE ; WT and MOR KO n=8 vehicle/genotype; n=9 ACEA/genotype;

B/ WT and MOR KO mice are treated for 5 days with ACEA 3mg/kg and the evolution of the nociceptive thresholds are measured 45 min after the first (d1) and last injection (d5) of ACEA or vehicle solution, and expressed as the percentage of baseline (BL) nociceptive threshold; WT and MOR KO n=12 group/genotype;

C/ nociceptive thresholds of WT and MOR KO mice are also determined after the 5 days repeated ACEA (3 mg/kg) or vehicle treatment, 22h after the last injection to evaluate the repeated effect of this drug. Results are expressed as the percentage of baseline (BL) nociceptive threshold. WT and MOR KO n=12 group/genotype.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

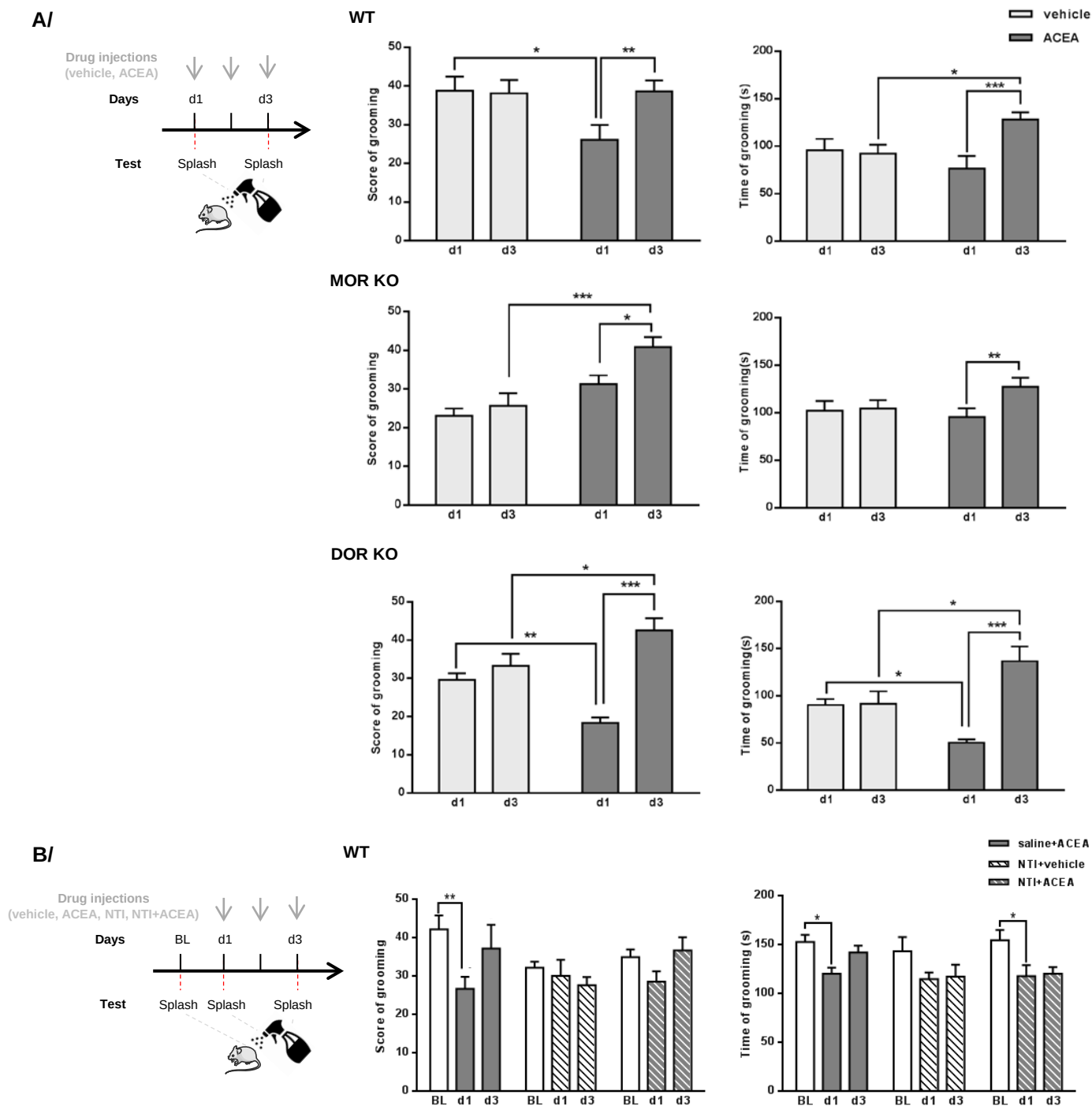


Figure 2: Effect of acute and repeated ACEA on depressive like behavior of WT, MOR KO and DOR KO mice.

A/ WT, MOR KO and DOR KO mice depressive like behavior was determined with the splash test, after injections of ACEA 3mg/kg at d1 and d3, and these results were compared to those obtained in control vehicle treated mice. The results show the score of grooming (left panels) and the time of grooming (right panels). WT, n=13 vehicle; n=10 ACEA; MOR KO n=8 vehicle; n=9 ACEA; DOR KO, n=7/group.

B/ WT mice were treated either with saline+ACEA, NTI+vehicle, or NTI+ACEA and there depressive like behavior was determined with the splash test at d1 and d3, and these results were compared to those obtained in BL conditions. The results show the score of grooming (left panels) and the time of grooming (right panels). WT n=8 saline+ACEA; n=7 NTI+vehicle; n=9 NTI+ACEA

* p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

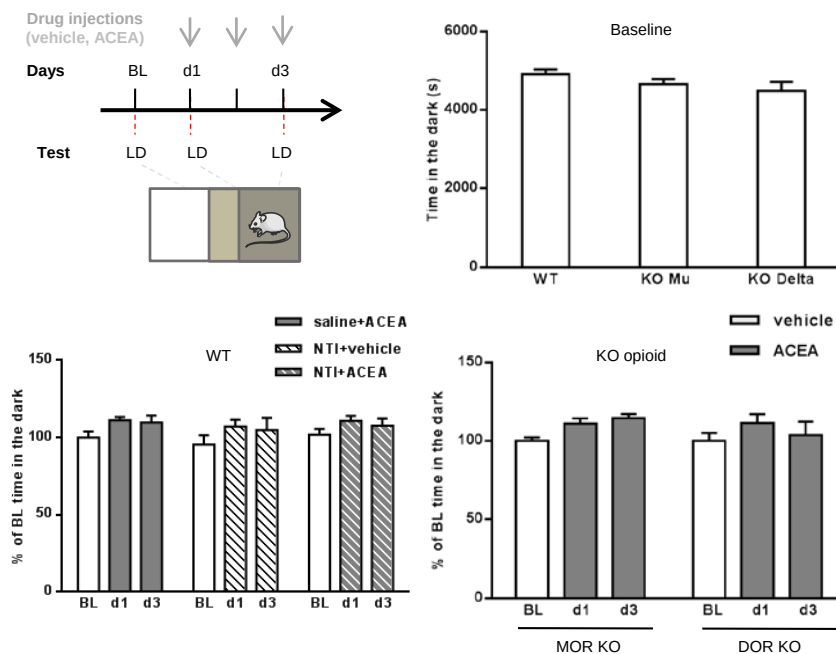


Figure 3: Effect of acute and repeated ACEA on anxiety like behavior of WT, MOR KO and DOR KO mice.

First, the baseline anxiety level of mice was determined with the light dark test according to their genotype. Then, WT mice anxiety like behavior was measured at d1 and d3 of either a treatment of saline+ACEA, NTI+vehicle, or NTI+ACEA; WT n=8 saline+ACEA; n=7 NTI+vehicle; n=9 NTI+ACEA; and the anxiolytic effect of ACEA was also evaluated in MOR KO and DOR KO mice, at d1 and d3; MOR KO n=8 vehicle; n=9 ACEA; DOR KO, n=7/group.

The results are expressed as a percentage of the baseline threshold.

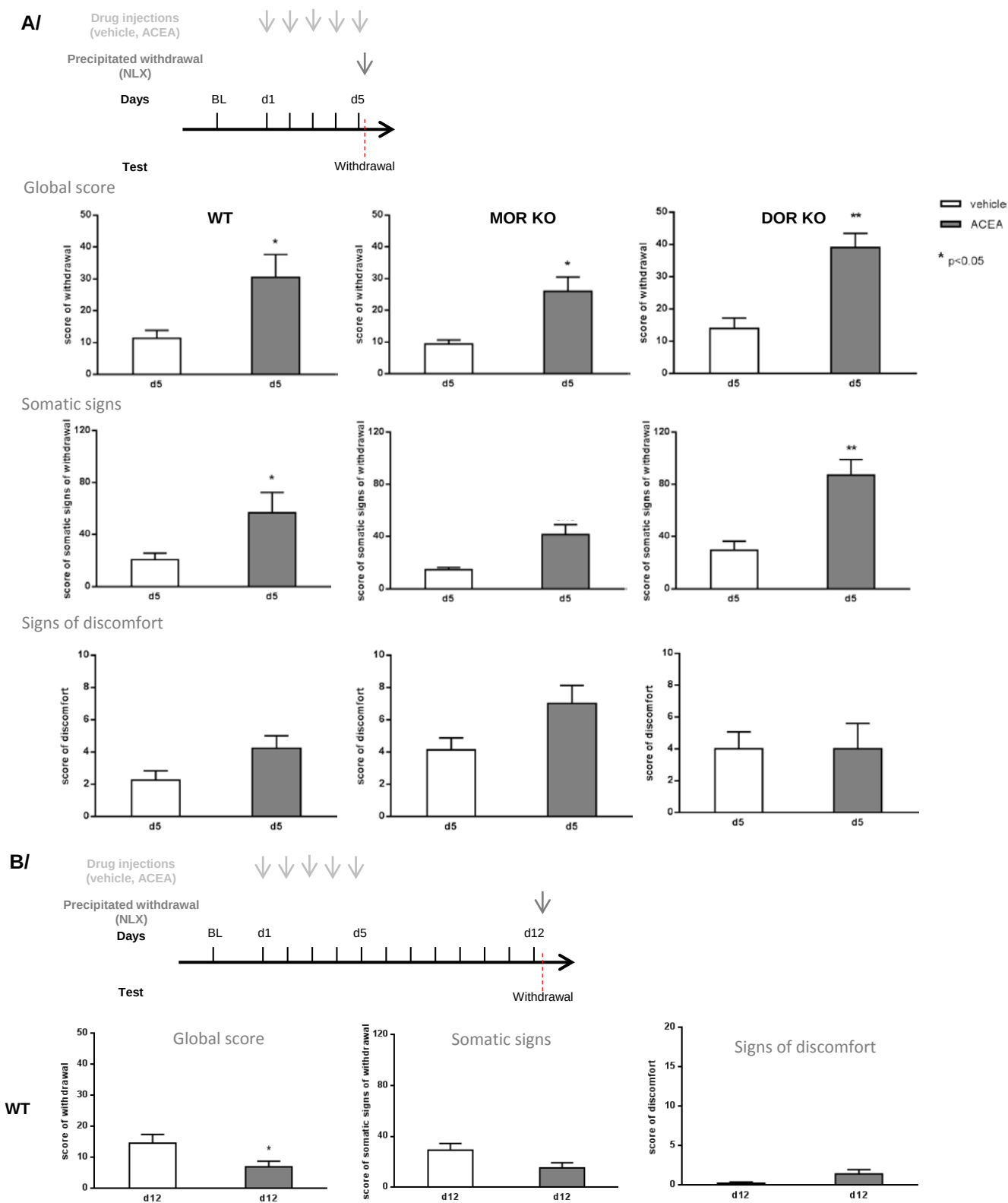


Figure 4: Precipitated ACEA withdrawal with NLX in WT, MOR KO and DOR KO mice.

A/ The global score of withdrawal, the somatic signs and the signs of discomfort of WT, MOR KO and DOR KO mice is measured after 5 days of ACEA 3mg/kg treatment and NLX 1mg/kg acute injection. WT, n=9 vehicle; n=10 ACEA; MOR KO, n=8 vehicle; n=90 ACEA; DOR KO, n=6 vehicle; n=7 ACEA.

B/ The same parameters are measured in WT mice, 7 days after ACEA treatment cessation (d12), after acute injection of NLX 1mg/kg. WT, n=8 vehicle; n=9 ACEA.

* p<0.05; **p<0.01

Supplemental tables for statistical analyzes

Results of statistical analyzes for **Figure 1A**

One-way ANOVA	WT	MOR KO
Effect of the treatment	F(3,32)=1.43 p=0.24	F(3,31)=1.86 p=0.15

Results of statistical analyzes for **Figure 1B**

Two-way ANOVA repeated measures	WT	MOR KO
Effect of the treatment	F(1,45)=0.40 p=0.15	F(1,27)=0.92 p=0.34
Effect of the time	F(2,90)=1.30 p=0.27	F(2,44)=14.67 p< 0.0001
Interactions	F(2,90)= 0.27 p=0.76	F(2,44)= 3.40 p= 0.042

Results of statistical analyzes for **Figure 1C**

Two-way ANOVA repeated measures	WT	MOR KO
Effect of the treatment	F(1,45)=0.40 p=0.15	F(1,22)=2.68 p=0.11
Effect of the time	F(1,45)=3.93 p= 0.053	F(1,22)=0.97 p=0.33
Interactions	F(1,45)=0.01 p=0.95	F(1,22)= 4.57 p= 0.043

Results of statistical analyzes for **Figure 2A**

Score of grooming

Two-way ANOVA repeated measures	WT	MOR KO	DOR KO
Effect of the treatment	F(1,23)=2.03 p=0.16	F(1,29)=17.04 p= 0.0003	F(1,12)=0.18 p=0.67
Effect of the time	F(1,23)=5.79 p= 0.024	F(1,29)=7.30 p= 0,014	F(1,12)=28.71 p= 0.0002
Interactions	F(1,23)= 7.15 p= 0.013	F(1,29)=2.42 p=0.13	F(1,12)=15.50 p= 0.002

Time of grooming

Two-way ANOVA repeated measures	WT	MOR KO	DOR KO
Effect of the treatment	F(1,23)=0.37 p=0.54	F(1,30)=0.53 p=0.46	F(1,12)=0.055 p=0.81

Effect of the time	F(1,23)=11.79 p= 0.0023	(1,30)=5.38 p= 0.027	F(1,12)=17.35 p= 0.0012
Interactions	F(1,23)= 15.25 p= 0.0007	F(1,30)= 3.96 p= 0.055	F(1,12)=16.23 p= 0.0017

Results of statistical analyzes for **Figure 2B**

Score of grooming

Two-way ANOVA repeated measures	WT
Effect of the treatment	F(2,21)=1.43 p=0.26
Effect of the time	F(2,42)=4.41 p= 0.017
Interactions	F(4,42)= 1.55 p=0.20

Time of grooming

Two-way ANOVA repeated measures	WT
Effect of the treatment	F(2,20)=1.23 p=0.31
Effect of the time	F(2,40)=9.95 p= 0.0003
Interactions	F(4,40)= 0.59 p=0.67

Results of statistical analyzes for **Figure 3**

Baseline

One-way ANOVA	
Effect of the genotype	F(2,45)=1.86 p=0.16

Effects of treatments in WT

Two-way ANOVA repeated measures	WT
Effect of the treatment	F(2,20)=1.017 p=0.37
Effect of the time	F(2,40)=3.89 p= 0.028
Interactions	F(4,40)= 0.056 p=0.99

Effects of treatment in MOR and DOR KO

Two-way ANOVA repeated measures	WT
Effect of the genotype	F(1,14)=0.63 p=0.44
Effect of the time	F(2,28)=3.12 p= 0.059
Interactions	F(2,28)=0.88 p=0.42

Results of statistical analyzes for **Figure 4A**

Global score

Two-way ANOVA repeated measures	
Effect of the treatment	F(1,41)=28.85 p<0.0001
Effect of the genotype	F(2,41)=1.74 p=0.16
Interactions	F(2,41)= 0.40 p=0.67

Somatic signs

Two-way ANOVA repeated measures	
Effect of the treatment	F(1,41)=24.45 p<0.0001
Effect of the genotype	F(2,41)=4.50 p=0.017
Interactions	F(2,41)= 1.18 p=0.31

Signs of discomfort

Two-way ANOVA repeated measures	
Effect of the treatment	F(1,41)=3.80 p=0.058
Effect of the genotype	F(2,41)=2.99 p=0.06
Interactions	F(2,41)= 0.97 p=0.36

Bibliography

- Altun A, Yildirim K, Ozdemir E, Bagcivan I, Gursay S, Durmus N (2015). Attenuation of morphine antinociceptive tolerance by cannabinoid CB1 and CB2 receptor antagonists. *J Physiol Sci.* 65(5):407-15.
- Befort, K. (2015). Interactions of the opioid and cannabinoid systems in reward: Insights from knockout studies. *Front. Pharmacol.* 6, 6.
- Berrendero, F., and Maldonado, R. (2002). Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl.)* 163, 111–117.
- Berrendero, F., Mendizábal, V., Murtra, P., Kieffer, B.L., and Maldonado, R. (2003). Cannabinoid receptor and WIN 55 212-2-stimulated [35S]-GTPgammaS binding in the brain of mu-, delta- and kappa-opioid receptor knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2197–2202.
- Broom, D.C., Jutkiewicz, E.M., Folk, J.E., Traynor, J.R., Rice, K.C., and Woods, J.H. (2002). Nonpeptidic delta-opioid receptor agonists reduce immobility in the forced swim assay in rats. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 26, 744–755.
- Bushlin, I., Gupta, A., Stockton, S.D., Miller, L.K., and Devi, L.A. (2012). Dimerization with cannabinoid receptors allosterically modulates delta opioid receptor activity during neuropathic pain. *PloS One* 7, e49789.
- Célérier, E., Ahdepil, T., Wikander, H., Berrendero, F., Nyberg, F., and Maldonado, R. (2006). Influence of the anabolic-androgenic steroid nandrolone on cannabinoid dependence. *Neuropharmacology* 50, 788–806.
- Chu Sin Chung, P., Keyworth, H.L., Martin-Garcia, E., Charbogne, P., Darcq, E., Bailey, A., Filliol, D., Matifas, A., Scherrer, G., Ouagazzal, A.-M., et al. (2015). A novel anxiogenic role for the delta opioid receptor expressed in GABAergic forebrain neurons. *Biol. Psychiatry* 77, 404–415.
- Cichewicz, D.L. (2004). Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. *Life Sci.* 74, 1317–1324.
- Cichewicz, D.L., and Welch, S.P. (2003). Modulation of oral morphine antinociceptive tolerance and naloxone-precipitated withdrawal signs by oral Delta 9-tetrahydrocannabinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 812–817.
- Dang, D.-K., Shin, E.-J., Mai, A.-T., Jang, C.-G., Nah, S.-Y., Jeong, J.H., Ledent, C., Yamamoto, T., Nabeshima, T., Onaivi, E.S., et al. (2017). Genetic or pharmacological depletion of cannabinoid CB1 receptor protects against dopaminergic neurotoxicity induced by methamphetamine in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 108, 204–224.
- Dhopeswarkar, A., and Mackie, K. (2014). CB2 Cannabinoid receptors as a therapeutic target-what does the future hold? *Mol. Pharmacol.* 86, 430–437.

- Dore, R., Valenza, M., Wang, X., Rice, K.C., Sabino, V., and Cottone, P. (2014). The inverse agonist of CB1 receptor SR141716 blocks compulsive eating of palatable food. *Addict. Biol.* *19*, 849–861.
- Ducottet, C., and Belzung, C. (2004). Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. *Physiol. Behav.* *81*, 417–426.
- Erbs, E., Faget, L., Scherrer, G., Matifas, A., Filliol, D., Vonesch, J.-L., Koch, M., Kessler, P., Hentsch, D., Birling, M.-C., et al. (2015). A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Struct. Funct.* *220*, 677–702.
- Fattore, L., Deiana, S., Spano, S.M., Cossu, G., Fadda, P., Scherma, M., and Fratta, W. (2005). Endocannabinoid system and opioid addiction: behavioural aspects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *81*, 343–359.
- Filliol, D., Ghozland, S., Chluba, J., Martin, M., Matthes, H.W., Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Dierich, A., LeMeur, M., et al. (2000). Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat. Genet.* *25*, 195–200.
- Finn, D.P., Beckett, S.R.G., Roe, C.H., Madjd, A., Fone, K.C.F., Kendall, D.A., Marsden, C.A., and Chapman, V. (2004). Effects of coadministration of cannabinoids and morphine on nociceptive behaviour, brain monoamines and HPA axis activity in a rat model of persistent pain. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 678–686.
- Ghozland, S., Matthes, H.W.D., Simonin, F., Filliol, D., Kieffer, B.L., and Maldonado, R. (2002). Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 1146–1154.
- Goeldner, C., Lutz, P.-E., Darcq, E., Halter, T., Clesse, D., Ouagazzal, A.-M., and Kieffer, B.L. (2011). Impaired emotional-like behavior and serotonergic function during protracted abstinence from chronic morphine. *Biol. Psychiatry* *69*, 236–244.
- Hillard, C.J., Manna, S., Greenberg, M.J., DiCamelli, R., Ross, R.A., Stevenson, L.A., Murphy, V., Pertwee, R.G., and Campbell, W.B. (1999). Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *289*, 1427–1433.
- Hudzik, T.J., Maciag, C., Smith, M.A., Caccese, R., Pietras, M.R., Bui, K.H., Coupal, M., Adam, L., Payza, K., Griffin, A., et al. (2011). Preclinical pharmacology of AZD2327: a highly selective agonist of the δ -opioid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *338*, 195–204.
- Jutkiewicz, E.M. (2006). The antidepressant-like effects of delta-opioid receptor agonists. *Mol. Interv.* *6*, 162–169.
- Kalueff, A.V., and Tuohimaa, P. (2004). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* *13*, 151–158.

La Porta, C., Bura, S.A., Llorente-Onaindia, J., Pastor, A., Navarrete, F., García-Gutiérrez, M.S., De la Torre, R., Manzanares, J., Monfort, J., and Maldonado, R. (2015). Role of the endocannabinoid system in the emotional manifestations of osteoarthritis pain. *Pain* 156, 2001–2012.

Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J.F., Beslot, F., Böhme, G.A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B.P., et al. (1999). Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283, 401–404.

Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL (2009). Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev.* 89(4):1379-412.

Lichtman, A.H., Sheikh, S.M., Loh, H.H., and Martin, B.R. (2001). Opioid and cannabinoid modulation of precipitated withdrawal in delta(9)-tetrahydrocannabinol and morphine-dependent mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1007–1014.

Liu QR1, Canseco-Alba A, Zhang HY, Tagliaferro P, Chung M, Dennis E, Sanabria B, Schanz N, Escosteguy-Neto JC, Ishiguro H, Lin Z, Sgro S, Leonard CM, Santos-Junior JG, Gardner EL, Egan JM, Lee JW, Xi ZX, Onaivi ES (2017). Cannabinoid type 2 receptors in dopamine neurons inhibits psychomotor behaviors, alters anxiety, depression and alcohol preference. *Sci Rep.* 7(1):17410.

Lötsch, J., Weyer-Menkhoff, I., and Tegeder, I. (2017). Current evidence of cannabinoid-based analgesia obtained in preclinical and human experimental settings. *Eur. J. Pain Lond. Engl.*

Lutz, P.-E., and Kieffer, B.L. (2013). Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends Neurosci.* 36, 195–206.

Mackie, K. (2008). Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J. Neuroendocrinol.* 20 Suppl 1, 10–14.

Maldonado, R., Berrendero, F., Ozaita, A., and Robledo, P. (2011). Neurochemical basis of cannabis addiction. *Neuroscience* 181, 1–17.

Mansour, A., Fox, C.A., Akil, H., and Watson, S.J. (1995). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.* 18, 22–29.

Martin, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., and Valverde, O. (2000). Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 12, 4038–4046.

Matthes, H.W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dollé, P., et al. (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383, 819–823.

Monory, K., Blandzun, H., Massa, F., Kaiser, N., Lemberger, T., Schütz, G., Wotjak, C.T., Lutz, B., and Marsicano, G. (2007). Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *PLoS Biol.* 5, e269.

- Nadal, X., La Porta, C., Andreea Bura, S., and Maldonado, R. (2013). Involvement of the opioid and cannabinoid systems in pain control: new insights from knockout studies. *Eur. J. Pharmacol.* **716**, 142–157.
- Naidu, P.S., Lichtman, A.H., Archer, C.C., May, E.L., Harris, L.S., and Aceto, M.D. (2007). NIH 11082 produces anti-depressant-like activity in the mouse tail-suspension test through a delta-opioid receptor mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* **566**, 132–136.
- Navarro, M., Chowen, J., Rocío A Carrera, M., del Arco, I., Villanúa, M.A., Martin, Y., Roberts, A.J., Koob, G.F., and de Fonseca, F.R. (1998). CB1 cannabinoid receptor antagonist-induced opiate withdrawal in morphine-dependent rats. *Neuroreport* **9**, 3397–3402.
- Navarro, M., Carrera, M.R., Fratta, W., Valverde, O., Cossu, G., Fattore, L., Chowen, J.A., Gomez, R., del Arco, I., Villanua, M.A., et al. (2001). Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **21**, 5344–5350.
- Nielsen, S., Sabioni, P., Trigo, J.M., Ware, M.A., Betz-Stablein, B.D., Murnion, B., Lintzeris, N., Khor, K.E., Farrell, M., Smith, A., et al. (2017). Opioid-Sparing Effect of Cannabinoids: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **42**, 1752–1765.
- Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.-P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P.A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., et al. (2006). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1074**, 514–536.
- Palazzo, E., de Novellis, V., Petrosino, S., Marabese, I., Vita, D., Giordano, C., Di Marzo, V., Mangoni, G.S., Rossi, F., and Maione, S. (2006). Neuropathic pain and the endocannabinoid system in the dorsal raphe: pharmacological treatment and interactions with the serotonergic system. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 2011–2020.
- Pertwee, R.G. (2010). Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr. Med. Chem.* **17**, 1360–1381.
- Rodriguez, J.J., Mackie, K., and Pickel, V.M. (2001). Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **21**, 823–833.
- Roeckel, L.-A., Utard, V., Reiss, D., Mouheiche, J., Maurin, H., Robé, A., Audouard, E., Wood, J.N., Goumon, Y., Simonin, F., et al. (2017). Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. *Sci. Rep.* **7**, 10406.
- Saitoh, A., Kimura, Y., Suzuki, T., Kawai, K., Nagase, H., and Kamei, J. (2004). Potential anxiolytic and antidepressant-like activities of SNC80, a selective delta-opioid agonist, in behavioral models in rodents. *J. Pharmacol. Sci.* **95**, 374–380.

- Salio, C., Fischer, J., Franzoni, M.F., Mackie, K., Kaneko, T., and Conrath, M. (2001). CB1-cannabinoid and mu-opioid receptor co-localization on postsynaptic target in the rat dorsal horn. *Neuroreport* 12, 3689–3692.
- Scavone, J.L., Sterling, R.C., and Van Bockstaele, E.J. (2013). Cannabinoid and opioid interactions: implications for opiate dependence and withdrawal. *Neuroscience* 248, 637–654.
- Smith, P.A., Selley, D.E., Sim-Selley, L.J., and Welch, S.P. (2007). Low dose combination of morphine and delta9-tetrahydrocannabinol circumvents antinociceptive tolerance and apparent desensitization of receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 571, 129–137.
- Soria, G., Castañé, A., Berrendero, F., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., and Valverde, O. (2004). Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2203–2213.
- Stevens, A.J., and Higgins, M.D. (2017). A systematic review of the analgesic efficacy of cannabinoid medications in the management of acute pain. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 61, 268–280.
- Suplita, R.L., Eisenstein, S.A., Neely, M.H., Moise, A.M., and Hohmann, A.G. (2008). Cross-sensitization and cross-tolerance between exogenous cannabinoid antinociception and endocannabinoid-mediated stress-induced analgesia. *Neuropharmacology* 54, 161–171.
- Tzschentke, T.M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict. Biol.* 12, 227–462.
- Valjent, E., and Maldonado, R. (2000). A behavioural model to reveal place preference to delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 147, 436–438.
- Valjent, E., Mitchell, J.M., Besson, M.-J., Caboche, J., and Maldonado, R. (2002). Behavioural and biochemical evidence for interactions between Delta 9-tetrahydrocannabinol and nicotine. *Br. J. Pharmacol.* 135, 564–578.
- Valverde, O., and Torrens, M. (2012). CB1 receptor-deficient mice as a model for depression. *Neuroscience* 204, 193–206.
- Valverde, O., Noble, F., Beslot, F., Daugé, V., Fournié-Zaluski, M.C., and Roques, B.P. (2001). Delta9-tetrahydrocannabinol releases and facilitates the effects of endogenous enkephalins: reduction in morphine withdrawal syndrome without change in rewarding effect. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1816–1824.
- Vera, G., Cabezas, P.A., Martín, M.I., and Abalo, R. (2013). Characterization of cannabinoid-induced relief of neuropathic pain in a rat model of cisplatin-induced neuropathy. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 105, 205–212.
- Vickers, S.P., and Kennett, G.A. (2005). Cannabinoids and the regulation of ingestive behaviour. *Curr. Drug Targets* 6, 215–223.

Zhang, H.-Y., Gao, M., Liu, Q.-R., Bi, G.-H., Li, X., Yang, H.-J., Gardner, E.L., Wu, J., and Xi, Z.-X. (2014). Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E5007-5015.

Zhang, H.-Y., Gao, M., Shen, H., Bi, G.-H., Yang, H.-J., Liu, Q.-R., Wu, J., Gardner, E.L., Bonci, A., and Xi, Z.-X. (2017). Expression of functional cannabinoid CB2receptor in VTA dopamine neurons in rats. *Addict. Biol.* *22*, 752–765.

Zimmer, A., Valjent, E., Konig, M., Zimmer, A.M., Robledo, P., Hahn, H., Valverde, O., and Maldonado, R. (2001). Absence of delta -9-tetrahydrocannabinol dysphoric effects in dynorphin-deficient mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 9499–9505.

III. Discussion complémentaire

Les éléments abordés dans cette partie sont complémentaires de ceux déjà discutés dans la partie discussion du manuscrit en préparation. De ce fait, les différents éléments déjà abordés précédemment ne seront pas repris ici.

Le premier élément de discussion complémentaire concerne le light-dark. Dans notre expérience, nous n'avons observé aucun résultat significatif dans ce test. Tout d'abord, nous n'avons noté aucune différence entre les différents génotypes alors que les souris KO delta sont décrites historiquement comme étant plus anxieuses. Nous nous serions donc attendus à observer une augmentation du temps passé dans le compartiment sombre par rapport aux WT, lors de la première exposition, en conditions basales (Filliol et al., 2000). Pourtant, les souris WT, KO mu et KO delta passent toutes en moyenne 80% du temps dans le compartiment sombre. Nous nous sommes alors questionné sur la validité de notre test, à savoir sur son niveau d'aversion. Le light-dark est un test aversif par nature, mais dans nos conditions, l'aversion était peut-être trop forte pour que nous puissions distinguer des effets entre les génotypes testés (valeur seuil atteinte). D'après l'étude de la littérature utilisant un système de light-dark comparable, c'est-à-dire des compartiments similaires, provenant du même fournisseur (Lutz et al. 2011 ; Goeldner et al., 2011), nous constatons que nos animaux présentent des résultats classiquement décrits dans ce test. Egalement en conditions basales, dans l'étude de Lutz et collaborateurs, les souris C57Bl6j passent environ 80% du temps de test dans le compartiment sombre, alors que dans l'étude de Goeldner et collaborateurs cette estimation est plus proche des 75%. L'étude de Ayranci et ses coéquipiers montre que les souris 129svPas sont nettement plus anxieuses que les souris C57Bl6j puisqu'elles passent près de 90% du temps de test dans le compartiment sombre (Ayranci et al., 2015). Nos souris, bien qu'étant de fond mixte C57Bl6j/129svPas, présentent le même type de réponses que ce qui a pu être observé dans des conditions de test similaires.

Toujours concernant les résultats d'anxiété, et même de dépression, comme le suggère les résultats de l'article de filliol et collaborateurs, nous nous serions attendus à observer des seuils d'anxiété et de dépression plus faibles chez les animaux KO delta par rapport aux animaux WT (Filliol et al., 2000). Pourtant, les seuils basaux de dépression et d'anxiété, mis en évidence respectivement avec le splash test et le light-dark test, ne montrent pas de différence entre les WT et les KO delta. En s'intéressant de plus près au phénotype de ces souris KO delta, nous nous sommes rendu compte que dans l'article de Lutz et collaborateurs, portant sur le cKO delta dans le raphé, des études d'anxiété avec l'open-field, et de dépression, avec le test de suspension caudale, ont aussi été réalisées (Lutz et al., 2014). Les résultats de cette étude ne montrent pas non plus d'anxiété ou dépression exacerbée dans ces tests en conditions basales chez les animaux KO delta. Cela montre donc que cette sensibilité

émotionnelle mise en évidence par Filliol et collaborateurs n'est pas nécessairement facile à mettre en évidence et est dépendante du contexte ou du test utilisé.

Bien qu'étant justifiables par les résultats de la littérature, une proportion de temps passé dans le compartiment sombre de 80% en conditions basales est tout de même très élevée et pourrait masquer d'éventuels effets anxiogéniques. Et le contraire est également envisageable : le test peut s'avérer trop aversif à lui seul pour permettre de mesurer un effet anxiolytique.

Ces hypothèses ne sont pas vérifiées et n'ont donc peut-être pas lieu d'être, surtout qu'elles remettent en cause plusieurs études déjà publiées. Comme déjà évoqué précédemment, chacun de ces tests comportementaux ne permettent d'explorer qu'une facette de pathologies complexes et le meilleur moyen de cerner au mieux ce type de pathologies psychiatriques chez le modèle préclinique est de multiplier le nombre de tests différents caractérisant un même symptôme de la pathologie. Pour des raisons éthiques évidentes, ces recommandations sont bien souvent difficiles à appliquer, et pour revenir à notre étude, le fait que nous utilisons des souris knockouts rend la démultiplication des tests d'autant plus compliquée à mettre en œuvre.

Le second élément de discussion complémentaire concerne les effets de l'ACEA sur la nociception thermique. Dans le manuscrit en préparation, nous avons montré que dans nos conditions l'ACEA n'induit pas de modifications des seuils de nociception. Nous mentionnions aussi le fait que la plupart des études révélant un effet antinociceptif des agonistes CB utilisaient un modèle de douleur induite, et que sans douleur induite, les effets analgésiques de ces composés sont plus discutables. D'autre part, nous évoquons la possibilité que les mesures d'analgésie soient biaisées par un mal-être induit par ces agonistes qui affecteraient négativement la locomotion et induiraient même une catalepsie. De façon plus précise, si nous prenons l'exemple du test d'immersion de la queue utilisé dans notre étude, ce test consiste à déterminer une latence avant retrait de la queue. Une diminution de cette latence traduira une augmentation de la nociception alors qu'une augmentation de cette latence sera plutôt synonyme d'antinociception. Nous voyons donc que ce test nécessite une mobilité intègre et comprenons aisément qu'une catalepsie induira une modification des résultats obtenus dans ce test qui ne sera peut-être pas associée à une analgésie. Afin de compléter et d'illustrer cette argumentation, nous commenterons les résultats obtenus par Vera et collaborateurs dans leur étude (Vera et al., 2013). Cette étude montre un effet analgésique du WIN55-212, à la dose de 5mg/kg, associée à une tendance à la diminution de l'activité locomotrice, une augmentation de la catalepsie et une diminution de la température rectale. Tous ces phénomènes ne sont pas observés avec une dose inférieure de 1mg/kg. Le test d'analgésie utilisé dans cet étude est le test plantaire de Hargreaves qui nécessite une certaine réactivité des animaux, or celle-ci semble affectée par le WIN dans ces

conditions précises, comme le montre les résultats de locomotion et de catalepsie. L'augmentation de latence avant retrait de la patte dans ce test plantaire n'est alors peut-être qu'une conséquence d'un effet sur la mobilité des animaux et non pas d'une analgésie. Comme précédemment, toutes ces propositions ne sont qu'hypothétiques.

Le troisième élément complémentaire de discussion porte sur l'implication des récepteurs du système opioïde dans la régulation des effets émotionnels de l'ACEA. De façon résumée, nous avons montré avec le splash test que le récepteur Mu est impliqué dans l'effet aversif de l'ACEA lors de la première administration, mais que ce récepteur n'est pas impliqué dans les effets plutôt récompensants de ce composé après administrations répétées. Ce test est classiquement décrit comme un test permettant de mettre en évidence un état dépressif. Il repose sur une activité quotidienne des rongeurs, à savoir le toilettage. Cette activité est provoquée dans ce test par vaporisation d'une solution de sucre 20%, qui présente une texture visqueuse ce qui rend le toilettage plus difficile. Il est intéressant de noter que l'activation des récepteurs opioïdes Mu est plutôt associée à des comportements de type antidépressif, comme décrit avec la morphine (Besson et al., 1996; Tejedor-Real et al., 1995). Afin de compléter ces résultats, des études ont également montré que la densité de récepteur Mu est augmentée dans les régions qui régulent les états émotionnels et la douleur suite à des traitements antidépresseurs (de Gandarias et al., 1999; Ortega-Alvaro et al., 2004). Néanmoins, l'étude sur les comportements dépressifs chez les KO Mu, réalisée par Filliol et collaborateurs rapportent des conclusions différentes quant au rôle du récepteur Mu dans ce phénomène (Filliol et al., 2000). En effet, dans cette étude il est montré que ces souris KO Mu sont à la fois moins dépressive et moins anxieuses que les contrôles WT dans les tests de nage forcée, light-dark et de labyrinthe en croix surélevé. Les approches pharmacologiques rapportent une participation du récepteur Mu dans des effets antidépresseurs, alors que l'approche par KO prône plutôt un effet pro-dépressif de ce récepteur. Ces divergences pourraient être accordées à des mécanismes compensatoires chez les KO Mu. Nos résultats d'approche par qRT-PCR chez les souris KO Mu apportent des éléments en faveur d'une telle compensation. En effet, dans la figure 13A, soit lors de la première partie de thèse, les qRT-PCR dans la moelle épinière de souris KO Mu montrent une augmentation de l'expression des transcrits Delta par rapport aux souris WT. L'étude de Filliol et collaborateurs montrent que les souris KO Delta présentent une anxiété et un état dépressif plus important que les souris WT et donc par extension, on pourrait s'attendre à ce qu'une augmentation de l'expression de Delta induise un effet inverse, c'est-à-dire une diminution de l'anxiété et de la dépression. D'autant plus, les résultats d'études comportementales réalisées suite à l'administration d'agonistes Delta montrent une diminution des symptômes de dépression, permettant d'obtenir des effets antidépresseurs comparables à ceux obtenus avec les traitements classiquement utilisés contre la dépression, comme les inhibiteurs de la

recapture de la sérotonine (Broom et al., 2002; Hudzik et al., 2011; Naidu et al., 2007; Saitoh et al., 2004; Tejedor-Real et al., 1998; Torregrossa et al., 2006).

Notre étude du chapitre I montre que les souris KO Mu ont un taux d'ARNm Delta plus élevé, ce qui pourrait être associé à un état moins anxieux ou dépressif. Cette compensation chez les souris KO Mu ne permet pas d'expliquer nos résultats de splash test, mais apportent des éléments de compréhension sur l'étude menée par Filliol et collaborateurs.

D'autre part, dans la discussion du manuscrit, nous suggérons un potentiel rôle du récepteur opioïde Kappa dans le sevrage précipité à la naloxone. Cette hypothèse est appuyée par différents résultats de la littérature. Tout d'abord, il a été montré que les souris KO Kappa présentent une diminution des signes de sevrage morphinique par rapport aux animaux WT, ce qui démontre la participation de ce récepteur dans cet état aversif (Simonin et al., 1998). De plus, dans le test de préférence de place conditionnée, le récepteur Kappa intervient dans les effets aversifs du THC puisque les souris KO Kappa, et les souris KO pdyn (le principal opioïde endogène agoniste Kappa), ne présentent plus de CPA (Ghozland et al., 2002; Zimmer et al., 2001; pour revue Charbogne et al., 2014). Enfin ces résultats sont complétés par le fait que l'activation du récepteur Kappa induit par elle-même une aversion, comme montré suite à l'administration de l'agoniste Kapa, U-50,488 (Zannas et al., 2017) et que l'utilisation d'antagonistes de ce récepteurs induit des effets à la fois antidépresseurs et anxiolytiques (Knoll et al., 2011; Reindl et al., 2008). Tous ces éléments montrent que le récepteur Kappa est impliqué dans les effets aversifs des cannabinoïdes et de la morphine.

Par contre, le rôle de Kappa semble être limité aux effets aversifs et ne pas intervenir dans les effets récompensants de la morphine puisque les souris KO kappa présentent une CPP morphinique comparable aux WT (Lutz and Kieffer, 2013; Simonin et al., 1998).

Afin de confirmer le rôle de Kappa dans le sevrage précipité à la naloxone, nous pourrions compléter notre étude par l'utilisation de souris KO kappa, ou encore par l'utilisation d'antagonistes sélectifs pour Mu (CTOP), pour Delta (NTI) ou Kappa (norBNI) pour induire le sevrage précipité. Si nos hypothèses s'avèrent juste, nous devrions observer un sevrage ACEA précipité uniquement par le norBNI parmi ces trois antagonistes.

Enfin, le dernier élément de discussion vise à appuyer l'importance de cette étude parmi les études déjà publiées concernant le rôle de l'activation de CB1 dans la régulation de ces différents états émotionnels. Rapidement, dans l'introduction de ce chapitre, ainsi que dans le manuscrit, nous avons vu que malgré le fait que très peu d'études aient été réalisées avec des agonistes sélectifs du récepteur CB1, le rôle de ce récepteur avait tout de même été exploré grâce à l'utilisation de modèles knockout CB1 ou d'antagonistes CB1 comme le rimonabant. Concernant les animaux KO, nous avons vu dans le

paragraphe précédent que des compensations pouvaient intervenir chez ces animaux et qu'il était important de compléter les études utilisant des knockouts d'approches pharmacologiques afin d'appuyer les résultats obtenus. Ensuite, concernant le rimonabant, dans l'introduction nous mentionnions le fait que ce composé était considéré à tort comme un antagoniste puisqu'il s'avère qu'il possède des propriétés agonistes inverses (Rinaldi-Carmona et al., 1994). D'autres études remettent encore plus en cause l'utilisation du rimonabant dans l'étude des récepteurs CB1 puisqu'ils montrent que ce composé possède une activité sur des récepteurs autres que les récepteurs cannabinoïdes (Raffa and Ward, 2012). En effet, alors que Zador et collaborateurs montrent des propriétés antagonistes du rimonabant sur le récepteur Mu, lorsqu'il est administré à de faibles doses, Seely et son équipe montre d'une part que le rimonabant, mais aussi l'AM251 agissent comme des antagonistes directs du récepteur Mu (Seely et al., 2012; Zádor et al., 2012). Ensemble, ces résultats montrent que les études réalisées jusqu'à ce jour, utilisant des agonistes CB mixtes, les souris KO CB1 ou des antagonistes/ agonistes inverses CB1 apportent des éléments d'information indispensables à la compréhension du rôle de l'activation de CB1 dans ces différents états émotionnels, et que notre étude appuie ces données par l'utilisation d'un agoniste sélectif CB1.

