

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA VIE

THESE

Discipline : Sciences du vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par

Alexis LAUX-BIEHLMANN

Doctorat en Neurosciences

NOUVELLES DONNÉES SUR LA MORPHINE ENDOGÈNE

*Description de sa localisation dans le système nerveux central
et développement d'outils biotechnologiques
et thérapeutiques*

Soutenue publiquement le 16 septembre 2011

Membres du Jury :

Dr. Yannick GOUMON

Directeur de Thèse

Pr. Guy SIMONNET

Rapporteur Externe
Président du jury

Pr. Anny CUPO

Rapporteur Externe

Dr. Frédéric SIMONIN

Examineur

À mon grand-père

MERCI

Au **Dr. Marie France BADER** pour m'avoir accueilli au sein de l'Institut de Neurosciences Cellulaires et Intégratives.

Au **Pr. Pierrick POISBEAU**, pour nous avoir accueillis dans son équipe, mais aussi pour m'avoir donné, dès les premiers cours de licence, l'envie de faire de la recherche.

Aux membres du jury, le **Pr. Anny CUPO**, le **Pr. Guy SIMONNET** et le **Dr. Frédéric SIMONIN** pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et d'avoir consacré leur temps à l'évaluation de mes travaux.

Au **Dr. Yannick GOUMON**, mon directeur de thèse.

Yannick, merci de m'avoir transmis ta passion pour la science, ta rigueur et ta persévérance. Merci aussi de m'avoir laissé libre dans mes travaux de recherche, de m'avoir laissé « m'éclater » pendant 3 ans tout en étant toujours là pour m'encadrer et m'aider quand il le fallait, mais aussi pour ta bonne humeur de tous les jours et pour les nombreux bons moments que nous avons passés ensemble, que ce soit en congrès (Genève, Amsterdam) ou derrière la paillasse. Et merci pour toutes les choses que je n'ai pas énumérées, mais la liste serait trop longue.

Mais aussi,

A **Denise**, pour son aide technique, son énergie communicative et ses rires quotidiens. A **Jinane** pour son soutien tout au long de la rédaction. A toute l'équipe « Exploration fonctionnelle de la douleur ».

Aux nombreux étudiant(e)s de passage pour les bons moments passés avec eux : **Nadia, Morgane, Julie, Marion, Greg, Ouria, Anais, Meghna** et **Julie**.

Au **Dr. Dominique AUNIS** directeur dans l'ancienne unité INSERM U575, pour m'avoir accueilli et permis de débiter ma thèse.

A tous les membres de l'ancienne unité INSERM U575, notamment le **Dr. Marie-Hélène METZ-BOUTIGUE, Martine, Charlotte, Patricia, Sylvie** et **Guy**.

Au personnel de l'animalerie, à **Dominique CIOCCA** et **Sophie REIBEL**, toujours disponibles et prêtes à apporter de l'aide.

A nos différents collaborateurs, et notamment le **Dr. Alain VAN DORSSELAER** et le **Dr. François DELALANDE**.

Pour terminer, un grand merci à ma famille, mes amis, et à Sophie pour m'avoir soutenu pendant ces trois années de thèse.



TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----------|
| AVANT-PROPOS | 1 |
| CHAPITRE I : INTRODUCTION | 5 |
| I. LA MORPHINE | 7 |
| I.1. De l'opium à la morphine | 7 |
| I.1.a. L'histoire de l'opium | 7 |
| I.1.b. Découverte de la morphine | 9 |
| I.1.c. Utilisation de la morphine | 9 |
| I.1.d. Quelques chiffres | 11 |
| I.2. Son effet analgésique | 11 |
| I.2.a. Nociception et douleur | 11 |
| I.2.b. Transmission de l'information nociceptive | 11 |
| I.2.c. Le contrôle de l'information nociceptive | 13 |
| I.2.d. L'effet analgésique de la morphine | 15 |
| I.3. Ses autres effets | 15 |
| I.3.a. Effets sur le système respiratoire | 15 |
| I.3.b. Effets sur le système gastro-intestinal | 15 |
| I.3.c. Effets sur le système immunitaire | 16 |
| I.4. La dépendance | 16 |
| I.4.a. La dépendance à la morphine et à l'héroïne | 16 |
| I.4.b. Mécanismes neurobiologiques de la dépendance | 17 |
| I.5. Le catabolisme de la morphine | 19 |
| I.5.a. Le catabolisme de la morphine chez l'homme | 19 |
| I.5.b. Les glucuronides de la morphine | 21 |
| I.5.c. Autres catabolites | 21 |
| I.6. Les protéines liant la morphine | 22 |
| II. LES RÉCEPTEURS AUX OPIOÏDES | 23 |
| II.1. Leur découverte | 23 |
| II.1.a. Découverte des récepteurs liant les opioïdes | 23 |
| II.1.b. Les différents types de récepteurs | 23 |
| II.2. Les récepteurs MORs | 25 |
| II.2.a. Les différents variants d'épissage | 25 |
| II.2.b. Leur localisation | 26 |
| II.2.c. Variants d'épissage et liaison ligands/récepteurs | 27 |
| II.2.d. La transduction du signal | 27 |
| II.2.e. L'oligomérisation des récepteurs opioïdes | 31 |
| III. LES LIGANDS ENDOGÈNES | 33 |
| III.1. Les ligands peptidiques endogènes | 33 |
| III.1.a. Les enképhalines | 33 |

| | |
|---|------------|
| III.1.b. La β -endorphine | 33 |
| III.1.c. Les dynorphines | 35 |
| III.1.d. Les endomorphines | 37 |
| III.1.e. La nociceptine/orphanine FQ | 37 |
| III.1.f. Les peptides endogènes anti-opioïdes : le cas du neuropeptide FF | 37 |
| III.2. Les ligands opiacés endogènes : histoire de la morphine endogène | 38 |
| IV. LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DE LA MORPHINE ENDOGÈNE | 40 |
| IV.1. Mise en évidence de la voie de biosynthèse chez les mammifères | 40 |
| IV.2. La biosynthèse de morphine endogène : une analogie avec les plantes | 41 |
| V. LOCALISATION DE LA MORPHINE ENDOGÈNE CHEZ LES MAMMIFÈRES | 47 |
| V.1. Au sein du système nerveux central | 47 |
| V.2. En périphérie | 48 |
| VI. QUELS RÔLES POUR LA MORPHINE ENDOGÈNE | 50 |
| VI.1. En périphérie : stress et système immunitaire | 50 |
| VI.1.a. Morphine endogène, cellules chromaffines et stress | 50 |
| VI.1.b. Morphine endogène et système immunitaire | 50 |
| VI.2. Les rôles connus et envisagés au sein du SNC | 51 |
| VI.2.a. La morphine endogène : un nouveau neurotransmetteur | 51 |
| VI.2.b. La morphine endogène et le contrôle de la nociception | 52 |
| VI.2.c. La morphine endogène et mémoire | 52 |
| VI.2.d. La morphine endogène et l'addiction | 53 |
| | |
| CHAPITRE II : OBJECTIFS | 55 |
| I. LA MORPHINE ENDOGÈNE ET LA COMMUNAUTÉ SCIENTIFIQUE | 57 |
| II. MES OBJECTIFS | 59 |
| | |
| CHAPITRE III : RÉSULTATS | 61 |
| | |
| PARTIE 1 : CARTOGRAPHIE DE LA MORPHINE ENDOGÈNE ET DE SES COMPOSÉS DÉRIVÉS DANS LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL DE SOURIS | 65 |
| I. RÉSUMÉ | 65 |
| I.1. Contexte et question posée | 65 |
| I.2. Approches & Résultats | 65 |
| I.3. Conclusions | 67 |
| II. PUBLICATION 1 | 69 |
| III. PUBLICATION 2 | 99 |
| PARTIE 2 : IDENTIFICATION DE PROTÉINES DE LIAISON DES ALCALOÏDES ENDOGÈNES ET EXOGÈNES : LA PEBP ET LA CRÉATINE KINASE | 119 |
| I. RÉSUMÉ | 119 |
| I.1. Contexte et question posée | 119 |
| I.2. Approches & Résultats | 120 |
| I.3. Conclusions | 122 |
| II. PUBLICATION 3 | 125 |
| III. PUBLICATION 4 | 137 |

| | |
|--|------------|
| PARTIE 3 : UNE APPLICATION POSSIBLE DE LA DISSOCIATION DES COMPLEXES PROTÉINES-MORPHINE : LE DOSAGE DE LA MORPHINE ENDOGÈNE ET EXOGÈNE DANS ÉCHANTILLONS SANGUINS | 153 |
| I. RÉSUMÉ | 153 |
| I.1. Contexte et question posée | 153 |
| I.2. Approches & Résultats | 154 |
| I.3. Conclusions | 155 |
| II. PUBLICATION 5 | 157 |
| | |
| CHAPITRE IV : DISCUSSION | 163 |
| | |
| I. LA SYNTHÈSE DE LA MORPHINE ENDOGÈNE AU SEIN DU SNC : DERNIÈRES AVANCÉES | 165 |
| I.1. La synthèse au sein des cellules catécholaminergiques, une généralité ? | 165 |
| I.2. L'hypothèse de la recapture de précurseurs | 167 |
| I.2.a. La recapture de dopamine | 167 |
| I.2.b. La recapture de THP | 168 |
| I.3. Quelles enzymes impliquées ? | 168 |
| I.3.a. La voie de la dopamine | 168 |
| I.3.b. La monoamine-oxydase | 169 |
| I.3.c. Les méthyltransférases | 169 |
| I.3.d. CYP2D6 | 171 |
| I.3.e. De nouvelles enzymes ? | 171 |
| I.4. Les intermédiaires de synthèse | 173 |
| I.4.a. (R)-THP ou (S)-THP ? | 173 |
| I.4.b. Le 4-HPAA, un nouvel intermédiaire de synthèse ? | 175 |
| I.4.c. Un autre intermédiaire possible, l'octopamine | 175 |
| I.5. Un autre produit final que la morphine ? | 177 |
| I.5.a. M6G/M3G | 177 |
| I.5.b. M6P/M3P | 179 |
| I.5.c. Autres produits | 179 |
| II. LOCALISATION, PROTÉINES DE LIAISONS ET RÔLES DE LA MORPHINE ENDOGÈNE AU SEIN DU SNC | 180 |
| II.1. La morphine endogène en tant que neurotransmetteur ou neuromédiateur ? | 180 |
| II.1.a. Le cas du cervelet | 180 |
| II.1.b. Une libération rétrograde de morphine endogène | 181 |
| II.2. Alcaloïdes endogènes et neurones GABAergiques | 181 |
| II.2.a. Une seule sous-population de neurones GABAergiques contient-elle de la morphine endogène ? | 181 |
| II.2.b. Alcaloïdes endogènes et cellules en paniers | 183 |
| II.3. Alcaloïdes endogènes et astrocytes | 183 |
| II.3.a. Synthèse ou recapture ? | 183 |
| II.3.b. Un catabolisme de la morphine | 185 |
| II.3.c. Les astrocytes : un réservoir d'alcaloïdes endogènes | 187 |
| II.4. Alcaloïdes endogènes et protéines de liaisons | 189 |
| II.4.a. La localisation dans le SNC de la créatine kinase, une similarité avec la localisation de la morphine endogène | 189 |
| II.4.b. La morphine endogène pourrait-elle avoir une implication dans le métabolisme énergétique au sein du SNC ? | 190 |
| II.4.c. La créatine kinase en tant que chélateur ou transporteur des alcaloïdes endogènes | 191 |
| II.4.d. La PEBP et l'effet analgésique de la M6G | 191 |
| II.5. Morphine endogène, quelles concentrations ? | 193 |
| II.5.a. Concentrations connues de la morphine endogène au sein du SNC | 193 |
| II.5.b. Quels effets pour quelles concentrations ? | 195 |

| | |
|--|------------|
| II.6. Morphine endogène, neurogenèse et plasticité structurale | 195 |
| II.6.a. Rôles connus de la morphine exogène dans la neurogenèse et la plasticité structurale | 195 |
| II.6.b. Morphine endogène, neurogenèse et plasticité structurale | 197 |
| III. MORPHINE ENDOGÈNE ET PATHOLOGIES | 199 |
| III.1. Tolérance, hyperalgésie induite par les opiacés et catabolisme | 199 |
| III.1.a. Tolérance et catabolisme des opiacés | 199 |
| III.1.b. Implication de la morphine endogène dans l'hyperalgésie induite par les opioïdes exogènes. | 201 |
| III.2. La Schizophrénie | 202 |
| III.2.a. Une pathologie « hypermorphinergique » ? | 202 |
| III.2.b. Morphine endogène, schizophrénie et hypoanalgésie | 203 |
| III.3. La maladie de Parkinson | 204 |
| III.3.a. Une autre pathologie « hypermorphinergique » | 204 |
| III.3.b. La morphine endogène et les troubles moteurs dans la maladie de Parkinson | 204 |
| III.3.c. Symptômes douloureux dans la maladie de Parkinson et morphine endogène | 205 |
| III.4. Lithium et morphine endogène | 207 |
| | |
| CHAPITRE V : PERSPECTIVES | 209 |
| | |
| I. UTILISATION DU LITHIUM ET IDENTIFICATION D'UN PEPTIDE DE LIAISON | 211 |
| II. PERSPECTIVES BIOTECHNOLOGIQUES | 211 |
| II.1. Dissociation des complexes protéines-morphine pour le dosage de la morphine endogène et exogène | 211 |
| II.2. Détection de la morphine endogène à l'aide d'un peptide de liaison | 212 |
| II.3. « Chélation » de la morphine endogène, <i>in vivo</i> , à but technologique | 212 |
| III. PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES | 213 |
| III.1. Traitement des maladies « hypermorphinergiques » | 213 |
| III.2. Augmentation de l'efficacité de la morphine | 214 |
| III.2.a. Co-injection peptide de liaison-morphine | 214 |
| III.2.b. 3.2.b. Co-injection Lithium-morphine | 214 |
| III.3. Utilisation du lithium pour la dissociation de complexes protéines-alcaloïdes endogènes à des fins thérapeutiques | 215 |
| | |
| LISTES | 217 |
| | |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | 218 |
| LISTE DES FIGURES | 220 |
| LISTE DES TABLEAUX | 221 |
| LISTE DES PUBLICATIONS | 222 |
| LISTE DES COMMUNICATIONS | 223 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE | 225 |



AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

Les préparations d'opium à partir du pavot (*Papaver somniferum*) ont été utilisées depuis plusieurs millénaires pour le traitement de la douleur. En 1803, Sertürner isola à partir de l'opium une substance cristallisée correspondant à un alcaloïde végétal. Cet alcaloïde fut nommé *morphium* (morphine), car ses effets rappellent le dieu de la Grèce antique Morphée, dieu du sommeil et des rêves. C'est en 1954 que fut décrite pour la première fois la théorie proposant que la morphine produirait ses effets *via* une interaction avec un récepteur spécifique. Cependant, ce n'est que vingt ans plus tard en 1973, que les récepteurs à la morphine ont été mis en évidence.

La présence de récepteurs à la morphine chez les mammifères a conduit les scientifiques à se poser la question de l'existence de ligands endogènes. C'est en 1975 qu'eut lieu la découverte des premiers agonistes endogènes peptidiques des récepteurs aux opioïdes, les enképhalines. Par la suite, à travers plusieurs milliers de publications, l'existence d'autres peptides opioïdes endogènes fut également rapportée.

Parmi les ligands endogènes des récepteurs aux opioïdes, on retrouve également la morphine endogène qui est un composé strictement identique à la morphine présente dans l'opium du pavot, mais synthétisé chez les mammifères. La morphine endogène fut découverte en 1978, à peine quelques années après les peptides opioïdes. Cependant, très peu de laboratoires ont étudié ce composé endogène (<200 articles) contrairement aux agonistes peptidiques endogènes (>30000 articles). De ce fait, il existe peu de données sur sa voie de synthèse, les enzymes impliquées, les phénomènes de régulation ainsi que sur ses implications physiologiques. En effet, à mon arrivée dans le laboratoire, seulement quatre groupes/équipes travaillaient sur la morphine endogène de par le monde. Celui de G. Stefano à New York (U.S.A.) travaillait sur la morphine endogène périphérique sécrétée lors d'états de stress, celui d'E. Bianchi à Sienne (Italie) travaillait sur la morphine endogène et le système nerveux central et

celui de M.H. Zenk à St. Louis (U.S.A.) étudiait la voie de biosynthèse de la morphine endogène. Enfin la quatrième équipe dirigée par le Dr. Yannick Goumon aujourd'hui rattachée à celle du Pr Pierrick Poisbeau, étudiait l'implication de la morphine endogène dans la physiologie et les pathologies périphériques. J'ai rejoint cette équipe afin de débiter ma thèse portant sur les « mécanismes physiologiques de la morphine endogène au sein du système nerveux central de souris » en ayant pour but de démontrer, sans ambiguïté, l'un des rôles de la morphine endogène et ainsi tenter de convaincre la partie encore sceptique de la communauté scientifique. Je me suis cependant vite retrouvé confronté à ce manque de documentation (p.ex., localisation) et d'outils (p.ex., modèles) sur le sujet. De ce fait, je me suis fixé un nouvel objectif, celui de fournir des outils et des bases, permettant l'étude et la compréhension des rôles de la morphine endogène au sein du système nerveux central.

Le premier chapitre de mon manuscrit propose une introduction, débutant par la présentation de la morphine, des récepteurs opioïdes et de leurs agonistes peptidiques endogènes, et se terminant par l'histoire de la morphine endogène et par une revue de toutes les données connues à ce jour, sur ce sujet. Ce chapitre sera suivi de la présentation du contexte scientifique de la morphine endogène qui m'a conduit à définir mes objectifs. Le troisième chapitre présente en trois parties, les résultats que j'ai obtenus pendant mes trois années de thèse et qui apportent des outils essentiels concernant la spécificité de détection de la morphine endogène et de ses dérivés, leur localisation au sein du SNC, leur quantification, ainsi que des perspectives relatives à la création d'un modèle d'étude (souris K.O.). Le chapitre suivant, sous forme d'une discussion (différente de celle de mes manuscrits), m'a permis de proposer différentes hypothèses, perspectives et nouvelles pistes de recherches postulées à partir de mes propres résultats et des données de la littérature. Enfin, le dernier chapitre présente les perspectives thérapeutiques et biotechnologiques liées au dépôt de 3 brevets portant sur une protéine de liaison de haute affinité à la morphine et sur un moyen de dissociation.

Les données présentées dans ce manuscrit apportent de nouveaux éléments fondamentaux ainsi que des outils de recherche qui permettront, à l'avenir, une meilleure compréhension du système de la morphine endogène.



Chapitre 1 :

INTRODUCTION



Figure 1 : Photos de plants de pavot (*Papaver somniferum*). **A :** Pavot en fleur. **B :** Sève s'écoulant d'une capsule de pavot arrivée à maturité. Crédit photo : Dr. Pierre-Arnaud Chouvy, <http://www.pa-chouvy.org>

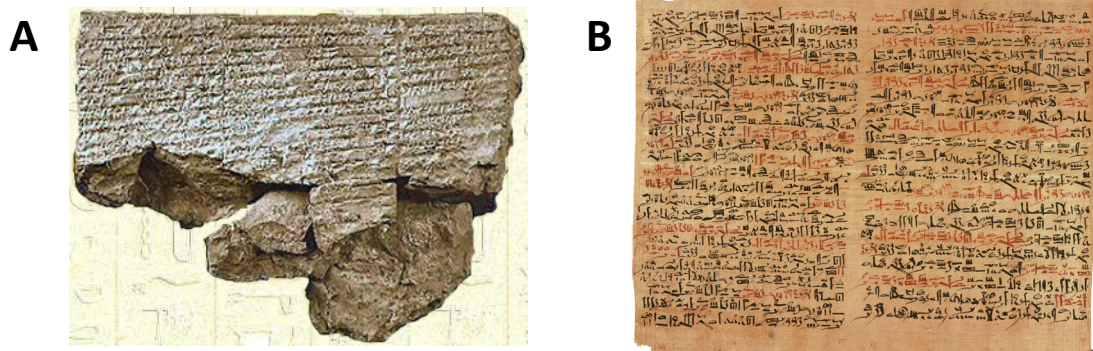


Figure 2 : Découvertes archéologiques relatant de l'utilisation de l'opium. **A :** Tablette sumérienne découverte à Nippur (2100ans av. J.-C.). **B :** Papyrus égyptien d'Ebers découvert à Louxor (1600 ans av. J.-C.).

INTRODUCTION

I. LA MORPHINE

I.1. De l'opium à la morphine

I.1.a. L'histoire de l'opium

Lorsque la fleur de pavot à opium (*Papaver Somniferum*) arrive à maturité, son ovaire se transforme en une capsule de forme ovoïde remplie de graines et de sève (figure 1). Celle-ci, également appelée latex, est récoltée par incision de la capsule et, en s'oxydant à l'air, prend une couleur brunâtre et devient ce qu'on appelle de l'opium. L'opium est certainement le plus vieux remède connu par l'homme pour lutter contre la douleur. En effet, plusieurs découvertes archéologiques prouvent que l'opium était déjà utilisé il y a 4500-5000 ans avant notre ère. Découvertes en Irak (à Nippur), des tablettes sumériennes écrites vers 2100 av. J.-C. rapportent déjà de l'utilisation de l'opium (qualifié de « Hul-Gil » ou « plante de la joie », figure 2). C'est cependant le papyrus égyptien d'Ebers (Louxor, 1600 ans av. J.-C., figure 2) qui indique pour la première fois l'utilisation de l'opium pour soulager de l'insomnie, des maux de tête et des douleurs. Les Égyptiens ont d'ailleurs fait commerce de l'opium vers le reste de l'Europe, notamment celui de l'opium thébaïcum de Thèbes, qui a donné son nom à la thébaïne, un des alcaloïdes présents dans l'opium et qui correspond à un précurseur de la morphine.

L'opium a été massivement utilisé tout au long de l'histoire pour ses propriétés analgésiques, antidiarrhéiques et antitussives; que ce soit par les Grecs de l'Antiquité (Homère le décrit comme « éloignant les peines »), les Romains (Galien le qualifie d'« *anodin* », de « *a* » privatif et « *odyn* » douleur), ou encore en France à la fin du XVIIIe siècle comme en témoigne cet extrait du manuel thérapeutique « le manuel des dames de la charité » écrit à Rouen en 1789 : « L'opium convient à tous les cas où les malades souffrent de violentes douleurs qui ne leur donnent point de relâche, car il les apaise presque à l'instant, en calmant l'agitation des esprits, et en faisant succéder un doux sommeil à de longues souffrances » (Dictionnaire des drogues et des dépendances, Larousse, 2004).

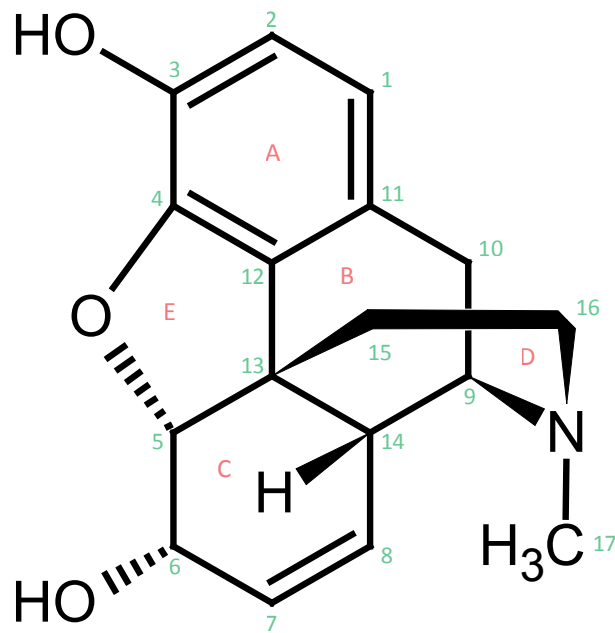


Figure 3 : Structure de la molécule de morphine. La morphine (C₁₇H₁₉NO₃) est composée de 5 cycles (notés de A à E). Les atomes de carbones sont numérotés de 1 à 17.



Figure 4 : Seringue hypodermique (1870). L'emploi de la seringue à injections hypodermiques a permis l'utilisation de la morphine pour le traitement des grands blessés lors de la guerre de 1870. (Musée d'Histoire de la Médecine, Paris)

1.1.b. Découverte de la morphine

La molécule responsable de l'effet analgésique du pavot fut découverte simultanément en 1804 par Arnaud Seguin, Bernard Courtois, et Charles Derosne. Ils découvrirent dans l'opium une substance cristalline, possédant des propriétés alcalines. Cependant, ils ne publièrent pas leurs résultats pensant que c'était un artefact dû aux conditions expérimentales. C'est à F.W. Sertürner, pharmacien de Hanovre, que revient le mérite (dans ses travaux publiés en 1805-1806 et 1817) d'avoir donné le nom « d'alcali végétal » à cette substance cristallisée et de découvrir une série de molécules aujourd'hui désignées sous le nom d'alkaloïdes. Ce premier alcaloïde trouvé fut nommé *morphium* (morphine), car les effets procurés font référence au dieu des songes et des rêves de la Grèce antique, Morphée. Mais, ce ne fut qu'en 1925 que la structure moléculaire de la morphine fut établie par un chimiste britannique R. Robinson (figure 3).

1.1.c. Utilisation de la morphine

Avec l'invention de la seringue hypodermique en 1850, la morphine fut l'un des premiers médicaments injectés et inaugura ainsi l'ère moderne de la pharmacologie et de la médecine (figure 4). C'est alors que commença une utilisation à grande échelle par les médecins militaires sur les champs de bataille (Guerre de Crimée (1854-1855), guerre de Sécession (1861-1865)) et notamment pour les amputations. Les premiers cas d'addiction à la morphine sont dès lors découverts et sont appelés « maladie du soldat », ou morphinomanie. Ces premiers signalements de morphinomanie apparaissent dès 1871, époque où la morphine est en vente libre dans de nombreuses préparations pharmaceutiques artisanales. C'est à la fin du XIXe siècle, devant cette montée de toxicomanie, que le corps médical amalgama propriétés thérapeutiques et toxicomanie, en condamnant d'un seul bloc l'utilisation de la morphine qui disparut du milieu médical. Ce n'est qu'au début des années 1950 que les hôpitaux anglais redécouvrent l'utilisation médicale de la morphine. C'est alors qu'apparaissent les premiers traitements à la morphine effectués de manière organisée et rigoureuse, avec des quantités injectées contrôlées.

D'après l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la morphine est à l'heure actuelle utilisée pour traiter la douleur aiguë, notamment après une opération, mais aussi la douleur chronique résistante aux autres antalgiques. Cependant, il n'y a pas de dose maximale recommandée et le traitement peut être augmenté jusqu'au soulagement des douleurs tant qu'il n'y a pas d'apparition d'effets secondaires. Les effets indésirables les plus fréquents

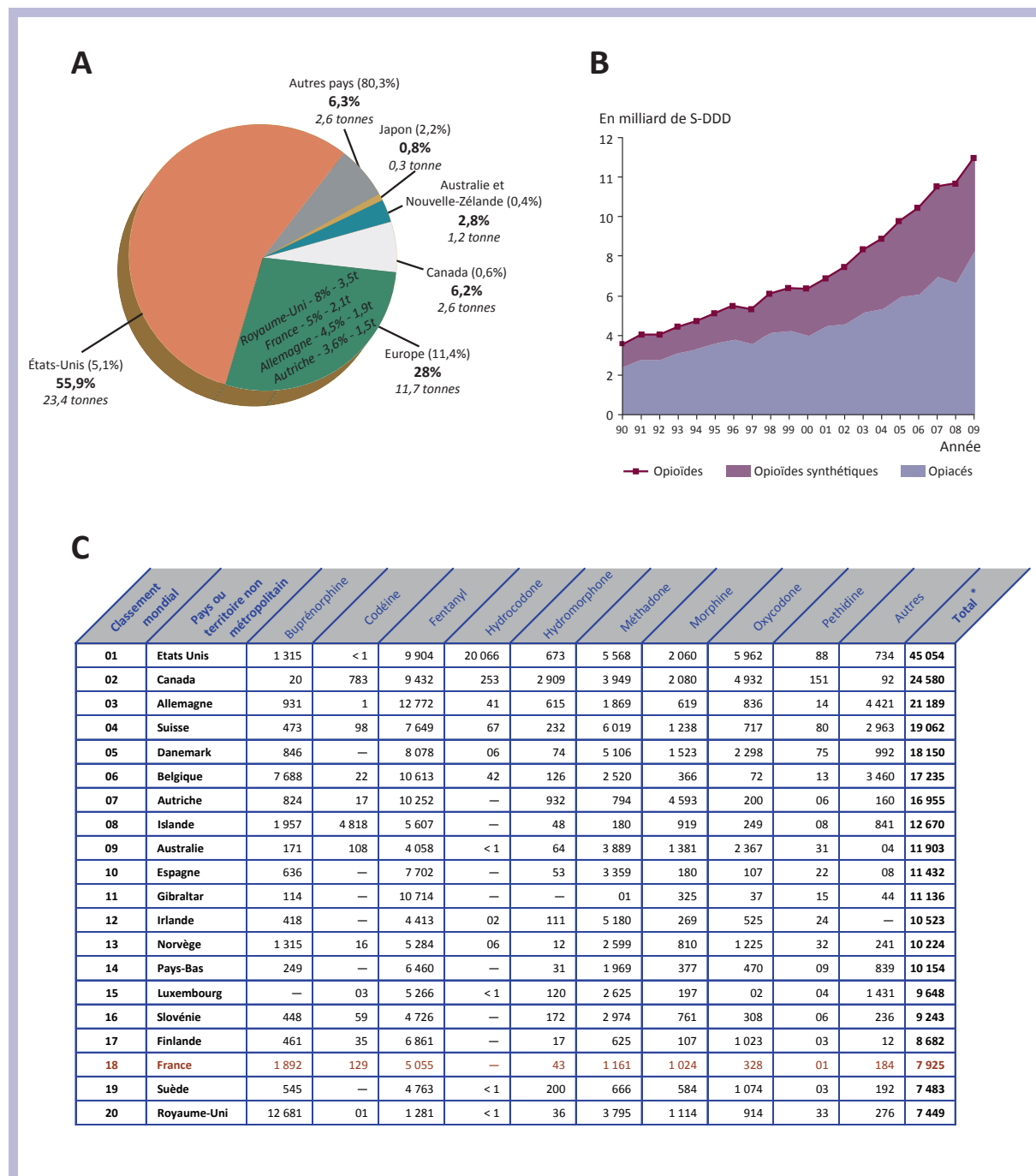


Figure 5 : Opioides et quelques chiffres. Données tirées et adaptées du rapport annuel (2010) de l'organe international de contrôle des stupéfiants sur les évaluations des besoins du monde en 2011, basé sur les statistiques de 2009 (International narcotic control board, 2010). **A** : Répartition de la consommation de morphine en 2009. Les chiffres en gras indiquent les pourcentages correspondant à la quantité totale de morphine consommée (41,9 tonnes). Les chiffres entre parenthèses indiquent les pourcentages correspondant à la population mondiale. **B** : Consommation mondiale d'opioïdes (opiacés + opioïdes synthétiques) entre 1990 et 2009, exprimée en milliards de doses quotidiennes (S-DDD). **C** : Tableau représentant les niveaux de consommation d'opioïdes en doses quotidiennes moyennes (2007-2009) déterminées, par millions d'habitants et par jour. * La consommation totale ne tient pas compte de la consommation de buprénorphine (actuellement placé sous contrôle, car considéré comme psychotrope).

aux doses habituellement administrées sont la constipation, la somnolence, les nausées et les vomissements. Les autres troubles assez fréquemment rencontrés sont la confusion, les cauchemars et surtout la dépression respiratoire pouvant conduire à l'apnée et à la mort si la morphine a été surdosée.

1.1.d. Quelques chiffres

Aujourd'hui encore la morphine est l'un des analgésiques le plus utilisé en milieu hospitalier. D'autres molécules opiacées, dérivés naturels, synthétiques ou semi-synthétiques de la morphine sont également utilisés pour leurs propriétés analgésiques. D'après l'organe international de contrôle des stupéfiants (INCB), environ 300 tonnes de morphine sont produites dans le monde chaque année, dont 42 tonnes pour l'utilisation directe (le reste est utilisé pour la fabrication des opiacés semi-synthétiques), les pays les plus développés étant les plus grands consommateurs de morphine (figure 5A). Au cours des 20 dernières années, la consommation d'opioïdes (opiacés naturels, semi-synthétiques et opioïdes synthétiques) a été multipliée par quatre (figure 5B). En France, les données fournies par l'INCB, indiquent que 1024 doses de morphine ont été administrées par jour et par million d'habitants (moyenne sur les années 2007-2009). Il est de plus intéressant d'observer la disparité de la prise en charge de la douleur dans le monde. En effet, il existe de grandes différences entre les pays développés, aussi bien dans le nombre de doses administrées que dans les types d'opiacés utilisés (figure 5C).

1.2. Son effet analgésique

1.2.a. Nociception et douleur

La douleur est définie comme étant « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle ou décrite en termes d'une telle lésion » (Merskey, 1991). Elle correspond à l'interprétation consciente de l'information nociceptive parvenant au cerveau. En effet, la nociception est le processus sensoriel à l'origine du message nerveux qui provoque la douleur. Ces mécanismes sont des signaux d'alarme qui mettent en jeu des réflexes de protection permettant de nous soustraire aux stimuli nocifs.

1.2.b. Transmission de l'information nociceptive

Le message nociceptif est créé au niveau cutané, articulaire, musculaire et viscéral. Il est généré après activation des nocicepteurs par une stimulation qui peut être thermique, chimique, électrique ou mécanique. Les nocicepteurs sont les terminaisons libres de neurones présents

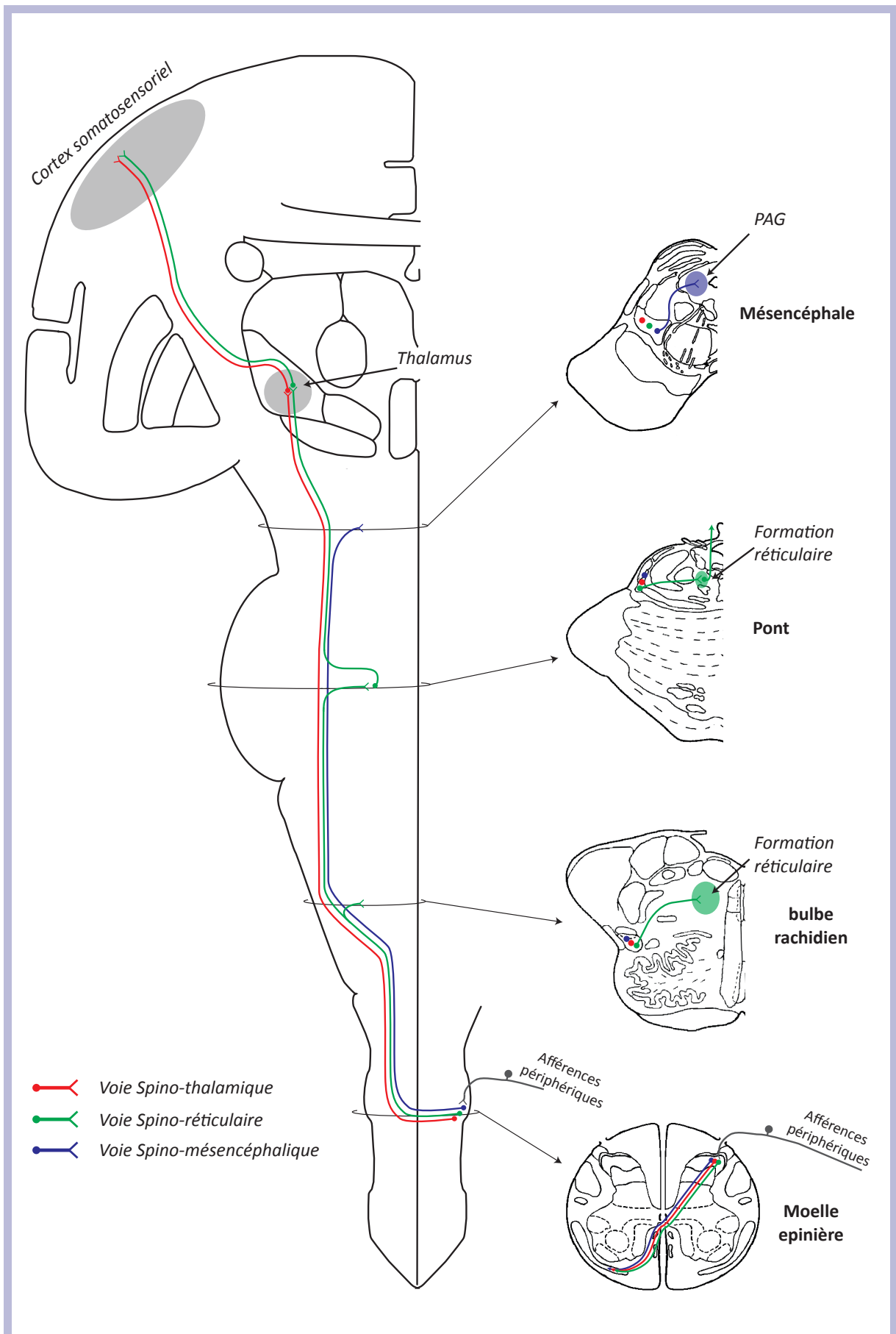


Figure 6 : Transmission de l'information nociceptive. Représentation schématique des trois voies principales impliquées dans la transmission de l'information nociceptive aux centres supra-spinaux.

dans les ganglions rachidiens et capables de coder la nature et l'intensité du stimulus nocif. Ils donnent naissance aux fibres A δ et C qui vont transmettre l'information au système nerveux central (SNC). La terminaison axonale de ces fibres va innover principalement les neurones des couches I, II et V de la corne dorsale de la moelle épinière. Ces neurones représentent le premier relai du message nociceptif dans le SNC. Après intégration de ce message, les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière vont transmettre l'information nociceptive aux structures cérébrales supérieures controlatérales par différentes voies ascendantes. Les principales sont la voie spino-thalamique, la voie spino-réticulaire et la voie spino-mésencéphalique (pour revue : Willis and Westlund, 1997).

Les axones transitant par le faisceau spino-thalamique font synapse sur les neurones des noyaux thalamiques, qui projettent leurs axones dans le cortex somatosensoriel. Les axones de la voie spino-réticulaire font, quant à eux, synapse sur les neurones de la formation réticulaire du tronc cérébral. Ces derniers vont innover les neurones thalamiques qui à leur tour vont projeter leurs axones dans le cortex somatosensoriel. La dernière voie ascendante, la voie spino-mésencéphalique, achemine les axones des neurones de la corne dorsale vers la substance grise périaqueducale (PAG) dans le mésencéphale. Ces trois voies transmettent les informations nécessaires aux structures cérébrales pour réagir de manière adéquate aux stimuli nociceptifs (figure 6).

1.2.c. Le contrôle de l'information nociceptive

La transmission des informations nociceptives est modulée par de puissants contrôles, le premier site de régulation étant la moelle épinière. En effet, on y trouve des interconnexions entre les neurones nociceptifs et des neurones modulateurs qui peuvent exercer un contrôle sur la transmission de l'information nociceptive vers les centres supraspinaux. Le second contrôle provient des centres supraspinaux, qui par des voies descendantes, sont capables de moduler la transmission de l'information nociceptive. Un de ces contrôles a pour origine les neurones de la PAG qui projettent vers les noyaux sérotoninergiques du tronc cérébral, en particulier vers le noyau du raphé magnus. Ses neurones sérotoninergiques projettent alors dans la corne dorsale de la moelle épinière pour y exercer un contrôle inhibiteur tonique sur les neurones responsables de la transmission des messages nociceptifs (pour revue : Millan, 2002). D'autres contrôles descendants provenant des cellules du noyau paragigantocellulaire, ainsi que des cellules noradrénergiques du locus cœruleus, sont également responsables du contrôle supraspinal de la transmission de l'information nociceptive (figure 7)

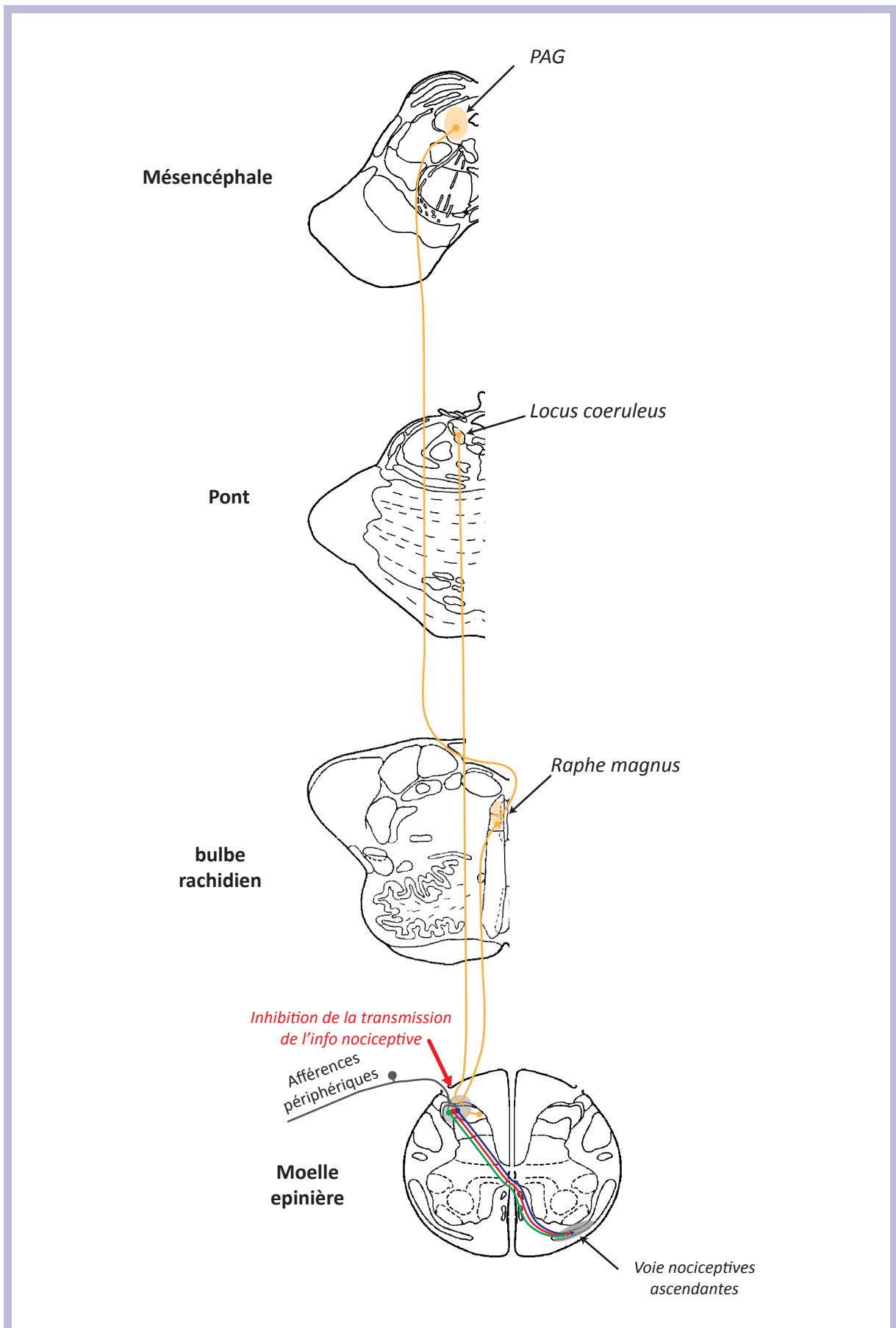


Figure 7 : Le contrôle de l'information nociceptive. Représentation schématique des voies responsables de la modulation de l'information nociceptive.

1.2.d. L'effet analgésique de la morphine

La morphine est un analgésique à effet central. Elle agit *via* ses récepteurs (cf. : I. Introduction, II, p.23) sur les différentes voies et différents relais décrits dans le paragraphe précédent afin de contrôler le message nociceptif (pour revues : Millan, 2002; Inturrisi, 2002). Au niveau spinal, la morphine est décrite pour déprimer la transmission des messages nociceptifs arrivant dans la corne dorsale de la moelle épinière. Ainsi, la morphine agit d'une part sur la terminaison présynaptique des nocicepteurs en diminuant la libération de neurotransmetteurs excitateurs et d'autre part en hyperpolarisant directement les neurones de la corne dorsale recevant les informations nociceptives (Kline and Wiley, 2008). Au niveau supraspinal, la morphine agit sur la PAG afin d'y moduler les contrôles descendants de la nociception. En effet, celle-ci possède une action inhibitrice sur les interneurons GABAergiques présents dans la PAG, augmentant ainsi l'activité des neurones projetant sur les noyaux du raphé (Vaughan and Christie, 1997; Vaughan et al., 1997). L'activation de ces neurones va conduire à l'activation des interneurons GABAergiques de la corne dorsale et inhiber ainsi la transmission des informations nociceptives.

1.3. Ses autres effets

1.3.a. Effets sur le système respiratoire

La morphine est responsable de différents effets secondaires, car elle peut agir sur des organes périphériques ou des structures cérébrales non impliquées dans le contrôle de la nociception. L'effet secondaire le plus connu est la dépression respiratoire qui est observée après administration de fortes doses de morphine ou d'héroïne (diacéylmorphine). Cet effet est la principale cause de décès lors d'une overdose aux opiacés. La morphine provoque une diminution du rythme et de l'amplitude de la respiration en agissant sur les centres respiratoires présents dans le tronc cérébral et notamment le noyau du tractus solitaire (Takita et al., 1997). Cette dépression respiratoire provient d'une diminution de l'adaptation à la pression partielle sanguine de CO₂ au niveau central (Kilpatrick and Smith, 2005).

1.3.b. Effets sur le système gastro-intestinal

Les traitements à la morphine affectent également le système digestif. Il est fréquent d'observer chez les patients ou les toxicomanes un dessèchement buccal, une baisse de l'appétit, des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales et des constipations. Ces effets sont pour la plupart liés à la diminution de la motricité de l'estomac et de la mobilité intestinale

induite par une action de la morphine aussi bien au niveau central que périphérique (pour revue : Wood and Galligan, 2004). Par exemple, la baisse de la mobilité intestinale apparaît après action de la morphine sur les muscles lisses de la paroi intestinale (Frantzides et al., 1992) et les neurones entériques (Pol et al., 1999), mais également par une action sur le système nerveux central (Galligan and Burks, 1983). Les nausées et les vomissements induits par une prise de morphine sont provoqués par une action de la morphine sur la « chemoreceptor trigger zone » (CTZ) qui est présente dans le tronc cérébral. Cette zone « chemosensible », présente en dehors de la barrière hémato-encéphalique (BHE), est capable d'activer les centres du vomissement du tronc cérébral. L'injection d'un antagoniste de la morphine dans la CTZ, ou son ablation inhibe les effets vomitifs de la morphine (Bhargava et al., 1981).

1.3.c. Effets sur le système immunitaire

La morphine possède un effet immunosuppresseur qui est connu depuis les années 1950. Une étude avait alors montré que les personnes dépendantes à la morphine et à l'héroïne étaient plus sensibles aux infections (Hussey and Katz, 1950). Des injections aiguës ou chroniques de morphine sont maintenant bien documentées pour avoir des effets inhibiteurs sur la réponse immunitaire. Ainsi, la morphine provoque une diminution de la production d'anticorps, de l'activité cytolytique des lymphocytes NK, de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et de l'activité de phagocytose des macrophages (pour revue : Sacerdote, 2006). Ces effets immunosuppresseurs découlent aussi bien d'une action centrale que périphérique de la morphine. Elle a une action directe sur les monocytes, les macrophages, les granulocytes et les cellules endothéliales en y induisant la production de monoxyde d'azote (NO)(Pasternak, 2007; Dinda et al., 2005). Indirectement, la morphine aura également un effet immunosuppresseur en provoquant la libération de glucocorticoïdes après activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Mellon and Bayer, 1998a).

1.4. La dépendance

1.4.a. La dépendance à la morphine et à l'héroïne

La dépendance ou l'addiction désigne l'asservissement (physique ou psychique) d'un sujet à une substance ou une activité dont il a contracté l'habitude par un usage plus ou moins répété. Dans le cas de la morphine, les premiers cas de dépendance ont été observés dans les années 1870 lors de son utilisation massive sur les champs de bataille et dans des préparations pharmaceutiques (cf. : I.Introduction : I.1.c, p.9). Afin de trouver une alternative à la morphine,

un dérivé diacétylé de la morphine, la diacétylmorphine (héroïne) a été développée en 1898 par H. Dreser, un chimiste de l'entreprise pharmaceutique Bayer. A la base utilisée pour ses effets analgésiques, il s'est avéré que l'héroïne est une molécule possédant un pouvoir addictif encore plus puissant que la morphine. L'héroïne franchit la BHE plus rapidement que la morphine en raison de sa plus grande liposolubilité induite par la présence des deux groupements acétyls. Une fois dans le SNC, elle est rapidement désacétylée et hydrolysée en morphine, qui constitue son principe actif. L'héroïne est une des drogues les plus addictives connues de nos jours. Selon l'Observatoire français des drogues et des toxicomanies, on comptait au moins 160 000 héroïnomanes en France en 2005. En milieu hospitalier, la morphine est maintenant utilisée dans des conditions particulièrement contrôlées. En effet, les prescriptions médicales stipulent des prises contrôlées, à heures fixes, et à intervalles réguliers ce qui permet la prise avant la réapparition de la douleur. Ce protocole a pour but d'éviter toute association entre médication et soulagement immédiat, mais également d'éviter une prise correspondant à un « besoin » de morphine par le patient. Toute prise est suivie d'un arrêt progressif pour éviter le syndrome de sevrage.

1.4.b. Mécanismes neurobiologiques de la dépendance

Le plaisir est le moyen sélectionné par l'évolution pour nous inciter par exemple à manger, à trouver un partenaire sexuel ou encore à nous protéger. Les signaux sensoriels provenant de ces activités vont, après intégration par le cortex sensoriel, transiter vers le circuit de la récompense. Les centres nerveux du circuit de la récompense sont localisés le long du faisceau médian du télencéphale (middle forebrain bundle, MFB). L'aire tegmentale ventrale (ATV) et le noyau accumbens représentent les centres majeurs de ce circuit qui comporte également le septum, l'amygdale, le cortex préfrontal ainsi que certaines régions thalamiques. Les voies impliquées dans la récompense sont des voies dopaminergiques. On distingue deux voies importantes pour la mémoire et la motivation de nos comportements, mais également pour la planification de nos actions. Tout d'abord, la voie méso-limbique qui démarre des neurones de l'ATV, innerve plusieurs structures du système limbique incluant l'amygdale et l'hippocampe. La seconde, la voie méso-corticale, part également de l'ATV mais innerve principalement le cortex frontal. C'est la libération de dopamine dans le système limbique, le cortex préfrontal et le noyau accumbens qui informe l'organisme de la présence d'un stimulus récompensant. L'effet « plaisir » de la morphine passe par une désinhibition des neurones dopaminergiques de l'ATV qui provoque la libération accrue de dopamine dans le noyau accumbens, le système limbique

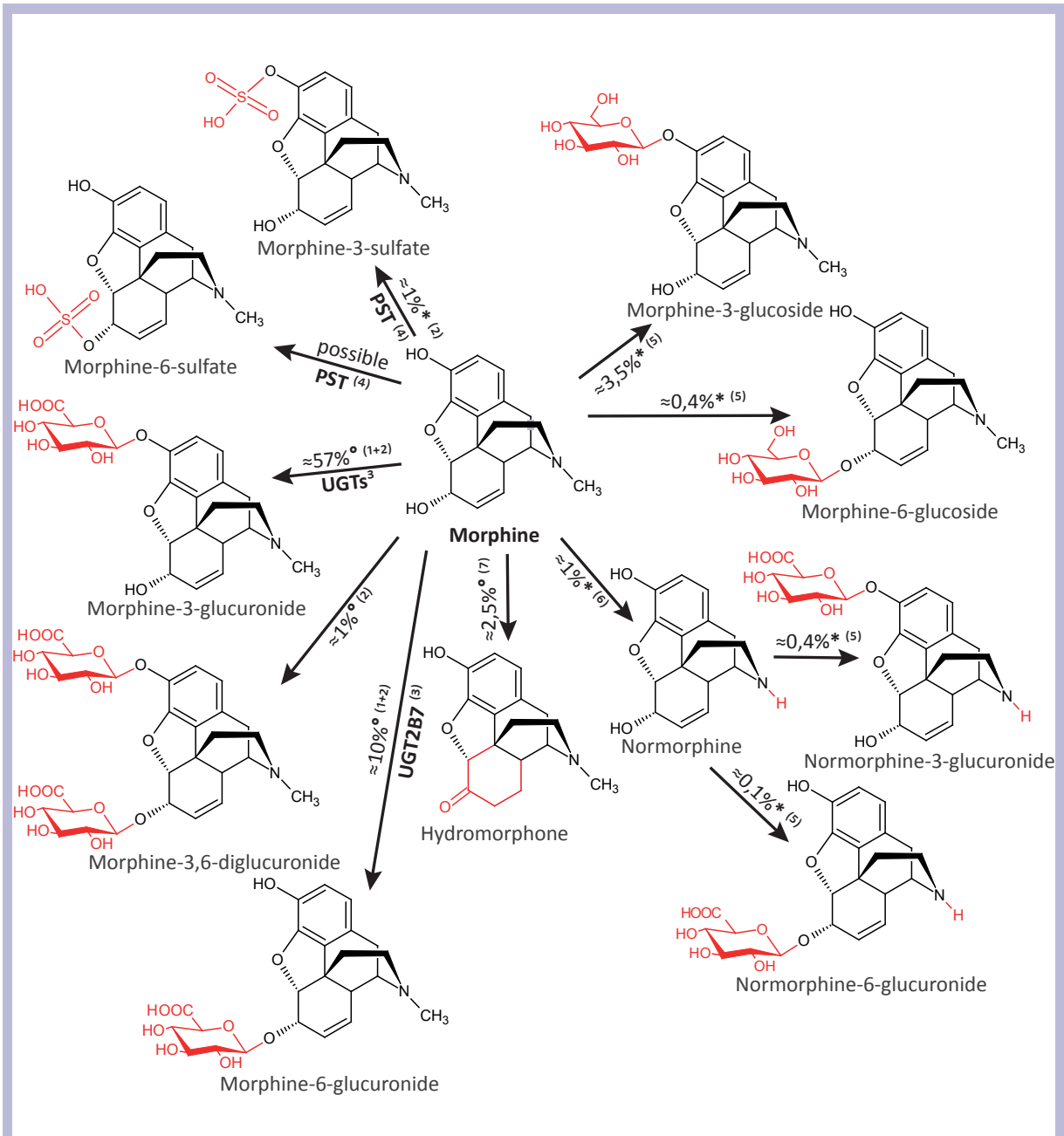


Figure 8 : Le catabolisme de la morphine chez l'homme. Les valeurs notées sur les flèches correspondent aux taux mesurés dans l'urine de patients humains par rapport à la quantité de morphine injectée (°) ou de M3G formée (*). Les enzymes connues ou supposées sont indiquées sous les flèches. Références : 1, (Hasselstrom and Sawe, 1993); 2, (Yeh et al., 1977b); 3, (Stone et al., 2003); 4, (Rein et al., 1982); 5, (Chen et al. 2003); 6, (Yeh et al., 1977a); 7, (Cone et al., 2008). Abréviations : PST, phenolsulphotransférases; UGT, UDP-glucuronosyl-transférase.

et le cortex frontal. Cette libération informe l'organisme d'une récompense liée à la prise de morphine. L'effet de renforcement de ce mécanisme au fil des prises de morphine explique les efforts entrepris pour se procurer cette récompense.

1.5. Le catabolisme de la morphine

1.5.a. Le catabolisme de la morphine chez l'homme

Chez l'homme, environ 90 % de la morphine injectée est convertie en métabolites. Ce métabolisme est complexe puisqu'il conduit à la formation de différents composés et fait intervenir différents enzymes (figure 8). Ce métabolisme s'effectue dans le cerveau, les reins, mais c'est principalement dans le foie que la morphine est dégradée. Les principaux métabolites de la morphine sont ses dérivés glucuronidés. Ainsi, dans le foie plus de 50 % de la morphine injectée est convertie en morphine-3-glucuronide (M3G), 10 % en morphine-6-glucuronide (M6G) et moins de 1 % en morphine-3,6-diglucuronide (Hasselstrom and Sawe, 1993; Lotsch et al. 1996; Osborne et al., 1990; Yeh et al., 1977a). Chez les mammifères, la glucuronidation est catalysée par la famille d'enzyme des UDP-glucuronosyl-transférase (UGT). La morphine peut également être dégradée minoritairement (2,5 % de la quantité de morphine injectée) sous forme d'hydromorphone (Cone et al., 2006; Cone et al., 2008; McDonough et al., 2008; Oyler et al., 2000; Yeh et al., 1977b). Les dérivés sulfo-conjugés de la morphine, la morphine-3-sulfate et la morphine-6-sulfate ont été souvent décrits comme résultant du catabolisme de la morphine. Seule la morphine-3-sulfate est détectée chez l'homme après injection de morphine (Yeh et al., 1977a; Yeh et al., 1977b). Cependant, plusieurs articles indiquent que les phénolsulphotransférases, qui sont probablement responsables de cette sulfo-conjugaison, seraient capables de former également de la morphine-6-sulfate (Donnerer et al., 1987; Foldes and Meek, 1973; Nagano et al., 2000; Rein et al., 1982). Récemment, un laboratoire a démontré l'existence de dérivés glucosidés de la morphine dans l'urine de patients atteints d'un cancer et traités à la morphine. Ces travaux ont montré la formation de 3,47 % morphine-3-glucoside et de 0,4 % de morphine-6-glucoside par rapport à la quantité de M3G formée (Chen et al., 2003). D'autre part, la morphine peut également être dégradée par N-déméthylation en normorphine, un composé inactif. Le taux de normorphine retrouvé dans l'urine est faible puisque seulement 1 % de la morphine injectée est convertie en normorphine (Yeh, 1975; Yeh et al., 1977b). De plus, certaines études ont décrit la formation de dérivés glucuronidés de la normorphine dans l'urine. Ainsi, on retrouve des taux inférieurs à 1 % de normorphine-3-glucuronide et de normorphine-6-glucuronide (Chen et al., 2003; Yeh et al., 1977b). Chez

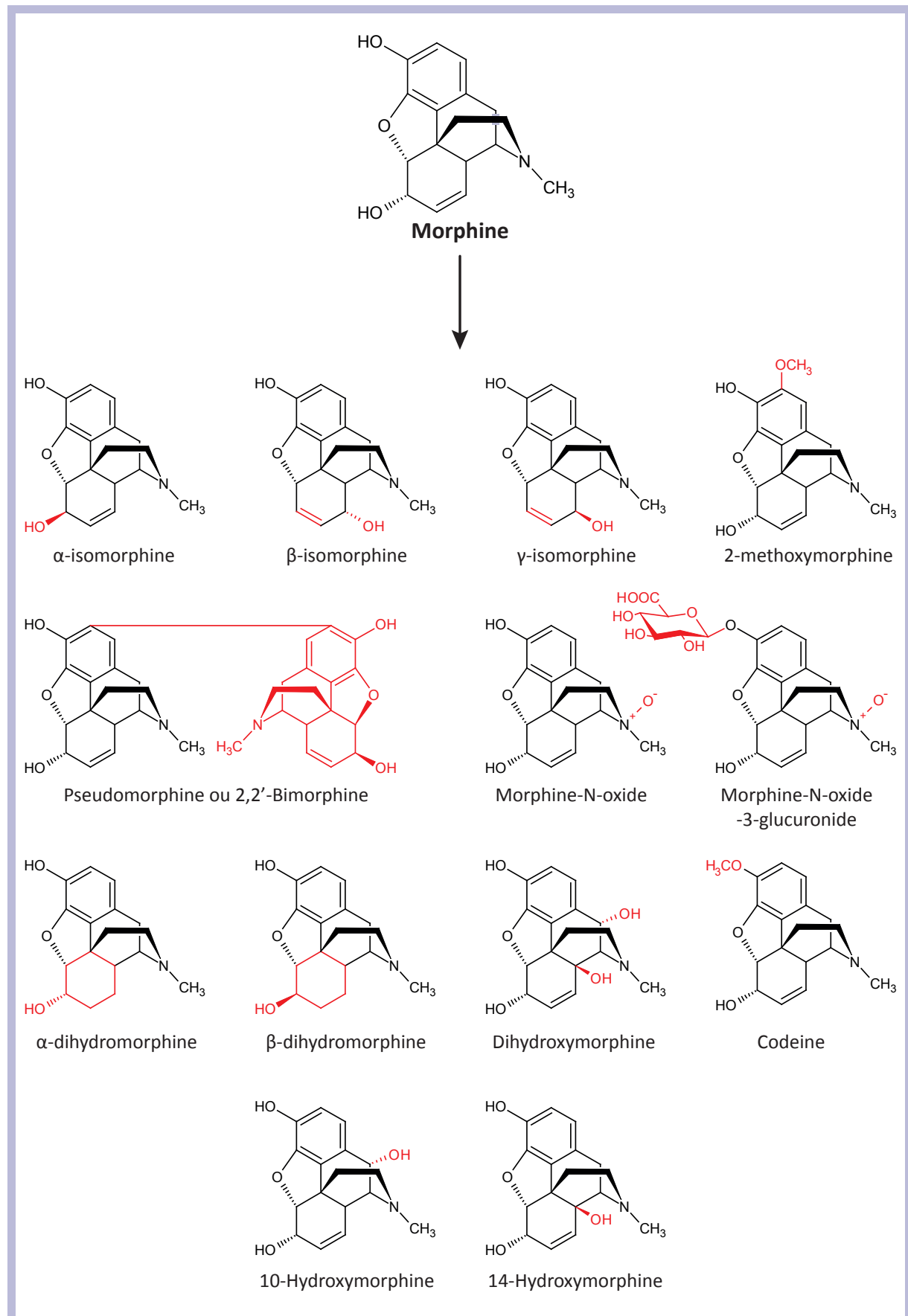


Figure 9 : Les autres catabolites de la morphine. Les molécules représentées ci-dessus sont retrouvées dans le sang ou l'urine de rongeurs après administration de morphine. Ces molécules n'ont encore jamais été décrites chez l'homme après administration de morphine.

les mammifères, de nombreuses données décrivent la présence de ces différents métabolites, cependant les pourcentages de formation décrits ci-dessus sont dépendants de nombreux paramètres. Par exemple, pour le cas des dérivés glucuronidés, le mode d'injection, la quantité de morphine injectée, l'âge, le patrimoine génétique, ou encore les pathologies, vont faire varier les pourcentages de formation de chacun des métabolites. (Pour revue : Faura et al., 1998)

1.5.b. Les glucuronides de la morphine

Les dérivés glucuronidés de la morphine sont les produits de catabolisme majoritairement formés. En effet, environ 60 % de la morphine est transformée en M3G et M6G. Cette glucuro-conjugaison est réalisée par la superfamille des enzymes UGTs exprimées dans le foie et d'autres tissus. Chez l'homme, plus de 31 membres de cette superfamille ont été caractérisés (Mackenzie et al., 1997; Mackenzie et al., 2005). Parmi eux, les isoformes 1A1, 1A3, 1A6, 1A8, 1A9, 1A10, 2A1 et 2B7 sont responsables de la glucuronidation de la morphine (Jedlitschky et al., 1999; Stone et al., 2003). De manière intéressante, tous sont impliqués dans la transformation de morphine en M3G. Cependant, seul l'isoforme UGT2B7 est capable de former la M6G. La M3G formée est un composé inactif, dépourvu d'activité analgésique, tandis que la M6G est décrite pour posséder une activité analgésique jusqu'à 600 fois supérieure à la morphine en fonction des modèles et des tests utilisés (pour revue : Lotsch & Geisslinger 2001). Certains chercheurs ont suggéré que l'activité analgésique de la morphine est en partie due à la M6G formée après administration de morphine (Fromm et al. 1997). En plus de leur localisation hépatique, certaines UGT (UGT1A6 et UGT2B7) sont exprimées dans les neurones et les astrocytes, suggérant que la morphine peut être également glucuronidée au sein du SNC (Buckley and Klaassen, 2007; King et al., 1999; Nagano et al., 2000; Suleman et al., 1998; Yamada et al., 2003).

1.5.c. Autres catabolites

D'autres catabolites de la morphine sont décrits pour être formés, mais sont pour l'instant uniquement trouvés chez les rongeurs (Daly et al., 1965; Frolich et al., 2011; Misra et al., 1974; Yeh et al., 1979). Ainsi, certaines études suggèrent même une O-méthylation de morphine en codéine (Borner and Abbott, 1973), mais cette conversion reste controversée (Yeh, 1974). Les conditions de formation, les enzymes impliquées et les proportions formées par rapport à la morphine injectée sont aujourd'hui inconnues pour tous ces catabolites (figure 9).

I.6. Les protéines liant la morphine

Plusieurs protéines capables de lier la morphine ont été décrites jusqu'à présent. Ainsi, la morphine peut se lier à des protéines sanguines incluant l'albumine sérique (Leow et al., 1993; Olsen, 1975; Olsen et al., 1975), mais également à d'autres protéines sanguines comme la gammaglobuline (Olsen et al., 1975) et l' α -1-acide-glycoprotéine (Leow et al., 1993). De manière intéressante, jusqu'à 35 % de la morphine injectée se retrouve sous une forme liée à l'albumine sérique (Leow et al., 1993), ce pourcentage de liaison étant dépendant du pH, de la température, de la concentration de protéines, mais pas de la concentration de morphine (Leow et al., 1993 ; Olsen, 1975). Par ailleurs, il a également été décrit que la phosphatidylethanolamine-binding protéine (PEBP) est capable de lier des dérivés de la morphine (Goumon et al., 2006; Grandy et al., 1990). Les travaux du laboratoire ont également montré que la PEBP est associée à la M6G au sein des granules de sécrétion des cellules chromaffines (Goumon et al., 2006). Ces différentes protéines pourraient représenter des transporteurs sériques/tissulaires de la morphine et de ses dérivés glucuronidés permettant ainsi de moduler leur biodisponibilité. Il existe également des protéines cérébrales (autres que les récepteurs) capables de lier la morphine. C'est le cas de l'OBCAM (opioid-binding cell adhesion molecule), une protéine cérébrale appartenant à la famille des IgLON-CAM (Immunoglobulin cell adhesion molecules) qui est capable de lier la morphine (Cho et al., 1983; Hachisuka et al., 1999; Schofield et al., 1989).