SCHEMA BILAN

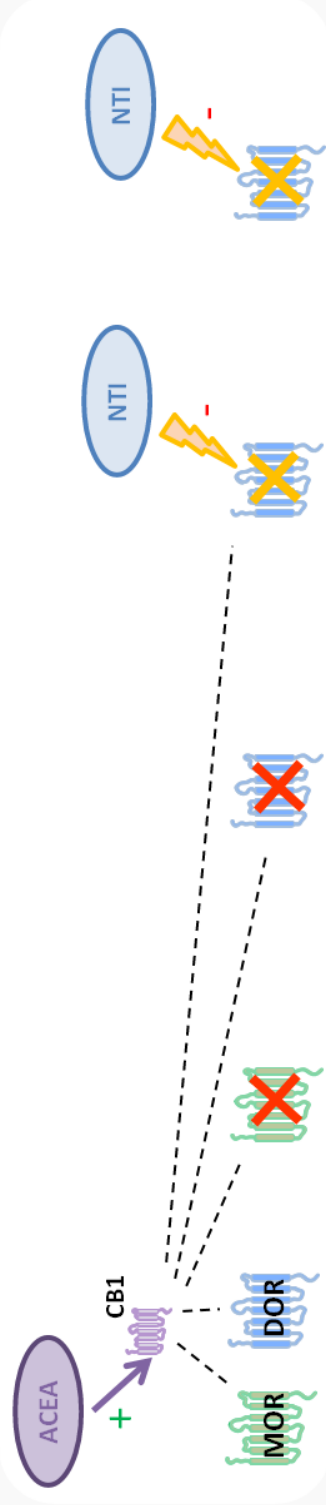
	WT traités ACEA	MOR KO traités ACEA	DOR KO traités ACEA	WT traités NTI+ACEA	WT traités NTI
 poids					
nociception					
 45 min post inj.	=	=	=	=	=
 23h post inj. d6	=	↗ mais effet ETOH 6% ?	ND	ND	ND
dépression					
	d1 ↗	d1 =	d1 ↗	d1 ? ns	d1 ↘ ns
	d3 ↗	d3 ↗ <i>Mu responsable des effets dysphoriques des ligands CB1 ?</i>	d3 ↗	d3 ? ns	d3 ? ns
anxiété					
	=	=	=	=	=
Sevrage					
	=	=	=	ND	ND
<i>Effets de la naloxone médiés par Kappa ?</i>					

Schéma bilan: Caractérisation des effets de l'ACEA sur la nociception, le bien-être et la dépendance physique et rôles des récepteurs Mu et Delta.

PROJET IV :

Interactions entre le récepteur opioïde Mu et le récepteur CB1 dans l'analgésie et les comportements associés à la dépendance morphinique

PROJET IV : Interactions entre le récepteur opioïde Mu et le récepteur CB1 dans l'analgésie et les comportements associés à la dépendance morphinique

I. Préambule

Dans ce projet, nous avons étudié les conséquences d'un prétraitement avec un agoniste du récepteur CB1, l'ACEA, sur différentes réponses morphiniques. L'intérêt de l'utilisation d'un prétraitement est d'étudier les interactions prolongées entre les récepteurs CB1 et Mu.

L'utilisation d'un prétraitement répété d'agoniste CB est à l'instar de ce qui a déjà pu être étudié, à savoir des interactions aiguës entre CB et Mu suite à des injections rapprochées d'agoniste CB et de morphine, reposant sur des protocoles où l'injection d'un agoniste CB a lieu peu de temps avant l'injection de morphine, ou bien lors de coadministrations de CB et de morphine.

De plus, l'étude précise de l'effet d'un traitement spécifique CB1 sur les réponses morphiniques n'a jamais été réalisée. En effet, toutes les études réalisées jusqu'à ce jour, utilisaient des agonistes mixtes CB1-CB2. La caractérisation des principaux effets comportementaux de l'ACEA, à la dose de 3mg/kg, ayant été réalisée (objet du [projet III](#)), nous avons choisi d'utiliser cet agoniste CB1, à la dose de 3mg/kg ip pour étudier l'effet d'un prétraitement sur les réponses antinociceptives et en relation avec la dépendance à la morphine. Une telle approche permettra peut-être d'apporter des éléments de compréhension des interactions spécifiques de l'activation des récepteurs CB1 et Mu. Aussi, ces différentes études de cotraitements, bien que n'ayant pas été réalisées avec des agonistes sélectifs pour un récepteur (CB1 ou CB2), ont rapporté des effets protecteurs d'une telle association thérapeutique ciblant CB1-CB2 et Mu (voir [Introduction](#), [Chapitre II](#)). L'objectif secondaire de notre étude est de déterminer si les résultats obtenus dans ces études de cotraitement sont médiés par l'activation de CB1, plutôt que de CB2. Toujours à des fins comparatives, nous avons choisi de réaliser cette étude chez des souris de fond génétique C57Bl6J, cette souche étant la plus utilisée dans les études décrites dans l'introduction.

De façon plus précise, notre étude a consisté à étudier les effets d'un prétraitement ACEA de 5 jours sur les réponses antinociceptives de la morphine aiguë et prolongée, ainsi que sur l'hypersensibilité morphinique. Ensuite, nous avons étudié l'effet d'un tel prétraitement sur les effets récompensants de la morphine grâce à un protocole de CPP, et sur le sevrage morphinique précipité à la naloxone.

Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces adaptations comportementales, nous avons étudié les régulations de l'expression des gènes des systèmes opioïdes et cannabinoïdes ainsi

que de ceux de l'inflammation chez les animaux des différents groupes de traitement, par qRT-PCR. Ces éléments sont complétés par l'étude des modifications de l'activité des récepteurs CB1 et Mu (GTPγS^[35]), ainsi que l'étude de l'expression protéique de CB1 et du marqueur d'activité neuronale cFOS (Immunomarquages) suite à ces traitements.

II. Matériels et méthodes

Modèles murins

Les souris utilisées ici sont des souris sauvages de fond génétique C57Bl6J (provenance Jackson laboratories).

Traitements pharmacologiques

Nous avons réalisé un prétraitement ACEA (3mg/kg, ip, 5j sur diverses réponses morphiniques et les protocoles pharmacologiques sont décrits dans les [figures 33, 35, 36 et 37](#).

La morphine est dissoute dans une solution saline (NaCl 0,9%) et injectée par voie intra-péritonéale (ip) dans un volume de 100 µl par 10 grammes de masse corporelle. Les doses administrées sont variables en fonction des études réalisées et sont précisées lors de la description du protocole expérimental ([figures 33, 35, 36 et 37](#)).

Le prétraitement avec l'ACEA réalisé est toujours le même et repose sur des injections ip d'ACEA 3mg/kg pendant 5 jours. Le stock d'ACEA (Tocris) est une solution de 5ml concentrée à 25mg/ml dans une solution d'éthanol 100%. La dilution que nous réalisons pour obtenir une concentration d'ACEA 3mg/kg fait que la concentration finale en éthanol de cette solution est de 6%. Le contrôle correspondant est donc une solution d'éthanol 6% (solution véhicule).

Tests comportementaux chez la souris

Certains des tests sont détaillés dans le chapitre 1 ; d'autres ont été mis au point au laboratoire dans le cadre de ma thèse. Les protocoles suivis pour réaliser les tests de nociception thermique, de préférence de place conditionnée à la morphine, de sevrage morphinique précipité à la naloxone ou de traitements pharmacologiques réalisés avant de procéder aux études moléculaires sont respectivement décrits dans les [figures 33, 35, 36 et 37](#).

Le test de CPP a été réalisé sur deux cohortes indépendantes d'animaux qui n'ont effectué que ce test (pas d'autre test comportemental). A l'issue de l'expérience de CPP les animaux ont été sacrifiés.

Le test de sevrage précipité a été réalisé sur 2 cohortes indépendantes de souris pour chaque génotype. Les animaux d'une de ces deux cohortes ont aussi réalisé le test d'immersion de la queue. A l'issue de l'expérience de sevrage les animaux ont été sacrifiés et les cerveaux d'une cohorte prélevés juste après le sevrage. Ces cerveaux n'ont pour l'instant pas fait l'objet d'étude particulière.

Les animaux utilisés pour réaliser les études moléculaires sont issus de 2 cohortes indépendantes de souris qui ont aussi réalisé le test d'immersion de la queue. A l'issue des traitements pharmacologiques les animaux ont été sacrifiés et les tissus collectés (dissection sur « tissus frais » ou perfusion au PFA 4% selon les études).

Test d'immersion de la queue

Ce test a été utilisé et décrit en détail pour les expériences du [Chapitre I](#) de thèse, ainsi que pour les expériences du [projet III](#).

Le test est réalisé à 47°C, et les mesures sont faites 45 minutes après injection du composé ou 20-22h après la dernière injection selon les expériences (cf [Figure 33](#)).

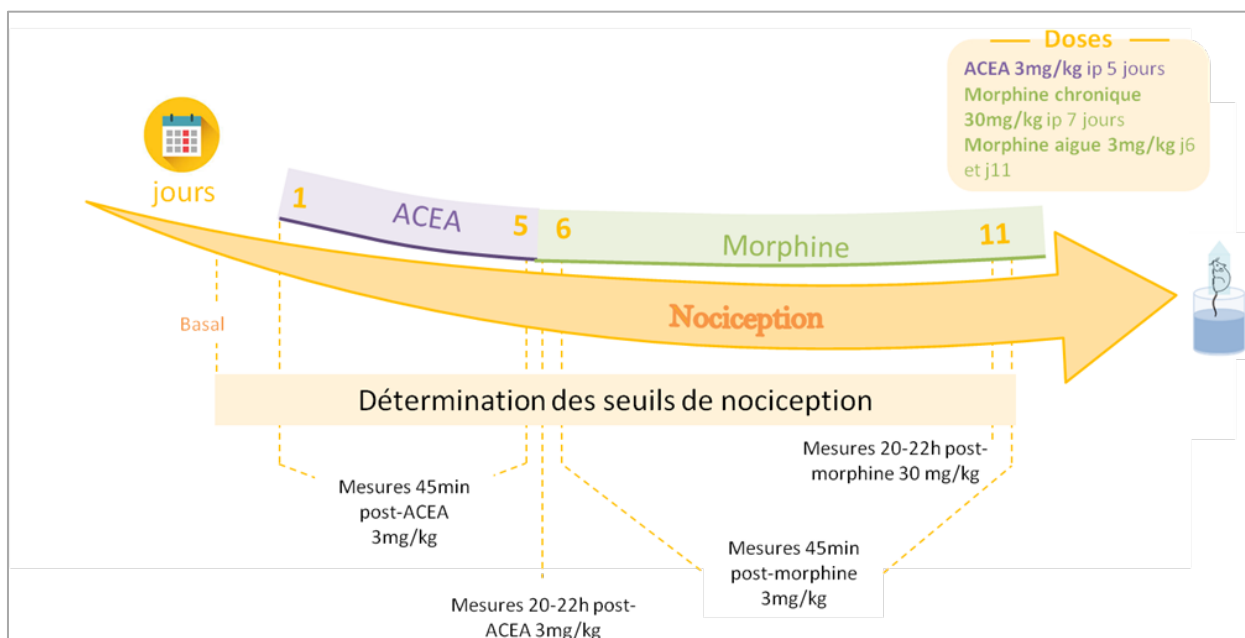


Figure 33: Schéma du protocole expérimental suivi pour réaliser l'étude de nociception thermique (immersion de la queue).

Avant de commencer les traitements pharmacologiques, les seuils de nociception basale sont déterminés par des séries de 3 mesures par jour espacées de 10 minutes, sur 2 jours. Ensuite le traitement pharmacologique commence.

Les souris sont injectées avec de l'ACEA 3mg/kg ip et 45 minutes post-injection les seuils de nociception sont mesurés (une seule mesure). Les jours suivants, le traitement ACEA 3mg/kg ip est poursuivi jusqu'au jour 5 où les seuils de nociception sont à nouveau mesurés 45 min post-injection (une seule mesure). Entre 20 et 22h après cette dernière injection d'ACEA (jour 6), le test d'immersion est réitéré (2 mesures espacées de 10 min), cette fois-ci pour mesurer les effets de l'arrêt d'un traitement répété à l'ACEA.

Le traitement morphinique est ensuite initié (jour 6). Tout d'abord, les souris sont injectées avec de la morphine 3mg/kg ip et les effets antinociceptifs sont mesurés 45 min plus tard (une seule mesure; jour 6). Une fois cette mesure réalisée (1h post-injection), les souris sont injectées avec de la morphine 30mg/kg ip (traitement induisant une dépendance physique et une tolérance). Après 5 jours de traitement morphinique 30mg/kg, 20-22h après la dernière injection de morphine (jour 11), le test d'immersion est réitéré (2 mesures espacées de 10 min), cette fois-ci pour mesurer les effets de l'arrêt d'un traitement répété à la morphine (hyperalgie?). Ce même jour (jour 11), les souris sont à nouveau injectées avec une dose de morphine plus faible (3mg/kg) pour évaluer la tolérance à l'analgésie après un tel traitement répété à la morphine.

Test de conditionnement de préférence de place (CPP)

Ce test est utilisé pour mesurer les effets récompensants de substances. Ici, nous l'avons utilisé pour mesurer les effets récompensants de la morphine après un éventuel prétraitement avec de l'ACEA. Nous nous sommes basés sur le protocole de réalisation du test de CPP décrit dans l'article de Lemerrer et collaborateurs (Le Merrer et al., 2012), que nous avons adapté à notre contexte de cotraitement (détails de la mise au point décrits dans [l'Annexe I du projet IV](#)).

Le système (Imetronic, Pessac, France) est composé de deux chambres en plexiglas (15.5x16.6x20 cm) séparées par un couloir central (6x16.5x20 cm) et de deux portes coulissantes (3x20cm) qui permettent la connexion entre le couloir et chacune des chambres. Les chambres se distinguent par la présence d'indices visuels différents (présence d'objets en plexiglas) et par la texture du sol (picots ou stries). L'activité et l'emplacement des souris sont déterminés grâce à 5 photocellules réparties le long du système et les informations sont collectées par une interface connectée à un ordinateur. L'intensité lumineuse dans les chambres est de 30 lux.

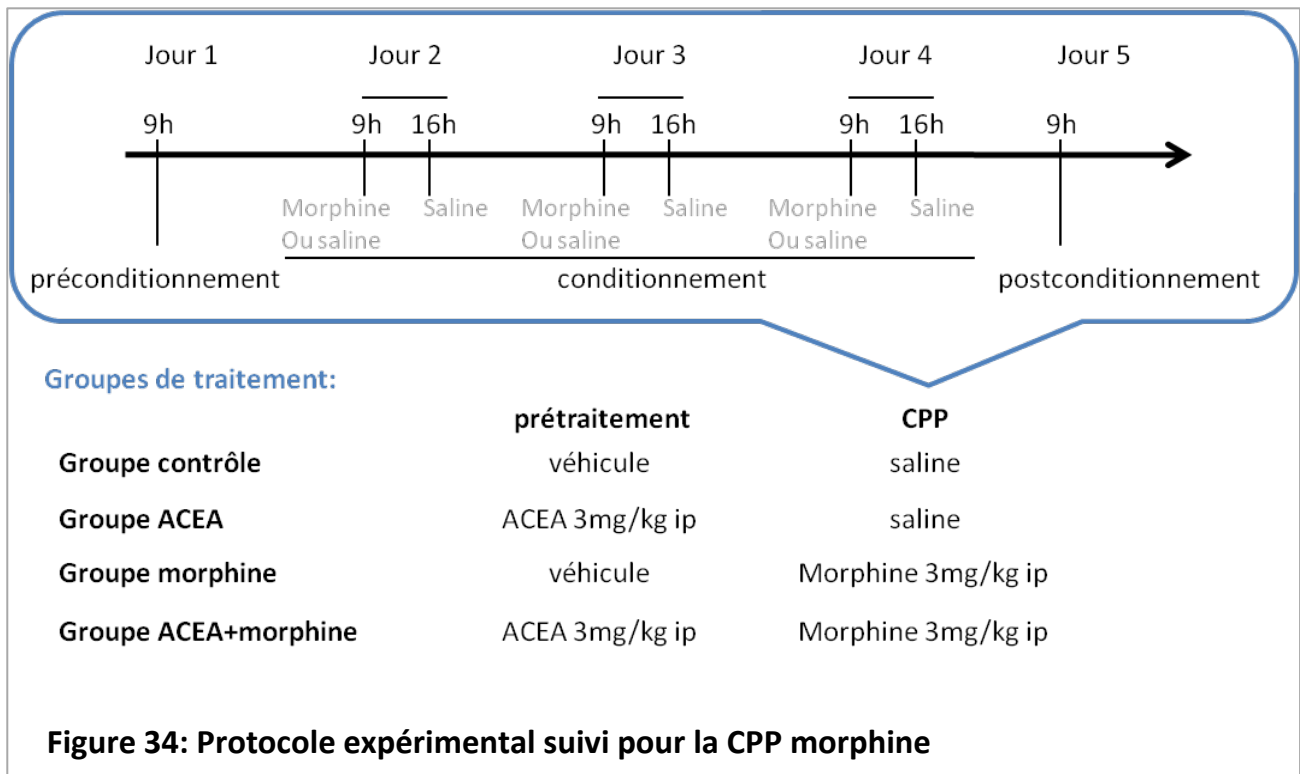
Le protocole expérimental est composé de 3 phases : une phase de **préconditionnement**, une phase de **conditionnement** et une phase de **postconditionnement**.

Le **préconditionnement** consiste à placer les animaux dans les boîtes de CPP pour une période de 30 minutes, pendant lesquelles ils sont libres de circuler d'un compartiment à un autre. Cette phase permet aux animaux de s'habituer au test, mais permet aussi de vérifier qu'il n'y a pas une préférence marquée pour un compartiment, ce qui fausserait les résultats obtenus ultérieurement.

Le **conditionnement** s'étend sur une période de 4 jours et consiste à exposer les animaux à un compartiment précis, pendant 30 minutes, le matin (9h), et au second l'après-midi (16h). Le matin, les animaux sont injectés avec de la morphine 3mg/kg ip (ou solution saline pour le groupe contrôle) avant d'être exposés au compartiment qui sera systématiquement associé à la prise de drogue et l'après-midi, les animaux sont injectés avec de la solution contrôle saline avant d'être exposés au second compartiment qui sera systématiquement associé à la prise de cette solution contrôle. Les groupes sont contrebalancés entre les deux compartiments.

Le **postconditionnement** a lieu au jour 5 et consiste à placer les animaux dans les boîtes de CPP, sans injection préalable, pendant 30 min, en les laissant libre de circuler d'un compartiment à un autre. Une préférence de place pour le compartiment associé à la drogue sera associée à un effet récompensant de cette drogue et au contraire, un temps faible passé dans le compartiment associé à la drogue sera synonyme d'aversion.

Le protocole expérimental que nous avons suivi pour réaliser ces expériences est décrit dans la [Figure 34](#).



Les résultats obtenus représentent le pourcentage de temps passé dans le compartiment associé à la drogue par rapport au temps total passé dans les deux compartiments (temps passé dans le couloir pas pris en compte).

Les détails du protocole expérimental suivis ainsi que la durée des expériences de CPP sont décrits dans la [Figure 35](#).

Avant d'utiliser ce protocole pour notre étude de cotraitement ACEA+morphine, nous avons réalisé une étude préliminaire de mise au point des doses et des temps d'exposition à suivre (Cf [Chapitre II](#) ; [Projet IV](#) ; [V. Annexe I](#))

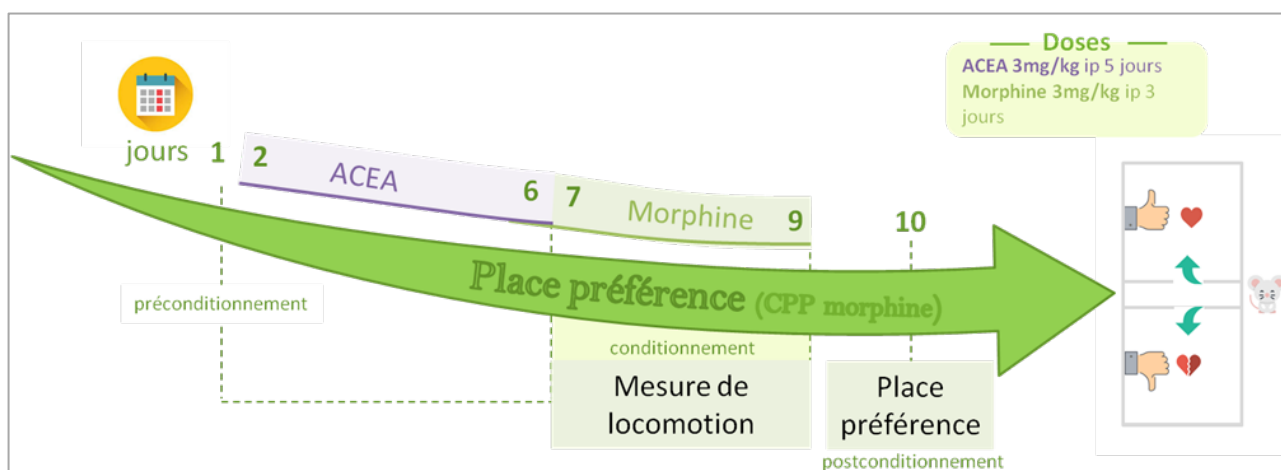


Figure 35 : Schéma du protocole expérimental suivi pour étudier les effets récompensants de la morphine (CPP).

Au jour 1, les animaux sont exposés pour la première fois aux boîtes de conditionnement (CPP). C'est une phase d'habituation et de vérification qu'il n'y a pas un biais de préférence pour un compartiment (pour protocole de la CPP, voir plus loin dans le matériel et méthode). Ensuite les animaux sont traités pendant 5 jours avec de l'ACEA 3mg/kg ip (jours 2 à 6). Au jour 7, les animaux reçoivent une injection de morphine 3mg/kg ip juste avant d'être exposés au compartiment apparié à la drogue dans les boîtes de CPP. Les souris sont traitées avec de la morphine 3mg/kg ip une fois par jour, le matin, pendant les 3 jours de conditionnement (jours 7 à 9). Les après-midi de la phase de conditionnement, les animaux sont exposés au compartiment non apparié à la drogue après injection de solution saline contrôle. Pendant ces expositions aux compartiments, les mesures de l'activité de locomotion des animaux sont réalisées. Au jour 10, les animaux sont remis dans les boîtes de CPP, sans injection préalable et libre de leurs mouvements dans les différents compartiments du test.

Test du sevrage précipité à la Naloxone

Pour réaliser ce test, nous avons suivi un protocole préalablement décrit dans la littérature (Del Boca et al., 2012; Faget et al., 2012). En pratique, les souris sont traitées pendant 7 jours avec de la morphine 30mg/kg ip (ou de la solution saline pour le groupe contrôle) et 2h après la dernière injection, le sevrage est précipité chez tous les animaux par injection de naloxone 1mg/kg ip et les signes de sevrage sont mesurés pendant 20 minutes (Matthes et al., 1996). Comme pour les autres expériences de ce projet, les animaux ont préalablement reçu un traitement de 5 jours à base d'ACEA 3mg/kg ip ou de solution véhicule ip (EtOH 6%), ce qui fait que 4 groupes de traitements sont testés dans cette expérience (Figure 36).

Les signes de sevrage sont mesurés dans une enceinte en plexiglas transparente de 15x15x30cm. Les signes mesurés sont le nombre de sauts, de secouements des pattes avant, d'ébrouements, les grattages, léchements génitaux, nombre de toilettages, et le nombre de fois où les souris s'élèvent sur

leurs pattes arrières (rearing). L'occurrence (1 ou 0) des tremblements, de la ptose, de la mastication et de la piloérection sont également mesurés par tranche de 5 minutes. La somme des nombres de sauts, de secouements des pattes avant, et des ébrouements constituent le score des signes somatiques de sevrage. Tous les signes individuels de sevrage décrits ci-dessus ont été scorés, mais seuls les nombres de sauts et de secouements de pattes seront commentés dans l'étude. Les observateurs ne sont pas au courant du traitement des animaux au moment de l'expérience (blind).

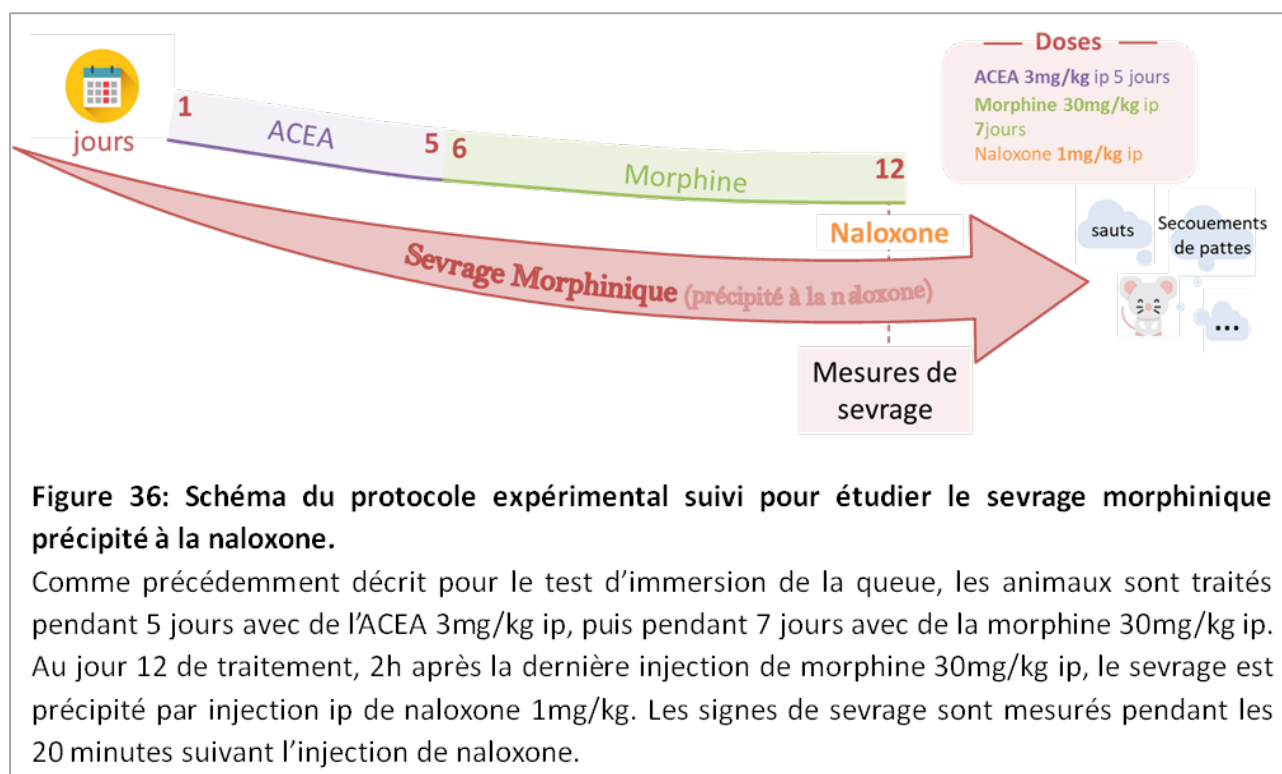


Figure 36: Schéma du protocole expérimental suivi pour étudier le sevrage morphinique précipité à la naloxone.

Comme précédemment décrit pour le test d'immersion de la queue, les animaux sont traités pendant 5 jours avec de l'ACEA 3mg/kg ip, puis pendant 7 jours avec de la morphine 30mg/kg ip. Au jour 12 de traitement, 2h après la dernière injection de morphine 30mg/kg ip, le sevrage est précipité par injection ip de naloxone 1mg/kg. Les signes de sevrage sont mesurés pendant les 20 minutes suivant l'injection de naloxone.

Etude de l'expression des gènes (qRT-PCR)

Le protocole suivi pour étudier l'expression des gènes est le même que celui décrit préalablement ([Chapitre I ; Figure 37](#)). Les régions étudiées ici sont le striatum, le cortex et l'hippocampe. Nous avons étudié la régulation des gènes :

- du système opioïde : des récepteurs Mu, Delta, Kappa, et des peptides opioïdes endogènes pENK, pDyn ;
- du système cannabinoïde : des récepteurs CB1, CB2, des enzymes de synthèse de l'anandamide et du 2-AG, NAPE et DAGLA respectivement, et des enzymes de dégradation de l'anandamide et du 2-AG, FAAH et MGL respectivement ;
- des marqueurs de l'inflammation : les marqueurs d'activation microgliale CD11b, Iba1 et TLR4 ; le marqueur astrocytaire GFAP et la cytokine pro-inflammatoire IL-1b.

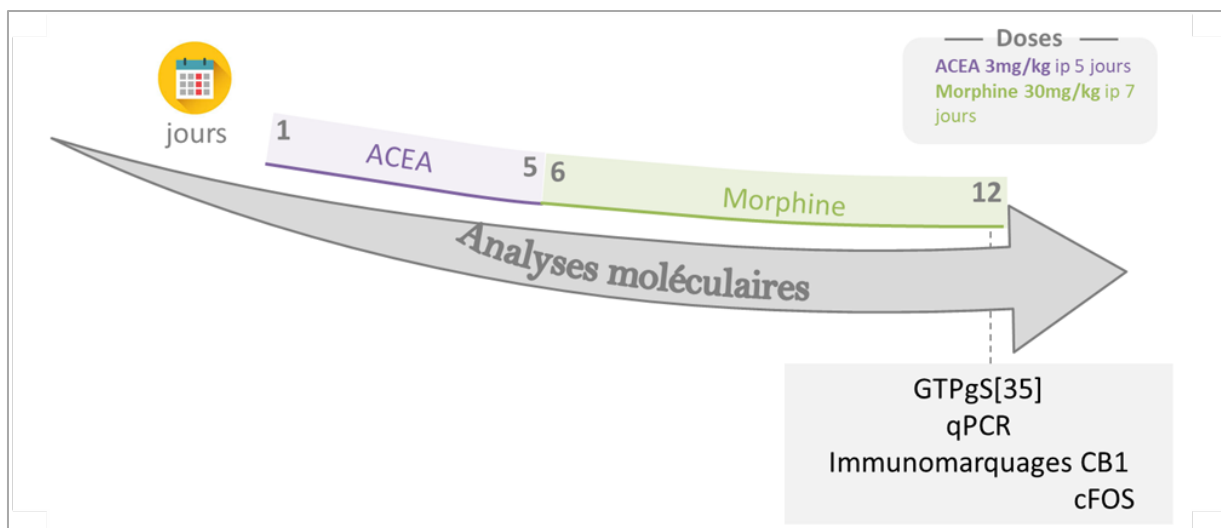


Figure 37 : Schéma du protocole expérimental suivi pour traiter les animaux avant de réaliser les études moléculaires.

Comme précédemment décrit pour le test d’immersion de la queue, les animaux sont traités pendant 5 jours avec de l’ACEA 3mg/kg ip, puis pendant 7 jours avec de la morphine 30mg/kg ip. Au jour 12 de traitement, 2h après la dernière injection de morphine 30mg/kg ip, les animaux sont sacrifiés et les tissus collectés et traités pour réaliser des études de qRT-PCR, de GTPγS[35] ou des immunomarquages.

Préparation des échantillons pour les immunomarquages

24h après la dernière injection de morphine ou de solution saline contrôle (en fonction du groupe de traitement), les animaux sont anesthésiés profondément avec du pentobarbital fortement dosé (500mg/kg, dose létale), avant de procéder à une perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde ou PFA 4%. Les cerveaux sont isolés et post-fixés dans du PFA 4% puis cryoprotégés dans une solution de sucrose avant d’être congelés à -80°C. Par la suite, les cerveaux sont inclus dans un milieu d’enrobage (OCT) avant d’être coupés (coupes coronales 30μm) au cryostat, et conservées dans une solution cryoprotectrice à -20°C. Les coupes sont ensuite sélectionnées pour réaliser les différents marquages (coupes de cerveaux et sélection des coupes faites par Débora Jacky, étudiante en Licence professionnelle).

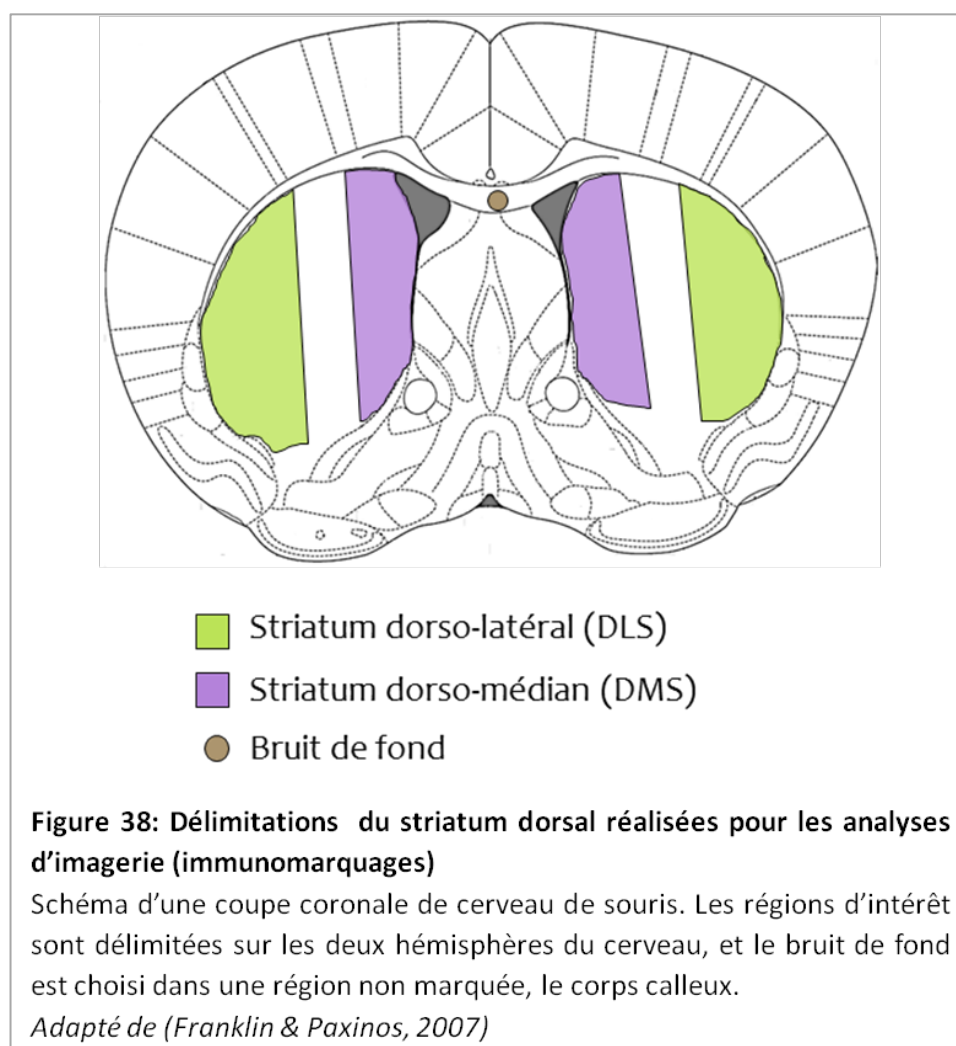
Etude de l’expression de CB1 (marquage par immunofluorescence)

Les coupes sont mises en présence d’une solution de saturation composée de sérum de cheval dilué à 5%, puis de l’anticorps anti-CB1 (Frontier Institute) dilué au 1/250^{ème}, avant d’être exposées à l’anticorps secondaire (Invitrogen) couplé à un fluorochrome, qui est l’Alexa Fluor 594, dilué au 1/500^{ème}. Les noyaux sont colorés par une solution de Hoechst 1/2000^{ème}. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelles et sont prêtes à être observées au microscope.

Une première analyse de densitométrie a été faite via Image J après prise de photographies avec un microscope à épifluorescence (microscope Zeiss Axio Imager avec ApoTome), suite à une excitation à 353nm et à 558nm pour exciter respectivement le Hoechst et l’Alexa Fluor 594, qui émettent respectivement dans le bleu (465nm) et le rouge (575nm). La quantification par densitométrie est une méthode semi-quantitative. La densité de fluorescence (DF) corrigée est calculée selon la formule suivante :

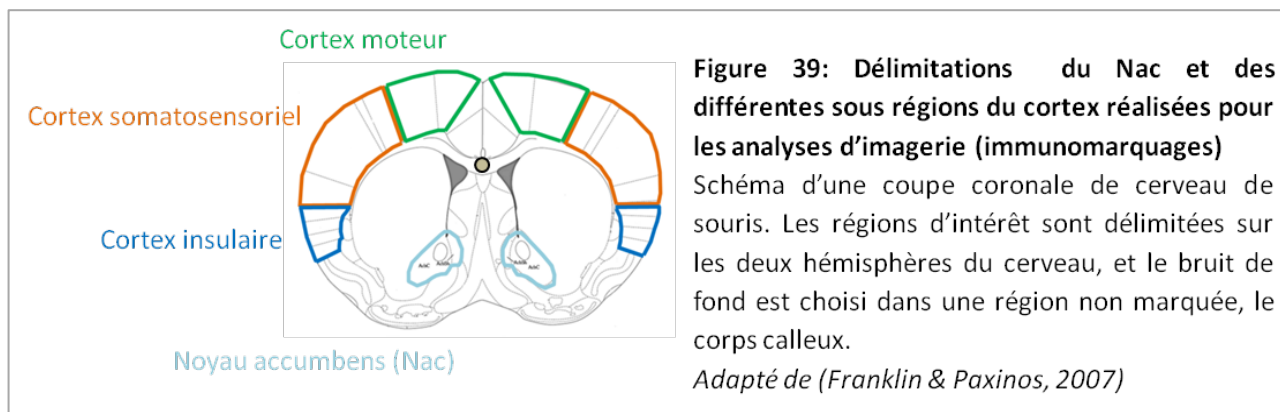
$$DF_{\text{corrigée}} = DF_{\text{région d'intérêt}} - DF_{\text{bruit de fond}}$$

Les immunomarquages et les premières analyses ont été réalisés par Débora Jacky, sur le striatum dorsolatéral et le striatum dorsomédian, en suivant le modèle de délimitation décrit dans la [figure 38](#) (d’après Thorn and Graybiel, 2014).



Une seconde analyse (en cours, réalisée par Caroline Correia) est faite avec le logiciel NDP View, suite à une prise d'images avec un microscope de type nanozoomer (INCI, Dominique Massotte). Cette seconde méthode permet une prise de photographies plus rapide et une analyse plus simple grâce au logiciel NDP View.

Ces analyses sont en cours sur les DLS et DMS, le Nac, les cortex insulaire, somatosensoriel, et moteur (Figure 39).



Etude de l'expression de cFOS (marquage par immunocytochimie)

Les coupes sont mises en présence d'une solution de saturation composée de sérum de cheval dilué à 5%, puis de l'anticorps anti-cFOS (Synaptic System) dilué au 1/250^{ème}, avant d'être exposées à l'anticorps secondaire biotynilé (Jackson ImmunoResearch) dilué au 1/500^{ème}. L'amplification du signal est induite par une exposition à un complexe ABC (Avidine-biotine peroxydase) et la révélation est faite grâce à la DAB (3,3-diaminobenzidine).

Après traitements, les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelles avant d'être photographiées au microscope optique (Microscope Olympus VANOX AH BT3). Les analyses sont ensuite réalisées avec le logiciel Image J par comptage des neurones cFOS positifs. Les valeurs obtenues représentent alors une densité de neurones cFOS positifs par μm^2 . La prise de photos et les analyses préliminaires ont été réalisées par Shani Follschweiller, étudiante stagiaire volontaire M1.

Les délimitations du cortex insulaire ont été réalisées comme indiqué dans la figure 39.

Etude de l'activité des récepteurs CB1 et Mu

L'étude de ces activations a été faite grâce à la technique du GTP γ S[35], préalablement décrite dans l'article Roeckel et al., 2017. Les récepteurs CB1 et Mu étant des récepteurs couplés aux protéines Gi, et nous avons vu précédemment que leur activation entraîne l'hydrolyse de GTP en GDP. Cette technique se base sur cet aspect pour mesurer la capacité d'activation de RCPG. Le GTP γ S[35] est non hydrolysable et va pouvoir prendre la place d'un GTP. La fixation de GTP γ S[35] reflète l'activation du récepteur ciblé. Ici, nous utilisons des agonistes spécifiques soit du récepteur Mu, le DAMGO, soit du récepteur CB1, l'ACEA pour activer respectivement ces récepteurs. Plus l'activation sera importante, plus il y aura de GTP γ S[35] détecté dans l'essai et cela nous permet d'obtenir des courbes d'activation du récepteur en fonction de la dose d'agonistes utilisée, mais aussi de déterminer une EC50 ou

concentration efficace 50, qui est la concentration d'agoniste nécessaire pour obtenir une activation de l'ordre de 50% d'un récepteur; et le Emax, ou efficacité maximale qui correspond à l'activation maximale observée pour un récepteur donné.

Les études de GTPγS[35] sont réalisées ici sur des membranes d'hippocampe et de striatum des mêmes animaux que ceux qui ont été utilisés pour réaliser les études d'expression de gènes par qPCR. Cela nous permet de directement comparer les résultats obtenus dans ces deux tests. Très brièvement, les préparations de membranes (hippocampe ou striatum) sont incubées pendant une heure avec des concentrations croissantes d'ACEA (10^{-10} à 10^{-5} M) ou du DAMGO (10^{-10} à 10^{-4} M), respectivement pour étudier l'activation des récepteurs CB1 ou Mu.

III. Résultats

A. Effets du cotraitement ACEA+morphine sur l'antinociception morphinique (immersion de la queue)

Les mesures par immersion de la queue, réalisées 45 minutes après injection d'ACEA 3mg/kg ip, montrent l'absence d'effet antinociceptif de l'ACEA chez ces souris (Figure 40). Par contre, avec le temps, on observe une diminution des seuils de nociception qui traduisent une hypersensibilité, significative chez les souris traitées avec l'ACEA (d5). Notons que cette diminution est également présente chez les animaux traités avec la solution véhicule, sans être significative comparée aux résultats obtenus en BL, ou même aux résultats des souris traitées avec l'ACEA à ce même moment (d5).