A l'inverse des ces protéines liant la morphine avec une faible affinité, d'autres protéines de liaison à très haute affinité seraient présentes au niveau cérébral et hépatique. En effet, une injection unique de ^{14}C -morphine induit la présence d'une radioactivité dans le SNC de rat jusqu'à 3 semaines (Misra et al., 1971) et après administration de ^3H -morphine une liaison irréversible à des protéines cérébrales a été décrite 48 h après injection (Mullis et al., 1979). De plus, chez la souris, dans le cerveau et le foie une liaison de très forte affinité entre la morphine et des protéines a été démontrée (Nagamatsu et al., 1983). Finalement, l'incubation de ^3H -morphine avec des extraits de foie de rats a démontré l'existence d'une liaison, qualifiée de covalente, à des protéines de 33, 50 et 53kDa (Nagamatsu and Hasegawa, 1992; Nagamatsu and Hasegawa, 1993).

II. LES RÉCEPTEURS AUX OPIOÏDES

II.1. Leur découverte

II.1.a. Découverte des récepteurs liant les opioïdes

C'est au milieu des années 50, sur la base des effets physiologiques d'une administration de morphine, que l'hypothèse de l'existence de récepteurs spécifiques liant la morphine a été postulée. Cette hypothèse provient d'un certain nombre d'observations : l'importance de la structure de la morphine dans son efficacité (Braenden et al., 1955), l'importance de la structure stéréochimique (Beckett and Casy, 1954; Beckett, 1956) et l'effet antagoniste de la nalorphine, un opiacé synthétique (Martin, 1967). C'est d'ailleurs sur la base de la découverte de la double action de la nalorphine, qui d'une part antagonise l'effet analgésique de la morphine et d'autre part induit elle-même une analgésie, qu'a été postulée l'hypothèse de l'existence de plusieurs récepteurs aux opiacés (Martin, 1967). Ce n'est qu'en 1973, que l'utilisation d'un ligand radioactif (^3H -Naloxone) a permis la mise en évidence biochimique de récepteurs liant les opiacés (incluant la morphine) dans le SNC (Pert and Snyder, 1973).

II.1.b. Les différents types de récepteurs.

La mise en évidence de l'existence de trois types de récepteurs, μ , κ et σ , provient de la démonstration de différents profils de réponses pharmacologiques à trois agonistes, la morphine (μ), la ketazocine (κ) et le SKF-10047 (σ) (Gilbert and Martin, 1976; Pert and Snyder, 1973). Rapidement, Kosterlitz et ses collaborateurs proposèrent un nouveau type de récepteurs, les récepteurs δ (Lord et al., 1977). Il est maintenant clairement établi qu'il existe 3 types de récepteurs « classiques » aux opioïdes, les récepteurs μ , δ et κ appelés respectivement MOR, DOR et KOR (pour Mu/Delta/Kappa opioid receptor). La caractérisation en 1992 du cDNA codant pour le DOR chez la souris (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992) a permis la découverte de la séquence des récepteurs MOR et KOR chez les rongeurs par homologie de séquence (Chen et al., 1993; Minami et al., 1993), mais également chez l'homme ; hMOR (Wang et al., 1994b), hDOR (Simonin et al., 1994) et hKOR (Simonin et al., 1995). Des homologies de séquence avec les trois récepteurs opioïdes connus ont également conduit à la mise en évidence d'un « opioid receptor-like » (ORL1). ORL1 est structuralement très similaire aux récepteurs MOR, DOR et KOR, mais possède cependant des caractéristiques de liaison ligand-récepteurs différentes (Bunzow et al., 1994; Chen et al., 1994; Fukuda et al., 1994; Lachowicz et al., 1995; Mollereau et al., 1994; Wang et al., 1994a).

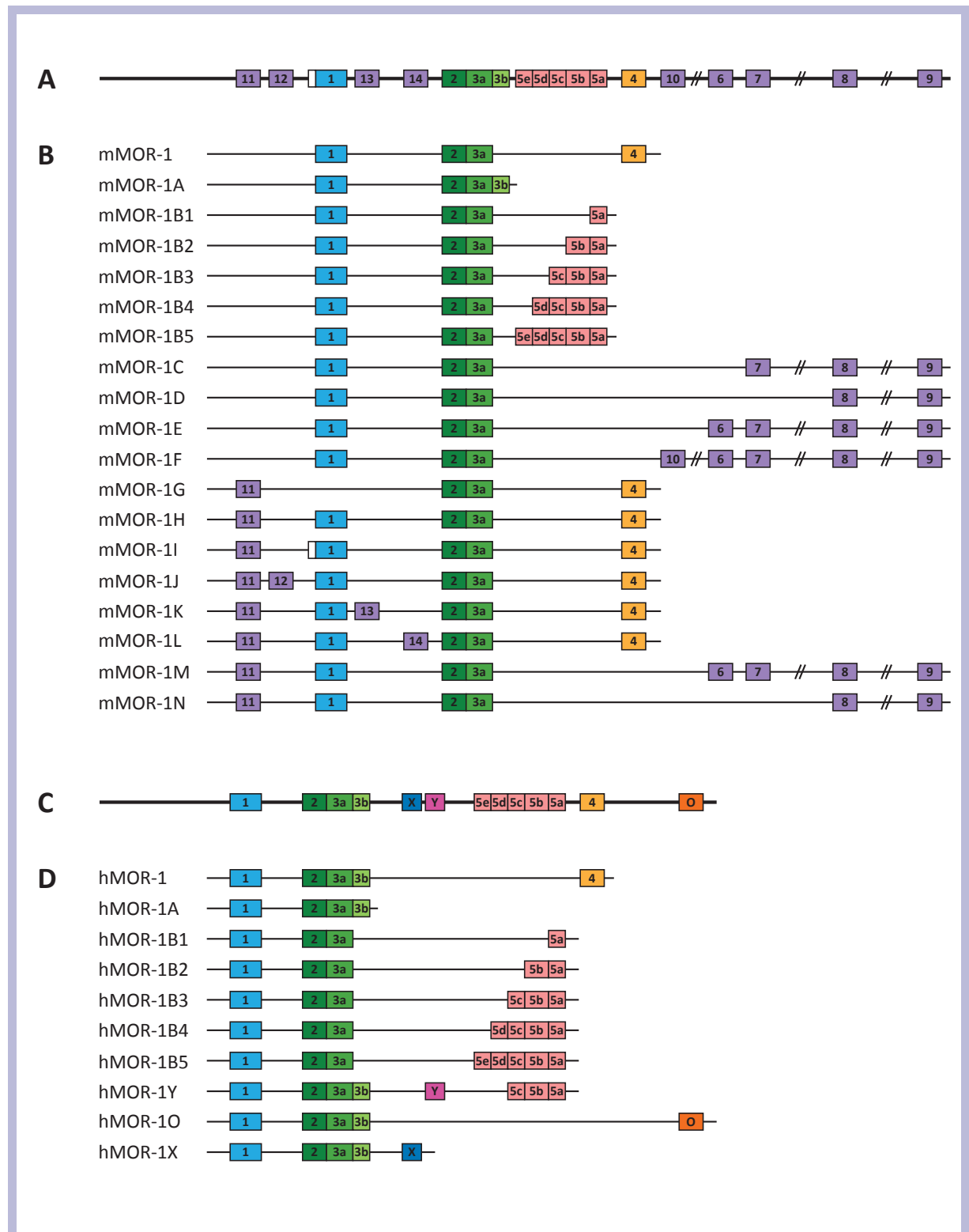


Figure 10 : Représentations des différents variants d'épissage des MOR-1 chez la souris et chez l'homme. Les exons sont représentés par des carrés et les introns par des traits noirs verticaux. **A** : Structure du gène *oprm1* murin. **B** : Représentation génomique de 19 des variants d'épissage de MOR-1 chez la souris (adapté de : Pan et al., 2005a). **C** : Structure du gène *OPRM1* humain. **D** : Représentation génomique des 10 variants d'épissage de MOR-1 actuellement connus chez l'homme (adapté de : Pan et al., 2005b)

Ces trois dernières années, quelques études ont démontré que la morphine pourrait avoir des effets *via* une action sur les TLR (toll-like receptors). Il est en effet décrit que l'effet apoptotique de la morphine passe par sa liaison aux TLR2 (Li et al., 2009; Li et al., 2010) et que la morphine et/ou ses dérivés seraient capables de se lier aux récepteurs TLR4 (Hutchinson et al., 2010a; Hutchinson et al., 2010b). Cependant, la morphine possédant une affinité plus importante pour les MOR comparée aux autres récepteurs (cf. : I.Introduction, Tableau 2, p.36), ses effets étant décrits pour passer principalement par les récepteurs MORs (Gaveriaux-Ruff et al., 1998; Iversen, 1996; Matthes et al., 1996), la prochaine partie de mon introduction se consacrera exclusivement à ces récepteurs.

II.2. Les récepteurs MORs

II.2.a. Les différents variants d'épissage

Dans les années 80, les études pharmacologiques et les études de liaison de ligands ont décrit l'existence de trois sous-types MORs : μ_1 , μ_2 , et μ_3 classés en fonction de leurs localisations et des effets induits. Le sous-type μ_1 est principalement exprimé par le SNC et est responsable de l'effet analgésique de la morphine (Ling and Pasternak, 1983; Moskowitz and Goodman, 1985; Pasternak, 1981). Le sous-type μ_2 est aussi exprimé par le SNC mais également par les systèmes respiratoire et gastro-intestinal. μ_2 serait responsable des effets secondaires de la morphine comme la constipation, les vomissements et la dépression respiratoire (Gintzler & Pasternak, 1983; Moskowitz and Goodman, 1985). Le sous-type μ_3 est décrit pour être localisé sur les cellules immunitaires et endothéliales, son activation par la morphine serait responsable de ces effets immuno-modulateurs et cardiovasculaires (Stefano et al., 1995; Stefano et al., 1996). Un dernier sous-type, nommé μ_4 , présenté comme un variant d'épissage de μ_1 , a été décrit récemment par le groupe de G. Stefano comme étant exprimé par le SNC et le placenta (Kream et al., 2007; Mantione et al., 2010).

Les MORs sont codés par un seul et même gène OPRM1 pour l'homme et Oprm1 pour les rongeurs (Opioid Receptor Mu 1) dont l'épissage alternatif génère différents variants (figure 10). Ce gène se situe chez l'homme sur le bras long du chromosome 6 (région 6q24-25) avec une taille d'au moins 90 kb et chez la souris sur le chromosome 10 avec une taille de 240 à 250 kb. Précédemment nommés μ_1 , μ_2 et μ_3 , les sous-types de MORs se sont avérés être des variants d'épissage du même gène et sont, aujourd'hui, dénommés par le radical « MOR-1 » suivi d'une lettre et/ou d'un chiffre permettant de les différencier. Ainsi, à l'heure

actuelle, 29 variants d'épissage différents ont été découverts chez la souris (Doyle et al., 2007a; Doyle et al., 2007b; Pan et al., 2005a; Pan et al., 1999; Pan et al., 2000; Pan et al., 2005a; Pan et al., 2005b) et 10 variants d'épissage chez l'homme (Bare et al., 1994; Pan et al., 2003; Pan et al., 2005b). Cependant, cette classification est en constante évolution et il est probable que d'autres variants seront trouvés. Tous ces variants présentent une séquence nucléotidique commune correspondant aux exons 1, 2 et 3 de l'OPRM1 codant pour la partie N-terminale extracellulaire, ainsi que pour les 7 segments transmembranaires du récepteur. Les séquences des variants diffèrent principalement par leur partie C-terminale intracellulaire responsable de la transduction du signal (cf. : I.Introduction, II.2.d, p.27). Au sein d'une même espèce, ces différents variants diffèrent donc de par leur extrémité 3' qui est issue d'un épissage alternatif entre l'exon 3 et les exons 4, 5, X, Y ou O pour l'homme. Ces variants d'épissage suggèrent que ces différents récepteurs pourraient avoir des localisations différentes et des propriétés pharmacologiques différentes.

II.2.b. Leur localisation

Les MORs ont principalement été décrits pour être exprimés au sein du SNC. Cependant ils sont également trouvés au niveau périphérique où ils sont exprimés dans les systèmes respiratoire et gastro-intestinal, par les cellules immunitaires et certaines cellules endothéliales (pour revue : Cadet, 2004). Dans le SNC, les MORs sont principalement présents dans les régions impliquées dans les contrôles descendants de la douleur (cf. : I.Introduction : 1.2.c, p.13) comme la PAG, les noyaux du raphé, le noyau paraventriculaire et le locus coeruleus. Les MORs sont également exprimés dans d'autres structures n'étant pas ou peu impliquées dans le contrôle de la douleur et incluant le striatum, le thalamus, le cortex, l'hippocampe et le cervelet ce qui suggère l'implication des MORs dans d'autres processus physiologiques non liés à la nociception (Arvidsson et al., 1995; Ding et al., 1996; Mansour et al., 1995a; Mansour et al., 1995b; Mrkusich et al., 2004; Stumm et al., 2004). Il faut noter qu'une localisation différente de chacun des variants d'épissage est décrite. En effet, les variants MOR-1C et MOR-1J sont par exemple fortement exprimés dans le thalamus, les variants MOR-1E, MOR-1G et MOR-1I le sont principalement dans l'hypothalamus, tandis qu'on retrouve le variant MOR-1D en majorité dans le cortex, cervelet, la PAG et le variant MOR-1H dans le striatum (Pan et al., 1999; Pan et al., 2001). Le variant MOR-1B4 est quant à lui décrit pour être présent dans toutes les structures citées ci-dessus (Zhang et al., 2006).

La localisation (chevauchante ou exclusive) de ces différents variants suggère qu'il pourrait exister des affinités différentes pour des ligands en fonction des structures cérébrales et ainsi, pour un même ligand, des effets cellulaires différents en fonction de ces structures.

II.2.c. Variants d'épissage et liaison ligands/récepteurs

Comme décrit dans la partie II.2.a (p.23), la partie N-terminale extracellulaire est conservée entre les différents sous-types de MORs. Cependant, les études réalisées sur l'affinité des MORs, principalement chez le rat et la souris, soulignent la complexité existant au sein des variants de MOR-1 (Pan et al., 2005a; Pan et al., 2005b). En effet, tous les variants de MOR-1 ne possèdent pas la même affinité par rapport à des ligands identiques comme le montre par exemple une étude comparative entre les variants MOR-1 et MOR-1B4 chez la souris (Pan et al., 2005b). Dans cette étude, les auteurs décrivent que le variant MOR-1B4 a sensiblement moins d'affinité pour la plupart des ligands testés par rapport aux autres variants de MOR-1. De plus, il est par exemple également décrit chez l'homme que MOR-1 possède une affinité plus élevée pour la M6G par rapport aux variants MOR-1X et MOR-1O, bien que l'affinité pour la morphine reste identique (Pan et al., 2003). Il semblerait par ailleurs que différents ligands n'auraient pas le même site de fixation puisque plusieurs études montrent que la perte de l'exon 1 provoquerait une perte de l'analgésie induite par la morphine alors que celle induite par la M6G serait conservée (Rossi et al., 1995; Rossi et al., 1996; Rossi et al., 1997; Schuller et al., 1999). Ces résultats sont cependant controversés puisqu'une étude montre une perte de l'effet analgésique induite par la morphine, mais aussi par la M6G chez des souris K.O. pour l'exon 1 (Kitanaka et al., 1998).

II.2.d. La transduction du signal

Les MORs opioïdes appartiennent à la superfamille de récepteurs à sept segments transmembranaires couplés à des protéines G (pour revues : Kieffer and Gaveriaux-Ruff, 2002; Raehal and Bohn, 2005; Trescot et al., 2008). La partie N-terminale extracellulaire de la protéine qui correspond au site de liaison des ligands est responsable de l'affinité pour les ligands, alors que la partie C-terminale intracellulaire est impliquée dans la transduction du signal (figure 11). L'activation des protéines $G_{i/o}$ auxquelles les MORs sont couplés va moduler l'activité cellulaire *via* plusieurs mécanismes. Cette modulation semble être dépendante du type cellulaire dans lequel sont exprimés les récepteurs.

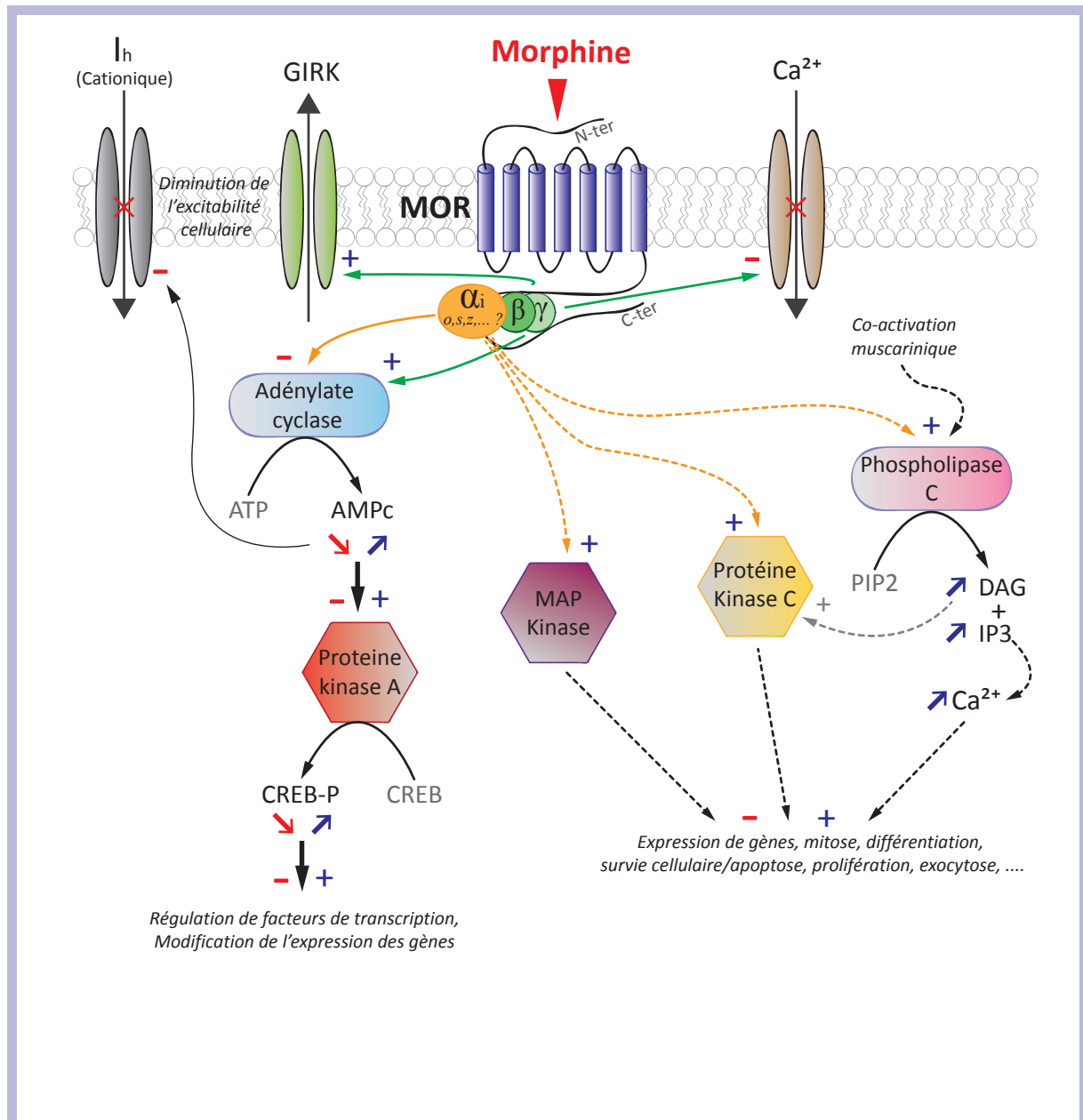


Figure 11 : Voies de signalisation intracellulaires des récepteurs MORs. Représentation schématique des voies décrites dans la partie II.2.d. Abréviations : AMPc, Adénosine mono-phosphate cyclique; ATP, Adénosine tri-phosphate; CREB, CRE-binding protein; DAG, 1,2-diacylglycérol; GIRK, G protein activated inwardly rectifying K^+ conductance; IP3, Inositol tri-phosphate; MAP, Mitogen activated protein; MOR, Mu opioid receptor; PIP2, phosphatidylinositol-4,5-biphosphate.

1. Effets sur l'adénylate cyclase (AC) :

(i) Une inhibition de l'AC suite à l'activation du récepteur et l'activation des protéines $G_{i/o}$ va entraîner une diminution de la production d'AMPC, un second messenger majeur impliqué dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaire. A titre d'exemple, dans les neurones ganglionnaires, une diminution des concentrations d'AMPC aura pour effet une inhibition du courant cationique voltage dépendant (I_h) se traduisant par une baisse d'excitabilité de la cellule (Ingram and Williams, 1994).

(ii) À l'inverse, dans les neurones du bulbe olfactif une activation de l'AC suite à l'activation des MORs est observée (Onali and Orianas, 1991). Cet effet serait provoqué, non pas par la sous-unité α de la protéine G_i mais par les sous unités β/γ (Orianas and Onali, 1999). Plus récemment, certaines études ont montré un couplage possible des MORs à des protéines G de type G_s , capables par leur sous-unité α (Chakrabarti et al., 2010) ou β/γ (Wang and Burns, 2006) d'activer l'AC.

2. Activation de la conductance potassique : Selon le type cellulaire, l'activation des MORs va se traduire par l'activation de différents courants potassiques se traduisant par une hyperpolarisation de la cellule.

(i) La morphine a pour effet d'activer les courants potassiques GIRK (G-protein-activated inwardly rectifying K^+ conductance) des neurones du locus cœruleus (Aghajanian and Wang, 1986).

(ii) Dans les neurones hippocampiques non pyramidaux, la liaison de la morphine sur les MORs va conduire à l'activation d'un courant potassique voltage dépendant (Wimpey and Chavkin, 1991).

3. Variations des concentrations de calcium intracellulaires :

(i) Une inhibition des courants calciques est observée après activation des MORs dans les neurones sensoriels des ganglions rachidiens de rats adultes. Cette inhibition est directement provoquée par les sous unités β/γ de la protéine $G_{i/o}$ (Wilding et al., 1995).

(ii) D'autre part, l'activation des MORs par un agoniste est également décrite pour induire une élévation des concentrations de calcium intracellulaire provenant du réticulum endoplasmique. Que ce soit dans le neuroblastome humain SH-SY5Y (Connor and Henderson, 1996) ou dans les neurones de ganglions rachidiens de souris (Tang et al. 1996), l'activation des MORs conduit à la libération des stocks intracellulaires de calcium (réticulum endoplasmique) après activation de la phospholipase C (PLC) et production d'IP3. Cet effet

est dépendant de la coactivation des récepteurs muscariniques, car l'activation des MORs seuls ne produit pas d'effet sur la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires (Connor and Henderson, 1996). Ces effets sur les variations intracellulaires de calcium auront de nombreuses répercussions physiologiques, notamment sur la libération de neurotransmetteurs et la plasticité cellulaire (Samways and Henderson, 2006).

4. Activation de la protéine kinase C (PKC): La morphine est capable d'activer la PKC *via* son action sur les MORs. Cette activation est décrite, dans les neurones du noyau accumbens, pour augmenter les courants postsynaptiques excitateurs induits par l'activation des récepteurs NMDA (Martin et al., 1999). Cet effet n'est cependant pas observé dans les neurones du locus coeruleus (Oleskevich et al., 1993).

5. Inhibition des MAPkinases : Certains articles décrivent une activation de la cascade des MAP kinases après activation des MORs. Cette activation est notamment responsable de l'effet immunodépresseur de la morphine sur les lymphocytes et les polymorphonucléaires (Chuang et al., 1997). Par ailleurs, dans les cellules du locus coeruleus, la cascade des MAP kinases n'est activée que lors d'un sevrage faisant suite à un traitement chronique à la morphine (Schulz and Holtt, 1998). Cette cascade va induire l'activation ou l'inhibition de nombreux facteurs de transcription (p. ex., CREB, c-fos, NF- κ B) et modifier les expressions de nombreux gènes. Ces mécanismes pourraient participer à la mise en place des phénomènes de dépendance et de tolérance (pour revue : Chen and Sommer, 2009).

On remarque que les effets décrits ci-dessus sont, selon les types cellulaires étudiés, différents et même opposés pour certains. Comme décrit dans la partie II.2.a (p.25), il existe de nombreux variants d'épissage dont la différence « structurale » se situe essentiellement sur la partie C-terminale de la protéine intracellulaire et donc liée aux protéines G. Il est probable que les différences observées dans les mécanismes de transductions induits par l'activation des MORs, proviennent en partie de ces différences structurales. De plus, on observe un profil de localisation propre à chaque variant (cf. : I.Introduction, II.2.b, p.26) ce qui pourrait expliquer les effets différents de l'activation des MORs entre deux structures du SNC. Finalement, il est également décrit que les récepteurs MORs sont couplés à plusieurs types de protéines G (p. ex., G_{i1-3} , G_{o1-2} , G_z , G_{15} , G_s), couplage qui pourrait être dépendant du sous-type de MORs (Connor and Christie, 1999; Quock et al., 1999; Wang and Burns, 2009). En effet, des expériences de liaison au [35S]GTP γ S et des études d'inhibition de l'activité induite de l'AC ont montré des activités qui diffèrent en fonction des variants d'épissage (Pan et al., 2005b).

II.2.e. L'oligomérisation des récepteurs opioïdes

La diversité des effets cellulaires produite par l'activation des MORs, en plus d'être expliquée par la présence de nombreux variants, peut également résulter de la formation d'homo- ou d'hétéro-dimères de récepteurs opioïdes. Ainsi, les récepteurs DOR, KOR ou MOR sont capables de s'associer sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimères et créer de « nouveaux récepteurs » possédant des propriétés de liaison et de transduction du signal différentes des récepteurs initiaux (Gomes et al., 2000; Jordan and Devi, 1999; Law et al., 2005; Milligan, 2008). En effet, il est décrit que l'oligomérisation des récepteurs opioïdes induit une sélectivité vis-à-vis du ligand (Berque-Bestel et al., 2008; Waldhoer et al., 2005), mais également des changements dans les voies de signalisation intracellulaires (Rozenfeld and Devi, 2007). Les MORs sont aussi décrits pour former des hétéro-dimères avec les ORL-1, le résultat de cette oligomérisation étant une diminution de l'activité analgésique des ligands des MORs (Wang et al., 2005). Il est également possible qu'une dimérisation entre les variants de MOR ait lieu. Dans ce cas, il y aurait plusieurs dizaines de complexes possibles et donc autant d'effets différents possibles.

Ce phénomène de dimérisation pourrait également expliquer les actions non-opioïdiques des opioïdes endogènes. En effet, les peptides opioïdes endogènes peuvent avoir des effets analgésiques indépendants des récepteurs aux opioïdes (pour revue : Wollemann and Benyhe, 2004). Ainsi, la dynorphine (agoniste des récepteurs DOR; cf. : I.Introduction, III.1.c, p.35) possède un effet analgésique dépendant des récepteurs NMDA (Wollemann and Benyhe, 2004) ou encore les endomorphines (agonistes des récepteurs MOR; cf. : I.Introduction, II.1.d, p.37) ont des effets qui sont insensibles à la naloxone, un antagoniste des récepteurs opioïdes (Fischer and Udem, 1999). Ces effets non-opioïdiques pourraient provenir de la dimérisation des récepteurs aux opioïdes avec des récepteurs non-opioïdes (Wollemann and Benyhe, 2004). En effet, il est décrit dans le cas des MORs, une hétérodimérisation avec les récepteurs CB1 aux cannabinoïdes (Christie, 2006; Hojo et al., 2008), avec le récepteur NK1 de la substance P (Pfeiffer et al., 2003) ou encore avec les récepteurs α 2-adrénergiques (Vilardaga et al., 2008).

| <i>Précurseur</i> | <i>Peptide opioïde</i> | <i>Séquence en acide aminés</i> |
|----------------------------------|------------------------|--|
| Pro-enképhaline | Leu-enképhaline | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu |
| | Met-enképhaline | Tyr-Gly-Gly-Phe-Met |
| | | Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe |
| | | Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Gly-Leu |
| | Peptide E | Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Arg-Val-Gly-Arg-Pro-Glu-Trp-Trp-Met-Asp-Tyr-Gln-Lys-Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu |
| | BAM 22P | Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Arg-Val-Gly-Arg-Pro-Glu-Trp-Trp-Met-Asp-Tyr-Gln-Lys-Arg-Tyr-Gly |
| | Metorphamide | Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Arg-Val |
| Pro-opiomélanocortine | β-endorphine | Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Val-Lys-Asn-Ala-His-Lys-Lys-Gly-Gln |
| Prodynorphine | Dynorphine A | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln |
| | Dynorphine A (1-13) | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys |
| | Dynorphine A (1-8) | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile |
| | Dynorphine B | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr |
| | α-Neoendorphine | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys |
| | β-Neoendorphine | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro |
| Pronocéptine/Orphanine FQ | Nocéptine/Orphanine FQ | Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln |

Tableau 1 : Séquence des différents peptides opioïdes endogènes. Les séquences en acides aminés correspondantes à celles de la Met- et de la Leu-enképhaline sont indiquées en gras. À noter que les peptides opioïdes dérivant de la pro-enképhaline, de la pro-opiomélanocortine et de la prodynorphine contiennent une de ces séquences en acides aminés en N-terminal (tableau adapté de : Corbett et al., 2006).

III. LES LIGANDS ENDOGÈNES

III.1. Les ligands peptidiques endogènes

III.1.a. Les enképhalines

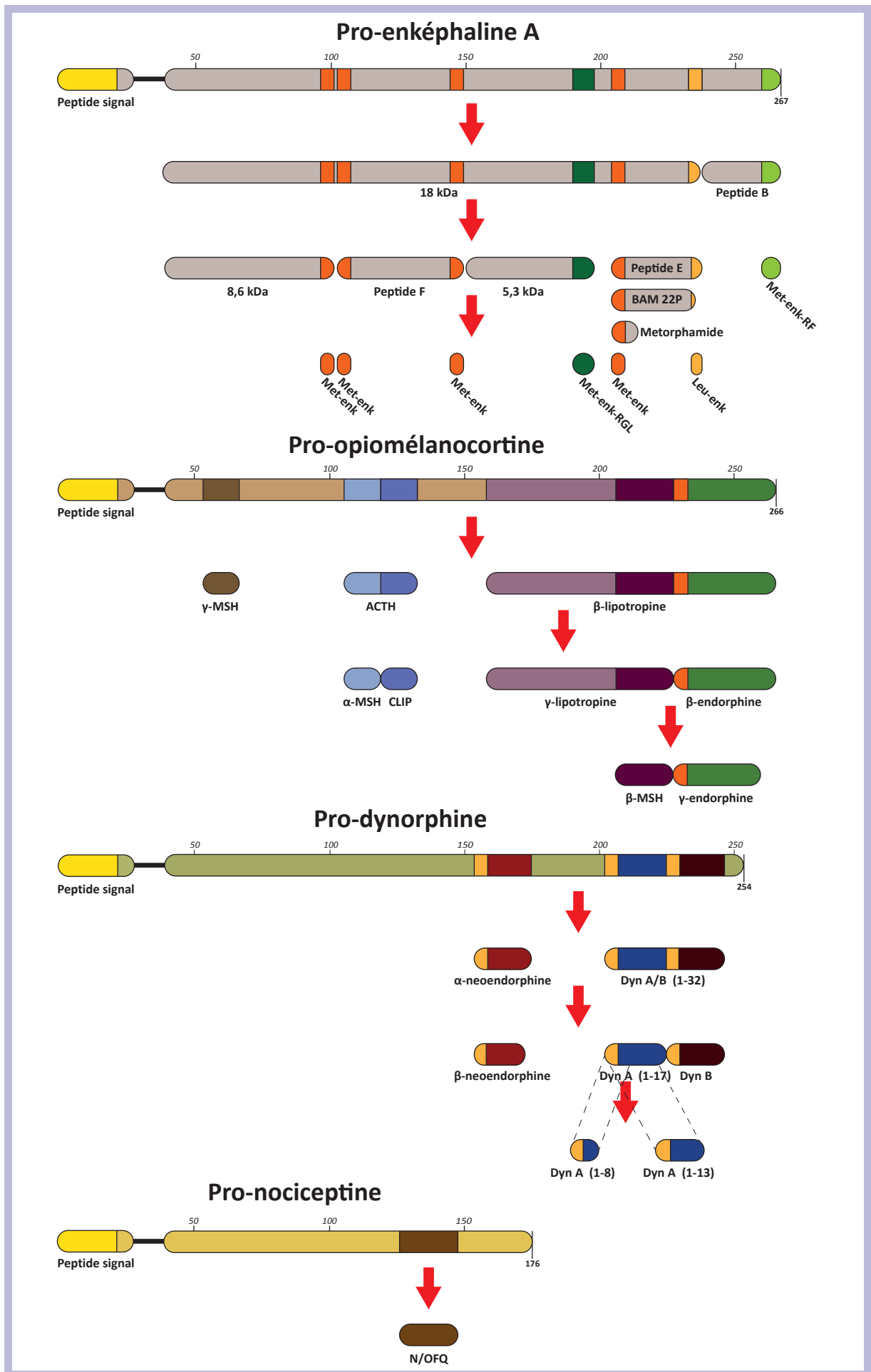
En 1972, la première évidence de la présence d'un système opioïde endogène est suggérée après observation d'un effet analgésique similaire à la morphine lors d'une stimulation électrique de la PAG (Akil et al., 1972). La mise en évidence de la présence de récepteurs aux opioïdes en 1973 dans le SNC, amena les scientifiques à rechercher la présence de ligands endogènes (Pert and Snyder, 1973). Les deux premiers agonistes endogènes des récepteurs aux opioïdes décrits furent deux pentapeptides découverts en 1975 (tableau 1) et baptisés Leu-enképhaline et Met-enképhaline en référence au grec « en kephalos » signifiant « dans la tête » (Hughes et al., 1975 ; Simantov and Snyder, 1976). Bien que la structure de ces pentapeptides soit très différente de la morphine, la conformation tridimensionnelle des enképhalines permet une liaison aux récepteurs aux opioïdes (Roques et al., 1976).

Les enképhalines dérivent de la maturation de la pro-enképhaline A (PEA), découverte pour la première fois en 1980 dans les glandes surrénales bovines (Lewis et al., 1980). Le gène codant pour la PEA comporte quatre exons formant après maturations postranscriptionnelles une protéine de 31kDa. Cette protéine donne naissance à différents peptides dérivés après plusieurs clivages enzymatiques (figure 12). Alors que la Met- et la Leu-enképhaline sont retrouvées sous forme libre dans le SNC, en périphérie la PEA est clivée partiellement et des peptides opioïdes plus longs y sont retrouvés (tableau 1). Au sein du SNC, les enképhalines sont distribuées de manière hétérogène dans le cerveau. Les régions cérébrales les plus riches étant le globus pallidus, le caudé putamen, l'amygdale, l'hypothalamus et la PAG (Finley et al., 1981b; Miller and Pickel, 1980). Les enképhalines possèdent une affinité élevée pour les DOR, plus faible pour les MOR et nulle pour les KOR et les ORL1 (tableau 2)

III.1.b. La β -endorphine

En 1976, plusieurs groupes mirent en évidence la formation d'un agoniste des récepteurs aux opioïdes après clivage de la β -Lipotropine, un peptide trouvé dans l'hypophyse. Ce nouvel agoniste fut baptisé la β -endorphine (Bradbury et al., 1976; Graf et al., 1976; Lazarus et al., 1976; Li and Chung, 1976; Li et al., 1976).

La β -endorphine est un peptide de 31 acides aminés (tableau 1) qui dérive de la maturation



de la pro-opiomélanocortine (POMC). Le gène codant pour la POMC est hautement conservé tout au long de l'évolution. La POMC va subir une série de clivage par différentes enzymes protéolytiques dont l'expression est dépendante du type cellulaire (figure 12). En effet, dans l'hypophyse, on observe une formation de β -Lipotropine dans les cellules corticotropes, tandis que cette β -Lipotropine est immédiatement maturée en β -endorphine dans les cellules mélanotropes. La β -endorphine est donc présente dans les cellules exprimant la POMC et les enzymes nécessaires à sa formation. On la retrouve principalement au sein du SNC dans les neurones du colliculus inférieur, des noyaux du raphé, de l'amygdale, du locus cœruleus et de certaines régions de l'hypothalamus et du thalamus (Finley et al., 1981a). La β -endorphine possède une forte affinité pour les récepteurs MOR, KOR et DOR et n'a aucune affinité pour les ORL1 (tableau 2).

III.1.c. Les dynorphines

La découverte d'un peptide opioïde hypophysaire différent de la β -endorphine d'un poids moléculaire plus bas, plus basique, et possédant un effet analgésique plus important, a été réalisée par le groupe de Goldstein (Cox et al., 1975; Lowney et al., 1979). L'apparition des techniques de séquençage permit d'identifier les 13 premiers résidus de ce peptide (Goldstein et al., 1979). La séquence N-terminale en acides aminés est commune en N-terminal avec la Leu-enképhaline (tableau 1). Cependant l'activité de ce nouveau peptide est de 3 à 700 fois plus importante que celle de la Leu-enképhaline (Goldstein et al., 1979). Cette nouvelle famille de peptides opioïdes endogènes a été baptisée dynorphine du grec « dynamis » pour « puissance ». Cette découverte a conduit à la découverte d'autres peptides appartenant à cette famille (tableau 1). Leur précurseur, la pro-dynorphine (ou pro-enképhaline B) est une protéine de 256 acides aminés contenant trois « motifs Leu-enképhaline ». C'est l'hydrolyse de ce précurseur qui conduit à la formation des peptides appartenant à la famille des dynorphines (figure 12). Les dynorphines sont essentiellement localisées dans l'hypothalamus, le striatum, le noyau accumbens, l'hippocampe et l'amygdale (Fallon and Leslie, 1986; Goldstein and Ghazarossian, 1980). Elles possèdent une affinité pour les KOR plus grande que celle pour les MOR ou les DOR (tableau 2).

Figure 12 : Représentation schématique des principaux produits de la maturation des précurseurs opioïdes. Abréviations : ACTH, Adrenocorticotropin hormone; CLIP, Corticotropin-like intermediate peptide; Dyn , Dynorphine; Enk, Enképhaline; MSH, Melanocyte-stimulating hormones; N/OFQ, Nociceptine/Orphanine FQ.

| Ligands endogènes | Récepteurs aux opioïdes | | | |
|-------------------|-------------------------|-----|-----|------|
| | MOR | KOR | DOR | ORL1 |
| Leu-enképhaline | ✓ | ✗ | ✓✓✓ | ✗ |
| Met-enképhaline | ✓✓ | ✗ | ✓✓✓ | ✗ |
| β-endorphine | ✓✓✓ | ✓✓✓ | ✓✓✓ | ✗ |
| Dynorphine A/B | ✓✓ | ✓✓✓ | ✓ | ✗ |
| Endomorphine 1/2 | ✓✓✓ | ✗ | ✗ | ✗ |
| N/OFQ | ✗ | ✗ | ✗ | ✓✓✓ |
| Morphine | ✓✓✓ | ✓ | ✓ | ✗ |
| Codéine | ✓✓ | ✓ | ✓ | ✗ |

Tableau 2 : Affinité des ligands opioïdes et opiacés endogènes vis-à-vis des différents types de récepteurs opioïdes. ✗ = pas d'affinité ; ✓ = affinité faible ; ✓✓ = affinité moyenne ; ✓✓✓ = affinité élevée. Abréviations : MOR, Mu opioid receptor; DOR, Delta opioid receptor; KOR, Kappa opioid receptor; ORL1, Opioid receptor like 1. Adapté de : McDonald and Lambert, 2005.

III.1.d. Les endomorphines

Après la découverte des enképhalines considérées comme les agonistes endogènes sélectifs des DOR et de la famille des dynorphines sélectives des KOR, il n'existait pas de données concernant des agonistes endogènes sélectifs des MOR. Une étude de Zadina et collaborateurs mit en évidence la présence de deux tétrapeptides endogènes très sélectifs des MOR dans le SNC de bœuf (Zadina et al., 1997). Ces peptides furent appelés endomorphine-1 et endomorphine-2 (tableau 1). La même année, les endomorphines 1 et 2 furent caractérisées dans le cortex humain (Hackler et al., 1997). La présence des endomorphines est décrite dans des structures comme l'amygdale, l'hypothalamus, la PAG, le locus coeruleus et les noyaux du raphé. De plus, certaines structures expriment seulement l'un des deux peptides. On retrouve l'endomorphine-1 dans le cortex et le striatum et l'endomorphine-2 dans la moelle épinière (pour revue : Fichna et al., 2007). Cette localisation différentielle suggérerait un précurseur différent (Zadina, 2002). Cependant, encore aujourd'hui le ou les précurseurs des endomorphines restent inconnus bien qu'ils soient considérés comme les agonistes peptidiques endogènes principaux des MOR (tableau 2).

III.1.e. La nociceptine/orphanine FQ

Les ORL1, découverts en 1994 (cf. : I.introduction, II.1.b, p.23), ne possèdent aucune affinité pour les peptides opioïdes endogènes connus à l'époque. Ils restèrent récepteurs « orphelins » jusqu'aux études de Meunier et Reinscheid qui découvrirent indépendamment le même ligand endogène. Les deux groupes décrivent la même séquence peptidique de 17 acides aminés (tableau 1) et appelèrent ce ligand nociceptine (Meunier et al., 1995) ou orphanine FQ (Reinscheid et al., 1995). Ce nouveau ligand (N/OFQ), possède une structure proche des autres peptides opioïdes endogènes décrits. Cependant, il possède uniquement une affinité pour l'ORL1 (tableau 2). Le précurseur de la N/OFQ est la pro-nociceptine codée par le gène PNOC (figure 12)(Meunier et al., 1995). La N/OFQ est décrite pour être localisée principalement dans le cortex, la PAG, les noyaux du raphé, l'hypothalamus et l'hippocampe (Neal et al., 1999).

III.1.f. Les peptides endogènes anti-opioïdes : le cas du neuropeptide FF

Quelques neuropeptides endogènes sont qualifiés, de par leurs propriétés pharmacologiques, d'« anti-opioïdes », car ils réduisent les effets des opiacés. Le neuropeptide FF (NPFF) et la cholécystokinine (CCK) possèdent ces caractéristiques.

Le NPF est un peptide de huit acides aminés (FLFQPQRF) isolé initialement à partir du cerveau de bœuf. Il est décrit comme un anti-opioïde car il est capable d'inhiber l'analgésie induite par la morphine (Yang et al., 1985). Deux récepteurs au NPF, les récepteurs NPF1 et NPF2 couplés aux protéines G, ont été caractérisés (Bonini et al., 2000; Gouarderes et al., 2002). De nombreuses données suggèrent que le système NPF est un modulateur de l'activité analgésique de la morphine. En effet, une administration de morphine va induire la libération de NPF (Devillers et al., 1995) et l'immunoneutralisation du NPF supprime la tolérance à la morphine (Lake et al., 1991). De plus, l'administration d'un antagoniste sélectif des récepteurs au NPF, le RF9, prévient la mise en place de la tolérance (Bourguignon et al., 2006; Simonin et al., 2006).

Comme tout système, les opioïdes endogènes disposent d'un système de contrôle/régulation de leur activité. Le NPF et ses dérivés font partie du système homéostatique anti-opioïde permettant de contrôler, *via* ses propres récepteurs, l'action des agonistes endogènes et exogènes des récepteurs opioïdes.

III.2. Les ligands opiacés endogènes : histoire de la morphine endogène

En 1903, un scientifique français, le Dr Mavrojanis, observa qu'une injection de morphine chez le rat induit des symptômes similaires à ceux observés pendant une crise de catalepsie. Il postula alors que les crises de catalepsie observées chez les mammifères étaient provoquées par une libération d'analogues endogènes de la morphine (Mavrojanis, 1903). En 1970, Davis et Walsh postulèrent pour la première fois l'existence chez les mammifères de morphine endogène qui serait formée par une voie de synthèse similaire à celle décrite chez les plantes (Davis and Walsh, 1970). Ce n'est qu'en 1976, peu après la découverte des récepteurs aux opioïdes et à la même période de la découverte des premiers peptides opioïdes endogènes, que le groupe de S. Spector démontra l'existence d'un « morphine-like compound » (MLC) endogène. Sa présence fut mise en évidence par une expérience de RIA (radioimmunoassay) dans le cerveau de lapin et de chat. Ce composé, une fois purifié, possédait les mêmes propriétés analgésiques que la morphine, était capable de se lier aux récepteurs aux opioïdes et était insensible aux peptidases signifiant sa nature non peptidique (Gintzler et al., 1976). Il fut postulé que ce MLC aurait une structure très proche de celle de la morphine puisqu'un anticorps spécifique de la morphine ne liant pas les peptides opioïdes endogènes était capable de le détecter (Blume et al., 1977). Par la suite, le MLC fut observé chez la souris dans les neurones du cervelet et du raphé (Gintzler et al., 1978), puis chez l'homme dans le liquide céphalorachidien (LCR), l'urine

et dans des extraits de cerveau de patients n'ayant jamais reçu de morphine ou de dérivés morphiniques (Shorr et al., 1978). En 1981, Killian et ses collaborateurs isolèrent ce MLC après immunoprécipitation avec des anticorps anti-morphine à partir d'extraits de cerveau de veaux (Killian et al., 1981). Puis en 1985, Goldstein et ses collaborateurs identifièrent la présence de ce MLC dans le cerveau et la glande surrénale de bœuf. Une analyse RMN (Résonance magnétique nucléaire) démontra que la structure du MLC était identique à la structure de la morphine trouvée chez les plantes (Goldstein et al., 1985). La morphine présente de manière endogène chez les mammifères, dont la structure était strictement identique à la morphine des plantes, fut appelée « morphine endogène ». Par ailleurs, le même groupe montra la présence endogène d'autres composés pouvant correspondre à des intermédiaires de synthèse de la morphine (Goldstein et al., 1985). En 1986, Weitz et ses collaborateurs caractérisèrent la présence de morphine endogène, mais également de codéine endogène chez le bœuf (Weitz et al., 1986). Un an plus tard, ils décrivent la synthèse de *novo* du squelette de la morphine par le foie de rat (Weitz et al., 1987). Par la suite, de nombreuses études démontrèrent par HPLC, RMN ou spectrométrie de masse la présence d'alcaloïdes endogènes dans différents tissus de nombreuses espèces (cf. : I.Introduction, V, p.47), indiquant la présence d'un nouvel agoniste endogène des récepteurs aux opioïdes μ .

Cependant, malgré ces résultats, la communauté scientifique resta perplexe quant à la synthèse « endogène » de la morphine. En effet, la présence d'alcaloïdes dans les tissus de mammifères pourrait provenir de leur alimentation puisque la morphine est décrite pour être présente dans de nombreux végétaux incluant le foin et la laitue. La morphine a d'ailleurs été retrouvée dans le lait de vache et humain à des concentrations comprises entre 200 et 500 ng/L (Hazum et al., 1981).

IV. LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DE LA MORPHINE ENDOGÈNE

IV.1. Mise en évidence de la voie de biosynthèse chez les mammifères

Afin de mettre fin à ce débat et de prouver que la morphine détectée depuis 1976 était bien d'une origine endogène, il fallait démontrer que celle-ci était synthétisée de *novo* par des cellules de mammifères. C'est pour la première fois en 1970 que Davis et Walsh émettent l'idée d'une biosynthèse de morphine chez les mammifères suivant une voie de synthèse similaire à celle décrite chez les plantes (Davis and Walsh, 1970). En 1986, Weitz et ses collaborateurs découvrirent de la morphine endogène dans l'hypothalamus de bœuf, mais également de la codéine endogène, la codéine étant décrite pour être l'un des précurseurs de la morphine (Weitz et al., 1986). De plus, la même année, des injections de salutaridine, de thébaine ou de codéine, trois intermédiaires de la voie de synthèse de morphine chez les plantes, ont été décrites pour induire une augmentation du taux de morphine dans le cerveau de rat. Cette étude démontra pour la première fois la présence des enzymes nécessaires à la synthèse de morphine chez les mammifères (Donnerer et al., 1986). Plus tard, la conversion de salutaridine en réticuline, une étape importante dans la formation du squelette de la morphine, fut également démontrée *in vivo* dans le foie de rat (Weitz et al., 1987). Chez les plantes, la voie de synthèse de la morphine dérive de la L-tyrosine en passant par L-DOPA et la dopamine. Une autre preuve, cette fois-ci de la réalisation complète de la voie de biosynthèse de morphine endogène chez l'homme, fut apportée en 1992. En effet Matsubara et ses collaborateurs, observèrent des taux plus élevés de morphine et de codéine endogènes dans l'urine de patients parkinsoniens traités à la L-DOPA (Matsubara et al., 1992). Une ultime preuve de la synthèse de *novo* de morphine par les mammifères a été apportée par le groupe de M.H. Zenk. En cultivant une lignée cellulaire humaine, les cellules SHSY5Y, en présence de $^{18}\text{O}_2$, ils purent isoler différents intermédiaires radiomarqués de la voie de synthèse de la morphine, ainsi que de la morphine radiomarquée. Ils incubèrent également ces cellules avec les différents précurseurs radioactifs et purent décrire l'ensemble de la voie de synthèse de la morphine (Boettcher et al., 2005; Poeknapo et al., 2004). Plus récemment, une étude *in vivo* a montré que chez des souris invalidées pour le gène de la tyrosine hydroxylase (TH), l'enzyme nécessaire à la formation de dopamine, il n'y avait pas formation de morphine endogène (Neri et al., 2008) prouvant ainsi que la synthèse de morphine nécessite la présence de dopamine. Enfin, en 2010, la découverte de morphine endogène et de plusieurs de ses précurseurs dans l'urine de souris démontra à nouveau une synthèse *in vivo* de morphine chez l'animal (Grobe et al., 2010).

IV.2. La biosynthèse de morphine endogène : une analogie avec les plantes

La voie de synthèse de la morphine endogène chez les mammifères est très proche de celle décrite dans le pavot. On retrouve dans les deux cas un nombre similaire d'intermédiaires pour la plupart communs, cependant plusieurs différences sont observables. Le reste du paragraphe présente, en 6 étapes, les analogies et les différences entre la voie de synthèse décrite chez les mammifères (Boettcher et al., 2005; Poeaknapo et al., 2004) et de celle décrite dans le pavot à opium (pour revues : Facchini, 2001; Ziegler et al., 2009).

Etape 1 : (figure 13)

La première étape de la biosynthèse de morphine est la formation de dopamine à partir de L-Tyrosine. On distingue dans les deux règnes la présence des mêmes intermédiaires. La dopamine est formée à partir de la L-tyrosine, soit *via* la L-DOPA, soit *via* la tyramine.

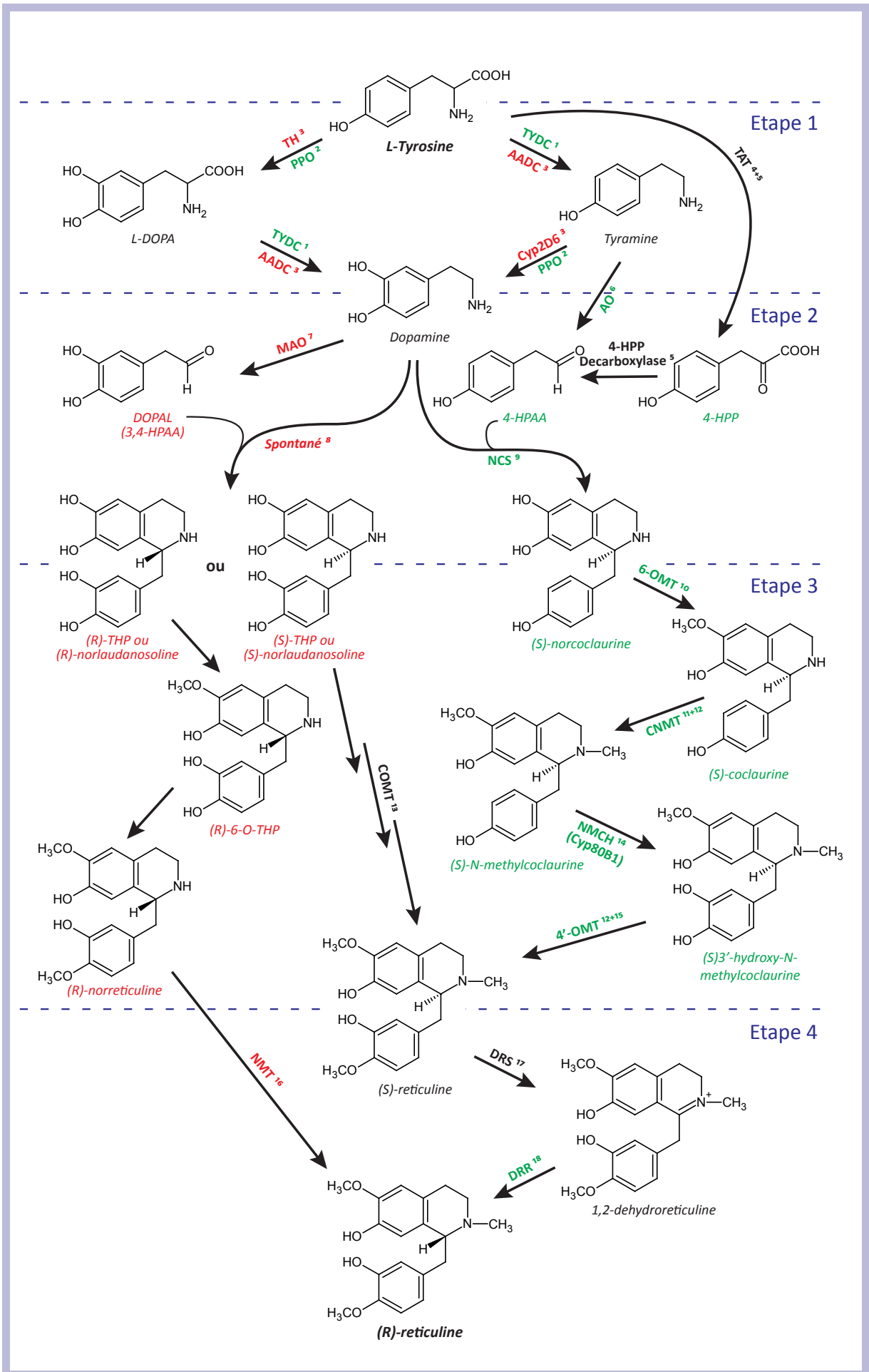
- ▶ Chez les mammifères, les deux principales enzymes connues sont la TH et la DOPA décarboxylase (AADC). Il est également décrit qu'une formation de dopamine est possible après hydroxylation de la tyramine par le cytochrome P450, CYP2D6.
- ▶ Chez les plantes, deux enzymes sont décrites, la tyrosine décarboxylase (TYDC) et la polyphénol oxydase (PPO).

Etape 2 : (figure 13)

- ▶ La seconde étape correspond chez les mammifères à la formation de nolaudanosoline (ou Tetrahydropapaveroline, THP) qui se fait par la condensation spontanée en condition aqueuse d'une molécule de dopamine et d'une molécule de 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde (DOPAL ou 3,4-HPAA). La DOPAL est formée par la monoamine-oxydase (MAO) à partir de la dopamine (Wachtel and Abercrombie, 1994).
- ▶ Chez les plantes, cette seconde étape est la formation de (S)-norcoclaurine par la condensation d'une molécule de dopamine et d'une molécule de 4-hydroxyphénylacétaldéhyde (4-HPAA). Contrairement aux mammifères, cette réaction est catalysée par une enzyme, la (S)-norcoclaurine synthase (NCS) (Ilari et al., 2009). Le 4-HPAA est formé à partir de la tyramine par une amine oxydase ou à partir de la L-tyrosine *via* le 4-HPP.

Etape 3 : (figure 13)

- ▶ Chez les mammifères, deux hypothèses ont été postulées quant au déroulement de cette étape : **(i)** de la (S)-THP est formée à l'étape 2 et est convertie par trois étapes de méthylation en (S)-Réticuline. L'ordre de ces étapes et les enzymes impliquées sont



inconnus (Boettcher et al., 2005). **(ii)** La deuxième hypothèse postule que de la (R)-THP est formée à l'étape 2, puis est convertie en (R)-Réticuline *via* trois méthylations. Récemment la N-méthyltransférase (NMT) a été décrite pour être capable de réaliser la dernière étape de méthylation de manière spécifique à la (R)-THP (Grobe et al., 2011). Cette hypothèse est d'un point de vue évolutif plus intéressante puisque la formation directe de (R)-réticuline permet de sauter l'étape 4.

- ▶ Chez les plantes la (S)-norcoclaurine est transformée en (R)-réticuline après trois méthylations et une hydroxylation. Les quatre enzymes impliquées ainsi que l'ordre de ces différentes étapes sont décrits et caractérisés dans la littérature.

Etape 4 : (figure 13)

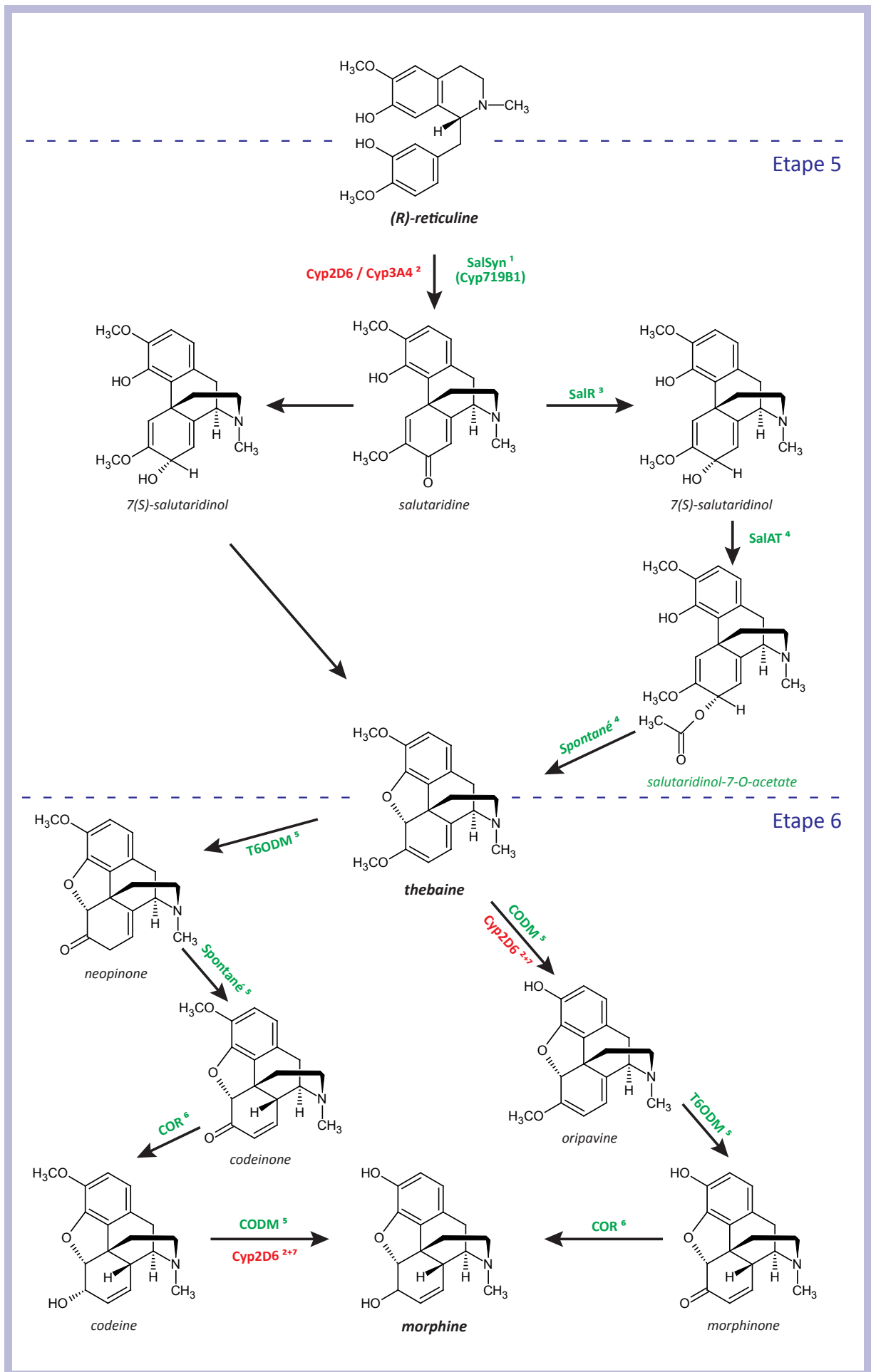
Cette étape consiste en la conversion de la (S)-Réticuline en (R)-Réticuline. Chez les mammifères, cette étape est nécessaire uniquement dans le cas de la première hypothèse, **(i)**, de l'étape 3, cependant celle-ci est mal connue. Chez les plantes, cette étape est obligatoire et seule l'une des deux enzymes impliquées a été caractérisée.

Etape 5 : (figure 14)

La première partie de cette étape est la conversion de la réticuline en salutaridine, qui est l'étape limitante de cette voie de synthèse. Elle est décrite pour être effectuée par un

Figure 13 : La voie de synthèse de la morphine, une analogie entre les mammifères et les plantes.

Partie 1 : L-tyrosine (R) → réticuline. Les intermédiaires (en italique) de la voie de synthèse communs aux deux règnes sont indiqués en noir, ceux propres aux plantes en vert, et ceux propres aux mammifères en rouge. Les enzymes identifiées (en gras) sont notées en rouge pour les mammifères et en vert pour les plantes. Les enzymes inconnues ou supposées sont indiquées en noir. Références : 1, (Facchini and De Luca, 1994); 2, (Bilka et al., 2000); 3, (Wassenberg et al., 2010); 4, (Prabhu and Hudson); 5, (Rueffer and Zenk, 1987); 6, (Bilkova et al., 2005); 7, (Florang et al., 2007); 8, (Deitrich and Erwin, 1980); 9, (Samanani and Facchini, 2002); 10, (Morishige et al., 2000); 11, (Loeffler et al., 1995); 12, (Ziegler et al., 2005); 13, (Silber et al., 1991); 14, (Facchini and Park, 2003); 15, (Morishige et al., 2000); 16, (Grobe et al., 2011); 17, (Ziegler et al., 2009); 18, (Hirata et al., 2004). Abréviations : TYDC, Tyrosine/Dopa Décarboxylase; PPO, Polyphénol oxydase; 4-HPP, 4-Hydroxyphenylpyruvate; 4-HPAA, 4-Hydroxyphenylacetaldehyde; L-DOPA, 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine; DOPAL, 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde; NCS, Norcoclaurine synthase; AO, Amine oxydase; CNMT, (S)-coclaurine-N-methyl-transferase; 6-OMT, 6-O-Methyltransferase; DRS, 1,2-Dehydroreticuline synthase; DRR, 1,2-Dehydroreticuline reductase; 4'-OMT, 4'-O-methyltransferase; NMCH, (S)-N-methylcoclaurine-3'-hydroxylase; TH, Tyrosine hydroxylase; AADC, Aromatic L-amino acid decarboxylase; MAO, monoamine oxydase; NMT, N-méthyltransférase; TAT, tyrosine aminotransférase; THP, tétrahydropapaveroline; COMT, Catechol-O-methyltransferase.



cytochrome P450/Salutaridine synthase étant le CYP179B1 chez les plantes (Ziegler et al., 2009) , le CYP2D6 chez l'homme et le CYP3A4 chez le rat (Grobe et al., 2009).

La seconde partie de cette étape est la conversion de la salutaridine en salutaridinol. Cette conversion est très mal connue chez les mammifères, alors que chez les plantes les différents intermédiaires et enzymes impliqués sont décrits.

Etape 6 : (figure 14)

Tous les intermédiaires de cette dernière étape sont décrits aussi bien chez les mammifères que chez les plantes. Deux voies sont possibles pour transformer la thébaine en morphine : la première passant par la codéinone, puis la codéine et, la seconde, passant par la morphinone. Chez les plantes, toutes les enzymes impliquées dans cette étape sont décrites, alors que chez les mammifères seul le CYP2D6 est décrit pour déméthyliser la thébaine en oripavine et la codéine en morphine.

La comparaison entre la voie de synthèse de la morphine décrite chez les mammifères et celle décrite chez les plantes suggère une conservation tout au long de l'évolution (Meijerink et al., 1999; Stefano and Kream, 2007). En effet, la morphine endogène, en plus d'être décrite chez les plantes et les mammifères, est également présente chez d'autres vertébrés comme l'anguille (Epple et al., 1993) et le crapaud (Donnerer et al., 1987 ; Oka et al., 1985). Elle est aussi retrouvée chez des invertébrés (pour revue : Perea-Sasiaín, 2008) comme la moule (Sonetti et al., 1999; Stefano et al., 1993; Zhu et al., 2001a), l'escargot (Goumon et al., 2001; Sonetti et al., 1999 ; Sonetti et al., 2005), les arthropodes comme le homard (Casares et al., 2005), les annélides comme la sangsue (Pryor and Elizee, 2000), dans les nématodes (Goumon et al., 2000b) et les plathelminthes (Pryor and Elizee, 2000; Zhu et al., 2002).

Figure 14 : La voie de synthèse de la morphine, une analogie entre les mammifères et les plantes.

Partie 2 : (R)-réticuline → morphine. Les intermédiaires (en italiques) de la voie de synthèse communs aux deux règnes sont indiqués en noir, ceux propres aux plantes en vert, et ceux propres aux mammifères en rouge. Les enzymes identifiées (en gras) sont notées en rouge pour les mammifères et en vert pour les plantes. Références : 1, (Gesell et al., 2009); 2, (Grobe et al., 2009); 3, (Gerardy and Zenk, 1993); 4, (Grothe et al., 2001); 5, (Hagel and Facchini, 2010); 6, (Lenz and Zenk, 1995); 7, (Zhu, 2008). Abréviations : SalSyn, Salutaridine Synthase; SalR, Salutaridine 7-oxidoreductase; SalAT, Salutaridinol-7-O-Acetate; COR, Codeine reductase; T6ODM, Thebaine-6-O-demethylase; CODM, Codeine-O-demethylase.

| Structure | Espèce | Quantités | | Référence | Techniques utilisées |
|----------------------|-------------|---|--------------------------|---------------------------|----------------------|
| | | Morphine | Codeine | | |
| Cerveau (Global) | Rat | 26 ± 6 fmol/g | 79 ± 16 fmol/g | (Donnerer et al., 1986) | HPLC, RIA |
| | | 0.23 ± 0.013 ng/g | | (Guarna et al., 1998) | HPLC, GC/MS |
| | | 329 ± 93 fmol/g | 31 ± 9 fmol/g | (Molina et al., 1995) | HPLC, RIA |
| | | 7 ± 3.2 ng/g | | (Goumon et al., 2000) | HPLC, GC/MS |
| | Souris | 0.31 ± 0.012 ng/g | | (Guarna et al., 2002) | HPLC, GC/MS |
| | | 6.3 fmol | 17.1 fmol | (Laux et al., 2011) | IP, LC/MS-MS |
| | | 1.01 ± 0.31 pmol/g M6G: 0.25 ± 0.15 pmol/g / M3G: 0.21 ± 0.22 pmol/g | 0.61 ± 0.22 pmol/g | (Laux et al., 2011) | HPLC, LC/MS-MS |
| | | 0.25 ± 0.23 ng/g | | (Charlet et al., 2010) | ELISA |
| | | 0.39 pmol/g (9h) 1.16 pmol/g (17h) | | (Horak et al., 1993) | HPLC, RIA |
| Singe | 0.11 ng/g | 0.04 ng/g | (Neri et al., 2004) | GC/MS | |
| Lobe temporal | Homme | 3.4 ng/g | | (Fricchione et al., 2008) | HPLC, RIA |
| Cortex | Rat | 0.62 ± 0.32 pmol/g | 0.81 ± 0.11 pmol/g | (Donnerer et al., 1987) | HPLC, RIA, MS |
| | | 0.43 ± 0.09 pmol/g | 0.63 ± 0.08 pmol/g | (Lee and Spector, 1991) | HPLC, RIA |
| | | 1 pmol/g | | (Meijerink et al., 1999) | HPLC, QTOF MS/MS |
| | Souris | 1.47 pmol/g | | (Muller et al., 2008) | ELISA |
| | | 0.62 fmol/mg | | (Laux et al., 2011) | HPLC, LC/MS-MS |
| | Lapin | 2 ± 1 ng/g | | (Gintzler et al., 1976) | RIA |
| | Bœuf | 0.05 ± 0.01 pmol/g | | (Oka et al., 1985) | HPLC, RIA |
| | Chat | 1.5 ± 0.7 ng/g | | (Gintzler et al., 1976) | RIA |
| Chien | 0.15 pmol/g | | (Meijerink et al., 1999) | HPLC, RIA | |
| Hippocampe | Lapin | 8 ± 3 ng/g | | (Gintzler et al., 1976) | RIA |
| | Souris | 7.46 pmol/g | | (Muller et al., 2008) | ELISA |
| | Chat | 5 ± 2 ng/g | | (Gintzler et al., 1976) | RIA |
| Ganglions de la base | Lapin | 33 ± 10 ng/g | | (Gintzler et al., 1976) | RIA |
| | Veau | 14 ng/g | | (Killian et al., 1981) | IP |
| | Chat | 24 ± 7 ng/g | | (Gintzler et al., 1976) | RIA |
| Bulbe Olfactif | Souris | 2.27 pmol/g | | (Muller et al., 2008) | ELISA |
| | | 2 fmol/mg | | (Laux et al., 2011) | HPLC, LC/MS-MS |
| Hypothalamus | rat | 7.22 pmol/g | | (Meijerink et al., 1999) | HPLC, RIA |
| | Lapin | 14 ± 4 ng/g | | (Gintzler et al., 1976) | RIA |
| | Bœuf | 0.25 à 4.9 pmol/g | | (Goldstein et al., 1985) | HPLC, RIA |
| | Chat | 12 ± 6 ng/g | | (Gintzler et al., 1976) | RIA |
| | Chien | 0.22 pmol/g | | (Meijerink et al., 1999) | HPLC, RIA |
| Cervelet | Rat | 0.63 ± 0.28 pmol/g | 0.80 ± 0.26 pmol/g | (Donnerer et al., 1987) | HPLC, RIA, MS |
| | | 0.37 ± 0.07 pmol/g | 0.48 ± 0.08 pmol/g | (Lee and Spector, 1991) | HPLC, RIA |
| | | 1.474 pmol/g | | (Meijerink et al., 1999) | HPLC, QTOF MS/MS |
| | Souris | 1.13 ± 0.59 ng/g | | (Charlet et al., 2010) | ELISA |
| | | 1.48 pmol/g | | (Muller et al., 2008) | ELISA |
| | Lapin | 12 ± 3 ng/g | | (Gintzler et al., 1976) | RIA |
| | Bœuf | 0.09 pmol/g | | (Oka et al., 1985) | HPLC, RIA |
| | Chat | 14 ± 4 ng/g | | (Gintzler et al., 1976) | RIA |
| | Chien | 0.134 pmol/g | | (Meijerink et al., 1999) | HPLC, RIA |
| Mésencéphale | Rat | 0.93 ± 0.36 pmol/g | 1.84 ± 0.57 pmol/g | (Donnerer et al., 1987) | HPLC, RIA, MS |
| | | 0.52 ± 0.07 pmol/g | 0.38 ± 0.09 pmol/g | (Lee and Spector, 1991) | HPLC, RIA |
| | Lapin | 4 ± 1 ng/g | | (Gintzler et al., 1976) | RIA |
| | Chat | 2.7 ± 1 ng/g | | (Gintzler et al., 1976) | RIA |
| Tronc cérébral | rat | 0.67 ± 0.18 pmol/g | 1.20 ± 0.27 pmol/g | (Donnerer et al., 1987) | HPLC, RIA, MS |
| | | 0.59 ± 0.10 pmol/g | 0.47 ± 0.08 pmol/g | (Lee and Spector, 1991) | HPLC, RIA |
| | | 0.346 pmol/g | | (Meijerink et al., 1999) | HPLC, RIA |
| | Souris | 0.54 ± 0.44 ng/g | | (Charlet et al., 2010) | ELISA |
| | | 3.39 pmol/g | | (Muller et al., 2008) | ELISA |
| | Lapin | 4 ± 1 ng/g | | (Gintzler et al., 1976) | RIA |
| | Chien | 0.388 pmol/g | | (Meijerink et al., 1999) | HPLC, RIA |
| Moelle Epinière | Rat | 0.13 pmol/g | | (Meijerink et al., 1999) | HPLC, RIA |
| | Rat | 1.64 ± 0.49 pmol/g | 3.22 ± 1.24 pmol/g | (Donnerer et al., 1987) | HPLC, RIA, MS |
| | Souris | 0.05 ± 0.01 ng/g | | (Charlet et al., 2010) | ELISA |
| | Chien | 0.16 pmol/g | | (Meijerink et al., 1999) | HPLC, RIA |

V. LOCALISATION DE LA MORPHINE ENDOGÈNE CHEZ LES MAMMIFÈRES

V.1. Au sein du système nerveux central

Grâce aux techniques d'immunohistochimie, de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), de spectrométrie de masse et de RIA, la présence de morphine endogène a pu être caractérisée sans ambiguïté dans différents tissus de mammifères et notamment dans le système nerveux central. On observe dans la littérature de nombreuses études quantifiant les taux de morphine endogène au sein de différentes zones du SNC (tableau 3). De plus, la présence de morphine et de codéine endogène a également été décrite dans le LCR humain (Cardinale et al., 1987; Shorr et al., 1978). De manière générale, bien que la présence de morphine endogène dans le SNC soit bien connue, sa localisation au sein des cellules du SNC l'est beaucoup moins. Seuls quelques articles décrivent la présence d'une immunoréactivité à la morphine et/ou à la codéine dans des cellules de l'hippocampe, du striatum, du cortex et du cervelet (Bianchi et al., 1994). Ces auteurs ont également décrit que les neurones sont capables d'accumuler de la ^3H -morphine après une infusion intracérébroventriculaire (ICV) (Bianchi et al., 1993), laissant supposer que ces neurones possèdent un système permettant la capture de la morphine. La morphine endogène est décrite pour être synthétisée de *novo* par une lignée cellulaire cathécolaminergique dérivant d'un neuroblastome humain, les SH-SY5Y (Boettcher et al., 2005; Poeaknapo et al., 2004), ce qui suggérerait une synthèse par les neurones cathécolaminergiques du SNC, *in vivo*. Cependant une étude plus récente à laquelle j'ai participé a montré que la morphine endogène est présente dans le cervelet au sein des terminaisons présynaptiques GABAergique des neurones en paniers sur les neurones de Purkinje (Muller et al., 2008). Bien que la dopamine soit nécessaire à la synthèse de morphine endogène, la présence de morphine endogène dans des cellules non dopaminergiques suggère une voie de synthèse plus complexe que celle décrite jusque-là.

Tableau 3 : Quantités décrites de morphine et de codéine endogènes dans le système nerveux central de mammifères. Abréviations : ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GC-MS, Gas chromatography-mass spectrometry; HPLC, High-performance liquid chromatography; IP, immuno-précipitation; LC-MS/MS, Liquid chromatography tandem mass-spectrometry; M6G, morphine-6-glucuronide; M3G, morphine-3-glucuronide; QTOF-MS/MS, quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry; RIA, radio-immuno-assay. Adapté de : Perea-Sasiain, 2008.

V.2. En périphérie

La morphine endogène est également décrite chez les mammifères pour être présente en périphérie. La morphine endogène a été détectée dans la glande surrénale de différents mammifères (Donnerer et al., 1987; Goumon and Stefano, 2000; Molina et al., 1995; Oka et al., 1985) qui représente un des organes majeurs de la réponse au stress. La partie médullaire de cette glande est principalement constituée par les cellules chromaffines. Il est intéressant de noter que la morphine a aussi été trouvée dans des cellules PC-12 qui sont des cellules chromaffines tumorales de rat (Goumon et al., 2000c; Poeaknapo et al., 2004). De plus, il a été récemment montré que la M6G est présente dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines suggérant, qu'au sein de ces cellules (Goumon et al., 2006), la M6G représente le composé final de la voie de biosynthèse des alcaloïdes endogènes. La morphine endogène est également détectée dans différents organes ou cellules :

- ▶ Les poumons de chien, ainsi que dans 4 lignées cellulaires pulmonaires humaines (Munjal et al., 1995). De manière intéressante, les taux de morphine endogène plasmatiques sont plus élevés chez les fumeurs que les non-fumeurs (Munjal et al., 1995).
- ▶ Le foie de rat (Donnerer et al., 1987 ; Donnerer et al., 1986; Molina et al., 1995) et la lignée d'hépatocytes humains HepG2 (Poeaknapo et al., 2004) sont décrits pour contenir de la morphine endogène.
- ▶ La morphine est également décrite pour être présente dans le pancréas de rat (Lee and Spector, 1991) et la formation d'intermédiaires de la morphine (THP, réticuline) a été montrée dans la lignée cellulaire pancréatique humaine DAN-G (Poeaknapo, 2005)
- ▶ La peau de lapin (Oka et al., 1985), de rat (Donnerer et al., 1987), humaine (Weinstein et al., 2002) et la lignée cellulaire de kératinocytes HaCaT (Poeaknapo et al., 2004) sont décrites pour contenir de la morphine endogène.
- ▶ La morphine endogène est présente dans un certain nombre de cellules sanguines humaines. Celle-ci est trouvée dans les granulocytes (Boettcher et al., 2006; Glattard et al., 2010; Zhu et al., 2005) et les cellules mononucléaires (Boettcher et al., 2006)
- ▶ La morphine endogène est détectée dans le cœur de souris (Horak et al., 1993), de rat (Donnerer et al., 1987) et humain (Zhu et al., 2001b).

D'autres organes ont également été décrits pour contenir de la morphine endogène, notamment chez le rat. Ainsi, la morphine endogène a été caractérisée dans la rate, le thymus et les reins (Molina et al., 1995). Les taux de morphine endogène décrits dans ces différents tissus et cellules sont très différents d'une étude à l'autre. Ces différences peuvent être expliquées par le fait que plusieurs conditions physiologiques sont connues pour induire une augmentation des taux plasmatiques ou tissulaires de morphine endogène. Notamment, il a été décrit chez la souris que les taux de morphine endogène détectés dans le cerveau, le cœur et la rate sont jusqu'à six fois plus importants l'après-midi (16h-17h) que le matin (9h-10h) suggérant la présence d'un rythme circadien de la sécrétion de morphine endogène (Horak et al., 1993). De nombreuses autres conditions vont également induire des élévations plasmatiques ou tissulaires des quantités de morphine endogène. Celles-ci seront décrites dans les paragraphes suivants puisqu'elles permettent de postuler un certain nombre d'hypothèses quant aux rôles de la morphine endogène.

VI. QUELS RÔLES POUR LA MORPHINE ENDOGÈNE

VI.1. En périphérie : stress et système immunitaire

VI.1.a. Morphine endogène, cellules chromaffines et stress

Les cellules chromaffines constituent la partie médullaire de la glande surrénale, l'un des organes majeurs de la réponse au stress. Elles sont connues pour synthétiser les catécholamines (p. ex., adrénaline) qui sont sécrétées lors d'un stress. Ainsi, des travaux ont montré que les cellules chromaffines de bœuf contiennent de la M6G au sein de leurs granules de sécrétion (cf. : I.Introduction, V.2., p.48). De plus, une sécrétion de M6G a été observée lors de l'application de nicotine induisant la sécrétion des cellules chromaffines en culture primaire (Goumon et al., 2006; Goumon et al., 2005). L'implication de ces cellules dans les réponses au stress suggère que la M6G est sécrétée en même temps que les catécholamines. Une fois sécrétée, la M6G pourrait avoir des effets physiologiques *via* sa liaison sur les MORs périphériques (p. ex. cellules immunitaires, endothélium). Cependant, chez l'homme, aucune étude n'a été effectuée sur les cellules chromaffines et l'on ne sait donc pas s'il y a présence de morphine ou de M6G.

VI.1.b. Morphine endogène et système immunitaire

Des études ont décrit que la morphine endogène était synthétisée par des cellules du système immunitaire (polymorphonucléaires et monocytes) suggérant une implication dans l'immunité (Boettcher et al., 2006 ; Glattard et al., 2010; Zhu et al., 2005). En effet, différentes données suggèrent l'implication de la morphine endogène dans les réponses immunitaires et les mécanismes de l'inflammation. Ainsi, quatre études réalisées sur le porc et sur des patients ayant subi des interventions chirurgicales (pontage coronarien ou laparotomie) indiquent une augmentation du taux sérique de morphine endogène. En effet, Brix-Christensen et ses collaborateurs ont montré qu'un pontage coronarien réalisé chez l'homme induisait une augmentation de la concentration de morphine endogène sérique de 0,28 à 3,9 nM (Brix-Christensen et al., 1997). De même chez des porcelets, un pontage coronarien induit des taux plasmatiques de 10 nM, alors qu'ils étaient non détectables dans le groupe témoin (Brix-Christensen et al., 2000). Pour finir, deux études réalisées chez l'homme ont indiqué que lors d'une cholécystectomie ouverte, la morphine endogène plasmatique était plus abondante (0,2 nM) que lors d'une intervention sous laparoscopie (0,018 nM) (Madbouly et al., 2010; Yoshida et al., 2000). Ces données suggèrent l'existence d'un effet « physiologique » de la morphine endogène lors de telles interventions, car les concentrations sériques observées

sont compatibles avec l'affinité des MOR (nM). Chez le rat, l'injection de lipopolysaccharide (LPS) ou de muramyl-dipeptide (MDP) chez la souris afin de mimer une infection bactérienne, induit une augmentation de la quantité en morphine endogène tissulaire (Goumon et al., 2000a; Horak et al., 1993). D'autres types de stress, tel que le jeûne, provoquent également l'augmentation des taux de morphine endogène présents dans le sang et la moelle épinière (Goumon et al., 2000a; Meijerink et al., 1999; Molina et al., 1995). Or, la morphine possède des effets immunosuppresseurs *via* la production de NO par les cellules immunitaires inhibant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, la chimiotaxie et la phagocytose (Stefano et al., 2000). De plus, la morphine induit la production de NO par l'endothélium, ce qui diminue l'expression des molécules d'adhésion nécessaires au recrutement des cellules immunitaires aux sites d'inflammation et active l'axe hypothalamohypophysosurrénalien libérant des glucocorticoïdes (Mellon and Bayer, 1998a). La morphine inhibe également la différenciation de cellules souches immunitaires en lymphocytes et la prolifération des lymphocytes T (Mellon and Bayer, 1998b), ainsi que l'activité cytolytique des lymphocytes NK (Mellon and Bayer, 1999). La libération de morphine endogène dans le sang lors de situations de « stress » pourrait représenter un mécanisme physiologique diminuant les réponses inflammatoires trop importantes (effets anti-inflammatoires).

VI.2. Les rôles connus et envisagés au sein du SNC

VI.2.a. La morphine endogène : un nouveau neurotransmetteur

De nombreux travaux ont décrit les effets de la morphine exogène sur le SNC aux concentrations habituellement utilisées dans le cadre thérapeutique, c'est-à-dire de l'ordre du μM . Ces concentrations sont de loin très supérieures aux concentrations de morphine endogène détectées (pM-nM). Il est donc difficile d'extrapoler les effets observés pour la morphine exogène aux effets potentiels de la morphine endogène. Il est cependant postulé que la morphine endogène pourrait être considérée comme un neurotransmetteur. En effet, celle-ci est décrite pour être présente dans certains neurones du SNC, synthétisée par un neuroblastome humain (SH-SY5Y) et être présente dans des terminaisons présynaptiques (cf. : I.Introduction, V.1., p.47). De plus, elle est décrite pour être libérée de manière calcium dépendante après dépolarisation au potassium (Guarna et al., 1998) ou après stimulation à la nicotine (Muller et al., 2008). Un autre critère nécessaire pour remplir les conditions d'un neurotransmetteur, est la présence d'un système de recapture. De nombreux travaux ont décrit l'existence de transporteurs de la morphine notamment au niveau des hépatocytes et des

cellules de la BHE. Cependant, il n'existe aucune information quant à l'identité des transporteurs de la morphine dans les neurones bien qu'un transport de morphine radiomarquée est décrit dans les neurones (Bianchi et al., 1993). Il n'existe pas à l'heure actuelle d'études décrivant précisément la morphine en tant que neurotransmetteur ; il manque par ailleurs un grand nombre de données quant à sa localisation au sein du SNC.

VI.2.b. La morphine endogène et le contrôle de la nociception

Sur la base des effets analgésiques de la morphine exogène, le premier rôle de son analogue endogène venant à l'esprit pourrait être lié au contrôle de la nociception. Ainsi, une étude décrit la présence de morphine endogène dans la RVM (Rostroventral medulla)(Stefano et al., 2000), structure impliquée dans la modulation supaspinale de la nociception. De plus, en injectant des anticorps anti-morphine dans le LCR de souris, Guarna et coll. ont pu baisser le taux cérébral de morphine endogène (immunodéplétion). En testant ensuite les souris à l'aide du test de la plaque chaude, les auteurs ont pu mesurer une baisse de la latence de léchage de la patte, indiquant l'apparition d'une hyperalgésie à la douleur thermique lorsque le niveau de morphine endogène est diminué (Guarna et al., 2002). D'autre part, des souris K.O. n'exprimant pas le MOR montrent une sensibilité accrue aux stimuli nociceptifs thermiques, mais pas aux stimuli mécaniques. Bien que dans le cas des souris K.O. MOR il est impossible de dissocier les effets des peptides opioïdes endogènes et de la morphine endogène. Ces résultats, avec les précédents, semblent indiquer que la morphine endogène diminuerait la sensibilité aux douleurs thermiques.

VI.2.c. La morphine endogène et mémoire

La présence de morphine endogène est décrite dans des cellules de l'hippocampe (Bianchi et al., 1993; Muller et al., 2008) et suggère un rôle de celle-ci sur les processus de mémorisation. Des études utilisant des injections d'anticorps anti-morphine dans le LCR de souris ont suggéré un lien entre la morphine endogène et la mémorisation (Guarna et al., 2004). En effet, après 12 heures de jeûne, des souris contrôles testées à l'aide d'un test d'évitement passif montrent une baisse de la mémorisation due à l'élévation de morphine endogène provoquée par un jeûne. Or, après une immunoneutralisation de la morphine réalisée à l'aide d'injections d'anticorps anti-morphine dans le LCR, plus aucune différence n'est observable. Ces données suggèrent que la morphine endogène pourrait, dans des conditions particulières (ici le jeûne) provoquant son augmentation, inhiber les processus de mémorisation.

VI.2.d. La morphine endogène et l'addiction

Sachant que la dopamine, un précurseur de la morphine endogène, est un neurotransmetteur clef des processus addictifs, un lien a été recherché entre la morphine endogène et l'addiction.

Des travaux réalisés sur deux modèles d'invertébrés, *Mytilus edulis* et *Homarus americanus*, ont montré que l'exposition à des substances addictives (éthanol, nicotine ou cocaïne) entraîne une augmentation de la libération de morphine endogène d'un facteur de deux par le système nerveux de ces organismes (Zhu et al., 2006a; Zhu et al., 2006b).

Chez les mammifères, une libération de morphine endogène par les cellules immunitaires humaines est décrite lors d'une administration de cocaïne, d'alcool ou de nicotine (Zhu et al., 2008). Par ailleurs, il est décrit chez l'homme que l'alcoolisme induit dans certaines structures cérébrales une surexpression du CYP2D6, impliqué dans quatre étapes de la voie de synthèse de la morphine endogène (Miksys et al., 2002). Finalement, il a été montré que l'alcoolisme induit une élévation des taux circulants de la THP, un précurseur de la voie de synthèse de la morphine endogène chez les mammifères (Haber et al., 1997; McCoy et al., 2003; Sango et al., 2000)

Un lien entre la morphine endogène et la dépendance a ainsi été postulé, puisqu'en raison de l'augmentation de ses taux plasmatiques (ou cérébraux *via* le CYP2D6), celle-ci pourrait avoir un effet renforçateur sur la prise de drogues (Gianoulakis, 2009; Stefano et al., 2007).



Chapitre 2 :



OBJECTIFS

OBJECTIFS

I. LA MORPHINE ENDOGÈNE ET LA COMMUNAUTÉ SCIENTIFIQUE

Les données sur la morphine endogène décrites et citées dans le paragraphe précédent sont finalement peu nombreuses par rapport aux données que l'on peut trouver sur les autres agonistes peptidergiques endogènes des récepteurs aux opioïdes. Pourtant, la présence de morphine synthétisée de manière endogène par les mammifères ouvre de nouvelles opportunités dans de nombreux domaines de recherche sur des mécanismes physiologiques, mais également pathologiques. Parmi ceux-ci, on peut citer les mécanismes de la dépendance, du contrôle de la douleur, de la tolérance et de l'inflammation. De plus, la morphine endogène pourrait avoir une implication dans toutes les pathologies liées à la dopamine, comme la schizophrénie ou la maladie de Parkinson.

Alors, pourquoi si peu d'études se rapportent-elles à la morphine endogène et pourquoi si peu d'équipes s'y intéressent-elles malgré toutes les perspectives qu'elle pourrait ouvrir ? Plusieurs raisons évidentes expliquent ce manque d'intérêt de la part de la communauté scientifique :

- ▶ **La controverse** : L'existence réelle de la morphine endogène a été débattue depuis la découverte du MLC (Gintzler et al., 1978). Encore aujourd'hui, malgré les preuves indiscutables obtenues ces dix dernières années (Boettcher et al., 2005 ; Neri et al., 2008), seulement cinq équipes travaillent actuellement sur la morphine endogène. C'est également la raison pour laquelle le sujet est encore inconnu de la majeure partie de la communauté scientifique.
- ▶ **L'amalgame** : En effet, entre la morphine endogène et les peptides opioïdes endogènes un amalgame est effectué et apparaît régulièrement dans les publications. Ainsi, de nombreux articles parlent d'« endogenous opiate » pour citer le système opioïdérique constitué des peptides. A notre niveau, nous faisons la différence entre le système opioïdérique (« opioïdes », peptidique) et le système opiacés endogènes

(« opiates », morphine et composés apparentés). Les publications sur la morphine endogène sont ainsi noyées parmi celles portant sur les opioïdes endogènes.

- ▶ **Un modèle** : La création d'un modèle d'étude permettant sans ambiguïté de déterminer les rôles de la morphine endogène est à l'heure actuelle impossible. En effet, les différentes étapes de la voie de synthèse sont bien décrites, mais la plupart des enzymes impliquées restent inconnues. Les enzymes décrites sont impliquées dans un grand nombre d'autres réactions enzymatiques/physiologiques et une invalidation pour ces enzymes ne serait donc pas spécifique à la morphine (p. ex. TH, CYP2D6). De plus, il est également impossible, *via* une invalidation ou un blocage des MORs, de différencier l'effet des peptides opioïdes endogènes de celui de la morphine endogène.
- ▶ **La Spécificité** : De par sa petite taille (285Da) et sa proximité structurale avec ses nombreux dérivés ou précurseurs, l'existence de moyens simples et spécifiques de détection de la morphine endogène reste limitée (i.e. anticorps).
- ▶ **Sa quantification** : La morphine endogène est présente en de très faibles quantités et les rendements des techniques d'extraction/quantification actuels sont très bas. Il est donc nécessaire d'utiliser des techniques de quantification très sensibles, coûteuses et pointues (i.e. spectrométrie de masse). De plus, les quantifications doivent se faire sur des quantités importantes de tissus.
- ▶ **Sa localisation** : La présence de morphine endogène au sein du SNC est décrite, cependant sa localisation cellulaire reste mal connue. Hormis de rares études qui décrivent succinctement la présence de morphine dans les neurones (Bianchi et al., 1994 ; Muller et al., 2008), il n'existe pas de description complète et précise de la localisation de la morphine endogène dans le SNC. Il est donc difficile de définir des hypothèses concernant les rôles éventuels de la morphine endogène.

Cinq équipes de part le monde travaillent actuellement sur la morphine endogène sur des axes de recherches différents. Cependant, l'hypothèse que la morphine puisse être un nouveau neurotransmetteur est commune aux cinq équipes et apparaît régulièrement dans les publications. L'équipe, au sein de laquelle j'ai effectué ma thèse, travaille depuis plusieurs années pour démontrer cette hypothèse. En effet, une étude à laquelle j'ai eu l'occasion de participer pendant mon stage de master (Muller et al., 2008) décrit la localisation de la morphine endogène dans des terminaisons présynaptiques du cervelet et décrit sa sécrétion

calcium dépendante dans une lignée cellulaire. Ces résultats suggèrent que la morphine pourrait représenter un neurotransmetteur mais n'apportent pas de preuves fonctionnelles.

II. MES OBJECTIFS

Mon objectif, posé lors de mon arrivée au sein de l'équipe, était de démontrer l'implication de la morphine endogène en tant que neurotransmetteur au sein du SNC et de décrire un processus physiologique cérébral dans lequel celle-ci est impliquée. Dès le début, je me suis confronté aux problèmes cités ci-dessus : manque de données, aucun modèle existant (K.O.), une spécificité très controversée, une quantification difficile et une localisation cellulaire mal connue. Il était donc difficile d'appréhender le rôle de la morphine endogène en tant que neurotransmetteur dans de telles conditions.

Je me suis alors fixé un nouvel objectif, celui de fournir des outils et des bases, permettant l'étude et la compréhension des rôles de la morphine endogène au sein du SNC *via* des approches d'immunologie, de biologie cellulaire et de biochimie. Les résultats que j'ai obtenus pendant ces trois années sont représentés dans les trois parties suivantes :

- ▶ **Partie 1** : Cartographie de la morphine endogène et de ses composés dérivés dans le système nerveux central de souris.
- ▶ **Partie 2** : Identification de protéines de liaison des alcaloïdes endogènes et exogènes : la Phosphatidyl Ethanolamine Binding Protein et la Créatine Kinase.
- ▶ **Partie 3** : Une application possible de la dissociation des complexes protéines-morphine : le dosage de la morphine endogène et exogène dans des échantillons sanguins.

Ces trois parties apportent des outils essentiels concernant la spécificité de détection de la morphine endogène et de ses dérivés, leur localisation au sein du SNC, leur quantification, ainsi que des perspectives concernant un modèle d'étude. Par ailleurs, en plus d'outils, chacune de ces parties apporte également de nombreuses informations fondamentales, aidant à la compréhension des rôles des alcaloïdes endogènes morphiniques dans le SNC.



Chapitre 3 :



RÉSULTATS

RÉSULTATS

Partie 1 : Cartographie de la morphine endogène et de ses composés apparentés dans le système nerveux central de souris

Partie 2 : Identification de protéines de liaison des alcaloïdes endogènes et exogènes : la PEBP et la Créatine Kinase

Partie 3 : Une application possible de la dissociation des complexes protéines-morphine : le dosage de la morphine endogène et exogène dans des échantillons sanguins

PARTIE 1

Cartographie de la morphine endogène et de ses composés dérivés dans le système nerveux central de souris

I. RÉSUMÉ

I.1. Contexte et question posée

La morphine endogène est décrite comme étant présente dans différentes structures du SNC (cf. : I.Introduction, V.1, p.47). Cependant, sa localisation cellulaire reste mal connue. En effet, seulement trois articles décrivent la présence de morphine dans les neurones de certaines structures cérébrales, mais sans en faire une cartographie complète (Bianchi et al., 1994; Gintzler et al., 1978; Muller et al., 2008). Afin de déterminer les rôles de la morphine endogène au sein du SNC, une des approches possibles est de déterminer sa localisation précise. La première partie de ma thèse a donc eu pour objectif de déterminer précisément la localisation de la morphine endogène et de ses dérivés au sein du SNC.

- ▶ **Dans quelles structures, quelles cellules et quels compartiments cellulaires la morphine endogène et ses dérivés sont-ils présents dans le SNC de souris adultes ?**

Pour répondre à cette question, les travaux effectués ont donné lieu à la rédaction de deux articles : le premier décrivant la localisation de la morphine endogène et de ses dérivés (codéine, M6G et M3G) dans le cerveau de souris (publication 1) et le second, en cours d'évaluation (Journal of comparative neurology), décrivant leur localisation dans la moelle épinière de souris (publication 2).

I.2. Approches & Résultats

Afin de décrire la localisation de la morphine endogène et de ses dérivés (Codéine, M6G et M3G) dans les différentes structures et cellules du SNC de souris, la première étape de mon travail a été de caractériser l'anticorps anti-morphine utilisé (6D6, Aviva Systems Biology) de manière à démontrer que l'immunoréactivité observée sur les coupes de cerveau de souris correspond sans ambiguïté aux alcaloïdes endogènes. Pour cela, plusieurs contrôles ont montré que : **(i)** l'anticorps utilisé (6D6, Aviva Systems Biology) reconnaît spécifiquement la morphine, la codéine, la M6G et la M3G sans cross-réactivité avec d'autres molécules structurellement

proches (précurseurs, antagonistes,...) et sans cross-réactivité avec les protéines présentes dans le SNC de souris. **(ii)** Une immunoprécipitation avec l'anticorps réalisée sur un extrait de cerveau de souris permet de purifier des alcaloïdes endogènes. **(iii)** Le paraformaldéhyde est capable de lier de manière covalente les alcaloïdes endogènes aux protéines, confirmant la fixation des alcaloïdes dans les tissus. **(iv)** L'injection ICV de morphine, codéine, M6G ou de M3G conduit à une augmentation de l'immunoréactivité dans le striatum montrant que les anticorps sont également capables de détecter les alcaloïdes exogènes *in-situ* après fixation. **(v)** Finalement, une quantification de la morphine et de la codéine endogène dans des structures microdisséquées montre leur présence uniquement dans les zones où une immunoréactivité pour la morphine et ses dérivés est observée.

Ces contrôles ayant été effectués, j'ai utilisé la microscopie à fond clair pour détecter la présence de la morphine endogène et de ses dérivés dans les différentes structures du SNC de souris adultes. De manière générale, la MOR et ses dérivés sont peu présents dans les structures habituellement impliquées dans les mécanismes de contrôle de la douleur (p. ex. PAG et noyaux du raphé). A l'inverse, ils sont retrouvés de manière importante dans les neurones présents dans des structures du système olfactif (p.ex., bulbe olfactif et tubercule olfactif), de la formation hippocampique (p.ex., subiculum et gyrus denté), des ganglions de la base (p.ex., caudé putamen et noyau accumbens), mais également du cervelet. Par ailleurs, dans la moelle épinière, mes résultats indiquent que la morphine endogène et ses dérivés sont présents dans des neurones répartis dans toutes les laminae de la moelle épinière hormis, les laminae I et II.

Une approche de microscopie confocale a ensuite permis la caractérisation neurochimique à l'aide de marqueurs spécifiques des cellules contenant la morphine endogène et ses dérivés. L'utilisation d'anticorps anti-GAD (Glutamic Acid Decarboxylase) a montré leur présence dans certains des neurones GABAergiques (γ -aminobutyric acid) comme observé par exemple dans le cortex, le striatum, l'hippocampe ou dans certaines couches profondes de la moelle épinière. Il faut noter que certains des neurones GABAergiques ne contiennent pas la morphine endogène ou ses dérivés. Par ailleurs, l'utilisation d'un anticorps anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) m'a permis de montrer la présence de morphine ou de ses dérivés dans les astrocytes (corps cellulaires, prolongements et pieds astrocytaires). Les astrocytes contenant la morphine endogène ou ses dérivés sont présents dans l'ensemble du système nerveux central. De manière surprenante, le dernier marqueur utilisé dirigé contre la TH, a

permis de montrer que la morphine endogène et ses dérivés sont absents du corps cellulaire des neurones dopaminergiques, notamment ceux de la substance noire compacte ou de l'ATV. La même observation est faite au niveau des terminaisons des neurones dopaminergiques dans le striatum ou le noyau accumbens.

Finalement, une approche de microscopie électronique m'a permis de confirmer la présence de morphine endogène ou de ses dérivés dans le cytoplasme des neurones et des astrocytes, ainsi que dans leurs prolongements respectifs. Comme précédemment décrit (Muller et al., 2008), la morphine ou ses dérivés sont détectés dans les vésicules de sécrétion des terminaisons présynaptiques des cellules en panier du cervelet innervant les corps cellulaires des neurones de Purkinje. Cependant, dans le reste du SNC de souris, nos observations montrent que les alcaloïdes endogènes sont localisés dans les parties postsynaptiques.

1.3. Conclusions

Cette première partie de ma thèse m'a permis de décrire deux outils permettant l'étude de la morphine endogène au sein du SNC. Premièrement, j'ai identifié et caractérisé un anticorps commercial de manière à montrer qu'il reconnaît sans ambiguïté la morphine, la M6G, la M3G et la codéine endogène dans des tissus fixés. Deuxièmement, j'ai fourni un descriptif détaillé de la localisation de la morphine endogène et de ses dérivés au sein du SNC qui servira d'outils aux futurs travaux portant sur leurs implications dans la physiologie du SNC.

En plus de ces deux outils, la cartographie présentée dans ces deux études apporte de nouveaux éléments qui permettront de définir de nouvelles hypothèses quant au(x) rôle(s) de la morphine endogène et de ses dérivés au sein du SNC. En effet, mes deux études décrivent la présence de morphine endogène et de ses dérivés dans des structures non impliquées dans le contrôle de la nociception (p. ex., striatum, cervelet), dans des cellules non dopaminergiques (p. ex., astrocytes, neurones GABAergiques), ainsi que dans le corps cellulaire et la partie postsynaptique des neurones. Ces éléments apportent de nombreuses perspectives de recherche: **(i)** les processus physiologiques dans lesquels ils sont impliqués semblent différents du simple contrôle de la nociception. **(ii)** La voie de synthèse, mais également le catabolisme de la morphine endogène semble faire intervenir plusieurs partenaires cellulaires différents. **(iii)** La morphine endogène aurait d'autres fonctions au sein du SNC que celui de neurotransmetteur et **(iv)** il est également possible, du fait de leur présence intracellulaire, que la morphine endogène ou ses dérivés aient d'autres cibles que les récepteurs aux opioïdes.

II. PUBLICATION 1

**MAPPING OF ENDOGENOUS MORPHINE-LIKE COMPOUNDS IN
THE ADULT MOUSE BRAIN: EVIDENCE OF THEIR LOCALIZATION
IN ASTROCYTES AND GABAERGIC CELLS**

Laux A., Muller A.H., Miehe M., Dirrig-Grosch S., Deloulme J.C.,
Delalande F., Stuber D., Sage D., Van Dorselaer A.,
Poisbeau P., Aunis D., Goumon Y.

The Journal of Comparative Neurology

15 Aout 2011, 519(12) :2390-2416

Mapping of Endogenous Morphine-Like Compounds in the Adult Mouse Brain: Evidence of Their Localization in Astrocytes and GABAergic Cells

Alexis Laux,^{1,2} Arnaud H. Muller,² Monique Miehé,^{1,3} Sylvie Dirrig-Grosch,⁴ Jean Christophe Deloulme,⁵ François Delalande,⁶ Denise Stuber,¹ Dominique Sage,⁷ Alain Van Dorsselaer,⁶ Pierrick Poisbeau,¹ Dominique Aunis,² and Yannick Goumon^{1,2*}

¹Nociception and Pain Department, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR 3212 and Université de Strasbourg, F-67084 Strasbourg, France

²INSERM, U575, Physiopathologie du Système Nerveux, F-67084 Strasbourg, France

³Plateforme imagerie cellulaire Strasbourg esplanade (Plateforme d'imagerie in vitro), IFR37 Neurosciences, F-67084 Strasbourg, France

⁴INSERM, U692, Laboratoire de signalisations moléculaires et neurodégénérescence, Université de Strasbourg UMRS692, F-67084 Strasbourg, France

⁵INSERM, U866, Institut des Neurosciences, CEA/IRTSV/GPC, Université Joseph Fourier, F-38042 Grenoble, France

⁶Laboratoire de spectrométrie de masse BioOrganique, IPHC-DSA, Université de Strasbourg, CNRS UMR7178, F-67087 Strasbourg, France

⁷Plate-forme d'hébergement et d'exploration fonctionnelle Chronobiotron, IFR37 Neurosciences -CNRS, F-67084 Strasbourg, France

ABSTRACT

Endogenous morphine, morphine-6-glucuronide, and codeine, which are structurally identical to vegetal alkaloids, can be synthesized by mammalian cells from dopamine. However, the role of brain endogenous morphine and its derivative compounds is a matter of debate, and knowledge about its distribution is lacking. In this study, by using a validated antibody, we describe a precise mapping of endogenous morphine-like compounds (morphine and/or its glucuronides and/or codeine) in the mouse brain. First, a mass spectrometry approach confirmed the presence of morphine and codeine in mouse brain, but also, of morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide representing two metabolites of morphine. Second, light microscopy allowed us to observe immunopositive cell somas and cytoplasmic processes throughout the mouse brain. Morphine-like immunoreactivity was present in various structures including the hippocampus, olfactory bulb, band of

Broca, basal ganglia, and cerebellum. Third, by using confocal microscopy and immunofluorescence co-localization, we characterized cell types containing endogenous opiates. Interestingly, we observed that morphine-like immunoreactivity throughout the encephalon is mainly present in γ -aminobutyric acid (GABA)ergic neurons. Astrocytes were also labeled throughout the entire brain, in the cell body, in the cytoplasmic processes, and in astrocytic feet surrounding blood vessels. Finally, ultrastructural localization of morphine-like immunoreactivity was determined by electron microscopy and showed the presence of morphine-like label in presynaptic terminals in the cerebellum and postsynaptic terminals in the rest of the mouse brain. In conclusion, the presence of endogenous morphine-like compounds in brain regions not usually involved in pain modulation opens the exciting opportunity to extend the role and function of endogenous alkaloids far beyond their analgesic functions. *J. Comp. Neurol.* 519:2390–2416,

Additional Supporting Information may be found in the online version of

Grant sponsors: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Université de Strasbourg; French Ministère délégué à la Recherche et à

*CORRESPONDENCE TO: Dr. Yannick Goumon, INCI, CNRS UPR3212, 5, rue Blaise Pascal, F-67084 Strasbourg Cedex, France. E-mail: yannick.

Received December 23, 2009; Revised August 20, 2010; Accepted March 1, 2011

DOI 10.1002/cne.22633

Published online March 31, 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

© 2011 Wiley-Liss, Inc.

this article.

l'Enseignement Supérieur (Ph.D. fellowship to A.M. and A.L.); Fondation Transplantation (to Y.G.); Fondation pour la Recherche Médicale (to Y.G.).

goumon@inserm.u-strasbg.fr

2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

INDEXING TERMS: morphine; morphine-6-glucuronide; morphine-3-glucuronide; codeine; dopamine; immunohistochemistry

INTRODUCTION

Morphine extracted from *Papaver somniferum* remains the gold standard for pain relief in the hospital setting (Stefano et al., 2000; Soliman et al., 2001). This alkaloid binds to the μ -opioid receptor (MOR), leading to several effects, including analgesia (Matthes et al., 1996). In humans, exogenous morphine is mainly catabolized into morphine-6-glucuronide (M6G; 10%) and morphine-3-glucuronide (M3G; 90%) through the action of the UDP-glucuronosyltransferase 1A and 2B families (UGT1A and UGT2B), which are present in the liver (Mackenzie et al., 2005) and in the brain (Suleman et al., 1998; Nagano et al., 2000; Heurtaux et al., 2006). M6G displays greater analgesic effects than morphine, whereas M3G is devoid of analgesic effects (Lotsch and Geisslinger, 2001; Lotsch, 2005a,b; Collier et al., 2009).

Since the 1970s, endogenous morphine, M6G, and codeine, which are structurally identical to alkaloids from plants, have been characterized in different mammalian tissues and cells (Gintzler et al., 1978; Hazum et al., 1981; Goldstein et al., 1985; Weitz et al., 1986; Donnerer et al., 1987; Herbert et al., 2000; Stefano et al., 2000, 2008; Zhu et al., 2001; Neri et al., 2004; Goumon et al., 2009). In mammals, the endogenous morphine biosynthesis pathway has been studied in the SH-SY5Y human neuronal catecholaminergic cell line and has been shown to derive from the dopamine biosynthesis pathway, leading to codeine and finally to morphine (Poeaknapo et al., 2004; Boettcher et al., 2005; Muller et al., 2008; Stefano et al., 2008). In addition, blockade of the dopamine biosynthesis using a tyrosine hydroxylase (TH) conditional knockdown mouse model is associated with a deficit in endogenous morphine synthesis (Neri et al., 2008), suggesting that dopamine is a precursor of endogenous morphine in mammalian cells. However, because the non-dopaminergic cell line DAN-G produces morphine (Poeaknapo et al., 2004), it is possible that non-dopaminergic cells can internalize dopamine or intermediate metabolites of the morphine biosynthesis pathway, such as tetrahydropapaveroline (THP; also called norlaudanosoline), but also synthesize intermediate metabolites for morphine biosynthesis, to complete the production of endogenous morphine (Boettcher et al., 2005; Goumon et al., 2009; Grobe et al., 2010).

We have previously reported the presence of M6G in secretory granules and secreted material of bovine adrenal chromaffin cells (Goumon et al., 2006). M6G was associated with the phosphatidylethanolamine-binding

protein (PEBP), a protein that specifically binds M6G and M3G and has no affinity for morphine (Goumon et al., 2004; Atmanene et al., 2009). In these particular cells, we observed the presence of an UGT2B-like enzyme able to convert morphine into M6G. More recently, in the SH-SY5Y cell line model, we observed the presence of morphine and M6G and characterized the presence of UGT2B7, which has been shown to catabolize morphine to M3G and M6G (Coffman et al., 1997; Muller et al., 2008). M6G, despite its more potent analgesic nature, was previously thought of only as a product of morphine catabolism. However, our data have indicated that M6G may represent the final product of endogenous alkaloid biosynthesis in chromaffin cells, whereas in SH-SY5Y cells, both morphine and M6G coexist (Muller et al., 2008).

The presence of endogenous morphine, codeine, and M6G has been characterized in the brain of cows, rats, monkeys, mice, and dogs (Donnerer et al., 1987; Stefano et al., 2000; Goumon et al., 2009). Recent data have indicated that high endogenous morphine levels are present in the blood during stressful situations including pathological states such as sepsis (Brix-Christensen et al., 1997, 2000; Glattard et al., 2010; Madbouly et al., 2010). However, these fluctuations in morphine levels and their consequences for brain function remain to be fully elucidated (Goumon et al., 2009). Among the few available studies, it has been shown that endogenous morphine immunoneutralization (intracerebroventricular administration of an anti-morphine antibody) decreased thermal response latency and attenuated the anti-nociceptive effect of the MOR-selective agonist DAMGO in a hot plate test. This suggests that endogenous morphine is involved in the setting of nociceptive thresholds and in opiate-mediated pain modulation (Guarna et al., 2002). A similar immunoneutralization approach has suggested a role for endogenous morphine in the weakening of memory processes under stressful conditions (Guarna et al., 2004).

Our recent studies have focused on the functional role of endogenous morphine in neuronal cells. Using the SH-SY5Y model, morphine and M6G were found to be restricted to large, dense-core vesicle-like organelles and to be released via a Ca^{2+} -dependent mechanism (Muller et al., 2008). Using the patch-clamp technique in cell culture, we have shown that naloxone-sensitive electrophysiological responses are induced by morphine and M6G at concentrations as low as 10^{-10} M. Using the mouse brain model, we have shown well-defined morphine expression

TABLE 1.
Primary Antibodies Used

| Antigen | Immunogen | Raised in | Manufacturer data | Dilution |
|----------|---|---------------------|--------------------------------------|---|
| GAD65/67 | Synthetic peptide corresponding to C ^{ter} part of human GAD. The sequence is identical in human GAD65 (amino acids 570–585) and GAD67 (amino acids 579–594) (Peptide: K-DIDFLIEEIERLGQDL) | Rabbit (polyclonal) | Abcam (ab49832) | IHC: 1:500 |
| GFAP | GFAP isolated from cow spinal cord | Rabbit (polyclonal) | DAKO (Z0334) | IHC: 1:1,000 |
| TH | Denatured TH from rat pheochromocytoma | Rabbit (polyclonal) | Chemicon-Millipore (AB152) | IHC: 1;1,000 |
| Morphine | BSA-morphine conjugate | Mouse (monoclonal) | Aviva Systems Biology (AVAMM16002-4) | IHC: 1:1,000 ICC: 1:3,000 WB: 1:4,000 ELISA: 1:2,000 |

Abbreviations: GAD, glutamic acid decarboxylase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; TH, tyrosine hydroxylase; BSA, bovine serum albumin; IHC, immunohistochemistry; ICC, immunocytochemistry; WB, Western blot; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

in the cerebellum, with morphine immunoreactivity present in basket cell bodies and in their axonal synaptic terminals, which innervate Purkinje cell bodies that express MOR subtypes (Mrkusich et al., 2004; Zhang et al., 2006; Muller et al., 2008). Morphine immunoreactivity was also present at the presynaptic level, suggesting its possible release and a regulatory action on Purkinje cell function (Muller et al., 2008; Goumon et al., 2009). This is supported by the previously published description of Ca²⁺-dependent release of morphine from nerve terminals (Guarna et al., 1998). Other studies have also shown the presence of morphine and codeine in specific brain neurons (Gintzler et al., 1978; Bianchi et al., 1993, 1994). This further suggests that endogenous morphine and its derivatives may represent new neuromodulators of brain functions, acting at both pre- and postsynaptic sites within neuronal networks.

A straightforward approach to studying the roles of endogenous morphine and morphine-derived molecules in brain physiology is to examine in detail their localization in brain structures. Few data are available on the localization of endogenous morphine, morphine glucuronides, or codeine in the central nervous system (CNS), and no precise mapping exists. The present study was designed to determine morphine/M3G/M6G/codeine immunoreactivity in mouse brain structures. First, a biochemical approach was used to characterize the presence of morphine, morphine glucuronides, and codeine in the mouse brain. Second, detailed immunohistochemical mapping of endogenous morphine-like compounds (i.e., morphine, M6G, M3G, and codeine) in the adult mouse brain was performed by using conventional and confocal microscopy and electron microscopy, to determine subcellular localizations. Finally, co-immunolocalization of morphine-like immunoreactivity with different cell markers allowed

us to characterize cells that contain endogenous morphine and/or morphine-derived molecules.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were performed on five 45-day-old laboratory-bred, adult male C57BL/6 mice weighting 30 ± 3 g. Animals were given free access to food and water, with a 12-hour light-dark cycle at a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$. All procedures were performed in accordance with European directives (86/609/EEC) and were approved by the regional ethics committee and the French Ministry of agriculture (license no. 67-116, to P.P.).

Antibody characterization

Antibodies used in the present study are commercially available and have already been used in previous studies. Table 1 provides informations about these antibodies including immunogens, species, commercial sources, and dilutions used in the present study.

Glutamic acid decarboxylase isoforms 65/67 (GAD65/67) antibody

The rabbit anti-GAD65/67 antiserum (Abcam, Cambridge, MA; #ab49832) was produced by using one synthetic peptide common to the two GAD isoforms. Anti-GAD65/67 antibodies recognize a specific band size of 65 kDa molecular weight on Western blot of human infant medulla lysate (Broadbelt et al., 2010). The staining observed on Western blot was blocked when incubation with the peptide was performed. In immunohistochemistry on mouse brain sections, no immunostaining was observed after a pre-incubation of the antibody with saturating concentration of the target protein (Broadbelt et al., 2010).

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody

The rabbit anti-GFAP polyclonal antiserum (DAKO, Glostrup, Denmark; #Z0334) was produced by using GFAP isolated from cow spinal cord. The staining pattern by immunohistochemistry matches the expected distribution of GFAP in mouse auditory brainstem (Abraira et al., 2007). With the use of cultured mouse primary astrocytes, the antibody staining demonstrates a filamentous pattern, consistent with GFAP presence in intermediate filaments. In Western blot using mouse brain extracts, this antibody recognizes a band of approximately 55 kDa (Arantes et al., 2009).

Tyrosine hydroxylase (TH) antibody

The rabbit anti-TH polyclonal antiserum (Chemicon-Millipore, Molsheim, France; #AB152) was produced by using denatured full-length TH isolated from rat pheochromocytoma. Its specificity has been corroborated by Western blot analysis of adrenal gland or brain of different species (i.e. rat, mouse; see manufacturer's data sheet), in which it selectively labels a single band at approximately 62 kDa. In addition, a selective label of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta has been observed (Martin-Ibanez et al., 2006).

Morphine antibody

The mouse anti-morphine antibody (6D6, Aviva Systems Biology, San Diego, CA; #16002) was produced by using a morphine-bovine serum albumin (BSA) conjugate. This antibody has been used in previous studies (Muller et al., 2008; Glattard et al., 2010) to determine the presence of morphine/M6G by immunohistochemistry, with results consistent with those described here (i.e. basket cell labeling in cerebellar cortex). Furthermore, seven specificity controls for the anti-morphine antibody (6D6) were performed for this study:

1. The morphine antibody was omitted in order to control for nonspecific binding of the secondary antibody in the tissue section. Omission of the primary antibody resulted in no peroxidase label in the tissue sections (e.g., striatum) compared with 6D6 immunoreactivity (data not shown).
2. Immunoreactivity disappeared when the 6D6 antibody was preabsorbed for 1 hour with 3 μ M of morphine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), codeine (Sigma-Aldrich), M6G (Sigma-Aldrich), or M3G (Sigma-Aldrich; data not shown) before immunohistochemistry.
3. Western blotting of mouse brain extracts with the 6D6 antibody was performed and showed no cross-reactivity of the antibody with proteins (see Results, Fig. 3C, lane 1).
4. A control for the cross-linking of morphine, M6G,

M3G, and codeine to proteins by paraformaldehyde (PFA) was performed in vitro (see Results, Fig. 3B,C, lane 2) and in vivo (see Results).

5. We assessed 6D6 anti-morphine antibody cross-reactivity with morphine, morphine derivatives, and catecholamines by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; see Results, Fig. 2). The 6D6 antibody is only able to recognize morphine, codeine, M6G, and M3G.
6. To link the immunohistochemistry results described in this study and the biochemical detection of endogenous morphine, codeine, M3G, and M6G, we performed mass spectrometry analysis of micro-punches from several brain areas. No endogenous alkaloids have been detected in structures that are poorly immunoreactive, such as the amygdala nuclei and the VPL/VPN nucleus of the thalamus; however, we were able to detect codeine in strongly immunoreactive structures, such as the caudate putamen (2.89 fmol/mg protein), the olfactory bulb (2 fmol/mg protein), and the cortex (0.62 fmol/mg protein). The levels of morphine, M6G, and M3G were beneath the limit of detection in these brain areas.
7. Immunoprecipitation was performed to confirm the ability of the 6D6 antibody to bind endogenous alkaloid. Thus, 10 mg of whole mouse brain extract (in 400 μ l of phosphate-buffered saline [PBS], pH 7.4) were mixed with 20 μ g of the 6D6 antibody and incubated overnight at 4°C. The reaction medium was then incubated with 300 μ l of protein A/G PLUS-agarose beads (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; #sc-2003) and incubated for 4 hours at 4°C. Complexes (i.e., antibodies-alkaloids-beads) were washed five times with 500 μ l of PBS (4°C). Elution of the protein A/G-mouse IgG complex was done by boiling for 30 minutes in a 1 M urea buffer. After acidification with 1 M HCl, an equal volume of chloroform was added. The mixture was then centrifuged at 13,000 rpm for 15 minutes at 4°C. The aqueous phase was retrieved and submitted to LC-MS/MS analysis (see below). Codeine (17.1 fmol) and morphine (6.3 fmol) were detected in the immunoprecipitated fraction, confirming the presence of these alkaloids and the ability of the 6D6 antibody to detect them in the mouse brain.

Immunohistochemistry

Tissue preparation for immunohistochemistry studies

Mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of 0.1 ml of a 5.6% (w/v) pentobarbital sodium solution (CEVA Santé Animale, Libourne, France) and perfused transcardially with fixative solution using a peristaltic

pump. For conventional and electron microscopy, a fixative solution of 4% formaldehyde (EMS, Hatfield, PA) in a 0.1 M NaCl/Pi buffer (disodium hydrogen phosphate dihydrate, 1.28% [w/v], sodium dihydrogen phosphate monohydrate, 0.38% [w/v]; pH 7.4) with 0.25% (v/v) glutaraldehyde (VWR, Fontenay sous bois, France) was used. The same fixative solution was used for laser confocal microscopy, except that glutaraldehyde was omitted. Fixative solutions were chilled and then perfused for 10 minutes with a peristaltic pump at a flow rate of 10 ml/min. The brain was quickly removed and incubated for 2 hours at 4°C in the same fixative solution. Coronal and sagittal brain sections (70 µm thick) were cut with a Vibratome (Leica VT 1000 S, Nanterre, France) and collected in Tris-buffered saline (TBS: 50 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, pH 7.4).

Slice immunostaining

Immunostaining was performed on slides, free-floating in TBS, as previously described (Hedou et al., 2000). Tissue slices were washed in TBS and incubated for 1 hour in BSA (Euromedex, Mundolsheim, France) diluted in TBS (5%, w/v) in order to saturate nonspecific immunoreactive sites. After saturation, sections were incubated overnight with a mixture of primary antibodies raised in different species in TBS containing 0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Triton X-100 was omitted for electron microscopy. Primary antibodies were used as described in the antibody list in Table 1. After incubation with the primary antibody, tissue slices were washed six times with TBS (5 minutes), and specific secondary antisera were added for 2 hours at room temperature (RT), followed by six TBS washes (5 minutes). These secondary antisera were as follows: 1) horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-mouse IgG (P.A.R.I.S., Paris, France; #BI 2413C; dilution 1:400); 2) Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probes-Invitrogen, Cergy Pontoise, France; #A21206; dilution 1:1,000); and 3) Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England; #715-165-150; dilution 1:1,000). Several controls were carried out to assess antibody specificity and nonspecific immunoreactivity. Primary antibodies were omitted, and each secondary antibody was tested individually or in a mixture in the presence of tissue sections. Each antibody was also tested with the secondary antibody used for the second immunolabeling in order to determine whether interspecies cross-reactivity exists.

Light microscopy

Peroxidase activity was measured after a 15 minutes incubation period in a freshly prepared solution of 4-chloro-1-naphthol (0.2 mg/ml) in TBS containing 0.006% (w/v) hydrogen peroxide. After washing with TBS, the

sections were mounted in glycerol/TBS (1:1, v/v) before analysis with a Leica DMRB microscope equipped with a digital camera (AxioCam, Zeiss, Le Pecq, France).

Electron microscopy

Peroxidase activity was detected with a freshly prepared solution of 0.025% (w/v) 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride in TBS containing 0.006% (w/v) hydrogen peroxide. After washing with NaCl/Pi buffer, sections and slides were postfixed for 30 minutes with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M NaCl/Pi buffer (pH 7.4), and then with 1% (w/v) osmium tetroxide in 0.1 M NaCl/Pi buffer (pH 7.4) at 4°C for 1 hour. Sections were dehydrated in ethanol and embedded in Araldite resin (Hedou et al., 2000). Ultrathin sections were observed with a Hitachi H 7500 electron microscope (Hitachi, Monroeville, PA) without additional staining. Pictures were acquired with a Hamamatsu Digital camera (C 4742-95, Massy, France).

Confocal microscopy observations

Immunofluorescent staining was analyzed with a Zeiss laser scanning microscope (LSM510 invert) equipped with a plan apo 63× oil immersion and a 40× oil immersion lens. Tissue sections were subjected to optical serial sectioning to produce images in the X-Y plane. Images of optical sections were the average of eight scans. Pictures were recorded digitally in a 1,024 × 1,024-pixel format. A look-up table (Range indicator, Zeiss) ensured that the full dynamic range of the photomultipliers was used. Before each measurement, a series of sections was acquired through the vertical axis in order to choose the equatorial section.

Anatomical and cellular distribution

Anatomical structures were identified under direct observation using the atlas and nomenclature of Paxinos and Watson (Paxinos and Franklin, 1997). Cartography was done on four animals, the staining being identical for each experiment.

HPLC-MS/MS instrumentation and analytical conditions

A hydrophilic interaction liquid chromatographic (HILIC) reverse phase column coupled to a triple quadrupole mass spectrometer was used to accurately detect the presence of morphine, M3G, and M6G in the selected reaction monitoring (SRM) mode. Identification of the compounds was based on the precursor ion, the selective fragment ions, and retention times.

Prior to LC-MS-MS analysis, methanol-extracted brains were dissolved in 0.1% trifluoroacetic acid in H₂O (v/v) and purified by using an Äkta purifier HPLC system (GE

Healthcare Bioscience, Strasbourg, France) as previously described (Goumon et al., 2006). Buffer A was 0.1% trifluoroacetic acid (TFA, v/v) in water, and buffer B was 70% acetonitrile and 0.09% TFA in water. Fractions corresponding to morphine, M3G, and M6G were dried by using a SpeedVac evaporator prior to LC-MS-MS analysis. LC retention time of endogenous morphine present in mouse brain was identical to the exogenous morphine standard (external and internal standards).

LC-MS separations were carried out with an Agilent LC 1100 binary pump, equipped with an autosampler, a vacuum degasser, and a column oven coupled with an Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Dry samples were resoluted in 10 μ l of 70% acetonitrile, vortex-mixed for 1 minute, and injected on an acrylamido-type column (TSKgel Amide-80, TOSOH, Tokyo, Japan) at 25°C. The solvent system consisted of 99.85% water, 0.15% formic acid, and 5 mM ammonium acetate (NH OAc, solvent A) and 100% acetonitrile (solvent B). Elution was performed at a flow rate of 220 μ l/min by using a 70–40% linear gradient (solvent B) for the first 8 minutes, followed by a 80% stage (solvent B) for 2 minutes before the reconditioning of the column at 70% of solvent B. The system was fully controlled by MassHunter software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Electrospray ionization was achieved in the positive mode with the spray voltage set at 4,000 V. Nitrogen was used as the nebulizer gas, and nebulizer pressure was set at 20 psi with a source temperature of 100°C. Desolvation gas (nitrogen) was heated to 350°C and delivered at a flow rate of 10 L/min. Qualification was performed in MRM mode with the following transitions:

m/z 286.1 \rightarrow 201.1 m/z and 286.1 \rightarrow 165.1 for morphine
 m/z 462.1 \rightarrow 286.1 and m/z 462.1 \rightarrow 201.1 for M6G and M3G
 m/z 300.2 \rightarrow m/z 225, m/z 300.2 \rightarrow 214.8, m/z 300.2 \rightarrow 199.0, m/z 300.2 \rightarrow 164.8, and m/z 300.2 \rightarrow 123.0 for codeine.

Anti-morphine 6D6 competitive immunoenzymatic ELISA

Determination of the morphine 6D6 antibody specificity was done on a 96-well plate (NUNC, Roskilde, Denmark) coated during a night at RT with 200 μ l of a 100 ng/ml morphine-BSA solution (#80-IM50, Fitzgerald Industries, North Acton, MA). After three washes with 0.1 M NaCl/Pi-0.05% Tween buffer (PT; 10 minutes), wells were incubated for 1 hour with 200 μ l of BSA diluted in NaCl/Pi buffer (5%, w/v) in order to saturate nonspecific sites. After saturation, wells were incubated

for 30 minutes with 100 μ l of NaCl/Pi-BSA (3%, w/v) containing from 0.01 nM to 1 μ M of the following potential antigens: morphine (Sigma-Aldrich), M6G (Sigma-Aldrich), M3G (Sigma-Aldrich), codeine (Sigma-Aldrich), norepinephrine (Sigma-Aldrich), epinephrine (Sigma-Aldrich), dopamine (Sigma-Aldrich), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA; Sigma-Aldrich), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC; Sigma-Aldrich), and norlaudanosoline (THP, Sigma-Aldrich). Then 100 μ l of the mouse monoclonal primary antibody (6D6, Aviva Systems Biology; dilution 1:2,000) in NaCl/Pi-BSA (3%, w/v) were added to each well. After 3 hours of incubation at RT, the plate was washed three times with PT buffer, and 200 μ l of the secondary antibody (HRP-conjugated donkey anti-mouse IgG, P.A.R.I.S.; dilution 1:400) was added and left in the wells for 2 hours at RT. After two washes with PT buffer followed by two washes with a pH 7.5 phosphate-citrate-0.05% Tween buffer (CT; 10 minutes), revelation was performed with 200 μ l of a fresh solution of ortho-phenylene diamine (OPD; Sigma Aldrich) at 1.5 mg/ml in CT buffer containing 0.075% hydrogen peroxide. After 20 minutes of incubation at RT, optical density was determined at 450 nm with a Multiskan EX plate reader (Thermo Life Sciences, Cergy Pontoise, France). The dissociation constants (K) of the antibody for an antigen were determined by sigmoidal fitting (KyPlot 2.0, Tokyo, Japan).

Cross-binding of morphine and derivatives to proteins after PFA treatment

In vivo experiments

To determine whether alkaloids can be fixed in brain tissues, mice were perfused with 4% PFA for either 30 minutes (saline, morphine, codeine) or 1 hour (M3G/M6G) after saline or alkaloid intracerebroventricular (i.c.v.) injections. Brains were used for immunohistochemistry experiments using the 6D6 antibody as described above.

In vitro experiments

Two different *in vitro* experiments were performed: 1) 10 μ g of morphine, codeine, M6G, or M3G were incubated (12 hours at 4°C, under shaking) in the presence of 200 μ g BSA (BSA V Fraction; Euromedex, Souffelweyersheim, France) and 200 μ l of 4% formaldehyde (EMS) in a 0.1 M NaCl/Pi buffer; and 2) 200 μ g of whole protein extract from brain mouse were incubated (12 hours at 4°C, under shaking) in the presence of 200 μ l of 4% formaldehyde (EMS) in a 0.1 M NaCl/Pi Buffer.

In both experiments, PFA was omitted in control. Then 10 μ g of protein of the resulting reactions were assayed on Western blot.

Intracerebroventricular injections

Mice were anesthetized (i.p.) with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Following induction of anesthesia, each mouse was placed in a stereotaxic frame. The injection site was 2.6 mm from the surface of the cortex and 1 mm to the right of the reference bregma, using coordinates from a standard mouse brain stereotaxic atlas (Paxinos and Franklin, 1997). Then 20 nmol (5 μ l) of each drug (morphine, codeine, M6G, and M3G; $n = 3$ animals per condition) were administered over 5 minutes by using a 26-gauge needle fitted on a 5- μ l Hamilton microsyringe (Hamilton, Bonaduz, Switzerland). After injection, the needle was kept in place for 5 minutes to allow for diffusion of the drugs.

Western blot

Proteins were separated on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gradient gels (4–12% acrylamide; Criterion XT, XT-MOPS running buffer; BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Samples (10 μ g) were suspended in 20 μ l of loading buffer (2% SDS, 4 M urea, 5% glycerol, 5 mM EDTA, 1% β -mercaptoethanol, 60 mM Tris-HCl, pH 6.8) and boiled for 10 minutes prior to gel loading. After migration, proteins were electrotransferred onto polyvinylidene difluorene membrane (GE Healthcare Bioscience) (Goumon et al., 2006). After 30 minutes of saturation (PBS supplemented with 3% BSA and 0.05% Tween 20), the 6D6 antibody was used at a dilution of 1:3,000 (in PBS supplemented with 3% BSA and 0.05% Tween 20). Immunoreactivity was revealed by using an HRP-conjugated donkey anti-mouse antiserum (P.A.R.I.S.; 1:50,000 in the same buffer) and a Supersignal West Femto Kit (Pierce, Rockford, IL). Non-specific binding of the secondary antibody was tested by omitting the 6D6 antibody; it showed no nonspecific labeling.