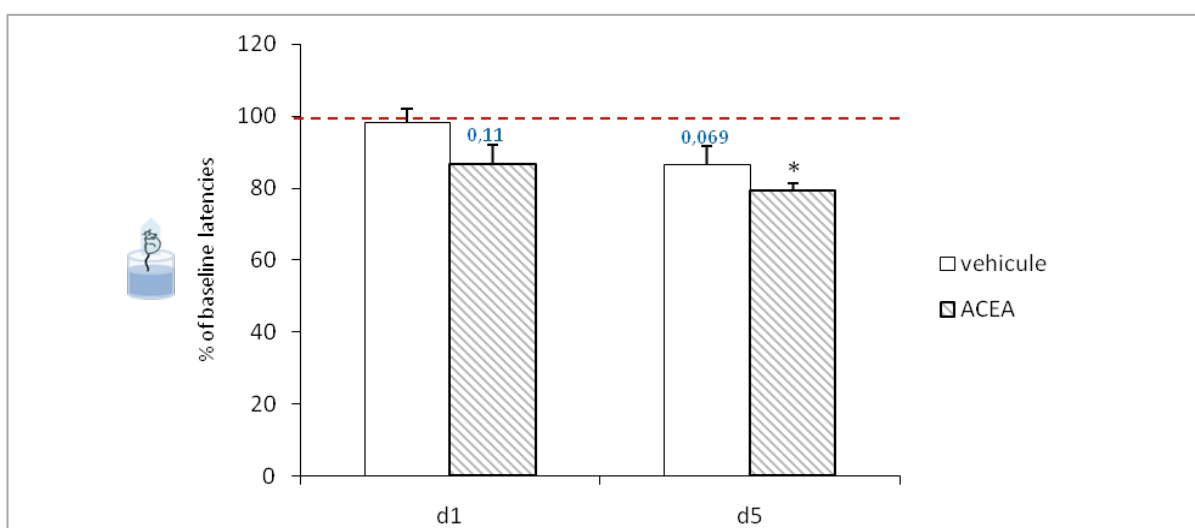
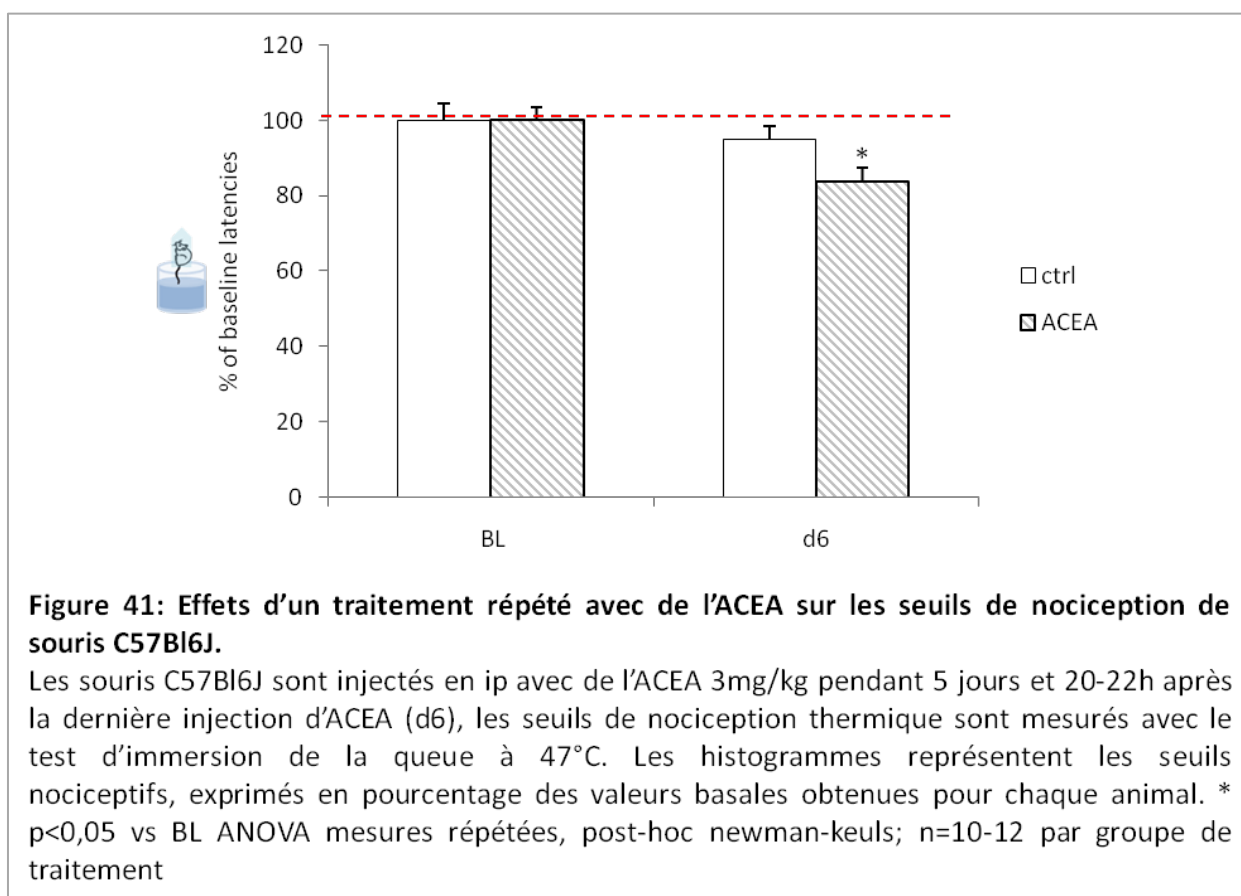


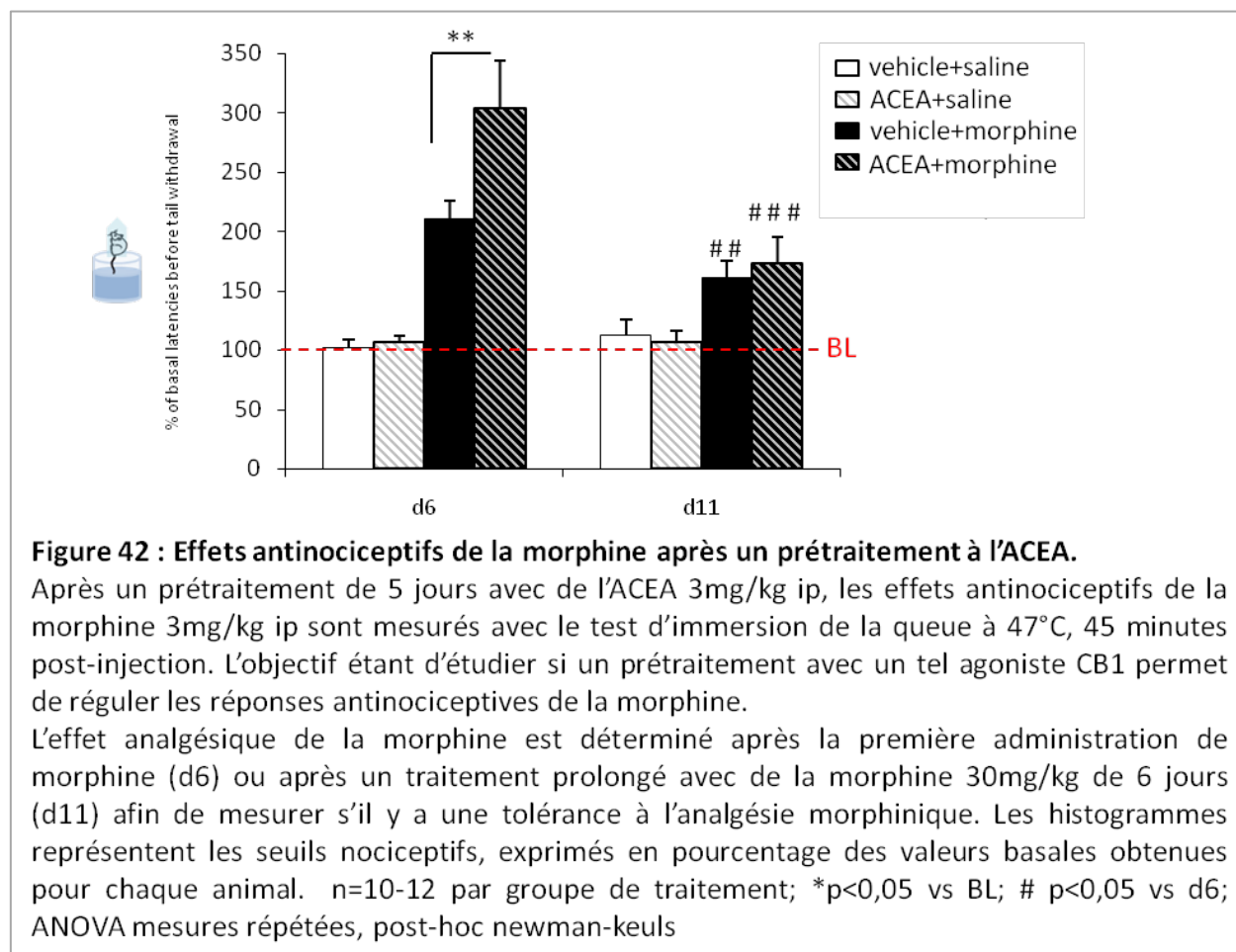
Figure 40 : Effets antinociceptifs de l'ACEA chez des souris C57Bl6J.

Les souris C57Bl6J sont injectées en ip avec de l'ACEA 3mg/kg et 45min post-injection les effets de cette injection sur la nociception thermique sont mesurés avec le test d'immersion de la queue à 47°C. Cet effet est mesuré au jour 1 (d1) et jour 5 (d5) d'un traitement répété à l'ACEA. Les histogrammes représentent les seuils nociceptifs à différents temps, exprimés en pourcentage des valeurs basales obtenues pour chaque animal. n=10-12 par groupe de traitement; * p<0,05 vs BL; ANOVA mesures répétées, post-hoc newman-keuls

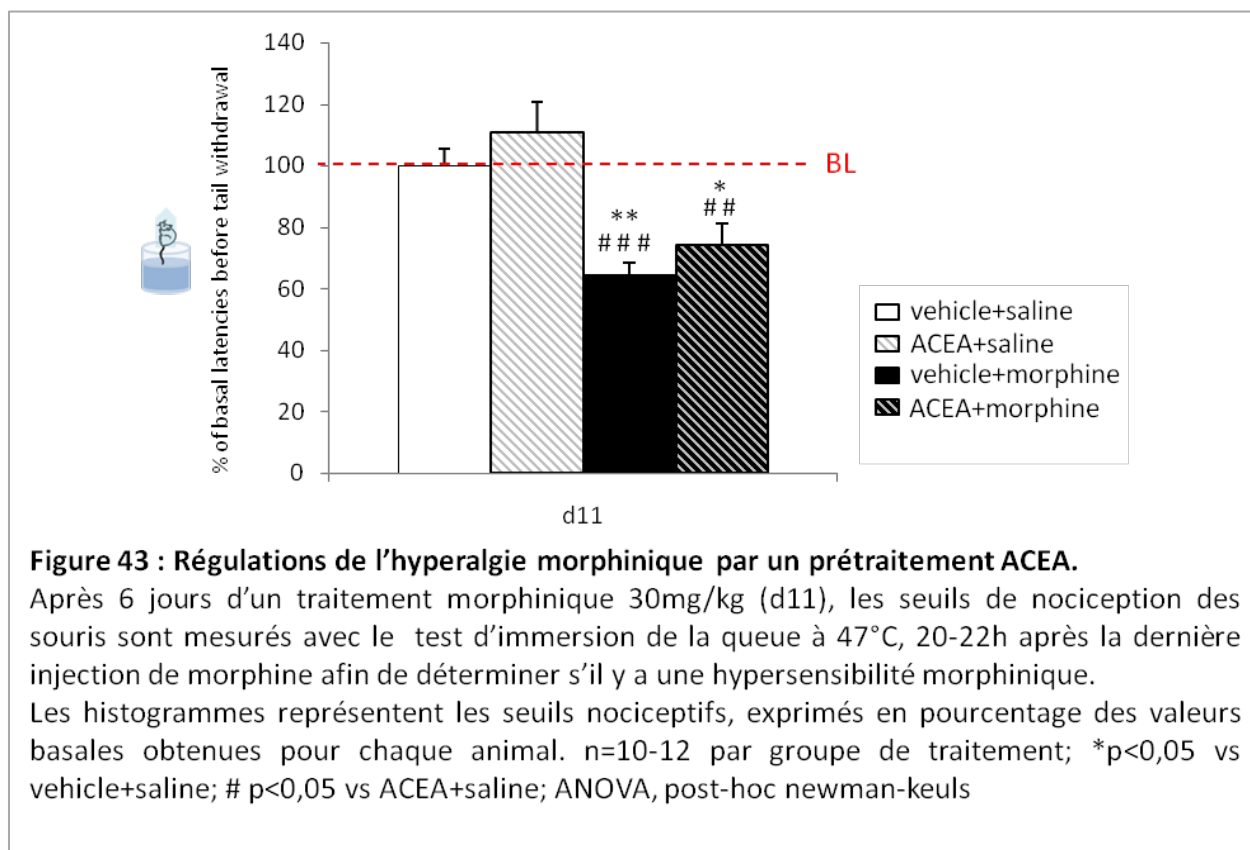
L'étude des effets prolongés de l'ACEA, révèle un léger effet pronociceptif de l'ACEA administré de façon répétée (Figure 41).



Ensuite les seuils nociceptifs des souris sont mesurés après administration de morphine suite à un tel prétraitement. Au jour 6 (d6) le traitement morphinique est initié et les effets antinociceptifs sont mesurés 45 minutes après injection de morphine 3mg/kg ip (Figure 42). Cette injection entraîne une forte augmentation des seuils de nociception, qui passent de 100% en BL à 200% après injection de morphine. Cette augmentation est synonyme d'analgésie (***) vs BL, non représenté sur le graphique). Il est intéressant de noter que l'analgésie morphinique est nettement plus importante chez les souris ayant reçu le prétraitement ACEA de 5 jours, où les seuils nociceptifs passent de 100% en BL à 300% après injection de morphine. Ensuite les souris sont traitées pendant 5 jours avec de la morphine 30mg/kg ip afin d'induire une tolérance. Cette tolérance est déterminée au jour 11 (d11 sur le graphique, correspondant au 6^{ème} jour de traitement morphinique), par injection de morphine 3mg/kg ip, comme à d6, afin d'évaluer l'évolution de l'effet antinociceptif de la morphine. A d11, la morphine 3mg/kg ip induit également une élévation des seuils de nociception de l'ordre de 150%, mais cette analgésie est bien moins importante que celle observée lors de la première administration de morphine. Les souris sont donc tolérantes à l'analgésie morphinique. Cette tolérance est comparable chez les animaux ayant reçu préalablement un prétraitement ACEA et les autres.

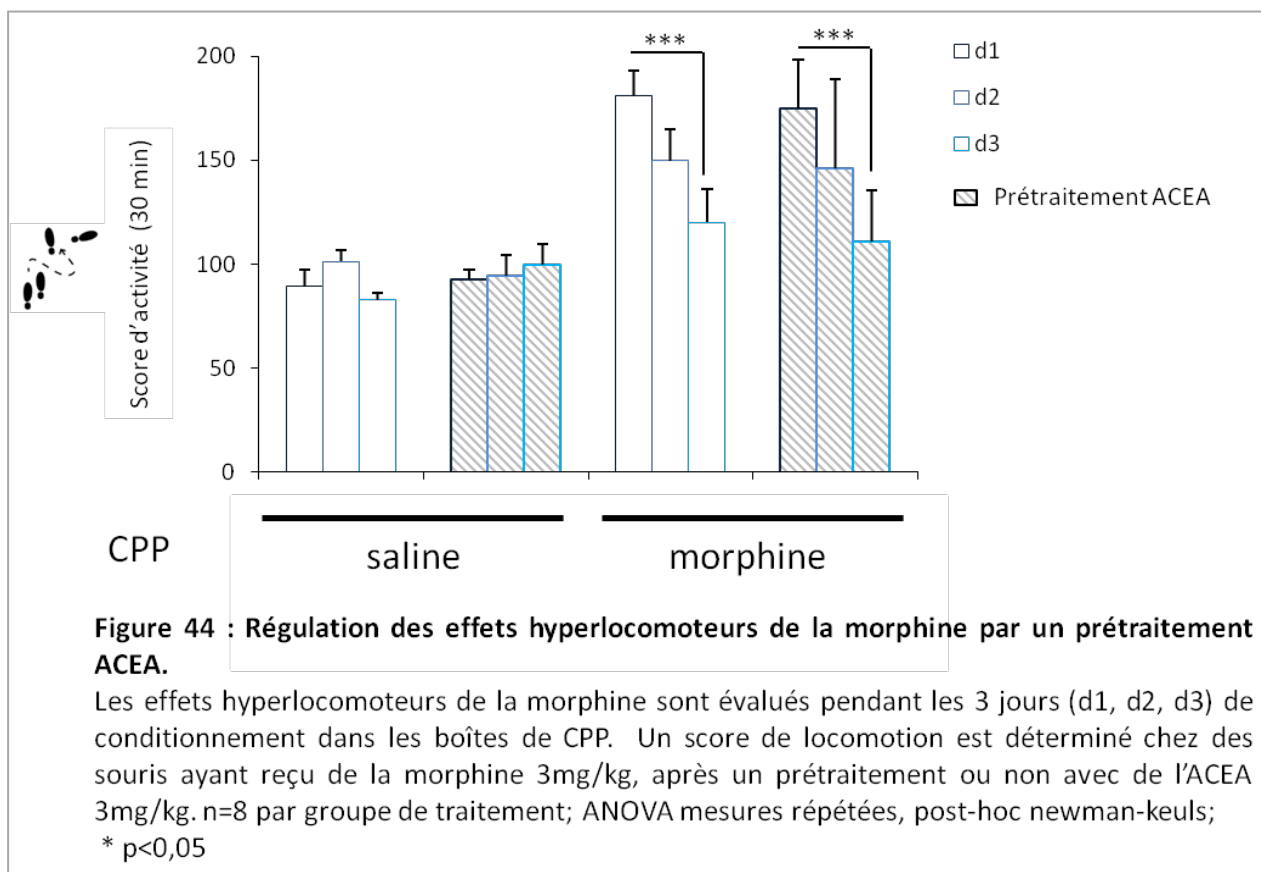


Afin de compléter cette approche sur la nociception, nous avons aussi étudié comment un tel prétraitement ACEA 3mg/kg pendant 5 jours régulait l'hypersensibilité morphinique (Figure 43). Toujours à d11, soit après 5 jours de traitement morphinique 30mg/kg ip, mais cette fois-ci avant l'injection quotidienne de morphine, soit 20-22h après la dernière injection de morphine, les seuils nociceptifs sont mesurés. Comme préalablement décrit, la morphine induit une hyperalgie importante, de l'ordre de 30% (cf Chapitre I). Cette hypersensibilité est comparable chez les animaux prétraités avec l'ACEA.



B. Le cotraitement ACEA+morphine et les effets locomoteurs de la morphine

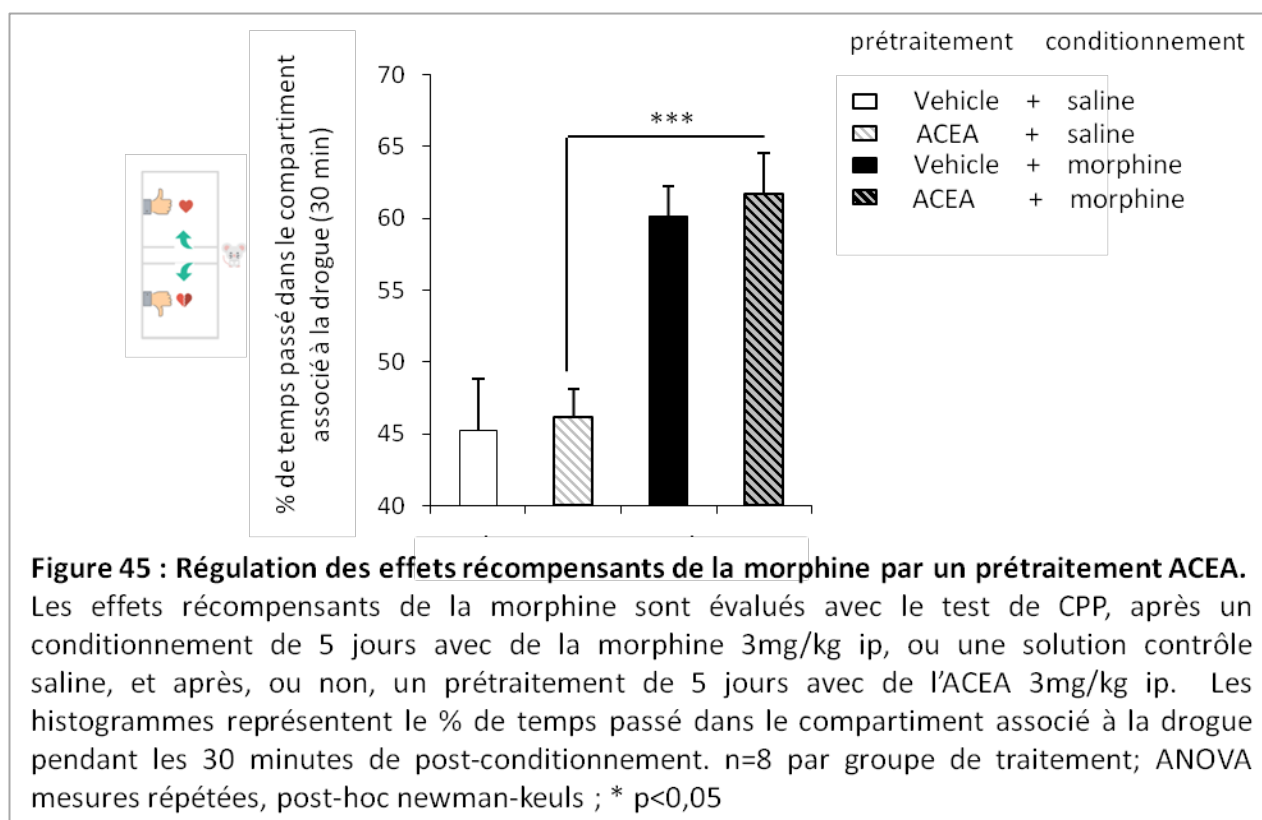
Dans les boîtes de conditionnement, nous avons mesuré l'activité locomotrice des animaux pendant les 3 jours de conditionnement, soit d1, d2, d3 (Figure 44). L'administration de morphine 3mg/kg ip à d1 induit un effet hyperlocomoteur important sur une période de 30 minutes (*** vs groupes traités avec de la solution saline, non représenté sur le graphique). Cet effet hyperlocomoteur de la morphine est comparable chez les souris ayant reçu le prétraitement ACEA de 5 jours. Par contre, au cours du traitement morphinique, on observe une diminution de cette hyperlocomotion (d1 vs d3), ou une tolérance à l'hyperlocomotion morphinique. A nouveau, le prétraitement ACEA n'influence pas le développement de cette tolérance.



C. Le cotraitement ACEA+morphine et les effets récompensant de la morphine (place préférence)

Ensuite, nous avons étudié si un prétraitement ACEA modifiait les effets récompensants de la morphine avec le test de CPP (Figure 45).

Ces résultats de postconditionnement montrent que les animaux ayant reçu de la morphine passent significativement plus de temps dans le compartiment associé à la drogue que dans le compartiment associé à la solution saline. Cela montre que la morphine à ces doses (3mg/kg) possède des propriétés récompensantes. Les souris prétraitées avec de l'ACEA pendant 5 jours présentent des résultats de CPP morphinique comparables à ceux obtenus pour les souris n'ayant pas reçu ce prétraitement.



D. Effets du cotraitement ACEA+morphine sur le sevrage morphinique (sevrage précipité à la naloxone)

Nous avons aussi mesuré si le prétraitement ACEA avait un effet sur le sevrage morphinique précipité à la naloxone. Comme précédemment décrit dans la littérature (Del Boca et al., 2012), un tel protocole morphinique induit un sevrage précipité à la naloxone qui se traduit par une augmentation des signes somatiques de sevrage, à savoir le nombre de sauts, de secouements des pattes avant et des ébrouements (Figures 46 et 47) (***) (*** groupe morphine vs saline, non représenté sur le graphique).

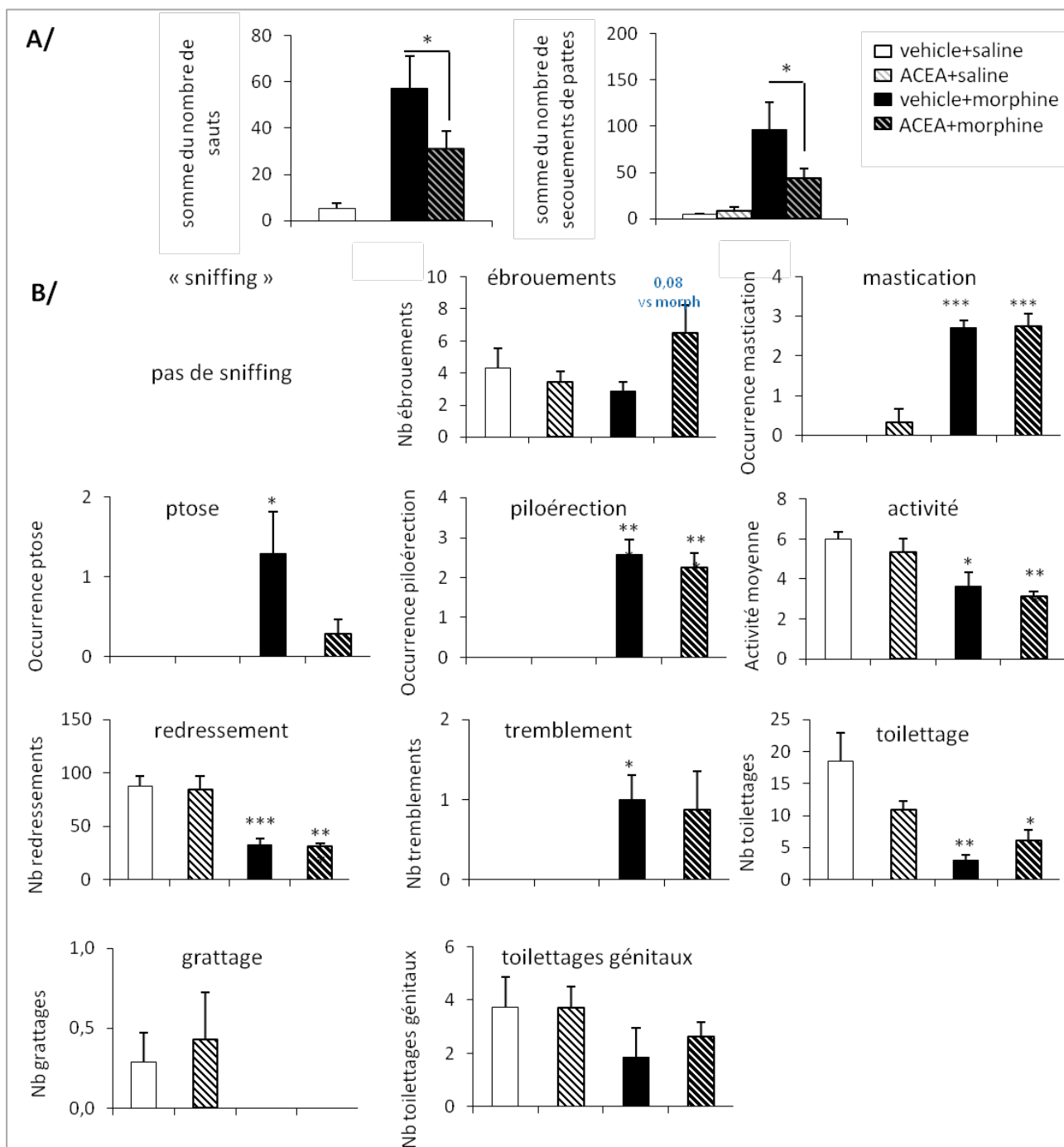
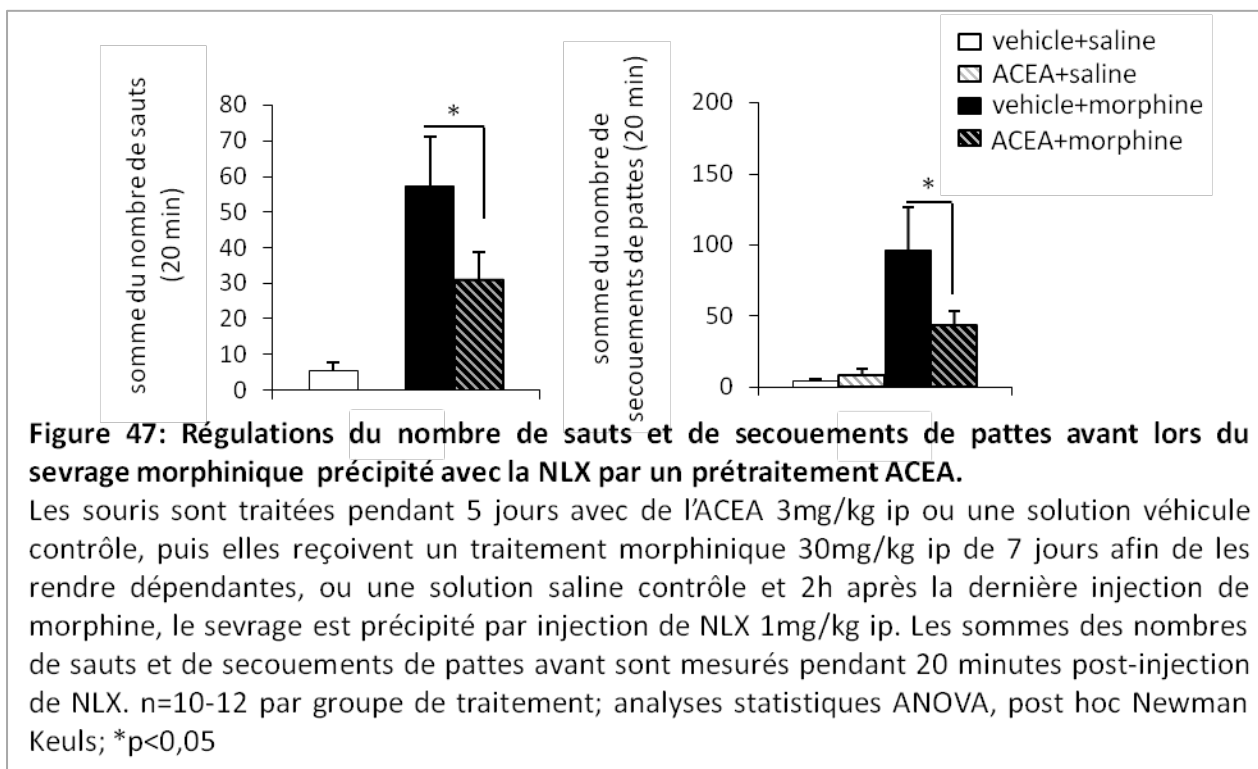


Figure 46: Régulations du nombre de sauts et de secouements de pattes avant lors du sevrage morphinique précipité avec la NLX par un prétraitement ACEA.

A/ Les souris sont traitées pendant 5 jours avec de l'ACEA 3mg/kg ip ou une solution véhicule contrôle, puis elles reçoivent un traitement morphinique 30mg/kg ip de 7 jours afin de les rendre dépendantes, ou une solution saline contrôle et 2h après la dernière injection de morphine, le sevrage est précipité par injection de NLX 1mg/kg ip. Les sommes des nombres de sauts et de secouements de pattes avant sont mesurés pendant 20 minutes post-injection de NLX. n=10-12 par groupe de traitement; analyses statistiques ANOVA, post hoc Newman Keuls; *p<0,05

B/ Détails des résultats obtenus pour les autres signes de sevrage, chez les mêmes individus. *p<0,05 vs vehicle+saline, t-test.

Par contre, ces résultats indiquent que les souris ayant reçu un prétraitement ACEA présentent des signes somatiques de sevrage atténués ([Figure 46A](#)). Cette atténuation est confirmée par les résultats de l'étude individuelle des signes de type sauts ou secouements de patte ([Figure 47](#)). Un tel prétraitement aurait un effet protecteur sur le sevrage morphinique.

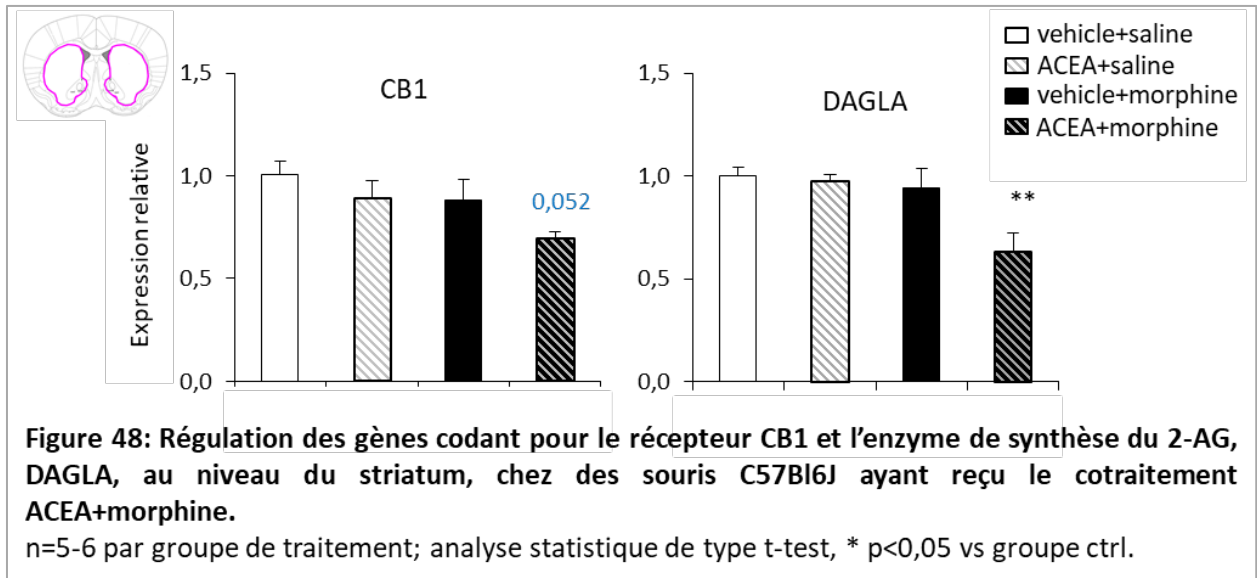


E. Régulations de l'expression des gènes du système opioïde, du système cannabinoïde et de l'inflammation induites par le cotraitement ACEA+morphine (qRT-PCR)

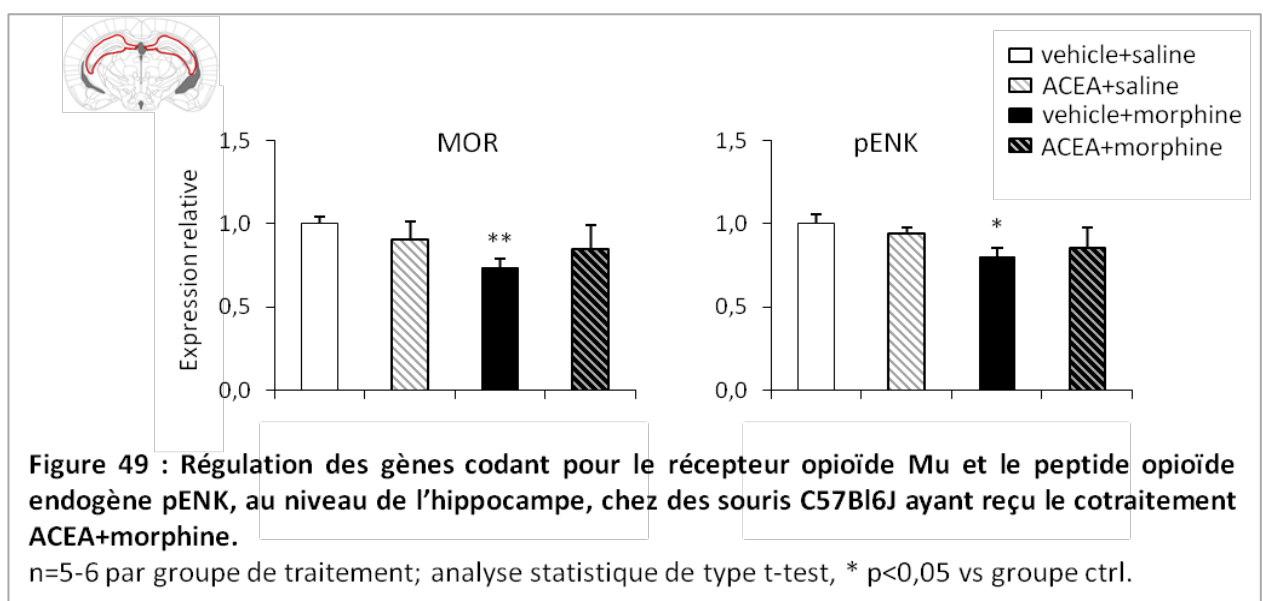
Nous avons étudié l'expression des gènes codants pour les systèmes cannabinoïdes, opioïdes et des marqueurs de l'inflammation, chez des souris sacrifiées 2 heures après la dernière injection de morphine 30mg/kg suite à un cotraitement ACEA (5j) + morphine (7j). Globalement, nous n'avons pas observé de régulations massives de l'expression des gènes de ces différents systèmes dans les régions étudiées, à savoir le striatum, l'hippocampe et le cortex. Les [figures 48, 49, 50 et 51](#) représentent les principaux résultats significatifs que nous avons obtenus dans ce contexte.

Nous avons observé des régulations de l'expression des gènes du système endocannabinoïde dans le striatum et plus particulièrement une diminution des taux de transcrits CB1 et DAGLA chez les individus ayant reçu le cotraitement par rapport aux individus du groupe contrôle ([Figure 48](#)). Cela signifie qu'un traitement morphinique précédé d'un traitement ACEA diminue l'expression des transcrits CB1 et

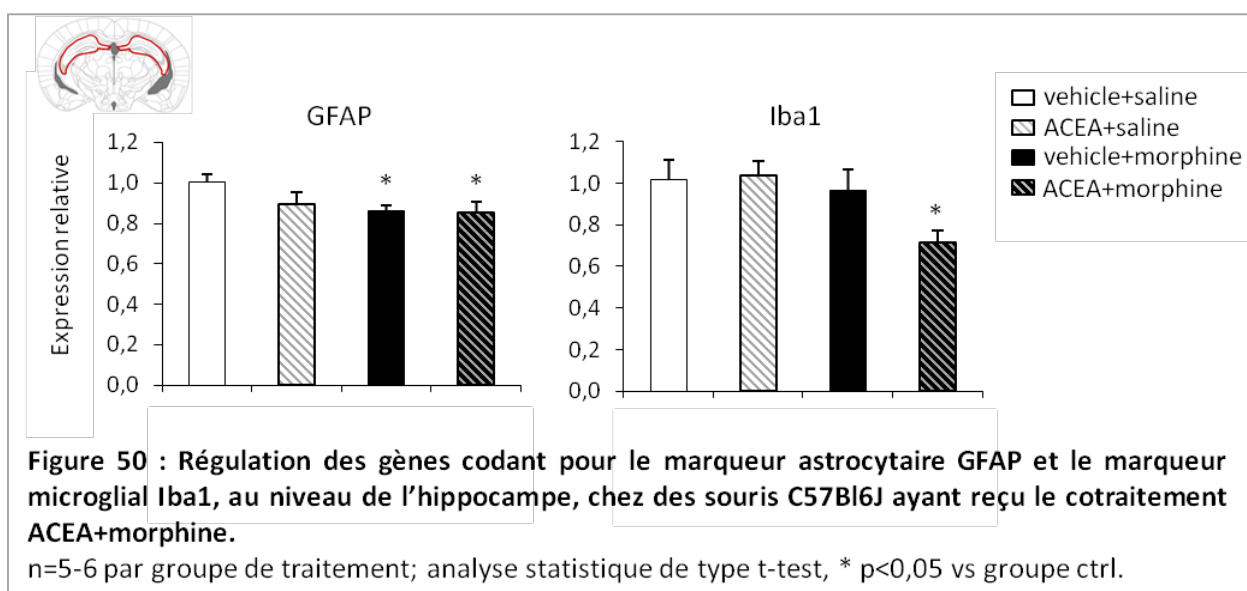
parallèlement diminue les taux de transcrits de l'enzyme de synthèse du 2-AG, DAGLA. Ensemble, ces résultats indiquent que le cotraitement induit une régulation négative du tonus endogène global, ou de la signalisation CB1 dans le striatum. Seuls, le prétraitement ACEA et le traitement morphinique n'induisent pas de régulations notables de ces gènes.



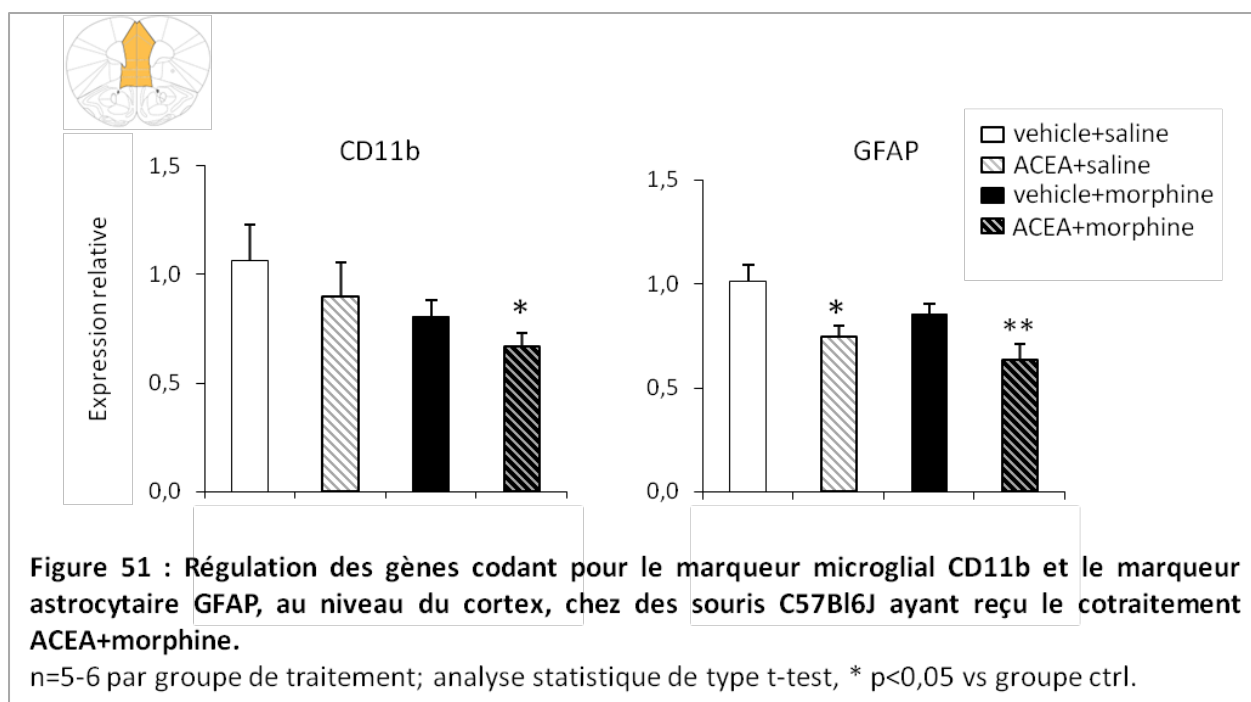
Ensuite, concernant le système opioïde, on observe une régulation négative des transcrits MOR et pENK dans l'hippocampe d'animaux traités chroniquement avec de la morphine (Figure 49). Ces deux régulations sont corrélées puisque pENK possède une affinité importante pour Mu et ces résultats indiquent donc que la morphine administrée de façon répétée régule négativement l'expression de transcrits participant à la signalisation Mu. Le fait d'administrer un prétraitement ACEA avant le traitement morphinique permet d'atténuer ces régulations négatives.



Toujours dans l'hippocampe, des régulations des marqueurs d'activation gliaux sont observées (Figure 50). Le cotraitement ACEA+morphine entraîne une régulation négative de l'expression des marqueurs astrocytaires GFAP et microgliaux Iba1 par rapport aux animaux du groupe contrôle. Concernant GFAP, une diminution de ses taux de transcrits est également observable chez les animaux ayant reçu de la morphine sans prétraitement ACEA. Cela suggère que cette régulation négative est dépendante du traitement morphinique uniquement.

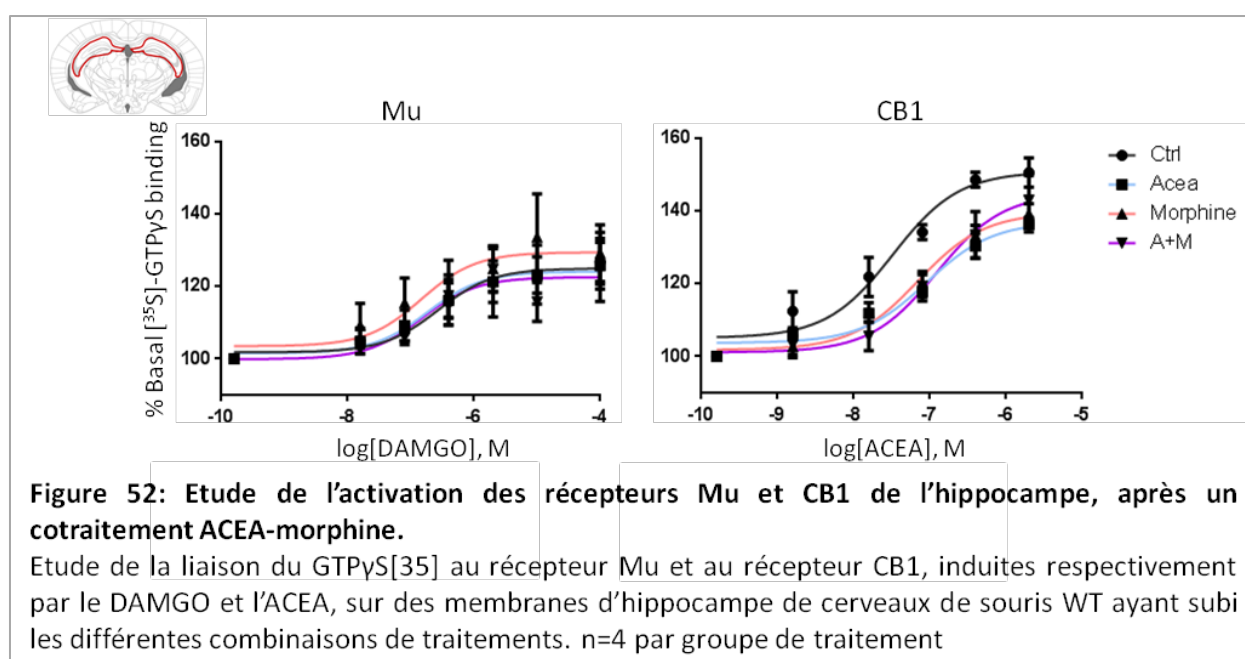


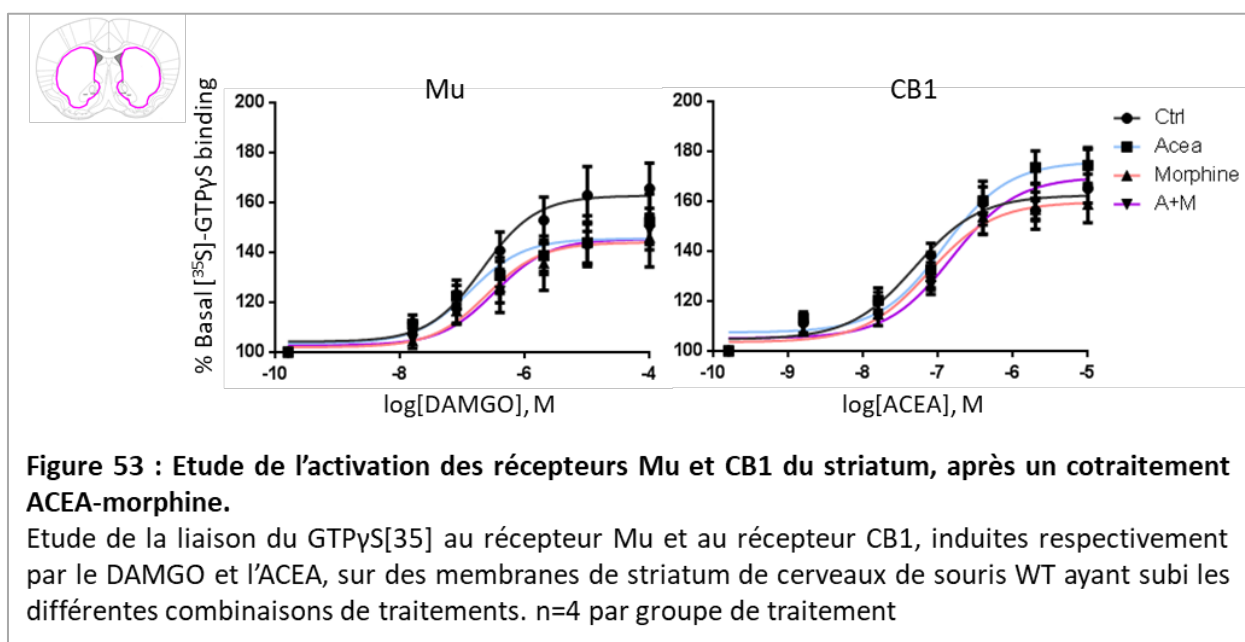
Des régulations des marqueurs gliaux sont également notables dans le cortex (Figure 51). Dans cette structure cérébrale, le cotraitement ACEA+morphine induit une diminution de l'expression des transcrits microgliaux CD11b et astrocytaires GFAP. Notons que concernant GFAP, les animaux ayant reçu uniquement le prétraitement ACEA (suivi d'injections de saline pendant 7 jours) présentent une régulation négative comparable de ce gène. Cela suggère un effet régulateur du prétraitement ACEA. De plus, pour CD11b l'ensemble des traitements à tendance à diminuer le taux de ces transcrits mais de façon non significative.



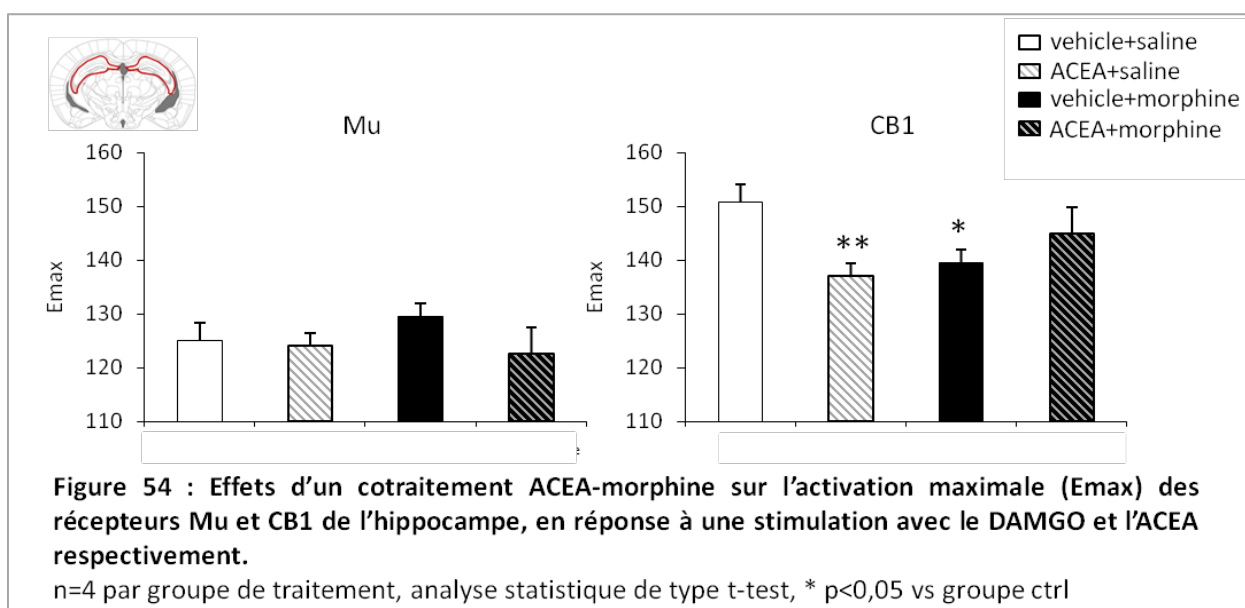
F. Régulations de l'activation des récepteurs opioïdes Mu et CB1 induites par le cotraitement ACEA+morphine (GTPyS[35])

Par qPCR, nous avons vu qu'il y avait des régulations de l'expression des gènes CB1 et Mu dans l'hippocampe ou le striatum. Nous voulions compléter ce résultat en évaluant la fonctionnalité des récepteurs dans ces régions, en utilisant la méthode de mesure de liaison du GTPyS[35], avec des agonistes sélectifs du récepteur mu (DAMGO) ou du récepteur CB1 (ACEA), respectivement. Nous avons utilisé cette approche dans l'hippocampe (Figure 52) et le striatum (Figure 53) des animaux préalablement traités avec les différentes combinaisons d'ACEA et de morphine.

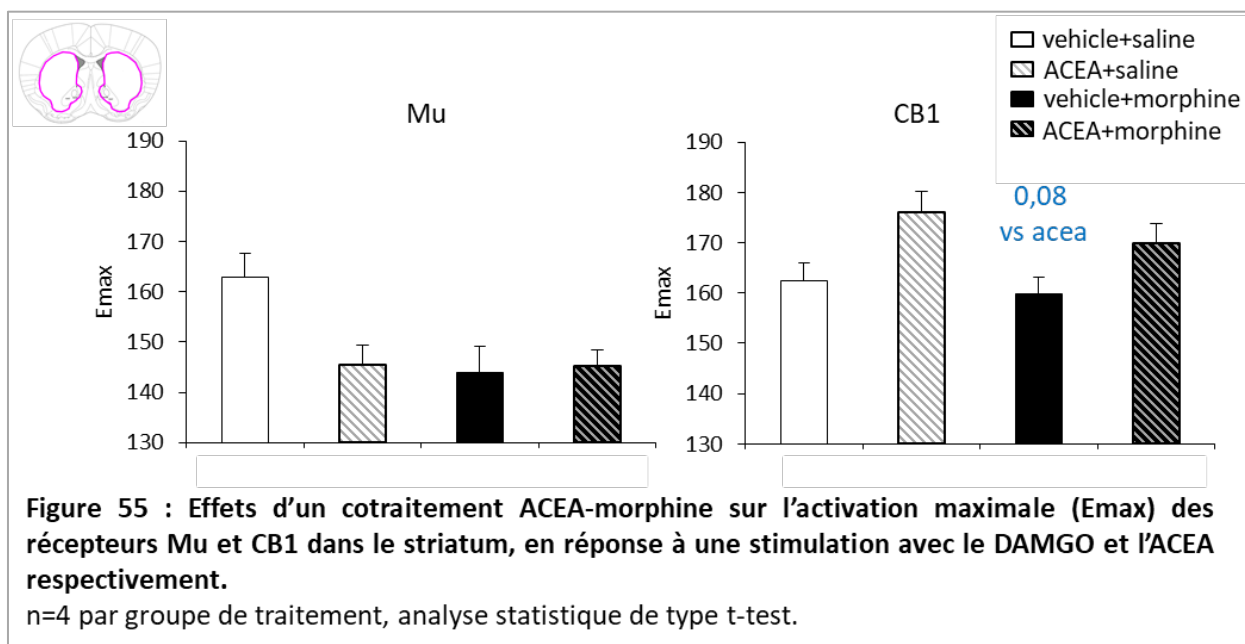




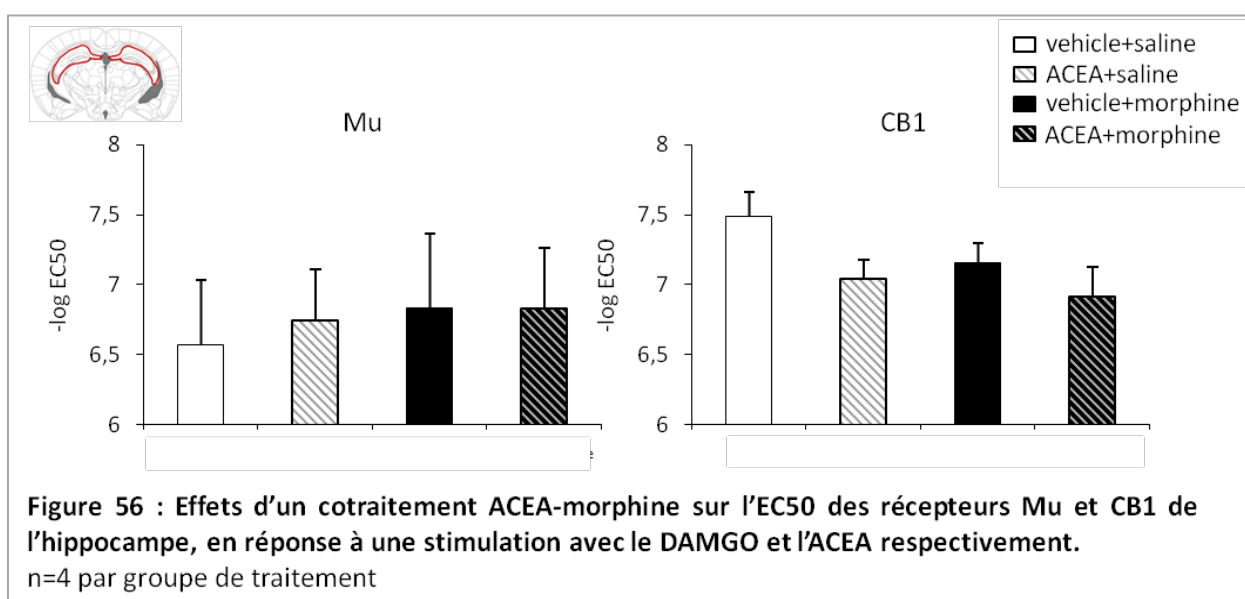
A partir des courbes obtenues en [Figures 52 et 53](#), nous avons pu déterminer les Emax, qui correspondent à l'activation maximale des récepteurs en fonction des concentrations d'agonistes (ACEA ou DAMGO) auxquelles sont exposées les préparations de membranes (cf [méthodes](#)) ([Figures 54 et 55](#)). Dans l'hippocampe, les Emax des récepteurs Mu ne sont pas modifiées par les différents traitements, alors que les Emax de CB1 sont diminuées par le prétraitement ACEA ou le traitement morphinique, malgré une variabilité interindividuelle assez importante. La combinaison des deux traitements permet la normalisation des Emax de CB1, à savoir un retour vers une activation maximale comparable à celle observée chez le groupe contrôle ([Figure 54](#)).



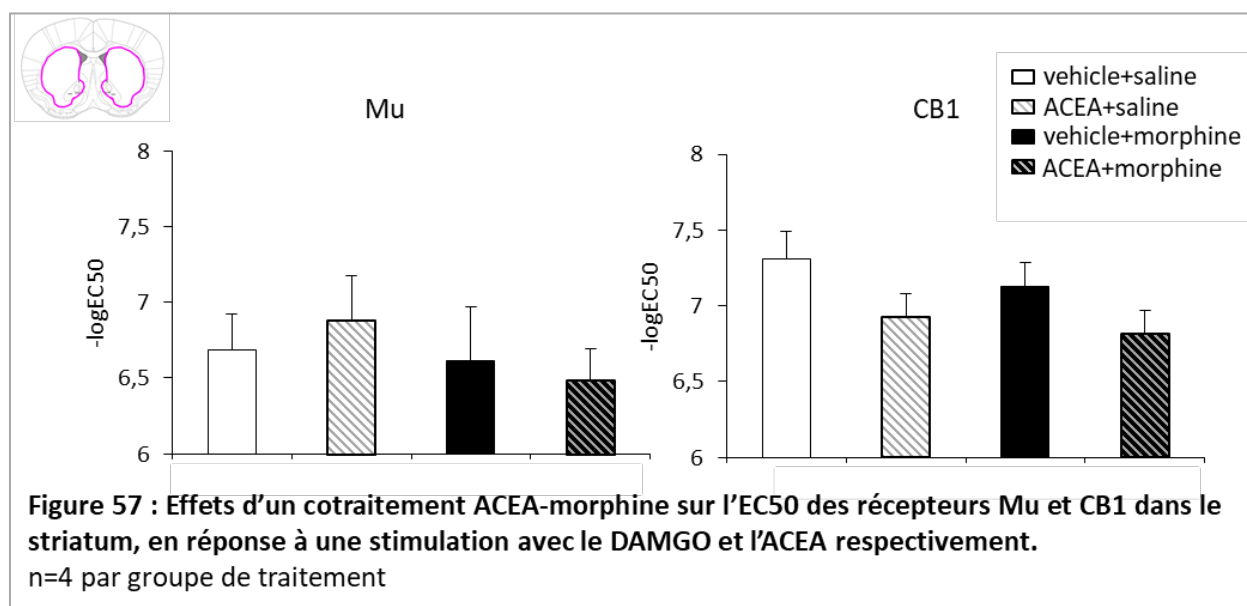
Dans le striatum, les 3 combinaisons de traitement entraînent une diminution de la Emax des récepteurs Mu, mais ces diminution ne sont pas significatives (Figure 55). Toujours dans le striatum, les prétraitements ACEA entraînent une légère augmentation du Emax CB1 (non significative), qui n'est pas retrouvé chez les souris ayant reçu uniquement de la morphine.



Nous avons aussi déterminé les EC50 des récepteurs CB1 et Mu dans ces régions après les différents traitements. Comme précédemment avec l'Emax, les différents traitements n'entraînent pas de régulation des EC50 du récepteur Mu dans l'hippocampe (Figure 56). Concernant le récepteur CB1, les différents traitements induisent une diminution non significative du -logEC50, soit une augmentation de l'EC50 de ce récepteur associée à une diminution de l'Emax de ce récepteur (Figure 54).

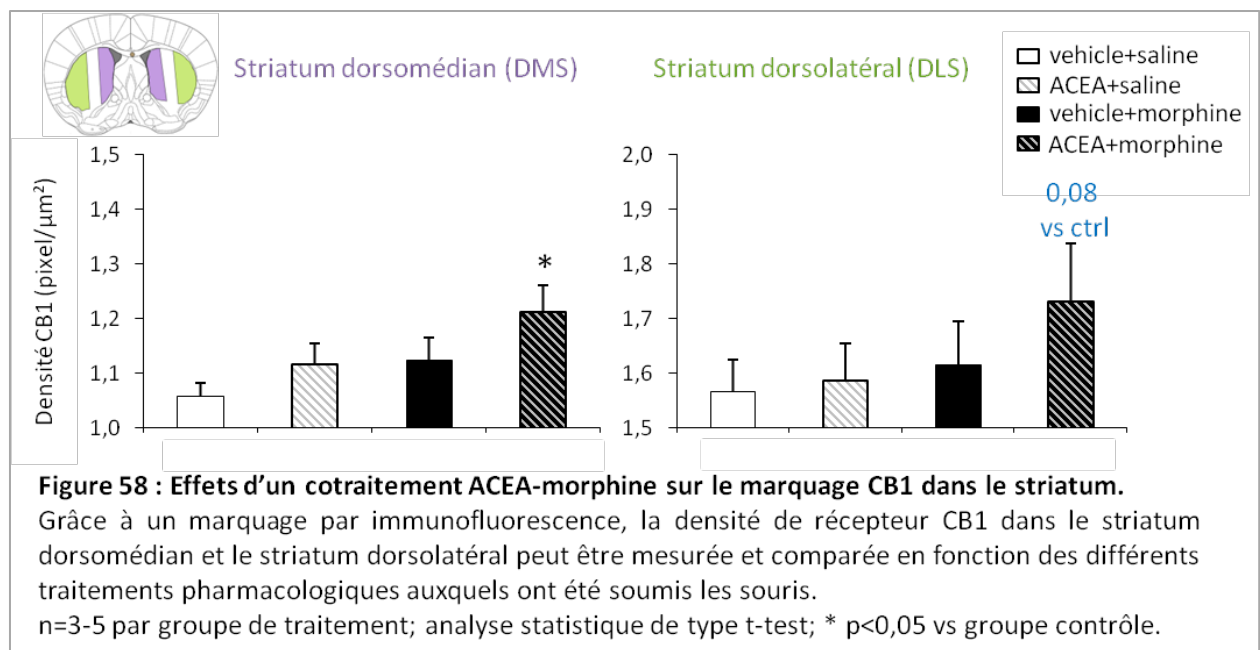


Dans le striatum, on ne voit pas non plus de régulations significatives des EC50 des récepteurs CB1 et Mu après les différents traitements (Figure 57).



G. Régulations de l'expression du récepteur CB1 induite par le cotraitement ACEA+morphine (immunohistochimie CB1)

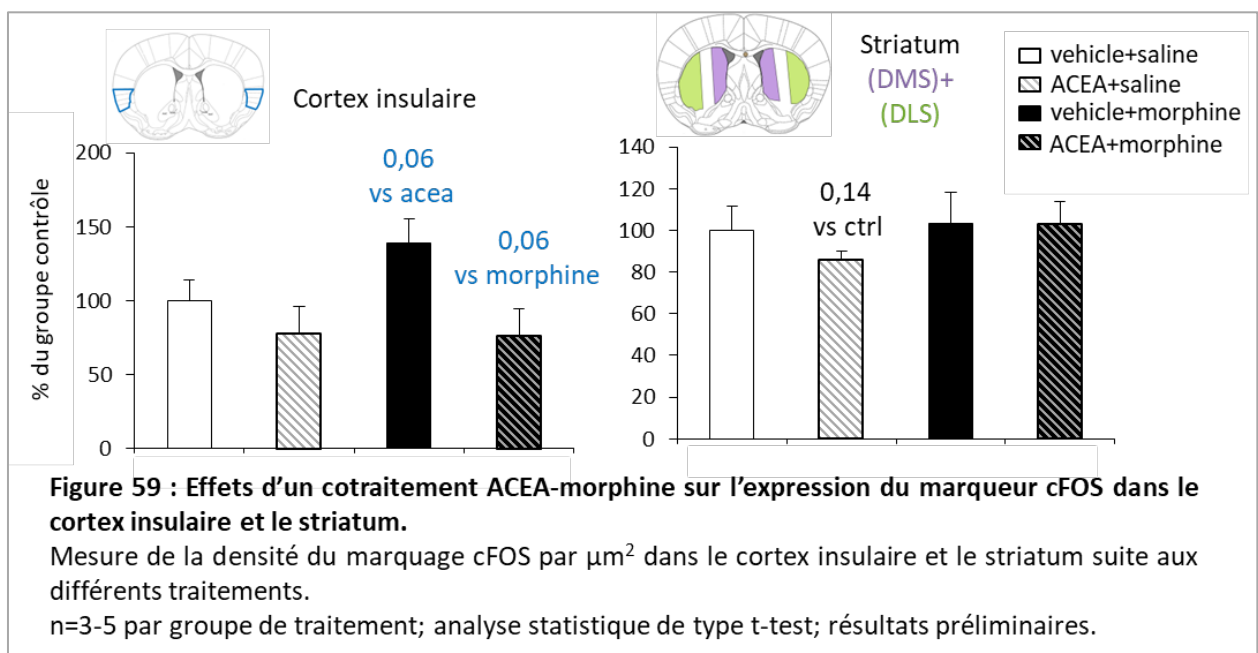
Afin de compléter l'étude des régulations de l'expression de CB1, nous avons quantifié l'expression des récepteurs CB1 dans le striatum des animaux traités. Pour réaliser ces quantifications, nous avons dissocié les parties médianes (DMS) et latérales (DLS) du striatum comme indiqué dans la figure 38. Le DMS étant plutôt impliqué dans les actions dirigées par un but particulier, et intervenant lors de la prise de décision face à un effet récompensant, le DLS intervient plutôt dans les actions habituelles, les choix routiniers et le contrôle des mouvements (Balleine and O'Doherty, 2010; Ito and Doya, 2015; Yin et al., 2004).



Les résultats de la première analyse par densitométrie faite par Débora Jacky montrent que suite au cotraitement ACEA+morphine, il y a une augmentation de la densité de récepteurs CB1 dans le DMS et la même tendance est retrouvée dans le DLS (Figure 58). Notons que cette augmentation de la densité de CB1 n'est observée que chez les animaux de ce groupe de traitement ce qui marque une régulation spécifique à cette combinaison pharmacologique. Cette augmentation de la densité CB1 chez les individus cotraités n'est pas corrélée avec une augmentation de l'Emax (Figure 55). Cette quantification sera complétée par de nouvelles mesures (travaux en cours, Caroline Correia).

H. Régulations de l'activité neuronale induite par le cotraitement ACEA+morphine (immunohistochimie cFOS)

Enfin, la dernière approche de cette étude vise à estimer les régulations de l'expression ou de l'activation cFOS dans différentes régions du cerveau suite à un tel cotraitement. Dans le striatum, aucune modification significative du marquage cFOS n'est observée après les différents traitements administrés (Figure 59). Par contre, dans le cortex insulaire, des régulations différentes selon les traitements sont observées. Aucun des résultats n'est significatif (n insuffisants), mais il y a une tendance importante à une augmentation du marquage cFOS chez les souris traitées chroniquement avec de la morphine, absente chez les souris ayant reçu le prétraitement ACEA suivi du traitement chronique à la morphine.



IV. Annexe I: Mise au point du protocole de CPP morphinique et de mesure de l'activité locomotrice après injection de morphine.

Les éléments décrits dans cette annexe ont permis de mettre au point le protocole de CPP à utiliser pour nos expériences de cotraitement.

Etant équipé de photocellules, le matériel de CPP permet également de mesurer la locomotion ou plutôt l'activité des animaux. Nous avons choisi de mesurer l'activité en utilisant ce système et en additionnant le nombre d'aller-retours dans un compartiment donné, les nombres de fois où le faisceau distal est interrompu et le nombre de fois où le faisceau proximal est interrompu. Cela donne une indication de l'activité locomotrice des animaux.

De plus, n'ayant jamais utilisé ce matériel dans nos locaux et avec nos animaux, nous avons aussi testé un protocole expérimental de CPP morphinique. Pour cela, nous avons testé deux doses de morphine (3 et 10mg/kg), les injections ont été réalisées en ip alors que classiquement ce test est réalisé suite à des injections en sc (Le Merrer et al., 2012). Nous avons utilisé des souris WT de fond génétique C57Bl6J et des souris KO Mu comme contrôles négatifs de l'expérience.

Les effets récompensants de la morphine sont évalués avec deux doses de morphine : 3mg/kg et 10mg/kg ip, selon le protocole décrit dans l'article de Le Merrer et collaborateurs, utilisant 5 jours de conditionnement, à raison d'un conditionnement de 20min le matin dans le compartiment apparié à la drogue et un conditionnement de 20min l'après-midi dans le compartiment apparié à la solution saline contrôle (Figure 34) (Le Merrer et al., 2012). Chez les WT, la morphine induit une CPP dose dépendante, alors que les KO Mu ne présentent pas de CPP avec la dose la plus élevée de morphine (Figure 60), comme attendu (Matthes et al., 1996).

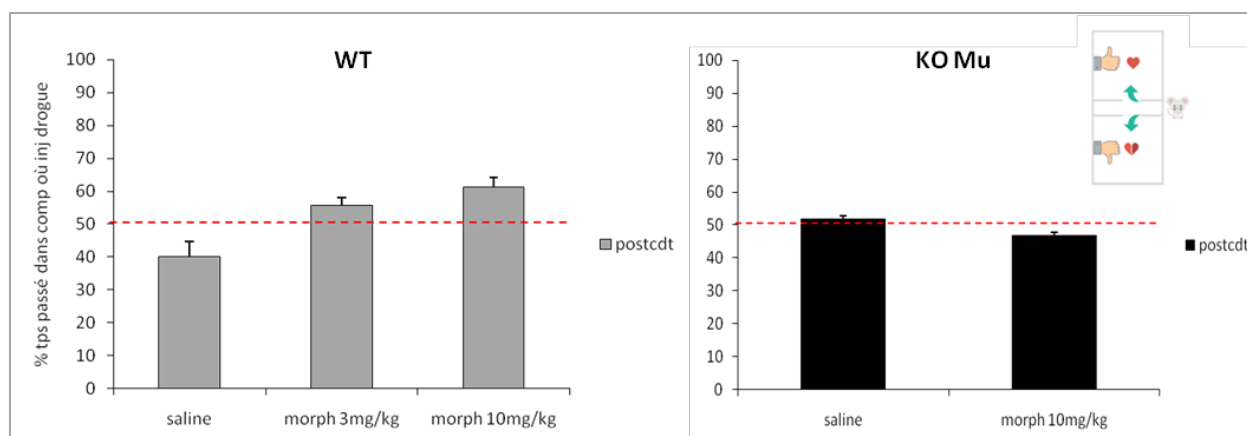


Figure 60 : Evaluation des effets récompensants de la morphine chez des souris C57Bl6J, et des souris KO Mu (50%C57Bl6;50%129SVPas).

Avant d'entreprendre une étude avec notre protocole de CPP, nous avons testé si la dose de morphine 3mg/kg permet d'obtenir un effet récompensant dans ce contexte et chez les souris C57Bl6J. Les souris KO Mu sont utilisées comme contrôles négatif de l'expérience. Les histogrammes représentent le temps passé dans le compartiment associé à la drogue, le jour du post-conditionnement (postcdt). Les mesures sont réalisées après une période de conditionnement de 5 jours à la morphine 3mg/kg, à la morphine 10mg/kg ou à la solution contrôle saline. Le trait rouge représente 50% du temps. n=4 par groupe de traitement/génotype

Ensuite, nous avons aussi évalué les effets locomoteurs de la morphine sur une période de 20 minutes après la 1ère administration de morphine (j1) lors du 1^{er} jour de conditionnement (Figure 61). Non seulement on observe un effet hyperlocomoteur dose-dépendant de la morphine, mais on voit également que cet effet intervient rapidement après l'injection, dès 10 minutes, et se prolonge encore jusqu'à la fin de notre mesure (20 min).

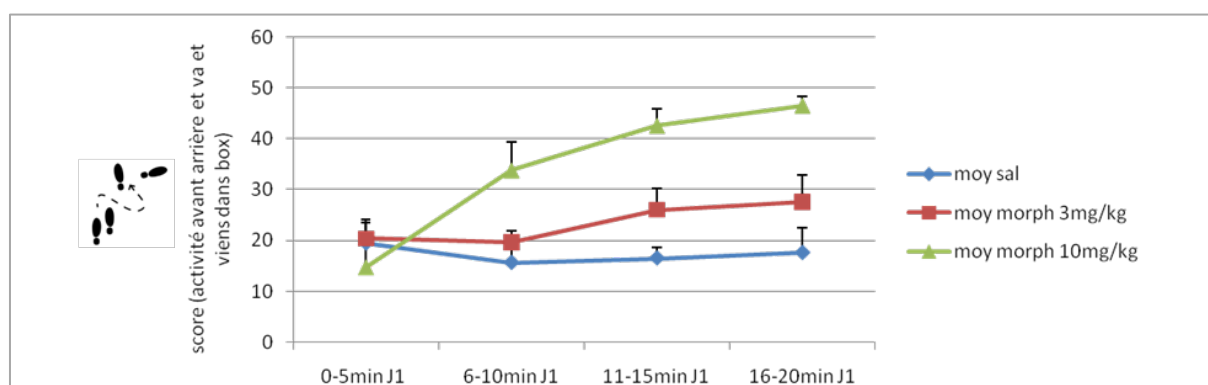


Figure 61 : Evaluation des effets aigus de la morphine au cours du temps chez des souris C57Bl6J.

Après injection aigue de morphine 3mg/kg ou 10mg/kg, la locomotion des souris est déterminée grâce à un score (somme des aller-retour, des mouvements à l'arrière et à l'avant du compartiment de CPP), par tranche de 5 minutes, sur une période de 20minutes post-injection. n=4 par groupe de traitement

Nous avons aussi étudié l'évolution de ces effets hyperlocomoteurs au cours du traitement morphinique, soit aux jours 1, 2 et 3 du conditionnement (Figure 62). Ces résultats ne montrent pas de sensibilisation aux effets hyperlocomoteurs de la morphine après plusieurs administrations.

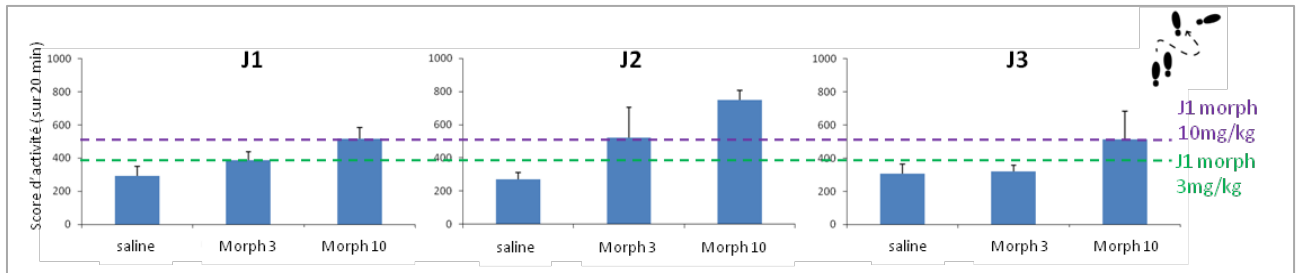


Figure 62 : Evaluation des effets de la morphine sur la locomotion chez des souris C57Bl6J.

Les effets hyperlocomoteurs de la morphine sont évalués pendant les 3 jours (J1, J2, J3) de conditionnement dans les boîtes de CPP. Un score de locomotion est déterminé après administration de morphine 3mg/kg, morphine 10mg/kg ou de solution contrôle saline. Le trait vert représente l'activité mesurée au J1 après administration de morphine 3mg/kg alors que le trait violet représente l'activité mesurée au J1 après administration de morphine 10mg/kg. n=4 par groupe de traitement

Enfin, chez les KO Mu, la morphine n'induit pas d'hyperlocomotion (Figure 63), comme attendu (Matthes et al., 1996).

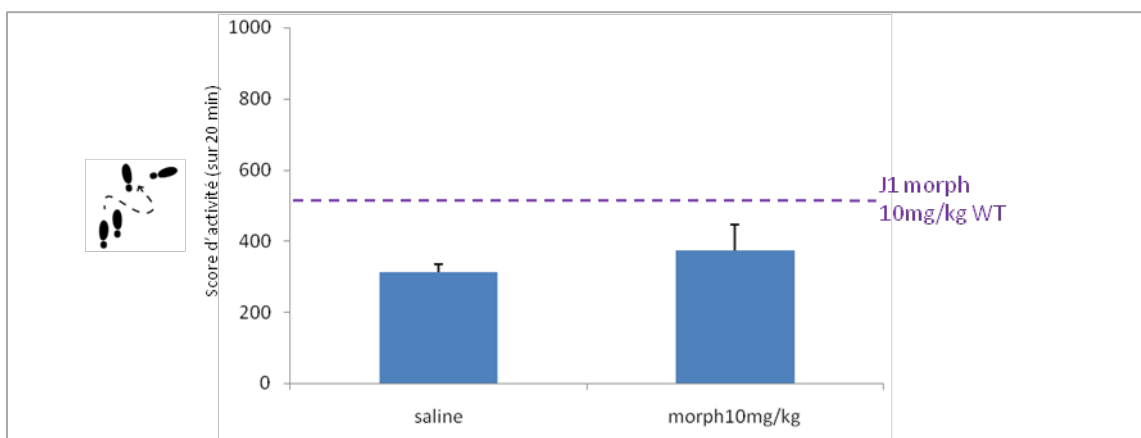


Figure 63 : Evaluation des effets de la morphine sur la locomotion chez des souris KO Mu.

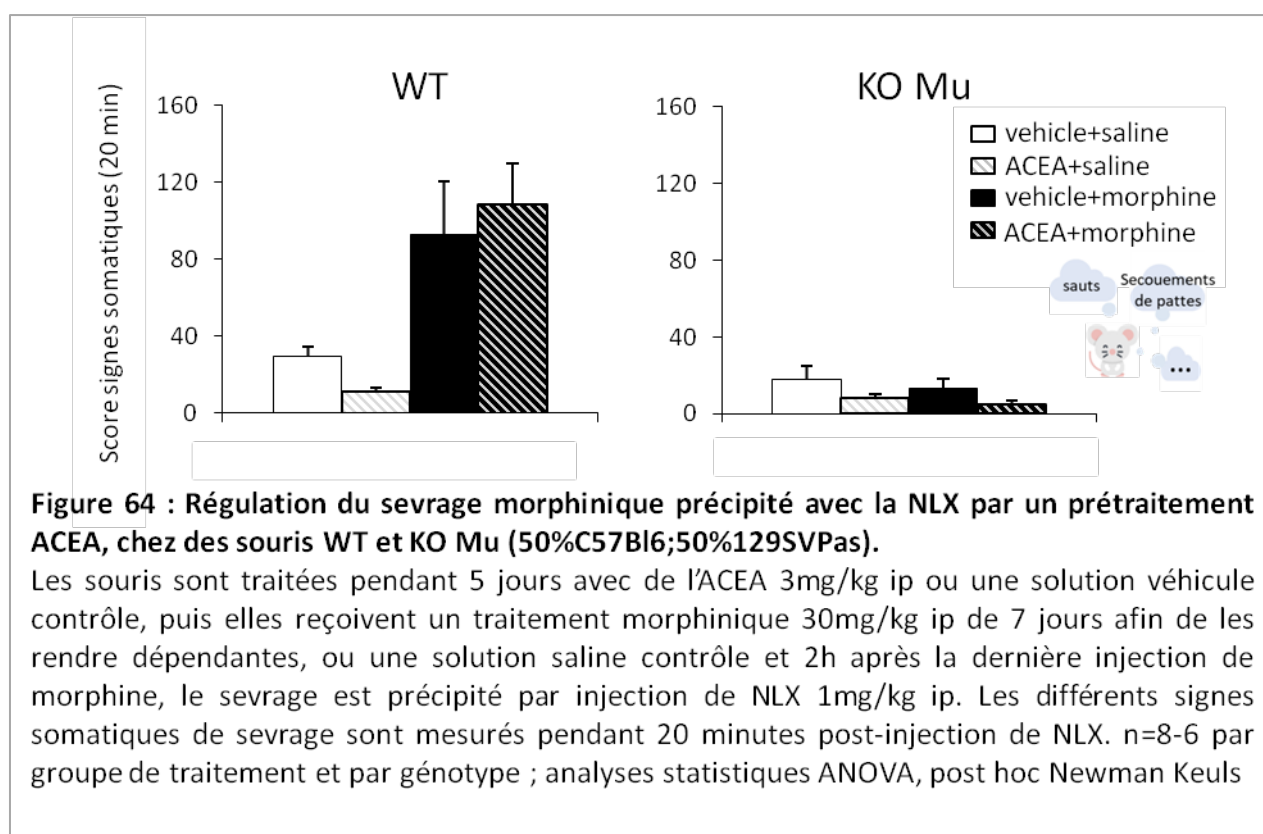
L'absence d'effet hyperlocomoteur de la morphine chez des souris KO Mu est vérifiée au jour 1, après mesure des scores d'activité pendant 20 minutes chez des souris ayant reçu une injection de morphine 10mg/kg ip et comparaison de ce score à celui obtenu par des souris KO Mu ayant reçu de la solution saline contrôle. n=4 par groupe de traitement

L'étude de la locomotion nous a montré qu'à 20 minutes, l'effet hyperlocomoteur n'a pas encore atteint son maximum et les analyses par tranche de temps montrent que la CPP est plus marquée dans la tranche 10-20 minutes du postconditionnement que la tranche 0-10min. Pour ces différentes raisons, nous nous sommes dit qu'il était judicieux d'augmenter les périodes d'exposition. A l'issue de cette expérience pilote, nous avons choisi de respecter des périodes d'exposition aux compartiments de 30 minutes plutôt que 20 minutes pour les différentes phases de préconditionnement, conditionnement et postconditionnement. Nous avons aussi décidé d'utiliser la dose de morphine 3mg/kg, qui donne une préférence intermédiaire, afin de pouvoir détecter des effets potentialisateurs ou opposés lors du prétraitement avec l'agoniste CB (voir [projet IV](#)).

V. Annexe II: Sevrage morphinique précipité à la naloxone après un prétraitement ACEA, chez des souris KO Mu et WT de fond génétique mixte (50% C57Bl6j; 50% 129svPas)

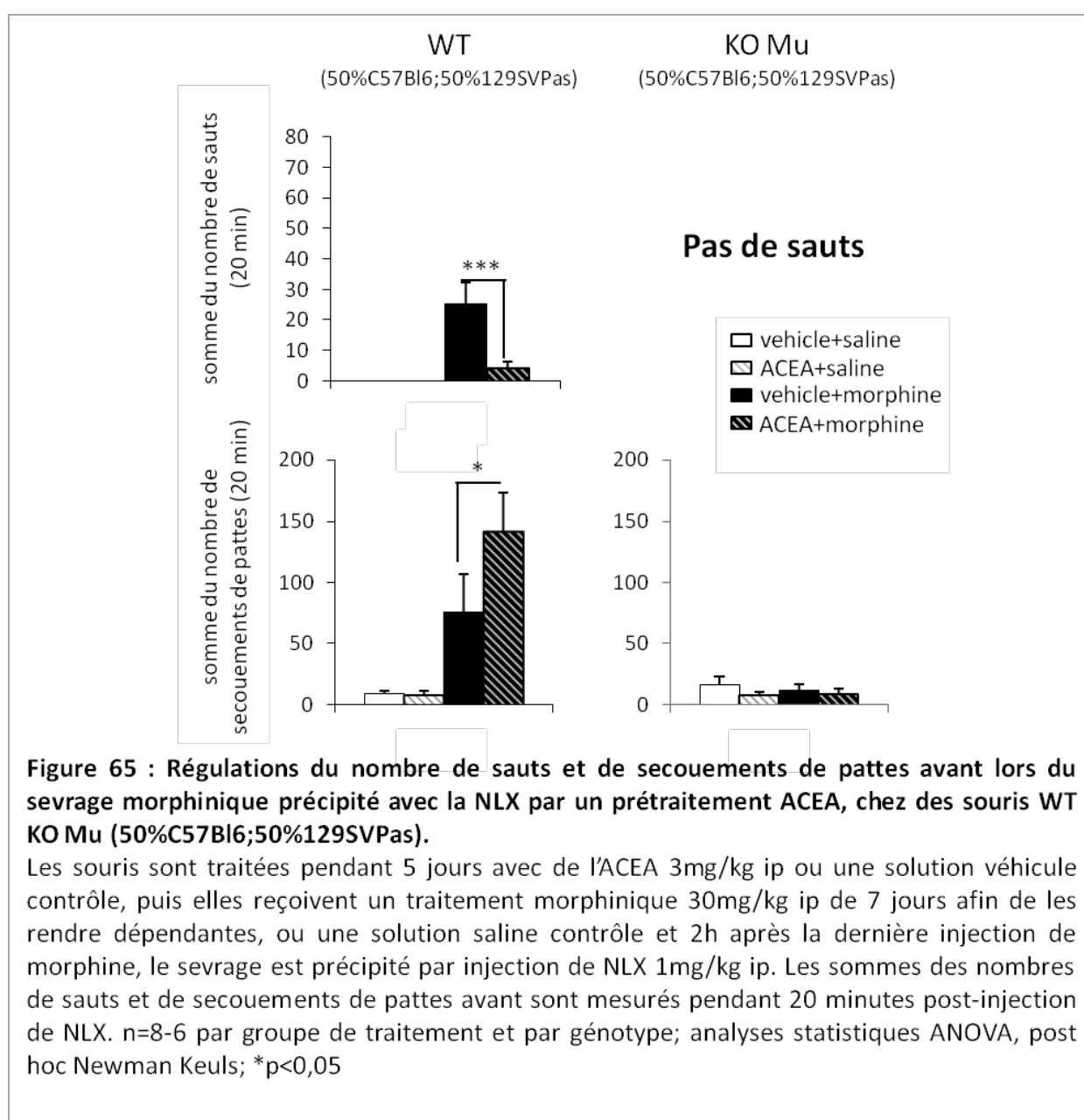
Afin de compléter notre étude, nous avons mesuré les signes de sevrage morphinique chez des souris KO Mu et leurs contrôles WT (fond mixte). L'étude chez les souris KO Mu est un contrôle négatif de l'expérience, sachant que ces souris ne présentent aucun signe de sevrage morphinique (Matthes et al., 1996). Cette étude est réalisée dans des souris de fond génétique mixte, comme l'étude de caractérisation de l'ACEA (projet III).

Comme attendu, les souris KO Mu ne présentent que très peu de signes somatiques de sevrage morphinique précipité à la naloxone (Figure 64). L'étude du nombre de sauts et du nombre de secouements de pattes confirme ces résultats avec une absence totale de saut et un score très faible de secouement de pattes avant (Figure 65).