Commercial morphine-BSA (0.1 μ g; #80-IM50, Fitzgerald Industries International) was used to determine whether the anti-morphine 6D6 antibody (Aviva Systems Biology) recognized morphine-protein complexes on a Western blot.

Photomicrographs

Figures including photomicrographs were made with Adobe Photoshop software without changing brightness, contrast, and exposure. For all series of experiments using microscopy, images were captured with the same parameters and settings of brightness, contrast, and exposition.

RESULTS

Characterization of morphine and morphine glucuronides in the mouse brain by mass spectrometry

In order to confirm the presence of morphine and morphine-derived compounds in mouse brain extracts, LC-MS-MS analysis was performed in SRM mode. The specific transition m/z 286.1 \rightarrow 201.1 and m/z 286.1 \rightarrow 165.1 was used to qualify the presence of morphine, m/z 462.1 \rightarrow m/z 286.1 and m/z 201.1 for M6G and M3G, and m/z 300.2 \rightarrow m/z 225, m/z 214.8, m/z 199.0, m/z 164.8, and m/z 123.0 for codeine. After comparison with the MS performed on morphine, M6G, M3G, and codeine standards (Fig. 1A), analysis of the whole mouse brain extract allowed for detection of morphine and codeine and, for the first time, detection of endogenous M6G and M3G (Fig. 1B). Endogenous morphine, codeine, M6G, and M3G levels were (per gram of wet brain; $n = 3$) 1.01 ± 0.31 pmol/g, 0.61 ± 0.22 pmol/g, 0.25 ± 0.15 pmol/g, and 0.21 ± 0.22 pmol/g, respectively.

In order to rule out a hypothetical intake of exogenous alkaloids from mouse diet, the same extraction protocol used to extract endogenous alkaloids from mouse brain was performed on 2 g of mouse food pellet. MS analysis performed on the food extract was unable to detect morphine, codeine, M6G, or M3G (data not shown), indicating that endogenous alkaloids do not result from exogenous compounds present in the diet.

Antibody selectivity

The specificity of the mouse monoclonal 6D6 anti-morphine antibody was investigated by several means.

6D6 anti-morphine antibody cross-reactivity with morphine, morphine derivatives, and monoamines

The cross-reactivity of the 6D6 antibody with morphine, M6G, M3G, and endogenous morphine precursors (codeine, THP, dopamine, L-DOPA, and DOPAC) as well as epinephrine and norepinephrine was tested by ELISA (Fig. 2). The 6D6 antibody displayed an affinity for morphine ($K = 20.93$ nM), M6G ($K = 8.1$ nM), M3G ($K = 7.56$ nM), and codeine ($K = 18.15$ nM). No cross-reactivity was found for the other monoamines tested (Fig. 2). These data confirm that the 6D6 antibody can simultaneously detect morphine, codeine, M6G, and M3G in brain structures without interfering with the other components tested above.

The 6D6 anti-morphine antibody is able to detect morphine-linked protein following PFA treatment

The efficiency of the cross-linking of alkaloids to proteins after PFA treatment is a matter of debate. PFA may

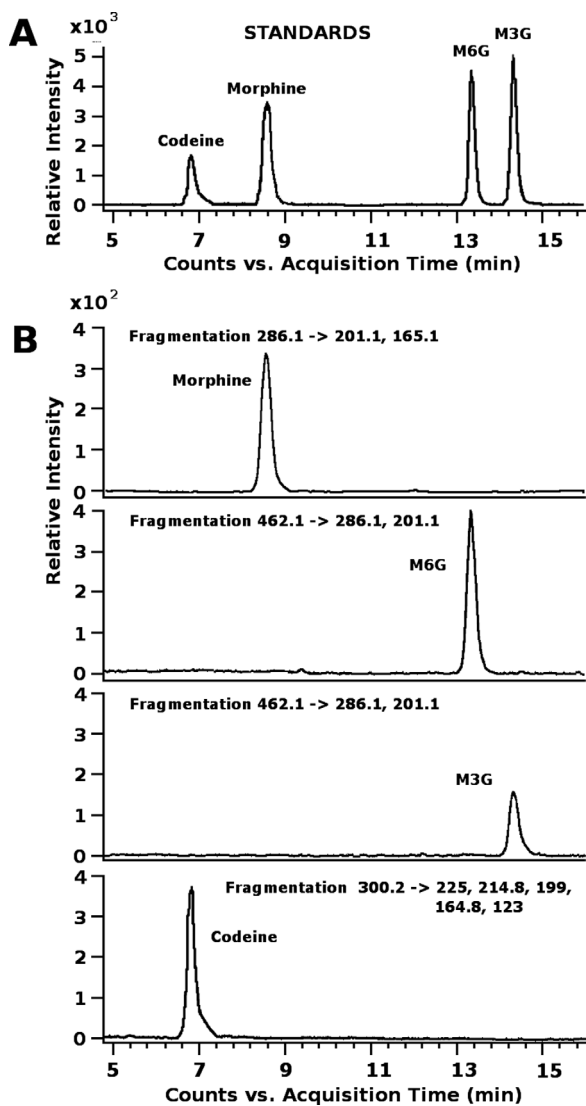


Figure 1. LC-MS-MS analysis of morphine, M6G, M3G, and codeine presence in mouse brain. **A:** Relative intensity of the MS-MS ions observed for morphine, M6G, M3G, and codeine standards. **B:** Relative intensity of the MS-MS ions specific for morphine, M6G, M3G, and codeine present in mouse brain extracts.

react with primary and secondary amines. For instance, formaldehyde has been described to react with aliphatic or aromatic amine (Walker, 1964; Kunkel et al., 1981) and alkaloids, in general, are expected to form complexes with formaldehyde (Hesse, 2002).

To determine whether morphine and its related compound can be cross-linked to proteins (i.e., covalent morphine-protein complexes) following PFA treatment, we first examined whether the anti-morphine 6D6 was able to detect commercial morphine-BSA complexes on a Western blot. BSA (0.1 μ g) and commercial morphine-BSA (0.1 μ g) were loaded onto an SDS-PAGE gel, and the anti-morphine 6D6 was used to detect morphine-like immunoreactivity after gel blotting (Fig. 3A). Immunodetection

allowed us to detect a band around 66 kDa ($n = 5$; BSA, 67 kDa) corresponding to morphine-BSA. Immunoreactive bands were also observed for higher molecular weights and correspond to multimers of morphine-BSA resulting from the action of the coupling agent on BSA. This control indicated that morphine, covalently linked to a protein, can be detected by Western blot with the anti-morphine 6D6 antibody. Complementary experiments omitting the anti-morphine 6D6 antibody confirmed that the label was not due to cross-reactivity of the secondary antibody with BSA or morphine-BSA (Fig. 3A).

We performed PFA fixation on commercial BSA to determine whether exogenous alkaloids can be cross-linked to this reference protein. Thus, codeine, M3G, M6G, or morphine was incubated with BSA in the presence or absence of PFA. Samples corresponding to 10 μ g of BSA were loaded on an SDS-PAGE gel. After migration and electroblotting, immunodetection was performed by using the anti-morphine 6D6 antibody. A diffuse immunolabeling due to alkaloid cross-linking and BSA-polymer cross-linking was observed for BSA treated with PFA in the presence of codeine, M3G, M6G, or morphine (Fig. 3B). No immunoreactivity was observed for the controls (BSA alone, BSA incubated in the presence of the alkaloids without PFA, and BSA alone treated with PFA). This experiment clearly demonstrates that PFA is able to induce cross-linking of codeine, M3G, M6G, or morphine to a protein. The experiment using BSA treated with PFA ruled out possible cross-immunoreactivity of the secondary antibody that may be due to PFA treatment (Fig. 3A).

In addition, total mouse brain extracts (containing endogenous alkaloids) treated or not treated with PFA *in vitro* were assayed by Western blot. A diffuse immunoreactive label was observed for PFA-treated extracts (around 80–90 kDa, $n = 5$), which is likely due to a cross-link between many different proteins and endogenous alkaloids. Control experiments showed no immunolabel for non-fixed brain extracts and for the control experiment using the secondary antibody alone (Fig. 3C). These results show that endogenous morphine-like compounds are fixed to proteins only after PFA treatment. An identical result was obtained with brain tissue from mice perfused with PFA (*in vivo*; data not shown).

Additional experiments were done after codeine, M3G, M6G, or morphine intracerebroventricular injections (i.c.v.; 20 nmol; $n = 3$) in mice. Mice were perfused with PFA 30 minutes (morphine, codeine) or 1 hour (M3G/M6G) after i.c.v. injections. These times are necessary to obtain a high concentration of exogenous alkaloids in the brain (Okura et al., 2003). The resulting brain slices underwent immunohistochemistry experiments using the anti-morphine 6D6 antibody. The tissues from each injection condition were processed simultaneously, using the

same batches of reagents and the same development times. As a result, and for example, 6D6 immunoreactivity in cells, extracellular space, and processes was stronger after alkaloid injections in the striatum in comparison

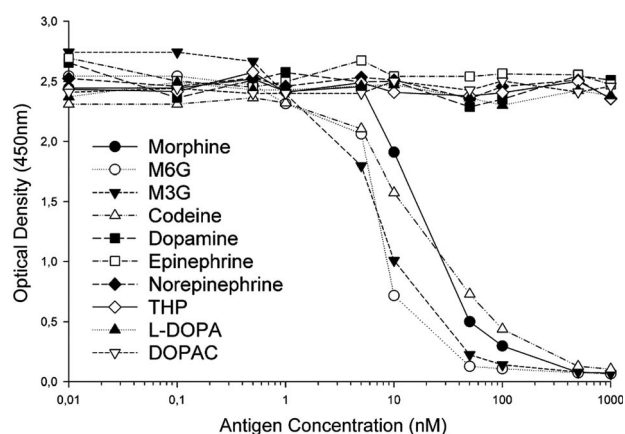


Figure 2. Competitive immunoassay (ELISA) of 6D6 morphine antibody specificity for morphine, M6G, M3G, codeine, dopamine, L-DOPA, DOPAC, norepinephrine, epinephrine, and THP. The antibody is blocked with specific antigens when the optical densities decrease. The 6D6 morphine antibody is able to recognize morphine, codeine, M3G, and M6G. DOPAC, dihydroxyphenylacetic acid; L-DOPA, L-3,4-dihydroxyphenylalanine; M3G, morphine-3-glucuronide; M6G, morphine-6-glucuronide; THP, tetrahydropapaveroline.

with saline-injected mice (data not shown). For alkaloid-injected mice, MIR density gradients in cells, extracellular space, and processes were dependent on the distance from the injection site (LV, lateral ventricle; data not shown). These results are consistent with those of previous studies showing that exogenous morphine can be stored in cells containing endogenous morphine (Bianchi et al., 1993).

Control experiments using MS analysis, performed after i.c.v. administration of 20 nmol of exogenous morphine, allowed us to determine that the morphine concentration increased to 16 ± 3.5 nmol per brain ($n = 4$).

These results indicate that morphine, M6G, M3G, and codeine are properly fixed by PFA in mouse brain and that the 6D6 antibody is able to detect them in situ.

Distribution of endogenous morphine-like immunoreactivity in the adult mouse brain *Immunohistochemistry*

Light microscopy was used to analyze morphine, morphine glucuronides, and codeine immunoreactivity (MIR) present in the adult mouse brain by using the 6D6 antibody.

Analysis of the MIR present in the olfactory structures, cortex, basal forebrain and ganglia, hippocampus, thalamus, hypothalamus, subthalamus, midbrain, cerebellum,

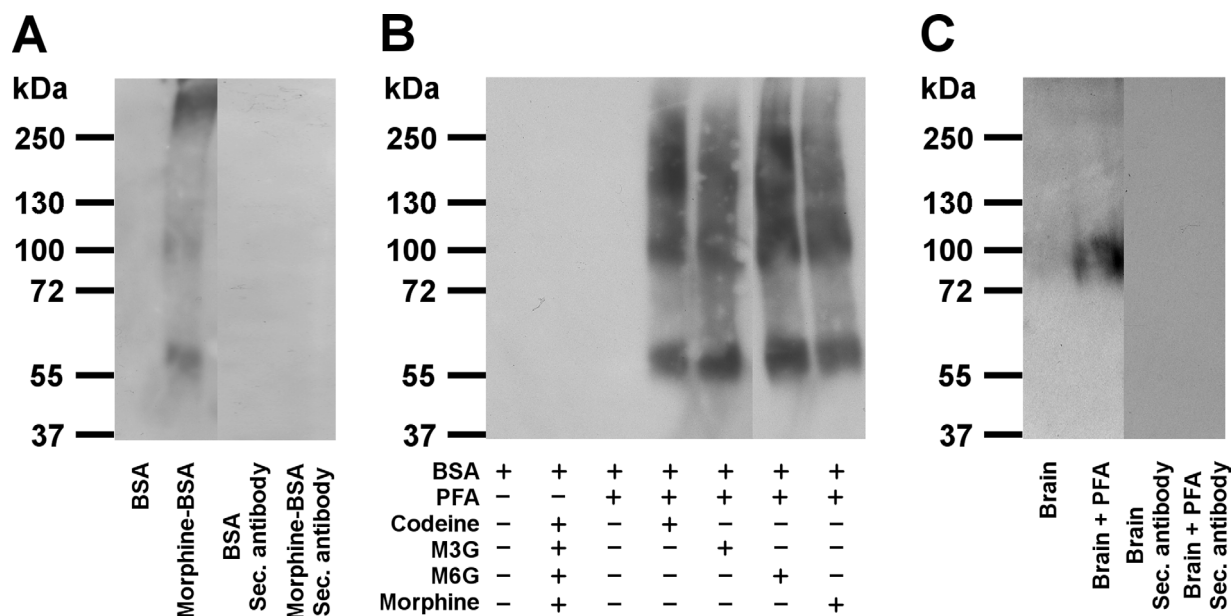


Figure 3. Controls for cross-linking of alkaloids to proteins after paraformaldehyde (PFA) treatment using a Western blot approach. A: Validation of the 6D6 antibody use for Western blot analysis (1:4,000). 6D6 antibody immunolabel observed for bovine serum albumin (BSA) alone (control) and morphine-BSA (0.5 μ g; 67 kDa; $n = 5$). The two last lanes correspond to the control (BSA and morphine-BSA) using the secondary antibody alone. B: Cross-linking experiments of alkaloids to BSA with or without PFA treatments. Immunolabel is only observed for alkaloids after PFA treatment. C: Immunolabel of morphine-like compounds linked to total mouse brain proteins (10 μ g) before and after PFA treatment. A diffuse immunolabel at 80–90 kDa can only be observed after PFA treatment. The two last lanes correspond to the control using the secondary antibody alone (unfixed and fixed brain proteins).

pons, and medulla was performed on the adult mouse brain and is summarized in Table 2.

Olfactory structures

In the olfactory system, MIR was observed in the primary and secondary olfactory structures. Strong immunolabeling was detected in the glomerular layer and the

external plexiform layer of the olfactory bulb, both in cell bodies and in cell processes (Fig. 4A). In the mitral cell layer, mitral cells were not labeled, but strong labeling was present in the granule cells of the γ -aminobutyric acid (GABA)ergic granular cell layer (Fig. 4B). In addition, MIR was also found in cells and processes in the core of the olfactory bulb and peduncle corresponding to the

TABLE 2.
Distribution of Morphine-Like Immunoreactivity in the Adult Mouse Central Nervous System¹

| Structure | Cell bodies | Processes | Structure | Cell bodies | Processes |
|--------------------------------------|-------------|-----------|-----------------------------------|-------------|-----------|
| Olfactory bulb | | | Subthalamus | | |
| Granular cell layer | + | + | Zona incerta | ++ | ++ |
| Mitral cell layer | - | ++ | Subthalamic nucleus | + | ++ |
| External plexiform layer | - | ++ | Midbrain | | |
| Glomerular layer | + | +++ | Substantia nigra compact part | - | ++ |
| Olfactory system | | | Substantia nigra reticular part | + | ++ |
| Piriform cortex | - | ++ | Ventral tegmental area | - | ++ |
| Anterior olfactory nu. | + | + | Red nucleus | +++ | ++ |
| Endopiriform nucleus | - | ++ | Interpeduncular nucleus | - | + |
| Tenia tecta | + | ++ | Periaqueductal gray | - | +++ |
| Olfactory tubercle | ++ | + | Oculomotor nucleus (III) | - | +++ |
| Basal forebrain | | | Dorsal raphe nucleus | - | +++ |
| Septohippocampal nucleus | + | ++ | Median raphe nucleus | - | +++ |
| Lateral septal nucleus | - | ++ | Superior colliculus | + | ++ |
| Medial septal nucleus | + | ++ | Inferior colliculus | +++ | ++ |
| Triangular septal nucleus | ++ | ++ | Midbrain reticular nucleus | - | ++ |
| Diagonal band of Broca | ++ | ++ | Nucleus of the optic tract | + | + |
| Bed nucleus of the stria terminalis | - | ++ | Nucleus of Darkschewitsch | ++ | ++ |
| Substantia innominata | +++ | ++ | Interstitial nucleus of Cajal | ++ | ++ |
| Basal ganglia | | | Anterior tegmental nucleus | + | ++ |
| Accumbens nucleus | +++ | ++ | Ventral tegmental nucleus | ++ | ++ |
| Caudate putamen | +++ | ++ | Cerebellum | | |
| Fundus striati | - | + | Cerebellar cortex | | |
| Globus pallidus | + | +++ | Granular layer | + | + |
| Amygdala | | | Purkinje layer | ++ | ++ |
| Posterior amygdala nucleus | + | ++ | Molecular layer | - | +++ |
| Basolateral/lateral amygdala nucleus | - | + | Deep cerebellar nucleus | ++ | ++ |
| Medial amygdala nucleus | - | ++ | Pons | | |
| Hippocampal formation | | | Perilivary nucleus | ++ | + |
| Subiculum | ++ | ++ | Nucleus of the trapezoid body | + | ++ |
| Ammon's horn | + | ++ | Principal sensory trigeminal nu. | - | ++ |
| Dentate gyrus | | | Central gray of pons | - | + |
| Polymorph layer | + | +++ | Nucleus of the lateral lemniscus | ++ | ++ |
| Subgranular zone | +++ | ++ | Parabrachial nucleus | - | + |
| Granular layer | - | + | Pontine reticular nucleus | - | ++ |
| Molecular layer | + | ++ | Reticulotegmental nu. of pons | - | ++ |
| Thalamus | | | Pontine raphe nucleus | - | ++ |
| Anteroventral thalamic nucleus | - | ++ | Medulla | | |
| Paraventricular thalamic nucleus | - | +++ | Prepositus nucleus | - | ++ |
| Medial habenular nucleus | - | ++ | Vestibular nucleus | ++ | +++ |
| Reticular thalamic nucleus | - | +++ | Spinal trigeminal nucleus | - | ++ |
| Ventromedial thalamic nucleus | - | ++ | Gigantocellular reticular nucleus | - | + |
| Subparafascicular thalamic nucleus | - | ++ | Area postrema | - | ++ |
| Lateral geniculate nucleus | + | +++ | Medullary reticular nucleus | - | ++ |
| Hypothalamus | | | Gracile nucleus | - | ++ |
| Paraventricular hypothalamic nucleus | - | ++ | Raphe magnus nucleus | - | ++ |
| Lateral preoptic area | - | ++ | External cuneate nucleus | - | ++ |
| Magnocellular preoptic nucleus | - | + | Dorsal cochlear nucleus | ++ | + |

¹The intensity of immunolabeling was qualitatively determined by using the caudate putamen (++++) and the granular layer of the hippocampal formation (-) as references. Intensity of morphine-like immunoreactivity ranges from no signal (-) to high signal (++++) and refers to both labeling intensity and the number of labeled elements. Only positive structures are shown.

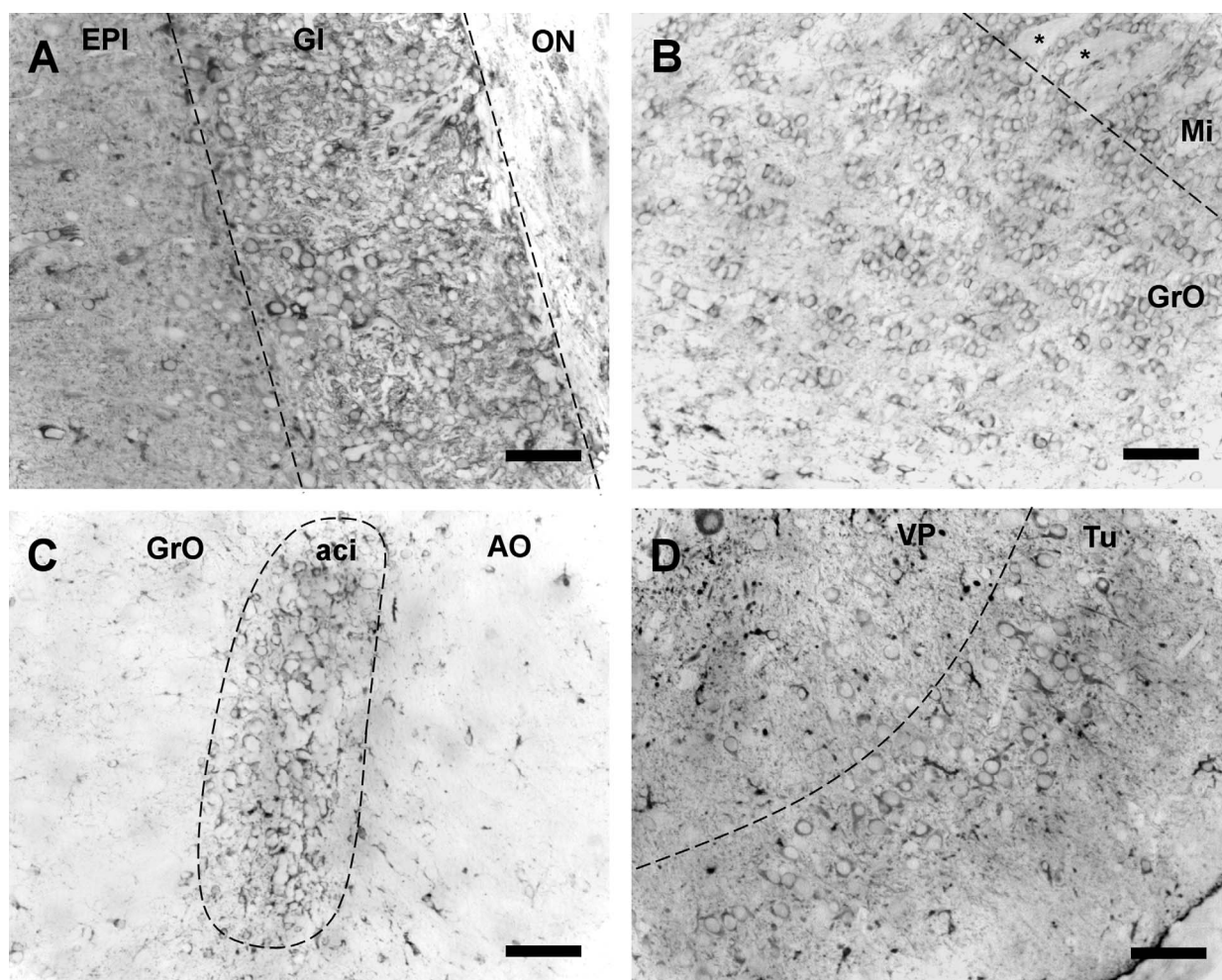


Figure 4. Distribution of MIR detected in the olfactory structures of the adult mouse brain. A: MIR observed in neurons and astrocytes of the glomerular layer of the olfactory bulb. B: MIR is present in the granule cells of the granular cell layer of the olfactory bulb, but no label is observed in the mitral cells (asterisk). C: MIR present in the soma and processes of astrocytes from the anterior commissure intrabulbar. D: MIR in neurons and astrocytes (darker cells) of the olfactory tubercle. aci, anterior commissure, intrabulbar part; AO, anterior olfactory nucleus; EPI, external plexiform layer; GI, glomerular layer; GrO, granular cell layer; Mi, Mitral cell layer; ON, olfactory nerve layer; Tu, olfactory tubercle; VP, ventral pallidum. Scale bar = 50 μ m in A–D.

anterior intrabulbar commissure (Fig. 4C). In the secondary olfactory structures, MIR was found both in neurons and in astrocytes of the olfactory tubercle (Fig. 4D). The labeling of the piriform cortex was the same as that of the other parts of the cortex (see below).

Cortex

Morphine-like immunoreactivity was found to be moderate throughout the cerebral cortex. Immunoreactivity was distributed across the entire thickness of the cortex (Fig. 5A). No strict correlation was detected between the distribution of MIR and functional cortical regions. Whereas MIR was relatively uniform and similar in both motor and sensory areas, stronger MIR was present in the cingulate area of the cortex. Higher magnification

suggested the MIR was localized in different subsets of cells including neurons (Fig. 5B, black arrow), astrocytes (Fig. 5B, white arrow), and astrocytic feet (Fig. 5C, arrow). In the molecular layer of the cortex, dense labeling was found in processes. Electron microscopy allows us to identify astrocytic processes (Fig. 5D, white arrow) and postsynaptic neuronal endings, recognizable by the typical postsynaptic density (Fig. 5D,E, black arrow).

Basal forebrain, basal ganglia, and amygdala

In the basal forebrain, MIR was observed in neuronal cells of the septal structures, the septohippocampal nucleus, the medial septal nucleus, and the triangular nucleus of the septum (Fig. 6A). Similar immunolabeling was observed in neurons of the substantia

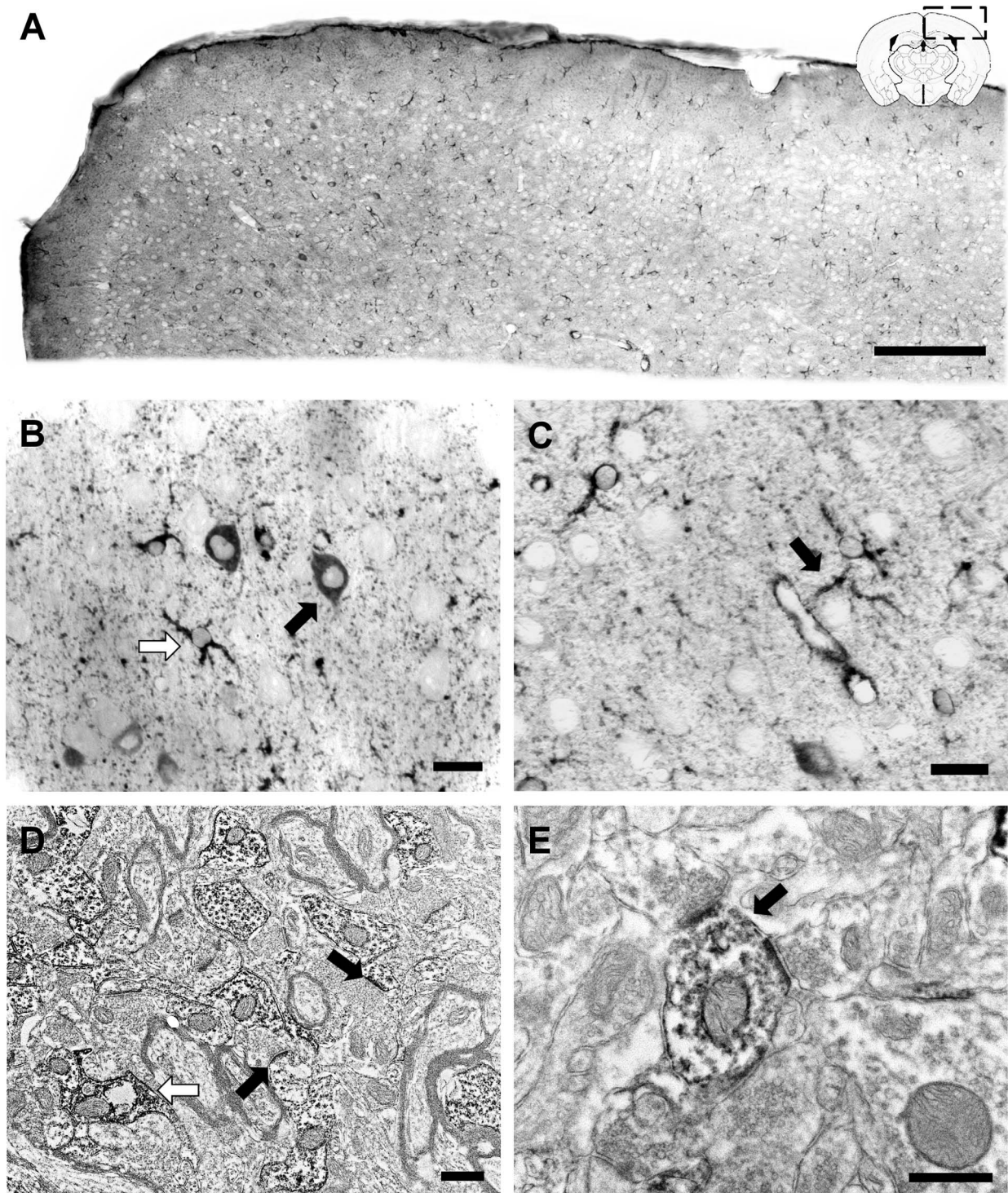


Figure 5. Distribution of MIR present in the cortex of the adult mouse brain. **A:** MIR observed in neurons and astrocytes from the left cortex (coronal slice). **B:** MIR in neurons (black arrow) and astrocytes (white arrow) of the cortex. The white round shapes correspond to unlabeled neurons. **C:** MIR present in an astrocytic foot around a blood vessel in the cortex (arrow). **D,E:** Electron microscopy of the molecular layer of the cortex showing labeled dendrites including some postsynaptic endings recognizable by their postsynaptic density (black arrows in D,E) and astrocytic process (white arrow, in D), which have a darker staining. Scale bar = 200 μm in A; 20 μm in B,C; 500 nm in D,E.

innominata (Fig. 6B) and in the diagonal band of Broca (Fig. 6C).

In the basal ganglia, MIR was observed in numerous cells and processes. In the striatum, intense MIR was found in small cells uniformly distributed among the

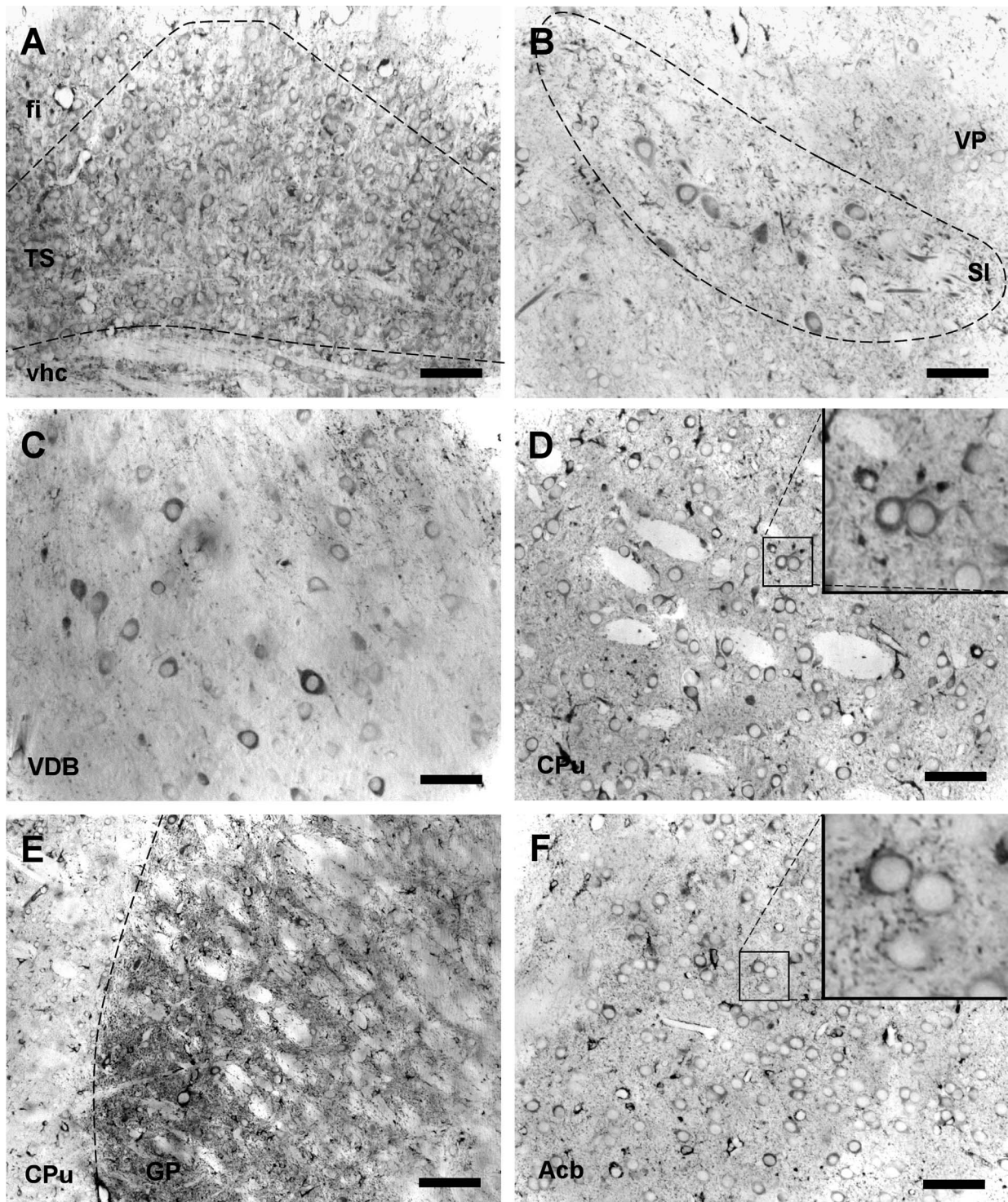


Figure 6. Distribution of MIR in the basal forebrain and basal ganglia of the adult mouse brain. **A:** MIR present in neurons and astrocytes in the triangular septal nucleus. **B:** MIR neurons of the substantia innominata. **C:** MIR in neurons of the nucleus of the vertical limb of the diagonal band of Broca. **D:** Dense MIR observed in neurons of the caudate putamen but also in astrocytes. The frame on the upper right corner displays a higher magnification of two neurons. **E:** MIR present in neurons and astrocytes of the globus pallidus. **F:** MIR in the neurons of the nucleus accumbens. The frame on the upper right corner displays a higher magnification of two neurons. Acb, accumbens nucleus; CPu, caudate putamen; fi, fimbria of the hippocampus; GP, globus pallidus; SI, substantia innominata; TS, triangular septal nucleus; VDB, nucleus of the vertical limb of the diagonal band of Broca; vhc, ventral hippocampal commissure; VP, ventral pallidum. Scale bar = 50 μ m in A–D,F; 100 μ m in E.

dorsal and ventral parts of this structure (Fig. 6D). In the globus pallidus, labeling was observed in some isolated cells as well as in processes and terminals (Fig. 6E). Throughout the nucleus accumbens, MIR distribution and intensity were similar to those observed in the striatum (Fig. 6F).

MIR in the amygdala was weak. Only the posterior amygdala nucleus contained some isolated MIR neurons. The basolateral, lateral, and medial amygdalar nuclei contained MIR only in some processes and terminals (data not shown).

Hippocampal formation

MIR was distributed in all hippocampal structures. In the lateral and central blade of the dentate gyrus, MIR was found not only in cells of the subgranular zone (SGZ), but also in some isolated cells present in the granular layer and in the polymorphic layer. No granule cells appeared to be labeled (Fig. 7A,B). In the SGZ, labeling was present in two morphologically different types of cells (Fig. 7B). Electron microscopy enabled detection of MIR in the basket cells of the SGZ (Fig. 7D) and in radial astrocytes (Fig. 7E) (von Bohlen Und Halbach, 2007). MIR was also observed in horizontal astrocytes of the SGZ. In Ammon's horn, MIR was homogeneously distributed. Labeled cells, processes, and astrocytic feet around blood vessels were observed in these layers (Fig. 7C).

Thalamus

In the thalamus, only the lateral geniculate nucleus (dorsal and ventral part) showed MIR in some cells displaying a neuronal morphology (Fig. 8A). MIR was also observed in processes and astrocyte-like cells distributed throughout the entire thalamus. In some structures (see Table 2), the density of processes appeared to be more prominent (i.e., anteroventral thalamic nucleus, reticular thalamic nucleus, and paraventricular thalamic nucleus; Fig. 8B–D).

Hypothalamus and subthalamus

Most of the hypothalamic structures displayed low levels of MIR. However, in the subthalamus, labeling of neuronal cells was observed in the zona incerta (Fig. 8E) and in the subthalamic nucleus (Fig. 8E,F). Only low levels of MIR were observed in other nuclei.

Midbrain

Low to high levels of MIR were present in midbrain areas. MIR was not observed in the neurons of the main dopaminergic nuclei of the midbrain; it was only observed in processes (in the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area). Only a few isolated neurons were labeled in the reticular part of the substantia nigra (Fig. 9A). In contrast, in the tectal areas, many strongly immunopositive

neurons were present in the inferior colliculus (Fig. 9B), whereas only some isolated neurons were stained in the superior colliculus. In the tegmental areas, the ventral tegmental nucleus (Fig. 9C) and the anterior tegmental nucleus contained MIR-positive neurons. MIR was also present in neurons of the nucleus of Darkschewitsch (Fig. 9D), the red nucleus, and the interstitial nucleus of Cajal. In other mid-brain structures, MIR was found in endings and processes (see Table 2). For example, dense processes were observed in the whole periaqueductal gray (PAG; Fig. 9E).

Cerebellum

As previously published (Muller et al., 2008), the MIR was distributed in all structures of the cerebellar cortex. The labeling intensity was the same in all these areas.

Within the cerebellar cortical structure, MIR present in the Purkinje layer was found in small cells and in processes around the Purkinje cells. Purkinje cells (soma and dendrites) were unlabeled (Fig. 10A). In the granular layer, granule cells displayed weak labeling; nevertheless, some isolated cells displaying a high MIR were found (Fig. 10A, arrow). In the molecular layer, both neuronal and astrocytic processes were labeled. As previously described (Muller et al., 2008), labeling around the Purkinje cell bodies corresponded to the presynaptic terminals of GABAergic basket cells (Fig. 10C, box). Interestingly, we also observed labeling of astrocytic processes all around the Purkinje dendritic tree (Fig. 10D, arrow and box).

In the deep part of the cerebellum, the deep cerebellar nuclei contained MIR in neuronal cells (Fig. 10B).

Pons and medulla

The pons areas displayed low MIR, with only some nuclei being labeled. MIR present in neuronal cells was observed in the periolivary nucleus and in the nucleus of the trapezoid body (Fig. 11A). Strong labeling was also observed in neurons of the lateral lemniscus complex (dorsal and ventral nuclei; Fig. 11B).

In the medulla, strong MIR was observed in neurons of the dorsal cochlear nucleus (Fig. 11C). In the vestibular nuclei, labeling was present in some cells and was intense in cell processes (Fig. 11D). The raphe magnus nuclei displayed dense processes (Fig. 11E).

Characterization of morphine-immunoreactive cells

In order to characterize the cells containing morphine-like compounds in the mouse brain, we used a confocal microscopy approach with different cell markers.

Olfactory structures

In the olfactory structures, cell bodies displaying MIR did not co-localize with the immunoreactivity for two isoforms

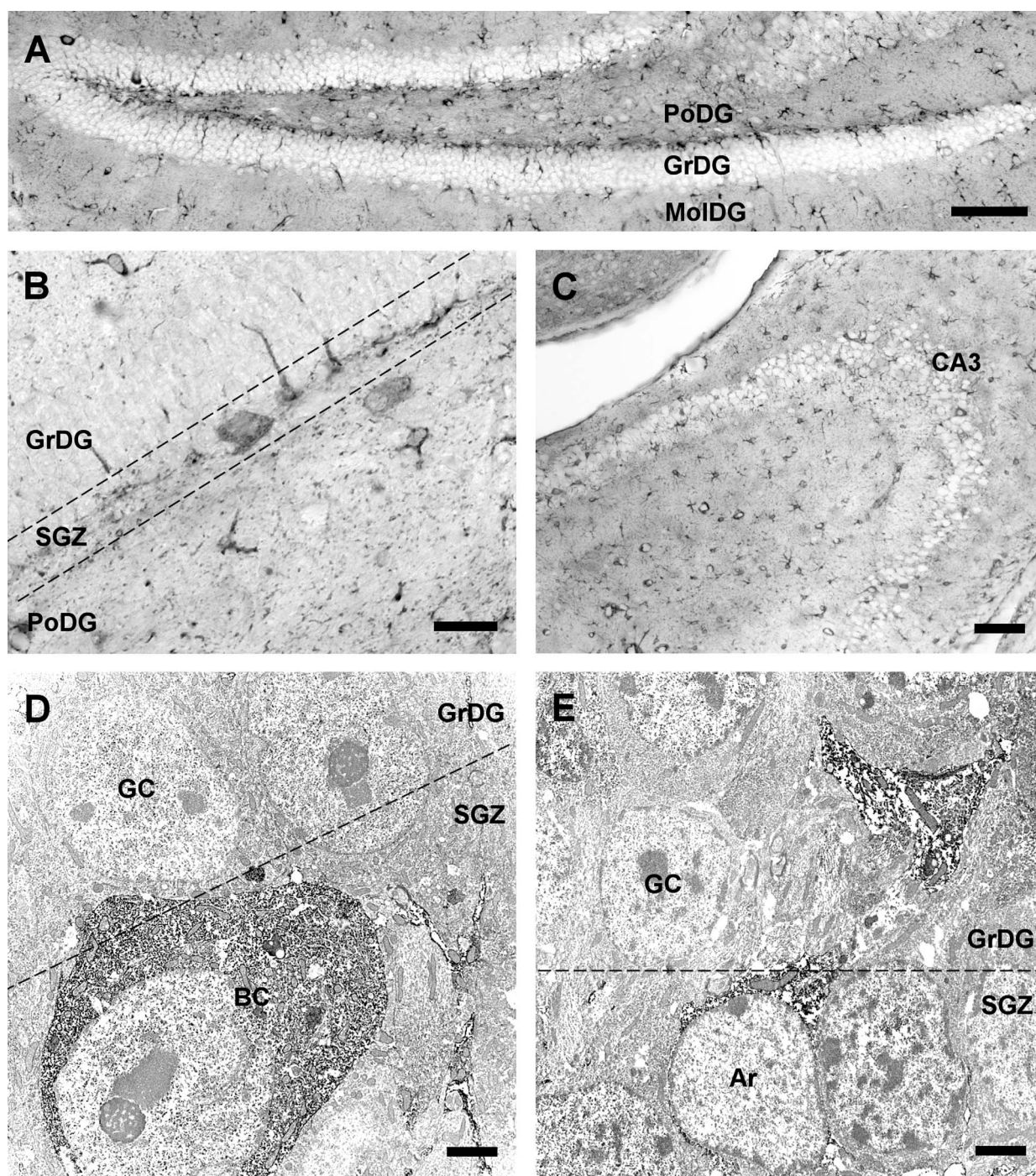


Figure 7. Distribution of MIR in the hippocampal formation of the adult mouse brain. **A:** MIR in the dentate gyrus; in particular, label is observed in the subgranular zone, whereas no label was detected in the granular layer. **B:** MIR observed at higher magnification in the dentate gyrus. Neurons and astrocytes are labeled in the subgranular zone. **C:** MIR present in the CA3 field of Ammon's horn. **D,E:** Electron microscopy of the subgranular zone showing a MIR-positive basket cell (**D**) and a radial astrocyte (**E**) recognizable by the process going through the granular layer. Ar, radial astrocyte; BC, basket cell; CA3, Ammon's horn 3; PoDG, polymorphic layer of the dentate gyrus; GC, granule cell; GrDG, granular layer; MolDG, molecular layer; SGZ, subgranular zone. Scale bar = 100 μ m in A,C; 20 μ m in B; 2 μ m in D,E.

of the glutamic acid decarboxylase enzyme (GAD65/67) in the glomerular layer, suggesting that GABAergic periglomerular cells do not contain endogenous morphine and/or mor-

phine glucuronides. However, in the granule cell layer, co-labeling with an anti-GAD65/67 antibody indicated that MIR was present in granule cells (Fig. 12A, arrow).

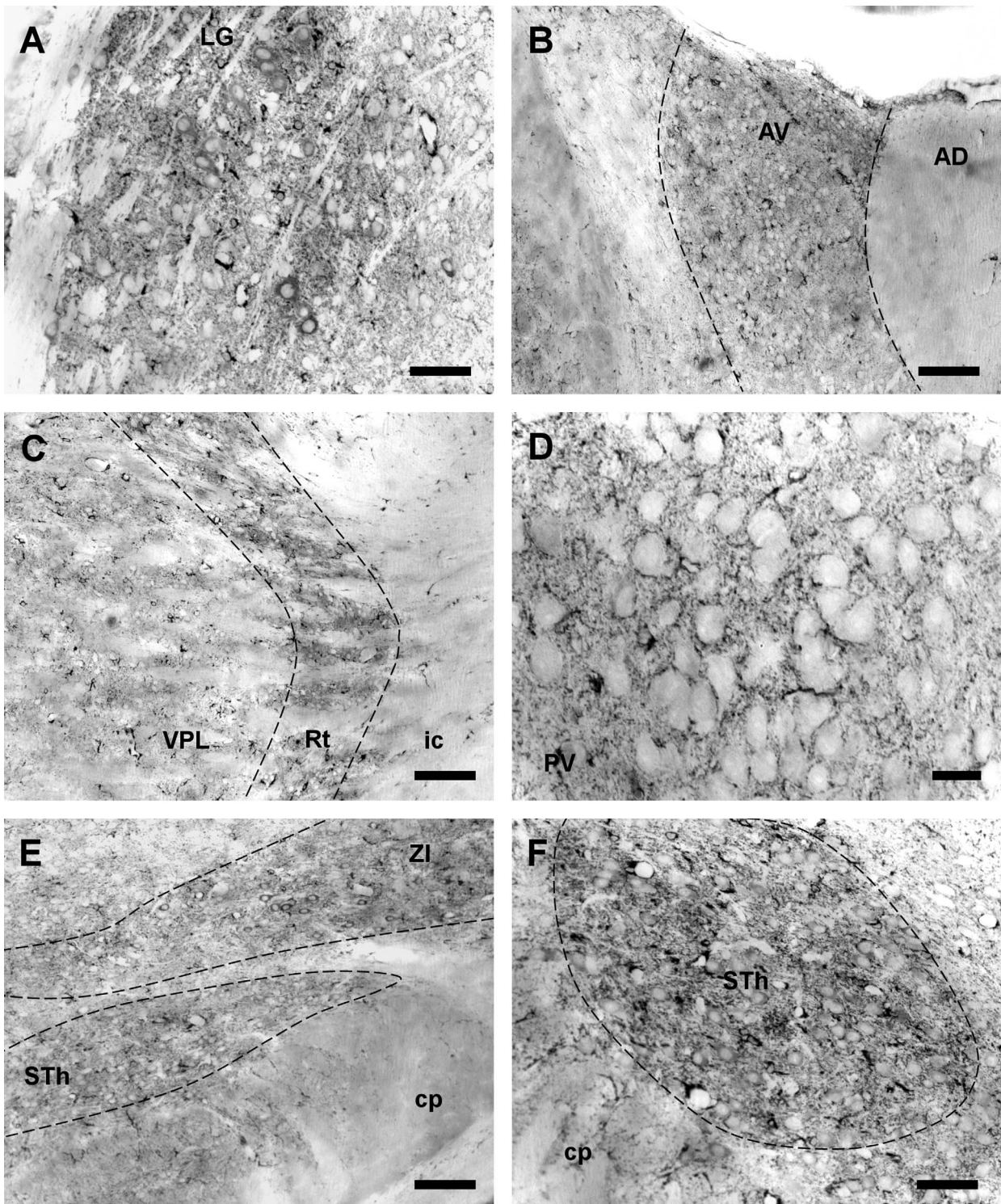


Figure 8. Distribution of MIR in the thalamus, the hypothalamus, and the subthalamus of the adult mouse brain. **A:** MIR in neurons (round cells) and astrocytes (stellate cells) in the lateral geniculate nucleus. **B:** MIR present in astrocytes of the anteroventral thalamic nucleus. **C:** MIR in astrocytes of the reticular thalamic nucleus. **D:** MIR present in astrocytes and in processes around the soma of the paraventricular thalamic nucleus neurons. **E,F:** MIR in neurons (round cells) and astrocytes (stellate cells) in the subthalamic nucleus (**E,F**) and the zona incerta (**E**). AD, anterodorsal thalamic nucleus; AV, anteroventral thalamic nucleus; cp, cerebral peduncle; ic, internal capsule; LG, lateral geniculate nucleus; PV, paraventricular thalamic nucleus; Rt, reticular thalamic nucleus; STh, subthalamic nucleus; VPL, ventral posterolateral thalamic nucleus; ZI, zona incerta. Scale bar = 100 μ m in B,C,E; 50 μ m in A,F; 20 μ m in D.

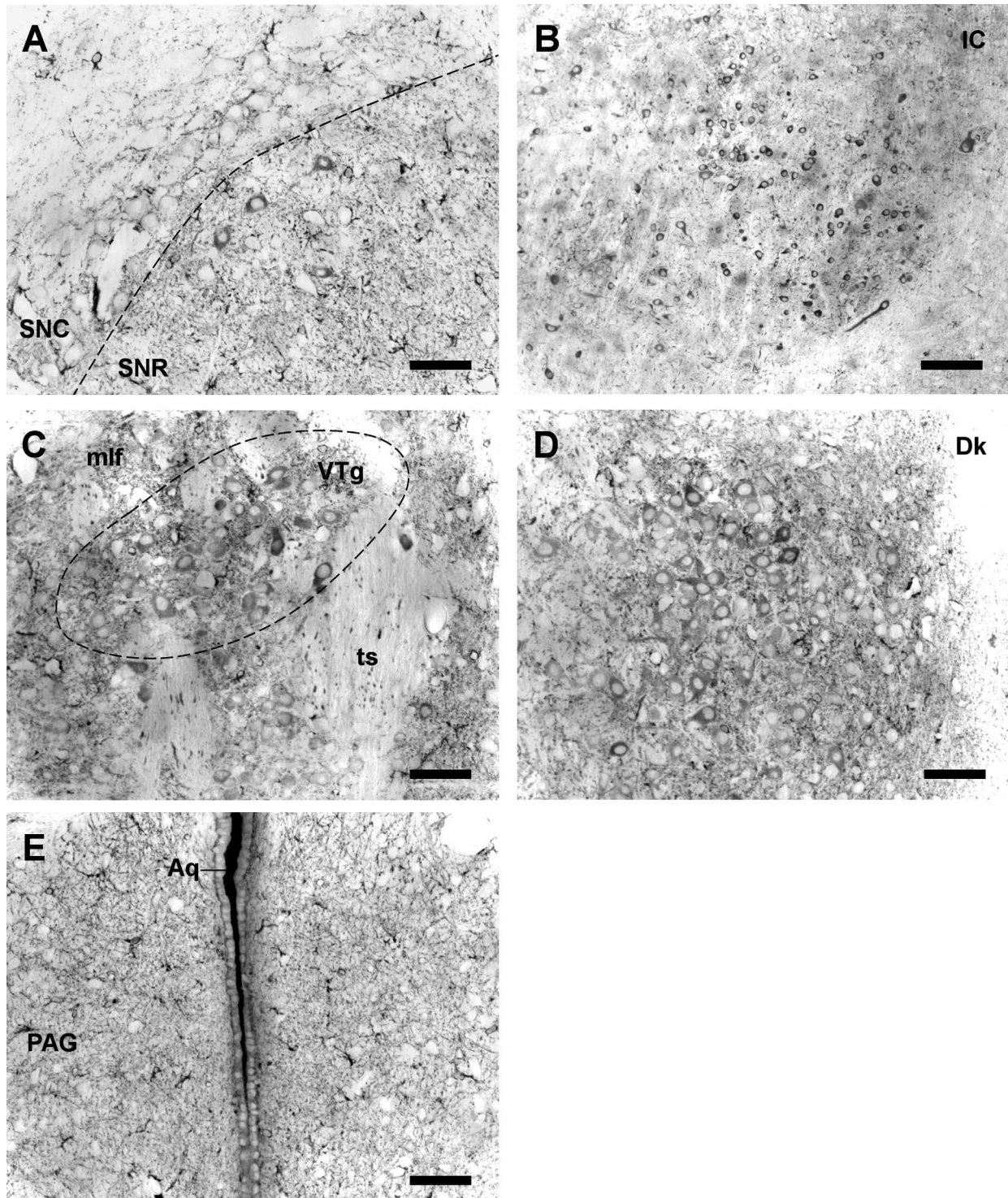


Figure 9. Distribution of MIR in the midbrain of the adult mouse brain. **A:** MIR in the substantia nigra is present only in neurons of the substantia nigra. **B:** MIR in neurons of the inferior colliculus. **C:** MIR observed in neurons of the ventral tegmental nucleus. **D:** MIR in neurons of the nucleus of Darkschewitsch. **E:** MIR present in astrocytes and process in the anterior part of the periaqueductal gray. Aq, aqueduct; Dk, nucleus of Darkschewitsch; IC, inferior colliculus; mlf, medial longitudinal fasciculus; PAG, periaqueductal gray; SNC, substantia nigra, compact part; SNR, substantia nigra, reticular part; ts, tectospinal tract; VTg, ventral tegmental nucleus. Scale bar = 100 μ m in B; 50 μ m in A,C-E.

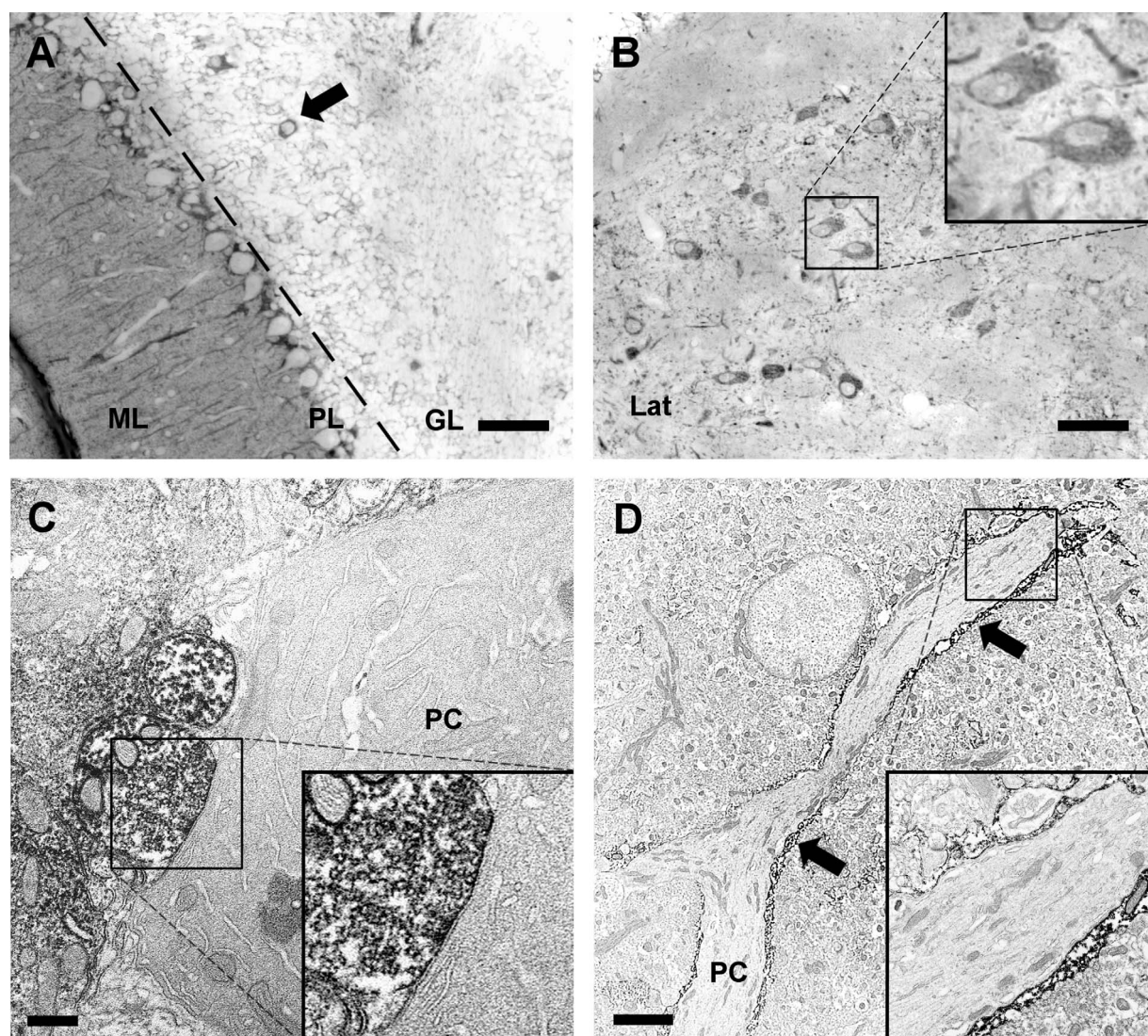


Figure 10. Distribution of MIR in the cerebellum of the adult mouse brain. **A:** MIR in the cerebellar cortex is present in basket cells of the Purkinje layer, in granule cells, and in astrocytes. The arrow indicates a MIR isolated cell in the granular layer. **B:** MIR observed in neurons of the lateral cerebellar nucleus. **C:** Electron microscopy of a labeled presynaptic ending on a Purkinje cell; the panel in the lower right is a higher magnification of the labeled presynaptic element. **D:** Electron microscopy of labeled astrocytic processes (arrows) around a Purkinje cell dendrite; the panel in the lower right is a higher magnification of the labeled astrocytic processes. GL, granule cell layer; Lat, lateral cerebellar nucleus; ML, molecular layer; PC, Purkinje cell; PL, Purkinje cell layer. Scale bar = 50 μm in A,B; 500 nm in C; 2 μm in D.

Double-label immunofluorescence with GFAP antibody revealed that MIR was also present within GFAP-labeled cells, indicating that morphine-like compounds are present in glial cells of the intrabulbar anterior commissure (Fig. 12B).

Cortex

In cortical structures, both neuronal and astrocyte-like cells were labeled. Immunolocalization of MIR within GAD65/67-positive cells showed that some GABAergic interneurons of the cortex contain MIR (Fig. 12C, arrow). Interestingly, not all GABAergic cells were labeled, sug-

gesting that only a specific subpopulation of interneurons contains morphine-like compounds (Fig. 12C). Co-labeling with GFAP showed the presence of MIR in numerous astrocytes in the cortex. Interestingly, MIR was also observed in astrocytic foot processes around blood vessels (Fig. 12D, arrow).

Basal ganglia

In the striatum, confocal microscopy experiments showed that small, round neuronal cells were immunoreactive for both GAD65/67 and morphine-like compounds (Fig. 12E, arrow), suggesting that medium

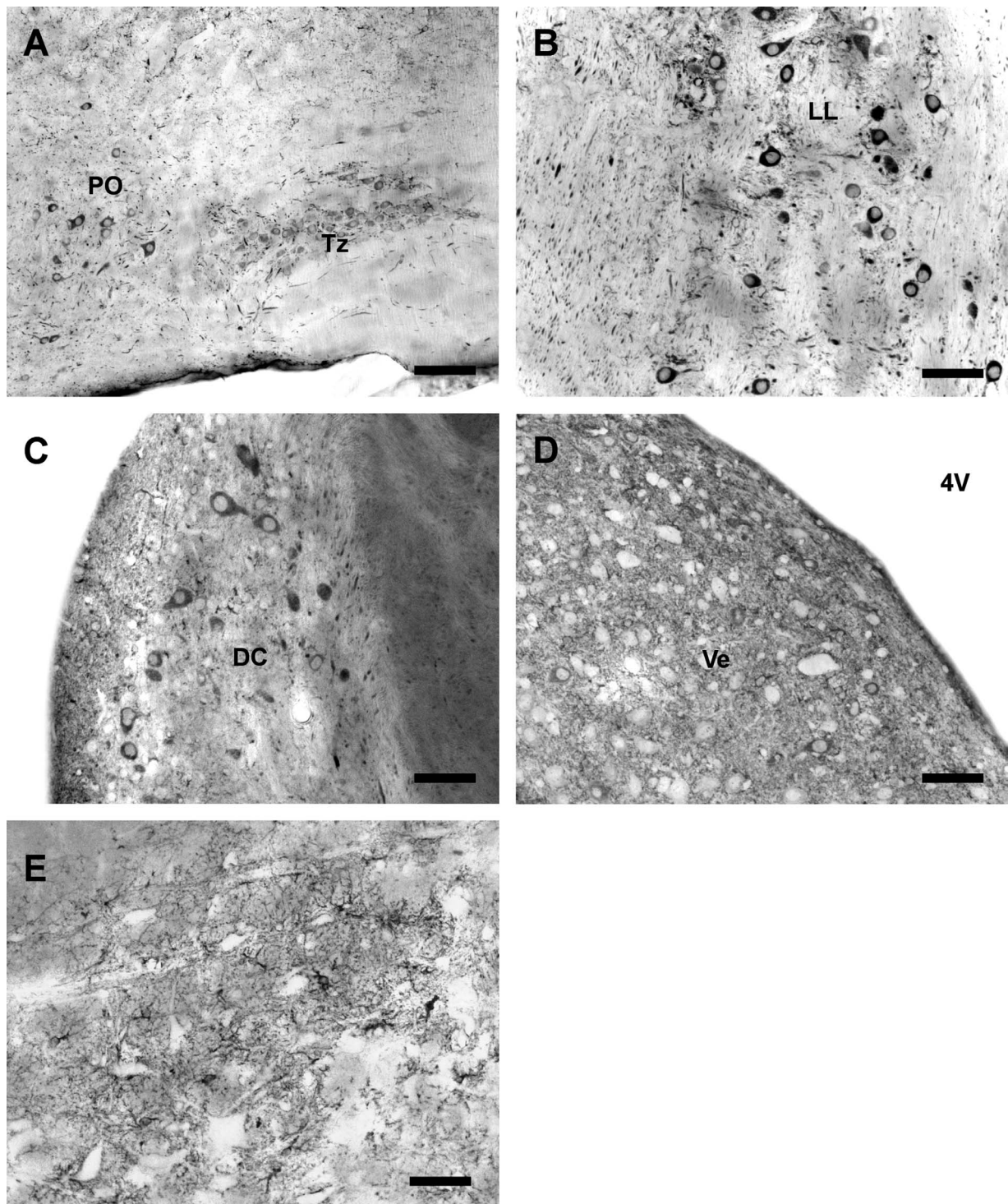


Figure 11. Distribution of MIR in the pons and medulla of the adult mouse brain. **A:** MIR in neurons of the periolivary nucleus and the nucleus of the trapezoid body. **B:** MIR observed in the lateral lemniscus. **C:** MIR present in neurons of the dorsal cochlear nucleus. **D:** MIR present in neurons and processes of the vestibular nucleus. **E:** MIR observed in the raphe magnus nuclei is present in astrocytes and processes. 4V, 4th ventricle; DC, dorsal cochlear nucleus; LL, lateral lemniscus; PO, periolivary nucleus; Tz, nucleus of the trapezoid body; Ve, vestibular nucleus. Scale bar = 100 μ m in A; 50 μ m in B–E.

spiny GABAergic interneurons contain morphine and/or morphine-derived molecules. Interestingly, in the striatum, co-localization of MIR and TH was absent,

suggesting that MIR-labeled processes do not correspond to dopaminergic innervation (Fig. 12F). As in the striatum, we found MIR co-localized with GAD65/

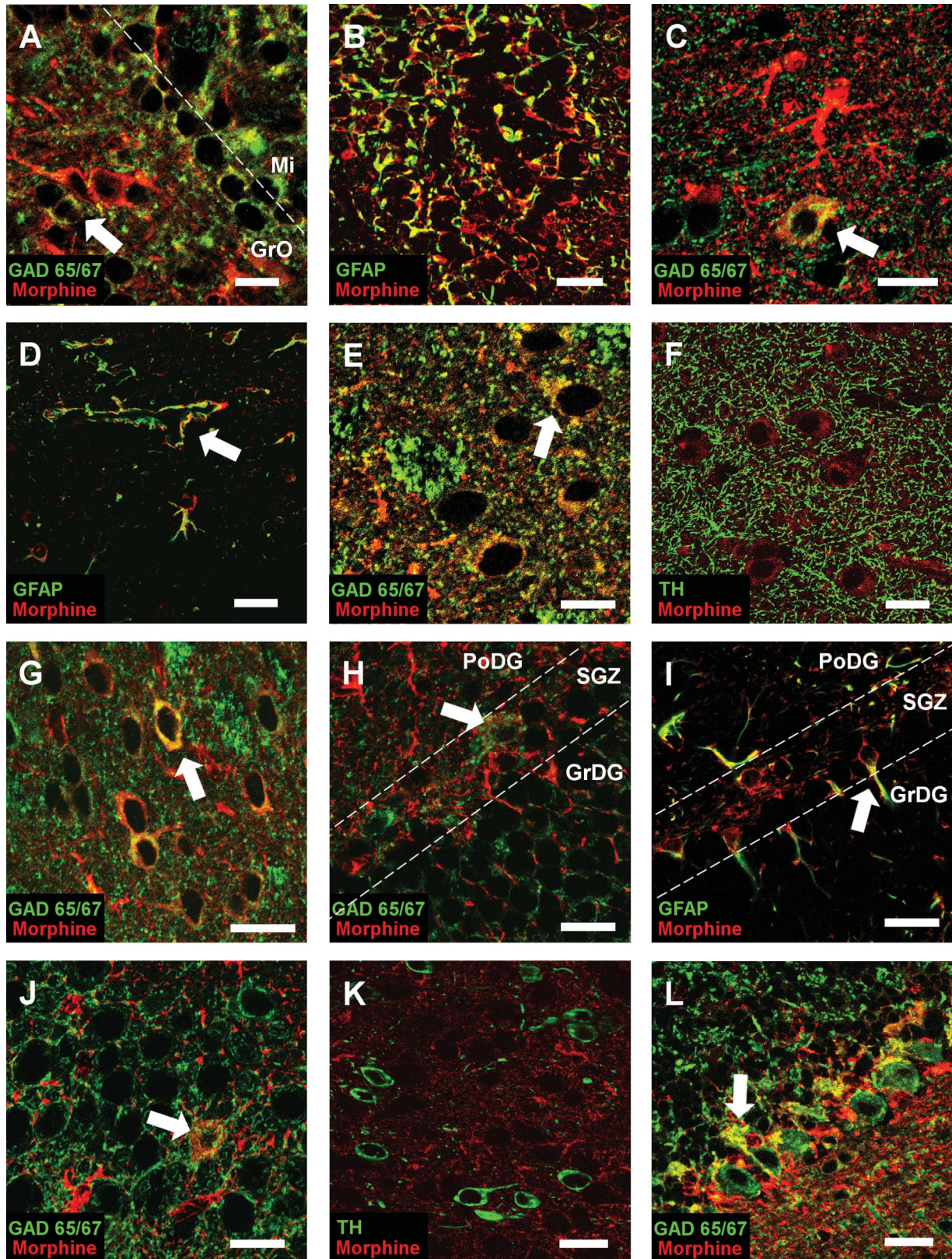


Figure 12

67 immunoreactivity in small, round cells of the nucleus accumbens, suggesting that GABAergic interneurons of this nucleus contain morphine and/or morphine derivatives (Fig. 12G, arrow).

Hippocampal formation

Immunofluorescence experiments revealed the presence of two different MIR-positive cell types in the SGZ. First, the co-labeling of cells for MIR and GAD65/67 suggests the presence of endogenous morphine-like compounds in GABAergic cells of the SGZ (Fig. 12H, arrow). Second, co-localization of MIR with GFAP indicated that both radial and horizontal astrocytes of the SGZ were labeled (Fig. 12I); interestingly, the same pattern of labeling was observed in the subventricular zone (data not shown). The MIR astrocytes present in the SGZ displayed a radial phenotype (Fig. 12I, arrow) and may correspond to radial glia-like progenitors (von Bohlen Und Halbach, 2007).

In addition to the SGZ, MIR-positive cells observed in the pyramidal cell layer expressed the GAD65/67 enzyme (Fig. 12J, arrow), indicating that some GABAergic interneurons show MIR in Ammon's horn.

Midbrain

In the substantia nigra pars compacta, MIR was not found in TH-positive neurons (Fig. 12K).

Cerebellum

In the Purkinje layer, morphine-like immunoreactivity co-localized with GAD65/67 immunoreactivity, confirming the presence of MIR in basket cells of the Purkinje layer (Fig. 12L, arrow), as previously described (Muller et al., 2008).

DISCUSSION

The goal of the present study was to determine the localization of endogenous morphine and its derivatives (i.e., morphine, M6G, M3G, and codeine) in mouse brain structures and in specific cell types. These results are similar to those of previously published studies of the localization of endogenous alkaloids in the mouse brain. (Gintzler et al., 1978; Bianchi et al., 1993, 1994; Stefano et al., 2000; Muller et al., 2008). By using classical confocal and electron microscopy, we were able to characterize different structures and cells containing endogenous morphine-like compounds. This article shows the presence of endogenous morphine and/or M6G and/or M3G and/or codeine in both neurons and astrocytes of the mouse brain. Endogenous morphine-like immunoreactivity is usually observed in GABAergic neurons but is absent in dopaminergic neurons. MIR is also found in astrocytes and astrocytic processes throughout the entire brain. The mapping of morphine-like immunoreactivity, presented in this study, is a key step to designing future experiments aimed at better understanding of the role of morphine and/or morphine derivatives in specific brain functions.

Characterization of morphine, codeine, and morphine glucuronides in the mouse central nervous system

In 1976 Gintzler et al. (1976, 1978) described for the first time the presence of a non-peptide morphine-like compound in the CNS. Since this discovery, many publications have characterized the presence of endogenous morphine and codeine in mammals (Goldstein et al., 1985; Spector et al., 1985; Cardinale et al., 1987; Donnerer et al., 1987; Bianchi et al., 1993; Molina et al., 1995; Muller et al., 2008). In the present paper a mass spectrometry approach

Figure 12. Characterization of MIR-positive cells of the adult mouse brain by confocal microscopy. **A:** Co-labeling of MIR (red) with GAD65/67 (green) in the periglomerular layer of the olfactory bulb showing the presence of MIR in granule cells. Arrow points to a GABAergic neuron that also expresses MIR. **B:** Co-labeling of MIR (red) with GFAP (green) in astrocytic processes of the anterior commissure intrabulbar. **C:** Co-labeling of MIR (red) with GAD65/67 (green) in the cortex showing in red a MIR-positive astrocyte and in yellow (arrow) a GABAergic interneuron that also expresses MIR. **D:** Co-labeling of MIR (red) with GFAP (green) in the cortex proving the presence of MIR in astrocytes and astrocytic feet around blood vessels (arrow). **E:** Co-labeling of MIR (red) with GAD65/67 (green) in the caudate putamen. GABAergic cells of the caudate putamen express MIR (arrow). **F:** Co-labeling of MIR (red) with tyrosine hydroxylase (green) in the caudate putamen. No MIR is observed in dopaminergic endings. **G:** Co-labeling of MIR (red) with GAD65/67 (green) in the nucleus accumbens. The arrow points to a GABAergic cell of the nucleus accumbens that also expresses MIR (arrow). **H:** Co-labeling of MIR (red) with GAD65/67 (green) in the subgranular zone of the dentate gyrus proving the presence of MIR in the GABAergic basket cells (arrow). **I:** Co-labeling of MIR (red) with GFAP (green) in the subgranular zone of the dentate gyrus showing MIR in radial astrocytes (arrow). **J:** Co-labeling of MIR (red) with GAD65/67 (green) in the CA3 field GABAergic cells of Ammon's horn. The arrow points to a GABAergic cell that also expresses MIR in the Ammon's horn. **K:** Co-labeling of MIR (red) with tyrosine hydroxylase (green) in the substantia nigra pars compacta. No MIR is observed in dopaminergic neurons. **L:** Co-labeling of MIR (red) with GAD65/67 (green) in the cerebellar cortex. The GABAergic basket cells of the Purkinje layer also express MIR (arrow). GAD, glutamic acid decarboxylase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GrDG, granular layer; GrO, granular cell layer; Mi, mitral cell layer; PoDG, polymorphic layer of the dentate gyrus; SGZ, subgranular zone. Magenta-green images are available as Supplementary Figure 1. Scale bar = 20 μ m in B–D,F–L; 10 μ m in A,E.

allowed us to characterize the presence of endogenous morphine and codeine in mouse brain. In addition, we show here, for the first time, the presence of M3G and M6G in the mouse brain, suggesting that brain UGT enzymes are able to produce these two glucuronides.

MIR and the dopaminergic system

To our surprise, morphine-like compounds were not found in neurons of dopaminergic areas. Endogenous morphine is thought to derive from dopamine biosynthesis, and its synthesis pathway was characterized in SH-SY5Y, a tumor-derived catecholaminergic cell line (Poeaknapo et al., 2004; Boettcher et al., 2005; Goumon et al., 2009). Moreover, a recent publication showed an absence of endogenous morphine in mice lacking tyrosine hydroxylase, suggesting that dopamine is necessary for endogenous morphine biosynthesis *in vivo* (Neri et al., 2008). However, several reports suggest that morphine-like compounds can also be synthesized by non-dopaminergic or non-catecholaminergic cells such as pancreatic cells, hepatocytes, and placenta-derived cells (Weitz et al., 1987; Molina et al., 1995; Poeaknapo et al., 2004).

Endogenous morphine-like immunoreactivity was found in non-dopaminergic neurons in the brain. Endogenous morphine-like compounds may derive from an uptake of precursors by the non-dopaminergic neurons. Interestingly, it has been hypothesized that THP, a dopamine metabolite found in extracellular brain spaces, may be used to synthesize morphine-like compounds (Boettcher et al., 2005). To strengthen this idea, a recent report from Zenk's laboratory showed that THP injection in mice leads to morphine production and excretion (Grobe et al., 2010).

Together, these results indicate that, in mouse brain, the biosynthesis of morphine is not completed in dopaminergic neurons and thus strongly suggest that morphine-like compounds present in non-dopaminergic brain cells *in vivo* may be synthesized after uptake of precursors (e.g., dopamine, THP, or others). Furthermore, this implies cooperation between different cell types to ensure complete endogenous codeine/morphine/glucuronides biosynthesis.

MIR in neurons

MIR was observed in different neuronal cell bodies, with different neurochemical patterns and different anatomical distributions. MIR was not observed in dopaminergic neurons and processes but was mainly present in GABAergic cells (e.g., in the hippocampus, cortex, and striatum) and also to a lesser extent in glutamatergic neurons (e.g., in deep cerebellar nuclei). There are two possible explanations for the presence of endogenous morphine or related compounds in neurons. One possibility is that endogenous morphine or/and morphine glucuro-

nides or/and codeine could be taken up from the extracellular space by active or passive transport. The second is that neurons could take up a morphine precursor (e.g., dopamine, THP, or others) and then produce codeine and/or morphine and/or its derivative. In our study, MIR corresponded to the possible presence of morphine, M6G, M3G, or codeine; it was impossible to determine which of these alkaloids was present in the immunoreactive neurons. However, the presence of UGT1A6 in neurons of the rat brain (Brands et al., 2000) and in neuronal primary cultures (Suleman et al., 1998) suggests that after morphine synthesis or uptake, some neurons are able to synthesize morphine glucuronides.

Our recent studies have focused on the roles of endogenous morphine in the CNS (Muller et al., 2008) and have suggested that endogenous morphine may be co-secreted with other neurotransmitters in the CNS and may be implicated in neurotransmission. Indeed, endogenous alkaloids are localized in large dense-core vesicles in a cell line model (SH-SY5Y) and are secreted by a Ca²⁺-dependent pathway (Muller et al., 2008). The presence of MIR in the presynaptic terminals of basket cells innervating the Purkinje cells supports this hypothesis. However, although immunoreactivity is present in dendrites and postsynaptic terminals, we were unable to find presynaptic labeling in the rest of the brain. Further investigation will allow us to resolve the mechanism of action of endogenous alkaloids.

MIR in astrocytes

Our results show the presence of endogenous morphine-like compounds in a large number of astrocytes in all structures of the CNS. Astrocytes do not express tyrosine hydroxylase (Jaeger, 1985) and thus are unable to synthesize dopamine and by extrapolation endogenous morphine and derivatives *de novo*. To explain MIR observed in astrocytes, we propose two hypotheses: 1) as postulated above in the case of neurons, astrocytes may achieve morphine biosynthesis after precursor uptake; and 2) astrocytes are well known to be involved in reuptake of neurotransmitters from the extracellular space (Iversen, 2006), and it can be hypothesized that possible uptake of morphine via a transporter exists. Indeed, astrocytes express multidrug-resistant protein (MRP)-1, -3, -4, and -5 as well as glucose transporter (GLUT), which correspond to transporters that are potentially involved in morphine/M6G/M3G/codeine uptake/efflux (Hirrlinger et al., 2002, 2005; Bourasset et al., 2003; Somogyi et al., 2007). In addition, the presence of UGT1A6 in rat astrocytes in primary culture (Suleman et al., 1998; Heurtaux et al., 2006) suggests that after morphine uptake, astrocytes may catabolize morphine into morphine-glucuronides. Moreover, the

presence of morphine and/or codeine and/or morphine glucuronides in astrocytic foot processes around blood vessels suggests the possibility of uptake from the blood or release into the blood (Brix-Christensen et al., 1997, 2000; Glattard et al., 2010). Finally, our results indicate that astrocytes may be responsible for morphine catabolism in the CNS, mechanisms that now require our attention because of the extensive use of morphine in clinics and as drug of abuse.

MIR and μ receptors

In the early 1970s, opioid receptors were discovered in the CNS (Pert et al., 1973). Morphine and its derivative, M6G, preferentially bind the MOR and δ -opioid (DOR) receptors (Matthes et al., 1996; Trescot et al., 2008). MORs are found in both the central and peripheral nervous system. In the brain, the highest densities of MORs are found in the thalamus, the putamen, the substantia nigra, the cortex, the ventral tegmental zone, the nucleus accumbens, and the amygdala (Mansour et al., 1995; Ding et al., 1996). Several endogenous peptides are able to bind the MOR, including β -endorphin (Li and Chung, 1976; Reisine, 1995), proenkephalin- (enkephalins), and prodynorphin-derived (dynorphin-B) peptides (Raynor et al., 1994; Toll et al., 1998). In addition, two other endogenous peptide ligands for MOR, endomorphin-1 and endomorphin-2, have been identified in bovine and human cortex (Zadina et al., 1997; Mizoguchi et al., 2002). Because multiple MOR-binding peptides exist in addition to morphine-like compounds (e.g., in the striatum) (Pierce and Wessendorf, 2000; Furuta et al., 2002), it is difficult to speculate on the individual effects of endogenous alkaloids. Our results have shown the presence of morphine-like compounds in these areas and strongly suggest that endogenous morphine or its derivatives could act as a novel high-affinity endogenous MOR agonists.

Endogenous morphine-like compounds and physiological processes in the central nervous system

Numerous studies have described the effects of exogenous morphine in the CNS, but without any estimation of effective concentrations inside the synaptic cleft or the extracellular space, it is difficult to speculate on the functions of endogenous morphine by extrapolation from those results. It is also likely that the level of endogenous morphine being produced and secreted can vary with physiological conditions, notably stressful conditions such as fasting (Lee and Spector, 1991; Molina et al., 1995; Goumon et al., 2000; Glattard et al., 2010). Nevertheless, based on the effects of exogenous morphine, coupled with the localization of MOR and the precise dis-

tribution of endogenous morphine and/or glucuronides and/or codeine described in this study, several cellular and physiological roles of endogenous morphine-like compounds can be hypothesized.

Motor control

In the brain, endogenous morphine-like compounds are found in neurons and cell processes involved in motor control, including the red nucleus, the cerebellum, the vestibular nuclei, and the basal ganglia. In the cerebellum, micro-iontophoretic or pneumatic application of morphine to cat Purkinje cells induces either excitatory or inhibitory responses (i.e., either increases or decreases of the firing rates, respectively; Taguchi and Suzuki, 1989; Taguchi et al., 2000). Naloxone reverses excitatory morphine-induced effects, whereas inhibitory effects can be reversed only by the GABA receptor antagonist bicuculline (Taguchi and Suzuki, 1989; Taguchi et al., 2000). In the vestibular nuclei, the spontaneous activity of medial vestibular neurons scattered throughout the nucleus was increased or decreased by iontophoretic application of morphine; this effect was blocked by naloxone (Lin and Carpenter, 1994). These previously published data indicate that exogenous morphine could modulate neuronal activity in brain areas involved in motor control. The presence of endogenous morphine or its derivatives in these specific areas suggests that they may be involved in control of the coordination of movements and postures.

Nociception

Morphine is one of the most common analgesic drugs used in hospitals; thus the question of the possible roles of endogenous morphine in nociception is unavoidable. Different experiments have suggested that endogenous morphine may be implicated in nociceptive processes. Experiments carried out by Guarna et al. have shown that the injection of antibodies directed against morphine into murine cerebrospinal fluid (a procedure that lowers the level of endogenous morphine in the brain) induced hypersensitivity to heat-associated pain (Guarna et al., 2002; Kieffer and Gaveriaux-Ruff, 2002). In the present study, we have shown the presence of endogenous morphine and/or morphine glucuronides and/or codeine in brain regions thought to be involved in the processing of nociceptive informations (e.g., the PAG and the raphe magnus nuclei). These findings suggest a potential role for endogenous morphine and/or its derivatives in the control of nociception.

Memory

Exogenous morphine has several effects on hippocampal function. Morphine is able to modulate

neurotransmission in the hippocampus through inhibition of its GABAergic interneurons by acting on the MORs present on these neurons, leading to an increase in the discharge amplitude of pyramidal neurons in the CA1 zone (Miller and Lupica, 1997), and morphine also modifies the efficiency of glutamatergic synapses by acting on the expression of proteins of the postsynaptic density (i.e., receptors; Moron et al., 2007). Interestingly, endogenous morphine immunoneutralization inhibits learning during periods of stress (e.g., during starvation) (Guarna et al., 2004). In light of all these observations and because this study revealed the presence of MIR in GABAergic interneurons of the dentate gyrus and Ammon's horn, endogenous morphine and/or its derivatives might be involved in the learning processes.

Neurogenesis

In the brain of adult mammals, the sub-granular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus undergoes ongoing neurogenesis (Altman and Das, 1965; Kaplan and Bell, 1984; Cameron et al., 1993; Luskin, 1993). Many studies have been published regarding the effects of morphine on the proliferation of neurons in the SGZ (reviewed in: Sargeant et al., 2007). For example, long-term exposure to morphine (rats and mice; 10 mg/kg administered intraperitoneally) decreased neurogenesis by a factor of 30% in the SGZ (Eisch et al., 2000; Mandyam et al., 2004); however, other experiments have shown that morphine stimulated proliferation (Persson et al., 2003a,b). Moreover, in MOR knockout mice, the survival of newly formed neurons in the granular zone of the dentate gyrus increased by over 50% (Harburg et al., 2007). The presence of endogenous morphine-like compounds in the SGZ may regulate neurogenesis and the survival of neurons.

Alertness

Startle, or making a quick involuntary movement as in alarm, surprise, or fright, can be regarded as a protective response in mammals. The acoustic startle reflex was prevented by administration of the opioid antagonist naloxone to rats, showing that the opioid system is implicated in acoustic startle gating (Swerdlow et al., 1991). The startle circuit is located in the lower brainstem (Koch et al., 1992), particularly in the caudal pontine reticular nucleus, an area enriched in "morphinergic" terminals. The presence of endogenous morphine-like compounds in the olfactory bulb suggests a role in the response to natural stressors for the endogenous alkaloid.

CONCLUSIONS

Although no definitive role has yet been attributed to endogenous morphine and its derived compounds found in nervous system tissue, their presence in specific neurons and astrocytes in different areas of the rodent brain cannot be considered simply fortuitous. Endogenous morphine has been shown to be implicated in the regulation of pain as well as in weakening the memory of a nociceptive experience, playing a role similar to its exogenous counterpart. However, the presence of endogenous morphine-like compounds in brain regions that are not usually involved in pain modulation opens exciting perspectives for extending the role and function of this endogenous opiate far beyond analgesic functions.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Yannick Bailly, Dr. Guy Roussel, and Mr. Guy Bombarde for technical assistance.

LITERATURE CITED

- Abraira VE, Hyun N, Tucker AF, Coling DE, Brown MC, Lu C, Hoffman GR, Goodrich LV. 2007. Changes in Sef levels influence auditory brainstem development and function. *J Neurosci* 27:4273–4282.
- Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319–335.
- Arantes C, Nomizo R, Lopes MH, Hajj GN, Lima FR, Martins VR. 2009. Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. *Glia* 57: 1439–1449.
- Atmanene C, Laux A, Glattard E, Muller A, Schoentgen F, Metz-Boutigue MH, Aunis D, Van Dorsselaer A, Stefano GB, Sanglier-Cianferani S, Goumon Y. 2009. Characterization of human and bovine phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP) interactions with morphine and morphine-glucuronides determined by noncovalent mass spectrometry. *Med Sci Monit* 15:BR178–187.
- Bianchi E, Alessandrini C, Guarna M, Tagliamonte A. 1993. Endogenous codeine and morphine are stored in specific brain neurons. *Brain Res* 627:210–215.
- Bianchi E, Guarna M, Tagliamonte A. 1994. Immunocytochemical localization of endogenous codeine and morphine. *Adv Neuroimmunol* 4:83–92.
- Boettcher C, Fellermeier M, Boettcher C, Drager B, Zenk MH. 2005. How human neuroblastoma cells make morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8495–8500.
- Bourasset F, Cisternino S, Tamsamani J, Scherrmann JM. 2003. Evidence for an active transport of morphine-6-beta-d-glucuronide but not P-glycoprotein-mediated at the blood-brain barrier. *J Neurochem* 86:1564–1567.
- Brands A, Munzel PA, Bock KW. 2000. In situ hybridization studies of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 expression in rat testis and brain. *Biochem Pharmacol* 59: 1441–1444.
- Brix-Christensen V, Tonnesen E, Sanchez RG, Bilfinger TV, Stefano GB. 1997. Endogenous morphine levels increase following cardiac surgery as part of the antiinflammatory response? *Int J Cardiol* 62:191–197.
- Brix-Christensen V, Goumon Y, Tonnesen E, Chew M, Bilfinger T, Stefano GB. 2000. Endogenous morphine is produced in

- response to cardiopulmonary bypass in neonatal pigs. *Acta Anaesthesiol Scand* 44:1204–1208.
- Broadbelt KG, Paterson DS, Rivera KD, Trachtenberg FL, Kinney HC. 2010. Neuroanatomic relationships between the GABAergic and serotonergic systems in the developing human medulla. *Auton Neurosci* 154:30–41.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. 1993. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337–344.
- Cardinale GJ, Donnerer J, Finck AD, Kantrowitz JD, Oka K, Spector S. 1987. Morphine and codeine are endogenous components of human cerebrospinal fluid. *Life Sci* 40:301–306.
- Coffman BL, Rios GR, King CD, Tephly TR. 1997. Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 25:1–4.
- Coller JK, Christrup LL, Somogyi AA. 2009. Role of active metabolites in the use of opioids. *Eur J Clin Pharmacol* 65:121–139.
- Ding YQ, Kaneko T, Nomura S, Mizuno N. 1996. Immunohistochemical localization of mu-opioid receptors in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 367:375–402.
- Donnerer J, Cardinale G, Coffey J, Lisek CA, Jardine I, Spector S. 1987. Chemical characterization and regulation of endogenous morphine and codeine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 242:583–587.
- Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ. 2000. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7579–7584.
- Furuta T, Zhou L, Kaneko T. 2002. Preprodynorphin-, preproenkephalin-, preprotachykinin A- and preprotachykinin B-immunoreactive neurons in the accumbens nucleus and olfactory tubercle: double-immunofluorescence analysis. *Neuroscience* 114:611–627.
- Gintzler AR, Gershon MD, Spector S. 1978. A nonpeptide morphine-like compound: immunocytochemical localization in the mouse brain. *Science* 199:447–448.
- Gintzler AR, Levy A, Spector S. 1976. Antibodies as a means of isolating and characterizing biologically active substances: presence of a non-peptide, morphine-like compound in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2132–2136.
- Glattard E, Welters ID, Lavaux T, Muller A, Laux A, Zhang D, Schmidt AR, Delalande F, Lavantie BJ, Dirrig-Grosch S, Colin D, Van Dorsselaer A, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Schneider F, Goumon Y. 2010. Endogenous morphine levels are increased in sepsis: a partial implication of neutrophils. *PLoS One* 1:e8791.
- Goldstein A, Barrett RW, James IF, Lowney LI, Weitz CJ, Knipmeyer LL, Rapoport H. 1985. Morphine and other opiates from beef brain and adrenal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:5203–5207.
- Goumon Y, Bouret S, Casares F, Zhu W, Beauvillain JC, Stefano GB. 2000. Lipopolysaccharide increases endogenous morphine levels in rat brain. *Neurosci Lett* 293:135–138.
- Goumon Y, Angelone T, Schoentgen F, Chasserot-Golaz S, Almas B, Fukami MM, Langley K, Welters ID, Tota B, Aunis D, Metz-Boutigue MH. 2004. The hippocampal cholinergic neurostimulating peptide, the N-terminal fragment of the secreted phosphatidylethanolamine-binding protein, possesses a new biological activity on cardiac physiology. *J Biol Chem* 279:13054–13064.
- Goumon Y, Muller A, Glattard E, Marban C, Gasnier C, Strub JM, Chasserot-Golaz S, Rohr O, Stefano GB, Welters ID, Van Dorsselaer A, Schoentgen F, Aunis D, Metz-Boutigue MH. 2006. Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules. *J Biol Chem* 281:8082–8089.
- Goumon Y, Laux A, Muller A, Aunis D. 2009. Central and peripheral endogenous morphine. *An R Acad Nac Farm* 75:389–418.
- Grobe N, Lamshoft M, Orth RG, Drager B, Kutchan TM, Zenk MH, Spiteller M. 2010. Urinary excretion of morphine and biosynthetic precursors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:8147–8152.
- Guarna M, Neri C, Petrioli F, Bianchi E. 1998. Potassium-induced release of endogenous morphine from rat brain slices. *J Neurochem* 70:147–152.
- Guarna M, Bianchi E, Bartolini A, Ghelardini C, Galeotti N, Bracci L, Neri C, Sonetti D, Stefano G. 2002. Endogenous morphine modulates acute thermoreception in mice. *J Neurochem* 80:271–277.
- Guarna M, Ghelardini C, Galeotti N, Bartolini A, Noli L, Neri C, Stefano GB, Bianchi E. 2004. Effects of endogenous morphine deprivation on memory retention of passive avoidance learning in mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 7:311–319.
- Harburg GC, Hall FS, Harrist AV, Sora I, Uhl GR, Eisch AJ. 2007. Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons. *Neuroscience* 144:77–87.
- Hazum E, Sabatka JJ, Chang KJ, Brent DA, Findlay JW, Cuatrecasas P. 1981. Morphine in cow and human milk: could dietary morphine constitute a ligand for specific morphine (mu) receptors? *Science* 213:1010–1012.
- Hedou G, Chasserot-Golaz S, Kemmel V, Gobaille S, Roussel G, Artault JC, Andriamampandry C, Aunis D, Maitre M. 2000. Immunohistochemical studies of the localization of neurons containing the enzyme that synthesizes dopamine, GABA, or gamma-hydroxybutyrate in the rat substantia nigra and striatum. *J Comp Neurol* 426:549–560.
- Herbert RB, Venter H, Pos S. 2000. Do mammals make their own morphine? *Nat Prod Rep* 17:317–322.
- Hesse M. 2002. Alkaloid nature's curse or blessing? Zurich: Wiley-VCH Verlag.
- Heurtaux T, Benani A, Moulin D, Muller N, Netter P, Minn A. 2006. Induction of UGT1A6 isoform by inflammatory conditions in rat astrocytes. *Neuropharmacology* 50:317–328.
- Hirrlinger J, König J, Dringen R. 2002. Expression of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. *J Neurochem* 82:716–719.
- Hirrlinger J, Moeller H, Kirchhoff F, Dringen R. 2005. Expression of multidrug resistance proteins (Mrps) in astrocytes of the mouse brain: a single cell RT-PCR study. *Neurochem Res* 30:1237–1244.
- Iversen L. 2006. Neurotransmitter transporters and their impact on the development of psychopharmacology. *Br J Pharmacol* 147(suppl 1):S82–88.
- Jaeger CB. 1985. Cytoarchitectonics of substantia nigra grafts: a light and electron microscopic study of immunocytochemically identified dopaminergic neurons and fibrous astrocytes. *J Comp Neurol* 231:121–135.
- Kaplan MS, Bell DH. 1984. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* 4:1429–1441.
- Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C. 2002. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol* 66:285–306.
- Koch M, Lingenhohl K, Pilz PK. 1992. Loss of the acoustic startle response following neurotoxic lesions of the caudal pontine reticular formation: possible role of giant neurons. *Neuroscience* 49:617–625.
- Kunkel GR, Mehrabian M, Martinson HG. 1981. Contact-site cross-linking agents. *Mol Cell Biochem* 34:3–13.

- Lee CS, Spector S. 1991. Changes of endogenous morphine and codeine contents in the fasting rat. *J Pharmacol Exp Ther* 257:647–650.
- Li CH, Chung D. 1976. Isolation and structure of an untrikon-tapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:1145–1148.
- Lin Y, Carpenter DO. 1994. Direct excitatory opiate effects mediated by non-synaptic actions on rat medial vestibular neurons. *Eur J Pharmacol* 262:99–106.
- Lotsch J. 2005a. Opioid metabolites. *J Pain Symptom Manage* 29(5 suppl):S10–24.
- Lotsch J. 2005b. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of opioids. *J Pain Symptom Manage* 29(5 suppl):S90–103.
- Lotsch J, Geisslinger G. 2001. Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clin Pharmacokinet* 40:485–499.
- Luskin MB. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173–189.
- Mackenzie PI, Walter Bock K, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, Nebert DW. 2005. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 15:677–685.
- Madbouly KM, Senagore AJ, Delaney CP. 2010. Endogenous morphine levels after laparoscopic versus open colectomy. *Br J Surg* 97:759–764.
- Mandyam CD, Norris RD, Eisch AJ. 2004. Chronic morphine induces premature mitosis of proliferating cells in the adult mouse subgranular zone. *J Neurosci Res* 76:783–794.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Akil H, Watson SJ. 1995. Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *J Chem Neuroanat* 8:283–305.
- Martin-Ibanez R, Jenstad M, Berghuis P, Edwards RH, Hioki H, Kaneko T, Mulder J, Canals JM, Ernfors P, Chaudhry FA, Harkany T. 2006. Vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3) identifies spatially segregated excitatory terminals in the rat substantia nigra. *Eur J Neurosci* 23:1063–1070.
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL. 1996. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383:819–823.
- Miller KK, Lupica CR. 1997. Neuropeptide FF inhibition of morphine effects in the rat hippocampus. *Brain Res* 750:81–86.
- Mizoguchi H, Tseng LF, Suzuki T, Sora I, Narita M. 2002. Differential mechanism of G-protein activation induced by endogenous mu-opioid peptides, endomorphin and beta-endorphin. *Jpn J Pharmacol* 89:229–234.
- Molina PE, Hashiguchi Y, Meijerink WJ, Naukam RJ, Boxer R, Abumrad NN. 1995. Modulation of endogenous opiate production: effect of fasting. *Biochem Biophys Res Commun* 207:312–317.
- Moron JA, Abul-Husn NS, Rozenfeld R, Dolios G, Wang R, Devi LA. 2007. Morphine administration alters the profile of hippocampal postsynaptic density-associated proteins: a proteomics study focusing on endocytic proteins. *Mol Cell Proteomics* 6:29–42.
- Mrkusich EM, Kivell BM, Miller JH, Day DJ. 2004. Abundant expression of mu and delta opioid receptor mRNA and protein in the cerebellum of the fetal, neonatal, and adult rat. *Brain Res Dev Brain Res* 148:213–222.
- Muller A, Glattard E, Taleb O, Kemmel V, Laux A, Miede M, Delalande F, G. R, Van Dorsselaer A, Metz-Boutigues MH, Aunis D, Goumon Y. 2008. Endogenous morphine in SH-SY5Y cells and the mouse cerebellum. *PLoS One* 3. Epub: www.plosone.org/doi/pone.0001641.
- Nagano E, Yamada H, Oguri K. 2000. Characteristic glucuronidation pattern of physiologic concentration of morphine in rat brain. *Life Sci* 67:2453–2464.
- Neri C, Guarna M, Bianchi E, Sonetti D, Matteucci G, Stefano GB. 2004. Endogenous morphine and codeine in the brain of non human primate. *Med Sci Monit* 10:MS1–5.
- Neri C, Ghelardini C, Sotak B, Palmiter RD, Guarna M, Stefano G, Bianchi E. 2008. Dopamine is necessary to endogenous morphine formation in mammalian brain in vivo. *J Neurochem* 106:2337–2344.
- Okura T, Saito M, Nakanishi M, Komiyama N, Fujii A, Yamada S, Kimura R. 2003. Different distribution of morphine and morphine-6 beta-glucuronide after intracerebroventricular injection in rats. *Br J Pharmacol* 140:211–217.
- Paxinos G, Franklin KBJ. 1997. The mouse brain in stereotaxic coordinates. London: Elsevier Academic Press.
- Persson AI, Thorlin T, Bull C, Eriksson PS. 2003a. Opioid-induced proliferation through the MAPK pathway in cultures of adult hippocampal progenitors. *Mol Cell Neurosci* 23:360–372.
- Persson AI, Thorlin T, Bull C, Zarnegar P, Ekman R, Terenius L, Eriksson PS. 2003b. Mu- and delta-opioid receptor antagonists decrease proliferation and increase neurogenesis in cultures of rat adult hippocampal progenitors. *Eur J Neurosci* 17:1159–1172.
- Pert CB, Pasternak G, Snyder SH. 1973. Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain. *Science* 182:1359–1361.
- Pierce TL, Wessendorf MW. 2000. Immunocytochemical mapping of endomorphin-2-immunoreactivity in rat brain. *J Chem Neuroanat* 18:181–207.
- Poeaknapo C, Schmidt J, Brandsch M, Dräger B, Zenk MH. 2004. Endogenous formation of morphine in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14091–14096.
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T. 1994. Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 45:330–334.
- Reisine T. 1995. Opiate receptors. *Neuropharmacology* 34:463–472.
- Sargeant TJ, Day DJ, Mrkusich EM, Foo DF, Miller JH. 2007. Mu opioid receptors are expressed on radial glia but not migrating neuroblasts in the late embryonic mouse brain. *Brain Res* 1175:28–38.
- Soliman HM, Melot C, Vincent JL. 2001. Sedative and analgesic practice in the intensive care unit: the results of a European survey. *Br J Anaesth* 87:186–192.
- Somogyi AA, Barratt DT, Collier JK. 2007. Pharmacogenetics of opioids. *Clin Pharmacol Ther* 81:429–444.
- Spector S, Kantrowitz JD, Oka K. 1985. Presence of endogenous morphine in toad skin. *Prog Clin Biol Res* 192:329–332.
- Stefano GB, Goumon Y, Casares F, Cadet P, Fricchione GL, Rialas C, Peter D, Sonetti D, Guarna M, Welters ID, Bianchi E. 2000. Endogenous morphine. *Trends Neurosci* 23:436–442.
- Stefano GB, Cadet P, Kream RM, Zhu W. 2008. The presence of endogenous morphine signaling in animals. *Neurochem Res* 33:1933–1939.
- Suleman FG, Abid A, Gradinaru D, Daval JL, Magdalou J, Minn A. 1998. Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch Biochem Biophys* 358:63–67.

- Swerdlow NR, Caine SB, Geyer MA. 1991. Opiate-dopamine interactions in the neural substrates of acoustic startle gating in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 15:415-426.
- Taguchi K, Suzuki Y. 1989. Effects of microiontophoretically-applied morphine on the Purkinje cell in the cerebellum of the cat. *Neuropharmacology* 28:235-242.
- Taguchi K, Abe K, Chyuma T, Kato M, Shigenaga T, Kushida K, Chikuma T. 2000. Effects of microiontophoretically-applied opioid peptides on Purkinje cells in the cat cerebellum. *Acta Pharmacol Sin* 21:877-884.
- Toll L, Berzetei-Gurske IP, Polgar WE, Brandt SR, Adapa ID, Rodriguez L, Schwartz RW, Haggart D, O'Brien A, White A, Kennedy JM, Craymer K, Farrington L, Auh JS. 1998. Standard binding and functional assays related to medications development division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications. *NIDA Res Monogr* 178:440-466.
- Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. 2008. Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11(2 suppl):S133-153.
- von Bohlen Und Halbach O. 2007. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 329:409-420.
- Walker JF. 1964. *Formaldehyde*, 3rd ed. New York: Reinhold Publishing. p 486.
- Weitz CJ, Lowney LI, Faull KF, Feistner G, Goldstein A. 1986. Morphine and codeine from mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9784-9788.
- Weitz CJ, Faull KF, Goldstein A. 1987. Synthesis of the skeleton of the morphine molecule by mammalian liver. *Nature* 330:674-677.
- Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. 1997. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386:499-502.
- Zhang Y, Pan YX, Kolesnikov Y, Pasternak GW. 2006. Immunohistochemical labeling of the mu opioid receptor carboxy terminal splice variant mMOR-1B4 in the mouse central nervous system. *Brain Res* 1099:33-43.
- Zhu W, Bilfinger TV, Baggerman G, Goumon Y, Stefano GB. 2001. Presence of endogenous morphine and morphine 6 glucuronide in human heart tissue. *Int J Mol Med* 7: 419-422.

III. PUBLICATION 2

**LOCALIZATION OF ENDOGENOUS MORPHINE-LIKE
COMPOUNDS IN THE MOUSE SPINAL CORD**

Laux A., Delalande F., Mouheiche J., Stuber D., Sage D.,
Van Dorsselaer A., Bianchi E., Poisbeau P., Goumon Y.

The Journal of Comparative Neurology

Sous presse

LOCALIZATION OF ENDOGENOUS MORPHINE-LIKE COMPOUNDS IN THE MOUSE SPINAL CORD.

Abbreviated title: Endogenous alkaloids mapping in the mouse spinal cord

Associate Editor: Pr. Paul E. Sawchenko

Indexing terms: morphine, morphine-6-glucuronide, morphine-3-glucuronide, codeine, astrocytes, GABA, spinal cord

Alexis Laux¹, François Delalande², Jinane Mouheiche¹, Denise Stuber¹, Alain Van Dorselaer², Enrica Bianchi³, Erwan Bezar⁴, Pierrick Poisbeau¹ & Yannick Goumon^{1#}

¹*Nociception and Pain Department, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR 3212 et Université de Strasbourg, F-67084 Strasbourg, France.*

²*Laboratoire de spectrométrie de masse BioOrganique, IPHC-DSA, Université de Strasbourg, CNRS UMR7178, 25 rue Becquerel, F-67087 Strasbourg, France.*

³*Department of Neuroscience, University of Siena, Siena, Italy.*

⁴*CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France.*

GGrant sponsor: This work was funded by Inserm, CNRS, Université de Strasbourg, French Ministère délégué à la Recherche et à l'Enseignement Supérieur (Ph.D fellowship to A.M. and A.L.), Conseil National de la Recherche Scientifique du Liban (Ph.D fellowship to J.M.), Fondation pour la Recherche Médicale (to Y.G.).

Sous presse dans Journal of Comparative Neurology

ABSTRACT

Morphine, codeine, morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide are de novo synthesized in mammalian cells and in the central nervous system. Knowledge about endogenous morphine-like compound distribution in the adult mouse brain has been recently improved, and new hypotheses have been suggested about their potential implications in brain physiology. Endogenous morphine-like compounds have been shown to be synthesized in the spinal cord, but their localization is unknown. In the present study, we describe the distribution of endogenous morphine-like compounds (morphine and/or its glucuronides and/or codeine) in the adult mouse spinal cord using a well validated antibody. Using different microscopy approaches, we found the presence of morphine, codeine, and/or morphine glucuronides in GABAergic neurons and astrocytes of the spinal cord. Whereas GABAergic neurons containing endogenous morphine-like compounds were primarily located in the ventral horn, astrocytes that were labeled for morphine-like compounds were found throughout the gray matter and the white matter. Our study demonstrates the possibility that endogenous morphine-like compounds in the central nervous system have other functions beyond their analgesic functions.

Correspondence to: Dr. Yannick Goumon, INCI, CNRS UPR3212 ; 5, rue Blaise Pascal, F-67084 Strasbourg Cedex, France ; Phone.: (33)-3-88-45-67-18 ; Fax: (33)-3-88-61-29-08. e-mail: yannick.goumon@inserm.u-strasbg.fr

INTRODUCTION

Endogenous alkaloids, which are structurally identical to vegetal alkaloids, are present in various mammalian tissues and cells (Donnerer et al., 1987; Donnerer et al., 1986; Gintzler et al., 1978; Glattard et al., 2010; Goldstein et al., 1985; Goumon et al., 2009; Hazum et al., 1981; Herbert et al., 2000; Laux et al., 2011; Muller et al., 2008; Neri et al., 2004; Stefano et al., 2000; Weitz et al., 1986; Zhu et al., 2001). Endogenous morphine biosynthesis pathways have been demonstrated in the SH-SY5Y human cell line and shown to be derived from dopamine (Boettcher et al., 2005; Muller et al., 2008; Neri et al., 2008; Poeaknapo, 2005; Poeaknapo et al., 2004). However, several reports have noticed that endogenous alkaloids can be synthesized by non-dopaminergic or non-catecholaminergic cells (i.e., pancreatic cells, hepatocytes and placenta-derived cells) (Molina et al., 1995; Poeaknapo et al., 2004; Weitz et al., 1987), suggesting that non-dopaminergic cells may internalize dopamine or intermediate metabolites to finalize morphine biosynthesis (Charron et al., 2011; Goumon et al., 2009; Laux et al., 2011).

Our recent studies have focused on the functional role of endogenous alkaloids in neuronal cells. Using the SH-SY5Y model producing dopamine, morphine and morphine-6-glucuronide (M6G) were found to be restricted to large dense core vesicle-like organelles and to be released via a Ca²⁺-dependent mechanism (Muller et al., 2008). However, using the mouse brain, we recently found that morphine-like compounds were located in non-dopaminergic cells (mainly in GABAergic neurons and astrocytes), and we characterized the presence of morphine, codeine, M6G and morphine-3-glucuronide (M3G) in the adult mouse brain (Laux et al., 2011). The presence of M3G and M6G in the brain is explained by the presence of enzymes of the UDP-glucuronosyltransferase 1A and 2B families (UGT1A, UGT2B). These enzymes convert morphine to M3G and M6G and are expressed in neurons and astrocytes (Heurtaux et al., 2006; King et al., 1999; Nagano et al., 2000; Suleman et al., 1998).

Interestingly, our recent immunomapping of morphine-like immunoreactivity throughout the entire brain described the presence of endogenous alkaloids in various structures, including the hippocampus, olfactory bulb, band of Broca, basal ganglia and cerebellum. Morphine-like immunoreactivity was mainly present in GABAergic neuronal and astrocytic cell bodies and processes. In neurons, endogenous alkaloids are present in presynaptic terminals in the cerebellum and postsynaptic terminals in other regions of the mouse brain (Laux et al., 2011). This further suggests that endogenous morphine

and its derivatives may act as neuromodulators of brain functions.

Endogenous morphine has been detected in the spinal cord of many species, including the dog (Meijerink et al., 1999), the rat (Donnerer et al., 1987; Meijerink et al., 1999) and the mouse (Charlet et al., 2010). However, its precise localization and cellular distribution has not been established in the spinal cord, and consequently, no indication about their potential roles in the spinal cord physiology have been described.

The goal of our present study was to determine the structural and cellular distribution of morphine/M3G/M6G/codeine immunoreactivity in the adult mouse spinal cord. A detailed immunohistochemical description of endogenous morphine-like compounds (i.e., morphine, M6G, M3G and codeine) in the adult mouse spinal cord was performed using conventional, confocal and electron microscopy to localize and characterize the immunoreactive cells and to determine the subcellular localization of endogenous morphine-like compounds.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were performed on six 45 day old laboratory-bred, adult male C57BL/6 mice weighting 30±3 g. Animals were given free access to food and water, with a 12 h light-dark cycle at a temperature of 22±2°C. All procedures were performed in accordance with European directives (86/609/EEC) and were approved by the regional ethics committee and French ministry of agriculture (license No. 67-116, to P.P.).

Antibody characterization

Antibodies used in the present study are commercially available and already used in previous studies. Table 1 provides informations about these antibodies including immunogens, species, commercial sources and dilutions used in the present study.

γ-aminobutyric acid (GABA) antibody.

Affinity-purified anti-GABA antiserum (Sigma Aldrich, ref: A2052, St. Louis, USA) was raised against GABA conjugated to bovine serum albumin (BSA) via a glutaraldehyde treatment and evaluated for specificity with a dot-blot immunoassay (Ito et al., 2007; Ligorio et al., 2000)), and it was blocked by preincubation with either GABA or GABA-BSA in mouse spinal cord (Heinke et al., 2004). The antiserum specifically labeled electrophysiologically identified GABAergic hippocampal neurons in cultures prepared from GAD67-GFP mice (Ikeda et al., 2008). As previously described, this antiserum labels GABAergic neurons after paraformaldehyde fixation

without addition of glutaraldehyde (Heinke et al., 2004; Ikeda et al., 2008).

Choline acetyltransferase (ChAT) antibody.

ChAT was labeled with an affinity-purified polyclonal antiserum raised in goat against ChAT enzyme purified from human placenta (Chemicon-Millipore, ref: AB144P, Molsheim, France). It stains a single band of 68-70 kDa on a Western blot from rat (see manufacturer's data sheet) and human brain extracts (Gill et al., 2007). This antiserum was previously used to label spinal cord motor neurons in humans (Gill et al., 2007) and mice (Matsumoto et al., 2007).

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody.

The rabbit anti-GFAP polyclonal antiserum (DAKO, ref: Z0334, Glostrup, Denmark) was produced using GFAP isolated from cow spinal cord. The staining pattern by immunohistochemistry matched the expected distribution of GFAP in the mice auditory brainstem (Abraira et al., 2007). Using cultured mouse primary astrocytes, the antibody staining demonstrated a filamentous pattern, which was consistent with the GFAP presence in intermediate filaments. Using Western blotting, this antibody recognized a band of approximately 55 kDa from mouse brain extracts (Arantes et al., 2009). This antiserum was used in our previous study on mouse brain and displayed a specific labeling of astrocytes cell bodies and processes (i.e., astrocytic foot around blood vessels) (Laux et al., 2011).

Tyrosine hydroxylase (TH) antibody.

The rabbit anti-TH polyclonal antiserum (Chemicon-Millipore, ref: AB152, Molsheim, France) was produced using denatured full length TH isolated from rat pheochromocytoma. Its specificity has been corroborated by western blot analysis in rat, mouse, ferret, feline, and aplysia (see manufacturer's data sheet), and it selectively labels a single band at approximately 62 kDa. In addition, a selective label of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta has been previously observed (Laux et al., 2011; Martin-Ibanez et al., 2006). The results presented in this study reveal a similar labeling and distribution of dopaminergic innervations in the spinal cord as previously described (Brumovsky et al., 2006).

Microtubule-associated protein 2 (MAP2) antibody

The rabbit anti-MAP2 antibody (Chemicon-Millipore, ref: AB5622, Molsheim, France) was generated using purified microtubule associated protein from rat brain. The antibody recognizes all isoforms of MAP2 (MAP2a, MAP2b, MAP2c and MAP2d). However, it has a strongest immunoreactivity for MAP2a and MAP2b. Analyzing adult rat brain soluble extract by Western blot, the antibody recognizes a 280 kD double band that corresponds to

MAP2a and MAP2b, as well as a 70kD doublet that corresponds to MAP2c (see manufacturer's data sheet).

Morphine antibody.

The mouse anti-morphine antibody (6D6, Aviva System Biology, ref: 16002, San Diego, USA) was produced using a morphine-BSA conjugate. This antibody has already been used and extensively controlled (Glattard et al., 2010; Laux et al., 2011; Muller et al., 2008), demonstrating the specificity of the labeling. (i) In ELISA, the 6D6 antibody recognized morphine, codeine, M3G and M6G without any cross reactivity with other morphine precursors or related compound (i.e., dopamine or THP). (ii) Control for the cross-linking of morphine, M6G, M3G and codeine to proteins by paraformaldehyde (PFA) has been performed in vitro and in vivo, showing that endogenous alkaloids are covalently bound to protein after PFA treatment. (iii) An increase in immunoreactivity in the striatum was observed after intracerebroventricular injection of morphine, codeine, M6G and/or M3G, and a gradient in the morphine immunoreactivity (MIR) density of cells, extracellular space and process labeling were dependent on the distance from the injection site. (iv) Finally, immunoprecipitation experiments using the 6D6 antibody performed on mouse brain extracts led to endogenous alkaloid recovery (Laux et al., 2011).

Three specificity controls were performed in the present study: (i) the morphine antibody was omitted to control for nonspecific binding of the secondary antibody in the spinal cord sections, and the omission of the primary antibody resulted in no peroxidase-label in the tissue sections; (ii) immunoreactivity was absent when the 6D6 antibody was preabsorbed 1 h with 3 μ M morphine (Sigma-Aldrich), codeine (Sigma-Aldrich), M6G (Sigma-Aldrich) or M3G (Sigma-Aldrich) before immunohistochemistry; and (iii) western blotting of mouse spinal cord extracts with the 6D6 antibody was performed and showed no cross reactivity of the antibody with other proteins (Laux et al., 2011).

The MIR observed with the 6D6 antibody may correspond to endogenous morphine, codeine, M6G and/or M3G. The results observed in the present study were consistent with previous studies (LAUX et al., 2011) and showed that MIR was primarily located in astrocytes and GABAergic cells.

Immunohistochemistry

Tissue preparation for immunohistochemistry studies.

Mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of 0.1 ml of a 5.6% (w/v) pentobarbital sodium solution (CEVA Santé Animale, Libourne, France) and perfused transcardially with fixative solution using a peristaltic pump. For conventional and electron

microscopy, a fixative solution of 4% formaldehyde (EMS, Hatfield, USA) in a 0.1 M NaCl/Pi buffer (Disodium hydrogen phosphate dihydrate, 1.28% (w/v), sodium dihydrogen phosphate monohydrate, 0.38% (w/v); pH 7.4) with 0.25% (v/v) glutaraldehyde (VWR, Fontenay sous bois, France) was used. The same fixative solution was used for laser confocal microscopy, except that glutaraldehyde was omitted. Fixative solutions were chilled and then perfused for 10 min with a peristaltic pump at a flow rate of 10 ml/min. The spinal cord was quickly removed and incubated for 2 h at 4°C in the same fixative solution. Sections of spinal cord (50 µm thick) were cut with a vibratome (Leica VT 1000 S, Nanterre, France) and collected in Tris-buffered saline (TBS: 50 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, pH 7.4).

Slices Immunostaining.

Immunostaining was performed on slides, free-floating in TBS, as previously described (Hedou et al., 2000). Tissue slices were washed in TBS and incubated for 1 h in bovine serum albumin (BSA; Euromedex, Mundolsheim, France) diluted in TBS (5%, w/v) in order to saturate nonspecific immunoreactive sites. After saturation sections were incubated overnight with mixture of primary antibody raised in different species in TBS containing 0.1% (v/v) Triton X100 (Sigma-Aldrich). Triton was omitted for electron microscopy. Primary antibodies were used as described in the list of antibody of the Table 1. After incubation with the primary antibody, tissue slices were washed six times with TBS (5 min) and specific secondary antisera were added for 2 h at room temperature (RT), followed by six TBS washes (5 min). These secondary antisera were (i) HRP-conjugated donkey anti-mouse IgG (P.A.R.I.S., ref: BI 2413C, Paris, France; dilution 1:400), (ii) Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probes-Invitrogen, ref: A21206, Cergy Pontoise, France; dilution 1:1000), (iii) 488-conjugated donkey anti-goat IgG (Jackson immunoresearch, ref: 705-486-147, Suffolk, England; dilution 1:500) and (iv) Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson immunoresearch, ref: 715-165-150; dilution 1:1000). Several controls were carried out to assess antibody specificity and nonspecific immunoreactivity. Primary antibodies were omitted and each secondary antibody was tested individually or in a mixture in the presence of tissue sections. Each antibody was also tested with the secondary antibody used for the second immunolabelling in order to determine whether interspecies cross-reactivity exists.

Light microscopy

Peroxidase activity was measured after a 10 min incubation period in a freshly prepared solution of 4-chloro-1-naphthol (0.2 mg/ml) in TBS containing 0.006% (w/v) hydrogen peroxide. After washing with TBS, the sections were mounted in glycerol/TBS (1:1, v/v) before

analysis with a Leica DMRB microscope equipped with a digital camera (Axiocam, Zeiss, Le Pecq, France).

Electron microscopy

Peroxidase activity was detected with a freshly prepared solution of 0.025% (w/v) 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride in TBS containing 0.006% (w/v) hydrogen peroxide. After washing with NaCl/Pi buffer, sections and slides were postfixed for 30 min with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M NaCl/Pi buffer (pH 7.4), and then with 1% (w/v) osmium tetroxide in 0.1 M NaCl/Pi buffer (pH 7.4) at 4°C for 1 h. Sections were dehydrated in ethanol and embedded in Araldite resin (Hedou et al., 2000). Ultrathin sections were observed with a Hitachi H 7500 electron microscope (Hitachi, Monroeville, USA) without additional staining. Pictures were acquired with a Hamamatsu Digital camera (C 4742-95, Massy, France).

Confocal microscopy observations

Immunofluorescent staining was analyzed with a Zeiss laser scanning microscope (LSM510 invert, Zeiss) equipped with a plan apo 63X oil immersion and a 40X oil immersion lens. Tissue sections were subjected to optical serial sectioning to produce images in the X–Y plane. Each optical section was scanned eight times to obtain an average image. Pictures were recorded digitally in a 1024x1024 pixel format. A look-up table (Range indicator, Zeiss) ensured that the full dynamic range of the photomultipliers was used. Before each measurement, a series of sections was acquired through the vertical axis in order to choose the equatorial section.

Anatomical and cellular distribution

The anatomical structures were identified under direct observation using the atlas and nomenclature of the Allen brain atlas Allen Spinal Cord Atla, <http://mousespinal.brain-map.org/>. Seattle (WA): Allen Institute for Brain Science. ©2009.. Cartography was performed on four animals, and the staining was identical for each experiment.

Photomicrographs

Figures including photomicrographs were made with Adobe Photoshop software without changing brightness, contrast and exposition. For all series of experiment using microscopy, images were captured with the same parameter and setting of brightness, contrast and exposition.

RESULTS

Endogenous morphine-like immunoreactivity distribution at the different levels of the adult mouse spinal cord

Light microscopy was used to analyze morphine, morphine glucuronides and codeine immunoreactivity (MIR) present in the cervical, thoracic and lumbar mouse spinal cord using the 6D6 antibody.

MIR in neurons of the spinal cord

A strong morphine-like immunoreactivity (MIR) was observed throughout the gray matter of the spinal cord, whereas lower levels of MIR was found in the white matter of the spinal cord (Fig. 1). The MIR distribution in the gray matter was similar through the cervical (Fig. 1A), thoracic (Fig. 1B) and lumbar sections of the spinal cord (Fig. 1C). However, a stronger MIR was observed in the dorsal horn superficial layers (I and II). Representation of the distribution of MIR neuronal cells (Fig. 1A-C, dots on the right side) showed no difference between the different levels of the spinal cords. No MIR neurons were found in laminae I to IV of the dorsal horn, but labeled neurons were present in the other gray matter areas. The neuronal MIR positive cells were primarily localized to laminae V to X. The presented sections are representative of the localization and the number of neuronal cells observed throughout the entire spinal cord (n=4).

MIR in the dorsal horn

Strong MIR was found in the processes of superficial layers (I and II) of the dorsal horn, and this staining was similar between the different levels of the spinal cord (Fig. 2A-C). No labeled neuronal cells were found in the superficial layers, whereas intense MIR was present in numerous processes and astrocytic cells bodies (Fig. 3A and 3B, arrows). In the deeper laminae (V and VI), only few labeled neurons were observed (Fig. 3C, arrow).

In the white matter of the dorsal horn, strong MIR astrocytes were found on the edge of the spinal cord (Fig. 3D). The MIR astrocytes in the white matter were distributed homogeneously, and therefore, no correlation was detected between the distribution of MIR astrocytes and anatomical or functional fasciculus of the white matter. After pre-adsorption of the 6D6 antibody, 1h, with 3µM of morphine, no immunoreactivity was detected in the dorsal horn gray matter (Fig. 3E) and in the edge of the white matter (Fig. 3F).

MIR in the ventral horn

In the ventral horn, MIR displayed an identical pattern of distribution in the different levels of the spinal cord. However, numerous labeled neuronal cells were observed in the cervical and lumbar ventral horn. In all cervical, thoracic, lumbar and sacral levels of lamina IX, MIR was observed in small, round-shaped cells but not in the motor neurons (Fig. 4A and 4B, asterisks). The labeled non-motor neurons were also observed in the lateral motor neuronal pool from the cervical level (Fig. 4C, asterisks). The MIR processes were present around the motor neurons and may correspond to astrocytic or neuronal processes (Fig. 4A-C, white arrows). In lamina VII (Fig. 4D), VIII and X, MIR was found in round shaped cells throughout the spinal cord.

MIR was also found in the whole gray matter of the ventral horn in astrocytic cell bodies (Fig. 4A-D, black arrows), processes and in the astrocytic foot around blood vessels (Fig. 4E arrow). In the dorsal horn, astrocytes were the only MIR positive cells in the white matter. Numerous labeled astrocytes were observed at the edge of the spinal cord (Fig. 4F).

Characterization of morphine-like immunoreactive cells in the adult mouse spinal cord.

In the mouse brain, morphine-like compounds were found in GABAergic cells and astrocytes (Charron et al., 2011; Laux et al., 2011). To characterize the cells and processes containing morphine-like compounds in the mouse spinal cord, we used confocal microscopy using different cell markers.

In the superficial laminae of the dorsal horn, co-labeling of morphine-like compounds and MAP2, a dendritic and neuronal cell body marker (Dehmelt and Halpain, 2005; Gritti et al., 2009; Tan et al., 2010), we find no evidence for colocalization of MIR labelled neurons and MAP2 in the dorsal horn (Fig. 5A-B). However, it can not be excluded that other neurons (i.e., non mature neurons) also express endogenous alkaloids. MAP2 localization in the spinal cord neurons was in agreement with previous studies (Vercelli et al., 2008; Zhang et al., 2006a). However, in lamina V, co-labeling with an anti-MAP2 antibody indicated that large round shaped cells corresponded to neurons (Fig. 5C, arrow). Moreover, using an anti-GABA antibody we demonstrated that MIR was present in GABAergic neurons of the lamina V (Fig. 5D, arrow).

In the motor neuron pool of the ventral horn, the cell bodies displaying MIR (Fig. 5E) did not colocalize with ChAT, which is present in motor neurons. This suggests that the

motor neurons do not contain endogenous morphine, codeine and/or morphine glucuronides. However, immunolocalization of MIR within GABA-positive cells showed that some GABAergic interneurons that contain MIR were present in the motor neuron pools of lamina IX (Fig. 5F, arrow). ChAT localisation found in our experiment was in agreement with previously described localization in ventral horn (Matsumoto et al., 2007; Park et al., 2010) and in lamina XI (Tortarolo et al., 2006).

We previously described that, in the mouse brain, MIR was absent from dopaminergic cells and processes (Laux et al., 2011). A similar result was observed in the spinal cord; TH processes did not colocalize with the MIR processes, suggesting that MIR labeled processes do not correspond to dopaminergic innervations (Fig. 5G). TH-immunoreactive processes in the spinal cord were as previously described (Brumovsky et al., 2006; Mizukami, 2004).

Endogenous morphine-like compounds are present in astrocytic cell bodies and processes in the mouse brain (Laux et al., 2011). Using a light microscopy approach, we observed the presence of MIR in astrocytes throughout the mouse spinal cord. Double-label immunofluorescence using glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody, an astrocyte marker (Bramanti et al.), confirmed the presence of MIR in numerous astrocytes present in the spinal cord (Fig. 5H-I) and in the astrocytic foot processes around blood vessels (Fig. 5I, arrow). GFAP-label (i.e., astrocytes) in the spinal cord is similar to what was previously described (Tawfik et al., 2008). Colabeling of GFAP and MIR confirmed the presence of endogenous morphine, codeine, and/or morphine glucuronides in the astrocytes localized to the edge of the white matter (Fig. 5J).

Ultrastructural localization of morphine-like immunoreactivity in the adult mouse spinal cord.

To assess if MIR elements were derived from a glial or neuronal origin, we performed electron microscopic immunohistochemistry on spinal cord sections. Similar results were found for each spinal cord section. As in the dorsal and ventral horn of the cervical spinal cord, a strong MIR was present in astrocytic cell bodies (Fig. 6A) and processes. We also observed labeling in the astrocytic processes around blood vessels (Fig 6B, arrow), whereas vascular epithelium was not labeled. For astrocytes, MIR was localized in the cytoplasm of some neuronal cells present in the gray matter of the spinal cord (Fig. 6C). Further, neuronal postsynaptic elements, recognizable by the typical postsynaptic density, contained MIR (Fig. 6D,

arrow). However, MIR was not observed in the neuronal presynaptic endings.

DISCUSSION

Morphine-like alkaloids (i.e., morphine, M6G, M3G and codeine) are found in the central nervous system (CNS), and their concentration and localization have been described in the brain (Bianchi et al., 1993; Bianchi et al., 1994; Charron et al., 2011; Laux et al., 2011; Meijerink et al., 1999; Muller et al., 2008). However, few studies have examined their presence in the spinal cord, although endogenous morphine presence has been characterized in the spinal cord (Charlet et al., 2010; Donnerer et al., 1987; Meijerink et al., 1999). However, its localization has never been studied in the spinal cord.

The goal of the present study was to determine the localization of endogenous morphine, codeine, M6G and M3G in the adult mouse spinal cord using classical, confocal and electron microscopy to discover the function of endogenous alkaloids in the spinal cord's physiology.

In the adult mouse spinal cord, endogenous morphine, codeine, M3G and/or M6G were observed in non-dopaminergic cells. Indeed, some of the GABAergic neurons of the spinal cord and astrocytic cell bodies and processes displayed a MIR that was homogeneously distributed at different levels of the spinal cord. The present mapping of morphine-like immunoreactivity represents a key step to design future experiments aimed at better understanding the role of morphine and/or morphine derivatives in spinal cord function.

MIR in non dopaminergic cells

Endogenous morphine is believed to be derived from dopamine biosynthesis, and its synthesis pathway has been characterized in SH-SY5Y, a tumor-derived catecholaminergic cell line (Boettcher et al., 2005; Poeaknapo et al., 2004). Moreover, a recent publication showed the absence of endogenous morphine in mice lacking TH, suggesting that dopamine is necessary for endogenous morphine biosynthesis in vivo (Neri et al., 2008). However, two recent articles revealed that, in the mouse brain, endogenous alkaloids are absent from dopaminergic neurons of the substantia nigra and their processes in the striatum (Charron et al., 2011; Laux et al., 2011). Dopaminergic processes have been shown to be present in the spinal cord (Brumovsky et al., 2006), and as observed in the brain (Charron et al., 2011; Laux et al., 2011), morphine-like immunoreactivity was absent from these neurons. These data are supported by the fact that endogenous morphine can be synthesized by non

dopaminergic cells (Molina et al., 1995; Poeaknapo et al., 2004; Weitz et al., 1987).

These results, together with our brain studies (Charron et al., 2011; Laux et al., 2011), suggest that the biosynthesis of morphine is not completed in the dopaminergic neurons of the CNS, implying that the peripheral and central endogenous morphine biosynthesis pathways are different. In the CNS, endogenous morphine, codeine and/or morphine glucuronides may be taken up from the extracellular space by active or passive transport, or may result from an uptake of a morphine precursor, such as tetrahydropapaveroline (THP) (Charron et al., 2011; Laux et al., 2011). Further, it has been hypothesized that THP, a dopamine metabolite found in the brain extracellular space, may be used to synthesize morphine-like compounds (Boettcher et al., 2005). THP injection in mice leads to morphine production and excretion (Grobe et al., 2010). This hypothesis implies cooperation between different cell types to ensure the complete endogenous codeine/morphine/glucuronides biosynthesis.

MIR in GABAergic neurons

In this study, we described the localization of morphine-like compounds in some GABAergic cells in the spinal cord. The MIR-positive GABAergic neurons were present in all regions of the spinal cord and were primarily located in the gray matter of the ventral horn. MIR corresponded to the possible presence of morphine, M6G, M3G and/or codeine. The presence of UGT1A6 in neurons of the rat brain (Brands et al., 2000; Suleman et al., 1998) suggests that, after morphine synthesis or uptake, some neurons are able to convert morphine into its glucuronides. Our electron microscopy study allowed us to describe the presence of morphine-like immunoreactivity only in postsynaptic elements in the spinal cord (no presynaptic MIR has been observed). This conclusion supports our results obtained in the mouse brain, where MIR was present in the postsynaptic elements in all regions except in the cerebellum, where presynaptic MIR was observed in GABAergic basket cells. In addition, the absence of morphine-like compounds in some GABAergic cells present in the dorsal horn was consistent with previous studies that showed that not all of the GABAergic cells contained MIR (Charron et al., 2011; Laux et al., 2011). We can hypothesize that morphine-like compounds may be synthesized by a subpopulation of GABAergic neurons and that this synthesis may be dependent on a specific transporter and/or enzyme expression.

Interestingly, endogenous morphine/GABAergic neurons were restricted to the anterior horn of the spinal

cord (or ventral horn), an area where the cell bodies of alpha motor neurons receive input from a number of sources, including sensory neurons and interneurons. GABA plays a role in this area via an inhibitory effect on alpha motor neuron activity. These cells, that are affected in the so-called «anterior horn diseases», namely amyotrophic lateral sclerosis, spinal muscular atrophy, and progressive muscular atrophy, pathologies characterized by altered GABAergic system (Abdipranoto et al., 2008). Morphine has the highest affinity for the μ opioid receptors (MORs) which are often found at postsynaptic locations as well as presynaptically. Since presynaptic MORs inhibit neurotransmitter release; through this mechanism, endogenous morphine might modulate the release of the inhibitory neurotransmitter GABA or regulate GABA synthesis. Further studies are necessary to establish the functional relevance and interdependence of GABA/morphine containing neurons in spinal ventral horn, particularly in muscle activity and its related pathologies.

MIR in astrocytes

As previously described in the adult mouse brain (Charron et al., 2011; Laux et al., 2011), our results showed the presence of endogenous morphine-like compounds in a large number of astrocytes throughout the spinal cord. Astrocytes do not express TH (Jaeger, 1985) and, thus, are unable to synthesize dopamine and endogenous morphine and its derivatives *de novo*. As postulated above, astrocytes may achieve morphine biosynthesis by uptaking the precursors. However, another hypothesis suggests that, because astrocytes are known to be involved in the uptake of neurotransmitters from the extracellular space (Iversen, 2006), astrocytes may be able to take up morphine via specific transporters (Charron et al., 2011; Laux et al., 2011). In addition, the presence of UGT1A6 in primary rat astrocyte cultures (Heurtaux et al., 2006; Suleman et al., 1998) suggests that astrocytes may catabolize morphine into morphine-glucuronides. The present description of MIR in the astrocytic foot processes around blood vessels may also suggest a possible uptake/release from the blood (Brix-Christensen et al., 2000; Brix-Christensen et al., 1997; Glattard et al., 2010). Finally, we are able to postulate that astrocytes may be responsible for the morphine catabolism in the spinal cord, which could lead to further studies in the fields of opiates addiction and tolerance processes.