Les souris WT de fond génétique correspondant à celui des KO Mu, montrent des signes de sevrage importants par rapport aux souris n'ayant pas reçu de morphine (Figure 64). Le prétraitement ACEA ne modifie pas ce score de sevrage morphinique. En étudiant les signes individuellement, à savoir le nombre de sauts et le nombre de secouements de pattes (Figure 65), on se rend compte que les souris ayant reçu uniquement de la morphine présentent des scores élevés pour ces 2 modalités, mais il est difficile de conclure concernant l'effet du prétraitement ACEA sur les nombres de sauts et de secouements de pattes induits par le sevrage morphinique. En effet, concernant le nombre de sauts,

on voit un effet protecteur du prétraitement ACEA qui diminue l'apparition de ce signe (nombre de sauts fortement atténué). Par contre, concernant le nombre de secouements de pattes, on observe le résultat opposé, c'est-à-dire un nombre de secouements de pattes plus élevé chez les souris ayant reçu le prétraitement ACEA avant le traitement morphinique. Ceci représente un mal être chez ces animaux, qui semble exacerbé. Le fait de sauter est une activité très énergivore et l'exacerbation des secouements de pattes est peut-être la conséquence du fait que les souris ne passent pas leur temps à sauter.



VI. Discussion

A. Effets protecteurs du cotraitement ACEA+morphine sur l'antinociception morphinique *Effets de l'ACEA*

Nous avons montré que l'ACEA ne possède aucune propriété analgésique dans nos conditions, c'est-à-dire à la dose de 3mg/kg ip, avec le test d'immersion de la queue à 47°C, 45 minutes après injection, chez des souris sauvages de fond mixte (cf [projet III](#)) ou de fond génétique C57Bl6J (résultats de cette étude, [projet IV](#)). Par contre, comme dans le [projet III](#), nous décelons une hypersensibilité induite par le traitement avec le test d'immersion de la queue. Cette hypersensibilité est bien marquée chez les souris traitées à l'ACEA, mais on voit qu'une tendance à l'hypersensibilité est également présente chez les souris contrôles traitées avec la solution véhicule composée d'éthanol 6%. Ces résultats confirment, dans un fond génétique différent, que l'EtOH à cette dose de 6% possède probablement des propriétés pro-algiques en aigu (45 minutes post-injection) ([Figure 40](#)). Nous ne sommes pas les seuls à nous questionner sur un éventuel effet d'une solution véhicule à base d'éthanol. En effet, Ghozland et collaborateurs avaient utilisé, dans leur étude des effets du rimonabant et du THC chez des souris génétiquement modifiées, des solutions de composés stocks contenant de l'éthanol (Ghozland et al., 2002). Ces auteurs mentionnent le fait que cette solution véhicule soit « un paramètre non contrôlé » qui puisse avoir des effets sur les récepteurs CB1 ou opioïdes et ainsi moduler les réponses obtenus.

Cependant, cette hypersensibilité mérite d'être considérée de façon relative. Il est important de mentionner que la latence avant retrait de la queue en BL mesurée chez nos souris avec le test d'immersion de la queue à 47°C est environ de 7 secondes, et ici l'hypersensibilité est d'environ de 10% (seuil de nociception fixé à 100% avant le traitement qui passe à 90% après 5 jours d'ACEA). Cela représente une diminution de la latence de retrait de la queue de 0,7 secondes. Dans l'article Roedel et al., 2017, nous avons vu que cette latence est diminuée de plus de 2 secondes après un traitement morphinique, ce qui représente à peu près une diminution de l'ordre de 28% des seuils nociceptifs en cas d'hyperalgie morphinique. Cette hypersensibilité observée ici est donc très faible par rapport à ce que l'on observe classiquement avec un traitement morphinique.

Les mesures à plus long terme, soit 20-22h après la dernière injection d'ACEA ou de véhicule, suggèrent un effet hypersensibilisant du traitement ACEA 3mg/kg ip, qui n'est pas retrouvé chez les souris traitées avec la solution contrôle ([Figure 41](#)). Dans le [projet III](#), chez des souris sauvages de fond mixte, il y avait également une tendance à l'hyperalgie ACEA 20-22h après la dernière injection, mais cette diminution des seuils de nociception n'était pas significative. Ces résultats méritent donc d'être confirmés sur d'autres cohortes, à la fois de fond génétique C57Bl6 et de fond mixte. Il serait également

préférable d'utiliser de l'ACEA sous un autre conditionnement, ou dilué dans un autre solvant que l'EtOH qui semble induire des variations des seuils de nociception.

Effets de la morphine

Dans le chapitre I et dans l'article Roeckel et al., 2017, nous avons montré qu'un traitement répété avec de la morphine 20mg/kg ou 60mg/kg induit une tolérance à l'analgésie morphinique ainsi qu'une hyperalgie. Les souris utilisées dans les études du Chapitre I étaient de fond mixte, alors que celles utilisées ici sont de fond génétique pur C57Bl6J. Nous avons traité les souris avec le même protocole de morphine (30mg/kg ip) pour étudier le sevrage et les effets nociceptifs chroniques de la morphine (précédemment décrit dans Del Boca et al., 2012). Un tel traitement répété induit bien une hyperalgie morphinique, et une diminution de l'antinociception induite par une injection de morphine 3mg/kg, soit une tolérance à l'analgésie (Figures 42, 43).

A titre de comparaison, dans l'article Roeckel et al., 2017, nous notons une diminution des seuils de nociception comprise entre 30 et 45% avec les traitements morphiniques 20 et 60 mg/kg respectivement et dans cette étude l'hyperalgie est d'environ 35% pour un traitement morphinique 30mg/kg ip, soit du même ordre de grandeur que ce que nous avons déjà mesuré dans notre précédente étude, chez des souris de fond génétique mixte.

Effets du prétraitement ACEA sur les effets nociceptifs de la morphine

Après un prétraitement avec de l'ACEA 3mg/kg ip de 5 jours, on observe une importante potentialisation de l'analgésie morphinique, avec une élévation des seuils de nociceptions de l'ordre de 300% chez les animaux prétraités à l'ACEA puis injectés avec de la morphine 3mg/kg ip, alors que les animaux qui reçoivent cette injection de morphine après un prétraitement avec de la solution contrôle montrent une élévation de leur seuils de nociception de l'ordre de 200% (Figure 42). La dose de morphine utilisée dans cette étude est une dose analgésique et non une dose subanalgésique comme testé préalablement dans plusieurs études (Reche et al., 1996; Smith et al., 2007). Cela montre qu'un prétraitement avec un agoniste CB1 permet de rendre efficaces d'un point de vue analgésique des doses décrites comme étant inefficaces lorsqu'elles sont injectées seules, mais aussi de potentialiser un effet analgésique déjà marqué (Smith et al., 2007). La majorité de ces études de potentialisation de l'analgésie morphinique est réalisée suite à l'administration de THC, soit un agoniste non spécifique des récepteurs CB1 (Cichewicz and Welch, 2003; Cichewicz et al., 1999; Finn et al., 2004; Maguire and France, 2014; Pugh et al., 1996; Reche et al., 1996; Smith et al., 2007). L'étude de Wilson et collaborateurs a confirmé une potentialisation de l'antinociception morphinique suite à la coadministration de HU-210 et de morphine dans la PAG (Wilson et al., 2008). Comme le THC, ce composé n'est pas spécifique du récepteur CB1 et leur protocole teste une voie d'administration très

particulière (intra-PAG). Deux études testent les effets d'une coadministration de WIN55-212 et de morphine sur l'antinociception (Maguire et al., 2013; Yesilyurt et al., 2003), et donc étudient également un effet de l'activation CB1-CB2 puisque le WIN55-212 possède une affinité 30 fois plus importante pour CB2 que pour CB1 (62.3 et 3.3 nM respectivement; Felder et al., 1995). De ce fait, un effet CB2 ne peut pas être exclu dans ces études. Par notre approche avec l'ACEA, qui possède une affinité 1400 fois plus importante pour CB1 que CB2 (Hillard et al., 1999), nous étudions les effets spécifiques de l'activation de CB1 sur la potentialisation de l'analgésie morphinique.

De plus, aucune de ces études préalables n'a mesuré l'effet d'un prétraitement prolongé avec un agoniste CB1. En effet, toutes ces études ont étudié les effets d'agonistes CB soit coadministrés soit injectés quelques minutes avant la morphine. Ici, nous évaluons les adaptations à plus long terme d'un prétraitement ACEA sur l'antinociception morphinique. Les résultats que nous avons obtenus, ajoutés à ceux déjà décrits dans la littérature, montrent que l'activation des récepteurs CB1 régule les réponses morphiniques, suggérant une collaboration entre les deux systèmes dans les réponses antinociceptives de la morphine. Ces interactions, dans un tel contexte sont protectrices contre la douleur, mais ne sont pas nécessaires à l'analgésie morphinique puisque les KO CB1 présentent une analgésie morphinique comparable aux WT (Ledent et al., 1999; Miller et al., 2011; Valverde et al., 2000).

Nous avons donc observé un effet potentialisateur du prétraitement ACEA de l'antinociception morphinique, mais la question que nous nous posions était de savoir si cette potentialisation était suffisante pour atténuer ou abolir la tolérance à l'analgésie morphinique et si elle pouvait masquer l'hyperalgie morphinique (Figures 42, 43). Dans notre étude, non seulement le prétraitement n'a pas d'influence sur le développement de la tolérance à l'analgésie morphinique, mais il ne régule pas non plus l'hyperalgie morphinique. Concernant la tolérance, plusieurs études avaient montré que la coadministration d'agonistes CB et de morphine permettait d'atténuer la tolérance (Cichewicz and Welch, 2003; Gerak and France, 2016; Smith et al., 2007). Par contre, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à l'hyperalgie morphinique. Ici, nous avons vu que le prétraitement ACEA n'est pas suffisant pour diminuer la tolérance et l'hyperalgie morphinique. Une hypothèse pour expliquer cette absence d'effet est le fait que le traitement ACEA ait été arrêté 6 jours avant les mesures d'hyperalgie ou de tolérance. Le fait de prolonger le traitement ACEA pendant le traitement morphinique aurait peut-être un effet sur ces phénomènes de tolérance et d'hyperalgie.

B. Le cotraitement ACEA+morphine et les effets récompensants de la morphine et le sevrage morphinique

Effets sur la récompense

La morphine, à la dose testée dans nos conditions, possède des propriétés récompensantes qui se traduisent par une préférence de place dans le test de CPP (Figure 45) et le prétraitement ACEA ne modifie pas ses propriétés. Pourtant, au vu des résultats exposés dans la littérature, nous nous attendions à observer une éventuelle potentialisation des effets récompensants de la morphine suite à un tel prétraitement. En effet, il a été montré qu'un prétraitement de 5 jours avec du WIN55-212,2 à des doses non récompensantes induit une sensibilisation aux effets récompensants de la morphine (Manzanedo et al., 2004). L'étude de Valverde et collaborateurs a également étudié les effets d'un prétraitement CB, à savoir le THC, sur les effets récompensants de la morphine (Valverde et al., 2001). Ils ont testé l'effet d'un tel prétraitement sur les effets récompensants de la morphine 0,5 et 2mg/kg. La dose la plus faible, soit celle de 0,5mg/kg de morphine n'induit pas d'effet récompensant et le prétraitement THC ne permet pas de sensibilisation de ces effets récompensants comme précédemment démontré par Manzanedo et son équipe. Par contre, la dose de morphine 2mg/kg induit une CPP, qui est abolie par le prétraitement THC (Valverde et al., 2001). Il est important de mentionner que cette étude de Valverde et collaborateurs a utilisé un protocole expérimental assez particulier avec un prétraitement THC de 3 semaines suivi de 3 jours d'interruption de traitement avant de commencer le conditionnement à la CPP morphinique et donc le début du traitement morphinique. Il y a donc une période de sevrage de 3 jours entre les deux traitements. Ce sevrage, qui peut être considéré comme un sevrage « doux » pourrait expliquer la perte des effets récompensants de la morphine 2mg/kg. En effet, le mal-être causé par l'arrêt du traitement THC est peut-être trop important pour permettre d'observer un effet récompensant de la morphine. D'autant plus que la dose de THC utilisée pour le prétraitement est très élevée : 10mg/kg et a été administrée pendant une assez longue période. Notons que l'utilisation d'un protocole d'administration de THC 10mg/kg ip sur une période de 6 jours, à hauteur de 1 ou 2 administrations par jour est suffisant pour induire une dépendance physique chez le souris (Hutcheson et al., 1998; Lichtman et al., 2001). Cela justifierait le fait que les animaux puissent présenter un sevrage après l'arrêt du traitement THC.

De plus, il a été montré que la CPP morphinique était fortement diminuée voir abolie suite à l'administration d'antagonistes CB1 comme le rimonabant ou l'AM251 (Mas-Nieto et al., 2001; Navarro et al., 2001; Zhang et al., 2016), et ce pendant l'acquisition de la CPP, c'est-à-dire le conditionnement ou l'apprentissage des effets récompensants, ou bien pendant l'expression de la CPP, c'est-à-dire au moment du postconditionnement (Karimi et al., 2013; Rezayof et al., 2011). De plus, la CPP morphinique peut être abolie chez les souris KO CB1 (Martin et al., 2000), mais ces résultats sont

controversés puisque l'étude de Rice et collaborateurs montrent une CPP morphinique conservée chez les KO CB1 (Rice et al., 2002).

Tous ces résultats de la littérature suggèrent l'intervention du récepteur CB1 dans les effets récompensants de la morphine, pourtant dans nos conditions expérimentales, le prétraitement ACEA 3mg/kg ne modifie pas la CPP morphinique. Ce résultat est plutôt positif quant aux potentielles applications cliniques puisque nous montrons un effet potentialisateur de l'analgésie morphinique tout en ne favorisant pas les effets récompensants de la morphine et donc le pouvoir addictogène de la morphine.

Effets sur la locomotion

Pendant la phase de conditionnement à la morphine, il est possible de mesurer l'activité locomotrice des animaux. La [figure 44](#) représente les mesures de locomotion des animaux pendant les phases de conditionnement à la morphine (ou à la solution saline pour les groupes contrôles) aux jours 1, 2 et 3. Nous voyons que la morphine 3mg/kg ip induit une hyperlocomotion et qu'une tolérance à cette hyperlocomotion se met très rapidement en place. De prime abord, cette tolérance peut paraître assez surprenante puisque classiquement la littérature décrit plutôt une sensibilisation à cet effet hyperlocomoteur de la morphine au cours du temps (Hakimian et al., 2017; pour revue Gavériaux-Ruff and Kieffer, 2002). La dose utilisée dans ces études est de 10mg/kg de morphine administrée en sc (Kaplan et al., 2011; Marrone et al., 2017; Vashchinkina et al., 2017). Une ancienne étude, menée par Babbini et Davis chez le rat, montrait que la morphine répétée induit, certes, une sensibilisation à l'hyperlocomotion à la dose de 10mg/kg, mais qu'aucune sensibilisation n'est démontrée aux doses de 2,5 ou 5mg/kg (Babbini and Davis, 1972). Cela suggère une sensibilisation à l'hyperlocomotion dose dépendante, présente uniquement aux doses relativement élevées. Dans nos conditions, la dose de morphine utilisée est bien en dessous de 10mg/kg, ce qui pourrait expliquer l'absence de sensibilisation. Par contre, le fait d'observer une tolérance à l'hyperlocomotion est un phénomène nouveau qui pourrait éventuellement être associé aux conditions de mesures, dans les boîtes de CPP. Cette hypothèse reste peu plausible puisque les souris des groupes contrôles (saline) ne présentent pas de diminution de la locomotion au cours du temps qui aurait pu être associée à une habitude au contexte.

De façon complémentaire, il a été suggéré que la sensibilisation à une drogue soit un signe de l'augmentation de l'efficacité d'un composé au fur et à mesure des administrations (Nakagawa et al., 2011). Cette hypothèse est donc en contradiction avec le développement de la tolérance qui au contraire indique une perte d'efficacité d'un composé au cours d'un traitement prolongé. Evidemment, on pourrait imaginer une tolérance dans certaines régions du SNC et une sensibilisation

dans d'autres régions qui seraient à l'origine de résultats à priori opposés, à savoir une tolérance à l'analgésie morphinique et une sensibilisation à l'hyperlocomotion morphinique chez les mêmes individus. Dans notre contexte, nous observons à la fois une tolérance à l'analgésie morphinique (morphine 30mg/kg 5 jours) et une tolérance à l'hyperlocomotion (morphine 3mg/kg 3 jours).

Le prétraitement ACEA ne modifie ni l'effet hyperlocomoteur de la morphine, ni le développement de la tolérance à cette hyperlocomotion. Les résultats de l'étude de Martin et collaborateurs sur les KO CB1 avaient montré que ces souris ne développaient pas de sensibilisation à l'effet hyperlocomoteur, mais une hyperlocomotion comparable au jour 1 (Martin et al., 2000). Ces résultats sont en accord avec les nôtres, à savoir pas d'implication du récepteur CB1 dans l'hyperlocomotion morphinique au jour 1, et puisque dans nos conditions il n'y a pas de sensibilisation à l'effet hyperlocomoteur de la morphine, nous ne nous attendions pas à voir de différences sur la locomotion entre le groupe prétraité ACEA et le groupe contrôle suite à l'administration répétée de morphine.

Effets sur le sevrage

Le protocole morphinique suivi dans cette étude induit l'apparition de signes somatiques de sevrage suite à l'administration de naloxone ([Figures 46 et 47](#)), comme cela avait déjà été décrit par le passé (Del Boca et al., 2012; Goeldner et al., 2011). Nous montrons aussi qu'un prétraitement ACEA permet de diminuer le score des signes somatiques de sevrage morphinique (diminution du score de près de 30% chez les animaux ACEA+morphine par rapport aux animaux véhicule+morphine). Cela se traduit également par une diminution du nombre de sauts (de l'ordre de 50%) et du nombre de secouements de pattes avant (de l'ordre de 50%).

Les interactions entre systèmes opioïdes et cannabinoïdes dans le sevrage avaient déjà été décrites par des études de dépendance aux opiacés avec un sevrage précipité avec un antagoniste CB, et inversement ; mais aussi grâce aux études impliquant des souris knockouts pour chacun des systèmes (cf [Chapitre II; Introduction; IV; C. Interactions dans la dépendance physique](#)). La seule étude à notre connaissance qui s'est intéressée à l'effet d'un prétraitement cannabinoïde est celle de Valverde. Dans leur étude, le THC est administré pendant 3 semaines (10mg/kg), puis une période de 3 jours de sevrage est observée avant de commencer le traitement morphinique (doses escaladantes, 10 à 100mg/kg, 2 fois par jour) (Valverde et al., 2001). Dans leurs conditions, ils observaient également une diminution des signes de sevrage morphinique suite au prétraitement THC. L'utilisation du THC, un agoniste mixte CB1-CB2 ne permettait pas de conclure clairement sur l'effet protecteur d'une activation préalable CB1 ou CB2 avant un traitement morphinique. Les résultats de notre étude permettent de préciser le rôle de l'activation préalable du récepteur CB1 dans ces effets protecteurs sur le sevrage morphinique. Evidemment, cela n'exclut pas un éventuel effet protecteur d'un

prétraitement CB2, que nous souhaitons tester dans le futur. En conclusion, notre étude confirme les données de Valverde, à savoir un effet protecteur, mais permet également de démontrer que cet effet est sans doute médié spécifiquement par le récepteur CB1.

Le fait que notre protocole expérimental mette en évidence une diminution des signes de sevrage et aucun effet sur la tolérance à l'analgésie morphinique montre que ces deux phénomènes (tolérance et dépendance) se développent de façons indépendantes, comme suggéré par l'étude de Christie et collaborateurs (Christie et al., 1987).

Chez les souris KO Mu, le traitement morphinique n'induit pas de modifications des signes de sevrage par rapport aux groupes contrôles saline ([Projet IV](#) ; [Annexe II](#) ; [Figures 64 et 65](#)) comme attendus (Matthes et al., 1996). Notons que chez les animaux KO Mu, tout comme chez les animaux WT B6 ou de fond mixte, il y a de légers signes de sevrage même chez les individus qui n'ont pas reçu de morphine. Ce sevrage est donc la conséquence de l'injection de naloxone. Lichtman et collaborateurs avaient déjà discuté cet effet de la naloxone dans leur article (Lichtman et al., 2001) et d'autres études récentes mettent en avant cet effet (Yuill et al., 2017). Ici, nous voyons que ces signes sont également présents chez les souris KO Mu, et cet effet de la naloxone pourrait être médié par un autre récepteur du système opioïde, comme le récepteur Kappa par exemple.

Chez les souris sauvages de fond mixte, nous observons également un sevrage morphinique mais dont le score des signes somatiques est légèrement inférieur à celui observé chez des souris C57Bl6 (environ 100 pour les 50/50 vs 110 pour les B6). Entre les deux fonds génétiques, on observe un fort déséquilibre dans le nombre de sauts avec près de 60 sauts en sevrage chez les B6 ([Figure 45](#)), alors que les souris à fond mixte atteignent difficilement les 30 sauts ([Figure 63](#)). Par contre le nombre de secouements de pattes avant est comparable chez les deux souches de souris. Ces éléments sont peut-être à l'origine du fait que nous n'observons pas de diminution du score des signes somatiques chez les WT de fond 50/50 avec le prétraitement cannabinoïde. En effet, le nombre de sauts est tout de même considérablement diminué chez les animaux prétraités ACEA puis ayant reçu de la morphine par rapport aux animaux qui n'ont eu que le traitement morphinique. Ces résultats sont donc similaires à ceux obtenus chez les souris C57Bl6J. Par contre, ce sont les résultats concernant le nombre de secouements de pattes qui sont opposés chez les souris de fond mixte par rapport aux souris B6 et qui font qu'il n'y a pas de différence de score de sevrage chez les souris 50/50 en sevrage morphinique avec ou sans prétraitement ACEA ([Figure 64](#)). Le fait que ces souris de fond mixte présentent des signes de sevrage moins importants est finalement peu surprenant. En effet, rappelons que ces souris possèdent un fond génétique composé à 50% de C57Bl6J et 50% de 129svPas. Or, les souris sur fond

génétique 129svPas ne présentent presque aucun signe de sevrage aux opiacés (Ayranci et al., 2015). Nous observons donc un sevrage intermédiaire à celui observé chez des souris 100% C57Bl6 et 100% 129svPas. .

Nous n'avons pas évalué si le prétraitement ACEA induisait des effets récompensants ni même s'il induit une dépendance physique. Ces expériences pourraient nous permettre de compléter notre caractérisation. Cependant, les résultats de la littérature indiquent qu'un traitement avec du THC (10 à 100mg/kg) pendant 5 jours poursuivi d'une injection de rimonabant induit un sevrage précipité (Lichtman et al., 2001). Cela indique qu'un tel prétraitement ACEA pourrait également induire une dépendance physique. Mais étant données les doses utilisées dans notre étude, bien inférieures à celles citées pour le THC, et également la sélectivité de l'ACEA pour CB1 par rapport au THC, les effets de l'ACEA sur la dépendance physique seraient à vérifier.

D'un point de vu clinique, les résultats que nous avons obtenus sont particulièrement intéressants car le sevrage est souvent la cause des rechutes de la consommation de drogues. En effet, lorsque le sevrage est trop fort, les signes d'inconforts sont très nombreux et bon nombre de patients rechutent, c'est-à-dire consomment à nouveau des opiacés, pour empêcher ces signes de survenir. L'utilisation d'agonistes CB1 permettrait peut-être de rendre le sevrage plus doux et plus supportable et ainsi augmenterait les chances de réussite d'arrêt de consommation d'opiacés dans le cadre de l'addiction ou de la dépendance physique. Ces résultats sont d'autant plus encourageants lorsqu'ils sont mis en lien avec nos autres résultats, à savoir une potentialisation des effets analgésiants de la morphine et une absence de sensibilisation aux effets récompensants de la morphine.

C. Régulations de l'expression des gènes de l'inflammation induites par le cotraitement ACEA+morphine

Nous avons étudié les régulations des principaux gènes des systèmes opioïde et cannabinoïde et des marqueurs de la neuroinflammation dans trois structures cérébrales : le striatum, l'hippocampe et le cortex, impliquées dans la mémoire, le sevrage, la récompense ou la douleur. Le protocole de dissection suivi pour isoler ces différentes structures ne nous permet pas des analyses fines des sous-régions mais donnent une indication sur les éventuelles régulations observées dans une région donnée. Les analyses par imagerie sur coupes de cerveaux permettent, quant à elles, de distinguer des régulations plus fines dans différentes sous régions du cortex ou du striatum. D'autres analyses seront réalisées prochainement (cf [suite du projet IV](#)).

Comme précédemment abordé dans le [chapitre I](#), les traitements chroniques à la morphine sont plutôt associés à des hausses de l'expression de marqueurs pro-inflammatoires. Dans le [chapitre I](#), nous nous intéressons essentiellement aux effets de la morphine dans le cadre de la douleur et pour ces raisons, la plupart des études citées dans cette partie se sont intéressées aux modifications dans la moelle épinière, site important de la gestion de la douleur. Dans la moelle épinière, la morphine chronique induit une augmentation de l'expression des gènes et de l'expression protéique des marqueurs microgliaux CD11b (Mattioli et al., 2014), et Iba1 (Wang et al., 2016b); et du marqueur d'activation astrocytaire GFAP (Mattioli et al., 2014; Wang et al., 2016, chez la souris et le rat respectivement). L'étude de Marie-Claire et son équipe, montre une augmentation de l'expression du gène GFAP dans le striatum de rats traités avec de la morphine pendant 5 jours avec des doses escaladantes et sacrifiés 16h après la dernière injection de morphine (Marie-Claire et al., 2004). Une autre étude, réalisée sur la PAG, montre que des souris tolérantes à la morphine présentent une augmentation de l'expression des gènes TLR4, Il1b et TNF (Eidson et al., 2017). Tous ces résultats sont donc en faveur d'un état pro-inflammatoire induit par la morphine chronique. Les résultats sont assez similaires lors d'un traitement chronique avec un agoniste CB, c'est-à-dire en faveur d'un état pro-inflammatoire également. Il a été montré que suite à un traitement prolongé avec du THC, il y a une augmentation du marquage GFAP dans l'hippocampe et le cortex chez les mâles et les femelles et une augmentation de Iba1 dans ces régions chez les mâles (Lopez-Rodriguez et al., 2014).

Dans notre étude, au vu d'un effectif réduit d'animaux, nous n'avons pas pu analyser les effets sur les femelles et les mâles séparément.

Dans le striatum, nous n'avons observé aucune régulation significative de l'expression des marqueurs de l'inflammation suite à nos différents traitements ([résultats non présentés](#)). Par contre que ce soit au niveau de l'hippocampe ou du cortex, nous avons noté une diminution de l'expression des marqueurs d'activation gliale comme GFAP, Iba1 ou CD11b suite au cotraitement ACEA+morphine. Cela indiquerait un effet anti-inflammatoire d'un tel cotraitement dans ces régions du cerveau et suggèrent donc un effet protecteur contre l'inflammation, décrite comme responsable des effets chroniques de la morphine (cf [chapitre I](#)). Il est important de mentionner que les deux marqueurs microgliaux CD11b et Iba1 ont été étudiés dans les différentes régions du cerveau, cependant ces deux marqueurs ne suivent pas forcément les mêmes régulations dans toutes les régions suite aux traitements. Par exemple, Iba 1 est spécifiquement downrégulé dans l'hippocampe ([Figure 50](#)) et CD11b dans le cortex ([Figure 51](#)). Ces régulations négatives de l'activation microgliale sont spécifiquement observées chez les animaux cotraités ACEA+morphine par rapport aux animaux des autres groupes de traitement. Cette diminution de l'activité microgliale pourrait directement être liée aux effets protecteurs du cotraitement sur le sevrage morphinique. En effet, en cas de sevrage morphinique précipité à la naloxone chez la souris, il a été montré qu'il y avait une augmentation de

l'expression des marqueurs gliaux GFAP et Iba1, ainsi qu'une augmentation des marqueurs pro-inflammatoires TLR4, et TNF α sur des échantillons de cerveau total (Pajohanfar et al., 2017). Dans notre contexte, les seuils d'activation microgliaux étant abaissés par le cotraitement pourraient exercer un effet protecteur contre le sevrage et donc en diminuer la sévérité.

En parallèle des régulations microgliales, nous notions également une diminution de l'expression du marqueur astrocytaire GFAP dans le cortex et l'hippocampe suite au cotraitement ACEA+morphine (Figures 49 et 50). Cette régulation négative pourrait également être à l'origine d'un effet protecteur lors du sevrage puisqu'une augmentation de l'expression de ce marqueur a également été mise en évidence dans le cadre du sevrage (Pajohanfar et al., 2017). Cependant, dans notre expérience cette régulation n'est pas spécifique au groupe de souris cotraitées puisqu'une downrégulation similaire est observée dans le groupe ayant reçu que le prétraitement ACEA dans le cortex (Figure 51), et on retrouve une telle downrégulation dans le groupe ayant reçu de la morphine dans l'hippocampe (Figure 50).

Enfin, dans cette expérience nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression des marqueurs pro-inflammatoires comme classiquement décrit dans la littérature suite à un traitement répété aux CB ou aux opiacés. Cette absence de neuroinflammation induite par la morphine est cohérente avec les résultats déjà obtenus dans nos études de douleur décrites dans le Chapitre I. Cela met en avant un élément très important, à savoir que cet état de neuroinflammation n'est pas si évident à mettre en évidence, et pour cause, dans deux contextes différents, sur des souris de fonds génétiques différents, élevées dans deux laboratoires de recherche différents, à deux ans d'intervalle, aucun état pro-inflammatoire n'a été mis en évidence, en termes de régulation de gènes.

Concernant les régulations d'Iba1, nous mentionnions précédemment l'étude de Lopez-rodriguez et collaborateurs qui montraient un effet sexe dépendant du THC sur l'activation microgliale. Il serait donc intéressant de distinguer, au sein de notre étude, les résultats obtenus chez les mâles et les femelles. Le problème est que l'effectif dont nous disposons actuellement pour les analyses par qPCR (n=4-5) ne nous permettent pas une telle analyse en fonction du sexe, comme déjà précisé précédemment.

D. Régulations de l'activité des récepteurs Mu et CB1, de l'expression de leurs transcrits et de l'expression du récepteur CB1 induites par le cotraitement ACEA+morphine

Le striatum dorsal est une structure cérébrale particulièrement impliquée dans la récompense et les actions habituelles. Au sein du striatum, il est possible de distinguer le striatum dorsomédian (DMS) du striatum dorsolatéral (DLS). Le DMS intervient dans les actions dirigées par un but particulier, il

intervient lors de la prise de décision face à un effet récompensant, alors que le DLS intervient plutôt dans les actions habituelles, les choix routiniers et le contrôle des mouvements (Balleine and O'Doherty, 2010; Ito and Doya, 2015; Yin et al., 2004). Le striatum ventral, dont fait partie le noyau accumbens, ou Nac, est impliqué dans la motivation.

Régulations du système opioïde

- *par la morphine*

Par hybridation in situ dans la Nac chez le rat, l'équipe de Georges avait montré une diminution de l'expression de Mu à 4 jours associée à une diminution de l'expression de pENK (Georges 1999). Ils notaient également une diminution de pENK dans le Cpu. Leur protocole d'administration morphinique reposait sur l'utilisation de pellets (2 pellets 75mg, rat), ce qui permet une libération prolongée par rapport à une injection ip. L'étude de Basheer et collaborateurs sur les effets de la morphine (doses escaladantes pellets 75mg, 5 jours, rat) montre, quant à elle, une diminution de l'expression de pENK par Northern Blot dans le Striatum de rat (Basheer and Tempel, 1993), ainsi qu'une augmentation de pENK dans l'hippocampe et une diminution de pENK dans le PFC. Avec notre protocole murin d'administration de morphine 30mg/kg pendant 7 jours, sacrifice 2h après la dernière injection, on n'observe aucune régulation significative des transcrits du système opioïde dans le cortex ou le striatum induit par la morphine chronique. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Castelli et collaborateurs chez le rat traités pendant 14 jours avec de la morphine aux concentrations escaladantes (10-100mg/kg/jour), et sacrifié 2h après la dernière injection de morphine, comme dans nos conditions (Castelli et al., 1997). Dans cette étude, les doses utilisées étaient très importantes et pourtant aucune régulation n'a été mise en évidence. Ils discutent dans leur article du nombre d'études de binding Mu après un traitement chronique à la morphine et de leurs résultats contradictoires.

Par contre, on note une diminution de l'expression des gènes Oprm1 (Mu) et pENK dans l'hippocampe (Figure 49). Cette diminution de l'expression des taux de transcrits pour le récepteur Mu ne semble pas être associée à une régulation fonctionnelle, puisque par liaison de GTPγS[35], aucune régulation du Emax dans l'hippocampe n'est observée (Figure 54). Afin de vérifier, si cette régulation de l'expression d'ARNm est corrélée avec une régulation de l'expression protéique du récepteur Mu, il faudrait compléter cette étude par immunomarquage Mu dans l'hippocampe d'animaux ainsi traités (cf [suite du projet IV](#)).

- *par le prétraitement ACEA*

Dans nos expériences, le prétraitement ACEA, suivi de 7 jours d'injections de solution saline contrôle, n'induit pas de régulation de l'expression protéique de Mu dans le striatum ou l'hippocampe (Emax), ni même de régulations des gènes du système opioïde dans le cortex, le striatum ou l'hippocampe. A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée aux régulations de l'expression des transcrits du système opioïdes ou bien de l'activité Mu chez des souris ayant eu un prétraitement CB suivi d'une période de sevrage. Cependant, un traitement répété au THC chez le rat induit des régulations du binding de Mu et de l'expression ARNm de pENK, dans le Cpu, 24h après la dernière injection de THC (Corchero et al., 1999). Ce protocole induit une augmentation du binding Mu par GTPγS, particulièrement après 7 jours de traitement et cette augmentation est corrélée avec une augmentation du taux de transcrits pENK. Ils mettent en avant une cinétique très particulière de ces effets qui atteignent un pic au jour 7 et qui ont fortement diminué au jour 14. Dans notre expérience, aux conditions expérimentales très différentes de celles précédemment décrites, le prétraitement ACEA n'induit aucune régulation de l'expression des gènes Oprm1 ou pENK dans le striatum, ni même une régulation du binding de Mu en GTPγS. La spécificité de l'ACEA pour CB1 par rapport au THC, le modèle murin plutôt que rat, les doses administrées, la durée du traitement et la durée du sevrage post-injection sont autant d'éléments divergents qui participent à expliquer des résultats différents dans notre étude par rapport à ceux préalablement publiés.

- *par le cotraitement ACEA+morphine*

Suite au cotraitement ACEA+morphine, les taux de transcrits MOR et pENK semblent normalisés dans l'hippocampe par rapport à ceux observés après un traitement morphinique ([Figure 49](#)). Cela indique que le cotraitement induirait une régulation de la signalisation Mu par rapport au traitement morphinique seul. Cette différence de régulations entre les groupes véhicule+morphine et ACEA+morphine pourrait peut-être participer à expliquer les différences de résultats comportementaux observées entre ces deux groupes. Au niveau protéique, nous n'avons pas observé de régulations significatives de Mu dans l'hippocampe ([Figures 54 et 56](#)). Dans le striatum, les études d'expression génique et protéique ne montrent pas non plus de régulations significatives.

Régulations du système cannabinoïde

- *par la morphine*

L'étude récente de Zhang et collaborateurs soulève un élément essentiel : ils montrent que selon le contexte de consommation de morphine les régulations d'expression du récepteur CB1 ne sont pas similaires (Zhang et al., 2016).

Leur étude est également menée sur des mâles C57Bl6J qui ont soit réalisé de la CPP morphinique, soit reçu passivement de la morphine (10mg/kg dans les 2 conditions). Alors que les souris ayant réalisé la CPP morphinique présentent une augmentation de l'expression de CB1 dans le Nac et l'hippocampe par western blot, les animaux injectés passivement ne présentent aucune expression de CB1 dans ces régions. Ces mesures par western blot sont réalisées 48h après la dernière injection de morphine, après un protocole d'injections morphinique de type CPP soit un jour sur 2. Ce protocole est donc très particulier et bien différent de celui que nous avons suivi. Pourtant, ils ne notent aucune régulation de CB1 après un tel traitement morphinique passif dans le Nac et le l'hippocampe, et de notre côté, nous ne voyons pas non plus de régulations de l'expression du récepteur CB1 (striatum, mesure par densitométrie de l'immunomarquage (Figure 58); binding, liaison GTPγS[35] (Figures 55 et 57)). Ces résultats sont accords avec ceux de qPCR qui ne montrent pas de régulation de l'expression des transcrits CB1 dans le striatum (Figure 48). Les résultats de qPCR de façon générale, ne nous permettent pas d'observer de régulations de l'expression des transcrits CB1, ou du système cannabinoïde suite à un tel traitement morphinique dans le cortex ou l'hippocampe (résultats non présentés). Par contre, nos études protéiques indiquent qu'il y a des régulations de l'expression de CB1 dans l'hippocampe mises en évidence par une diminution du Emax chez les souris ayant reçu le traitement morphinique (Figure 54). A ce jour, nous ne disposons pas d'informations complémentaires quant à l'expression protéique de CB1 dans cette région puisque nous n'avons pas encore réalisé les quantifications des immunomarquages CB1 dans cette région. Cette étude nous permettra de confirmer ces résultats.

- *par le prétraitement ACEA*

A notre connaissance, aucune étude ne s'est encore intéressée à l'effet d'un traitement ACEA sur la régulation de gènes ou bien à l'effet d'un prétraitement CB, suivi d'une période de sevrage sur l'expression des marqueurs du système cannabinoïde. Les résultats des études réalisées sur l'expression de gène et de protéine CB1 suite à un traitement chronique avec un agoniste CB sont très divergents. Citons comme exemple l'étude de Oviedo et collaborateurs qui montrent une diminution du nombre de récepteur CB1 (par diminution du Bmax) dans le striatum ou le système limbique (Oviedo et al., 1993), alors que deux autres études ne montrent pas de régulation de l'expression de ce récepteur après un traitement CB (Abood et al., 1993; Rodríguez de Fonseca et al., 1994). Les résultats concernant les régulations de gène CB1 sont toutes aussi divergentes. Alors que certains montrent une augmentation de l'expression des transcrits CB1 dans le cervelet après THC (Zhuang et al., 1998), d'autres ne voient aucune modification (Romero et al., 1997). Enfin, au sein d'un même groupe, les résultats d'études d'expression génique et protéique peuvent être divergents. En effet, le groupe de Romero montre une augmentation du nombre de récepteurs CB1 dans le cervelet après

traitement THC (Romero et al., 1995), et aucune régulation des transcrits CB1 (Romero et al., 1997). De façon comparable, une augmentation de l'ARNm CB1 dans le cervelet a été montrée suite à un traitement avec du CP55,940, associée à une diminution du nombre de protéines CB1 dans cette même région, suite au même traitement (Fan et al., 1996). L'explication mise en avant pour les auteurs est qu'il y ait une possible compensation de la baisse du nombre de récepteur par augmentation du taux de transcrits et ainsi l'organisme cherche à rééquilibrer l'expression protéique CB1.

Notre étude ne montre pas de régulation significative des gènes du système cannabinoïde dans le cortex, l'hippocampe ou le striatum 7 jours après l'arrêt d'un prétraitement ACEA ([résultats non présentés; Figure 48](#)). De façon comparable, un tel prétraitement ACEA ne semble pas affecter l'expression de CB1 dans le striatum comme démontré par immunomarquage ([Figure 58](#)), ou binding avec un E_{max} comparable aux autres groupes de traitement ([Figure 55](#)). Par contre, dans l'hippocampe, on observe une diminution de la E_{max} suite à l'arrêt du prétraitement ACEA ([Figure 54](#)), comparable à celle observée dans le groupe ayant reçu le traitement morphinique. Comme évoqué précédemment, nous ne disposons pas des quantifications de l'expression de CB1 par immunomarquage dans l'hippocampe et, à nouveau, les résultats de telles analyses permettraient de confirmer ces indications de régulations négatives de CB1 indiquées par binding. Les résultats de qPCR et de GTPγS[35] obtenus dans l'hippocampe mènent à des conclusions différentes quant aux régulations de CB1. Comme mentionné précédemment, d'autres équipes avaient également obtenu des résultats d'expression d'ARN et de protéine différents (Fan et al., 1996; Romero et al., 1995, 1997). Concernant les résultats de notre étude, ils mériteraient d'être confirmés et nécessitent d'être considérés avec précaution au vu du nombre d'individus parfois faible.

- *par le cotraitement ACEA+morphine*

Dans le striatum de ce groupe d'animaux, on note une diminution de l'expression des gènes de CB1 et DAGLA par rapport aux autres groupes de traitement ([Figure 48](#)). DAGLA est une enzyme de synthèse du 2-AG, un endocannabinoïde responsable de l'activation des récepteurs CB1 et CB2. Ici, on voit donc qu'un tel cotraitement permet de diminuer la signalisation CB1 dans le striatum. Lorsqu'on s'intéresse aux régulations protéiques de CB1 dans le striatum, on se rend compte que les régulations rencontrées sont opposées à celles observées au niveau de l'ARNm. En effet, les analyses par immunomarquage montrent une augmentation de l'expression de CB1 dans le striatum (DMS et DLS) suite au prétraitement ACEA+morphine ([Figure 58](#)). Comme proposé par Fan et collaborateurs, de tels résultats divergents peuvent être la conséquence de régulations. Les échantillons sont prélevés exactement au même moment d'un point de vue cinétique post-injection, pour les immunomarquages CB1 et les qPCR, et pourtant on sait que la transcription est une étape préliminaire à l'expression protéique. Ici,

nous observons une uprégulation de l'expression de CB1 suite au cotraitement, nous pourrions imaginer que la diminution de l'expression du gène CB1 soit la conséquence d'un rétrocontrôle négatif qui vise à contrer cette uprégulation protéique à plus long terme. Evidemment, ce n'est qu'une hypothèse et le fait que nous ne voyons pas de régulation du Emax et l'EC50 dans les échantillons de striatum de ce groupe d'animaux est assez surprenant (Figures 55 et 57). De façon générale, les résultats de GTPγS[35] sont très hétérogènes, on note une assez grande variabilité de résultats dans ces expériences alors qu'habituellement ce test est assez robuste. Il faudrait augmenter les effectifs pour pouvoir conclure.

Par qPCR, nous n'avons observé aucune régulation significative du système cannabinoïde dans le cortex suite au cotraitement (résultats non présentés). Et par qPCR et GTPγS[35], nous n'avons pas noté de régulation significative des gènes du système CB ou du récepteur CB1 dans l'hippocampe (résultats non présentés; Figures 54 et 56).

Associés aux résultats de cotraitement montrant une normalisation de l'expression des transcrits pENK et Mu dans l'hippocampe, ces résultats de cotraitement dans le striatum montrant des régulations de CB1 confirment qu'un tel cotraitement entraîne des régulations de l'expression des récepteurs/ gènes CB1 et Mu différentes de celles observées sans le prétraitement. Bien que n'étant pas conclusifs, ces résultats suggèrent qu'il y a une interaction moléculaire entre les deux systèmes, et par nos approches comportementales, nous avons montré que les interactions entre ces systèmes ne sont pas dénuées d'effet.

E. Régulations de l'activité neuronale cFOS induite par le cotraitement ACEA+morphine

Nos résultats d'immunomarquages cFOS ne nous permettent pas de conclure quant à une augmentation ou une diminution de l'activité neuronale suite aux différents traitements dans le cortex insulaire ou le striatum. Les causes de cette interprétation délicate des résultats sont diverses. Tout d'abord, nous ne disposons que de 5 animaux par groupe de traitement, tout comme pour les immunomarquages CB1. Seulement, contrairement aux immunomarquages CB1, les immunomarquages cFOS ont été beaucoup plus délicates à réaliser et nous avons été confrontés à des problèmes de reproductibilité du marquage d'une expérience à une autre. Le nombre d'échantillons insuffisant, associé aux problèmes techniques impactant la qualité de nos marquages font que les résultats sont difficilement exploitables. Aucune régulation n'est observée dans le striatum (Figure 59), aussi bien dans le striatum dorsolatéral que le dorsomédian.