MIR and the μ opioid receptor

Morphine and its derivative, M6G, preferentially bind the μ opioid (MOR) and the δ opioid (DOR) receptors

(Matthes et al., 1996; Trescot et al., 2008). In the spinal cord, the highest density of MORs were found in the processes of the superficial layers I and II of the dorsal horn (Abbadie et al., 2000; Zhang et al., 2006b). MORs were also found in the processes of others layers of the spinal cord but with less intensity. Interestingly, motor neuronal cell bodies have been shown to express the MORs (Abbadie et al., 2000; Zhang et al., 2006b). The presence of MORs in the same area of MIR, such as lamina I and II and in the motor neuron pool, suggests a role for endogenous alkaloids in these areas. However, several endogenous peptides are also able to bind MORs, including β -endorphin ((Reisine, 1995)) and, endomorphin-1 and endomorphin-2 (Zadina et al., 1997). Because multiple MOR-binding peptides exist in addition to morphine-like compounds (e.g. in the superficial layer I and II) (Martin-Schild et al., 1999; Pierce and Wessendorf, 2000), it is difficult to speculate on the individual effects of endogenous alkaloids. However, such colocalization strongly suggests that endogenous morphine or its derivatives could act as novel high-affinity endogenous MOR agonists.

CONCLUSION

Although no definitive role has been attributed to endogenous morphine and its derived compounds found in nervous system tissue, their presence in GABAergic neurons and astrocytes in the spinal cord needs to be studied further. Endogenous morphine has been shown to be implicated in the regulation of pain and in weakening the memory of a nociceptive experience, which plays a similar role as its exogenous counterpart (Charlet et al., 2010; Guarna et al., 2002; Guarna et al., 2004; Guarna et al., 2005). However, the mechanism of action of endogenous morphine in the CNS remains unknown, and the presence of endogenous morphine-like compounds in non-dopaminergic cells and in regions of the spinal cord not usually involved in pain modulation allows for exciting future studies to examine and extend the role of these endogenous opiates beyond their analgesic functions.

ACKNOWLEDGMENTS

We are most grateful to Dr. Yannick Bailly and Mr. Guy Bombarde for technical assistance.

LITERATURE CITED

Abbadie C, Pan Y, Drake CT, Pasternak GW. 2000. Comparative immunohistochemical distributions of carboxy terminus epitopes from the mu-opioid receptor splice variants MOR-1D, MOR-1 and MOR-1C in the mouse and rat CNS. *Neuroscience* 100(1):141-153.

Abdipranoto A, Wu S, Stayte S, Vissel B. 2008. The role of neurogenesis in neurodegenerative diseases and its implications for therapeutic development. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7(2):187-210.

Abraira VE, Hyun N, Tucker AF, Coling DE, Brown MC, Lu C, Hoffman GR, Goodrich LV. 2007. Changes in Sef levels influence auditory brainstem development and function. *J Neurosci* 27(16):4273-4282.

Arantes C, Nomizo R, Lopes MH, Hajj GN, Lima FR, Martins VR. 2009. Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. *Glia* 57(13):1439-1449.

Bianchi E, Alessandrini C, Guarna M, Tagliamonte A. 1993. Endogenous codeine and morphine are stored in specific brain neurons. *Brain Res* 627(2):210-215.

Bianchi E, Guarna M, Tagliamonte A. 1994. Immunocytochemical localization of endogenous codeine and morphine. *Adv Neuroimmunol* 4(2):83-92.

Boettcher C, Fellermeier M, Boettcher C, Drager B, Zenk MH. 2005. How human neuroblastoma cells make morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(24):8495-8500.

Bourasset F, Cisternino S, Temsamani J, Scherrmann JM. 2003. Evidence for an active transport of morphine-6-beta-d-glucuronide but not P-glycoprotein-mediated at the blood-brain barrier. *J Neurochem* 86(6):1564-1567.

Brands A, Munzel PA, Bock KW. 2000. In situ hybridization studies of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 expression in rat testis and brain. *Biochem Pharmacol* 59(11):1441-1444.

Brix-Christensen V, Goumon Y, Tonnesen E, Chew M, Bilfinger T, Stefano GB. 2000. Endogenous morphine is produced in response to cardiopulmonary bypass in neonatal pigs. *Acta Anaesthesiol Scand* 44(10):1204-1208.

Brix-Christensen V, Tonnesen E, Sanchez RG, Bilfinger TV, Stefano GB. 1997. Endogenous morphine levels increase following cardiac surgery as part of the antiinflammatory response? *Int J Cardiol* 62(3):191-197.

Brumovsky P, Villar MJ, Hokfelt T. 2006. Tyrosine hydroxylase is expressed in a subpopulation of small dorsal root ganglion neurons in the adult mouse. *Exp Neurol* 200(1):153-165.

Charlet A, Muller AH, Laux A, Kemmel V, Schweitzer A, Deloulme JC, Stuber D, Delalande F, Bianchi E, Van Dorselaer A, Aunis D, Andrieux A, Poisbeau P, Goumon Y. 2010. Abnormal nociception and opiate sensitivity of STOP null mice exhibiting elevated levels of the endogenous alkaloid morphine. *Mol Pain* 6(1):96.

Donnerer J, Cardinale G, Coffey J, Lisek CA, Jardine I, Spector S. 1987. Chemical characterization and regulation of endogenous morphine and codeine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 242(2):583-587.

Donnerer J, Oka K, Brossi A, Rice KC, Spector S. 1986.

- Presence and formation of codeine and morphine in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(12):4566-4567.
- Gill SK, Ishak M, Dobransky T, Haroutunian V, Davis KL, Rylett RJ. 2007. 82-kDa choline acetyltransferase is in nuclei of cholinergic neurons in human CNS and altered in aging and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 28(7):1028-1040.
- Gintzler AR, Gershon MD, Spector S. 1978. A nonpeptide morphine-like compound: immunocytochemical localization in the mouse brain. *Science* 199(4327):447-448.
- Glattard E, Welters ID, Lavaux T, Muller A, Laux A, Zhang D, Schmidt AR, Delalande F, Lavantie BJ, Dirrig-Grosch S, Colin D, Van Dorsselaer A, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Schneider F, Goumon Y. 2010. Endogenous Morphine Levels are Increased in Sepsis: a Partial Implication of Neutrophils. *PLoS One* 1(1):e8791.
- Goldstein A, Barrett RW, James IF, Lowney LI, Weitz CJ, Knipmeyer LL, Rapoport H. 1985. Morphine and other opiates from beef brain and adrenal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(15):5203-5207.
- Goumon Y, Laux A, Muller A, Aunis D. 2009. Central and Peripheral Endogenous Morphine. *An R Acad Nac Farm* 75(3):389-418.
- Grobe N, Lamshoft M, Orth RG, Drager B, Kutchan TM, Zenk MH, Spiteller M. 2010. Urinary excretion of morphine and biosynthetic precursors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(18):8147-8152.
- Guarna M, Bianchi E, Bartolini A, Ghelardini C, Galeotti N, Bracci L, Neri C, Sonetti D, Stefano G. 2002. Endogenous morphine modulates acute thermociception in mice. *J Neurochem* 80(2):271-277.
- Guarna M, Ghelardini C, Galeotti N, Bartolini A, Noli L, Neri C, Stefano GB, Bianchi E. 2004. Effects of endogenous morphine deprivation on memory retention of passive avoidance learning in mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 7(3):311-319.
- Guarna M, Ghelardini C, Galeotti N, Stefano GB, Bianchi E. 2005. Neurotransmitter role of endogenous morphine in CNS. *Med Sci Monit* 11(6):RA190-193.
- Hazum E, Sabatka JJ, Chang KJ, Brent DA, Findlay JW, Cuatrecasas P. 1981. Morphine in cow and human milk: could dietary morphine constitute a ligand for specific morphine (μ) receptors? *Science* 213(4511):1010-1012.
- Hedou G, Chasserot-Golaz S, Kemmel V, Gobaille S, Roussel G, Artault JC, Andriamampandry C, Aunis D, Maitre M. 2000. Immunohistochemical studies of the localization of neurons containing the enzyme that synthesizes dopamine, GABA, or gamma-hydroxybutyrate in the rat substantia nigra and striatum. *J Comp Neurol* 426(4):549-560.
- Heinke B, Ruscheweyh R, Forsthuber L, Wunderbaldinger G, Sandkuhler J. 2004. Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurones identified by expression of green fluorescent protein in mice. *J Physiol* 560(Pt 1):249-266.
- Herbert RB, Venter H, Pos S. 2000. Do mammals make their own morphine? *Nat Prod Rep* 17(4):317-322.
- Heurtaux T, Benani A, Moulin D, Muller N, Netter P, Minn A. 2006. Induction of UGT1A6 isoform by inflammatory conditions in rat astrocytes. *Neuropharmacology* 50(3):317-328.
- Hirrlinger J, König J, Dringen R. 2002a. Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. *J Neurochem* 82(3):716-719.
- Hirrlinger J, Moeller H, Kirchhoff F, Dringen R. 2005. Expression of multidrug resistance proteins (Mrps) in astrocytes of the mouse brain: a single cell RT-PCR study. *Neurochem Res* 30(10):1237-1244.
- Hirrlinger J, Schulz JB, Dringen R. 2002b. Glutathione release from cultured brain cells: multidrug resistance protein 1 mediates the release of GSH from rat astroglial cells. *J Neurosci Res* 69(3):318-326.
- Ikeda K, Yanagawa Y, Bekkers JM. 2008. Distinctive quantal properties of neurotransmission at excitatory and inhibitory autapses revealed using variance-mean analysis. *J Neurosci* 28(50):13563-13573.
- Iversen L. 2006. Neurotransmitter transporters and their impact on the development of psychopharmacology. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S82-88.
- Jaeger CB. 1985. Cytoarchitectonics of substantia nigra grafts: a light and electron microscopic study of immunocytochemically identified dopaminergic neurons and fibrous astrocytes. *J Comp Neurol* 231(1):121-135.
- King CD, Rios GR, Assouline JA, Tephly TR. 1999. Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Arch Biochem Biophys* 365(1):156-162.
- Laux A, Muller AH, Mieke M, Dirrig-Grosch S, Deloulme JC, Delalande F, Stuber D, Sage D, Van Dorsselaer A, Poisbeau P, Aunis D, Goumon Y. 2011. Mapping of endogenous morphine-like compounds in the adult mouse brain: Evidence of their localization in astrocytes and GABAergic cells. *J Comp Neurol*.
- Li CH, Chung D. 1976. Isolation and structure of an untriantopeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(4):1145-1148.
- Martin-Ibanez R, Jenstad M, Berghuis P, Edwards RH, Hioki H, Kaneko T, Mulder J, Canals JM, Ernfors P, Chaudhry FA, Harkany T. 2006. Vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3) identifies spatially segregated excitatory terminals in the rat substantia nigra. *Eur J Neurosci* 23(4):1063-1070.
- Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Zadina JE. 1999.

- Differential distribution of endomorphin 1- and endomorphin 2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *J Comp Neurol* 405(4):450-471.
- Matsumoto M, Xie W, Inoue M, Ueda H. 2007. Evidence for the tonic inhibition of spinal pain by nicotinic cholinergic transmission through primary afferents. *Mol Pain* 3:41.
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL. 1996. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383(6603):819-823.
- Meijerink WJ, Molina PE, Abumrad NN. 1999. Mammalian opiate alkaloid synthesis: lessons derived from plant biochemistry. *Shock* 12(3):165-173.
- Mizoguchi H, Tseng LF, Suzuki T, Sora I, Narita M. 2002. Differential mechanism of G-protein activation induced by endogenous mu-opioid peptides, endomorphin and beta-endorphin. *Jpn J Pharmacol* 89(3):229-234.
- Molina PE, Hashiguchi Y, Meijerink WJ, Naukam RJ, Boxer R, Abumrad NN. 1995. Modulation of endogenous opiate production: effect of fasting. *Biochem Biophys Res Commun* 207(1):312-317.
- Muller A, Glattard E, Taleb O, Kemmel V, Laux A, Miehe M, Delalande F, Roussel G, Van Dorsselaer A, Metz-Boutigue MH, Aunis D, Goumon Y. 2008. Endogenous morphine in SH-SY5Y cells and the mouse cerebellum. *PLoS One* 3(2):e1641.
- Nagano E, Yamada H, Oguri K. 2000. Characteristic glucuronidation pattern of physiologic concentration of morphine in rat brain. *Life Sci* 67(20):2453-2464.
- Neri C, Ghelardini C, Sotak B, Palmiter RD, Guarna M, Stefano G, Bianchi E. 2008. Dopamine is necessary to endogenous morphine formation in mammalian brain in vivo. *J Neurochem* 106(6):2337-2344.
- Neri C, Guarna M, Bianchi E, Sonetti D, Matteucci G, Stefano GB. 2004. Endogenous morphine and codeine in the brain of non human primate. *Med Sci Monit* 10(6):MS1-5.
- Pert CB, Pasternak G, Snyder SH. 1973. Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain. *Science* 182(119):1359-1361.
- Pierce TL, Wessendorf MW. 2000. Immunocytochemical mapping of endomorphin-2-immunoreactivity in rat brain. *J Chem Neuroanat* 18(4):181-207.
- Poeknapo C. 2005. Mammalian morphine: de novo formation of morphine in human cells. *Med Sci Monit* 11(5):MS6-17.
- Poeknapo C, Schmidt J, Brandsch M, Drager B, Zenk MH. 2004. Endogenous formation of morphine in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(39):14091-14096.
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T. 1994a. Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 45(2):330-334.
- Raynor K, Kong H, Hines J, Kong G, Benovic J, Yasuda K, Bell GI, Reisine T. 1994b. Molecular mechanisms of agonist-induced desensitization of the cloned mouse kappa opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 270(3):1381-1386.
- Reisine T. 1995. Opiate receptors. *Neuropharmacology* 34(5):463-472.
- Somogyi AA, Barratt DT, Collier JK. 2007. Pharmacogenetics of opioids. *Clin Pharmacol Ther* 81(3):429-444.
- Stefano GB, Goumon Y, Casares F, Cadet P, Fricchione GL, Rialas C, Peter D, Sonetti D, Guarna M, Welters ID, Bianchi E. 2000. Endogenous morphine. *Trends Neurosci* 23(9):436-442.
- Suleman FG, Abid A, Gradinaru D, Daval JL, Magdalou J, Minn A. 1998. Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch Biochem Biophys* 358(1):63-67.
- Toll L, Berzetei-Gurske IP, Polgar WE, Brandt SR, Adapa ID, Rodriguez L, Schwartz RW, Haggart D, O'Brien A, White A, Kennedy JM, Craymer K, Farrington L, Auh JS. 1998. Standard binding and functional assays related to medications development division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications. In: *Monogr. NR*, editor. Menlo Park, CA, USA.: SRI International, p 440-466.
- Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. 2008. Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11(2 Suppl):S133-153.
- Weitz CJ, Faull KF, Goldstein A. 1987. Synthesis of the skeleton of the morphine molecule by mammalian liver. *Nature* 330(6149):674-677.
- Weitz CJ, Lowney LI, Faull KF, Feistner G, Goldstein A. 1986. Morphine and codeine from mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(24):9784-9788.
- Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. 1997. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386(6624):499-502.
- Zhang Y, Pan YX, Kolesnikov Y, Pasternak GW. 2006. Immunohistochemical labeling of the mu opioid receptor carboxy terminal splice variant mMOR-1B4 in the mouse central nervous system. *Brain Res* 1099(1):33-43.
- Zhu W, Bilfinger TV, Baggerman G, Goumon Y, Stefano GB. 2001. Presence of endogenous morphine and morphine 6 glucuronide in human heart tissue. *Int J Mol Med* 7(4):419-422.

Table 1. Table of primary antibodies used

| Antigen | Immunogen | Raised in | Manufacturer data | IHC Dilution |
|----------|---|-------------------|-------------------------------------|--------------|
| Morphine | BSA-morphine conjugate | Mouse monoclonal | Aviva system biology (AVAMM16002-4) | 1:1,000 |
| ChAT | Human placental enzyme | Goat polyclonal | Chemicon-Millipore (AB144P) | 1:250 |
| GFAP | GFAP isolated from cow spinal cord | Rabbit polyclonal | DAKO (Z0334) | 1:1,000 |
| TH | Denatured TH from rat pheochromocytoma | Rabbit polyclonal | Chemicon-Millipore (AB152) | 1:1,000 |
| GABA | BSA-GABA conjugate done with glutaraldehyde | Rabbit polyclonal | Sigma Aldrich (A2052) | 1:500 |
| MAP2 | Purified MAP2 from rat brain | Rabbit polyclonal | Chemicon-Millipore (AB5622) | 1:500 |

Table 1.

Table of primary antibodies used. BSA, bovine serum albumin; ChAT, Choline acetyltransferase; GABA, γ -Aminobutyric acid; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IHC, immunohistochemistry; TH, tyrosine hydroxylase.

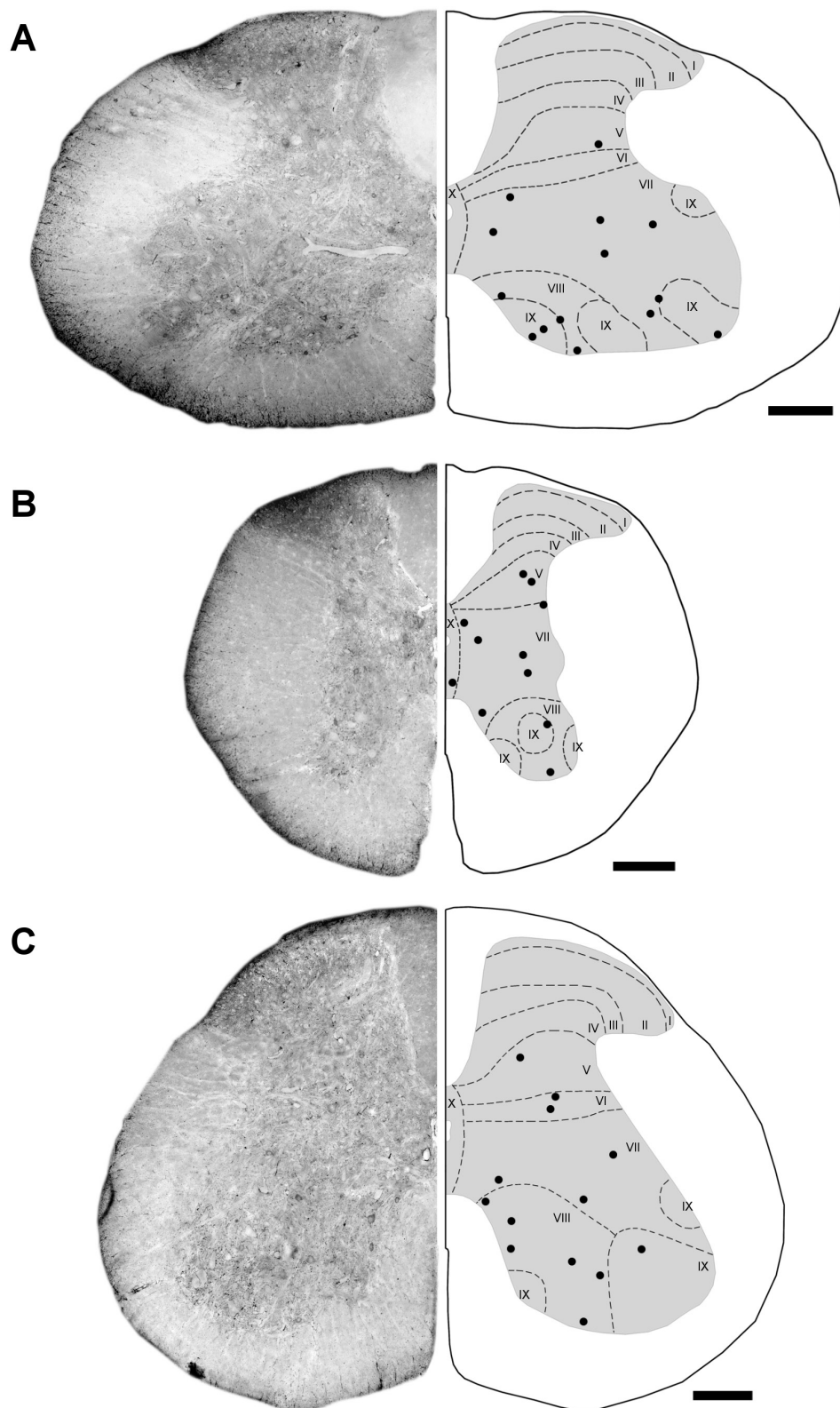


Figure 1.

The distribution of MIR in the cervical (A), thoracic (B), and lumbar (C) spinal cord. The left side contains representative x10 magnification microscopic pictures, whereas the right side shows a schematic of the anatomic representation of the section. The black dots represent labeled neuronal cells observed on the picture presented on the left side. The presented sections are representative of the localization and the number of neuronal cells observed throughout the entire spinal cord (n=4). Laminae are named in roman numerals. Scale bars = 200 μm A-C.

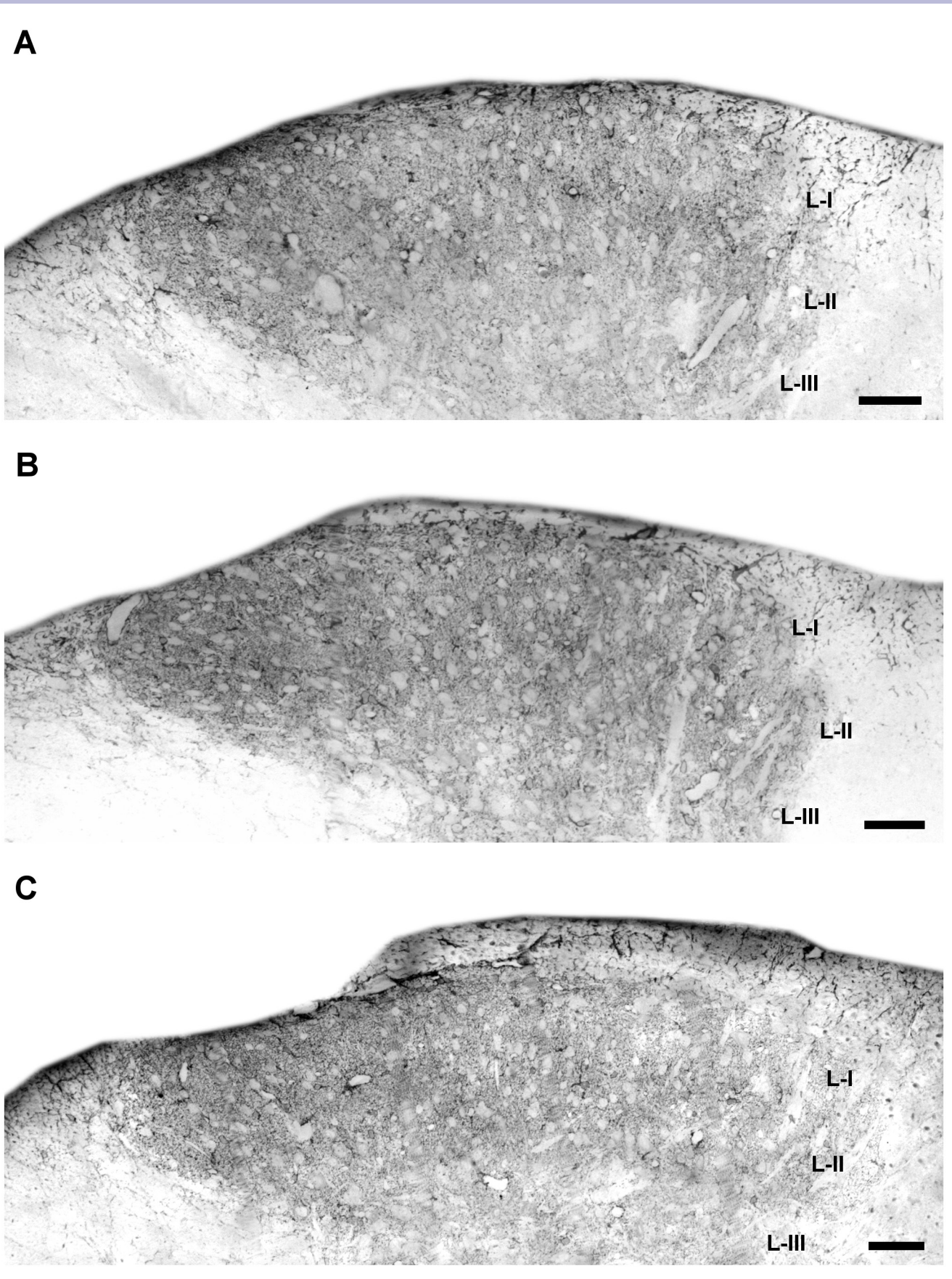


Figure 2.

The distribution of MIR in the dorsal horn at different levels of the adult mouse spinal cord. A: Cervical. B: Thoracic. C: Lumbar. The distribution of MIR was similar between the different levels of the spinal cord; no MIR-positive neurons were present in the superficial laminae of the dorsal horn, whereas MIR was observed in astrocytes and processes. L-I, Lamina I; L-II, Lamina II; L-III, Lamina III. Scale bars = 50 μm A-C

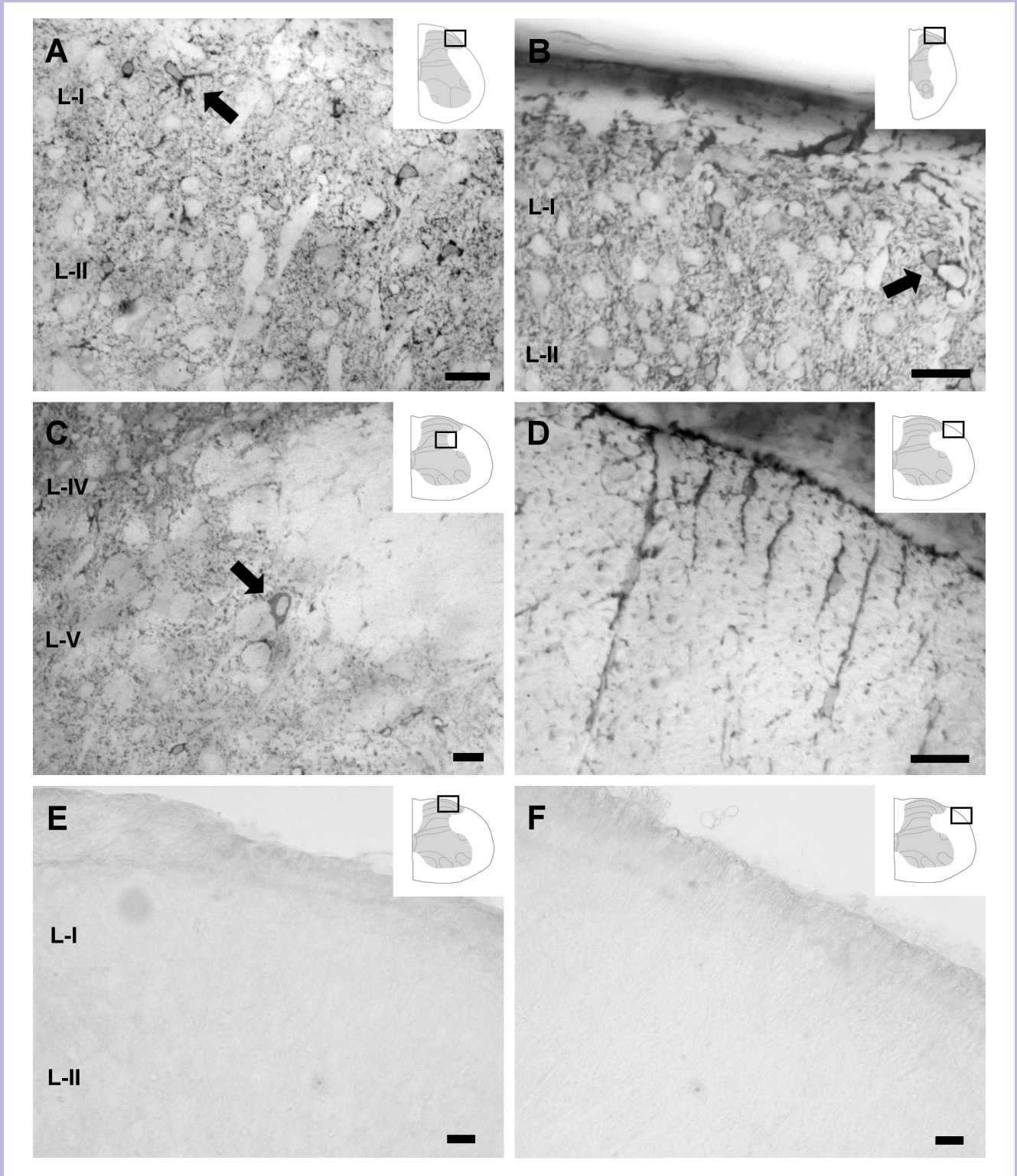


Figure 3.

Higher magnifications of MIR-distribution in the dorsal horn of the adult mouse spinal cord. A: A high magnification of laminae I and II from a lumbar section. B: A high magnification of thoracic laminae I and II. Both pictures in A and B show no MIR in dorsal horn neurons, whereas astrocytes (arrows) show high MIR. C: A labeled neuronal cell (arrow) in the lamina V of a cervical section of adult mouse spinal cord. D: MIR observed in astrocytes was found at the edge of the dorsal white matter of the spinal cord. E-F: No MIR is detected when the 6D6 antibody was pre-adsorbed 1 h with 3 μ M morphine, in the dorsal horn gray matter (E) and in the edge of the white matter (F), confirming the specificity of the labelling (experiment done in parallel with non preadsorbed antibody). On the upper right corner, a schematic representation of a cervical, thoracic or a lumbar spinal cord indicates the localization of the picture by a frame. L-I, Lamina I; L-II, Lamina II; L-III, Lamina III; L-V, Lamina V. Scale bars = 20 μ m A-F.

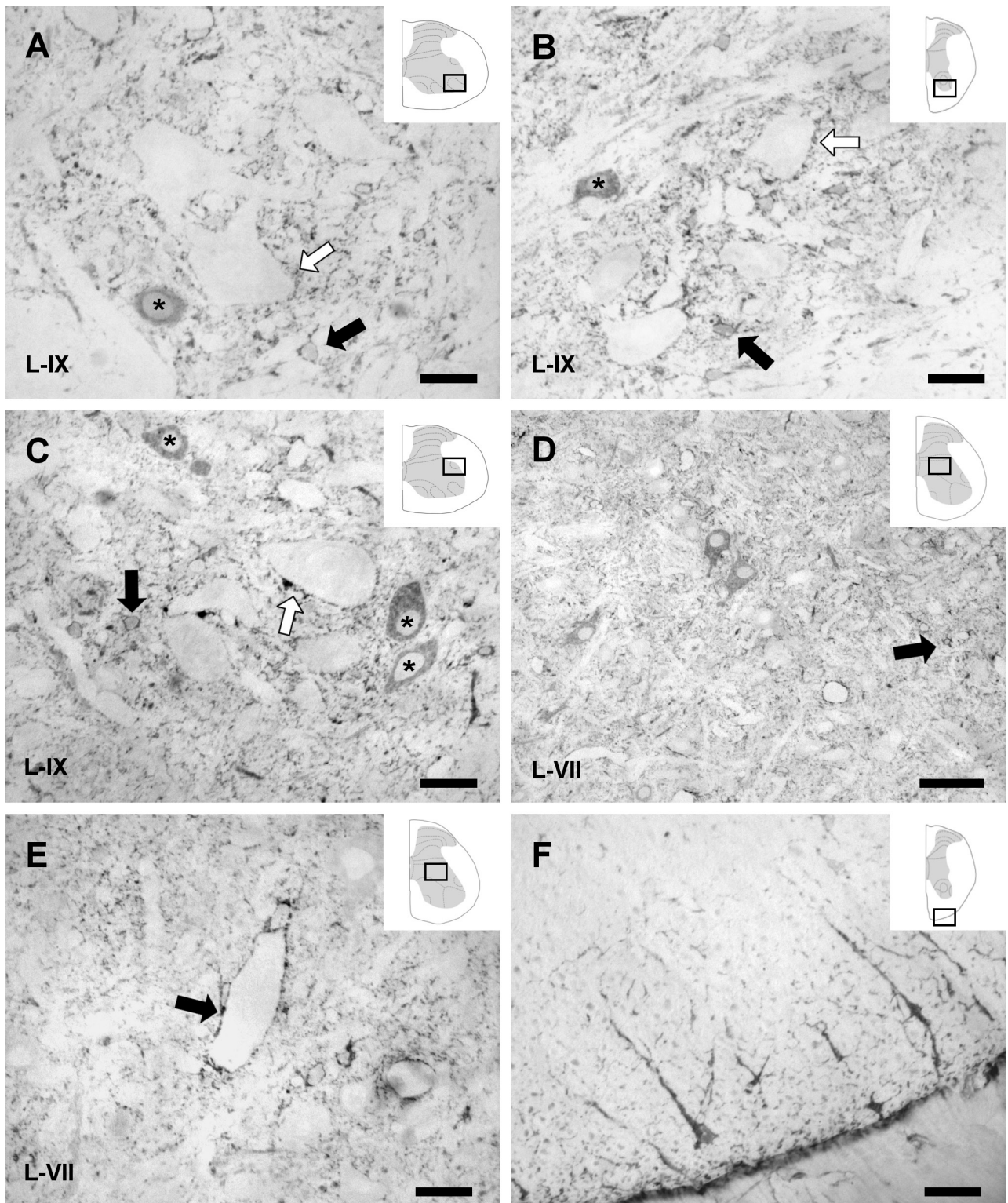


Figure 4.

The distribution of MIR in the ventral horn of the adult mouse spinal cord. A, B: The observation of MIR in the motor neuronal pool present in the lamina IX of a cervical (A) and thoracic (B) section of the spinal cord. *MIR positive neurons. C: MIR present in neurons (asterisk), astrocytes (black arrow) and labeled astrocytic or neuronal processes around the motor neuronal soma (white arrow) in the lateral motor neuronal pool of the cervical spinal cord. D: MIR present in neuronal cells in the lamina VII of lumbar spinal cord section. The arrow shows a MIR astrocyte. E: MIR present in the astrocytic foot around blood vessels (arrow) in the lamina VII of a lumbar section. F: MIR observed in astrocytes present at the edge of the ventral white matter of the spinal cord. In upper right corners, schematic representations of a cervical, thoracic or a lumbar spinal cord displays the localization of the picture by a frame. L-VII, Lamina VII; L-IX, Lamina IX. Scale bars = 20 μm in A-C, E, F; 50 μm in D.

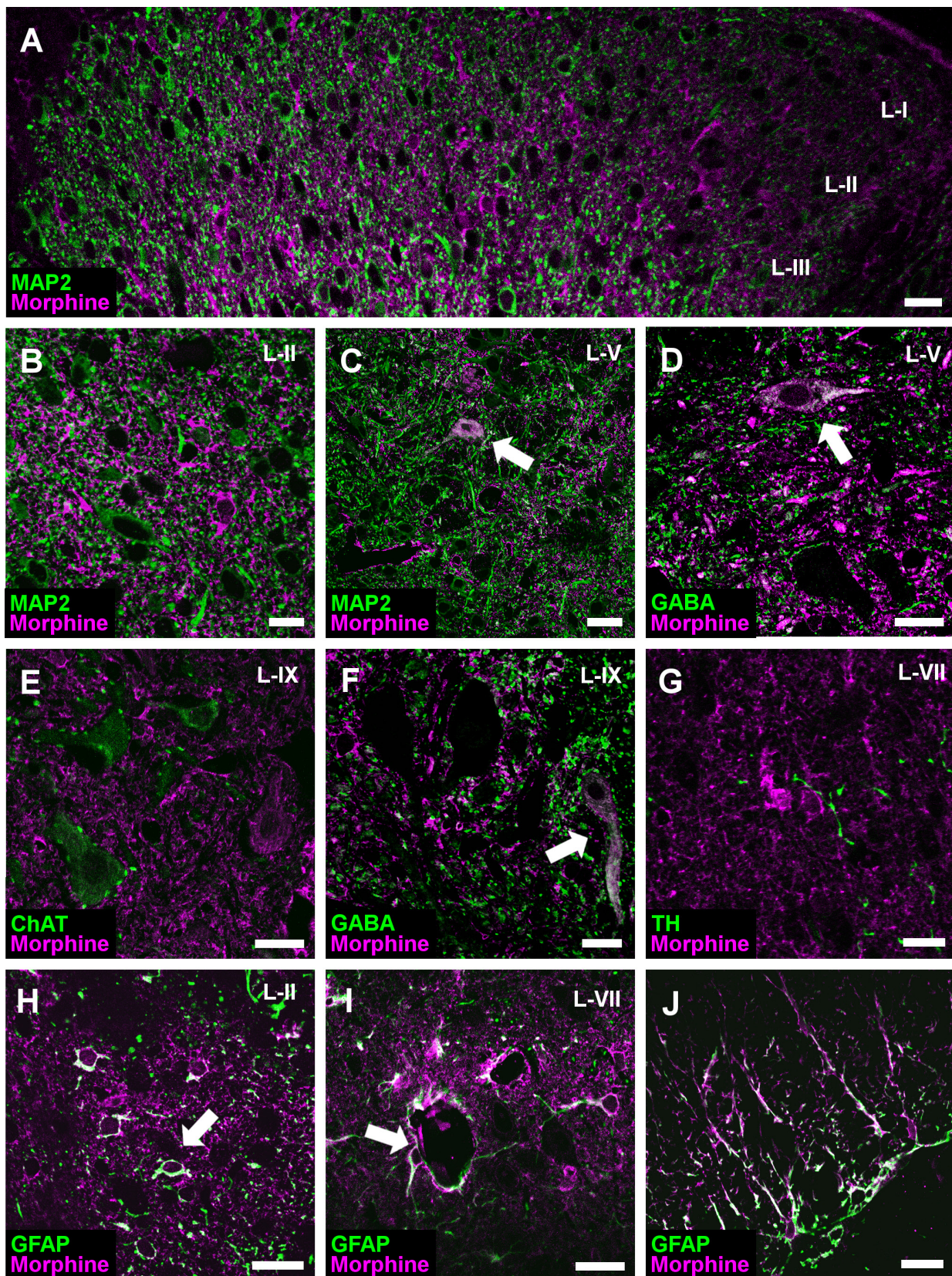


Figure 5.

The characterization of MIR-positive cells in the adult mouse spinal cord by confocal microscopy. A: Co-labelling of MIR (magenta) with MAP2 (green) in the dorsal horn of a cervical section, which was similar for all spinal cords regions. No colocalization between the two markers was observed in either the cells bodies or in the processes, suggesting neurons do not contain morphine-like compounds in the dorsal horn. B: High magnification of a co-labelling of MIR (magenta) and MAP2 (green) in the dorsal horn of a lumbar section. No colocalization was found in neurons present in this spinal cord area. C: Co-labelling of MIR (magenta) with MAP2 (green) in the lamina V of a thoracic section, showing that MIR-positive cells in this lamina correspond

to neurons. The arrows point at a co-labelled cell. D: Co-labelling of MIR (magenta) with GABA (green) in the lamina V of a lumbar section, showing that the MIR-positive neurons in this lamina correspond to GABAergic neurons. E: Co-labelling of MIR (magenta) and ChAT (green) in a motor neuronal pool of lamina IX of a lumbar section, showing that motor neurons (ChAT+) do not contain morphine-like compounds. F: Co-labelling of MIR (magenta) and GABA (green) in a motor neuronal pool of lamina IX of a cervical section, showing that MIR neuronal cells are GABAergic. The arrows point at a double labelled cell. G: Colabeling of MIR (magenta) and TH (green) in lamina VII of the lumbar spinal cord. No MIR was observed in dopaminergic endings. H: Co-labelling of MIR (magenta) and GFAP (green) in lamina II of the thoracic spinal cord, showing the presence of MIR in astrocytes in the dorsal horn. I: Colabeling of MIR (magenta) and GFAP (green) in lamina VII of the cervical spinal cord, demonstrating the presence of MIR in astrocytes and astrocytic feet around blood vessels (arrow; white label). J: Co-labelling of MIR (magenta) and GFAP (green) in the ventral white matter of a lumbar spinal cord section, showing a colocalization of the two markers in astrocytes at the edge of the spinal cord (white label). ChAT, Choline acetyltransferase; GABA, γ -aminobutyric acid; GFAP, glial fibrillary acidic protein; MAP2: microtubule-associated protein 2 ; TH, tyrosine hydroxylase; L-I, Lamina I; L-II, Lamina II; L-III, Lamina III; L-V, Lamina V; L-VII, Lamina VII; L-IX, Lamina IX. Scale bars = 10 μ m in B; 20 μ m in A, C-J.

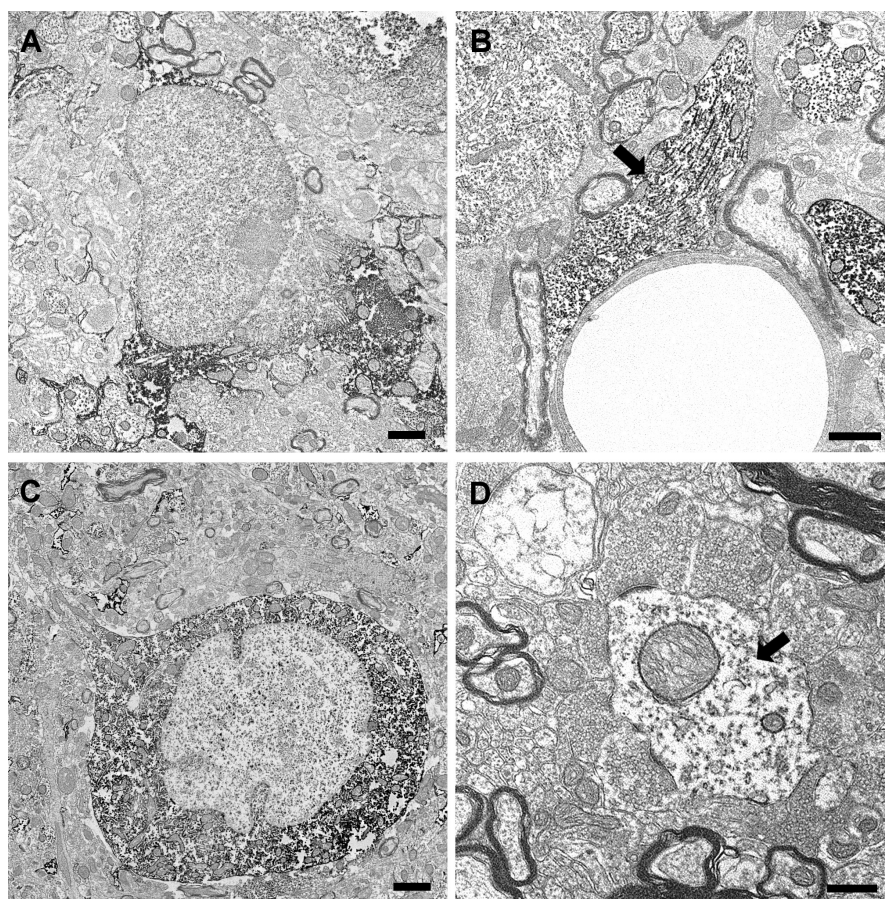


Figure 6.

Electron microscopy micrographs of the MIR present in the gray matter of the adult mouse spinal cord. A: MIR present in an astrocyte of the ventral horn of the cervical spinal cord, recognizable by its bipolar cell body and small soma. B: Label of an astrocytic foot around a blood vessel (arrow). C: MIR-labeled neuronal cell present in the gray matter of the spinal cord. The foiled nucleus and the large round shaped soma correspond to neuron's structural characteristics. D: A MIR dendrite (arrow) recognizable by numerous postsynaptic densities. Presynaptic endings were not labeled in the spinal cord. Scale bars = 1 μ m in A, B; 2 μ m in C; 500 nm in D.

PARTIE 2

Identification de protéines de liaison des alcaloïdes endogènes et exogènes : la PEBP et la Créatine Kinase

I. RÉSUMÉ

I.1. Contexte et question posée

Différentes études décrivent l'existence de protéines non identifiées liant la morphine au sein du SNC (cf. : I. Introduction, I.6, p.22). Cette liaison est qualifiée de forte et même de covalente par certains auteurs puisque dans certains articles celle-ci est résistante à la précipitation et à la dénaturation des protéines (conservation après migration sur gel SDS-PAGE). La présence de protéines différentes des récepteurs aux opioïdes et capables de lier la morphine suggère que la morphine pourrait avoir un mode d'action ou des fonctions différentes de celles précédemment décrites. La morphine pourrait ainsi moduler le(s) rôle(s) de ces protéines ou encore, l'action de la morphine pourrait être elle-même modifiée par son interaction avec ses protéines de liaison. L'absence de morphine endogène et de ses dérivés dans la plupart des terminaisons présynaptiques, ainsi que leur présence dans le cytoplasme des neurones et des astrocytes décrite dans la partie précédente, suggèrent que ceux-ci pourraient avoir un rôle différent de celui de neurotransmetteur ou neuromodulateur postulé jusqu'à présent (Guarna et al., 2005; Kream et al., 2007; Muller et al., 2008).

L'identification de ces protéines, ainsi que l'analyse de leurs caractéristiques de liaison aux alcaloïdes, constitueraient en plus de l'apport fondamental, de nouveaux outils permettant l'étude de la morphine endogène. En effet, la présence de protéines de liaison de forte affinité pourrait expliquer les difficultés de quantification des alcaloïdes endogènes. Une caractérisation de ces liaisons fortes, ainsi que la mise au point de techniques de dissociation pourraient accroître les quantités de morphine endogène libre, et donc détectées. Par ailleurs, ces protéines de liaison pourraient être impliquées dans la synthèse et/ou le catabolisme de la morphine endogène. Une caractérisation de ces protéines pourrait également permettre l'éventuel développement de modèles d'études de la morphine endogène (p. ex. souris génétiquement modifiée).

- ▶ **Quelles sont les protéines de liaison de la morphine au sein du système nerveux central, et quelles sont les caractéristiques de cette liaison ?**

J'ai dans un premier temps participé à une étude (publication 3) dont le but était de déterminer les propriétés de liaison des opiacés à la PEBP (phosphatidylethanolamine binding proteine) qui était décrite pour lier des dérivés de la morphine (cf. : I.Introduction, I.6, p.22). Dans un second temps, nous avons identifié une nouvelle protéine liant à très forte affinité les alcaloïdes endogènes et exogènes dans le cerveau de souris. Cette étude n'est pas totalement finalisée, cependant les résultats obtenus sont présentés sous forme de manuscrit provisoire (publication 4) et ont fait l'objet de trois demandes de dépôt de brevet.

I.2. Approches & Résultats

Cette partie de mon manuscrit décrit mes deux études portant sur les interactions entre les alcaloïdes endogènes et exogènes et deux protéines présentes au sein du SNC.

- ▶ **Publication 3** : La PEBP est une protéine décrite initialement pour lier la phosphatidyléthanolamine (PE), mais également les dérivés de la morphine. En effet, la PEBP est décrite pour reconnaître la β -bromoacetamidomorphine (Grandy et al., 1990), ainsi que la M6G (Goumon et al., 2006). Cependant les propriétés de la liaison des opiacés avec la PEBP restaient inconnues. Afin de caractériser les propriétés de liaison de la PEBP avec la morphine, la M6G et la M3G, une approche de spectrométrie de masse non covalente a été utilisée. Nous avons décrit dans un premier temps que la PEBP purifiée à partir de cerveau de bœuf (bPEBP), ainsi que la PEBP recombinante humaine (hPEBP), sont toutes les deux capables de lier la M6G et la M3G, alors qu'aucune affinité entre la PEBP et la morphine n'a été détectée. Dans un second temps, nous avons décrit que la position du glucuronide (C3 ou C6) sur la morphine n'influence pas les propriétés de liaison avec la PEBP. Nous avons également décrit que la bPEBP et la hPEBP possèdent une affinité identique pour la PE (ligand de référence) pour la M6G et la M3G. Finalement, nous avons observé que la PEBP était capable de lier plus d'une molécule de M6G ou M3G sans entrer en compétition avec la PE. Cette première étude décrit donc une interaction de faible affinité (facilement dissociable) entre la PEBP et les glucuronides de la morphine.
- ▶ **Publication 4** : Lors de ma deuxième étude, nous avons recherché la présence d'une protéine liant à haute affinité les alcaloïdes endogènes dans le SNC de souris. Ainsi, après

avoir déposé des extraits de cerveau de souris sur gel SDS-PAGE (Tampon particulier et sans traitement thermique) et transféré ce gel sur membrane de PVDF, nous avons pu détecter un complexe protéine-morphine d'environ 40-45kDa à l'aide de 6 anticorps anti-morphine différents. Ces premiers résultats démontrent que des alcaloïdes endogènes sont présents de manière liée dans un extrait de cerveau de souris. L'anticorps utilisé (6D6, Aviva Systems Biology) pour le reste de cette publication est le même que celui utilisé pour la cartographie de la morphine endogène et de ses dérivés dans le SNC (cf. : Résultats, partie 1, publication 1 & 2). De plus, ce complexe protéine-alcaloïdes est de haute affinité puisqu'il est résistant à la migration sur gel SDS-PAGE et à un traitement thermique en présence de détergents et d'agents dénaturants. Cependant, un traitement thermique (10mins à 100°C) dans un tampon contenant de l'urée provoque une dissociation de ce complexe (l'urée étant souvent utilisée comme agent chaotrope pour la dissociation de complexes protéiques).

Dans un second temps, afin d'identifier la protéine liant les alcaloïdes endogènes, un gel bidimensionnel a été réalisé avec des extraits de cerveau de souris. Le complexe immunoréactif a été identifié comme contenant la créatine kinase de type B (CK-B). Nous avons également décrit qu'il n'existait pas de cross-réactivité entre la CK et l'anticorps anti-morphine. L'utilisation de la créatine kinase active commerciale purifiée à partir de cerveau humain (CK-B) ou à partir de muscle de lapin (CK-M), indique la présence de ce complexe même dans les lots commerciaux. En effet, afin de préserver l'activité de la CK, une purification douce est nécessaire. Etant donné la forte affinité du complexe CK-alcaloïdes endogènes, il n'est pas étonnant d'observer la présence d'alcaloïdes endogènes liés. L'utilisation d'anticorps dirigés contre la partie N-ter ou C-ter de la CK a montré une augmentation de l'immunoréactivité pour la CK avec l'anticorps C-ter après dissociation des alcaloïdes endogènes (urée, 10mins à 100°C), tandis que l'immunoréactivité pour la partie N-ter n'est pas affectée. Ces résultats suggèrent que les alcaloïdes endogènes seraient liés au niveau de la partie C-ter de la CK, que ce soit la CK-B de souris, humaine, ou la CK-M de lapin.

Nous avons ensuite montré qu'il était possible de dissocier/réassocier ce complexe en conditions douces : **(i)** Le lithium, un agent chaotrope, est capable de dissocier le complexe CK-alcaloïdes de manière dose dépendante. **(ii)** L'héparinate de lithium (LH) est également capable de dissocier ce complexe, alors que l'héparine seule n'induit aucune dissociation. **(iii)** Il est également possible d'associer des alcaloïdes exogènes à la CK.

Cette association nécessite la présence de LH ou de lithium. **(iv)** Finalement, la présence nécessaire à la réassociation de lithium et de LH suggère que d'autres molécules endogènes seraient liées à la CK (p. ex., dopamine). En effet, ces agents chaotropes permettraient de dissocier ces molécules endogènes et ainsi, à davantage de morphine de se lier à la CK (d'où l'augmentation de l'immunoréactivité pour la morphine et ses dérivés endogènes).

Finalement, nous avons cherché à identifier la portion de la CK responsable de la liaison aux alcaloïdes. Pour cela, nous avons déposé le résultat d'une digestion de la CK-M de lapin à la trypsine sur gel bidimensionnel. Nous avons identifié plusieurs fragments restant immunoréactifs à la morphine et ses dérivés, montrant ainsi que ces fragments étaient encore liés aux alcaloïdes endogènes. Ces fragments (entre 2 et 5 kDa) ont été analysés par spectrométrie de masse et possèdent le même motif peptidique C-ter. Ces résultats suggèrent qu'une portion plus petite de la CK, située dans sa partie C-ter, est capable de lier à haute affinité la morphine ou ses dérivés.

A l'heure actuelle, deux aspects de cette étude restent à finaliser : **(i)** identifier par spectrométrie de masse l'alcaloïde endogène lié, **(ii)** déterminer si un peptide, contenant le motif liant les alcaloïdes, possède toujours une affinité et une spécificité de cette liaison pour la morphine et ses dérivés et **(iii)** rechercher si ce complexe est existant *in situ* ou s'il résulte de l'homogénéisation des tissus.

1.3. Conclusions

Les résultats présentés dans cette partie de mes travaux engendrent de nouvelles pistes de recherche concernant les rôles ou les modes d'action de la morphine/alcaloïdes endogènes au sein du SNC. En effet, nous avons dans un premier temps décrit les propriétés d'une liaison de faible affinité entre les alcaloïdes et la PEBP et j'ai dans un second temps décrit l'existence d'un complexe de haute affinité entre la CK et les alcaloïdes endogènes qui est dissocié par le lithium. Les nouvelles hypothèses de recherche concernant les alcaloïdes endogènes apportées par ces résultats sont, entre autres : **(i)** la présence de complexes de faible affinité et d'autres de très haute affinité suggère que ces deux types de liaison n'ont pas le même but physiologique. **(ii)** Les actions de la morphine ou de ses dérivés endogènes et/ou exogènes pourraient être modulées par la liaison à ces protéines. **(iii)** La biodisponibilité, la synthèse et le métabolisme des alcaloïdes pourraient également être modulés par la liaison à ces protéines. Enfin, **(iv)** la liaison des alcaloïdes à ces protéines permettrait de moduler l'activité de celles-ci et, en particulier, l'activité enzymatique de la CK.

La mise en évidence de ces protéines de liaison et la caractérisation d'un peptide de liaison ouvrent des perspectives d'applications/utilisations thérapeutiques et biotechnologiques. Celles-ci ont été détaillées dans la partie « perspectives » de ce manuscrit et font l'objet de deux brevets :

- ▶ **Brevet n°1** : Goumon Y., Laux-Biehlmann A., Stuber D. – PATENT N°, BIP209236FR01 : « Utilisation de la créatine kinase pour la prévention ou le traitement d'une addiction ».
- ▶ **Brevet n°2** : En cours de dépôt : Goumon Y., Laux-Biehlmann A., Stuber D., Gräfe N. – D.I. N° 04170-02 : « Utilisation du lithium et de ses dérivés pour la dissociation des complexes créatine kinase-alcaloïde et protéines inconnues-alcaloïdes à des fins thérapeutiques ».

II. PUBLICATION 3

CHARACTERIZATION OF HUMAN AND BOVINE
PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE-BINDING PROTEIN (PEBP/
RKIP) INTERACTIONS WITH MORPHINE AND
MORPHINE-GLUCURONIDES DETERMINED BY NONCOVALENT
MASS SPECTROMETRY

Atmanene C., **Laux A.**, Glattard E., Muller A., Schoentgen F., Metz-
Boutigue MH., Aunis D., Van Dorsselaer A., Stefano GB., Sanglier-
Cianférani S., Goumon Y.

Medical Science Monitor
Juillet 2009;15(7):BR178-87.

Received: 2009.02.20
Accepted: 2009.04.27
Published: 2009.07.01

Characterization of human and bovine phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP) interactions with morphine and morphine-glucuronides determined by noncovalent mass spectrometry

Cédric Atmanene^{1ABCEFG}, Alexis Laux^{2ABE}, Elise Glattard^{2AB},
Arnaud Muller^{2AB}, Françoise Schoentgen^{3ADEFF}, Marie-Hélène Metz-Boutigue^{2EEFG},
Dominique Aunis^{2EEFG}, Alain Van Dorsselaer^{1EG}, George B. Stefano^{4DEE},
Sarah Sanglier-Cianféran^{1ABCEFG}, Yannick Goumon^{2ABCEDEFG}

Authors' Contribution:

- A** Study Design
- B** Data Collection
- C** Statistical Analysis
- D** Data Interpretation
- E** Manuscript Preparation
- F** Literature Search
- G** Funds Collection

¹ Laboratoire de Spectrométrie de Masse, BioOrganique (LSMBO), IPHC-DSA, University of Strasbourg UDS, CNRS UMR7178, Strasbourg, France

² Inserm, Physiopathology of the Nervous System, Strasbourg, France

³ University Pierre and Marie Curie-Paris 6, IMPMC, Paris, France

⁴ Neuroscience Research Institute, State University of New York – College at Old Westbury, Old Westbury, NY, U.S.A.

Source of support: This work was funded by Inserm, CNRS, the University of Strasbourg, the Fondation de France (to Y.G.), the French Ministère délégué à la Recherche et à l'Enseignement Supérieur (Ph.D fellowship to C.A., E.A., A.M. and A.L.), the Fondation Transplantation (to Y.G.) and the Fondation pour la Recherche Médicale (to Y.G.), the Ligue contre le cancer (to F.S.) and the Cancéropôle du Grand Ouest (to F.S.)

| | |
|--------------------------|---|
| Background: | Summary The phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP), initially found to bind phosphatidylethanolamine (PE), has been shown to be associated with morphine derivatives. Our recent study on bovine primary chromaffin cells showed that inside secretory granules, PEBP is noncovalently associated to endogenous morphine-6-glucuronide (M6G), a highly analgesic morphine metabolite. During stress, M6G-PEBP complexes may be released into circulation to target peripheral opioid receptors. We now report the investigation of PEBP binding properties towards morphine and morphine analogs. |
| Material/Methods: | Noncovalent electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was used to investigate bovine and human PEBP binding properties towards morphine and morphine-glucuronides. |
| Results: | We describe for the first time that: (i) PEBP directly interacts with morphine glucuronides (M3G and M6G) but not with morphine, (ii) that the presence of a glucuronide group either on the 3 rd or the 6 th morphine's carbon does not affect these interactions, (iii) that M6G binds PEBP in a similar manner as the reference ligand PE and (iv) that PEBP displays a similar affinity for PE, M6G and M3G. |
| Conclusions: | Our results suggest that PEBP might protect M6G following its secretion into blood, leading to a longer half life. This study highlights the potentialities of ESI-MS to validate / invalidate the formation of protein: ligand noncovalent complexes when low affinity binders (<i>i.e.</i> , compounds with affinities lower than 10 ³ M ⁻¹) are concerned. |
| key words: | morphine-6-glucuronide • morphine-3-glucuronide • morphine • phosphatidylethanolamine-binding protein • Raf-1 kinase inhibitor protein • noncovalent mass spectrometry • protein-ligand interactions |
| Full-text PDF: | http://www.medscimonit.com/fulltxt.php?CID=869702 |
| Word count: | 4363 |
| Tables: | – |
| Figures: | 5 |
| References: | 80 |
| Author's address: | Yannick Goumon, Inserm U575; 5, rue Blaise Pascal. F-67084 Strasbourg Cedex, France, e-mail: yannick.goumon@inserm.u-strasbg.fr |

BACKGROUND

Morphine (Figure 1A) is one of the 40 alkaloids present in opium from the plant *Papaver somniferum*, and is one of the strongest analgesic compounds [1]. Morphine has been characterized in numerous mammalian cells and tissues, its structure being identical to morphine from poppy (for review see [2–6]). A recent study performed on the human catecholaminergic neuroblastoma cell line SH-SY5Y and on the mouse brain model concluded that endogenous alkaloids may be involved in neurotransmission [7,8] via their binding to μ opioid receptor [9]. In addition, it has recently been reported that morphine-6-glucuronide (M6G), previously considered as a product of morphine catabolism, is present in the secretory granules and released by stimulated chromaffin cells from bovine adrenal medulla [10–12]. In these cells, morphine was not detected indicating an almost total conversion of morphine into M6G. Moreover, no trace of morphine-3-glucuronide (M3G) was detected suggesting that the enzymatic process leading to M6G is different from that of the liver. Interestingly, M6G was found to be associated noncovalently to intragranular phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP or Raf-1 kinase inhibitor protein) [13], a protein previously described to bind morphine derivatives [14]. M6G (Figure 1C), as well as morphine-3-glucuronide (M3G, Figure 1D), corresponds to liver catabolism products of morphine (Figure 1A). While M3G has no analgesic effect, M6G displays a stronger analgesic activity than morphine [15,16] with fewer side effects [16].

The PEBP/RKIP [17,18], initially described to bind phosphatidylethanolamine (PE, Figure 1B), belongs to a highly conserved group of ubiquitous proteins found in a variety of tissues from a wide range of organisms (bacteria, yeasts, insects, mammals and plants). PEBP corresponds to a 21kDa protein originally purified as a cytosolic protein from bovine brain [17] and later found to be associated with plasma or reticulum membranes [19]. Several reports have also described the presence of PEBP immunoreactivity in biological fluids [20] and secretions [13]. Numerous functions have been proposed for PEBP (for review see [21]), including intracellular inhibition of MAP kinase (leading to its alternative name, Raf-1 kinase inhibitor protein or RKIP) [22]. In humans, cytoplasmic PEBP/RKIP is implicated in cancers

and has been proposed as a metastasis suppressor and a cell sensitizer to chemotherapy and immunotherapy [23,24]. Human PEBP/RKIP may also be involved in Alzheimer disease [25], infertility, and diabetes [21]. Its implication as a carrier protein may also be one of its function.

Crystals of both human and bovine PEBP [26,27] have shown a structure consisting of a large central β -sheet flanked by a smaller one on one side, and by an α -helix on the other side. Along this protein family, sequence alignments show a conserved central region, D-P-D-x-P-x(11)-H-x(28,30)-H-R, which forms a consensus signature for the PEBP family [27]. This region is suspected to form part of a ligand-binding site, which can accommodate various anionic groups. Thus, in addition to PE, PEBP displays also an affinity for nucleotides (GTP or GDP), small GTP-binding proteins [28] and morphine derivatives [14].

Since the early 1990's, electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) [29] has been successfully used to develop so-called noncovalent mass spectrometry approaches [30,31] to study supramolecular assemblies of biomolecules (for review see [32–35]). This soft ionization technique allows weakly bound partners to be transferred intact from solution to the gas phase [36]. Their subsequent mass measurement allows valuable information to be obtained, such as determination of binding stoichiometries [37,38], binding specificities [39,40] and relative binding affinities [38].

The present study reports the ESI-MS characterization of PEBP binding properties towards morphine and morphine-glucuronides. Titration and competition experiments were carried out in order to characterize bovine and human PEBP behaviours towards morphine, M6G and M3G. Binding specificities and relative affinities are discussed and compared to PE binding properties.

MATERIAL AND METHODS

Protein purification

Native bovine PEBP – Bovine PEBP (bPEBP) was prepared from calf brains obtained within 2 h after death from the

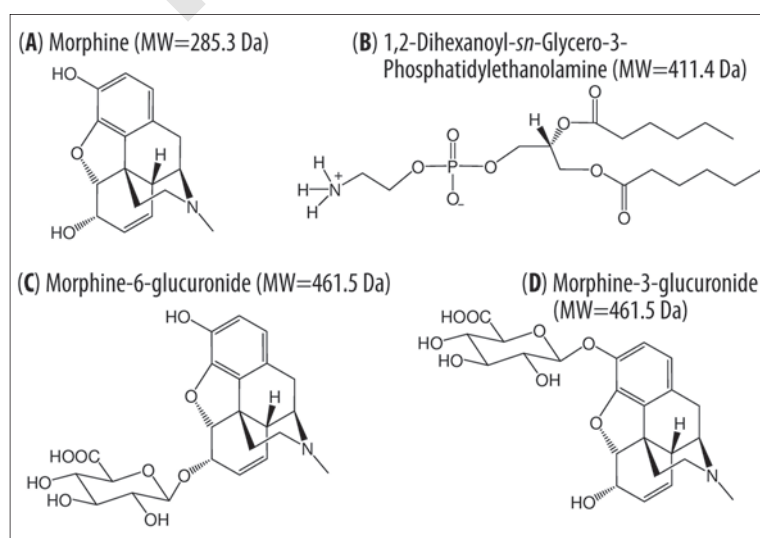


Figure 1. Chemical structure of (A) morphine, (B) 1,2-Dihexanoyl-*sn*-Glycero-3-phosphatidylethanolamine, (C) morphine-6-glucuronide and (D) morphine-3-glucuronide.

slaughterhouse. Purification was performed as previously described [41,42]. The purified protein was dialyzed at 4°C against water containing 2 mM β -mercapoethanol, lyophilized and stored at -20°C. After solubilization in the appropriate buffer, bPEBP purity was checked by mass spectrometry and concentration was determined by automatic Edman degradation on an Applied Biosystems 473A sequencer (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Boston, USA) and Bradford assay.

Cloning, over expression and purification of human PEBP- Poly-A+ mRNA, from human oligodendrocytes grown on dishes (5×10^6 cells), was extracted using QIAGEN's Oligotex direct mRNA Mini kit. Purified Poly-A+ mRNA was then submitted to Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) by use of TITAN one tube RT-PCR system (Roche, Meylan, France). Human PEBP (hPEBP) was produced without any tag to be comparable with natural bovine PEBP. The forward primer was:

5'-ATATCATATGCCGGTGGACCTCAGCAAGTGGT-3', including a *Nde*I restriction site (underlined) at the 3' end of the ORF. The reverse primer was:

5'-TATACTCGAGCTACTTCCCAGACAGCTGCTCATACAGTTT-3' including a *Xho*I restriction site at the 3' end of the ORF (underlined). The following PCR protocol was used: initial denaturation, 60°C 30 min, 94°C 2 min; annealing and elongation, 94°C 30 s, 64°C 30 s, 68°C 2 min, 30 cycles; prolonged elongation, 68°C 7 min. The PCR product was cloned into plasmid pET 31b(+) (Novagen, Merck Chemicals, Nottingham, UK) using *Nde*I and *Xho*I restriction endonucleases (New England Biolabs, Herts. UK) and T4 DNA ligase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Competent *E. coli* BL21 (DE3) cells (Novagen) were transformed with pET31b(+) containing hPEBP insert.