Nous nous sommes intéressés au cortex insulaire qui est une structure directement impliquée dans la modulation des émotions négatives et plus particulièrement dans l'aversion (Slouzkey et al., 2013;

Stark et al., 2007). Cette région intervient dans les processus de recherche de consommation de substances addictives comme la nicotine (Abdolahi et al., 2010), ou l'addiction à la cocaïne (Di Pietro et al., 2008) ou encore aux opiacés (Li et al., 2013). Récemment, une étude a montré que le cortex insulaire est responsable de l'aversion induite par la naloxone dans le test de préférence de place conditionné (Wang et al., 2016a). En effet, suite à une lésion du cortex insulaire, les animaux ne présentent plus de CPA après administration de naloxone. L'activation de cette région participe donc aux effets aversifs des opiacés. Dans notre expérience, on note des régulations du marquage cFOS dans le cortex insulaire (Figure 59). Le traitement morphinique semble augmenter le marquage cFOS ce qui reflète une augmentation de l'activité neuronale dans cette région. Le prétraitement ACEA permet d'empêcher cette augmentation du marquage cFOS. Ainsi le prétraitement ACEA protègerait d'un effet excitateur causé par la morphine chronique et ce phénomène pourrait contribuer aux effets protecteurs de ce prétraitement ACEA, observés lors des tests comportementaux. Malheureusement, nous devons compléter cette analyse car les tendances observées ne sont pas significatives. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les effets aversifs de la morphine chronique soient associés à l'activation du cortex insulaire et que le prétraitement ACEA prévienne cette activation et donc les effets aversifs associés.

VII. Suite du projet IV (en cours)

Certaines parties de ce projet sont à compléter. A ce jour, la seconde analyse de densitométrie de CB1 dans le striatum est en cours de réalisation par Caroline Correia. Cette analyse est aussi complétée par l'étude de la densitométrie CB1 dans les cortex insulaire, somatosensoriel, et moteur.

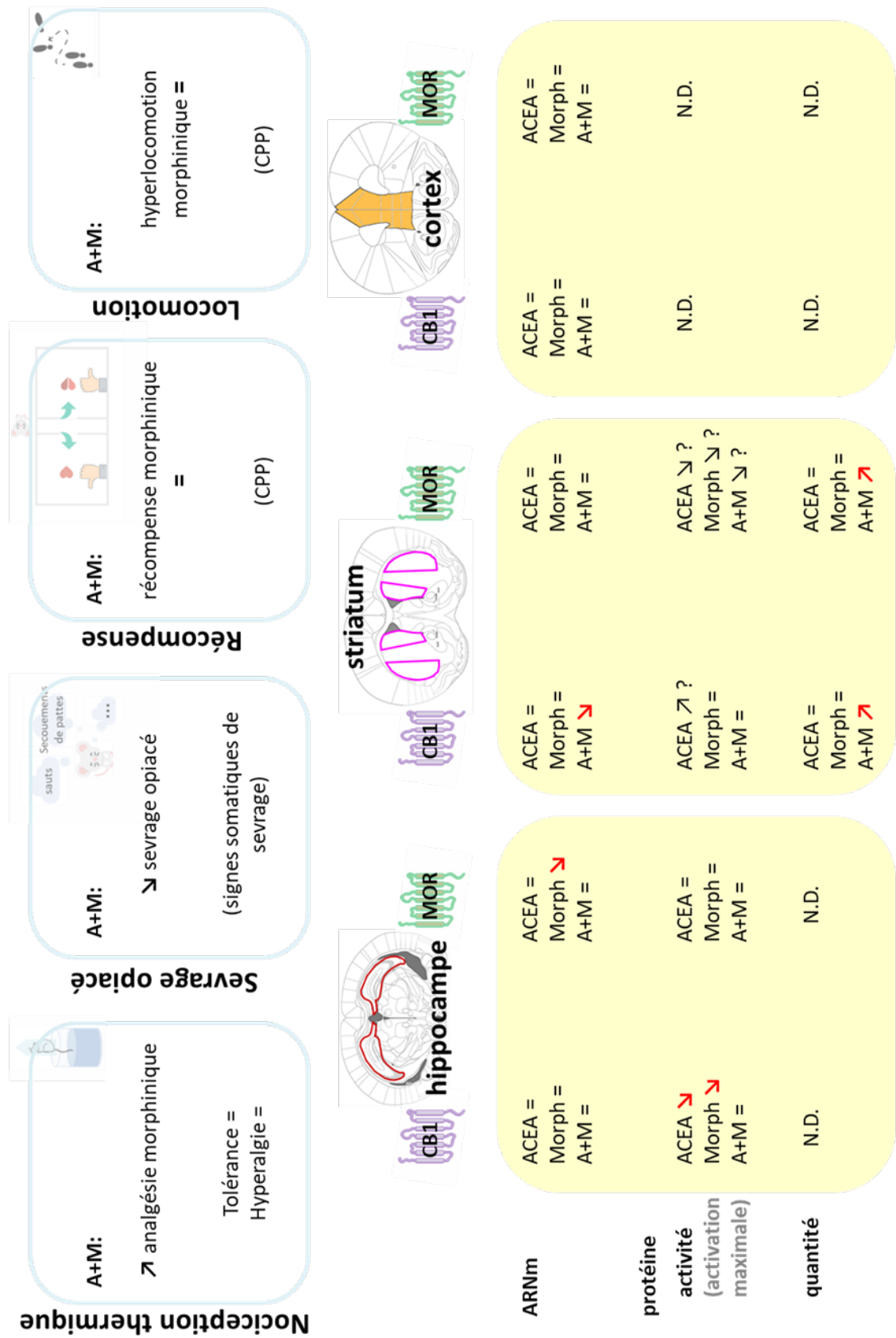
A moyen terme, il sera aussi possible d'étendre ces analyses à toutes les autres régions du cerveau, les immunomarquages étant déjà réalisés. Dans un premier temps, nous souhaitons élargir cette analyse à l'hippocampe et à différentes sous régions du cortex.

Nous disposons aussi de cerveaux congelés d'animaux dont les récepteurs opioïdes Mu et Delta sont fluorescents (souris MuCherryDOReGFP, fond mixte 50% C57Bl6j; 50% 129svPas; collaboration D Massotte INCI), et qui ont subi ces différents traitements pharmacologiques. Nous avons prévu d'étudier par immunofluorescence les régulations de l'expression de ces récepteurs induites par ces différentes conditions. Les résultats de ces marquages permettraient peut-être d'amener des éléments mécanistiques permettant de mieux comprendre les résultats comportementaux observés.

Aussi, les résultats d'imagerie CB1 ou cFOS décrits ici sont ceux obtenus 2h après la dernière injection de morphine (ou contrôle saline, selon le groupe). Nous disposons des cerveaux fixés et congelés d'animaux dont le sevrage a été précipité (perfusion intracardiaque réalisée soit juste après les mesures de sevrage, soit 30 minutes après l'injection de naloxone). Réaliser les mêmes marquages CB1 et cFOS après le sevrage permettrait d'évaluer s'il y a des modifications de ces marquages après sevrage, et des régulations de CB1 après sevrage par rapport aux résultats décrits ici, soit 2h après la dernière administration de morphine, mettraient en évidence l'intervention du récepteur CB1 lors du sevrage morphinique précipité à la naloxone.

A plus long terme, nous souhaiterions compléter cette étude avec un agoniste du récepteur CB2, le JWH-133, afin de comparer les résultats obtenus dans ces deux situations et peut-être distinguer des effets spécifiquement CB1 ou CB2 sur un traitement prolongé à la morphine.

SCHEMA BILAN



↘ diminution; ↗ augmentation; = pas de régulation; N.D. non déterminé

Schéma bilan: Interactions entre le récepteur opioïde Mu et le récepteur CB1 dans l'analgésie et le sevrage induits par la morphine chez des souris C57Bl6J.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

(projets III et IV)

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II (projets III et IV)

Les résultats du projet III permettent d'éclaircir un problème mis en évidence par de nombreuses équipes mais jamais clairement élucidé, à savoir une dualité des effets des agonistes cannabinoïdes en fonction du nombre d'expositions à ce type de composés. En effet, comme abordé préalablement, des effets ambigus du THC, par exemple, avaient déjà été observés et les équipes cherchaient à éviter ce problème par la mise en place de protocoles particuliers. En l'occurrence lors de la CPP, une primo-injection était réalisée avant de commencer le protocole de conditionnement au THC ou au WIN pour éviter une aversion. Cependant, cet aspect n'avait jamais été franchement étudié. Ici, nous avons montré que la première administration de l'agoniste cannabinoïde CB1 est particulièrement aversive et dépressogène. Les autres études préalablement réalisées utilisant des agonistes mixtes CB1-CB2, il était donc difficile de déterminer si cette aversion était CB1 ou CB2 dépendante. Grâce à notre étude, nous pouvons affirmer que cet effet est médié par l'activation du récepteur CB1. Nos travaux nous permettent même d'identifier un rôle du récepteur Mu dans cette aversion lors de la première administration d'ACEA, puisque les souris KO Mu ne présentent pas cette aversion. Cette approche nous permet donc de montrer que les récepteurs CB1 et Mu interagissent pour induire les effets aversifs d'agonistes CB1.

Ensuite, nous avons montré qu'après plusieurs injections d'agonistes CB, cette aversion disparaissait pour laisser place à une sensation plutôt positive, agréable associée dans la littérature à des effets récompensants. Toujours grâce à notre étude avec l'ACEA, nous pouvons dire que cet effet, suite à une exposition répétée, est également une conséquence de l'activation du récepteur CB1. Les approches de KO Mu et Delta et d'antagonisme Delta permettent d'exclure la participation des récepteurs opioïdes dans ces effets antidépressifs de l'ACEA.

Le sevrage est également un état d'aversion mis en évidence par l'apparition de nombreux signes physiques. Dans nos conditions, nous avons montré que suite à un traitement répété à l'ACEA, une injection de naloxone, un antagoniste des récepteurs opioïdes, permettait d'induire un sevrage. A noter que ce sevrage est d'intensité moindre qu'un sevrage morphinique classique. Ainsi les récepteurs opioïdes participent au sevrage CB1 et suggèrent une interaction des systèmes CB1-opioïdes dans ce phénomène. Afin d'identifier le rôle des récepteurs Mu et Delta dans le sevrage ACEA, nous avons traité des souris KO Mu et KO Delta avec ce même protocole ACEA et avons précipité un sevrage par administration de NLX. Chez ces animaux, les signes de sevrage observés sont comparables à ceux obtenus chez les souris sauvages ce qui montre que ces récepteurs ne participent pas à ce sevrage. La

naloxone étant un antagoniste, des récepteurs Mu, Delta et Kappa, cela suggère l'intervention du récepteur Kappa dans ce phénomène.

Enfin, cette étude nous permet aussi de montrer que l'administration d'agonistes CB1 n'est pas nécessairement associée à une analgésie, puisque dans nos conditions, nous n'avons pas mis en évidence d'effet antinociceptif. Ces résultats, associés à ceux de la littérature, suggèrent un effet anti-hyperalgésiant de ces composés, c'est-à-dire sur des animaux présentant une douleur induite grâce à un modèle de nociception (douleur neuropathique, ou inflammatoire par exemple).

Par cette étude, nous avons donc montré qu'un traitement avec de l'ACEA 3mg/kg pendant 5 jours n'induit pas de régulations particulières de la nociception. Pourtant, lorsqu'un tel prétraitement est suivi d'un traitement morphinique, il induit une potentialisation de l'analgésie. Une potentialisation de l'analgésie morphinique par l'administration préalable d'agoniste CB (quelques minutes) avant l'injection de morphine avait déjà été proposée, montrant des interactions à court terme entre les systèmes CB et Mu. Ici, nous montrons qu'un prétraitement CB1 (ACEA), dont la dernière administration remonte à 24h permet également d'induire une telle potentialisation de l'analgésie morphinique. Ces résultats, associés à ceux déjà publiés, montrent que les interactions entre récepteurs CB1 et Mu dans ce type de réponses se mettent en place rapidement et persistent (au minimum 24h), mais pas suffisamment longtemps pour empêcher le développement de la tolérance morphinique à 6 jours. Ces effets potentialisateurs de l'analgésie morphinique sont à distinguer des effets récompensants puisque le prétraitement ACEA ne modifie pas les propriétés récompensantes de la morphine. Par contre, nous avons montré qu'un tel prétraitement permet de diminuer les signes de sevrage morphinique et ce malgré le fait que le traitement ACEA ait été suspendu pendant les 7 jours de traitement morphinique. Cela indique d'une part que des interactions entre Mu et CB1 interviennent lors du sevrage morphinique et d'autre part que le système cannabinoïde est capable de réguler ce sevrage. Ces résultats permettent aussi de montrer que les phénomènes de tolérance et de dépendance ne sont pas nécessairement régulés de façon similaire puisque le prétraitement ACEA permet de diminuer le sevrage morphinique tout en étant inefficace sur la tolérance.

Ensemble, ces résultats comportementaux nous montrent qu'un prétraitement avec un agoniste CB1 permet de potentialiser les effets analgésiques de la morphine tout en diminuant les signes de sevrage morphinique responsables d'un grand nombre de rechute en clinique. Une telle association thérapeutique pourrait avoir des propriétés positives dans le cas du traitement de la douleur, tout comme dans la prise en charge de l'addiction aux opiacés. Les résultats de nos études de biologie moléculaire et d'expression ou d'activation de récepteurs Mu et CB1 nécessitent d'être complétées et finalisées. Elles indiquent tout de même des régulations des systèmes (opioïdes, CB, inflammatoires) qui pourraient être à l'origine de ces adaptations comportementales.

Notons que ces résultats de cotraitement potentiellement positifs d'un point de vue clinique, ne sont observés que chez des souris de fond génétique C57Bl6j et pas chez des souris de fond mixte C57Bl6J/129svPas. Cela est certainement la conséquence du phénotype particulier des souris 129svPas dans de nombreux tests comportementaux et particulièrement dans les réponses morphiniques.

Pour conclure, nous avons montré que malgré une littérature assez fournie sur les effets des agonistes CB, des éléments restent encore à éclaircir. Ici, nous avons mis en évidence différents aspects des traitements agonistes CB1. Une telle caractérisation des agonistes CB2 serait également à réaliser et les effets propres des agonistes CB1 et CB2 seraient à développer pour d'éventuelles applications cliniques. Toujours dans la même optique, il serait désormais intéressant de réaliser le même type de cotraitement CB-morphine mais cette fois-ci en utilisant un agoniste CB2, comme le JWH-133. La littérature CB2 est bien moins développée que celle de CB1. Pourtant, CB2 est un médiateur de l'inflammation et de la neuroinflammation et nous avons vu dans le chapitre I que la neuroinflammation joue un rôle très important dans la régulation de la douleur chronique.

CONCLUSION GENERALE DE LA THESE

CONCLUSION GENERALE DE LA THESE

Lors de mon parcours de thèse un peu atypique, j'ai abordé différents aspects allant de la nociception, aux comportements addictifs, en passant par la régulation des émotions ou certaines adaptations moléculaires.

Le fil conducteur de ces différentes études est le récepteur Mu. Les conclusions de chaque partie sont plus détaillées, mais je tenais ici à faire un bref résumé de l'ensemble de mon travail.

Nous avons montré que ce récepteur est impliqué dans l'hyperalgie morphinique, mais aussi dans l'hyperalgie induite par son métabolite, la M3G. Nous avons également montré que les réponses de ce récepteur pouvaient être modulées par un prétraitement avec un agoniste CB1 et de ce fait, nous avons démontré que les récepteurs Mu et CB1 interagissent. Aussi, ce récepteur Mu est impliqué dans les réponses à des agonistes autres qu'opioïdes. En effet, par notre étude avec l'ACEA, nous avons montré que le récepteur Mu est impliqué dans les effets aversifs de la primoinjection d'ACEA.

L'étude de ce récepteur Mu nous a également permis de nous rendre compte qu'il est indispensable de s'intéresser aux effets anxio-dépressifs lorsqu'on étudie les effets addictogènes d'un composé. De plus, les divergences de résultats obtenus dans différents fond génétiques murins soulèvent aussi la nécessité d'élargir ces études sur différentes souches, voir même différentes espèces animales afin de cerner au mieux les effets de ces composés.

Enfin, la neuroinflammation semble être le lien commun entre toutes ces pathologies neurologiques. Bien qu'une neuroinflammation ait été identifiée chez les modèles précliniques traités chroniquement avec de la morphine, dans nos conditions, nous n'avons jamais réussi à les mettre en évidence. Pourtant, comme mentionné précédemment, nos études ont été réalisées dans deux instituts différents, sur des animaux différents et en suivant des protocoles de traitement morphinique différents. Cela ne remet en aucun cas le fait qu'une neuroinflammation intervienne lors d'un traitement morphinique, mais démontre que cette inflammation n'est pas nécessairement évidente à mettre en évidence.

Par ces études, le rôle du récepteur Mu est un peu mieux identifié dans ces pathologies. De plus, nous avons montré que l'utilisation d'un cotraitement ACEA-morphine pouvait soulager de façon plus efficace la douleur tout en diminuant le sevrage. Cela représente une éventuelle piste pour le développement de nouvelles thérapies. En complément, nous avons montré que l'activation microgliale jouait un rôle important dans les effets pronociceptifs de la morphine chronique. Les microglies pourraient également jouer un rôle important dans les effets addictifs et aversifs observés

après l'utilisation chronique de morphine. De plus, notre étude sur le rôle du récepteur Mu sur les microglies par l'approche du cKO Mu permettra peut-être également de développer de nouvelles pistes thérapeutiques contre la douleur et l'addiction. Enfin, nous avons vu que la littérature sur les interactions mécanistiques entre les systèmes opioïde et cannabinoïde est pauvre, et nos perspectives d'études d'interactions entre les récepteurs CB1 et opioïdes grâce à l'utilisation de souris transgéniques fluorescentes pour les récepteurs Mu et Delta permettrait d'apporter des informations expliquant les résultats comportementaux observés dans le cadre de tels cotraitements.

Bibliographie :

- Abdel-Zaher, A.O., Mostafa, M.G., Farghaly, H.S.M., Hamdy, M.M., and Abdel-Hady, R.H. (2013). Role of oxidative stress and inducible nitric oxide synthase in morphine-induced tolerance and dependence in mice. Effect of alpha-lipoic acid. *Behav. Brain Res.* **247**, 17–26.
- Abdolahi, A., Acosta, G., Breslin, F.J., Hemby, S.E., and Lynch, W.J. (2010). Incubation of nicotine seeking is associated with enhanced protein kinase A-regulated signaling of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa in the insular cortex. *Eur. J. Neurosci.* **31**, 733–741.
- Abood, M.E., Sauss, C., Fan, F., Tilton, C.L., and Martin, B.R. (1993). Development of behavioral tolerance to delta 9-THC without alteration of cannabinoid receptor binding or mRNA levels in whole brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **46**, 575–579.
- Agudo, J., Martin, M., Roca, C., Molas, M., Bura, A.S., Zimmer, A., Bosch, F., and Maldonado, R. (2010). Deficiency of CB2 cannabinoid receptor in mice improves insulin sensitivity but increases food intake and obesity with age. *Diabetologia* **53**, 2629–2640.
- Ahmadi, J. (2003). Methadone versus buprenorphine maintenance for the treatment of heroin-dependent outpatients. *J. Subst. Abuse Treat.* **24**, 217–220.
- Ahmadi, J., and Ahmadi, K. (2003). Controlled trial of maintenance treatment of intravenous buprenorphine dependence. *Ir. J. Med. Sci.* **172**, 171–173.
- Ahmed, S.H., Walker, J.R., and Koob, G.F. (2000). Persistent increase in the motivation to take heroin in rats with a history of drug escalation. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **22**, 413–421.
- Ahn, K., McKinney, M.K., and Cravatt, B.F. (2008). Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem. Rev.* **108**, 1687–1707.
- Akil, H., Owens, C., Gutstein, H., Taylor, L., Curran, E., and Watson, S. (1998). Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend.* **51**, 127–140.
- Andersen, J.M., Ripel, A., Boix, F., Normann, P.T., and Mørland, J. (2009). Increased locomotor activity induced by heroin in mice: pharmacokinetic demonstration of heroin acting as a prodrug for the mediator 6-monoacetylmorphine in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **331**, 153–161.
- Andres-Mach, M., Haratym-Maj, A., Zagaja, M., Rola, R., Maj, M., Chrościńska-Krawczyk, M., and Luszczki, J.J. (2015). ACEA (a highly selective cannabinoid CB1 receptor agonist) stimulates hippocampal neurogenesis in mice treated with antiepileptic drugs. *Brain Res.* **1624**, 86–94.
- Ashton, J.C., and Glass, M. (2007). The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr. Neuropharmacol.* **5**, 73–80.
- Ayranci, G., Befort, K., Lalanne, L., Kieffer, B.L., and Lutz, P.-E. (2015). Dissociation of heroin-induced emotional dysfunction from psychomotor activation and physical dependence among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl.)* **232**, 1957–1971.
- Babbini, M., and Davis, W.M. (1972). Time-dose relationships for locomotor activity effects of morphine after acute or repeated treatment. *Br. J. Pharmacol.* **46**, 213–224.

- Baker, D., Pryce, G., Croxford, J.L., Brown, P., Pertwee, R.G., Huffman, J.W., and Layward, L. (2000). Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* *404*, 84–87.
- Balleine, B.W., and O'Doherty, J.P. (2010). Human and rodent homologues in action control: corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *35*, 48–69.
- Barrio, P., Reynolds, J., García-Altés, A., Gual, A., and Anderson, P. (2017). Social costs of illegal drugs, alcohol and tobacco in the European Union: A systematic review. *Drug Alcohol Rev.* *36*, 578–588.
- Basheer, R., and Tempel, A. (1993). Morphine-induced reciprocal alterations in G α s and opioid peptide mRNA levels in discrete brain regions. *J. Neurosci. Res.* *36*, 551–557.
- Bass, C.E., Griffin, G., Grier, M., Mahadevan, A., Razdan, R.K., and Martin, B.R. (2002). SR-141716A-induced stimulation of locomotor activity. A structure-activity relationship study. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *74*, 31–40.
- Basu, S., and Dittel, B.N. (2011). Unraveling the complexities of cannabinoid receptor 2 (CB2) immune regulation in health and disease. *Immunol. Res.* *51*, 26–38.
- Beardsley, P.M., Balster, R.L., and Harris, L.S. (1986). Dependence on tetrahydrocannabinol in rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *239*, 311–319.
- Befort, K. (2015). Interactions of the opioid and cannabinoid systems in reward: Insights from knockout studies. *Front. Pharmacol.* *6*, 6.
- Berger, A.C., and Whistler, J.L. (2011). Morphine-induced mu opioid receptor trafficking enhances reward yet prevents compulsive drug use. *EMBO Mol. Med.* *3*, 385–397.
- Berrendero, F., and Maldonado, R. (2002). Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl.)* *163*, 111–117.
- Berrendero, F., Mendizábal, V., Murtra, P., Kieffer, B.L., and Maldonado, R. (2003). Cannabinoid receptor and WIN 55 212-2-stimulated [35S]-GTPgammaS binding in the brain of mu-, delta- and kappa-opioid receptor knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* *18*, 2197–2202.
- Berton, O., McClung, C.A., Dileone, R.J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S.J., Graham, D., Tsankova, N.M., Bolanos, C.A., Rios, M., et al. (2006). Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* *311*, 864–868.
- Besson, A., Privat, A.M., Eschaliér, A., and Fialip, J. (1996). Effects of morphine, naloxone and their interaction in the learned-helplessness paradigm in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* *123*, 71–78.
- Braida, D., Pozzi, M., Cavallini, R., and Sala, M. (2001). Conditioned place preference induced by the cannabinoid agonist CP 55,940: interaction with the opioid system. *Neuroscience* *104*, 923–926.
- Braida, D., Iosué, S., Pegorini, S., and Sala, M. (2004a). Delta9-tetrahydrocannabinol-induced conditioned place preference and intracerebroventricular self-administration in rats. *Eur. J. Pharmacol.* *506*, 63–69.
- Braida, D., Iosué, S., Pegorini, S., and Sala, M. (2004b). Delta9-tetrahydrocannabinol-induced conditioned place preference and intracerebroventricular self-administration in rats. *Eur. J. Pharmacol.* *506*, 63–69.

- Broom, D.C., Jutkiewicz, E.M., Folk, J.E., Traynor, J.R., Rice, K.C., and Woods, J.H. (2002). Nonpeptidic delta-opioid receptor agonists reduce immobility in the forced swim assay in rats. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 26, 744–755.
- Bruchas, M.R., Land, B.B., and Chavkin, C. (2010). The dynorphin/kappa opioid system as a modulator of stress-induced and pro-addictive behaviors. *Brain Res.* 1314, 44–55.
- Bruijnzeel, A.W. (2009). kappa-Opioid receptor signaling and brain reward function. *Brain Res. Rev.* 62, 127–146.
- Burgos, E., Pascual, D., Martín, M.I., and Goicoechea, C. (2010). Antinociceptive effect of the cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, in the orofacial and temporomandibular formalin tests. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 14, 40–48.
- Cabral, G.A., and Griffin-Thomas, L. (2009). Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev. Mol. Med.* 11, e3.
- Camí, J., and Farré, M. (2003). Drug addiction. *N. Engl. J. Med.* 349, 975–986.
- Caplehorn, J.R., Dalton, M.S., Haldar, F., Petrenas, A.M., and Nisbet, J.G. (1996). Methadone maintenance and addicts' risk of fatal heroin overdose. *Subst. Use Misuse* 31, 177–196.
- Carlezon, W.A., Béguin, C., DiNieri, J.A., Baumann, M.H., Richards, M.R., Todtenkopf, M.S., Rothman, R.B., Ma, Z., Lee, D.Y.-W., and Cohen, B.M. (2006). Depressive-like effects of the kappa-opioid receptor agonist salvinorin A on behavior and neurochemistry in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 440–447.
- Carlini, E.A., Santos, M., Claussen, U., Bieniek, D., and Korte, F. (1970). Structure activity relationship of four tetrahydrocannabinols and the pharmacological activity of five semi-purified extracts of *Cannabis sativa*. *Psychopharmacologia* 18, 82–93.
- Castañé, A., Robledo, P., Matifas, A., Kieffer, B.L., and Maldonado, R. (2003). Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in double mu and delta opioid receptor knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 17, 155–159.
- Castañé, A., Maldonado, R., and Valverde, O. (2004). Role of different brain structures in the behavioural expression of WIN 55,212-2 withdrawal in mice. *Br. J. Pharmacol.* 142, 1309–1317.
- Castelli, M.P., Melis, M., Mameli, M., Fadda, P., Diaz, G., and Gessa, G.L. (1997). Chronic morphine and naltrexone fail to modify mu-opioid receptor mRNA levels in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 45, 149–153.
- Célérier, E., Ahdepil, T., Wikander, H., Berrendero, F., Nyberg, F., and Maldonado, R. (2006). Influence of the anabolic-androgenic steroid nandrolone on cannabinoid dependence. *Neuropharmacology* 50, 788–806.
- Cerdá, M., Sagdeo, A., and Galea, S. (2008). Comorbid forms of psychopathology: key patterns and future research directions. *Epidemiol. Rev.* 30, 155–177.
- Chaouloff, F., Dubreucq, S., Bellocchio, L., and Marsicano, G. (2011). Endocannabinoids and motor behavior: CB1 receptors also control running activity. *Physiol. Bethesda Md* 26, 76–77; author reply 78.

- Chaperon, F., Soubrié, P., Puech, A.J., and Thiébot, M.H. (1998). Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 135, 324–332.
- Charbogne, P., Kieffer, B.L., and Befort, K. (2014). 15 years of genetic approaches in vivo for addiction research: Opioid receptor and peptide gene knockout in mouse models of drug abuse. *Neuropharmacology* 76 Pt B, 204–217.
- Chavoustie, S., Frost, M., Snyder, O., Owen, J., Darwish, M., Dammerman, R., and Sanjurjo, V. (2017). Buprenorphine implants in medical treatment of opioid addiction. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 10, 799–807.
- Cheer, J.F., Kendall, D.A., and Marsden, C.A. (2000). Cannabinoid receptors and reward in the rat: a conditioned place preference study. *Psychopharmacology (Berl.)* 151, 25–30.
- Chefer, V.I., and Shippenberg, T.S. (2009). Augmentation of morphine-induced sensitization but reduction in morphine tolerance and reward in delta-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 34, 887–898.
- Cheng, H.-Y.M., Laviolette, S.R., van der Kooy, D., and Penninger, J.M. (2004). DREAM ablation selectively alters THC place aversion and analgesia but leaves intact the motivational and analgesic effects of morphine. *Eur. J. Neurosci.* 19, 3033–3041.
- Chou, R., Turner, J.A., Devine, E.B., Hansen, R.N., Sullivan, S.D., Blazina, I., Dana, T., Bougatsos, C., and Deyo, R.A. (2015). The effectiveness and risks of long-term opioid therapy for chronic pain: a systematic review for a National Institutes of Health Pathways to Prevention Workshop. *Ann. Intern. Med.* 162, 276–286.
- Christensen, R., Kristensen, P.K., Bartels, E.M., Bliddal, H., and Astrup, A. (2007). Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet Lond. Engl.* 370, 1706–1713.
- Christie, M.J., Williams, J.T., and North, R.A. (1987). Cellular mechanisms of opioid tolerance: studies in single brain neurons. *Mol. Pharmacol.* 32, 633–638.
- Chuang, T.K., Killam, K.F., Chuang, L.F., Kung, H.F., Sheng, W.S., Chao, C.C., Yu, L., and Chuang, R.Y. (1995). Mu Opioid Receptor Gene Expression in Immune Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 922–930.
- Cichewicz, D.L., and Welch, S.P. (2003). Modulation of oral morphine antinociceptive tolerance and naloxone-precipitated withdrawal signs by oral Delta 9-tetrahydrocannabinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 812–817.
- Cichewicz, D.L., Martin, Z.L., Smith, F.L., and Welch, S.P. (1999). Enhancement mu opioid antinociception by oral delta9-tetrahydrocannabinol: dose-response analysis and receptor identification. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 859–867.
- Clarke, S.F.J., Dargan, P.I., and Jones, A.L. (2005). Naloxone in opioid poisoning: walking the tightrope. *Emerg. Med. J. EMJ* 22, 612–616.
- Colombo, G., Agabio, R., Diaz, G., Lobina, C., Reali, R., and Gessa, G.L. (1998). Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci.* 63, PL113-117.

Contet, C., Kieffer, B.L., and Befort, K. (2004). Mu opioid receptor: a gateway to drug addiction. *Curr. Opin. Neurobiol.* *14*, 370–378.

Corchero, J., Romero, J., Berrendero, F., Fernandez-Ruiz, J., Ramos, J.A., Fuentes, J.A., and Manzanares, J. (1999). Time-dependent differences of repeated administration with Delta9-tetrahydrocannabinol in proenkephalin and cannabinoid receptor gene expression and G-protein activation by mu-opioid and CB1-cannabinoid receptors in the caudate-putamen. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *67*, 148–157.

Correa, F., Mestre, L., Docagne, F., and Guaza, C. (2005). Activation of cannabinoid CB2 receptor negatively regulates IL-12p40 production in murine macrophages: role of IL-10 and ERK1/2 kinase signaling. *Br. J. Pharmacol.* *145*, 441–448.

Cota, D., Marsicano, G., Tschöp, M., Grübler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thöne-Reineke, C., Ortmann, S., et al. (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J. Clin. Invest.* *112*, 423–431.

Cox, M.L., and Welch, S.P. (2004). The antinociceptive effect of Delta9-tetrahydrocannabinol in the arthritic rat. *Eur. J. Pharmacol.* *493*, 65–74.

Crain, S.M., and Shen, K.F. (1995). Ultra-low concentrations of naloxone selectively antagonize excitatory effects of morphine on sensory neurons, thereby increasing its antinociceptive potency and attenuating tolerance/dependence during chronic cotreatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 10540–10544.

Cravatt, B.F., Saghatelian, A., Hawkins, E.G., Clement, A.B., Bracey, M.H., and Lichtman, A.H. (2004). Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 10821–10826.

Curioni, C., and André, C. (2006). Rimonabant for overweight or obesity. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD006162.

Curto-Reyes, V., Llames, S., Hidalgo, A., Menéndez, L., and Baamonde, A. (2010). Spinal and peripheral analgesic effects of the CB2 cannabinoid receptor agonist AM1241 in two models of bone cancer-induced pain. *Br. J. Pharmacol.* *160*, 561–573.

Degenhardt, L., Whiteford, H.A., Ferrari, A.J., Baxter, A.J., Charlson, F.J., Hall, W.D., Freedman, G., Burstein, R., Johns, N., Engell, R.E., et al. (2013). Global burden of disease attributable to illicit drug use and dependence: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Lond. Engl.* *382*, 1564–1574.

Del Boca, C., Lutz, P.E., Le Merrer, J., Koebel, P., and Kieffer, B.L. (2012). Cholecystokinin knock-down in the basolateral amygdala has anxiolytic and antidepressant-like effects in mice. *Neuroscience* *218*, 185–195.

Deroche-Gamonet, V., Belin, D., and Piazza, P.V. (2004). Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* *305*, 1014–1017.

Devine, D.P., and Wise, R.A. (1994). Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *14*, 1978–1984.

Dhopeswarkar, A., and Mackie, K. (2014). CB2 Cannabinoid receptors as a therapeutic target-what does the future hold? *Mol. Pharmacol.* *86*, 430–437.

Di Pietro, N.C., Mashhoon, Y., Heaney, C., Yager, L.M., and Kantak, K.M. (2008). Role of dopamine D1 receptors in the prefrontal dorsal agranular insular cortex in mediating cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 200, 81–91.

Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., and Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10819–10824.

Doğrul, A., Gül, H., Yildiz, O., Bilgin, F., and Güzeldemir, M.E. (2004). Cannabinoids blocks tactile allodynia in diabetic mice without attenuation of its antinociceptive effect. *Neurosci. Lett.* 368, 82–86.

Dore, R., Valenza, M., Wang, X., Rice, K.C., Sabino, V., and Cottone, P. (2014). The inverse agonist of CB1 receptor SR141716 blocks compulsive eating of palatable food. *Addict. Biol.* 19, 849–861.

Dravolina, O.A., Belozertseva, I.V., Sukhotina, I.A., and Bespalov, A.Y. (1999). Morphine tolerance and dependence in mice with history of repeated exposures to NMDA receptor channel blockers. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63, 613–619.

Dubreucq, S., Koehl, M., Abrous, D.N., Marsicano, G., and Chaouloff, F. (2010). CB1 receptor deficiency decreases wheel-running activity: consequences on emotional behaviours and hippocampal neurogenesis. *Exp. Neurol.* 224, 106–113.

Ebner, S.R., Roitman, M.F., Potter, D.N., Rachlin, A.B., and Chartoff, E.H. (2010). Depressive-like effects of the kappa opioid receptor agonist salvinorin A are associated with decreased phasic dopamine release in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl.)* 210, 241–252.

Eidson, L.N., Inoue, K., Young, L.J., Tansey, M.G., and Murphy, A.Z. (2017). Toll-like Receptor 4 Mediates Morphine-Induced Neuroinflammation and Tolerance via Soluble Tumor Necrosis Factor Signaling. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 42, 661–670.

Elmes, S.J.R., Winyard, L.A., Medhurst, S.J., Clayton, N.M., Wilson, A.W., Kendall, D.A., and Chapman, V. (2005). Activation of CB1 and CB2 receptors attenuates the induction and maintenance of inflammatory pain in the rat. *Pain* 118, 327–335.

Faget, L., Erbs, E., Le Merrer, J., Scherrer, G., Matifas, A., Benturquia, N., Noble, F., Decossas, M., Koch, M., Kessler, P., et al. (2012). In vivo visualization of delta opioid receptors upon physiological activation uncovers a distinct internalization profile. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 7301–7310.

Fan, F., Tao, Q., Abood, M., and Martin, B.R. (1996). Cannabinoid receptor down-regulation without alteration of the inhibitory effect of CP 55,940 on adenylyl cyclase in the cerebellum of CP 55,940-tolerant mice. *Brain Res.* 706, 13–20.

Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A.L., and Mitchell, R.L. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol. Pharmacol.* 48, 443–450.

Ferrari, A., Coccia, C.P.R., Bertolini, A., and Sternieri, E. (2004). Methadone--metabolism, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol. Res.* 50, 551–559.

Filliol, D., Ghozland, S., Chluba, J., Martin, M., Matthes, H.W., Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Dierich, A., LeMeur, M., et al. (2000). Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat. Genet.* 25, 195–200.

- Finn, D.P., Beckett, S.R.G., Roe, C.H., Madjd, A., Fone, K.C.F., Kendall, D.A., Marsden, C.A., and Chapman, V. (2004). Effects of coadministration of cannabinoids and morphine on nociceptive behaviour, brain monoamines and HPA axis activity in a rat model of persistent pain. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 678–686.
- da Fonseca Pacheco, D., Klein, A., de Castro Perez, A., da Fonseca Pacheco, C.M., de Francischi, J.N., and Duarte, I.D.G. (2008). The mu-opioid receptor agonist morphine, but not agonists at delta- or kappa-opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* *154*, 1143–1149.
- Fudala, P.J., Bridge, T.P., Herbert, S., Williford, W.O., Chiang, C.N., Jones, K., Collins, J., Raisch, D., Casadonte, P., Goldsmith, R.J., et al. (2003). Office-based treatment of opiate addiction with a sublingual-tablet formulation of buprenorphine and naloxone. *N. Engl. J. Med.* *349*, 949–958.
- Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., and Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* *232*, 54–61.
- de Gandarias, J.M., Echevarría, E., Acebes, I., Abecia, L.C., Casis, O., and Casis, L. (1999). Effects of fluoxetine administration on mu-opioid receptor immunostaining in the rat forebrain. *Brain Res.* *817*, 236–240.
- Garzón, J., de la Torre-Madrid, E., Rodríguez-Muñoz, M., Vicente-Sánchez, A., and Sánchez-Blázquez, P. (2009). Gz mediates the long-lasting desensitization of brain CB1 receptors and is essential for cross-tolerance with morphine. *Mol. Pain* *5*, 11.
- Gavériaux-Ruff, C., and Kieffer, B.L. (2002). Opioid receptor genes inactivated in mice: the highlights. *Neuropeptides* *36*, 62–71.
- Georges, F., Stinus, L., Bloch, B., and Le Moine, C. (1999). Chronic morphine exposure and spontaneous withdrawal are associated with modifications of dopamine receptor and neuropeptide gene expression in the rat striatum. *Eur. J. Neurosci.* *11*, 481–490.
- Gerak, L.R., and France, C.P. (2016). Combined Treatment with Morphine and Δ9-Tetrahydrocannabinol in Rhesus Monkeys: Antinociceptive Tolerance and Withdrawal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *357*, 357–366.
- Ghavimi, H., Darvishi, S., and Ghanbarzadeh, S. (2018). Attenuation of Morphine-Induced Tolerance and Dependence by Pretreatment with Cerebrolysin in Male rats. *Drug Res.* *68*, 33–37.
- Ghozland, S., Matthes, H.W.D., Simonin, F., Filliol, D., Kieffer, B.L., and Maldonado, R. (2002). Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 1146–1154.
- Gilpin, N.W., Herman, M.A., and Roberto, M. (2015). The central amygdala as an integrative hub for anxiety and alcohol use disorders. *Biol. Psychiatry* *77*, 859–869.
- Giron, L., and Befort, K. (2016). Cannabinoids: Drug or Medication? In *Cannabinoids in Health and Disease*, R. Meccariello, and R. Chianese, eds. (InTech), p.
- Goeldner, C., Lutz, P.-E., Darcq, E., Halter, T., Clesse, D., Ouagazzal, A.-M., and Kieffer, B.L. (2011). Impaired emotional-like behavior and serotonergic function during protracted abstinence from chronic morphine. *Biol. Psychiatry* *69*, 236–244.

- Gong, J.-P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q.-R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A., and Uhl, G.R. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* 1071, 10–23.
- González, P., Cabello, P., Germany, A., Norris, B., and Contreras, E. (1997). Decrease of tolerance to, and physical dependence on morphine by, glutamate receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 332, 257–262.
- Grant, B.F., Stinson, F.S., and Harford, T.C. (2001). Age at onset of alcohol use and DSM-IV alcohol abuse and dependence: a 12-year follow-up. *J. Subst. Abuse* 13, 493–504.
- Grant, B.F., Hasin, D.S., Chou, S.P., Stinson, F.S., and Dawson, D.A. (2004). Nicotine dependence and psychiatric disorders in the United States: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Arch. Gen. Psychiatry* 61, 1107–1115.
- Guindon, J., Desroches, J., Dani, M., and Beaulieu, P. (2007). Pre-emptive antinociceptive effects of a synthetic cannabinoid in a model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 568, 173–176.
- Habibi-Asl, B., Vaez, H., Najafi, M., Bidaghi, A., and Ghanbarzadeh, S. (2014). Attenuation of morphine-induced dependence and tolerance by ceftriaxone and amitriptyline in mice. *Acta Anaesthesiol. Taiwanica Off. J. Taiwan Soc. Anesthesiol.* 52, 163–168.
- Hakimian, J., Minasyan, A., Zhe-Ying, L., Loureiro, M., Beltrand, A., Johnston, C., Vorperian, A., Romaneschi, N., Atallah, W., Gomez-Pinilla, F., et al. (2017). Specific behavioral and cellular adaptations induced by chronic morphine are reduced by dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids. *PloS One* 12, e0175090.
- Hall, F.S., Sora, I., and Uhl, G.R. (2001). Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 154, 43–49.
- Hall, F.S., Goeb, M., Li, X.-F., Sora, I., and Uhl, G.R. (2004). mu-Opioid receptor knockout mice display reduced cocaine conditioned place preference but enhanced sensitization of cocaine-induced locomotion. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 121, 123–130.
- Hanus, L., Breuer, A., Tchilibon, S., Shiloah, S., Goldenberg, D., Horowitz, M., Pertwee, R.G., Ross, R.A., Mechoulam, R., and Fride, E. (1999). HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14228–14233.
- Hasin, D.S., and Beseler, C.L. (2009). Dimensionality of lifetime alcohol abuse, dependence and binge drinking. *Drug Alcohol Depend.* 101, 53–61.
- Hillard, C.J., Manna, S., Greenberg, M.J., DiCamelli, R., Ross, R.A., Stevenson, L.A., Murphy, V., Pertwee, R.G., and Campbell, W.B. (1999). Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 1427–1433.
- Hirose, N., Murakawa, K., Takada, K., Oi, Y., Suzuki, T., Nagase, H., Cools, A.R., and Koshikawa, N. (2005). Interactions among mu- and delta-opioid receptors, especially putative delta1- and delta2-opioid receptors, promote dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroscience* 135, 213–225.
- Hohmann, A.G., and Herkenham, M. (1999). Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. *Neuroscience* 90, 923–931.

- Hohmann, A.G., Briley, E.M., and Herkenham, M. (1999). Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord. *Brain Res.* 822, 17–25.
- Houser, S.J., Eads, M., Embrey, J.P., and Welch, S.P. (2000). Dynorphin B and spinal analgesia: induction of antinociception by the cannabinoids CP55,940, Delta(9)-THC and anandamide. *Brain Res.* 857, 337–342.
- Hsieh, G.C., Pai, M., Chandran, P., Hooker, B.A., Zhu, C.Z., Salyers, A.K., Wensink, E.J., Zhan, C., Carroll, W.A., Dart, M.J., et al. (2011). Central and peripheral sites of action for CB₂ receptor mediated analgesic activity in chronic inflammatory and neuropathic pain models in rats. *Br. J. Pharmacol.* 162, 428–440.
- Hudzik, T.J., Maciag, C., Smith, M.A., Caccese, R., Pietras, M.R., Bui, K.H., Coupal, M., Adam, L., Payza, K., Griffin, A., et al. (2011). Preclinical pharmacology of AZD2327: a highly selective agonist of the δ -opioid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338, 195–204.
- Huffman, J.W., Liddle, J., Yu, S., Aung, M.M., Abood, M.E., Wiley, J.L., and Martin, B.R. (1999). 3-(1',1'-Dimethylbutyl)-1-deoxy-delta8-THC and related compounds: synthesis of selective ligands for the CB2 receptor. *Bioorg. Med. Chem.* 7, 2905–2914.
- Hulse, G.K., Morris, N., Arnold-Reed, D., and Tait, R.J. (2009). Improving clinical outcomes in treating heroin dependence: randomized, controlled trial of oral or implant naltrexone. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 1108–1115.
- Hutcheson, D.M., Tzavara, E.T., Smadja, C., Valjent, E., Roques, B.P., Hanoune, J., and Maldonado, R. (1998). Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. *Br. J. Pharmacol.* 125, 1567–1577.
- Hutcheson, D.M., Matthes, H.W., Valjent, E., Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Díaz, M., Garzón, J., Kieffer, B.L., and Maldonado, R. (2001). Lack of dependence and rewarding effects of deltorphin II in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.* 13, 153–161.
- Ide, S., Minami, M., Satoh, M., Uhl, G.R., Sora, I., and Ikeda, K. (2004). Buprenorphine antinociception is abolished, but naloxone-sensitive reward is retained, in mu-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 29, 1656–1663.
- Ito, M., and Doya, K. (2015). Distinct neural representation in the dorsolateral, dorsomedial, and ventral parts of the striatum during fixed- and free-choice tasks. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 3499–3514.
- Jacobs, E.H., Smit, A.B., de Vries, T.J., and Schoffelmeer, A.N.M. (2003). Neuroadaptive effects of active versus passive drug administration in addiction research. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 566–573.
- Jenkins, A.J., Keenan, R.M., Henningfield, J.E., and Cone, E.J. (1994). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of smoked heroin. *J. Anal. Toxicol.* 18, 317–330.
- Ji, S.-P., Zhang, Y., Van Cleemput, J., Jiang, W., Liao, M., Li, L., Wan, Q., Backstrom, J.R., and Zhang, X. (2006). Disruption of PTEN coupling with 5-HT_{2C} receptors suppresses behavioral responses induced by drugs of abuse. *Nat. Med.* 12, 324–329.
- Johnson, S.W., and North, R.A. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 483–488.

- Kaplan, G.B., Leite-Morris, K.A., Fan, W., Young, A.J., and Guy, M.D. (2011). Opiate sensitization induces FosB/ Δ FosB expression in prefrontal cortical, striatal and amygdala brain regions. *PloS One* 6, e23574.
- Karimi, S., Azizi, P., Shamsizadeh, A., and Haghparast, A. (2013). Role of intra-accumbal cannabinoid CB1 receptors in the potentiation, acquisition and expression of morphine-induced conditioned place preference. *Behav. Brain Res.* 247, 125–131.
- Khanna, I.K., and Pillarisetti, S. (2015). Buprenorphine - an attractive opioid with underutilized potential in treatment of chronic pain. *J. Pain Res.* 8, 859–870.
- Knoll, A.T., and Carlezon, W.A. (2010). Dynorphin, stress, and depression. *Brain Res.* 1314, 56–73.
- Knoll, A.T., Muschamp, J.W., Sullivan, S.E., Ferguson, D., Dietz, D.M., Meloni, E.G., Carroll, F.I., Nestler, E.J., Konradi, C., and Carlezon, W.A. (2011). Kappa opioid receptor signaling in the basolateral amygdala regulates conditioned fear and anxiety in rats. *Biol. Psychiatry* 70, 425–433.
- Koek, W., France, C.P., and Javors, M.A. (2012). Morphine-induced motor stimulation, motor incoordination, and hypothermia in adolescent and adult mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 219, 1027–1037.
- Koob, G.F. (1992). Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 654, 171–191.
- Koob, G.F. (2008). A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 59, 11–34.
- Kremer, M., Yalcin, I., Nexon, L., Wurtz, X., Ceredig, R.A., Daniel, D., Hawkes, R.A., Salvat, E., and Barrot, M. (2016). The antiallodynic action of pregabalin in neuropathic pain is independent from the opioid system. *Mol. Pain* 12.
- La Porta, C., Bura, S.A., Llorente-Onaindia, J., Pastor, A., Navarrete, F., García-Gutiérrez, M.S., De la Torre, R., Manzanares, J., Monfort, J., and Maldonado, R. (2015). Role of the endocannabinoid system in the emotional manifestations of osteoarthritis pain. *Pain* 156, 2001–2012.
- La Rana, G., Russo, R., Campolongo, P., Bortolato, M., Mangieri, R.A., Cuomo, V., Iacono, A., Raso, G.M., Meli, R., Piomelli, D., et al. (2006). Modulation of neuropathic and inflammatory pain by the endocannabinoid transport inhibitor AM404 [N-(4-hydroxyphenyl)-eicosa-5,8,11,14-tetraenamide]. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317, 1365–1371.
- Le Foll, B., Wiggins, M., and Goldberg, S.R. (2006). Nicotine pre-exposure does not potentiate the locomotor or rewarding effects of Delta-9-tetrahydrocannabinol in rats. *Behav. Pharmacol.* 17, 195–199.
- Le Merrer, J., Faget, L., Matifas, A., and Kieffer, B.L. (2012). Cues predicting drug or food reward restore morphine-induced place conditioning in mice lacking delta opioid receptors. *Psychopharmacology (Berl.)* 223, 99–106.
- Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J.F., Beslot, F., Böhme, G.A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B.P., et al. (1999). Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283, 401–404.
- Li, A.-L., Carey, L.M., Mackie, K., and Hohmann, A.G. (2017). Cannabinoid CB2 Agonist GW405833 Suppresses Inflammatory and Neuropathic Pain through a CB1 Mechanism that is Independent of CB2 Receptors in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 362, 296–305.

- Li, C.-L., Zhu, N., Meng, X.-L., Li, Y.-H., and Sui, N. (2013). Effects of inactivating the agranular or granular insular cortex on the acquisition of the morphine-induced conditioned place preference and naloxone-precipitated conditioned place aversion in rats. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* 27, 837–844.
- Li, J.-X., McMahon, L.R., Gerak, L.R., Becker, G.L., and France, C.P. (2008). Interactions between Delta(9)-tetrahydrocannabinol and mu opioid receptor agonists in rhesus monkeys: discrimination and antinociception. *Psychopharmacology (Berl.)* 199, 199–208.
- Liang, Y.-C., Huang, C.-C., and Hsu, K.-S. (2007). The synthetic cannabinoids attenuate allodynia and hyperalgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Neuropharmacology* 53, 169–177.
- Lichtman, A.H., Sheikh, S.M., Loh, H.H., and Martin, B.R. (2001). Opioid and cannabinoid modulation of precipitated withdrawal in delta(9)-tetrahydrocannabinol and morphine-dependent mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1007–1014.
- Lin, S.-L., Tsai, R.-Y., Shen, C.-H., Lin, F.-H., Wang, J.-J., Hsin, S.-T., and Wong, C.-S. (2010). Co-administration of ultra-low dose naloxone attenuates morphine tolerance in rats via attenuation of NMDA receptor neurotransmission and suppression of neuroinflammation in the spinal cords. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 96, 236–245.
- Liu, C.-H., Cherng, C.-H., Cherng, C.-H., Lin, S.-L., Yeh, C.-C., Wu, C.-T., Tai, Y.-H., and Wong, C.-S. (2011). N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 suppresses glial pro-inflammatory cytokine expression in morphine-tolerant rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99, 371–380.
- Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Huang, B.X., Kim, H.-Y., Luquet, S., Palmiter, R.D., Krystal, G., Rai, R., Mahadevan, A., et al. (2008). Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* 54, 1–7.
- Loimer, N., Schmid, R.W., Presslich, O., and Lenz, K. (1989). Continuous naloxone administration suppresses opiate withdrawal symptoms in human opiate addicts during detoxification treatment. *J. Psychiatr. Res.* 23, 81–86.
- Longoni, R., Cadoni, C., Mulas, A., Di Chiara, G., and Spina, L. (1998). Dopamine-dependent behavioural stimulation by non-peptide delta opioids BW373U86 and SNC 80: 2. Place-preference and brain microdialysis studies in rats. *Behav. Pharmacol.* 9, 9–14.
- Lopez-Rodriguez, A.B., Llorente-Berzal, A., Garcia-Segura, L.M., and Viveros, M.-P. (2014). Sex-dependent long-term effects of adolescent exposure to THC and/or MDMA on neuroinflammation and serotonergic and cannabinoid systems in rats. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1435–1447.
- Lopez-Rodriguez, A.B., Mela, V., Acaz-Fonseca, E., Garcia-Segura, L.M., and Viveros, M.-P. (2016). CB2 cannabinoid receptor is involved in the anti-inflammatory effects of leptin in a model of traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 279, 274–282.
- Lutz, P.-E., and Kieffer, B.L. (2013). Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends Neurosci.* 36, 195–206.
- Lutz, P.E., Reiss, D., Ouagazzal, A.M., and Kieffer, B.L. (2013). A history of chronic morphine exposure during adolescence increases despair-like behaviour and strain-dependently promotes sociability in abstinent adult mice. *Behav. Brain Res.* 243, 44–52.
- Lutz, P.-E., Ayranci, G., Chu-Sin-Chung, P., Matifas, A., Koebel, P., Filliol, D., Befort, K., Ouagazzal, A.-M., and Kieffer, B.L. (2014). Distinct mu, delta, and kappa opioid receptor mechanisms underlie low

sociability and depressive-like behaviors during heroin abstinence. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 39, 2694–2705.

Mackie, K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb. Exp. Pharmacol.* 299–325.

Mague, S.D., Pliakas, A.M., Todtenkopf, M.S., Tomasiewicz, H.C., Zhang, Y., Stevens, W.C., Jones, R.M., Portoghese, P.S., and Carlezon, W.A. (2003). Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 323–330.

Maguire, D.R., and France, C.P. (2014). Impact of efficacy at the μ -opioid receptor on antinociceptive effects of combinations of μ -opioid receptor agonists and cannabinoid receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 351, 383–389.

Maguire, D.R., Yang, W., and France, C.P. (2013). Interactions between μ -opioid receptor agonists and cannabinoid receptor agonists in rhesus monkeys: antinociception, drug discrimination, and drug self-administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 345, 354–362.

Mailleux, P., and Vanderhaeghen, J.J. (1992). Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons. *Neurosci. Lett.* 148, 173–176.

Maldonado, R. (2010). [The endogenous opioid system and drug addiction]. *Ann. Pharm. Fr.* 68, 3–11.

Maldonado, R., Valverde, O., and Berrendero, F. (2006). Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci.* 29, 225–232.

Maldonado, R., Berrendero, F., Ozaita, A., and Robledo, P. (2011). Neurochemical basis of cannabis addiction. *Neuroscience* 181, 1–17.

Mallet, P.E., and Beninger, R.J. (1998). Delta9-tetrahydrocannabinol, but not the endogenous cannabinoid receptor ligand anandamide, produces conditioned place avoidance. *Life Sci.* 62, 2431–2439.

Mansouri, M.T., Naghizadeh, B., Ghorbanzadeh, B., Alboghobeish, S., Houshmand, G., and Amirgholami, N. (2017). Venlafaxine attenuates the development of morphine tolerance and dependence: role of L-arginine/nitric oxide/cGMP pathway. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.*

Manzanedo, C., Aguilar, M.A., Rodríguez-Arias, M., Navarro, M., and Miñarro, J. (2004). Cannabinoid agonist-induced sensitisation to morphine place preference in mice. *Neuroreport* 15, 1373–1377.

Marie-Claire, C., Courtin, C., Roques, B.P., and Noble, F. (2004). Cytoskeletal genes regulation by chronic morphine treatment in rat striatum. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 29, 2208–2215.

Marrone, G.F., Le Rouzic, V., Varadi, A., Xu, J., Rajadhyaksha, A.M., Majumdar, S., Pan, Y.-X., and Pasternak, G.W. (2017). Genetic dissociation of morphine analgesia from hyperalgesia in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 234, 1891–1900.

Martin, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., and Valverde, O. (2000). Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 12, 4038–4046.

- Martini, L., and Whistler, J.L. (2007). The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 556–564.
- Mas-Nieto, M., Pommier, B., Tzavara, E.T., Caneparo, A., Da Nascimento, S., Le Fur, G., Roques, B.P., and Noble, F. (2001). Reduction of opioid dependence by the CB(1) antagonist SR141716A in mice: evaluation of the interest in pharmacotherapy of opioid addiction. *Br. J. Pharmacol.* 132, 1809–1816.
- Massotte, D. (2015). In vivo opioid receptor heteromerization: where do we stand? *Br. J. Pharmacol.* 172, 420–434.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., and Bonner, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561–564.
- Matthes, H.W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dollé, P., et al. (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383, 819–823.
- Mattioli, T.A., Leduc-Pessah, H., Skelhorne-Gross, G., Nicol, C.J.B., Milne, B., Trang, T., and Cahill, C.M. (2014). Toll-like receptor 4 mutant and null mice retain morphine-induced tolerance, hyperalgesia, and physical dependence. *PloS One* 9, e97361.
- McGregor, I.S., Arnold, J.C., Weber, M.F., Topple, A.N., and Hunt, G.E. (1998). A comparison of delta 9-THC and anandamide induced c-fos expression in the rat forebrain. *Brain Res.* 802, 19–26.
- McMillan, D.E. (1971). Interactions between Naloxone and Chlorpromazine on behavior under schedule control. *Psychopharmacologia* 19, 128–133.
- Mechoulam, R., and Gaoni, Y. (1965). A TOTAL SYNTHESIS OF DL-DELTA-1-TETRAHYDROCANNABINOL, THE ACTIVE CONSTITUENT OF HASHISH. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 3273–3275.
- Metzger, D.S., Woody, G.E., McLellan, A.T., O'Brien, C.P., Druley, P., Navaline, H., DePhilippis, D., Stolley, P., and Abrutyn, E. (1993). Human immunodeficiency virus seroconversion among intravenous drug users in- and out-of-treatment: an 18-month prospective follow-up. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 6, 1049–1056.
- Mikuriya, T.H. (1969). Marijuana in medicine: past, present and future. *Calif. Med.* 110, 34–40.
- Miller, L.L., Picker, M.J., Schmidt, K.T., and Dykstra, L.A. (2011). Effects of morphine on pain-elicited and pain-suppressed behavior in CB1 knockout and wildtype mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 215, 455–465.
- Molaei, M., Fatahi, Z., Zaringhalam, J., and Haghparast, A. (2016). CB1 Cannabinoid Agonist (WIN55,212-2) Within the Basolateral Amygdala Induced Sensitization to Morphine and Increased the Level of μ -Opioid Receptor and c-fos in the Nucleus Accumbens. *J. Mol. Neurosci.* MN 58, 446–455.
- Monory, K., Blaudzun, H., Massa, F., Kaiser, N., Lemberger, T., Schütz, G., Wotjak, C.T., Lutz, B., and Marsicano, G. (2007). Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *PLoS Biol.* 5, e269.
- Moreira, F.A., and Crippa, J.A.S. (2009). The psychiatric side-effects of rimonabant. *Rev. Bras. Psiquiatr. Sao Paulo Braz.* 1999 31, 145–153.

- Munro, S., Thomas, K.L., and Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61–65.
- Nackley, A.G., Makriyannis, A., and Hohmann, A.G. (2003). Selective activation of cannabinoid CB(2) receptors suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience* 119, 747–757.
- Naidu, P.S., Lichtman, A.H., Archer, C.C., May, E.L., Harris, L.S., and Aceto, M.D. (2007). NIH 11082 produces anti-depressant-like activity in the mouse tail-suspension test through a delta-opioid receptor mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* 566, 132–136.
- Nakagawa, T., Suzuki, Y., Nagayasu, K., Kitaichi, M., Shirakawa, H., and Kaneko, S. (2011). Repeated exposure to methamphetamine, cocaine or morphine induces augmentation of dopamine release in rat mesocorticolimbic slice co-cultures. *PLoS One* 6, e24865.
- Navarro, M., Chowen, J., Rocío A Carrera, M., del Arco, I., Villanúa, M.A., Martin, Y., Roberts, A.J., Koob, G.F., and de Fonseca, F.R. (1998). CB1 cannabinoid receptor antagonist-induced opiate withdrawal in morphine-dependent rats. *Neuroreport* 9, 3397–3402.
- Navarro, M., Carrera, M.R., Fratta, W., Valverde, O., Cossu, G., Fattore, L., Chowen, J.A., Gomez, R., del Arco, I., Villanua, M.A., et al. (2001). Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 5344–5350.
- Novak, C.M., Burghardt, P.R., and Levine, J.A. (2012). The use of a running wheel to measure activity in rodents: relationship to energy balance, general activity, and reward. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 1001–1014.
- Ohno-Shosaku, T., and Kano, M. (2014). Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Curr. Opin. Neurobiol.* 29, 1–8.
- Olmstead, M.C., and Burns, L.H. (2005). Ultra-low-dose naltrexone suppresses rewarding effects of opiates and aversive effects of opiate withdrawal in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 181, 576–581.
- Onaivi, E.S., Chakrabarti, A., Gwebu, E.T., and Chaudhuri, G. (1995). Neurobehavioral effects of delta 9-THC and cannabinoid (CB1) receptor gene expression in mice. *Behav. Brain Res.* 72, 115–125.
- Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.-P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P.A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., et al. (2006). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1074, 514–536.
- Ornellas, T., and Chavez, B. (2011). Naltrexone SR/Bupropion SR (Contrave): A New Approach to Weight Loss in Obese Adults. *P T Peer-Rev. J. Formul. Manag.* 36, 255–262.
- Ortega-Alvaro, A., Acebes, I., Saracíbar, G., Echevarría, E., Casis, L., and Micó, J.A. (2004). Effect of the antidepressant nefazodone on the density of cells expressing mu-opioid receptors in discrete brain areas processing sensory and affective dimensions of pain. *Psychopharmacology (Berl.)* 176, 305–311.
- Oviedo, A., Glowa, J., and Herkenham, M. (1993). Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res.* 616, 293–302.

- Pace, N.L., Parrish, R.G., Lieberman, M.M., Wong, K.C., and Blatnick, R.A. (1979). Pharmacokinetics of naloxone and naltrexone in the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *208*, 254–256.
- Pacheco, D. da F., Klein, A., Perez, A.C., Pacheco, C.M. da F., de Francischi, J.N., Reis, G.M.L., and Duarte, I.D.G. (2009). Central antinociception induced by mu-opioid receptor agonist morphine, but not delta- or kappa-, is mediated by cannabinoid CB1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* *158*, 225–231.
- Pajohanfar, N.S., Mohebbi, E., Rad, A., Pejhan, A., Nazemi, S., and Amin, B. (2017). Protective effects of atorvastatin against morphine-induced tolerance and dependence in mice. *Brain Res.* *1657*, 333–339.
- Palazzo, E., de Novellis, V., Petrosino, S., Marabese, I., Vita, D., Giordano, C., Di Marzo, V., Mangoni, G.S., Rossi, F., and Maione, S. (2006). Neuropathic pain and the endocannabinoid system in the dorsal raphe: pharmacological treatment and interactions with the serotonergic system. *Eur. J. Neurosci.* *24*, 2011–2020.
- Panagis, G., Mackey, B., and Vlachou, S. (2014). Cannabinoid Regulation of Brain Reward Processing with an Emphasis on the Role of CB1 Receptors: A Step Back into the Future. *Front. Psychiatry* *5*, 92.
- Paquette, J., Olmstead, M.C., and Olmstead, M. (2005). Ultra-low dose naltrexone enhances cannabinoid-induced antinociception. *Behav. Pharmacol.* *16*, 597–603.
- Pascual, D., Goicoechea, C., Suardíaz, M., and Martín, M.I. (2005). A cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, reduces neuropathic nociception induced by paclitaxel in rats. *Pain* *118*, 23–34.
- Pertwee, R.G. (1999). Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem.* *6*, 635–664.
- Pertwee, R.G. (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.* *153*, 199–215.
- Pertwee, R.G. (2010). Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr. Med. Chem.* *17*, 1360–1381.
- Pol, O., Murtra, P., Caracuel, L., Valverde, O., Puig, M.M., and Maldonado, R. (2006). Expression of opioid receptors and c-fos in CB1 knockout mice exposed to neuropathic pain. *Neuropharmacology* *50*, 123–132.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., and Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* *47*, 379–391.
- Pugh, G., Smith, P.B., Dombrowski, D.S., and Welch, S.P. (1996). The role of endogenous opioids in enhancing the antinociception produced by the combination of delta 9-tetrahydrocannabinol and morphine in the spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *279*, 608–616.
- Quartilho, A., Mata, H.P., Ibrahim, M.M., Vanderah, T.W., Porreca, F., Makriyannis, A., and Malan, T.P. (2003). Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology* *99*, 955–960.
- Racz, I., Bilkei-Gorzo, A., Toth, Z.E., Michel, K., Palkovits, M., and Zimmer, A. (2003). A critical role for the cannabinoid CB1 receptors in alcohol dependence and stress-stimulated ethanol drinking. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 2453–2458.

- Raffa, R.B., and Ward, S.J. (2012). CB₁-independent mechanisms of Δ^9 -THCV, AM251 and SR141716 (rimonabant). *J. Clin. Pharm. Ther.* 37, 260–265.
- Rahn, E.J., Makriyannis, A., and Hohmann, A.G. (2007). Activation of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors suppresses neuropathic nociception evoked by the chemotherapeutic agent vincristine in rats. *Br. J. Pharmacol.* 152, 765–777.
- Rahn, E.J., Zvonok, A.M., Thakur, G.A., Khanolkar, A.D., Makriyannis, A., and Hohmann, A.G. (2008). Selective activation of cannabinoid CB₂ receptors suppresses neuropathic nociception induced by treatment with the chemotherapeutic agent paclitaxel in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327, 584–591.
- Ravinet Trillou, C., Delgorge, C., Menet, C., Arnone, M., and Soubrié, P. (2004). CB₁ cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 28, 640–648.
- Reche, I., Fuentes, J.A., and Ruiz-Gayo, M. (1996). Potentiation of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced analgesia by morphine in mice: involvement of mu- and kappa-opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 318, 11–16.
- Rehm, J., Taylor, B., and Room, R. (2006). Global burden of disease from alcohol, illicit drugs and tobacco. *Drug Alcohol Rev.* 25, 503–513.
- Reindl, J.D., Rowan, K., Carey, A.N., Peng, X., Neumeyer, J.L., and McLaughlin, J.P. (2008). Antidepressant-like effects of the novel kappa opioid antagonist MCL-144B in the forced-swim test. *Pharmacology* 81, 229–235.
- Reynaud-Maurupt, C., Caer, Y., Escaffre, N., Gagneau, M., Galinier, A., Marzo, J.-N., and Meroueh, F. (2005). [High-dose buprenorphine substitution during incarceration. Management of opiate addicts]. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983 34, 487–490.
- Rezayof, A., Sardari, M., Zarrindast, M.-R., and Nayer-Nouri, T. (2011). Functional interaction between morphine and central amygdala cannabinoid CB₁ receptors in the acquisition and expression of conditioned place preference. *Behav. Brain Res.* 220, 1–8.
- Rice, O.V., Gordon, N., and Gifford, A.N. (2002). Conditioned place preference to morphine in cannabinoid CB₁ receptor knockout mice. *Brain Res.* 945, 135–138.
- Richards, E.M., Mathews, D.C., Luckenbaugh, D.A., Ionescu, D.F., Machado-Vieira, R., Niciu, M.J., Duncan, W.C., Nolan, N.M., Franco-Chaves, J.A., Hudzik, T., et al. (2016). A randomized, placebo-controlled pilot trial of the delta opioid receptor agonist AZD2327 in anxious depression. *Psychopharmacology (Berl.)* 233, 1119–1130.
- Richardson, J.D., Aanonsen, L., and Hargreaves, K.M. (1997). SR 141716A, a cannabinoid receptor antagonist, produces hyperalgesia in untreated mice. *Eur. J. Pharmacol.* 319, R3-4.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Néliat, G., and Caput, D. (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* 350, 240–244.
- Rios, C., Gomes, I., and Devi, L.A. (2006). mu opioid and CB₁ cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *Br. J. Pharmacol.* 148, 387–395.

- Rodríguez de Fonseca, F., Gorriti, M.A., Fernández-Ruiz, J.J., Palomo, T., and Ramos, J.A. (1994). Downregulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *47*, 33–40.
- Rodríguez de Fonseca, F., Carrera, M.R., Navarro, M., Koob, G.F., and Weiss, F. (1997). Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science* *276*, 2050–2054.
- Roeckel, L.-A., Utard, V., Reiss, D., Mouheiche, J., Maurin, H., Robé, A., Audouard, E., Wood, J.N., Goumon, Y., Simonin, F., et al. (2017). Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. *Sci. Rep.* *7*, 10406.
- Romero, J., García, L., Fernández-Ruiz, J.J., Cebeira, M., and Ramos, J.A. (1995). Changes in rat brain cannabinoid binding sites after acute or chronic exposure to their endogenous agonist, anandamide, or to delta 9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *51*, 731–737.
- Romero, J., Garcia-Palomero, E., Castro, J.G., Garcia-Gil, L., Ramos, J.A., and Fernandez-Ruiz, J.J. (1997). Effects of chronic exposure to delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several rat brain regions. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *46*, 100–108.
- Romero, J., Fernández-Ruiz, J.J., Vela, G., Ruiz-Gayo, M., Fuentes, J.A., and Ramos, J.A. (1998). Autoradiographic analysis of cannabinoid receptor binding and cannabinoid agonist-stimulated [35S]GTP gamma S binding in morphine-dependent mice. *Drug Alcohol Depend.* *50*, 241–249.
- Romero, T.R.L., Resende, L.C., Guzzo, L.S., and Duarte, I.D.G. (2013). CB1 and CB2 cannabinoid receptor agonists induce peripheral antinociception by activation of the endogenous noradrenergic system. *Anesth. Analg.* *116*, 463–472.
- Rook, E.J., Huitema, A.D.R., van den Brink, W., van Ree, J.M., and Beijnen, J.H. (2006). Pharmacokinetics and pharmacokinetic variability of heroin and its metabolites: review of the literature. *Curr. Clin. Pharmacol.* *1*, 109–118.
- Rothman, R.B., Long, J.B., Bykov, V., Xu, H., Jacobson, A.E., Rice, K.C., and Holaday, J.W. (1991). Upregulation of the opioid receptor complex by the chronic administration of morphine: a biochemical marker related to the development of tolerance and dependence. *Peptides* *12*, 151–160.
- Russo, E.B. (2013). *Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential* (Routledge).
- Rutkowska, M., and Fereniec-Gołbiewska, L. (2006). ACEA (arachidonyl-2-chloroethylamide), the selective cannabinoid CB1 receptor agonist, protects against aspirin-induced gastric ulceration. *Pharm.* *61*, 341–342.
- Saitoh, A., Kimura, Y., Suzuki, T., Kawai, K., Nagase, H., and Kamei, J. (2004). Potential anxiolytic and antidepressant-like activities of SNC80, a selective delta-opioid agonist, in behavioral models in rodents. *J. Pharmacol. Sci.* *95*, 374–380.
- Salamone, J.D., and Correa, M. (2002). Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav. Brain Res.* *137*, 3–25.

- Salio, C., Fischer, J., Franzoni, M.F., Mackie, K., Kaneko, T., and Conrath, M. (2001). CB1-cannabinoid and mu-opioid receptor co-localization on postsynaptic target in the rat dorsal horn. *Neuroreport* 12, 3689–3692.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., et al. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805–809.
- Scherrer, G., Befort, K., Contet, C., Becker, J., Matifas, A., and Kieffer, B.L. (2004). The delta agonists DPDPE and deltorphin II recruit predominantly mu receptors to produce thermal analgesia: a parallel study of mu, delta and combinatorial opioid receptor knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2239–2248.
- Schuckit, M.A., Smith, T.L., Danko, G.P., Bucholz, K.K., Reich, T., and Bierut, L. (2001). Five-year clinical course associated with DSM-IV alcohol abuse or dependence in a large group of men and women. *Am. J. Psychiatry* 158, 1084–1090.
- Schuckit, M.A., Danko, G.P., Smith, T.L., Bierut, L.J., Bucholz, K.K., Edenberg, H.J., Hesselbrock, V., Kramer, J., Nurnberger, J.I., Trim, R., et al. (2008). The prognostic implications of DSM-IV abuse criteria in drinking adolescents. *Drug Alcohol Depend.* 97, 94–104.
- Seely, K.A., Brents, L.K., Franks, L.N., Rajasekaran, M., Zimmerman, S.M., Fantegrossi, W.E., and Prather, P.L. (2012). AM-251 and rimonabant act as direct antagonists at mu-opioid receptors: implications for opioid/cannabinoid interaction studies. *Neuropharmacology* 63, 905–915.
- Selley, D.E., Cao, C.C., Sexton, T., Schwegel, J.A., Martin, T.J., and Childers, S.R. (2001). mu Opioid receptor-mediated G-protein activation by heroin metabolites: evidence for greater efficacy of 6-monoacetylmorphine compared with morphine. *Biochem. Pharmacol.* 62, 447–455.
- Shen, K.F., and Crain, S.M. (1997). Ultra-low doses of naltrexone or etorphine increase morphine's antinociceptive potency and attenuate tolerance/dependence in mice. *Brain Res.* 757, 176–190.
- Sherwin, null (1998). Voluntary wheel running: a review and novel interpretation. *Anim. Behav.* 56, 11–27.
- Shi, J., Zhao, L.-Y., Epstein, D.H., Zhang, X.-L., and Lu, L. (2007). Long-term methadone maintenance reduces protracted symptoms of heroin abstinence and cue-induced craving in Chinese heroin abusers. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 87, 141–145.
- Simonin, F., Valverde, O., Smadja, C., Slowe, S., Kitchen, I., Dierich, A., Le Meur, M., Roques, B.P., Maldonado, R., and Kieffer, B.L. (1998). Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J.* 17, 886–897.
- Singh, M.E., Verty, A.N.A., McGregor, I.S., and Mallet, P.E. (2004). A cannabinoid receptor antagonist attenuates conditioned place preference but not behavioural sensitization to morphine. *Brain Res.* 1026, 244–253.
- Skoubis, P.D., Matthes, H.W., Walwyn, W.M., Kieffer, B.L., and Maidment, N.T. (2001). Naloxone fails to produce conditioned place aversion in mu-opioid receptor knock-out mice. *Neuroscience* 106, 757–763.

- Slouzkey, I., Rosenblum, K., and Maroun, M. (2013). Memory of conditioned taste aversion is erased by inhibition of PI3K in the insular cortex. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 38, 1143–1153.
- Smith, F.L., Cichewicz, D., Martin, Z.L., and Welch, S.P. (1998). The enhancement of morphine antinociception in mice by delta9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60, 559–566.
- Smith, P.A., Selley, D.E., Sim-Selley, L.J., and Welch, S.P. (2007). Low dose combination of morphine and delta9-tetrahydrocannabinol circumvents antinociceptive tolerance and apparent desensitization of receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 571, 129–137.
- Soethoudt, M., Grether, U., Fingerle, J., Grim, T.W., Fezza, F., de Petrocellis, L., Ullmer, C., Rothenhäusler, B., Perret, C., van Gils, N., et al. (2017). Cannabinoid CB2receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. *Nat. Commun.* 8, 13958.
- Song, L., Yang, X., Ma, Y., Wu, N., and Liu, Z. (2014). The CB1 cannabinoid receptor agonist reduces L-DOPA-induced motor fluctuation and ERK1/2 phosphorylation in 6-OHDA-lesioned rats. *Drug Des. Devel. Ther.* 8, 2173–2179.
- Sora, I., Takahashi, N., Funada, M., Ujike, H., Revay, R.S., Donovan, D.M., Miner, L.L., and Uhl, G.R. (1997). Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1544–1549.
- Sora, I., Elmer, G., Funada, M., Pieper, J., Li, X.F., Hall, F.S., and Uhl, G.R. (2001). Mu opiate receptor gene dose effects on different morphine actions: evidence for differential in vivo mu receptor reserve. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 25, 41–54.
- Soria, G., Castañé, A., Berrendero, F., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., and Valverde, O. (2004). Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2203–2213.
- Stark, R., Zimmermann, M., Kagerer, S., Schienle, A., Walter, B., Weygandt, M., and Vaitl, D. (2007). Hemodynamic brain correlates of disgust and fear ratings. *NeuroImage* 37, 663–673.
- Steffensen, S.C., Stobbs, S.H., Colago, E.E.O., Lee, R.-S., Koob, G.F., Gallegos, R.A., and Henriksen, S.J. (2006). Contingent and non-contingent effects of heroin on mu-opioid receptor-containing ventral tegmental area GABA neurons. *Exp. Neurol.* 202, 139–151.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., and Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 85, 367–370.
- Suplita, R.L., Eisenstein, S.A., Neely, M.H., Moise, A.M., and Hohmann, A.G. (2008). Cross-sensitization and cross-tolerance between exogenous cannabinoid antinociception and endocannabinoid-mediated stress-induced analgesia. *Neuropharmacology* 54, 161–171.
- Tejedor-Real, P., Mico, J.A., Maldonado, R., Roques, B.P., and Gibert-Rahola, J. (1995). Implication of endogenous opioid system in the learned helplessness model of depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52, 145–152.
- Tejedor-Real, P., Micó, J.A., Smadja, C., Maldonado, R., Roques, B.P., and Gilbert-Rahola, J. (1998). Involvement of delta-opioid receptors in the effects induced by endogenous enkephalins on learned helplessness model. *Eur. J. Pharmacol.* 354, 1–7.

- Thorn, C.A., and Graybiel, A.M. (2014). Differential entrainment and learning-related dynamics of spike and local field potential activity in the sensorimotor and associative striatum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 2845–2859.
- Tiihonen, J., Krupitsky, E., Verbitskaya, E., Blokhina, E., Mamontova, O., Föhr, J., Tuomola, P., Kuoppasalmi, K., Kiviniemi, V., and Zwartau, E. (2012). Naltrexone implant for the treatment of polydrug dependence: a randomized controlled trial. *Am. J. Psychiatry* *169*, 531–536.
- Toguri, J.T., Lehmann, C., Laprairie, R.B., Szczesniak, A.M., Zhou, J., Denovan-Wright, E.M., and Kelly, M.E.M. (2014). Anti-inflammatory effects of cannabinoid CB(2) receptor activation in endotoxin-induced uveitis. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 1448–1461.
- Torregrossa, M.M., Jutkiewicz, E.M., Mosberg, H.I., Balboni, G., Watson, S.J., and Woods, J.H. (2006). Peptidic delta opioid receptor agonists produce antidepressant-like effects in the forced swim test and regulate BDNF mRNA expression in rats. *Brain Res.* *1069*, 172–181.
- Turcotte, C., Blanchet, M.-R., Laviolette, M., and Flamand, N. (2016). The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *73*, 4449–4470.
- Tzschentke, T.M. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog. Neurobiol.* *56*, 613–672.
- Tzschentke, T.M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict. Biol.* *12*, 227–462.
- Valjent, E., and Maldonado, R. (2000). A behavioural model to reveal place preference to delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* *147*, 436–438.
- Valjent, E., Mitchell, J.M., Besson, M.-J., Caboche, J., and Maldonado, R. (2002). Behavioural and biochemical evidence for interactions between Delta 9-tetrahydrocannabinol and nicotine. *Br. J. Pharmacol.* *135*, 564–578.
- Valverde, O., and Torrens, M. (2012). CB1 receptor-deficient mice as a model for depression. *Neuroscience* *204*, 193–206.
- Valverde, O., Ledent, C., Beslot, F., Parmentier, M., and Roques, B.P. (2000). Reduction of stress-induced analgesia but not of exogenous opioid effects in mice lacking CB1 receptors. *Eur. J. Neurosci.* *12*, 533–539.
- Valverde, O., Noble, F., Beslot, F., Daugé, V., Fournié-Zaluski, M.C., and Roques, B.P. (2001). Delta9-tetrahydrocannabinol releases and facilitates the effects of endogenous enkephalins: reduction in morphine withdrawal syndrome without change in rewarding effect. *Eur. J. Neurosci.* *13*, 1816–1824.
- Vashchinkina, E., Piippo, O., Vekovischeva, O., Krupitsky, E., Ilyuk, R., Neznanov, N., Kazankov, K., Zaplatkin, I., and Korpi, E.R. (2017). Addiction-related interactions of pregabalin with morphine in mice and humans: reinforcing and inhibiting effects. *Addict. Biol.*
- Vera, G., Chiarlone, A., Cabezós, P.A., Pascual, D., Martín, M.I., and Abalo, R. (2007). WIN 55,212-2 prevents mechanical allodynia but not alterations in feeding behaviour induced by chronic cisplatin in the rat. *Life Sci.* *81*, 468–479.

- Vera, G., Cabezas, P.A., Martín, M.I., and Abalo, R. (2013). Characterization of cannabinoid-induced relief of neuropathic pain in a rat model of cisplatin-induced neuropathy. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *105*, 205–212.
- Verty, A.N.A., McGregor, I.S., and Mallet, P.E. (2004). Consumption of high carbohydrate, high fat, and normal chow is equally suppressed by a cannabinoid receptor antagonist in non-deprived rats. *Neurosci. Lett.* *354*, 217–220.
- Verty, A.N.A., Stefanidis, A., McAinch, A.J., Hryciw, D.H., and Oldfield, B. (2015). Anti-Obesity Effect of the CB2 Receptor Agonist JWH-015 in Diet-Induced Obese Mice. *PLoS One* *10*, e0140592.
- Vickers, S.P., and Kennett, G.A. (2005). Cannabinoids and the regulation of ingestive behaviour. *Curr. Drug Targets* *6*, 215–223.
- Wang, F., Jing, X., Yang, J., Wang, H., Xiang, R., Han, W., Liu, X., and Wu, C. (2016a). The role of the insular cortex in naloxone-induced conditioned place aversion in morphine-dependent mice. *Physiol. Res.* *65*, 701–709.
- Wang, J., Xu, W., Zhong, T., Song, Z., Zou, Y., Ding, Z., Guo, Q., Dong, X., and Zou, W. (2016b). miR-365 targets β -arrestin 2 to reverse morphine tolerance in rats. *Sci. Rep.* *6*, 38285.
- Wang, Z., Bilsky, E.J., Wang, D., Porreca, F., and Sadée, W. (1999). 3-Isobutyl-1-methylxanthine inhibits basal mu-opioid receptor phosphorylation and reverses acute morphine tolerance and dependence in mice. *Eur. J. Pharmacol.* *371*, 1–9.
- Warner, M., Chen, L.H., Makuc, D.M., Anderson, R.N., and Miniño, A.M. (2011). Drug poisoning deaths in the United States, 1980-2008. *NCHS Data Brief* 1–8.
- Welch, S.P., and Stevens, D.L. (1992). Antinociceptive activity of intrathecally administered cannabinoids alone, and in combination with morphine, in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *262*, 10–18.
- Williams, J.T., Ingram, S.L., Henderson, G., Chavkin, C., von Zastrow, M., Schulz, S., Koch, T., Evans, C.J., and Christie, M.J. (2013). Regulation of μ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol. Rev.* *65*, 223–254.
- Wilson, A.R., Maher, L., and Morgan, M.M. (2008). Repeated cannabinoid injections into the rat periaqueductal gray enhance subsequent morphine antinociception. *Neuropharmacology* *55*, 1219–1225.
- Wittchen, H.U., Jacobi, F., Rehm, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Jönsson, B., Olesen, J., Allgulander, C., Alonso, J., Faravelli, C., et al. (2011). The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* *21*, 655–679.
- Wotherspoon, G., Fox, A., McIntyre, P., Colley, S., Bevan, S., and Winter, J. (2005). Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. *Neuroscience* *135*, 235–245.
- Xi, Z.-X., Peng, X.-Q., Li, X., Song, R., Zhang, H.-Y., Liu, Q.-R., Yang, H.-J., Bi, G.-H., Li, J., and Gardner, E.L. (2011). Brain cannabinoid CB₂ receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat. Neurosci.* *14*, 1160–1166.

Xie, W.-Y., He, Y., Yang, Y.-R., Li, Y.-F., Kang, K., Xing, B.-M., and Wang, Y. (2009). Disruption of Cdk5-associated phosphorylation of residue threonine-161 of the delta-opioid receptor: impaired receptor function and attenuated morphine antinociceptive tolerance. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 3551–3564.

Yalcin, I., Coubard, S., Bodard, S., Chalon, S., and Belzung, C. (2008). Effects of 5,7-dihydroxytryptamine lesion of the dorsal raphe nucleus on the antidepressant-like action of tramadol in the unpredictable chronic mild stress in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* *200*, 497–507.

Yalcin, I., Bohren, Y., Waltisperger, E., Sage-Ciocca, D., Yin, J.C., Freund-Mercier, M.-J., and Barrot, M. (2011). A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. *Biol. Psychiatry* *70*, 946–953.

Yamamoto, W., Mikami, T., and Iwamura, H. (2008). Involvement of central cannabinoid CB2 receptor in reducing mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* *583*, 56–61.

Yesilyurt, O., Dogrul, A., Gul, H., Seyrek, M., Kusmez, O., Ozkan, Y., and Yildiz, O. (2003). Topical cannabinoid enhances topical morphine antinociception. *Pain* *105*, 303–308.

Yin, H.H., Knowlton, B.J., and Balleine, B.W. (2004). Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 181–189.

Yoshida, Y., Koide, S., Hirose, N., Takada, K., Tomiyama, K., Koshikawa, N., and Cools, A.R. (1999). Fentanyl increases dopamine release in rat nucleus accumbens: involvement of mesolimbic mu- and delta-2-opioid receptors. *Neuroscience* *92*, 1357–1365.

Yuill, M.B., Hale, D.E., Guindon, J., and Morgan, D.J. (2017). Anti-nociceptive interactions between opioids and a cannabinoid receptor 2 agonist in inflammatory pain. *Mol. Pain* *13*, 1744806917728227.

Zádor, F., Otvös, F., Benyhe, S., Zimmer, A., and Páldy, E. (2012). Inhibition of forebrain μ -opioid receptor signaling by low concentrations of rimonabant does not require cannabinoid receptors and directly involves μ -opioid receptors. *Neurochem. Int.* *61*, 378–388.

Zannas, A.S., Kim, J.H., and West, A.E. (2017). Regulation and function of MeCP2 Ser421 phosphorylation in U50488-induced conditioned place aversion in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* *234*, 913–923.

Zarrindast, M.R., Assadi, E., Oryan, S., Torkaman-Boutorabi, A., and Sahebgharani, M. (2003). Influence of histamine, cimetidine and pyrilamine on naloxone-induced jumping in morphine-dependent mice. *Eur. J. Pharmacol.* *471*, 105–112.

Zhang, H.-Y., Gao, M., Liu, Q.-R., Bi, G.-H., Li, X., Yang, H.-J., Gardner, E.L., Wu, J., and Xi, Z.-X. (2014). Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E5007–5015.

Zhang, H.-Y., Gao, M., Shen, H., Bi, G.-H., Yang, H.-J., Liu, Q.-R., Wu, J., Gardner, E.L., Bonci, A., and Xi, Z.-X. (2017). Expression of functional cannabinoid CB2receptor in VTA dopamine neurons in rats. *Addict. Biol.* *22*, 752–765.

Zhang, J., Wang, N., Chen, B., Wang, Y., He, J., Cai, X., Zhang, H., Wei, S., and Li, S. (2016). Blockade of Cannabinoid CB1 receptor attenuates the acquisition of morphine-induced conditioned place preference along with a downregulation of ERK, CREB phosphorylation, and BDNF expression in the nucleus accumbens and hippocampus. *Neurosci. Lett.* 630, 70–76.