For over-expression of hPEBP, 1 L of LB medium was inoculated with a 15 mL overnight culture of *E. coli* BL21 (pET31b-hPEBP) cells and incubated at 30°C with shaking until OD₆₀₀ reached 0.7; then IPTG was added to a final concentration of 1 mM to induce expression of hPEBP. After further incubation at 30°C for 150 min, the cells were pelleted by centrifugation at 4000 g for 5 min at 4°C and then frozen at -20°C. The frozen cell pellet was thawed in 30 mL ice-cold QAE buffer (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaN₃ 0.05%). The suspension was sonicated and centrifuged. The supernatant was directly loaded on a QAE Sephadex A-50 column. The hPEBP purification was then performed, according to the protocol described for natural bPEBP, *i.e.*, three purification steps were performed: QAE Sephadex A-50 chromatography, isoelectrofocusing and Blue-Sepharose chromatography [41]. The sequence of the purified protein was verified by mass spectrometry and N-terminal Edman microsequencing. About 10 mg of purified hPEBP were obtained from 1 L of LB medium inoculated with *E. coli* BL21 (pET31b-hPEBP) cells.

Purity and integrity of both human recombinant and natural bovine proteins were checked, using protein sequencing, Western blot and ESI-MS analysis.

N-terminal sequence analysis

The sequence of purified bPEBP and hPEBP were determined by automatic Edman degradation on an Applied

Biosystems 473A sequencer (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Carlsbad, USA). Samples purified by HPLC were loaded on polybrene-treated and precycled glass-fiber filters [43]. Phenylthiohydantoin-amino acids (Pth-Xaa) were identified by online HPLC on a C18 column (PTH C18, 2.1×200 mm). Protein sequencing confirmed the N-terminal sequence to be PVDLSKWSGPLS and PVDLSKWSGPLSLQ for natural bPEBP and recombinant hPEBP, respectively.

Western blot analysis

Proteins were separated on SDS-PAGE containing 15% acrylamide [44]. Intragranular matrix proteins from bovine chromaffin cells were used as a control [13]. Proteins were electrotransferred [45] (45 min, 75 V) onto polyvinylidene difluorene membrane (PVDF; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and immunodetected with specific affinity repurified [11] rabbit polyclonal antibodies raised against the HCNP (bovine and human PEBP₁₋₁₁; dilution 1:3,000). Western blot analysis allowed us to evaluate an apparent molecular weight (MW) of 21 kDa for both natural bPEBP and recombinant hPEBP.

Alkaloids, and phosphatidylethanolamine preparation

Morphine, M6G and M3G (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were dissolved in Milli-Q water in order to obtain initial stock concentrations of 15 mM, 10.8 mM and 8.65 mM. The 1,2-Dihexanoyl-*sn*-Glycerol-3-Phosphatidylethanolamine (PE; Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) was first dissolved in ethanol and then diluted in Milli-Q water to reach a PE concentration of 4.8 mM in a 9:1 water/ethanol mixture (v/v).

Electrospray ionization mass spectrometry

Prior to ESI-MS experiments, natural bPEBP and recombinant hPEBP were desalted using gel filtration (NAP-5, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) and concentrated with microconcentrators (Centricon 10 kD, Amicon, Millipore, Molsheim, France) in a 50 mM ammonium acetate buffer (pH 6.8).

ESI-MS measurements were performed on an electrospray time-of-flight mass spectrometer (LCT, Waters, Manchester, UK) equipped with a standard Z-spray source and a Speedi valve that allows the pressure in the first pumping stage of the mass spectrometer to be modulated. Calibration was performed with the multiply charged ions produced by a horse heart myoglobin solution diluted to 2 μ M in a 1:1 water/acetonitrile mixture (v/v) acidified with 1% (v/v) formic acid. Samples were continuously infused into the ESI ion source at a flow rate of 6 μ l / min through a Harvard syringe pump. Spectra were acquired in the positive ion mode on the mass range m/z 500–5000.

In order to preserve noncovalent interactions during the ionization/desorption process, instrumental settings were carefully tuned. For that, the accelerating voltage applied on the sample cone (V_c) and the pressure in the first pumping stage of the instrument (P_i) were adjusted with a particular attention as described elsewhere [36]. These parameters control the energy transferred to the ions into the mass spectrometer and must therefore be optimized in order to

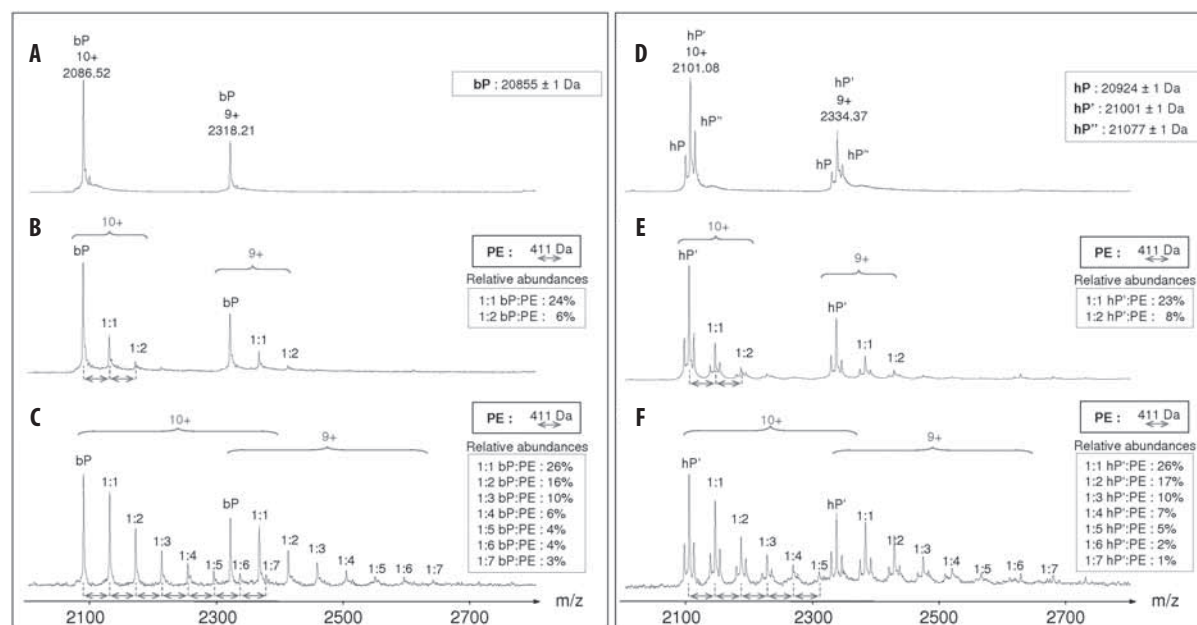


Figure 2. Titration experiments of PEBP with PE. Natural bPEBP (15 μM) was analyzed either (A) alone or in presence of (B) 75 μM PE and (C) 300 μM PE. Recombinant hPEBP (15 μM) was analyzed either (D) alone or in presence of (E) 75 μM PE and (F) 300 μM PE. ESI mass spectra were acquired in non-denaturing conditions (50 mM ammonium acetate pH 6.8; $V_c=40$ V; $P_i=6.1$ mbar). bP, hP, hP' and hP'' are related to bPEBP, hPEBP, hPEBP+1 β -mercaptoethanol and hPEBP + 2 β -mercaptoethanol, respectively. Protein: ligand binding stoichiometries are indicated over each peak.

avoid complex dissociation into the gas phase, while ensuring optimal ion desolvation and transmission. Here, V_c and P_i were respectively set to 40 V and 6.1 mbar, unless mentioned otherwise. In addition, assuming that free protein and protein: ligand complexes display the same ionization efficiency, we evaluate the relative abundance of the different species present on ESI mass spectra based on their relative peak heights. This assumption can be justified by the fact that ligands molecular weight represent only 2% of proteins molecular weight and, for this reason, protein ionization efficiency may not be influenced upon ligand binding [46]. Moreover, only the most abundant charge states, *i.e.* the 9+ and 10+ protonation states, were considered to evaluate relative abundances. The reproducibility of abundances evaluation was estimated to be within ± 2 –3%. Data interpretation was realized MassLynx 4.0 (Waters, Manchester, UK) and deconvoluted mass spectra were obtained using the MaxEnt 1 algorithm from MassLynx 4.0.

ESI-MS analyses in denaturing conditions

First, purity and homogeneity of both bPEBP and hPEBP were checked by working under denaturing conditions. Proteins were diluted to 5 μM in a 1:1 water/acetonitrile mixture (v/v) acidified with 1% (v/v) formic acid. Under denaturing conditions, natural bPEBP gives rise to the detection of a single ion distribution with a molecular weight (MW) of 20854.2 ± 0.1 Da in good agreement with the MW calculated from the amino acid sequence after cleavage of the N-terminal methionine (bP: 20854.5 Da; data not shown). For recombinant hPEBP, ESI-MS analysis in denaturing conditions revealed the presence of three species with MWs of 20925.3 ± 0.3 Da, 21001.4 ± 0.3 Da and 21077.3 ± 0.3 Da (data not shown), corresponding respectively to the theoretical

MWs deduced from the amino acid sequence after cleavage of the N-terminal methionine (hP: 20925.5 Da), and fixation of one β -mercaptoethanol molecule (hP': 21001.6 Da) or two β -mercaptoethanol molecules (hP'': 21077.7 Da). For clarity, results related to hPEBP will only be described for its most abundant form (hPEBP + 1 β -mercaptoethanol molecule).

ESI-MS analyses in non-denaturing conditions

Analyses under non-denaturing conditions were carried out in a 50 mM ammonium acetate buffer (pH 6.8). For all experiments in non-denaturing conditions, a fixed concentration of protein (15 μM) and variable amounts of ligand were incubated for 1 h at 37°C before analysis. In order to compare the affinity of PEBP for both PE and morphine-glucuronides, direct competition experiments were performed by adding bPEBP or hPEBP (15 μM) in an equimolar mixture of PE (150 μM) and either M6G or M3G (150 μM). Again, ESI-MS analyses were performed after a 1 h incubation period at 37°C.

RESULTS

PEBP binds PE in a non-specific manner

Since PEBP has been demonstrated to bind phosphatidylethanolamine [47], ESI-MS experiments under non-denaturing conditions were performed with PE as a reference ligand. In order to determine the binding stoichiometry of PEBP: PE complexes and to assess their specificity, titration experiments were carried out by diluting the protein in the ammonium acetate buffer (pH 6.8), containing increasing amounts of PE. Under these conditions,

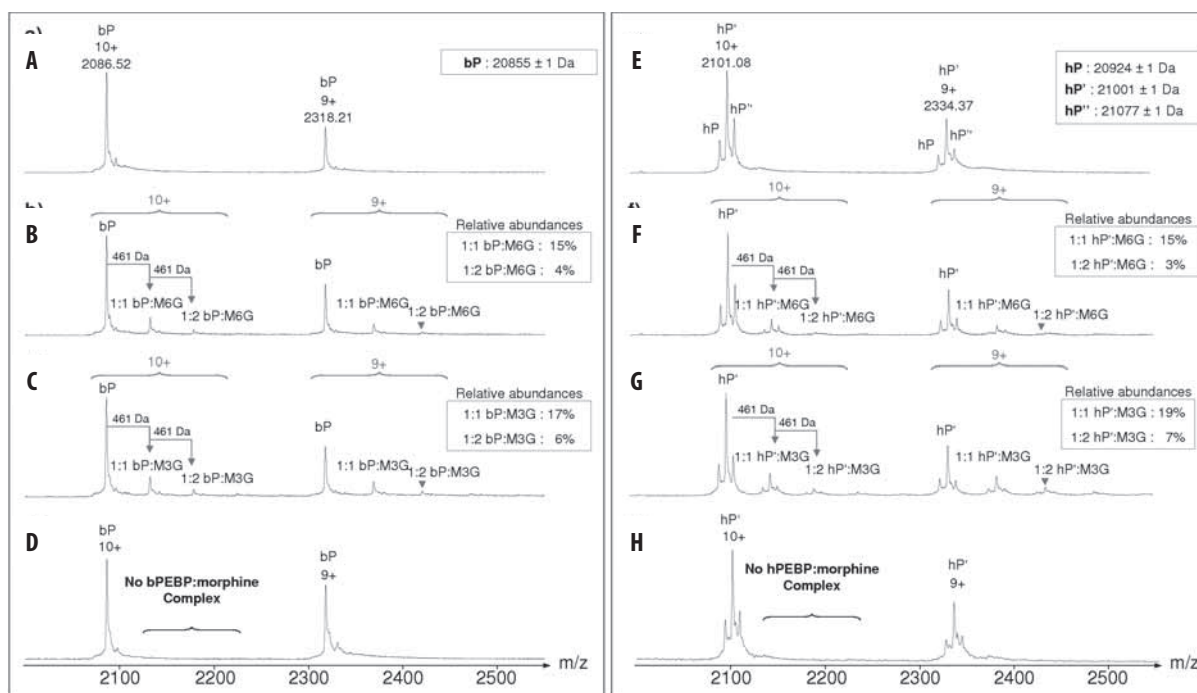


Figure 3. Determination of PEBP binding properties towards morphine and morphine glucuronides. Natural bPEBP (15 μM) was analyzed either (A) alone or in presence of (B) 75 μM M6G, (C) 75 μM M3G and (D) 75 μM Morphine. Recombinant hPEBP (15 μM) was analyzed either (E) alone or in presence of (F) 75 μM M6G, (G) 75 μM M3G and (H) 75 μM Morphine. ESI mass spectra were acquired in non-denaturing conditions (50 mM ammonium acetate pH 6.8; $V_c=40$ V; $P_i=6.1$ mbar). bP, hP, hP' and hP'' are related to bPEBP, hPEBP, hPEBP+1 β-mercaptoethanol and hPEBP + 2 β-mercaptoethanol, respectively. Protein: ligand binding stoichiometries are indicated over each peak.

bovine (b) and human (h) PEBP alone appear to be monomeric (measured molecular weights: 20855±1 Da for bPEBP and 21001±1 Da for hPEBP + 1 β-mercaptoethanol molecule; Figure 2A,D). For clarity, results related to hPEBP will only be described for its most abundant form hP' corresponding to hPEBP + 1 β-mercaptoethanol molecule, with a narrow charge state distribution ranging from 9+ to 10+ observed in the mass range m/z 2000–2500 (Figure 2A,D). When bPEBP is incubated in presence of five molar excess of PE (Figure 2B), three different species are detected and can be assigned to unbound bPEBP, 1:1 and 1:2 bPEBP: PE complexes according to their measured molecular weights (*i.e.*, 20855±1 Da, 21266±1 Da and 21678±1 Da, respectively). When a twenty-fold molar excess of PE is added (Figure 2C), up to eight ion distributions are observed, demonstrating the simultaneous coexistence of unbound protein and bPEBP: PE complexes containing up to seven PE molecules per bPEBP molecule. Unbound bPEBP and 1:1 bPEBP: PE complexes represent, respectively, 31% and 26% of the signal, whereas relative abundances of higher order bPEBP: PE complexes statistically decrease from 16% (1:2) to 3% (1:7). This statistical complex formation indicates that the binding of PE to bPEBP occurs at least partially in a non-specific manner.

An identical approach was used for hPEBP. Figure 2D–F shows that PE indifferently binds to the different forms of hPEBP, leading to more complex mass spectra. Nevertheless, comparison with bPEBP evidences similar binding properties of PE towards both proteins in terms of binding stoichiometries and relative abundances (Figure 2E,F).

PEBP binds M6G and M3G but not morphine

Presence of noncovalent interactions between natural bPEBP or recombinant hPEBP and different alkaloids (morphine, M6G and M3G) was examined by diluting proteins in the ammonium acetate buffer (pH 6.8), containing a five-fold molar excess of each ligand. When bPEBP is analyzed in presence of M6G (461 Da), apo-bPEBP (*i.e.*, free bPEBP, 20855 Da; Figure 3A) is still detected as the main component (Figure 3B). However, two additional ion distributions are observed with molecular weights of 21317±1 Da and 21778±1 Da corresponding to 1:1 and 1:2 bPEBP: M6G complexes, respectively (Figure 3B). Relative abundances of 1:1 and 1:2 bPEBP: M6G complexes deduced from their peaks intensities are 15% and 4%, respectively.

In presence of M3G (461 Da; Figure 3C), unbound protein and both 1:1 and 1:2 bPEBP: M3G complexes are detected with MWs of 20855±1 Da, 21317±1 Da and 21778±1 Da with ratio of 77%, 17% and 6%, respectively. All species are present in similar proportions to those observed for M6G (Figure 3B,C). In contrast, when natural bPEBP is incubated with morphine (Figure 3D) and analyzed by ESI-MS under strictly identical experimental and instrumental conditions, only ions corresponding to free bPEBP are observed (MW=20855±1 Da).

Control experiments were performed to rule out the possibility of complex dissociation occurring into the gas phase. Natural bPEBP was incubated in presence of a twenty-fold molar excess of morphine which may favour low affinity complex formation in solution. Reaction medium was then analyzed under the gentlest instrumental conditions acces-

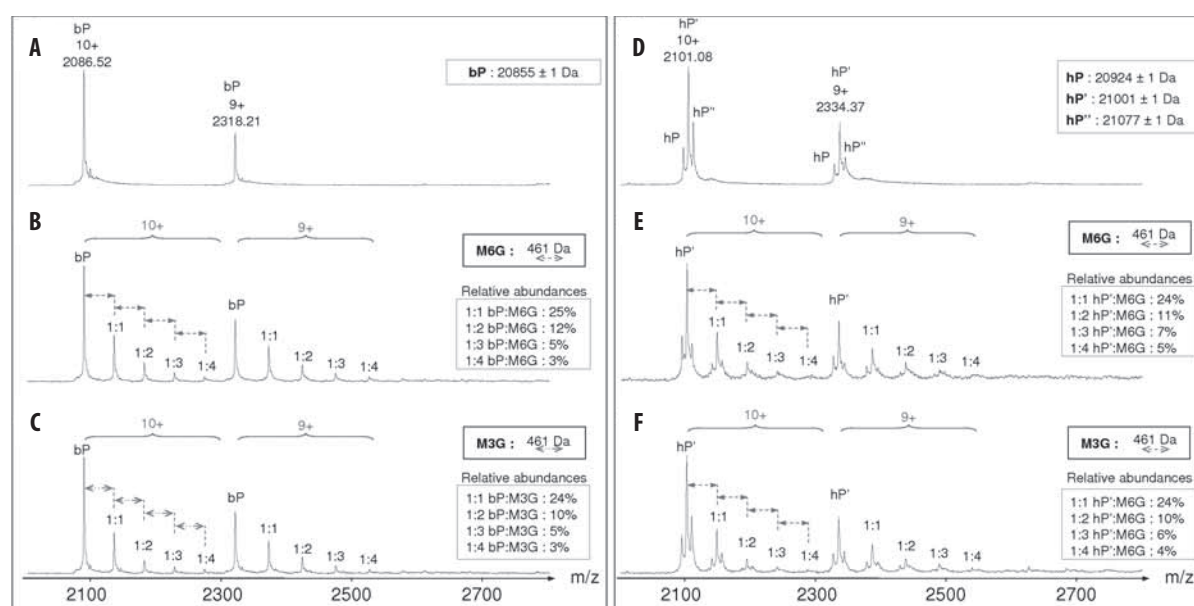


Figure 4. Binding specificity assessment for PEBP: morphine glucuronides complexes. Natural bPEBP (15 μ M) was analyzed either (A) alone or in presence of (B) 300 μ M M6G and (C) 300 μ M M3G. Recombinant hPEBP (15 μ M) was analyzed either (D) alone or in presence of (E) 300 μ M M6G and (F) 300 μ M M3G. ESI mass spectra were acquired in non-denaturing conditions (50 mM ammonium acetate pH 6.8; $V_c=40$ V; $P_i=6.1$ mbar). bP, hP, hP' and hP'' are related to bPEBP, hPEBP, hPEBP+1 β -mercapoethanol and hPEBP + 2 β -mercapoethanol, respectively. Protein: ligand binding stoichiometries are indicated over each peak.

sible on the mass spectrometer ($V_c=5$ V and $P_i=8$ mbar, see Material and Methods). However, in spite of these favourable conditions, no bPEBP: morphine complex is detected.

Above-described experiments were repeated with hPEBP, leading to similar results which confirm that hPEBP and bPEBP display equivalent binding properties towards morphine and morphine-glucuronides (Figure 3E–H).

Finally, since noncovalent complexes between PEBPs and M6G were found in the acidic intragranular matrix of chromaffin cells (pH 5.5) [48] and are released into the circulation (*i.e.*, pH between 6.8 and 7.5), a series of experiments was set up to monitor the pH effect on complexes formation. Using both bPEBP and hPEBP, identical ratios of PEBP: M6G and PEBP: M3G complexes were found at pH 5.5, 6.8 and 8.0 showing that complexes still exist at the intragranular pH as well as at the blood pH (data not shown).

M6G interacts non-specifically with PEBP

Effect of a large M6G molar excess

In order to determine the specificity of PEBP: M6G interactions, M6G concentration was increased in order to reach a twenty-fold molar excess relative to the natural bPEBP or recombinant hPEBP concentration. In the case of bPEBP, five ion distributions are detected in the mass range m/z 2000–2500 (Figure 4B). Mass measurements of these different species allow to identify the presence of unbound protein (20855 ± 1 Da) as well as 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4 bPEBP: M6G complexes (21316 ± 1 Da, 21778 ± 1 Da, 22238 ± 1 Da and 22700 ± 1 Da, respectively). Relative abundances of 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4 bPEBP: M6G complex-

es estimated from the ESI mass spectrum are 24%, 10%, 5% and 3%, respectively. Similar statistical M6G binding is also observed in the case of hPEBP (Figure 4D,E), evidencing that PEBP: M6G complexes are at least partially non-specific as observed in the case of the reference ligand (*i.e.*, PE; see above).

Comparison with M3G

Slightly changing the structure of a binding partner is one of the most relevant ways to assess the specificity of noncovalent complexes [49]. Thus, similar experiments were performed with M3G, a M6G isobaric isomer with no analgesic effect. Incubation of bPEBP or hPEBP in presence of a twenty-fold molar excess of M3G and subsequent mass measurement under non-denaturing conditions reveals that several M3G molecules can be bound to both bovine and human PEBP, although unbound PEBP is still present (Figure 4C,F). Complexes containing up to four M3G molecules are detected with relative abundances similar to those observed in the case of M6G. Thus, bPEBP and hPEBP bind M6G and M3G regardless of the position of the glucuronic acid. This observation confirms the non-specificity of PEBP: morphine glucuronides complexes.

Relative binding affinities of PE and morphine glucuronides towards PEBP

In order to compare PE and morphine glucuronides relative binding affinities for bPEBP and hPEBP, direct competition experiments were performed by adding the protein to an equimolar mixture of PE (411 Da) and either M6G (461 Da) or M3G (461 Da; Figure 5A,B, respectively). Results are only shown for bPEBP to avoid complicated mass spec-

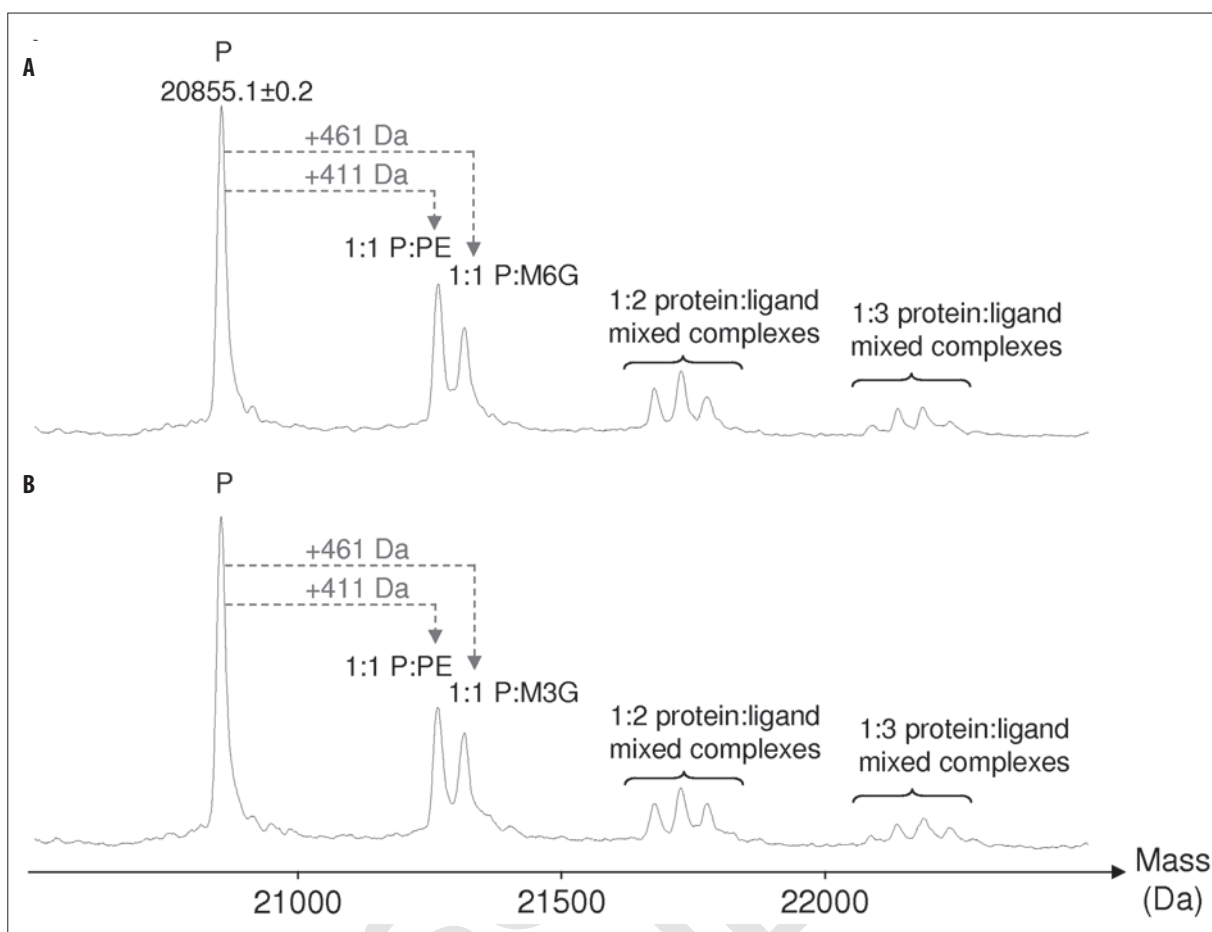


Figure 5. Direct competition experiments: phosphatidylethanolamine versus morphine glucuronides. ESI mass spectra were acquired in non-denaturing conditions (50 mM ammonium acetate pH 6.8; $V_c=40$ V; $P_i=6.1$ mbar) for natural bovine PEBP (P) at 15 μ M in presence of (A) 150 μ M PE + 150 μ M M6G and (B) 150 μ M PE + 150 μ M M3G.

tra arising from the intrinsic heterogeneity of hPEBP. It is noteworthy that identical results were obtained with hPEBP. As detailed above, PE as well as morphine glucuronides are able to be bound several times to PEBP leading to the formation of a high number of mixed complexes as observed on deconvoluted mass spectra (Figure 5). For both morphine glucuronides, comparison of the peak heights of 1:1 complexes allows to conclude that, in solution, bPEBP and hPEBP display a similar affinity for PE and both morphine glucuronide isomers (*i.e.*, M6G and M3G).

DISCUSSION

Due to its ability to provide information on all chemical species simultaneously present in solution, noncovalent ESI-MS has emerged as a powerful biophysical technique to study weak protein : ligand interactions. This technique generates reliable information on the presence/absence of noncovalent complexes, to determine protein : ligand binding stoichiometries and to assess their binding specificities and relative affinities [36,50,51]. In the present report, potentialities of noncovalent ESI-MS are highlighted through the characterization of PEBP: morphine derivatives interactions. Our results demonstrate the absence of a direct interaction between PEBP and morphine and confirmed the existence of noncovalent complexes involving

PEBP and morphine glucuronides. Moreover, ESI-MS experiments show that PEBP binds M6G, M3G as well as PE, the reference ligand, in a non-specific manner and with similar relative affinities.

As the stability of noncovalent assemblies can be dramatically altered when transferring ions from solution to a solvent-free environment (*i.e.*, the gas phase of the instrument), one question to be addressed is the possibility to obtain artefactually disrupted PEBP: morphine complexes in the gas phase of the instrument. However, two facts may account for the observation that morphine does not bind to PEBP in solution: (i) first, it has been shown that electrostatic-based and more generally polar interactions are considerably strengthened in absence of solvent shielding while hydrophobic effect no longer exists in the gas phase [52,53]. In the case of morphine, the presence of alcohol groups suggests that hydrogen bonds may exist (Figure 1A). It can thus be expected that if PEBP: morphine complexes exist, they could survive the ESI ionization process. (ii) Even in presence of a twenty-fold molar excess of morphine, which may favour low affinity complexes formation in solution, no PEBP: morphine complex was detected.

On these bases, these results may have an important significance in the context of a future therapeutic use of

M6G. M6G that is produced from morphine by UDP-glucuronosyltransferase 2B enzymes (UGT2B) displays an analgesic effect 1 to 500 times stronger than morphine [15,54]. In contrast, the M3G that is also produced by UGT1A and UGT2B, represents the major catabolism product of exogenous morphine in the liver and does not have any known biological effect. In addition to its analgesic activity, M6G induces lower side effects than morphine (*i.e.*, respiratory depression and vomiting) since it only weakly crosses the blood-brain-barrier [16,55]. Unlike morphine, M6G is not metabolized in the liver, but is rapidly excreted *via* the kidneys [56] due to both its high hydrophilicity and its small size (462 Da). Considering the potential implication of endogenous M6G in physiology [11] and its probable use in future pain therapeutic treatments (*i.e.*, postoperative pain management) [56,57], noncovalent complexes involving PEBP and morphine or morphine glucuronides are of great interest. In human plasma, the half-life of M6G is reported to be between 2 and 3 h [58]. The formation of complexes involving M6G and a protein such as PEBP could modify the pharmacokinetic of M6G by prolonging its presence in the organism and thus its physiological/therapeutic effects.

Interestingly, only few data are available regarding the presence of morphine in cerebral areas, and neuronal cells. Endogenous morphine has been characterized in bovine, rat, monkey, human and dog brains (for review: [1–4,6,59,60]), as well as in different cell lines [61,62], whereas M6G presence is less documented. M6G was found in bovine chromaffin cells as well as in the neuroblastoma SH-SY5Y cells and their corresponding secretions [7,63]. Enzymes implicated in the conversion of morphine into inactive M3G (*i.e.*, UDP-glucuronosyl transferase enzymes, UGT1A and 2B7) have been found in primary neurons and astrocytes [64–66]. In addition, human and rat brain extracts incubated with radiolabeled morphine have been shown to produce labeled M3G and M6G, suggesting the expression of UGT2B7 and *de novo* synthesis of M6G in the central nervous system (CNS) [67,68]. Our recent data have also described the presence of functional UGT2B enzyme able to transform morphine into M6G in chromaffin cells [10–12], as well as the presence of UGT2B7 in SH-SY5Y cell line [7].

At the peripheral level, endogenous morphine was found in the blood after stressful paradigms [69–72]. Recently, our group reported the presence of M6G previously considered as a product of morphine catabolism, in secretory granules and secreted material of bovine adrenal chromaffin cells [11]. In these cells, M6G represents the final product of endogenous alkaloid biosynthesis (because morphine was undetectable) and is formed through the action of an UGT2B-like enzyme. In chromaffin granules, M6G is bound to intragranular PEBP. Secretion of M6G, catecholamines and PEBP [11] into the blood likely occurs in response to stress, and is likely involved in different stress-modulating or pain-modulating mechanisms *via* binding to μ opioid receptors, which are present on numerous cell types, including human stem cells (*e.g.*, neurons and immune cells) [15,73,74].

PEBP has been described to bind various molecules, including γ -globulin [75] and β 1-acid glycoprotein [76], indocyanine, phosphatidylethanolamine, bromosulfophthalein, and hormones such as estradiol-17 β and dehydroepiandrosterone

[47]. Since PEBP displays also an affinity for anionic ligands, such as nucleotides (GTP or GDP) and small GTP-binding proteins [28], it was postulated that PEBP might also represent an organic anion transporter with the same affinity as bovine serum albumin. Interestingly, in 1990, Grandy and colleagues were able to observe that PEBP binds a morphine-derived molecule, suggesting its implication as a morphine binding protein [14]. Our recent study demonstrated that, in the chromaffin intragranular matrix of bovine chromaffin cells, M6G is a novel endogenous ligand for PEBP [11].

Because PEBP and M6G are naturally bound together within the granule matrix and are co-secreted from bovine chromaffin cells upon stimulation, it is likely that the PEBP:M6G complex exists after secretion and is present in the blood. Interestingly, PEBP may also be unaffected by proteases present in the blood, having thus a high half life. Indeed, mouse PEBP inhibits serine protease-like enzymes such as thrombin ($K_i=380$ nM), chymotrypsin ($K_i=1.8$ μ M), and neuropsin, but not plasmin, trypsin, and elastase [77]. In addition, our previous results have indicated that uncleaved PEBP is present in bovine serum showing its stability after secretion. Thus, PEBP might protect M6G from bodily clearance, acting as a stable transporter and molecular shield. Such protection may increase M6G systemic activities. M6G may bind μ opioid receptors present on the surface of immune and endothelial cells [1,78–80], but also neurons in the CNS. M6G analgesic potential, even at low concentrations, could explain in part the analgesia observed under highly stressful situations that could correspond to a «fight or runaway» mechanism characterized by a mobilization of energy and a strong and short analgesia.

CONCLUSIONS

The present paper reports the direct observation of PEBP binding properties towards morphine and morphine glucuronides. We described for the first time that: (*i*) PEBP directly interacts with morphine glucuronides but not with morphine, (*ii*) that the presence of a glucuronide group either on the 3rd or the 6th morphine's carbon does not affect these interactions, (*iii*) that M6G binds PEBP in a similar manner as the reference ligand PE and (*iv*) that PEBP displays a similar affinity for PE, M6G and M3G. From a more general point of view, this work highlights the potential of ESI-MS to validate / invalidate the formation of protein: ligand noncovalent complexes when low affinity binders (*i.e.*, compounds with affinities lower than 10^3 M⁻¹) are concerned. Our results suggest that PEBP might protect M6G after secretion into the blood, leading to a longer half time.

REFERENCES:

1. Stefano GB, Goumon Y, Casares F et al: Endogenous morphine. Trends Neurosci, 2000; 23: 436–42
2. Stefano GB, Cadet P, Kream RM, Zhu W: The presence of endogenous morphine signaling in animals. Neurochem Res, 2008; 33: 1933–39
3. Kream RM, Stefano GB: *De novo* biosynthesis of morphine in animal cells: An evidence-based model. Med Sci Monit, 2006; 12(10): RA207–19
4. Kream RM, Stefano GB: Morphine synthesis in animals. Med Sci Monit, 2006; 12(10): ED1–2
5. Zhu W, Mantione KJ, Shen L et al: Tyrosine and tyramine increase endogenous ganglionic morphine and dopamine levels *in vitro* and *in vivo*: cyp2d6 and tyrosine hydroxylase modulation demonstrates a dopamine coupling. Med Sci Monit, 2005; 11: BR397–404

6. Zhu W, Ma Y, Bell A et al: Presence of morphine in rat amygdala: evidence for the mu₃ opiate receptor subtype via nitric oxide release in limbic structures. *Med Sci Monit*, 2004; 10(12): BR433–39
7. Muller A, Glattard E, Taleb O et al: Endogenous Morphine in SH-SY5Y Cells and the Mouse Cerebellum. *PLoS One*, 2008; 3: Epub www.plosone.org/doi/pone.0001641
8. Guarna M, Ghelardini C, Galeotti N et al: Neurotransmitter role of endogenous morphine in CNS. *Med Sci Monit*, 2005; 11(6): RA190–93
9. Kream RM, Sheehan M, Cadet P et al: Persistence of evolutionary memory: primordial six-transmembrane helical domain mu opiate receptors selectively linked to endogenous morphine signaling. *Med Sci Monit*, 2007; 13(12): SC5–6
10. Glattard E, Muller A, Aunis D et al: Rethinking the opiate system? Morphine and morphine-6-glucuronide as new endocrine and neuroendocrine mediators. *Med Sci Monit*, 2006; 12(6): SR25–27
11. Goumon Y, Muller A, Glattard E et al: Identification of Morphine-6-glucuronide in Chromaffin Cell Secretory Granules. *J Biol Chem*, 2006; 281: 8082–89
12. Goumon Y, Strub JM, Stefano GB et al: Characterization of a morphine-like molecule in secretory granules of chromaffin cells. *Med Sci Monit*, 2005; 11: MS31–34
13. Goumon Y, Angelone T, Schoentgen F et al: The hippocampal cholinergic neurostimulating peptide, the N-terminal fragment of the secreted phosphatidylethanolamine-binding protein, possesses a new biological activity on cardiac physiology. *J Biol Chem*, 2004; 279: 13054–64
14. Grandy DK, Hanneman E, Bunzow J et al: Purification, cloning, and tissue distribution of a 23-kDa rat protein isolated by morphine affinity chromatography. *Mol Endocrinol*, 1990; 4: 1370–76
15. Lotsch J, Geisslinger G: Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clin Pharmacokinet*, 2001; 40: 485–99
16. Kilpatrick GJ, Smith TW: Morphine-6-glucuronide: actions and mechanisms. *Med Res Rev*, 2005; 25: 521–44
17. Schoentgen F, Seddiqi N, Bucquoy S et al: Main structural and functional features of the basic cytosolic bovine 21 kDa protein delineated through hydrophobic cluster analysis and molecular modelling. *Protein Eng*, 1992; 5: 295–303
18. Yeung K, Seitz T, Li S et al: Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature*, 1999; 401: 173–77
19. Roussel G, Nussbaum F, Schoentgen F et al: Immunological investigation of a 21-kilodalton cytosolic basic protein in rat brain. *Dev Neurosci*, 1988; 10: 65–74
20. Saunders PT, McKinnell C, Millar MR et al: Phosphatidylethanolamine binding protein is an abundant secretory product of haploid testicular germ cells in the rat. *Mol Cell Endocrinol*, 1995; 107: 221–30
21. Klysik J, Theroux SJ, Sedivy JM et al: Signaling crossroads: the function of Raf kinase inhibitory protein in cancer, the central nervous system and reproduction. *Cell Signal*, 2008; 20: 1–9
22. Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS et al: Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, 2001; 21: 7207–17
23. Keller ET, Fu Z, Brennan M: The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease. *Biochem Pharmacol*, 2004; 68: 1049–53
24. Keller ET, Fu Z, Brennan M: The biology of a prostate cancer metastasis suppressor protein: Raf kinase inhibitor protein. *J Cell Biochem*, 2005; 94: 273–78
25. George AJ, Holsinger RM, McLean CA et al: Decreased phosphatidylethanolamine binding protein expression correlates with Abeta accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2006; 27: 614–23
26. Banfield MJ, Barker JJ, Perry AC, Brady RL: Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction. *Structure*, 1998; 6: 1245–54
27. Serre L, Vallee B, Bureaud N et al: Crystal structure of the phosphatidylethanolamine-binding protein from bovine brain: a novel structural class of phospholipid-binding proteins. *Structure*, 1998; 6: 1255–65
28. Bucquoy S, Jolles P, Schoentgen F: Relationships between molecular interactions (nucleotides, lipids and proteins) and structural features of the bovine brain 21-kDa protein. *Eur J Biochem*, 1994; 225: 1203–10
29. Fenn JB, Mann M, Meng CK et al: Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989; 246: 64–71
30. Ganem B, Li YT, Henion JD: Detection of noncovalent receptor-ligand complexes by mass spectrometry. *J Am Chem Soc*, 1991; 113: 6294–96
31. Katta V, Chait BT: Observation of the heme-globin complex in native myoglobin by electrospray-ionization mass spectrometry. *J Am Chem Soc*, 1991; 113: 8534–35
32. Loo JA: Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 1997; 16: 1–23
33. Loo JA: Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *Int J Mass Spectrom*, 2000; 200: 175–86
34. Hofstadler SA, Sannes-Lowery KA: Applications of ESI-MS in drug discovery: interrogation of noncovalent complexes. *Nat Rev Drug Discov*, 2006; 5: 585–95
35. Heck AJ, Van Den Heuvel RH: Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 2004; 23: 368–89
36. Sanglier S, Atmanene C, Chevreux G, Dorsselaer AV: Nondenaturing mass spectrometry to study noncovalent protein/protein and protein/ligand complexes: technical aspects and application to the determination of binding stoichiometries. *Methods Mol Biol*, 2008; 484: 217–43
37. Courjean O, Chevreux G, Perret E et al: Modulation of E-Cadherin Monomer Folding by Cooperative Binding of Calcium Ions. *Biochemistry*, 2008; 47: 2339–49
38. Sanglier S, Bourguet W, Germain P et al: Monitoring ligand-mediated nuclear receptor-coreceptor interactions by noncovalent mass spectrometry. *Eur J Biochem*, 2004; 271: 4958–67
39. Bovef C, Wortmann A, Eiler S et al: Estrogen receptor-ligand complexes measured by chip-based nano-electrospray mass spectrometry: an approach for the screening of endocrine disruptors. *Protein Sci*, 2007; 16: 938–46
40. Darmanin C, Chevreux G, Potier N et al: Probing the ultra-high resolution structure of aldose reductase with molecular modelling and non-covalent mass spectrometry. *Bioorg Med Chem*, 2004; 12: 3797–806
41. Bernier I, Jolles P: Purification and characterization of a basic 23 kDa cytosolic protein from bovine brain. *Biochim Biophys Acta*, 1984; 790: 174–81
42. Vallee BS, Tauc P, Brochon JC et al: Behaviour of bovine phosphatidylethanolamine-binding protein with model membranes. *Eur J Biochem*, 2001; 268: 5831–41
43. Metz-Boutigue MH, Garcia-Sablone P, Hogue-Angeletti R, Aunis D: Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur J Biochem*, 1993; 217: 247–57
44. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680–85
45. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*, 1992; 24: 145–49
46. Peschke M, Verkerk UH, Kebarle P: Features of the ESI mechanism that affect the observation of multiply charged noncovalent protein complexes and the determination of the association constant by the titration method. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2004; 15: 1424–34
47. Bernier I, Tresca JP, Jolles P: Ligand-binding studies with a 23 kDa protein purified from bovine brain cytosol. *Biochim Biophys Acta*, 1986; 871: 19–23
48. Aunis D: Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Int Rev Cytol*, 1998; 181: 213–20
49. Smith RD, Light-Wahl KJ: The observation of non-covalent interactions in solution by electrospray ionization mass spectrometry: Promise, pitfalls and prognosis. *Biological Mass Spectrometry*, 1993; 22: 493–501
50. Benkestock K, Van Pelt CK, Akerud T et al: Automated nano-electrospray mass spectrometry for protein-ligand screening by noncovalent interaction applied to human H-FABP and A-FABP. *J Biomol Screen*, 2003; 8: 247–56
51. Tocchini-Valentini GD, Rochel N, Escriva H et al: Structural and Functional Insights into the Ligand-binding Domain of a Nonduplicated Retinoid X Nuclear Receptor from the Invertebrate Chordate *Amphioxus*. *J Biol Chem*, 2009; 284: 1938–48
52. Robinson CV, Chung EW, Kragelund BB et al: Probing the Nature of Noncovalent Interactions by Mass Spectrometry. A Study of Protein-CoA Ligand Binding and Assembly. *J Am Chem Soc*, 1996; 118: 8646–53
53. Rogniaux H, Van Dorsselaer A, Barth P et al: Binding of aldose reductase inhibitors: correlation of crystallographic and mass spectrometric studies – A System for X-ray Crystallography and NMR. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1999; 10: 635–47
54. Lotsch J: Opioid metabolites. *J Pain Symptom Manage*, 2005; 29: S10–24
55. Lotsch J: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of opioids. *J Pain Symptom Manage*, 2005; 29: S90–103

56. van Dorp EL, Romberg R, Sarton E et al: Morphine-6-Glucuronide: Morphine's Successor for Postoperative Pain Relief? *Anesth Analg*, 2006; 102: 1789-97
57. van Dorp EL, Morariu A, Dahan A: Morphine-6-glucuronide: potency and safety compared with morphine. *Expert Opin Pharmacother*, 2008; 9: 1955-61
58. Dahan A, van Dorp E, Smith T, Yassen A: Morphine-6-glucuronide (M6G) for postoperative pain relief. *Eur J Pain*, 2008; 12: 403-11
59. Meijerink WJ, Molina PE, Abumrad NN: Mammalian opiate alkaloid synthesis: lessons derived from plant biochemistry. *Shock*, 1999; 12: 165-73
60. Fricchione G, Zhu W, Cadet P et al: Identification of endogenous morphine and a mu3-like opiate alkaloid receptor in human brain tissue taken from a patient with intractable complex partial epilepsy. *Med Sci Monit*, 2008; 14(6): CS45-49
61. Goumon Y, Zhu W, Weeks BS et al: Identification of morphine in the adrenal medullary chromaffin PC-12 cell line. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000; 81: 177-80
62. Poeknapo C, Schmidt J, Brandsch M et al: Endogenous formation of morphine in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 14091-96
63. Boettcher C, Fellermeier M, Boettcher C et al: How human neuroblastoma cells make morphine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102: 8495-500
64. Heurtaux T, Benani A, Moulin D et al: Induction of UGT1A6 isoform by inflammatory conditions in rat astrocytes. *Neuropharmacology*, 2006; 50: 317-28
65. King CD, Rios GR, Assouline JA, Tephly TR: Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Arch Biochem Biophys*, 1999; 365: 156-62
66. Suleman FG, Abid A, Gradinaru D et al: Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch Biochem Biophys*, 1998; 358: 63-67
67. Nagano E, Yamada H, Oguri K: Characteristic glucuronidation pattern of physiologic concentration of morphine in rat brain. *Life Sci*, 2000; 67: 2453-64
68. Yamada H, Ishii K, Ishii Y et al: Formation of highly analgesic morphine-6-glucuronide following physiologic concentration of morphine in human brain. *J Toxicol Sci*, 2003; 28: 395-401
69. Brix-Christensen V, Goumon Y, Tonnesen E et al: Endogenous morphine is produced in response to cardiopulmonary bypass in neonatal pigs. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2000; 44: 1204-8
70. Brix-Christensen V, Tonnesen E, Sanchez RG et al: Endogenous morphine levels increase following cardiac surgery as part of the antiinflammatory response? *Int J Cardiol*, 1997; 62: 191-97
71. Goumon Y, Bouret S, Casares F et al: Lipopolysaccharide increases endogenous morphine levels in rat brain. *Neurosci Lett*, 2000; 293: 135-38
72. Yoshida S, Ohta J, Yamasaki K et al: Effect of surgical stress on endogenous morphine and cytokine levels in the plasma after laparoscopic or open cholecystectomy. *Surg Endosc*, 2000; 14: 137-40
73. Cadet P, Mantione KJ, Stefano GB: Molecular identification and functional expression of mu 3, a novel alternatively spliced variant of the human mu opiate receptor gene. *J Immunol*, 2003; 170: 5118-23
74. Cadet P, Mantione KJ, Zhu W et al: A functionally coupled mu3-like opiate receptor/nitric oxide regulatory pathway in human multi-lineage progenitor cells. *J Immunol*, 2007; 179: 5839-44
75. Olsen GD, Bennett WM, Porter GA: Morphine and phenytoin binding to plasma proteins in renal and hepatic failure. *Clin Pharmacol Ther*, 1975; 17: 677-84
76. Leow KP, Wright AW, Cramond T, Smith MT: Determination of the serum protein binding of oxycodone and morphine using ultrafiltration. *Ther Drug Monit*, 1993; 15: 440-47
77. Hengst U, Albrecht H, Hess D, Monard D: The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *J Biol Chem*, 2001; 276: 535-40
78. Cadet P, Bilfinger TV, Fimiani C et al: Human vascular and cardiac endothelia express mu opiate receptor transcripts. *Endothelium*, 2000; 7: 185-91
79. Stefano GB, Kushnerik V, Rodriguez M, Bilfinger TV: Inhibitory effect of morphine on granulocyte stimulation by tumor necrosis factor and substance P. *Int J Immunopharmacol*, 1994; 16: 329-34
80. Stefano GB, Zhu W, Cadet P et al: A hormonal role for endogenous opiate alkaloids: vascular tissues. *Neuro Endocrinol Lett*, 2002; 23: 21-26

III. PUBLICATION 4

CHARACTERIZATION OF HIGH AFFINITY COMPLEX INVOLVING
CREATINE KINASE B/M AND MORPHINE-LIKE ALKALOIDS:
FORMATION OF NONCOVALENT COMPLEXES WITH POTENTIAL
BIOTECHNOLOGICAL OUTCOMES

Laux-Biehlmann A., Gräfe N., Mouheiche J., Petiot S., Stuber D., Dela-
lande F., Sanglier-Cianférani S., Welter I.D., Poisbeau P., Van Dorsseleer
A., Schneider F. & Goumon Y.

British Journal of Clinical Pharmacology

Sous Presse

CHARACTERIZATION OF HIGH AFFINITY COMPLEX INVOLVING CREATINE KINASE B/M AND MORPHINE-LIKE ALKALOIDS: FORMATION OF NONCOVALENT COMPLEXES WITH POTENTIAL BIOTECHNOLOGICAL OUTCOMES

Abbreviated title: creatine kinase-alkaloid complexes

Indexing terms: morphine, morphine-6-glucuronide, morphine-3-glucuronide, codeine, creatine kinase-B, creatine kinase-M, noncovalent complexes

Alexis Laux-Biehlmann¹, Nadja Gräfe¹, Jinane Mouheiche¹, Stéphanie Petiot², Denise Stuber¹, François Delalande², Sarah Sanglier-Cianférani², Ingeborg D. Welter^{3,4}, Pierrick Poisbeau¹, Alain Van Dorsselaer², Francis Schneider⁵ & Yannick Goumon^{1#}

¹*Nociception and Pain Department, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR 3212 et Université de Strasbourg, F-67084 Strasbourg, France*

²*Laboratoire de spectrométrie de masse BioOrganique, IPHC-DSA, Université de Strasbourg, CNRS UMR7178, 25 rue Becquerel, F-67087 Strasbourg, France*

³*Critical Care Research Unit, School of Clinical Sciences, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom*

⁴*Abteilung für Anaesthesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen, Giessen, Germany,*

⁵*Réanimation Médicale, Hôpitaux Universitaires and University of Strasbourg, Strasbourg, France*

Grant sponsor: This work was funded by CNRS, Université de Strasbourg, French Ministère délégué à la Recherche et à l'Enseignement Supérieur (Ph.D fellowship to A.L.) and Fondation pour la Recherche Médicale (to Y.G).

ABSTRACT

Endogenous morphine (eM) and its derivatives, structurally identical to vegetal alkaloids, are synthesized by mammalian cells from dopamine. However, while EM is found in high amount in pathologic blood samples, only trace of endogenous alkaloids are found in tissues and fluids when extracted with protocols using protein-precipitation steps. Exogenous morphine is described since a long time to bind protein in blood and tissue extract. Recently, we have hypothesized that eM, but also exogenous morphine, may form high affinity complexes with proteins in the blood, those being be dissociated with lithium-heparinate treatment.

The present article described the characterization of high affinity morphine-like alkaloid-creatine kinase B (CK-B, brain) and M (CK-M, muscle) complexes present in homogenized brain, muscle and heart tissues. These complexes, are resistant to detergents, reducing agents and heat treatments. At 37°C, naloxone, lithium-heparinate or lithium treatments, as well as a urea treatment followed by heating (100°C), dissociate the morphine-like alkaloid-CK-B/M complexes. A lithium-heparinate treatment in presence of high concentration of exogenous morphine or a mix of alkaloids lead to a reassociation of the complexes. A proteomic approach using trypsin-digestion allows us to determine that the alkaloids bind to the C-ter part of the creatine kinase B/M. The corresponding 26 amino acids synthetic peptide display a strong affinity for morphine and a weaker affinity for codeine and morphine glucuronides (morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide). Together, our results explain the low recovery yield of endogenous alkaloids from tissues and open exciting opportunities to develop both therapeutic and biotechnological approaches.

France ; Phone.: (33)-3-88-45-67-18 ; Fax: (33)-3-88-60-16-64. e-mail: yannick.goumon@inserm.u-strasbg.fr

INTRODUCTION

Morphine, the gold standard for pain relief¹, is catabolized into morphine-6-glucuronide (M6G; a potent analgesic) and morphine-3-glucuronide (M3G; no activity)²⁻⁴. It is now well established that morphine is endogenously synthesized in vertebrates^{1, 5-7} and its biosynthesis derives from dopamine^{1, 7, 8}. Endogenous morphine, as well as its glucuronides are found in different cells types including neuroendocrine cells⁹ (i.e., chromaffine cells), immune cells^{10, 11} (i.e., polymorphonuclear neutrophils), as well as in brain cells¹²⁻¹⁴. Interestingly, using the mouse brain model, our group has shown the presence of eM-like compounds in brain regions not usually involved in pain modulation opening exciting opportunities to extend the role and function of endogenous alkaloids far beyond its analgesic functions. EM-like immunolabel was not found in dopamine neurons but mainly in GABA-neurons¹⁴ suggesting that the uptake of naturally occurring eM precursors such as tetrahydropapaveroline (THP)¹⁴ lead to the formation of eM in non dopaminergic cells in mouse brain. EM-like immunolabel was also found in astrocytes that express UGT1A6 enzyme¹⁵ which may degrade morphine into inactive M3G. In astrocytes, morphine secreted by neurons may be taken up in the cytoplasm and be catabolized to form inactive M3G. Thus, our data indicate that eM biosynthesis pathway is different in the brain and in peripheral tissues, the later pathway being done in unique cells.

Since three decades, eM and its derivatives (codeine, M6G, M3G) have been extracted from tissues with a low recovery yield (fmol-pmol/g of tissue). However, these data do not fit with high EM-levels found in pathological blood samples^{10, 16, 17} (0.1-8nM) or with brain immunohistochemistry results¹⁴. Until now, endogenous alkaloid extraction methods required deproteinization steps (chloroform/methanol) in order to enrich the alkaloid content (the protein pellets being always discarded).

Interestingly, several articles have described the presence of proteins capable to bind morphine. Single dose injection of ¹⁴C-morphine-N-methyl lead to the presence of a long lasting radioactivity in rat CNS up to 3 weeks¹⁸, whereas [³H]morphine and [N-¹⁴CH₃]morphine were found to be irreversible bound to insoluble tissue components after 48h¹⁹. In addition, covalent binding of morphine metabolites to proteins in mouse has been reported²⁰ and an incubation of ³H-morphine

with rat hepatocytes extracts leads to a covalent binding to a 40-50 kDa proteins, as indicated by the radioactivity recovered from the protein precipitate. Morphine-binding to liver proteins was qualified of "covalent" because complexes are resistant both to methanol precipitation and SDS-PAGE^{21, 22}. Only few specific morphine-binding proteins have been identified so far and include serum albumin and alpha 1-acid glycoprotein^{23, 24}. To illustrate this point, our laboratory has demonstrated that phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) binds to M6G and M3G with an equal affinity as its reference ligand, the phosphatidylethanolamine²⁵. In this particular example, no affinity of PEBP was found for morphine.

Because morphine or its derivatives (endogenous or exogenous) may naturally bound to proteins, we have postulated that particular proteins may "buffer" a large part of the morphine-like alkaloids (endogenous or exogenous) and impair their proper detection/quantification. Thus, our last article has analyzed in parallel the EM levels in serum (dry tubes) and lithium-heparinate plasma samples from different patients suffering of pathologies where eM is elevated or positive controls treated with exogenous morphine. Surprisingly, EM levels were found to be in average 65% lower in serum compared to corresponding lithium-heparinate plasma. A same conclusion was observed in vitro when adding exogenous morphine to blood samples, suggesting that morphine can be noncovalently bound to proteins in the blood and that a lithium heparinate treatment lead to an almost total recovery of morphine.

Among the different proteins that potentially bound morphine, creatine kinase-B (CK-B) has been described to covalently bound to dopamine (an eM precursor) ²⁶. Interestingly, an article reports that CK-B represent the main I₂-binding site for imidazoline²⁷. The modulation of the availability of I₂ binding-sites by morphine and the modulation of analgesic effects of I₂ agonists by morphine treatments²⁷⁻³⁵ suggests a direct interaction between morphine and I₂-binding sites (i.e., CK-B). In line with this idea, fentanyl (μ opioid receptor agonist) displays a strong affinity for I₂-binding sites³³.

Different CK isoenzymes (noncovalent dimmers) exist in the cytoplasm of cells: CK-B in brain, CK-MM in muscles and CK-MB in heart³⁶. In addition, CK forms are present in mitochondria (ubiquitous and sarcomeric: referred to as umtCK and smtCK, respectively). CK catalyses reversible phosphorylation of creatine by ATP and produces phosphocreatine and ADP. Phosphocreatine represent a stock of energy that can be used to generate ATP. In addition to tissues, CK-MM, -MB and -BB are found in the blood after a muscular effort and in pathologies (e.g.,

rabdomiolysis, heart infarct, brain injury)^{37, 38}.

Our recently published article¹⁴ has characterized the affinity of 6D6 anti-morphine antibody to detect only morphine, codeine M6G, M3G and M3-6G. Our experiment revealed that this antibody detects covalent alkaloid-protein complexes induced by paraformaldehyde treatment *in vitro* and *in vivo*¹⁴. Using this specific tool, we have investigated the presence of proteins that form highly resistant complexes with EM-like compound in tissues. Western blot, 2D-gel electrophoresis and mass spectrometry (MS) analysis allowed to identify the C-ter CK-B part as a potential morphine-like-binding domain.

MATERIAL AND METHODS

Antibodies

The mouse monoclonal 6D6 and 3A6 anti-morphine antibodies (Aviva System Biology, ref: 16002 and AMM00033 respectively, San Diego, USA) were produced using a ((5- α -6- α) 7,8-didehydro-4,5-epoxy-17-methylmorphinan-3,5-diol)-BSA conjugate.

The ABD6330-0004 sheep polyclonal antibody was raised with 3-(O-Carboxymethyl)-morphine conjugated to keyhole limpet hemocyanin (AbD Serotec, Oxford, UK).

The ABD6330-0014 sheep polyclonal antibody was obtained after immunization with morphine conjugated to Keyhole Limpet Haemocyanin.

The G61 goat antibody and R29 rabbit antibody were a gift from the Pr. R. Hain (Cardiff School of Medicine, University Hospital of Wales, Cardiff, UK).

The rabbit polyclonal antibody against the creatine kinase-B (ABCAM92452) was raised against the C-terminal part of the human creatine kinase-B whereas the goat polyclonal antibody against creatine kinase-B (N-20 sc-15157; Santa Cruz Biotechnology) was raised against the N-terminal part of the human creatine kinase-B.

Brain extractions

Mouse brains were homogenized in water. After a centrifugation (30 min, 15,000g, 4°C), the supernatant was recovered and proteins were quantified using the Protein Essays (Bio-Rad).

SDS-PAGE

1D-SDS-PAGE- Proteins were separated on SDS-PAGE gels (12% acrylamide; Criterion XT, XT-MES running buffer; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Samples were suspended in 15 μ l of specific loading buffers (see below) and submitted or not to a heat treatment (100°C) for 0, 5, 10 or 15min prior to gel loading.

Control loading buffer: 125mM Tris HCl pH6.8, 2% SDS, 5mM EDTA, 5% glycerol, 50mM DTT and 0.05% Bleu de Bromophenol blue.

Urea loading buffer: 60 mM TrisHCl pH6.8, 2 % SDS, 4 M Urea, 5 % glycerol, 5 mM EDTA and 1 % β -mercaptoethanol.

LDS loading buffer: Loading buffer 5 (Lithium Dodecylsulfate buffer): 250mM Tris HCl pH8.5, 2% Lithium Dodecylsulfate buffer (LDS), 10% Glycerol 0.5mM EDTA, 0,075% Coomassie blue G250, 0.025% Phenol Red, XT-reducing agent (Bio-Rad).

2D-SDS-PAGE- Isoelectrofocussing were done on 7 or 11 cm IPG strips with a pHi range of 3-10 and 5-8 (Bio-Rad) according to manufacturer's recommendations. The second dimension was performed using 12% acrylamide SDS-PAGE gels (Criterion XT, XT-MES running buffers; Bio-Rad). Gels were either silver stained according to supplier's instructions (Proteabio Europe, France) or used for Western immunoblot analysis (see below).

Western Blot

After migration, 1-D and 2-D SDS-PAGE were electrotransferred onto polyvinylidene difluorene membrane (PVDF, Bio-Rad). PVDF membranes were treated 30 min with a saturation solution (PBS supplemented with 3 % of BSA and 0.05 % Tween 20). Then, the primary antibodies were incubated 1h with the following dilution in PBS supplemented with 3 % of BSA and 0.05 % Tween 20: 6D6 mouse monoclonal anti-morphine antibody, dilution of 1:4,000; 3A6 mouse monoclonal anti-morphine antibody (1:2,000); ABD6330-0004 sheep polyclonal anti-morphine antibody (1:500); ABD6330-0014 sheep polyclonal anti-morphine antibody (1:500). G61 goat polyclonal anti-morphine antibody (1:500); R29 rabbit polyclonal anti-morphine antibody; ABCAM92452 rabbit polyclonal anti-creatine kinase-B antibody (1:3000). N-20 sc-15157, goat polyclonal anti-creatine kinase-B antibody (1:3000).

The immunoreactivity was revealed using either HRP-conjugated donkey anti-mouse antiserum (P.A.R.I.S.; 1:50,000 in the same buffer) or HRP-conjugated donkey anti-sheep antiserum (P.A.R.I.S.; 1:30,000 in the same buffer) or HRP-conjugated donkey anti-goat antiserum (P.A.R.I.S.; 1:30,000 in the same buffer) or HRP-conjugated donkey anti-rabbit antiserum (P.A.R.I.S.; 1:50,000 in the same buffer). Supersignal West Femto Kit (Pierce, Rockford, USA) or Luminata FORTE™ Western HRP Substrate (Millipore, France). Non specific binding of each secondary antibody was tested by omitting the primary antibody, and it showed no non-specific labeling.

Anti-morphine 6D6 competitive immu-

noenzymatic ELISA

The determination of the morphine 6D6 antibody specificity was done on a 96 wells plate (NUNC, Roskilde, Denmark) coated during a night at RT with 200 μ L of a 100 ng/ml morphine-BSA solution (ref. 80-IM50, Fitzgerald Industries International, North Acton, USA). After three washes with 0.1 M NaCl/Pi-0.05 % tween buffer (10 min, PT), wells are incubated for 1 h with 200 μ L of BSA diluted in NaCl/Pi buffer (5 %, w/v) in order to saturate nonspecific sites. After saturation, sections were incubated 30 min with 100 μ L of NaCl/Pi-BSA (3%, w/v) containing from 0.01 nM to 1 μ M of the following potential antigens: morphine (Sigma-Aldrich), M6G (Sigma-Aldrich), M3G (Sigma-Aldrich), Morphine 3,6-glucuronide (Sigma-Aldrich), codeine (Sigma-Aldrich), normorphine (Sigma-Aldrich), norcodeine (Sigma-Aldrich), DAGO ([3H] [D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]enkephalin, Sigma-Aldrich), CTOP (Sigma-Aldrich), CTAP (Sigma-Aldrich), naloxonazine (Sigma-Aldrich), naltexone (Sigma-Aldrich), naloxone (Sigma-Aldrich), norepinephrine (Sigma-Aldrich), epinephrine (Sigma-Aldrich), dopamine (Sigma-Aldrich), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA; Sigma-Aldrich), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC; Sigma-Aldrich) and norlaudanosoline (THP, Sigma-Aldrich), creatine kinase-B (Fitzgerald, France). Then, 100 μ L of the mouse monoclonal primary antibody (6D6, Aviva System Biology; dilution 1:2000) in NaCl/Pi-BSA (3%, w/v) were added in each wells. After 3 h of incubation at RT, the plate is washed three times with PT buffer and 200 μ L of the secondary antibody (HRP conjugated donkey anti-mouse IgG, P.A.R.I.S.; dilution 1:400) was added and let in the wells during 2 h at RT. After two washes with PT buffer followed with two washes with a pH 7,5 phosphate-citrate-0.05 % tween buffer (10 min, CT), revelation was performed with 200 μ L of a freshly solution of ortho-phenylene diamine (OPD; Sigma Aldrich) at 1.5 mg/ml in CT buffer containing 0.075 % hydrogen peroxide. After 20 min of incubation at RT, optical density was determined at 450 nm with a Multiskan EX plate reader (Thermo Life Sciences, Cergy Pontoise, France). The dissociation constants (K) of the antibody for an antigen were determined with a sigmoidal fitting (KyPlot 2.0, Tokyo, Japan).

Liquid trypsin digestion

Proteins were incubated in 200 μ L of buffer containing 8 M urea, 0.1 M NH₄HCO₃, 12 mM DTT during 30 min at 37°C, 30 min (reduction step). Secondly; iodoacetamide was added (final concentration of 40 mM) and incubated 1h at 25°C in the dark (alkylation step). Volume was then adjusted to 1 M urea by adding 1500 μ L of 0.1 M NH₄HCO₃ and the digestion was performed with 1 μ g of porcine

trypsin (Promega, France) per 100 μ g of protein during different times. Digestions were stopped by addition of antiprotease cocktail (Roche Diagnostic, France)

Dissociation-reassociation assays

Dissociation- Brain extracts were submitted to different treatments in order to observe the dissociation of CK-morphine-like alkaloids complexes (CK-B-alkaloids). 40 μ g of brain extract, 2 μ g of human brain CK-B (Fitzgerald) and rabbit CK-M (Sigma Aldrich) purified were incubated 12h at 37°C in presence of naloxone (ration 1:1, m/m; Sigma Aldrich), lithium-heparine (17 U.I/ml; Decton Dickinson, France), 0.1mM, 10mM, 100mM, 500mM or 1M of lithium chloride (Sigma Aldrich) in a final volume 40 μ L (water diluent). The effect of lithium on the dissociation was analyzed on 10 μ g of brain extract by Western blot (diluted 1:2 with control loading buffer without heat treatment). Membrane revelation was performed with the anti-morphine 6D6 antibody. Control experiments without treatments were done in parallel.

Reassociation- Experiments were done in presence of a mix of alkaloids (5 μ g of morphine, M6G, M3G and codeine) or in presence of 20 μ g of morphine, M6G, M3G or codeine (final volume 30 μ L). Samples were diluted 1:2 with control loading buffer, and 10 μ L of each reaction were loaded on the SDS-PAGE without heat treatment.