Zhuang, S., Kittler, J., Grigorenko, E.V., Kirby, M.T., Sim, L.J., Hampson, R.E., Childers, S.R., and Deadwyler, S.A. (1998). Effects of long-term exposure to delta9-THC on expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different rat brain regions. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 62, 141–149.

Zimmer, A. (2015). Genetic Manipulation of the Endocannabinoid System. *Handb. Exp. Pharmacol.* 231, 129–183.

Zimmer, A., Zimmer, A.M., Hohmann, A.G., Herkenham, M., and Bonner, T.I. (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5780–5785.

Zimmer, A., Valjent, E., Konig, M., Zimmer, A.M., Robledo, P., Hahn, H., Valverde, O., and Maldonado, R. (2001). Absence of delta -9-tetrahydrocannabinol dysphoric effects in dynorphin-deficient mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 9499–9505.

Zuardi, A.W., Shirakawa, I., Finkelfarb, E., and Karniol, I.G. (1982). Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology (Berl.)* 76, 245–250.

Annexe de thèse

De janvier à juin 2017, j'ai suivi une unité d'enseignement (UE) proposée par l'université de Strasbourg intitulée « Nouveau Chapitre de Thèse » ou NCT.

Cette UE a pour objectif de faire réaliser au doctorant toutes les connaissances et savoir-faire qu'il a acquis durant la thèse, qui pourraient être valorisés dans un milieu industriel, pas nécessairement scientifique. Les objectifs étaient donc de mettre en évidence ses propres caractéristiques, compétences et savoir-faire, afin de plus facilement pouvoir les valoriser lors d'un entretien d'embauche. Pour cela, il a fallu vulgariser au maximum le travail de thèse, afin qu'il soit accessible et compréhensible par un public non spécialiste. Des méthodes de communication nous ont été inculquées, comme le fait de toujours illustrer ses dires par des exemples concrets (STAR : situation, task, action, result). Ce travail de plusieurs mois s'est concrétisé par la rédaction d'un rapport, évalué par un examinateur, spécialisé dans les ressources humaines (RH) et d'une interview de 10 minutes avec 3 membres de jury (chefs d'entreprises ou DRH d'entreprises locales). Le rapport de ce travail est présenté dans cette annexe. Etant donné que ce rapport a été rédigé en juin 2017, certains aspects discutés ne sont plus à jour (exemple : Manuscrit Roeckel et al., 2017 désormais publié).

« Valorisation des compétences, Nouveau Chapitre de Thèse, NCT »®

Laurie-Anne ROECKEL, Doctorante en Neurosciences

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, ED414, Université de Strasbourg

Thèse en codirection

Unités de Recherche

CNRS UMR 7364, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives

Equipe Neuroadaptations induites par les psychostimulants, direction d'équipe : Katia BEFORT

&

CNRS UMR 7104-INSERM U 964, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Equipe Système opioïde et fonction cérébrale, direction d'équipe : Brigitte KIEFFER

Titre académique du NCT :

La morphine et le cannabis face à la douleur et l'addiction

Mentor : Jean-Jacques HINCKER

Titre académique de la thèse :

**Le récepteur opioïde Mu et les interactions entre systèmes opioïde et cannabinoïde dans
les effets nociceptifs et addictogènes de la morphine**

Directrices de thèse : **Katia BEFORT** et **Claire GAVERIAUX-RUFF**

Date prévisionnelle de soutenance de thèse : mars 2018

Plan

I. Cadre général et enjeux des recherches

- 1) Présentation succincte
- 2) Résumé succinct de la thèse
- 3) La thèse dans son contexte
- 4) Ma place dans ce contexte

II. Déroulement, gestion et coût du projet

- 1) Préparation et cadrage du projet
 - a) Evaluation des facteurs de succès et des facteurs de risque
 - b) Choix des partenaires
- 2) Conduite du projet

III. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles illustrées par des exemples

IV. Résultats et impacts des recherches

V. Identification des pistes professionnelles

I. Cadre général et enjeux des recherches

1) Présentation succincte

La douleur est un problème de santé publique qui concerne tous les individus à un moment donné de leur vie. Afin de soulager les douleurs les plus intenses, la morphine et ses dérivés sont largement utilisés en clinique. Cependant, un traitement prolongé avec ces composés va mener au développement de nombreux effets secondaires. Parmi ces effets indésirables, la morphine administrée de façon répétée perd de ses capacités antidouleur. Concrètement, l'effet antidouleur obtenu après la première administration de morphine ne sera plus retrouvé après plusieurs jours de traitement. Ce phénomène est classiquement appelé tolérance morphinique. En plus de cette perte d'efficacité sur la douleur, la morphine donnée initialement pour soulager la douleur va en réalité augmenter la sensibilité des personnes traitées, c'est ce que l'on appelle l'hypersensibilité morphinique.

Un moyen évident pour lutter contre la tolérance morphinique et les hypersensibilités serait d'augmenter les doses de morphine administrées aux patients. Malheureusement, cela n'est pas dénué d'effet : premièrement, cela ne va faire qu'aggraver les phénomènes de tolérance et d'hypersensibilités mais surtout cela va exacerber le risque de développer une dépendance. En effet, il ne faut pas oublier que la morphine est cousine de l'héroïne, drogue « dure » largement connue pour ses effets addictogènes, et le fait d'augmenter les doses administrées, ne peut qu'augmenter ce risque de dépendance. La dépendance se traduit par un besoin de consommer de la drogue afin de minimiser l'apparition de signes de manque. En absence de la dose nécessaire, les patients vont se trouver dans un état de mal-être physique et psychologique important, qui ne pourra être soulagé que par apport de la drogue ou d'un équivalent.

Ces effets indésirables –hypersensibilités ; tolérance ; dépendances et addictions à la morphine– sont particulièrement craints par le personnel soignant et rendent l'utilisation de morphine difficile. Ce sont pourtant les analgésiques les plus puissants sur le marché à ce jour. Certaines unités médicales considèrent même qu'il est préférable de ne pas utiliser ces composés chez des patients qui ne sont pas en phase terminale afin d'éliminer le risque de développer une dépendance. Cette crainte a pour conséquence une prise en charge de la douleur insuffisante, et ce malgré les progrès considérables réalisés ces dernières années dans ce domaine.

Cependant, une drogue, dont la consommation est illégale dans notre pays, est matière à débat dans la prise en charge de la douleur : le cannabis. C'est la drogue d'abus la plus consommée dans nos sociétés, et elle est responsable d'une marginalisation sociale, d'une perte financière importante, mais aussi d'une hausse de la criminalité du fait du marché noir. A cause de ces éléments, la consommation de cannabis est taboue et associée à une image négative dans notre pays. Pourtant, le cannabis contient des composés particulièrement intéressants pour la recherche. Ces composés possèdent des propriétés antidouleur qui semblent être complémentaires à celles des dérivés de la morphine. Ces propriétés antidouleur sont recherchées par les patients et font que la consommation illégale de cannabis à usage thérapeutique est en constante croissance. Certains patients préfèrent même consommer du cannabis plutôt que de la morphine pour soulager leurs douleurs car les effets secondaires sont moindres.

2) Résumé succinct de la thèse

Dans ce contexte, l'objectif de nos études est de comprendre ces phénomènes. Pour cela, dans un premier temps, nous avons cherché à comprendre si les effets antidouleur et hypersensibilisants de la morphine sont régis par les mêmes acteurs. Il y a maintenant 20 ans, notre équipe a identifié le récepteur responsable de l'effet antidouleur de la morphine. Par contre, les acteurs responsables des effets indésirables de la morphine à long terme restent mal connus, et plusieurs mécanismes sont proposés et

discutés. L'objet de notre première étude a donc été de déterminer quel est le rôle de ce même récepteur, identifié il y a 20 ans, dans les effets chroniques de la morphine.

Dans un second temps, nous avons voulu comprendre s'il y a des interactions entre les systèmes qui régissent les réponses morphiniques et ceux qui régissent les réponses du cannabis. Ces interactions, nous avons voulu les évaluer particulièrement dans les effets antidouleur et la dépendance morphinique. Cela consiste à suivre les réponses comportementales de souris lors de tests de douleur et de dépendance à une drogue. Afin de pouvoir expliquer les observations comportementales l'étude est complétée par des approches moléculaires et la visualisation des récepteurs cibles par méthodes d'imagerie afin d'observer les modulations induites par les différents traitements réalisés.

3) La thèse dans son contexte

J'ai réalisé ma thèse dans deux laboratoires de recherche. Le premier s'appelle l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC). Ce laboratoire est le plus grand de Strasbourg, il est constitué de 50 équipes de recherche, sur des domaines de sciences du vivant variés et compte environ 750 employés. Au commencement de ma thèse, l'équipe dans laquelle j'ai réalisé la première partie de mon doctorat était constituée de 5 chercheurs, 3 post-doctorants, 4 doctorants, 3 ingénieurs d'études, 2 techniciens. Cette équipe travaille sur les récepteurs responsables des effets de la morphine et de ses dérivés. Elle appartient au département dédié à l'étude de la médecine translationnelle et neurogénétique. De par sa dynamique et la qualité des travaux de ses équipes de recherche, cet institut connaît une renommée internationale.

La seconde partie de ma thèse s'est déroulée dans un autre laboratoire, également strasbourgeois. Ce laboratoire appartient à la faculté de psychologie et se nomme le laboratoire de neurosciences cognitives et adaptatives (LNCA). Il est composé de 4 équipes et d'une cinquantaine de personnes au total. L'équipe dans laquelle je travaille est constituée de 3 chercheurs, 1 post-doctorant, 3 doctorants, 2 ingénieurs. Cette équipe s'intéresse aux adaptations neuronales induites par les drogues, et de façon plus générale aux addictions.

Dans ce contexte, l'école doctorale de Strasbourg, via le ministère de la recherche et de l'enseignement, permet à environ 30 étudiants de master de sciences de la vie d'obtenir un financement pour réaliser une thèse de 3 ans dans un laboratoire strasbourgeois. L'attribution de ces financements se fait sur concours. C'est grâce à ce financement que j'ai pu réaliser une thèse en Neurosciences.

J'ai commencé ma thèse dans le laboratoire spécialisé sur les récepteurs morphiniques (IGBMC), et y ai travaillé sur la douleur durant un an et demi. Ce laboratoire dispose de gros moyens financiers ce qui rend un grand nombre d'expériences matériellement envisageables. De plus, la diversité de thématiques de recherche dans l'institut facilite les potentielles collaborations inter-équipes, et l'accès aux matériels de pointe dans plusieurs disciplines. Mais pour des raisons personnelles et soutenue par ma hiérarchie ainsi que l'école doctorale, j'ai rejoint un autre laboratoire afin de terminer ma thèse. La seconde partie s'est donc déroulée au LNCA, sur une thématique différente, qui vise à identifier les interactions entre un traitement avec des dérivés du cannabis et de la morphine dans la douleur et la dépendance.

4) Ma place dans ce contexte

Depuis toujours, la volonté de comprendre comment la nature fonctionne me passionne. Plus particulièrement, j'ai toujours été attirée par les animaux. Comprendre leur mode de vie, leurs comportements et environnements a occupé et occupe encore aujourd'hui une grande partie de mon temps libre. Après avoir réalisé des stages dans des parcs animaliers et étudié le mode de vie d'animaux, je me suis rendue compte que d'autres aspects de la biologie m'intéressaient comme la physiologie. C'est

donc assez naturellement que j'ai choisi de faire des études de sciences de la vie. Avec les années, la médecine et la pharmacie se sont ajoutées à la liste de mes centres d'intérêt. Ce sont pour ces raisons qu'après une licence de biologie cellulaire et physiologie, j'ai poursuivi mes études en master en sciences du médicament, parcours pharmacologie. Je voulais travailler sur un sujet qui représente un problème de santé publique majeur, et utiliser une approche pharmacologique. Ce sont ces choix qui m'ont dirigée vers l'étude de la douleur et la morphine chronique. De nature créative, déterminée, réfléchie et persévérante, j'ai voulu poursuivre mon travail de master et ai mis en œuvre tout mon possible pour obtenir un financement de thèse. J'ai alors passé le concours du ministère de la recherche et de l'enseignement et obtenu un financement de 3 ans de thèse. Ce financement m'a permis de réaliser un doctorat.

Avec mon équipe de première partie de thèse, nous avons identifié le récepteur responsable de l'hypersensibilité induite par la morphine. C'est une découverte scientifique particulièrement intéressante car elle permettra peut-être d'identifier de nouveaux moyens pour abolir cet effet indésirable, rendant le potentiel antidouleur de la morphine plus important. Cette histoire terminée, je me suis intéressée au rôle de ce même récepteur dans l'addiction à la morphine. Jusque-là, je n'avais jamais étudié la mécanistique de l'addiction, il m'a donc été nécessaire d'apprendre toutes les bases de cette pathologie afin de pouvoir l'étudier plus en détails. Mon équipe de seconde partie de thèse s'intéressant aussi au système qui régit les effets du cannabis, j'ai alors développé mes connaissances sur ce système, en plus de celles concernant l'addiction. Tout cela dans le but de comprendre comment les systèmes qui régissent les réponses à la morphine et ceux qui régissent les réponses au cannabis, sont impliqués dans l'addiction morphinique. En plus d'une adaptation à une nouvelle thématique, il a aussi fallu que je m'adapte à de nouvelles conditions de travail dans un nouvel environnement. Cela m'a demandé beaucoup d'énergie, mais a été particulièrement stimulant et motivant.

II. Déroulement, gestion et coût du projet

1) Préparation et cadrage du projet

a) Evaluation des facteurs de succès et des facteurs de risque

❖ Facteurs de risques, à priori, et solutions pour les minimiser :

Le premier projet portant sur la douleur et la morphine a été réalisé sur des souris génétiquement modifiées chez qui un récepteur (le récepteur mu) n'est plus fonctionnel. Ces souris ne sont pas commerciales et ont été générées dans notre animalerie, au laboratoire. Le risque majeur est que la mutation induise une fertilité amoindrie de nos animaux. Ce risque s'est avéré vrai car nos couples génèrent moins de portées que des souris « sauvages ». Afin d'anticiper au mieux ce risque, il a fallu croiser plus d'animaux qu'habituellement dans le but d'obtenir des couples fertiles et ensuite, il fallait régulièrement suivre les naissances, afin de s'assurer que les couples restent fertiles avec le temps.

Un autre risque majeur est de ne pas être assez rapide à produire les résultats et d'être devancé par une autre équipe de recherche dans le monde. Ce risque est rencontré par tous les chercheurs mais il est particulièrement important sur cette thématique car la recherche y est très active. J'ai réalisé la majorité de l'étude seule alors que certaines équipes font travailler un grand nombre de personnes sur un même projet pour qu'il aboutisse au plus vite. Nous avons tout fait pour être les premiers à révéler le rôle de ce récepteur dans l'hypersensibilité morphinique, mais malheureusement nous n'avons pas eu le privilège de révéler pour la première fois cette découverte au monde scientifique. En effet, une grande équipe américaine nous a devancé de peu (6 mois) et a montré cette découverte dans un article scientifique dans un journal de très fort impact. Cependant, nos résultats sont tout de même en cours de

publication car l'étude que nous avons réalisée est très détaillée et apporte des informations supplémentaires sur le sujet en plus de corroborer celles déjà publiées.

En ce qui concerne la seconde partie de thèse, le facteur de risque principal du projet de recherche est sa réalisation dans le temps imparti. En effet, un sujet de thèse s'écoule classiquement sur une période de 3 ans, et dans mon contexte, il ne m'était attribué plus qu'un an et demi. Afin de remédier à ce problème, avec ma directrice de thèse K. Befort, avons tout mis en œuvre pour obtenir un financement afin de prolonger la durée de la thèse et d'aboutir le projet. Nous avons fait des demandes auprès d'associations d'aide à la recherche qui accordent des bourses d'un an à leurs lauréats. Mais les chances d'obtenir ce type de financement sont faibles étant donné le grand nombre de demandeurs et le faible nombre de financements. Consciente de ce risque, j'ai contacté un grand nombre d'associations et d'entreprises pharmaceutiques ou non afin de savoir s'ils étaient intéressés par le sponsoring de ma 4^{ème} année de thèse. J'ai fait face à de nombreuses réponses négatives, à des interlocuteurs qui ne me répondaient pas. Ces démarches ont nécessité une grande persévérance, de la motivation et de la positivité face aux nombreux échecs. Puis, à force de multiplier les demandes, j'ai eu obtenu un retour positif d'une entreprise qui me propose un financement de 6 mois minimum que j'ai accepté. De ce fait, le projet pourra être poursuivi 6 mois supplémentaires.

Enfin, un autre risque important est le manque de moyens financiers. Nous sommes dans un laboratoire aux ressources financières actuellement modestes et mon projet est coûteux car il implique, entre autres, des animaux génétiquement modifiés dont l'achat est très cher. Etant donné ce risque, j'avais demandé à l'entreprise qui a accepté de me sponsoriser d'attendre les résultats des appels d'offre auxquels j'ai postulé afin de déterminer si cette donation sera utilisée comme salaire ou bien comme argent de fonctionnement. Dans le meilleur des cas, ma candidature aurait pu être retenue et à ce moment-là nous aurions disposé d'un prolongement de thèse et en plus de moyens pour financer de façon optimale les expériences réalisées durant cette période. A ce jour, toutes les réponses aux appels d'offre ont été rendues et sont malheureusement négatives. Mais grâce à l'anticipation de ces éventuelles réponses négatives, j'ai tout de même un prolongement de 6 mois de thèse.

❖ Facteurs de réussite, à priori :

Mon classement et mes notes de master me donnaient de bonnes chances d'obtenir la bourse ministérielle permettant de réaliser ma thèse.

Le projet sur l'hypersensibilité morphinique a été réalisé dans une équipe spécialisée sur la thématique. La grande majorité des techniques nécessaires à l'obtention des résultats étaient utilisées en routine au laboratoire. Le risque de problèmes techniques majeurs était donc restreint.

Les animaux génétiquement modifiés utilisés étaient élevés dans l'équipe depuis des années. Cela nous a permis d'anticiper les problèmes de reproduction déjà connus et de générer plus de couples afin d'avoir assez d'animaux d'expérimentation.

En ce qui concerne les travaux de seconde partie de thèse, ils sont réalisés au sein d'une équipe spécialisée sur l'addiction. En parallèle, j'apporte une expertise sur le comportement douloureux. Ensemble, ces compétences donnaient de bonnes chances de réussite technique.

b) Choix des partenaires

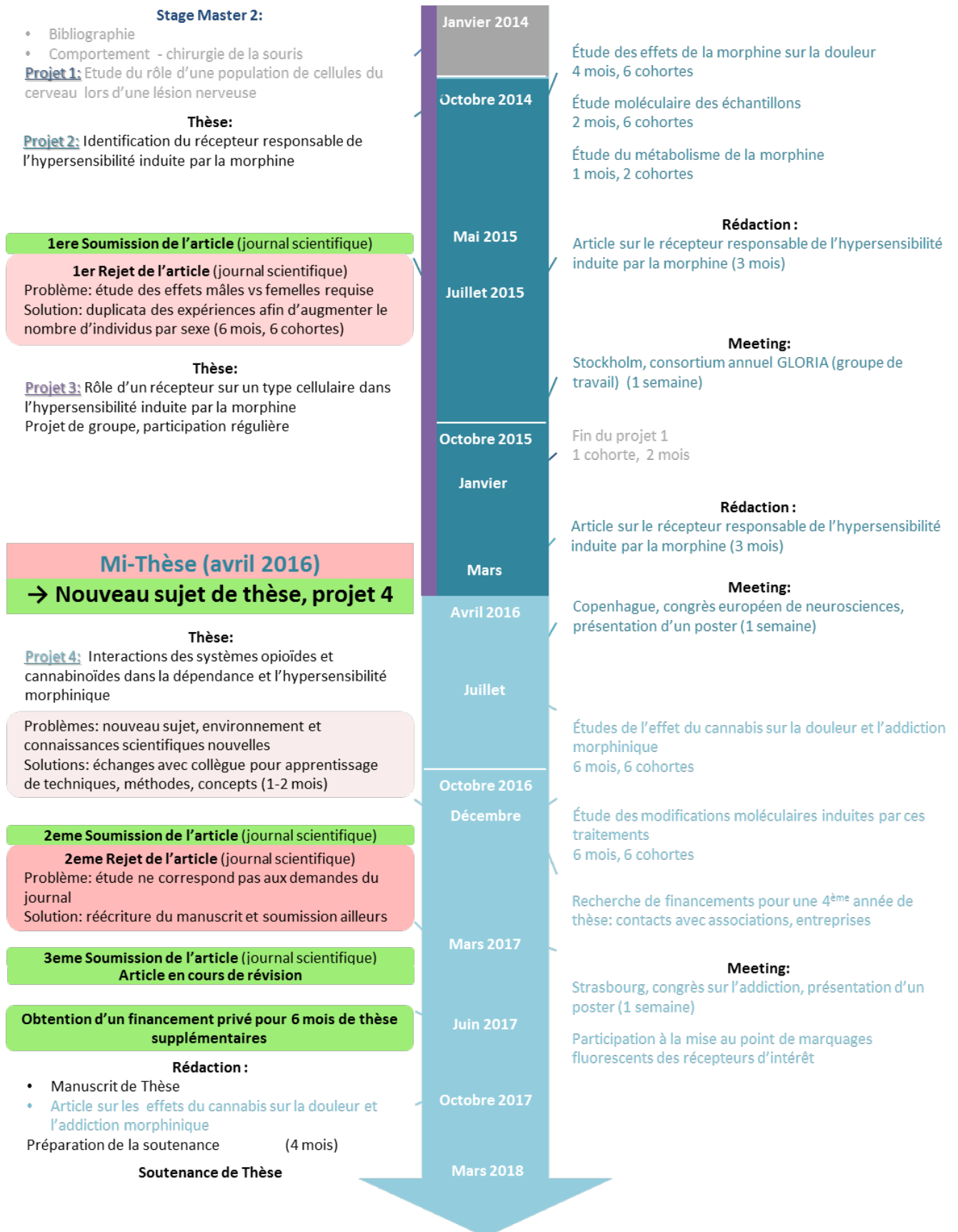
Pour la première partie de thèse, les techniques d'études comportementales et moléculaires classiquement utilisées au laboratoire n'ont pas nécessité de collaborations, par contre, nous avons complété nos expériences par des études du métabolisme de la morphine. Pour réaliser ces expériences, nous avons collaboré avec une équipe strasbourgeoise (Dr Y. Goumon, INCI) qui travaille sur ces aspects.

Ces travaux sur l'hypersensibilité ont conduit à la réalisation d'une revue faisant le point sur ce qui est connu sur l'hypersensibilité induite par la morphine. Cette revue a été rédigée en collaboration avec des membres d'une équipe strasbourgeoise spécialisée sur la thématique (Dr F. Simonin, ESBS).

Les travaux réalisés sur l'addiction, en deuxième partie de thèse, utilisent des animaux génétiquement modifiés exprimant les récepteurs à la morphine de façon fluorescente. Ces souris sont générées par un laboratoire strasbourgeois, qui étudie l'expression de ces récepteurs dans le cerveau et l'outil de couplage à la fluorescence rend la visualisation des récepteurs plus aisée. Nous utilisons également ces souris pour étudier les interactions entre les systèmes opioïde et cannabinoïde et elles proviennent de ce laboratoire avec lequel nous collaborons (Dr D. Massotte).

2) Conduite du projet

Feuille de route de la thèse



Montant en euros TTC		Coûts totaux en euros					
Nature de la dépense		Détails		Nombre d'unités	Coût unitaire moyen		Total
Ressources humaines		Salaire brut	Charges				
Doctorant		1600	800	36	2400		86400
Encadrant 1		2500	1250	18	3750		67500
Encadrant 2		4000	2000	18	6000		108000
Technicien		1200		12	1200		14400
Sous-total Ressources humaines							276300

consommables							
Fournitures expérimentales				Prix unitaire			
Souris	C57			50*2	25		2500
Souris	transgénique	4 sem repro	14 sem	500	3/semaine		21000
gants		11000	0.1				1100
Tubes Falcon	50mL	250	184 les 500 unités				92
Tubes eppendorf	1.5mL	2000	50 les 500 unités				200
	0.5mL	200	50 les 500 unités				20
Instruments chirurgie		set	400				400
Lames		300	5.35 les 50				32.1
Lamelles		300	129.2 les 1000				39.1
pointes	10ul	10000	48 les 1000				480
	200ul	10000	45.3 les 1000				453
	1000ul	10000	45.3 les 1000				453
Produits chimiques							
PFA 32%			20	44			880
Morphine			200mg	15 le mg			3000
Acea			65mg	300 les 25mg			900

Naloxone			10mg	174 les 300mg		5.22
Naltrexone			10mg	174 les 300mg		5.22
M3G			20mg	30 le mg		600
Minocycline			200mg	6 les 100mg		12
PBS 10x			4	163 les 4L		163
NaCl 0.9			5l	20.49 les 500ml		205
kétamine			1	73 les 1ml		73
xylazine			0.5	300 les 25g		6
pentobarbital			10ml	138 les 1ml		1380
Amorces- Primers			30 couples	10 le couple		300
qRT-PCR		96 puits	40	100 la plaque		4000
		384 puits	20	200 la plaque		4000
Anticorps- immunomarquages						
CB1			1 tube	500		500
biotinylé goat			1 tube	300		300
Alexa fluor 594			1 tube	300		300
cFOS			1 tube	500		500
Dapi			5mg	95 pour 250mg		1.9
mowiol			6g	26.8 les 50g		3.21
Cryomatrix			500mL	18 les 100mL		90
Sous-total consommables						44293.75

Infrastructures						
Entretien, gardiennage, secrétariat						Forfait, payé par université -Montant inconnu-
Loyer des locaux						
Electricité, eau, chauffage						
Ordinateur de bureau			1	800		800
Logiciels de bureau			4	100 le logiciel		400
Sous-total Infrastructures						1200

Déplacements						
Missions en France						
	GDR		gratuit			

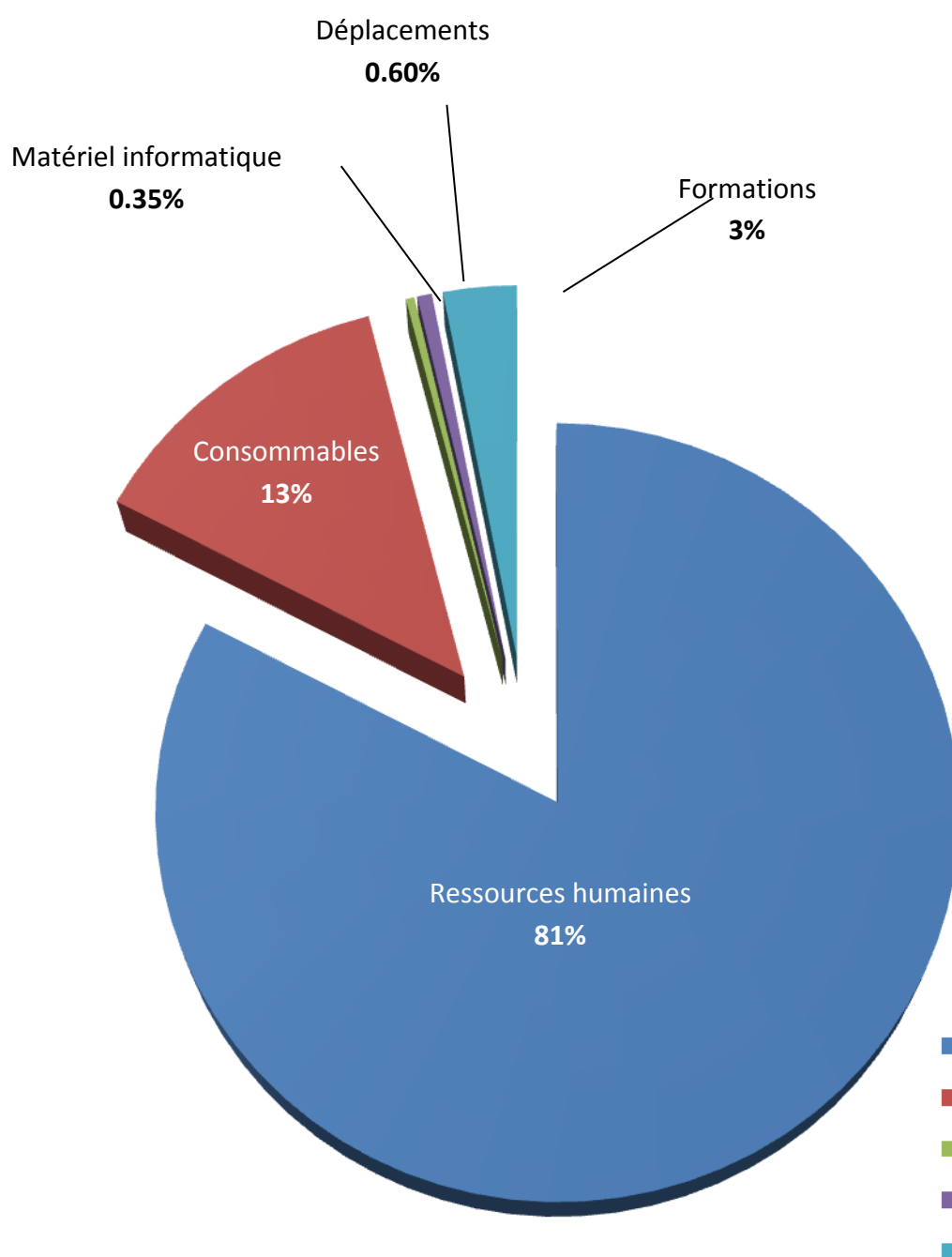
	Tours					
	Transports		88			88
	Hôtel		140			140
Missions à l'étranger						
	Gloria meeting Stockholm		gratuit			
	Transports		230			230
	Hôtel		472			472
	FENS Copenhague		215			215
	Transports		305			305
	Hôtel		615			615
Sous-total déplacements						2065

Fournitures de bureau						
Cahiers spirale			5	1.5		7.5
Cahiers Laboratoire			3	10		30
Feutres	Fin		5	1		5
	épais		5	1		5
Divers	crayons		10	1		10
	Stylos bille		10	1		10
Autres achats						
Poster		A0	4	15		60
Sous-total consommables						127.5

Formations						
Formations			100	100h/h		10000
		NCT				
		Métier de chef de projet				
Inscriptions						1800
		Sécurité sociale étudiante assurance responsabilité civile				100
Sous-total formations						11900

TOTAL (€)	335886.25

Estimation du coût consolidé de la thèse



III. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles illustrées par des exemples

Scientifique

Ma thèse s'est déroulée dans deux laboratoires de recherche, sur deux thématiques différentes, dans des environnements au fonctionnement totalement différents. Grâce à cette thèse atypique, j'ai pu utiliser des techniques scientifiques variées, aussi bien sur le plan de l'étude comportementale, que sur le plan de la biologie moléculaire et cellulaire. J'ai participé à la mise au point de protocoles que nous n'utilisions pas au laboratoire. Cette grande diversité de méthode et de techniques a rendu ma thèse particulièrement enrichissante d'un point de vue technique. J'ai aussi diversifié mes connaissances théoriques en abordant des thématiques différentes entre ma première et ma seconde partie de thèse. De par ces aspects, ma thèse a été particulièrement riche.

Communication et adaptation

Le laboratoire où j'ai réalisé ma première partie de thèse, est situé dans un institut comptant environ 800 employés, nécessitant une organisation importante afin que la communication soit optimale. Le second laboratoire est d'une taille beaucoup plus restreinte, une cinquantaine de personnes, favorisant la communication orale et les échanges entre équipes. J'ai donc eu l'opportunité de côtoyer des environnements aux modes de communication différents et su faire preuve de flexibilité de ce point de vue. En plus d'avoir développé mes capacités de communication avec mes collègues, j'ai aussi eu la chance de pouvoir présenter mes résultats lors de congrès internationaux, en France et à l'étranger.

Encadrement

J'ai eu la chance de pouvoir encadrer des étudiants pharmaciens en travaux dirigés de pharmacologie et participé à des communications de vulgarisation avec le grand public. De plus, cette année j'ai participé à l'encadrement d'une étudiante en alternance en licence de biotechnologies et j'ai encadré une étudiante en première année de master pour une période de 2 mois. Toutes ces expériences de communication et d'encadrement ont confirmé le fait que j'aime interagir et travailler en groupe, que j'aime gérer et que je suis une personne rigoureuse.

Autonomie

Durant ma première partie de thèse, j'ai quasiment exclusivement réalisé mes expériences seule. Après une courte période d'encadrement technique par un membre de l'équipe, j'ai très vite appris à travailler seule et à organiser mes journées de travail. Cela a démontré que je sais faire preuve d'une grande autonomie au travail et ce sur différents aspects. Bien qu'interagissant beaucoup plus avec mon équipe depuis mon changement de laboratoire, je reste autonome dans mes manips et grâce à la confiance que m'accorde ma directrice de thèse, je suis entièrement libre d'organiser mon projet comme cela me semble le plus optimal.

Relationnel

D'un point de vue humain, je suis ouverte à la discussion et toujours à l'écoute lorsque quelqu'un en a besoin. Réciproquement, lorsque je rencontre des difficultés, j'ose en parler à mon entourage et à ma hiérarchie afin de trouver ensemble des solutions dans le but de mener à bien notre projet, et ce malgré les obstacles. De par mon caractère persévérant et déterminé, j'ai toujours su prendre le dessus pour poursuivre mon projet selon mes motivations et convictions et me réadapter rapidement à un changement radical d'environnement. Concrètement, j'ai dû faire face à ce type de situation lors de mon changement de laboratoire de recherche. J'ai contacté ma hiérarchie ainsi que l'école doctorale de

Strasbourg afin de leur faire part des difficultés rencontrées lors de ma première partie de thèse et ensemble, nous avons pris la décision de poursuivre cette thèse dans un autre environnement.

Organisation

Mes expériences professionnelles ainsi que la thèse m'ont permis de développer mes capacités organisationnelles. La thèse se déroule sur une période limitée durant laquelle nous devons faire face à de nombreux imprévus et organiser au mieux nos journées de travail et notre projet permet de gagner du temps, et d'appréhender plus positivement les imprévus. En pratique, lorsque j'entreprends un nouveau projet, je cherche à le cerner au maximum, et à évaluer ses risques et limites. Cela peut paraître être une perte de temps à priori, mais il s'est déjà avéré que je ne lance pas une expérience car les chances de réussite étaient trop faibles par rapport au coût, au temps nécessaire et aussi aux considérations éthiques.

Ethique

En effet, je travaille en biologie moléculaire et cellulaire, certes, mais la plupart de mes expériences portent sur des animaux et d'un point de vue éthique, je me dois de respecter au maximum chaque individu. Cela se traduit par une évaluation préalable de la gêne occasionnée que je cherche à limiter.

Efficience

J'ai aussi appris à faire preuve d'efficience, c'est-à-dire à faire plus en un temps limité et en consommant moins. Ce sens de l'efficience est particulièrement important lorsqu'on travaille avec des animaux, comme moi. Pour chaque expérience nécessitant des animaux, je cherche à réaliser un maximum d'études sur un groupe d'animaux afin de ne pas avoir à reproduire l'expérience plus tard par manque de données. Cette efficience est une caractéristique indispensable au fonctionnement de mon laboratoire actuel : notre laboratoire dispose de moyens financiers très limités et nous devons être très vigilants face aux dépenses effectuées.

Marketing

Motivée par le sujet de ma seconde partie de thèse et voulant aboutir mes travaux sur l'addiction, j'ai contacté des entreprises pour qu'ils acceptent de me sponsoriser. J'ai donc dû les convaincre de l'intérêt de sponsoriser un projet comme le mien. J'ai leur ai expliqué quel était l'intérêt médical pour la société et quel pourrait être l'impact pour leur entreprise (publicité indirecte). Pour cela, j'ai utilisé des techniques de vente et j'ai cherché à vendre mon projet de thèse comme un produit marketing favorisant le développement d'une image positive pour une entreprise qui soutien la recherche contre un problème de santé publique majeure.

Négociation

Egalement pendant cette expérience de demande de financement de 4^{ème} année, j'ai aussi su faire preuve de persévérance et de négociation. En effet, après obtention d'un prolongement de 6 mois de thèse, j'ai proposé à l'entreprise d'attendre avant de finaliser son don afin de connaître les résultats des appels d'offre et à ce moment là, de déterminer à l'utilisation des ce don plutôt comme financement de thèse ou d'argent de fonctionnement.

IV. Résultats et impacts des recherches

Mes travaux de première partie de thèse vont permettre de donner lieu à 2 publications scientifiques dans des journaux de renommée internationale. Le premier article a été publié en juillet 2016, dans le journal scientifique « Neuroscience ». C'est un article qui fait un état des lieux des connaissances sur l'hypersensibilité morphinique, aussi appelé « revue », rédigée en collaboration avec des chercheurs d'un autre laboratoire strasbourgeois. Cette revue en un an a été citée comme référence 8 fois, dont des citations dans des journaux de très grande renommée. Les résultats de mes travaux de première partie de thèse sont quant à eux en cours de publication, également dans un journal scientifique international, « Scientific Reports ».

Concrètement, mes travaux concernent des problèmes de santé publique majeure, telles la douleur et l'addiction. Les travaux sur l'hypersensibilité morphinique ont permis d'identifier le rôle essentiel d'un récepteur dans ce phénomène. A plus long terme, ces résultats aideront certainement au développement de nouvelles thérapies antidouleur dénuées d'effets hypersensibilisants. Cela permettra une meilleure prise en charge de la douleur et une amélioration considérable de la qualité de vie de la population. Les objectifs des travaux de seconde partie de thèse sont comparables puisqu'ils visent à comprendre quelles sont les interactions entre les systèmes régissant les réponses à la morphine et au cannabis dans la dépendance et l'hypersensibilité morphinique. Ici, toujours dans le cadre d'un traitement répété à la morphine, nous cherchons à identifier quelles sont les interactions entre ces deux systèmes, mais aussi quels sont les effets de l'association d'un traitement à base de dérivés du cannabis à un traitement morphinique. On a pu constater que ce type d'association thérapeutique peut mener à un accroissement de l'effet antidouleur de la morphine. Cela insinue qu'en adoptant ce type d'association thérapeutique, nous pourrions peut-être observer un effet antidouleur fort malgré le fait de diminuer les doses de morphine administrées. En parallèle, nous avons observé que l'ajout de cannabis à un traitement morphinique permet de diminuer les signes de dépendance physique à la morphine. En clair, le cannabis augmenterait l'effet antidouleur de la morphine tout en diminuant son potentiel addictogène.

Ces résultats pourraient avoir un impact médical et sociétal. En effet, l'impact médical est relativement évident aux vues des effets d'un tel traitement. Mais l'utilisation de dérivés du cannabis, même à usage thérapeutique et pour soulager la douleur, reste interdit en France. Ce type de résultats permettra peut-être une avancée des lois en faveur de la légalisation de ces composés pour la prise en charge clinique des patients. N'oublions pas que la douleur est un problème de santé publique majeure en France, mais aussi dans le monde de façon générale, et que nous nous devons de faire avancer ces thérapies tout en limitant au maximum le développement d'effets indésirables chez les malades.

V. Identification des pistes professionnelles

Au fil de la thèse, mes volontés d'orientation professionnelle ont évolué. Initialement, je me destinais à un parcours « classique » dans la recherche, c'est-à-dire composé d'une thèse, suivie d'un premier post-doctorat à l'étranger, puis d'un second, et éventuellement d'un troisième afin de pouvoir postuler aux concours de la fonction publique en France pour obtenir un poste de chargé de recherche. Mais ces désirs sont désormais obsolètes. En effet, grâce aux nombreuses formations que j'ai pu suivre durant ma thèse, à la thèse elle-même avec son déroulement original dans deux environnements différents, et les discussions que j'ai pu avoir avec des professionnels du privé ou du public, je sais aujourd'hui que je ne suis pas faite pour la fonction publique. Les moyens financiers y sont très difficilement accessibles, si bien que les chercheurs passent à ce jour la quasi-majorité de leur temps à postuler à des appels d'offre pour financer leur recherche. Je suis consciente que la liberté qui existe dans la recherche publique n'est accessible nulle part ailleurs et que les méthodes de travail du privé sont beaucoup plus strictes rendant la part de créativité du travail moins importante. Mais étant de nature plutôt stricte et rigoureuse, je pense que ce type d'environnement pourrait me convenir. Aussi, j'ai découvert avec le temps que j'aime encadrer, organiser et guider les gens qui m'entourent. J'aimerais

mettre en avant cette forme de leadership dans mon travail. Cela pourrait s'illustrer à travers un poste à responsabilités de type gestion d'équipe. Les demandes de financement de 4^{ème} année de thèse qui ont duré plusieurs mois, nécessité du mailing, de nombreux contacts téléphoniques et des entretiens physiques, m'ont permis de réaliser que la négociation, la communication et le marketing sont des disciplines qui me passionnent. Tous ces éléments font qu'à ce jour les métiers de **responsable scientifique régional** ou **chef de produit marketing** m'intéresseraient beaucoup.

Enfin, un autre domaine continue toujours à m'attirer, la pharmacologie. Titulaire d'un diplôme de master en pharmacologie et ayant travaillé sur l'effet de traitements pharmacologiques durant ma thèse, j'aimerais pouvoir mettre en avant cette expertise dans l'exercice de mon futur emploi. Pour ces raisons, je pense que le métier de **chargé de pharmacovigilance** pourrait me correspondre. De plus, et contrairement aux autres propositions d'emplois citées plus haut, ce poste est ouvert aux débutants. Ce poste nécessite également une communication avec un public large et varié, mais aussi un sens important de la gestion du risque, activités que j'ai su gérer durant ma thèse. Pour ces raisons et aux vues de mes caractéristiques, je pense postuler à des offres d'emploi de chargé de pharmacovigilance lors de l'obtention de ma thèse.

Le récepteur opioïde Mu et les interactions entre systèmes opioïde et cannabinoïde dans les effets nociceptifs et addictogènes de la morphine.

Résumé

Le système opioïde contrôle la douleur et la récompense, et le récepteur opioïde mu est la cible moléculaire de l'analgésie et de la dépendance aux opiacés. Dans la première partie de la thèse, nous avons montré que ce récepteur est également nécessaire au développement de l'hyperalgie se développant lors d'une administration chronique de morphine. Dans la seconde partie de thèse, nous avons étudié l'impact des interactions entre systèmes opioïde et cannabinoïde sur les effets associés à l'administration chronique de morphine. Nous avons exploré les effets d'un prétraitement avec un agoniste sélectif du récepteur cannabinoïde CB1, l'arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA) sur le développement de réponses nociceptives morphiniques, le sevrage, la récompense et des comportements naturels. L'étude comportementale a été complétée par des analyses transcriptionnelles et fonctionnelles afin d'identifier les processus neuroadaptatifs mis en jeu. Nos travaux montrent que l'activation des récepteurs CB1 et Mu présentent des effets bénéfiques sur les paramètres comportementaux associés à l'addiction, suggérant un intérêt thérapeutique potentiel à associer ces composés en clinique.

Mots-clés: opioïde, cannabinoïde, douleur, récompense, sevrage, addiction, Mu, CB1

Summary

The opioid system controls pain and reward, and the Mu opioid receptor plays a central role in these effects. In the first part of the thesis, we showed that Mu receptor is also involved in the development of hyperalgesia induced by chronic opiate exposure. In the second part of the thesis, we studied the impact of opioid and cannabinoid interactions on effects associated to chronic morphine administration. We explored the effects of a pretreatment with a CB1 cannabinoid receptor selective agonist, arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA), on morphine-associated nociceptive, withdrawal, reward and naturalistic behaviors. To complete this behavioral study, we performed transcriptional and functional analyses to identify the neuroadaptive processes involved. Our study demonstrates that dual activation of CB1 and Mu receptors has a beneficial effect on behavioral parameters related to addiction, pointing to potential usefulness of combining both medications for therapeutic interventions.

Keywords: opioid, cannabinoid, pain, reward, withdrawal, addiction, Mu, CB1