Control experiment using CK-M and CK-B treated with lithium-heparinate shows no effect on the protein content since an identical silver stained band is observed with and without lithium (data not shown)

Proteins and peptides identification

Coomassie blue or silver stained protein spots were submitted to in-gel digestion and mass spectrometry analyses using a CapLC (Waters, <http://www.waters.com>) coupled to a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem mass spectrometer (Q-TOF 2; Waters). The MS and MS/MS data were analyzed using a local Mascot server (MASCOT 2.0; MatrixScience, <http://www.matrixscience.com>) by comparison with a composite target-decoy database, including the UniProt protein sequences of Viridiplantae (554 832 sequences; January 2009), human keratins, porcine trypsin and all corresponding reversed sequences (1 109 972 entries in total). Searches were performed with a mass tolerance of 250 ppm in MS mode and 0.4 Da in MS/MS mode for nanoLC-MS/MS data. One missed cleavage per peptide was allowed and variable modifications were taken into account, such as carbamidomethylation of cysteine, oxidation of methionine and N-acetylation (protein N-ter).

Neither protein molecular weight nor isoelectric point

constraints were applied (see Figure S4). Mascot results were loaded in MuDPIT mode into SCAFFOLD (Proteome Software, <http://www.proteomesoftware.com>). Results were subjected to the following filtering criteria. For the identification of proteins with two peptides or more, a Mascot ion score of above 25 was required. In the case of single peptide hits, the score of the unique peptide must be greater (minimal 'difference score' of 0) than the 95% Mascot significance threshold. The target–decoy database search allows us to control and estimate the false-positive identification rate of our study (Peng et al., 2003; Elias and Gygi, 2007). Thus, the final catalogue of proteins presents an estimated false-positive rate of below 1%.

RESULTS

Immunodetection of protein-morphine-like molecule complexes

Our previously studies have indicated that the 6D6 anti-morphine antibody is able to detect covalent complexes including morphine, M6G, M3G or codeine on Western blot¹⁴. These results suggest that, if high affinity complexes involving morphine-like alkaloids exist, those can be detected in particular Western blot conditions.

6D6 antibody cross-reactivity with morphine, morphine-derivatives and monoamines

The cross-reactivity of the 6D6 antibody with morphine, M6G, M3G, endogenous morphine precursors (codeine, THP, dopamine, L-DOPA and DOPAC), as well as other opiates (morphine 3,6-glucuronide, normorphine, norcodeine), MOR agonist (DAGO), MOR antagonist (CTOP, CTAP, naloxonazine, naltexone, naloxone and catecholamines (norepinephrine, epinephrine) were tested by ELISA. The 6D6 antibody displayed only an affinity for morphine ($K = 20.93$ nM), M6G ($K = 8.1$ nM), M3G ($K = 7.56$ nM), codeine ($K = 18.15$ nM). A much weaker affinity was observed for morphine 3,6-glucuronide ($K = 776.14$ nM) and normorphine ($K = 785.22$ nM). No cross-reactivity was found for the other compound tested including the MOR antagonist, naloxone. These data confirm that the 6D6 antibody can simultaneously detect morphine, codeine, M6G and M3G without interfering with the other components tested above.

Immunodetection of morphine-like molecules-protein complexes

In order to determine if morphine-like immunolabel can be detected in mouse brain, brain extracts (10 μ g) were suspended in a control loading buffer containing

(see Material and Methods section). Brain extracts, which were not submitted to heat treatment to prevent strong complexes dissociation, were loaded on SDS-PAGE and gel was transferred onto PVDF membrane. Immunodetection was performed with 8 different antibodies (raised with different chemistry, hapten and host species). All of these antibodies were not only specific for morphine but cross-react with codeine, morphine, M6G and M3G. A single labelled band of 40-45kDa for 6 among 8 of these antibodies (Fig. 1A).

Together, this experiment suggests that EM-like compounds (that might correspond to morphine, M6G, M3G and/or codeine) are bound to a 40-45 kDa protein in mouse brain extracts. These 40-45 kDa complexes are resistant to SDS-PAGE, suggesting the presence of very high affinity interactions.

Dissociation of the complexes by different loading buffers

In order to investigate if high affinity complexes between endogenous morphine-like alkaloids and a protein exist, brain homogenates (20 μ g) were loaded on polyacrylamide gels in presence of different loading buffers. Usually used loading buffers containing SDS or LDS (lithium dodecylsulfate), reducing agents (β -mercaptoethanol or DTT) and/or chaotropic agent were tested (Fig. 1B). Samples were submitted or not to heat treatments during 5 or 10 min. After electrotransfer, EM-like immunolabel was observed using the 6D6 anti-morphine anti-body (Fig. 1B). Without heat treatment (room temperature; Fig. 1B), an immunolabelled band of 40-45 kDa was observed indicating that none of the loading buffers is able to dissociate morphine-like alkaloids-protein complexes at room temperature. When 10 min of heat treatment was apply (100°C), a slight decrease of the morphine-like immunolabel was observed only for the loading buffer containing LDS (lithium dodecylsulfate), whereas morphine-like label totally disappear when using the buffer contains urea.

Together, our data show the putative complex involving a morphine-like compound is dissociated by a urea loading buffer associated with a heat treatment, but is also sensible to LDS (lithium dodecylsulfate). Interestingly, urea and lithium buffers are often used to dissociate protein-protein complexes.

Complementary experiments performed in parallel on a brain marker (chromogranin A, CGA) did not show any decrease of the immunoreactivity (data not shown). In addition, the immunolabel observed for loading buffers that do not contain LDS and urea (Fig. 1B, left window) do

not show a significant decrease of EM-like immunolabel and confirms that the lose of immunolabel is not due to the heat-degradation of proteins.

Dissociation of the complexes on transfer membrane

In order to determine if such label can be reversed after PVDF transfer membrane treatments, we have performed a Western blot analysis on mouse brain extract (20µg, without heat treatment). The resulting gel was transferred onto PVDF membrane was incubated 30 min at room temperature or at 100°C in water, 0.1M HClO₃ pH 3.3, 0.44M ammoniac pH 11 or 4M urea in 60mM Tris-HCl pH6.8. The intensity of the 40-45 kDa immunolabeled of band (6D6 anti-morphine antibody) was monitored. No decrease of EM-like immunolabel was observed with water, HClO₄ or ammoniac with or without heat treatments (Fig. 1C). Interestingly, while the PVDF lane treated with urea at room temperature still shows the presence of the 40-45kDa band, whereas the PVDF membrane submitted to heat treatment shows a complete lost of the EM-like immunolabel (Fig. 1C).

This experiment indicates, that urea only associated with heat treatment induce the decrease of EM-like immunolabel after membrane treatment. It suggests that an unknown morphine-like alkaloid is noncovalently bound to a protein present in the mouse brain. The immunoreactivity decrease is not associated with the heat treatment since the label does not decrease for buffers that do not contain urea.

In vitro dissociation assay with naloxone

As described above (Results, 1.1) the 6D6 antibody do not cross react with naloxone (µ opioid receptor antagonists displaying a structure close to that of morphine) in ELISA. On this basis, a competition assay was performed on brain extracts in order to exchange the morphine-like molecules with non immunoreactive antagonists. Thus, brain extracts were incubated with naloxone during 12h at 37°C. Samples were loaded on SDS-PAGE (control urea buffer with no heat treatment) and the PVDF transfer membrane was revealed with the 6D6 antibody. Incubations with antagonist significantly decrease of the alkaloid label compared to control experiments (same incubation performed in absence of antagonist; Fig. 1D). This experiment suggests that morphine-like molecules are non covalently bound to a 40-45 kDa mouse brain protein and that these alkaloids can be replaced by a morphine analogue.

Characterization of the protein complexed to morphine-like molecules

Proteomic identification protein complexed to morphine-like molecules

A proteomic approach was used to identify the protein that bound EM-like compounds. 125µg of mouse brain extract were submitted to an isoelectrofocalization (linear pH gradients range 3-10 and 5-8) and then separated on SDS-PAGE. Two experiments were done in parallel: (i) a silver staining of the gel and (ii) a transfer and a Western blot using the 6D6 antibody. The Western blot analysis shows the presence of two immunoreactive spots at 40-45kDa with a pHi of 6.1 and 6.9 (Fig. 2A). The corresponding spots (Fig. 2B, arrows) present in the silver stained gel were digested with trypsin and analyzed by MS-MS showing the presence of the mouse CK-B in both spots (29 and 61% of coverage; 42kDa). The presence of two immunoreactive spots is likely due to the presence of a posttranslational modification allowing a switch of pHi. This result suggests that, in mouse brain, the CK-B is bound to EM-like ligand.

Dissociation of CK-B/M-morphine-like alkaloid complexes

10µg of mouse brain extract 0.5 µg of rabbit muscular CK-M (active form) and 2 µg of human CK-B (active form) were tested for morphine-like immunoreactivity. Morphine-like-immunolabel (6D6 anti-morphine antibody) at 42 kDa was observed for brain extract, rabbit CK-M and human brain CK-B. The morphine-like immunoreactive band of 42 kDa corresponds respectively to the monomer CK-B present in the mouse brain, the muscular CK-M and the human CK-B (Fig. 2C). A second diffuse band of 84 kDa was also observed for the human purified CK-B and correspond to the CK-BB (dimers). As observed for the brain extract, urea loading buffer in association with a heat treatment (100°C, 10 min) abolish the morphine-like immunolabel (Fig. 2C).

We have also investigated CK immunoreactivity using both anti-N-ter and C-ter antibodies. The anti-N-ter CK antibody displays an identical immunolabel for brain extract, CK-M and CK-B before and after heat treatments in presence of urea loading buffer (Fig. 2D). Interestingly, the anti-C-terminal CK antibody display a very weak immunolabel for CK in samples not submitted to heat treatment, whereas a stronger immunolabel was

observed after heat treatment (Fig. 2E).

Identical results have been obtained when the experiment was done on membrane treated with urea buffer associated with a heat treatment (data not shown).

This result suggests that anti-C-terminal CK antibody recognize an epitope close to the morphine-binding site: urea buffer associated with heat treatment allow the displacement of the alkaloid and let the epitope free for the anti-C-terminal CK antibody. Our experiments also indicate that native and active human brain CK-B and rabbit muscular CK-M are complexed to a morphine-like molecule. This association may result from the high affinity complex and the gentle purification needed to keep enzymatic activity of CK intact.

We recently published that, in the blood, eM is recovered with a higher yield in lithium-heparinate plasma compared to serum (dry tubes) suggesting that lithium-heparinate (LH) dissociate eM-protein complexes present in the blood. These data, together with the decrease of morphine-like immunoreactivity when LDS is present in the loading buffer (Fig. 1B), strongly suggest that lithium represent a dissociating agent of the eM-CK complex.

In order to investigate the effect of lithium, LH concentration used to recover plasma (17 UI/ml) was tested on purified active CK-M (rabbit muscles; Fig. 3A) and CK-B (human brain, data not shown). LH is able to dissociate CK-morphine-like compound complexes at 37°C (12h), since the treatment dramatically decrease morphine-like immunoreactivity (Fig. 3A). In order to determine if a reassociation of exogenous morphine-like alkaloids can occur, CK was incubated with a mix of alkaloids (morphine, M6G, M3G, codeine; 5µg of each) in presence or absence of LH. No difference of the morphine-like immunoreactivity was observed when CK-M or CK-B were incubated alone with the mix of alkaloid. Whereas LH dissociate the complex (dramatic decrease of eM label), a strong increase for morphine-like compounds immunoreactivity is observed when LH is associated with alkaloids (Fig. 3A).

These data suggests that LH dissociate endogenous alkaloid bound to CK and that the saturating amount of alkaloid is then able to bind “free” sites on both monomer (42kDa band) and dimmers (84kDa band) of CK. Morphine-like immunoreactivity reach a higher immunolabel compared with control CK (incubated 12h at 37°C), indicating that endogenous non immunoreactive morphine-like or non-morphine-like compounds are bound to the native CK.

In order to determine if a specificity of reassociation for a particular alkaloid exists, reassociation assays were

performed with LH in presence of single alkaloid (20µg). Reassociation with morphine alone display the higher reassociation yield compared to M6G, M3G and codeine, showing that a non exclusive reassociation exist but that CK-M display a higher affinity for morphine.

Identical results were obtained for CK-B and brain extracts, indicating that association properties of CK for alkaloids is a common point to CK-B and CK-M that may be due to a conserved protein sequence (data not shown).

To determine if lithium is able to induce the dissociation of the CK-morphine-like complex, mouse brain extract and brain purified human CK-B were treated with an increasing concentration of lithium chloride (LC; 0.1mM to 1M). A complete dissociation of the complex (brain extract and CK-B), observed by a lost of the morphine-like immunoreactivity, occurs for 1M of LC, the dissociation being less effective with lower concentrations and abolished for 0.1mM (i.e., immunoreactivity comparable to the control). As previously observed, the LH (0.51 UI) dissociate the complex. Our experiments also reveal that heparin alone is unable to induce the dissociation of the complex. The same conclusion was obtain using rabbit purified CK-M (data not shown).

Identification of the fragment of CK having an affinity for morphine-like compounds

In order to characterize the fragment of CK able to bind morphine-like compounds, rabbit CK-M was digested with trypsin during different periods of time. First, using a SDS-PAGE, we have determine that low molecular morphine-like-immunoreactive fragments (3-10 kDa) are generated after 3 min, longer digestion leading to a disappear of the immunoreactive bands. On this basis, 100µg of CK-M was digested with trypsin for 3 min and the resulting digestion was submitted to a 2D-gel electrophoresis (pH 3-10) in duplicate. One gel was dedicated to silver staining, whereas the second was transferred onto PVDF membrane and submitted to an immunodetection using the 6D6 anti-morphine antibody. Three immunoreactive spots with low molecular weights (>10 kDa) were localized. MS-MS analysis allows us to determine that these spots correspond to the C-ter sequences 266-381, 308-381, 342-381 of the rabbit CK-M.

DISCUSSION

The present article reports that the C-ter part of the CK-B and CK-M are able to bind morphine, M6G, M3G and codeine with a high affinity. These complexes are resistant to detergent, reducing agents and heat treatments, but

are dissociated by naloxone, lithium and lithium-heparine at 37°C and urea associated with an heat treatment.

Morphine remains the gold standard for pain relief in hospital settings¹. In humans, exogenous morphine is catabolized into M6G (more potent as analgesic than morphine) and M3G (no activity)^{2-4, 39}. Since the early 1970s, eM, structurally identical to morphine from plants, has been characterized in mammals^{1, 7} and its biosynthesis pathway has been shown to derive from dopamine^{1, 7, 8}. In the contrary to the well-studied opioidergic peptides (e.g., enkephalins), the functional role of endogenous alkaloids remains to be elucidated. However, different studies have highlighted the potential use of eM and its derivatives as physiopathological markers for infection¹⁰, inflammation^{16, 17, 40-42}, bulimia and anorexia⁴³, Parkinson disease^{44, 45}, alcoholism⁴⁶⁻⁴⁹ or various mental disorder^{44, 50}. However, the question of the eM level increase as a cause or as a result of pathologies remains unanswered.

The eM field receives a growing interest since 2005 because the synthesis of eM has been now characterized in mammalian cells. However, only few biochemical tools expensive and/or not very specific are available so far to detect and quantify endogenous alkaloids in biological fluids and tissues (ELISA, antibody, MS analysis). In addition, since only three enzymes have been identified to be implicated in eM biosynthetic pathway, those being implicated in multiple important physiological pathways (tyrosine-hydroxylase, CYP2D6, NMT), researcher are unable to produce a relevant eM knockdown model display only eM invalidation. Thus, an urgent need exists for new tools of high accuracy to (i) study eM roles in physiology, (ii) develop diagnostic kits for eM as a marker of pathologies and (iii) to improve existing therapeutic approaches based on morphine action.

The Quantification of eM and its derivatives (codeine, M6G, M3G) in tissues indicated low recovery yield (fmol-pmol/g of tissue). Surprisingly, these data do not fit with eM-levels found in pathological blood samples^{10, 16, 17} or the label observed after brain immunohistochemistry¹⁴. Until now, endogenous alkaloid extraction methods required deproteinization step (chloroform/methanol) to enrich the alkaloid content, the protein pellets being always discarded. Radiolabelled morphine is described to bound covalently proteins in mouse²⁰, to be irreversible bound to insoluble tissue components 48h after its injection¹⁹, and to last in CNS up to 3 weeks¹⁸. In addition, incubation of 3H-morphine with rat hepatocytes extracts leads to a covalent binding to a 40-50 kDa proteins, as indicated by the radioactivity recovered from the protein precipitate^{21, 22}. Few morphine-binding proteins have

not been identified so far and include, serum albumin and alpha 1-acid glycoprotein^{23, 24}, as well as the phosphatidylethanolamine-binding protein that display an affinity for M6G and M3G and not for morphine²⁵.

BIBLIOGRAPHIE

1. Stefano, G.B. et al. Endogenous morphine. *Trends Neurosci* 23, 436-442. (2000).
2. Lotsch, J. & Geisslinger, G. Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clin Pharmacokinet* 40, 485-499 (2001).
3. Lotsch, J. Opioid metabolites. *J Pain Symptom Manage* 29, S10-24 (2005).
4. Coller, J.K., Christrup, L.L. & Somogyi, A.A. Role of active metabolites in the use of opioids. *Eur J Clin Pharmacol* 65, 121-139 (2009).
5. Stefano, G.B. & Scharrer, B. The presence of the mu3 opiate receptor in invertebrate neural tissues. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 113, 369-373 (1996).
6. Muller, A. et al. Endogenous Morphine in SH-SY5Y Cells and the Mouse Cerebellum. *PLoS One* 3, Epub www.plosone.org/doi/pone.0001641 (2008).
7. Goumon, Y., Laux, A., Muller, A. & Aunis, D. Central and Peripheral Endogenous Morphine. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 75, 389-418 (2009).
8. Neri, C. et al. Dopamine is necessary to endogenous morphine formation in mammalian brain in vivo. *J Neurochem* 106, 2337-2344 (2008).
9. Goumon, Y. et al. Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules. *J Biol Chem* 281, 8082-8089 (2006).
10. Glattard, E. et al. Endogenous Morphine Levels are Increased in Sepsis: a Partial Implication of Neutrophils. *PLoS One* 1, e8791 (2010).
11. Zhu, W., Cadet, P., Baggerman, G., Mantione, K.J. & Stefano, G.B. Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation. *J Immunol* 175, 7357-7362 (2005).
12. Muller, A. et al. Endogenous morphine in SH-SY5Y cells and the mouse cerebellum. *PLoS One* 3, e1641 (2008).
13. Charron, G. et al. Dramatic rise in endogenous morphine-like compound immunoreactivity in parkinsonism. *Brain* (2011).
14. Laux, A. et al. Mapping of endogenous morphine-like compounds in the adult mouse brain: Evidence of their localization in astrocytes and GABAergic cells. *J Comp Neurol* (2011).
15. Heurtaux, T. et al. Induction of UGT1A6 isoform by inflammatory conditions in rat astrocytes. *Neuropharmacology* 50, 317-328 (2006).
16. Brix-Christensen, V. et al. Endogenous morphine is produced in response to cardiopulmonary bypass in neonatal pigs. *Acta Anaesthesiol Scand* 44, 1204-1208 (2000).
17. Brix-Christensen, V., Tonnesen, E., Sanchez, R.G., Bilfinger, T.V. & Stefano, G.B. Endogenous morphine levels increase following cardiac surgery as part of the antiinflammatory response? *Int J Cardiol* 62, 191-197 (1997).
18. Misra, A.L., Mitchell, C.L. & Woods, L.A. Persistence of morphine in central nervous system of rats after a single injection and its bearing on tolerance. *Nature* 232, 48-50 (1971).

19. Mullis, K.B., Perry, D.C., Finn, A.M., Stafford, B. & Sadee, W. Morphine persistence in rat brain and serum after single doses. *J Pharmacol Exp Ther* 208, 228-231 (1979).
20. Nagamatsu, K., Kido, Y., Terao, T., Ishida, T. & Toki, S. Studies on the mechanism of covalent binding of morphine metabolites to proteins in mouse. *Drug Metab Dispos* 11, 190-194 (1983).
21. Nagamatsu, K. & Hasegawa, A. Covalent binding of morphine to isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 43, 2631-2635 (1992).
22. Nagamatsu, K. & Hasegawa, A. Effect of sodium selenite on morphine-induced hepatotoxicity in mice. *Drug Chem Toxicol* 16, 241-253 (1993).
23. Olsen, G.D., Bennett, W.M. & Porter, G.A. Morphine and phenytoin binding to plasma proteins in renal and hepatic failure. *Clin Pharmacol Ther* 17, 677-684 (1975).
24. Leow, K.P., Wright, A.W., Cramond, T. & Smith, M.T. Determination of the serum protein binding of oxycodone and morphine using ultrafiltration. *Ther Drug Monit* 15, 440-447 (1993).
25. Atmanene, C. et al. Characterization of human and bovine phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP) interactions with morphine and morphine-glucuronides determined by noncovalent mass spectrometry. *Med Sci Monit* 15, BR178-187 (2009).
26. Van Laar, V.S., Mishizen, A.J., Cascio, M. & Hastings, T.G. Proteomic identification of dopamine-conjugated proteins from isolated rat brain mitochondria and SH-SY5Y cells. *Neurobiol Dis* 34, 487-500 (2009).
27. Kimura, A. et al. Identification of an imidazoline binding protein: creatine kinase and an imidazoline-2 binding site. *Brain Res* 1279, 21-28 (2009).
28. Hudson, A.L., Nutt, D.J., Barton, C.L. & Hutson, P.H. 72 Hour morphine treatment decreases the density of imidazoline-2 sites in rat brain. *J. Psychopharmacol* 10, A19 (1996).
29. Sastre, M., Ventayol, P. & Garcia-Sevilla, J.A. Decreased density of I2-imidazoline receptors in the postmortem brain of heroin addicts. *Neuroreport* 7, 509-512 (1996).
30. Boronat, M.A., Olmos, G. & Garcia-Sevilla, J.A. Attenuation of tolerance to opioid-induced antinociception and protection against morphine-induced decrease of neurofilament proteins by idazoxan and other I2-imidazoline ligands. *Br J Pharmacol* 125, 175-185 (1998).
31. Boronat, M.A., Olmos, G., Miller, D.D., Patil, P.N. & Garcia-Sevilla, J.A. Isothiocyanatobenzyl imidazoline is an alkylating agent for I2-imidazoline binding sites in rat and rabbit tissues. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357, 351-355 (1998).
32. Dardonville, C., Jagerovic, N., Callado, L.F. & Meana, J.J. Fentanyl derivatives bearing aliphatic alkaneguanidinium moieties: a new series of hybrid molecules with significant binding affinity for mu-opioid receptors and I2-imidazoline binding sites. *Bioorg Med Chem Lett* 14, 491-493 (2004).
33. Dardonville, C. & Rozas, I. Imidazoline binding sites and their ligands: an overview of the different chemical structures. *Med Res Rev* 24, 639-661 (2004).
34. Escriba, P.V. et al. Pharmacological modulation of immunoreactive imidazoline receptor proteins in rat brain: relationship with non-adrenoceptor [3H]-idazoxan binding sites. *Br J Pharmacol* 118, 2029-2036 (1996).
35. Gentili, F. et al. Novel ligands rationally designed for characterizing I2-imidazoline binding sites nature and functions. *J Med Chem* 51, 5130-5134 (2008).
36. Wyss, M. & Kaddurah-Daouk, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80, 1107-1213 (2000).
37. Brancaccio, P., Lippi, G. & Maffulli, N. Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med* 48, 757-767 (2010).
38. Maffulli, N., Brancaccio, P. & Lippi, G. Biochemical markers of muscular damage. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 48, 757-767 (2010).
39. Lotsch, J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of opioids. *J Pain Symptom Manage* 29, S90-103 (2005).
40. Goumon, Y. et al. Lipopolysaccharide increases endogenous morphine levels in rat brain. *Neurosci Lett* 293, 135-138 (2000).
41. Madbouly, K.M., Senagore, A.J. & Delaney, C.P. Endogenous morphine levels after laparoscopic versus open colectomy. *Br J Surg* 97, 759-764 (2010).
42. Yoshida, S. et al. Effect of surgical stress on endogenous morphine and cytokine levels in the plasma after laparoscopic or open cholecystectomy. *Surg Endosc* 14, 137-140 (2000).
43. Marrazzi, M.A., Luby, E.D., Kinzie, J., Munjal, I.D. & Spector, S. Endogenous codeine and morphine in anorexia and bulimia nervosa. *Life Sci* 60, 1741-1747 (1997).
44. Arun, P., Ravikumar, A., Leelamma, S. & Kurup, P.A. Endogenous alkaloids in the brain of rats loaded with tyrosine/tryptophan & in the serum of patients of neurodegenerative & psychiatric disorders. *Indian J Med Res* 107, 231-238 (1998).
45. Matsubara, K., Fukushima, S., Akane, A., Kobayashi, S. & Shiono, H. Increased urinary morphine, codeine and tetrahydropapaveroline in parkinsonian patient undergoing L-3,4-dihydroxyphenylalanine therapy: a possible biosynthetic pathway of morphine from L-3,4-dihydroxyphenylalanine in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 260, 974-978 (1992).
46. Cashaw, J.L. Determination of Tetrahydropapaveroline in the Urine of Parkinsonian-Patients Receiving L-Dopa Carbidopa (Sinemet) Therapy by High-Performance Liquid-Chromatography. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 613, 267-273 (1993).
47. Cashaw, J.L. Tetrahydropapaveroline in Brain-Regions of Rats after Acute Ethanol Administration. *Alcohol* 10, 133-138 (1993).
48. Collins, M.A. Tetrahydropapaveroline in Parkinson's disease and alcoholism: a look back in honor of Merton Sandler. *Neurotoxicology* 25, 117-120 (2004).
49. Gintzler, A.R., Mohacsi, E. & Spector, S. Radioimmunoassay for the simultaneous determination of morphine and codeine. *Eur J Pharmacol* 38, 149-156 (1976).
50. Charlet, A. et al. Abnormal nociception and opiate sensitivity of STOP null mice exhibiting elevated levels of the endogenous alkaloid morphine. *Mol Pain* 6, 96 (2010).

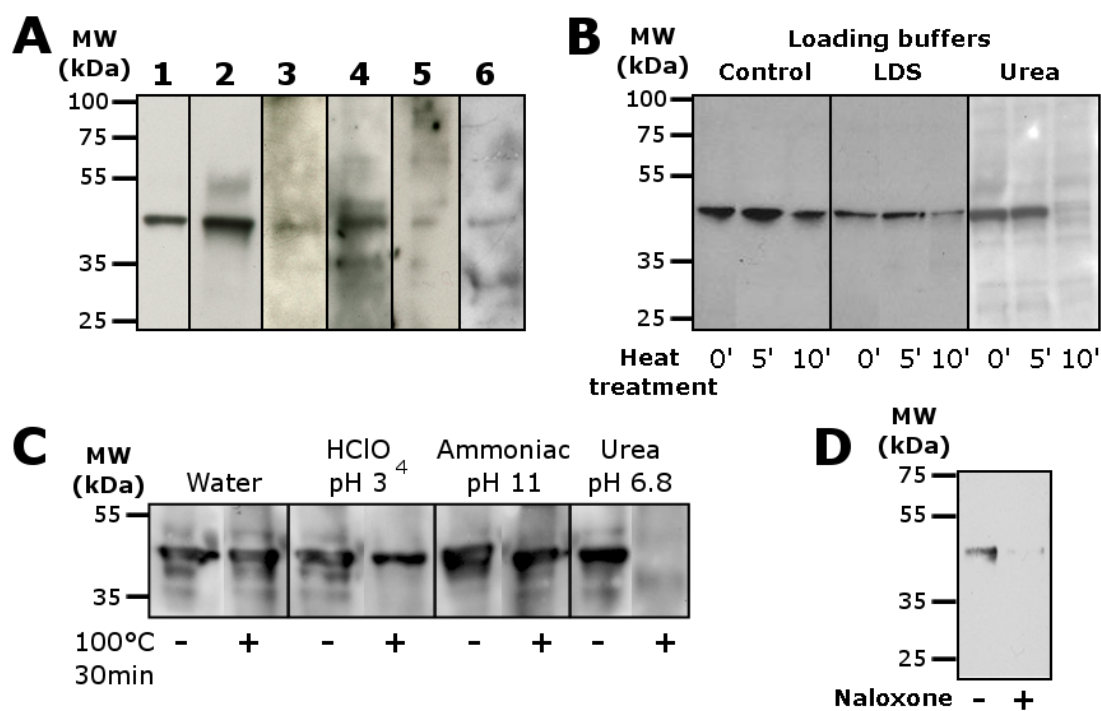


Figure 1

Western blot analysis of the EM-like immunoreactivity- A, Western blot analysis performed on mouse brain extracts using different anti-morphine antibodies. 20 μ g of brain extracts were loaded without heat treatment (control loading buffer) on 12% SDS-PAGE and the resulting gel was transferred onto PVDF membrane. Immunodetection was performed with the (1) 6D6, (2) 3A6, (3) ABD6330-0004, (4) ABD6330-0014, (5) G61 and (6) R-49 antibodies. EM-like immunolabel at 40-45 KDa is observed. B, Effect of control, LDS (lithium dodecyl sulphate) and urea sample loading buffers and of an heat treatment on EM-like immunoreactivity (6D6 anti-morphine antibody). C, Western blot analysis of the EM-like immunoreactivity of the 40-45 kDa band after different PVDF membrane treatments (water; 0.1M HClO₃ pH 3.3; pH 11; 0.44M ammoniac pH 11; 4M urea in 60mM Tris-HCl pH6.8) and with our without heat treatment (100°C, 30 min). Brain extracts (20 μ g) were loaded on 12% SDS-PAGE without heat treatment (urea loading buffer containing urea) and the resulting gel was transferred onto PVDF membrane. Immunodetection was performed with the) 6D6 anti-morphine antibody. D, Effect of naloxone on EM-like immunoreactivity at 37°C (6D6 anti-morphine antibody).

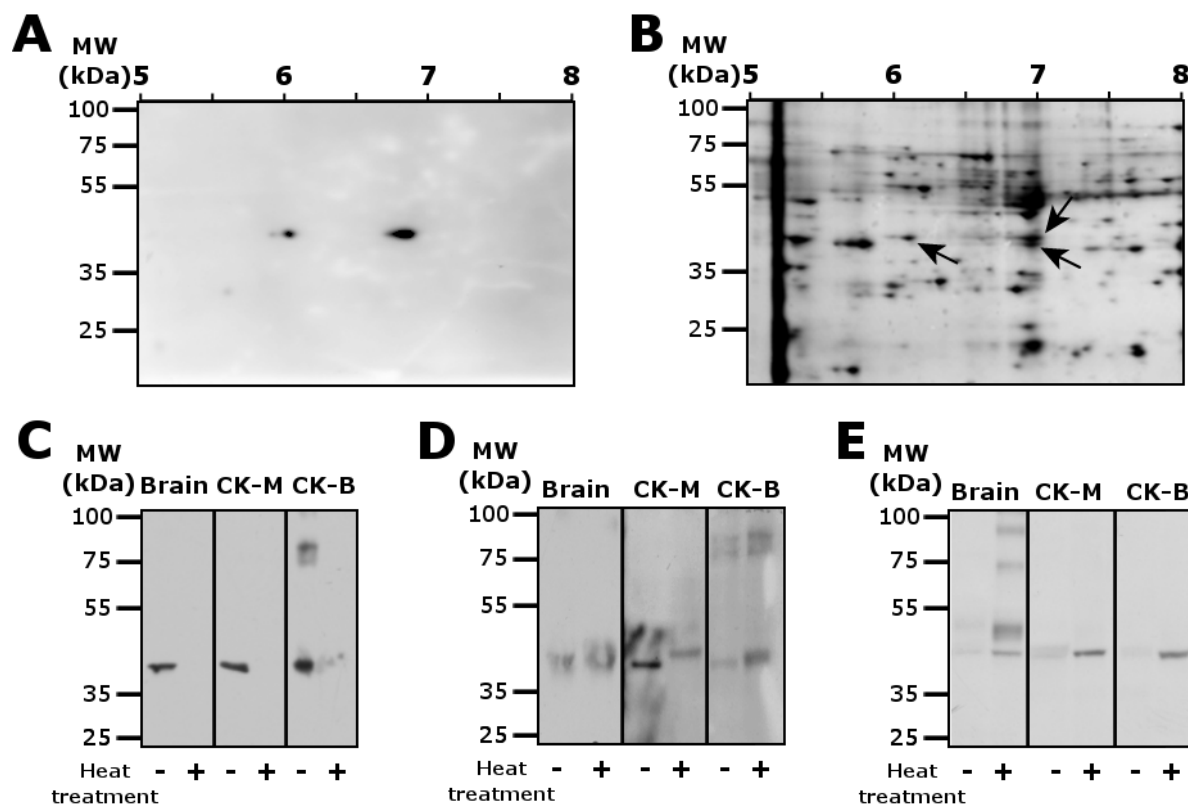


Figure 2

Characterization of the EM-like immunolabelled protein present in the mouse brain and dissociation of the morphine-like-ligand- A, Western blot analysis performed on mouse brain extracts after 2D gel eletrophoresis. 125µg of brain extract was submitted to 2D-gel electrophoresis and the resulting gel was transferred onto PVDF membrane. Immunodetection was performed with the 6D6 antibody. Two EM-like immunolabel at 40-45 KDa are observed. B, Silver staining of the corresponding gel. Arrows localize the immunoreactive spots. C, Western blot analysis of the EM-like immunoreactivity using the 6D6 antibody on brain extract (10µg), CK-M (0.5µg) and CK-B (2µg) before and after heat treatment (100°C, 10 min). D, Western blot analysis of the N-ter CK immunoreactivity before and after heat treatment (100°C, 10 min). E, Western blot analysis of the C-ter CK immunoreactivity after heat treatment (100°C, 10 min).

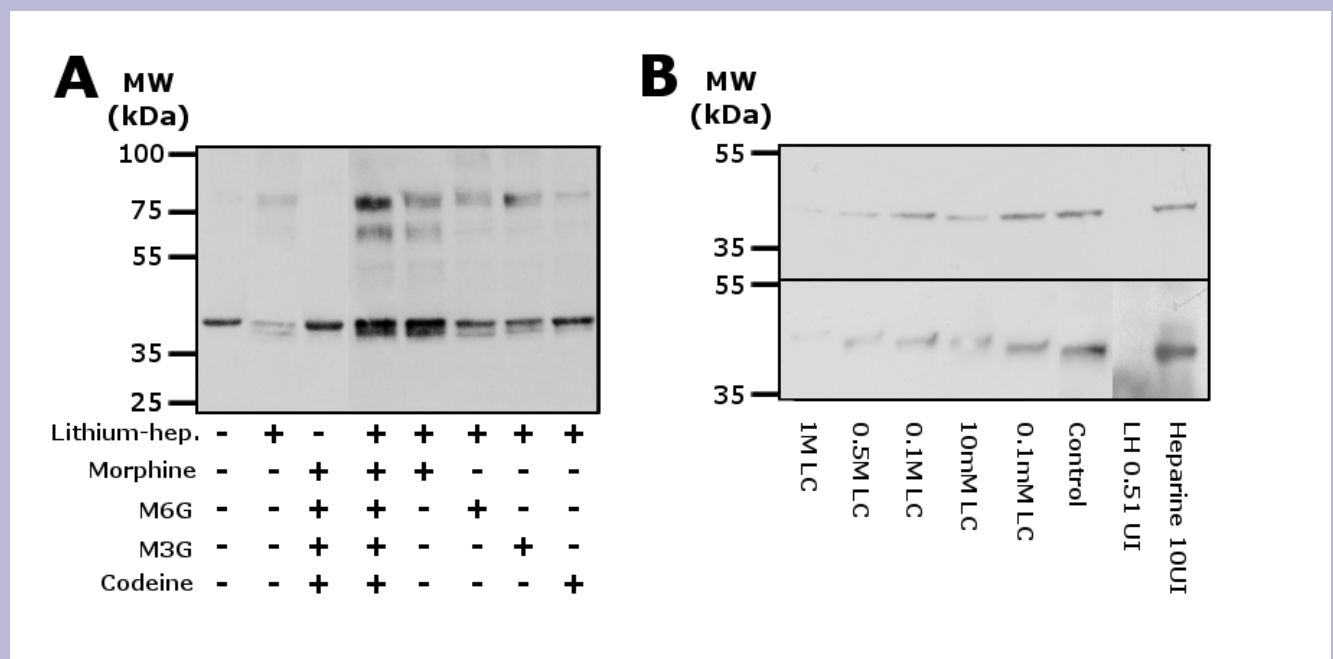


Figure 3

Dissociation and association of the CK-alkaloids complex- A, Western blot analysis performed on 1 μ g of CK-M purified from rabbit muscles. CK-M was treated with LH (0.51UI/30 μ l) in presence of alkaloids (morphine+M6G+M3G+codeine), morphine, M6G, M3G or codeine (12h at 37°C). Morphine-like immunolabel was visualized with the 6D6 anti-morphine antibody. B, Effect of LC, LH and heparin on morphine-like-CK complex in mouse brain (higher panel) and human brain CK (lower panel). Dissociation of the complex is observed when 6D6-immunolabel decrease.

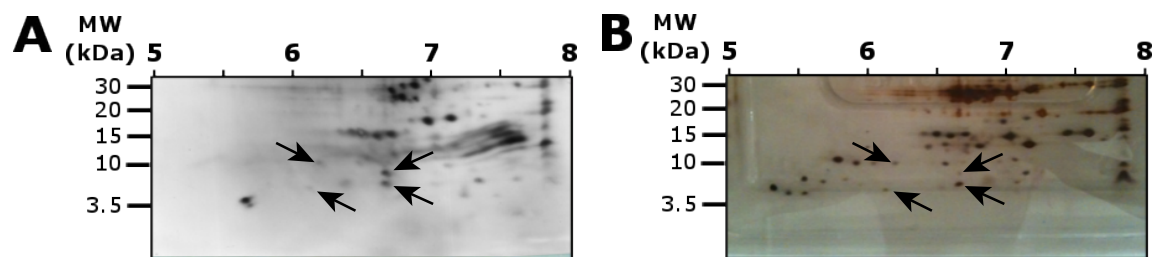


Figure 4

Identification of the EM-like immunolabelled peptides after a trypsin digestion of the CK-M- A, 100 μ g of CK-M digested for 3min were submitted to 2D-gel electrophoresis and the resulting gel was transferred onto PVDF membrane. Immunodetection was performed with the 6D6 antibody. B, Silver staining of the corresponding gel. Arrows point immunoreactive spots of interest.

PARTIE 3

Une application possible de la dissociation des complexes protéines-morphine : le dosage de la morphine endogène et exogène dans des échantillons sanguins

I. RÉSUMÉ

I.1. Contexte et question posée

Les taux circulants de morphine endogène sont décrits pour varier de manière importante lors de certaines conditions pathologiques et physiologiques. Ainsi, que ce soit lors d'un « stress » alimentaire (boulimie, anorexie, jeûne), lors de certains traitements pharmacologiques (L-DOPA), ou lors de situations inflammatoires ou infectieuses, de nombreuses études ont décrit, chez l'homme et l'animal, une augmentation des taux sanguins ou tissulaires de morphine endogène (pour revues : Goumon et al., 2009a; Goumon et al., 2009b; Perea-Sasiain, 2008). Par ailleurs, toutes les pathologies impliquant la dopamine (précurseur de la morphine) seraient susceptibles de provoquer une variation des taux de morphine endogène, qui pourrait ainsi potentiellement représenter un bio-marqueur pathologique sanguin. Dans ce sens, une étude menée par notre équipe et à laquelle j'ai participé pendant ma première année de thèse, a mis en évidence une élévation des taux sanguins de morphine endogène chez des patients septiques (Glattard et al., 2010), suggérant que la morphine pourrait représenter un marqueur des infections systémiques.

Ces données soulignent l'importance que la morphine endogène pourrait apporter dans le dépistage et le diagnostic de certaines pathologies.

A l'heure actuelle, il n'existe aucun consensus concernant le protocole de dosage de la morphine endogène dans des échantillons sanguins. La description dans la partie précédente de la présence de protéines de liaison de la morphine endogène pourrait apporter certaines explications quant aux difficultés de sa détection. En effet, la liaison de la morphine à des protéines pourrait empêcher sa détection par les kits de dosage (p. ex., ELISA). De plus, les complexes de haute affinité « protéine-morphine » pourraient être perdus lors de l'étape de précipitation des protéines nécessaire au dosage de la morphine endogène/exogène dans les tissus. Ces différentes hypothèses suggèrent que la dissociation de ces complexes, avant le dosage de la morphine endogène, pourrait en améliorer le rendement. Or, la partie précédente

de mes résultats décrit que le lithium (un agent chaotrope) est capable de dissocier le complexe CK-alcaloïdes endogènes, suggérant qu'il permettrait d'augmenter la biodisponibilité de la morphine, et ainsi les quantités de morphine endogène détectées dans des échantillons biologiques.

Que ce soit pour les prélèvements sanguins de routine ou d'urgence, les tubes lithium-héparinés (plasma-LH), les tubes citrate (plasma-citrate) et les tubes « sec » (sérum) sont les plus utilisés en clinique. L'objectif de cette partie a été de comparer les taux de morphine endogène/exogène détectés dans des échantillons sanguins prélevés dans ces différents types de tube en ayant pour but de déterminer les conditions optimales de dosage de la morphine endogène et exogène.

► **Existe-t-il une corrélation entre les taux de morphine endogène et exogène mesurés lors d'un prélèvement sanguin et le type de prélèvement réalisé ?**

Les résultats obtenus dans cette partie ont donné lieu à la rédaction d'une lettre à l'éditeur de « Clinical Chemistry » actuellement en cours d'évaluation (Publication 5).

I.2. Approches & Résultats

Afin de mesurer les taux de morphine endogène et/ou exogène dans les échantillons sanguins, nous avons utilisé un kit ELISA commercial spécifique de la morphine. Nous avons dans un premier temps décrit que la présence d'héparinate de lithium n'interfère pas avec la détection réalisée à l'aide du kit ELISA.

Deuxièmement, des quantités connues de morphine exogène ont été ajoutées, avant les prélèvements sanguins, dans les trois types de tubes commerciaux les plus utilisés en milieu hospitalier : des tubes secs (tubes Sérum), contenant du citrate (tubes plasma-citrate), ou de l'héparinate de lithium (tubes plasma-LH). Nous avons quantifié les taux de morphine dans chacun des échantillons et observé que 86% de la morphine de départ est retrouvée dans les échantillons Plasma LH tandis que seulement 42% et 38% de la morphine de départ est retrouvée dans les tubes sérums et plasma citrate.

Finalement nous avons quantifié les taux de morphine endogène et exogène dans les échantillons sanguins de 80 patients souffrant de pathologies sévères, prélevés d'une part dans des tubes sérums et d'autre part dans des tubes plasma LH. Nos résultats ont montré une diminution moyenne de 65% des taux de morphine endogène (patients naïfs à la morphine,

n=56) et de 78% des taux de morphine exogène/endogène (patients ayant reçu de la morphine, n=8) lorsque les échantillons sont prélevés dans des tubes sérums, comparés aux échantillons plasma-LH.

I.3. Conclusions

Nos résultats démontrent que plus de la moitié de la morphine endogène ou exogène présente dans les échantillons sanguins n'est pas détectée lorsque les échantillons ne sont pas traités à l'héparinate de lithium. L'utilisation de tube lithium héparine permet donc une meilleure détection de la morphine endogène, mais également exogène, dans des échantillons sanguins. Le lithium, qui est un agent chaotrope, serait responsable de la dissociation de complexes morphine-protéines ce qui permettrait d'obtenir plus de morphine libre détectable.

Cette partie de mes travaux a amené à l'obtention d'un nouvel outil permettant d'augmenter les quantités de morphine endogène et exogène « libre » pouvant être détectées dans les échantillons sanguins. Ainsi, un traitement au lithium de tout tissu ou fluide biologique pourrait permettre d'augmenter la biodisponibilité de la morphine endogène/exogène détectable et d'augmenter les rendements actuels de détection. De plus, d'un point de vue thérapeutique, le lithium pourrait également être utilisé pour le traitement de certaines pathologies. Cet outil fait également l'objet d'un dépôt de brevet, dont les perspectives seront détaillées dans le dernier chapitre de ce manuscrit.

- ▶ **Brevet n°3** : En cours de dépôt : Goumon Y., Laux-Biehlmann A., Stuber D., Schneider F., Welter I.D., Gräfe N. – D.I. N° 04170-03 : « Utilisation du lithium et de ses dérivés pour le dosage ou l'extraction des alcaloïdes endogènes et exogènes dans les fluides biologiques et les tissus ».

II. PULICATION 5

**USE OF SERUM OR LITHIUM-HEPARINATE PLASMA FOR THE
MEASUREMENT OF ENDOGENOUS AND EXOGENOUS
MORPHINE LEVELS?**

Laux-Biehlmann A., Gräfe N., Mouheiche J., Stuber D., Welter I.D.,
Schneider F. & Goumon Y.

British Journal of Clinical Pharmacology
Sous Presse

Comparative Use of Serum and Lithium-Heparinate Plasma for the Effective Measurements of Endogenous and Exogenous Morphine Levels

**Alexis Laux-Biehlmann¹, Nadja Gräfe^{1,3}, Denise Stuber¹, Ingeborg D. Welters^{2,3},
Pierrick Poisbeau¹, Francis Schneider⁴ & Yannick Goumon¹**

¹ Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique and University of Strasbourg, Strasbourg, France

² Critical Care Research Unit, School of Clinical Sciences, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom

³ Abteilung für Anaesthesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen, Giessen, Germany,

⁴ Réanimation Médicale, Hôpitaux Universitaires, Faculté de Médecine and University of Strasbourg, Strasbourg, France

Corresponding author: Dr. Yannick Goumon, INCI, CNRS UPR3212 ; 5, rue Blaise Pascal, F- 67084 Strasbourg Cedex, France. e-mail: yannick.goumon@inserm.u-strasbg.fr

Phone.: (33)-3-88-45-67-18 ; Fax: (33)- +33 (0)3-88-60-16-64 .

Keywords: measurement, morphine, serum, plasma, lithium, heparin

List abbreviations: BSA, Bovine serum albumin; CV, coefficient of variation; ELISA, Enzyme-linked immunoadsorbent assay; eM, endogenous morphine; L-DOPA, L-3,4-dihydroxyphenylalanine.

Sous Presse dans *British Journal of Clinical Pharmacology*

TO THE EDITOR:

To the Editor: Endogenous morphine (eM) is synthesized from dopamine in mammalian cells (1, 2) and has a structure identical to that of morphine from poppies. A growing number of studies suggest that eM is an important modulator in physiological and pathophysiological states. Thus, patients with sepsis have significantly higher circulating eM levels compared to patients with systemic inflammatory response syndrome and healthy donors (3). Elevated eM levels in the blood of patients were found in other pathological conditions, (cardiovascular bypass, Parkinson) (2, 4). Lipopolysaccharide treatments are also associated with increases in eM levels in rats. These data support that circulating eM levels might serve as a biomarker in various pathologies (3).

Because of the usually low circulating levels of eM (0-25ng/ml), a highly sensitive procedure for eM quantification is needed. No consensus exists regarding blood sample preparation for morphine measurement. Since lithium-heparinate and serum samples are used for emergency and routine measurements at the hospital, we have compared the eM levels detected using these two different procedures.

This study was approved by our institutional review board for human experimentation. The samples were collected from patients who required laboratory analyses and who gave written informed consent. Blood from 80 patients was collected at the same time in two types of sampling tubes. (i) For serum analysis, blood was collected in dry tubes (BD, ref: 377615), and serum was obtained after centrifugation (4°C, 4000rpm, 10min). (ii) For plasma analysis, blood was collected in lithium-heparinate tubes (BD, ref: 367378, 17UI/ml), and plasma was recovered after centrifugation (4°C, 4000rpm, 10min). Plasma and serum morphine levels were quantified using a commercially available morphine specific ELISA kit (ref 213-0480, Immunalysis Corporation) (3). The plasma or

serum samples were tested in duplicates (40µL), and coefficients of variation (CV) of <8% were accepted. Samples with higher CVs were tested again to obtain CVs below 8%. For all tests, morphine standards (0-25ng/ml) were diluted in 1% PBS-BSA (w/v) for serum samples and in 1% PBS-BSA (w/v) containing lithium-heparinate (17UI/ml) for plasma samples. In this study, the calculated detection limit for the batch of ELISA kit was 0.1ng/ml of morphine.

As a control experiment, known concentrations of morphine diluted in PBS or PBS-lithium-heparin buffer were first tested using our ELISA procedure. No differences were observed, showing that lithium-heparinate does not affect morphine detection.

In a second step, known concentrations of morphine were added to serum and lithium-heparinate tubes prior to fresh blood collection (healthy donors, n=4). In the plasma samples, 86 % of the initial morphine concentration was recovered, whereas only 42 % was recovered in serum samples.

Finally, 80 patients were included in three groups: (i) healthy donors (n=16), (ii) morphine treated patients (morphine's skin patch 12-48 hours before blood collection, 20 mg/day, n=8), and (iii) non selected critically ill patients (naive for morphine and with various pathologies, n=56). In healthy donors, eM was undetectable in both serum and plasma samples. In morphine-treated patients (Fig.1, cross), the mean morphine concentrations in serum samples ranged from 3.2 ng/ml to 31 ng/ml, whereas those in plasma were between 25.7 ng/ml and 114.8 ng/ml. Compared to plasma levels, morphine concentrations in the serum were on average 78%±15% lower. In critically ill patients (Fig.1, dots), eM levels ranged between 0 ng/ml (not detectable) and 23.6 ng/ml in serum samples and between 0.15 ng/ml and 76.3 ng/ml in plasma samples. Again, eM serum concentrations were significantly lower (from +13% to -98%; mean=-65±32%) compared to plasma,

As shown in figure 1, the concentration of

eM or exogenous morphine was systematically higher in plasma compared to serum for 61 of 64 patients. Together, our results show that lithium-heparin tubes are most appropriate to quantify precisely exogenous and endogenous morphine concentration in blood samples. A hypothesis explaining the failure of free morphine quantification in serum is currently under investigation and may involve binding of morphine to blood proteins. Different morphine-binding proteins have been identified so far and include serum albumin and alpha 1-acid glycoprotein (5). Interestingly, exogenous morphine detection in the blood has been shown to highly depend on urea and albumin levels, suggesting an important link between morphine-binding proteins and morphine bioavailability (5). Interestingly, lithium is being considered as a chaotropic/denaturing agent and may increase the amount of free and detectable morphine.

In vivo, the release of eM in the blood is likely to occur during stress or pathological situations. eM is playing a major role in numerous physiological and pathophysiological

processes, we demonstrate here that accurate determination of blood morphine concentrations requires analysis from lithium-heparinate plasma instead of serum samples.

REFERENCES

1. Boettcher C, Fellermeier M, Boettcher C, Drager B, Zenk MH. How human neuroblastoma cells make morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8495-500.
2. Goumon Y, Laux A, Muller A, Aunis D. Central and Peripheral Endogenous Morphine. *An R Acad Nac Farm* 2009;75:389-418.
3. Glattard E, Welters ID, Lavaux T, Muller A, Laux A, Zhang D, et al. Endogenous Morphine Levels are Increased in Sepsis: a Partial Implication of Neutrophils. *PLoS One* 2010;1:e8791.
4. Charron G, Doudnikoff E, Laux A, Berthet A, Porras G, Canron MH, et al. Dramatic rise in endogenous morphine-like compound immunoreactivity in parkinsonism. *Brain* 2011;in press.
5. Leow KP, Wright AW, Cramond T, Smith MT. Determination of the serum protein binding of oxycodone and morphine using ultrafiltration. *Ther Drug Monit* 1993;15:440-7.

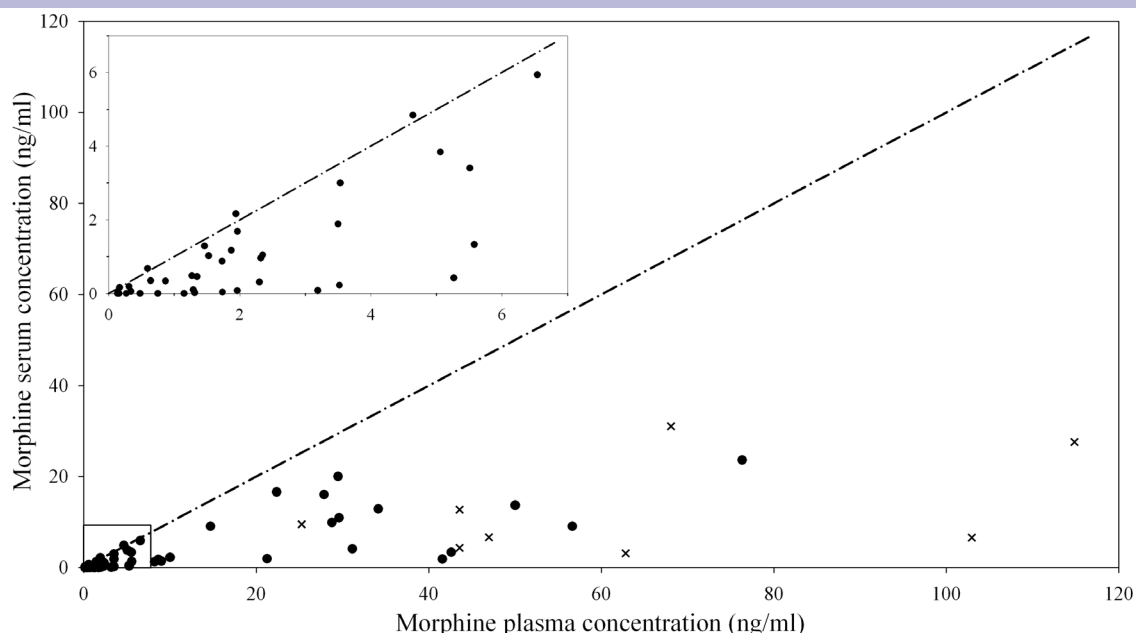


Figure 1

Concentrations of morphine in serum expressed as a function of the corresponding morphine plasma concentrations in critically ill patients ($n=56$, dots) and in morphine-treated patients ($n=8$, cross). Upper corner graph shows a higher magnification of these results for the lowest concentrations found. All patients below the dashed line exhibited higher concentrations of morphine in the plasma than in the serum.



Chapitre 4 :



DISCUSSION

DISCUSSION

I. LA SYNTHÈSE DE LA MORPHINE ENDOGÈNE AU SEIN DU SNC : DERNIÈRES AVANCÉES

I.1. La synthèse au sein des cellules catécholaminergiques, une généralité ?

Depuis la découverte et la caractérisation en 2005 de la voie de synthèse de la morphine endogène chez les mammifères (Boettcher et al., 2005; Poeaknapo, 2005), peu d'avancées concernant cette voie de synthèse ont été réalisées. La synthèse de la morphine endogène dans le neuroblastome humain catécholaminergique (SH-SY5Y) a démontré que celle-ci dérivait de la dopamine. Il a donc été postulé que la synthèse de la morphine endogène pouvait se dérouler au sein des cellules cathécolaminergiques et notamment en périphérie sur la base de sa synthèse par des cellules de ce type incluant les cellules chromaffines (Goumon et al., 2000b; Goumon et al., 2005), les PMN (Zhu et al., 2005) et les MN (Boettcher et al., 2006). Au sein du SNC, l'absence de morphine endogène dans le cerveau de souris K.O pour la TH a été décrite, suggérant que la dopamine est nécessaire à la formation de la morphine endogène (Neri et al., 2008). De plus, nous avons montré en 2010 une augmentation des taux cérébraux de morphine endogène chez les souris STOP (stable tubule only peptide), un modèle animal, possédant certains aspects de la schizophrénie ainsi qu'un caractère hyperdopaminergique (figure 15)(Charlet et al., 2010). J'ai également montré (résultats non publiés) que la déplétion intracellulaire de dopamine des SH-SY5Y, un neuroblastome humain, induit une disparition de la morphine endogène (figure 16). Ensemble, ces résultats suggèrent que la dopamine est nécessaire à la formation de morphine endogène au sein du SNC.

Cependant, plusieurs lignées cellulaires tumorales non cathécolaminergiques ont été décrites comme étant capables de synthétiser de *novo* la morphine endogène (Poeaknapo et al., 2004). Ces cellules sont les JEG-3 (cellules placentaires), HepG2 (Cellules hépatiques) et HaCaT (cellules épithéliales de la peau). D'autres comme les DAN-G (cellules pancréatiques) sont

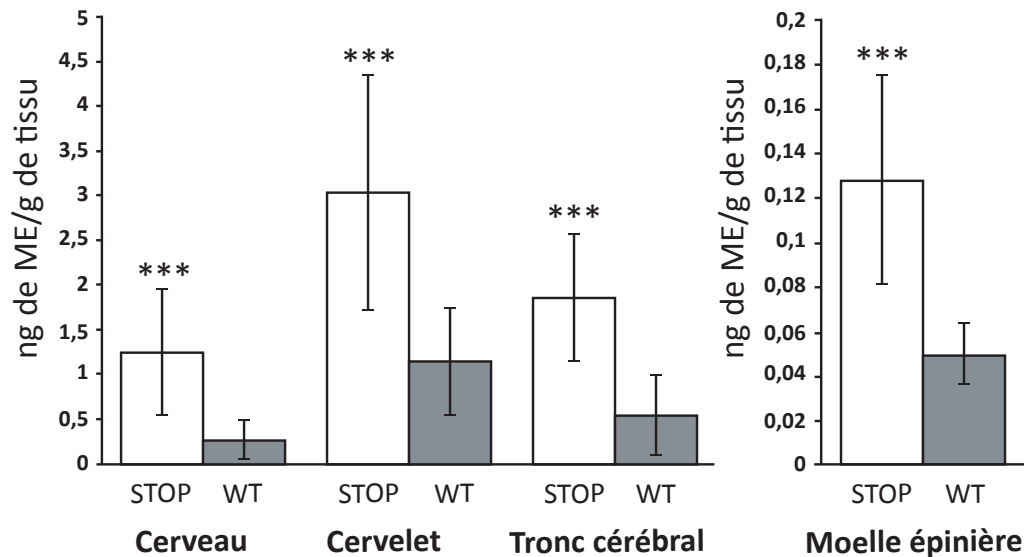


Figure 15 : Quantités de morphine endogène détectées dans le SNC de souris sauvages ou de souris STOP. D'après, Charlet et al., 2010. Quantités de morphine endogène déterminées dans le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral (sauvages, $n=10$; STOP, $n=13$) et dans la moelle épinière (sauvages, $n=9$; STOP, $n=9$). Test de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

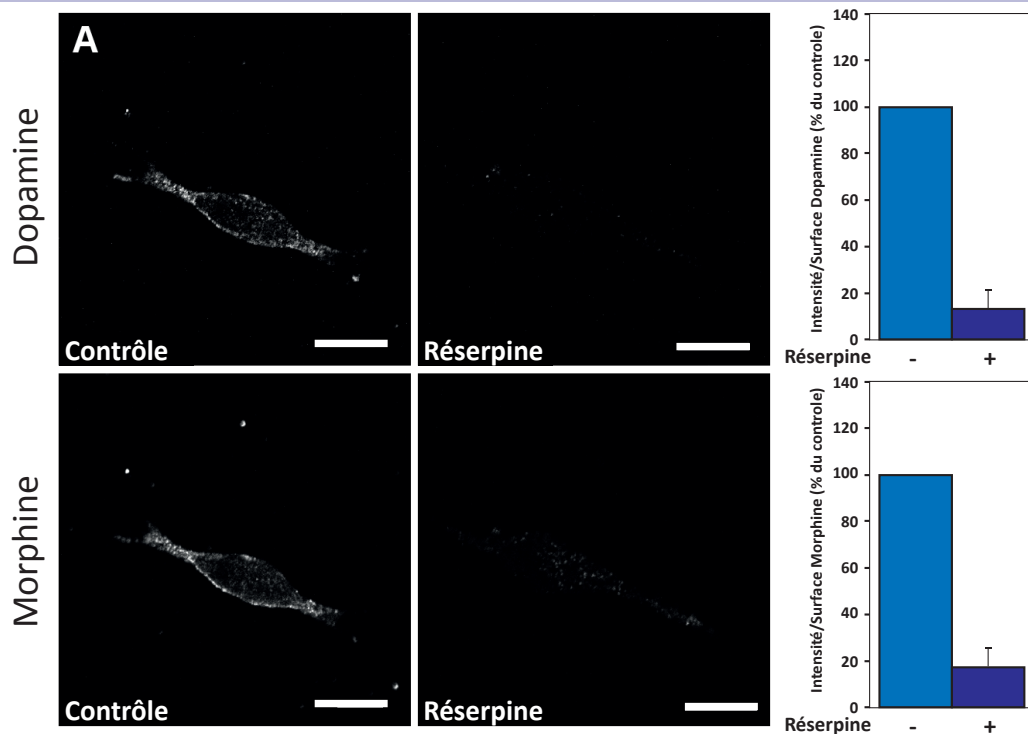


Figure 16 : Déplétion de la morphine endogène et de la dopamine intracellulaire dans les SH-SY5Y par un traitement à la réserpine. La réserpine est un inhibiteur de la VMAT qui est décrit pour dépléter le contenu intracellulaire en dopamine de ces cellules. **A** : Effet du traitement à la réserpine ($10\mu\text{M}$, 14h) sur l'immunoréactivité à la dopamine (en haut, anticorps ab6427, Abcam, $1/6000$) et la morphine endogène (en bas, anticorps 6D6, Aviva Systems Biology; $1/3000$). **B** : Quantification de l'intensité de l'immunoréactivité ($n=20$; intensité/surface; % du contrôle). Échelles = $10\mu\text{m}$.

seulement capables de synthétiser des précurseurs (THP, réticuline). Ces résultats suggèrent que la synthèse de la morphine endogène n'est pas restreinte aux cellules cathécolaminergiques et que de nouveaux intermédiaires ou enzymes pourraient être découverts. Ainsi, les résultats de ma cartographie des alcaloïdes endogènes au sein du SNC de souris adultes apportent de nouveaux éléments (publications 1 & 2; Laux et al., 2011). En effet, j'ai décrit pour la première fois que les cellules dopaminergiques du SNC ne contiennent pas d'alcaloïdes endogènes, alors que les neurones GABAergiques et les astrocytes en contiennent. La synthèse de la morphine endogène au sein du SNC est donc plus complexe que celle postulée sur la base des données obtenues sur les SH-SY5Y et pourrait faire intervenir différents partenaires cellulaires, de nouvelles enzymes et probablement de nouveaux intermédiaires. Le reste de ce chapitre regroupe les données actuelles (directes et indirectes) concernant la voie de synthèse de la morphine endogène au sein du SNC, et tente d'apporter certains éléments de réponse.

1.2. L'hypothèse de la recapture de précurseurs

La présence d'alcaloïdes endogènes dans des cellules non-dopaminergiques suggère une éventuelle recapture de précurseurs de la voie de synthèse de la morphine endogène. Il est possible de postuler que différents précurseurs, à différents niveaux de la voie de synthèse de la morphine endogène, puissent être recaptés à partir du milieu extracellulaire, du LCR ou du sang par des cellules possédant les enzymes nécessaires à la finalisation de la synthèse de la morphine endogène (figure 17).

1.2.a. La recapture de dopamine

Plusieurs études décrivent la présence de transporteurs de la dopamine dans les astrocytes et des neurones non-dopaminergiques du SNC. Il est donc envisageable qu'une recapture de dopamine soit réalisée par les cellules non dopaminergiques afin de finaliser la synthèse de la morphine endogène. En effet, le DAT (Dopamine transporter), qui est le principal transporteur de la dopamine, est localisé essentiellement sur les terminaisons synaptiques des neurones dopaminergiques. Cependant, ce transporteur est également décrit pour être exprimé par les astrocytes (Takeda et al., 2002) et des neurones non-dopaminergiques à travers tout le SNC (Ciliax et al., 1995; Freed et al., 1995). Cette recapture de dopamine pourrait également dépendre de l'OCT-3 (organic cation transporter 3) qui est capable de transporter la dopamine dans des cellules non dopaminergiques (Chemuturi and Donovan, 2007). De manière intéressante, l'OCT-3 est exprimé par les astrocytes, ainsi que par les neurones de structures dans lesquelles j'ai décrit de la morphine endogène (Gasser et al., 2009). Par ailleurs,

le PMAT (plasma membrane monoamine transporter), également décrit pour être capable de transporter la dopamine, est présent dans les neurones de nombreuses structures du SNC dans lesquelles de la morphine endogène est retrouvée (Dahlin et al., 2007). D'autre part, l'EMT (extraneuronal monoamine transporter) et le NET (Norepinephrine transporter), sont décrits pour être exprimés et impliqués dans la capture de dopamine par les astrocytes (Inazu et al., 2003a; Inazu et al., 2003b).

1.2.b. La recapture de THP

La THP est le résultat de la condensation spontanée d'une molécule de dopamine et d'une molécule de DOPAL. On la retrouve dans le LCR où elle pourrait être excrétée par des cellules ou être directement formée dans le milieu extracellulaire. La THP pourrait ensuite être captée par différents types cellulaires qui pourraient alors finaliser la synthèse de morphine endogène. De manière intéressante, des données indiquent que la THP posséderait une affinité pour le DAT. En effet, la THP est décrite pour bloquer le transport de dopamine *via* une action sur la DAT (Okada et al., 1998). Cependant, on ne sait pas si la THP peut être elle-même transportée par la DAT. Malheureusement, aucune information n'est disponible quant à un éventuel transport des autres précurseurs de la morphine endogène présents dans la voie de synthèse. Cependant, on ne peut exclure l'existence d'une capture d'autres précurseurs de la morphine endogène.

1.3. Quelles enzymes impliquées ?

1.3.a. La voie de la dopamine

La dopamine est indispensable à la formation de morphine, que ce soit chez les mammifères ou chez les plantes. Chez les mammifères, la présence des enzymes impliquées dans la voie de synthèse de la dopamine (TH et AADC) est nécessaire à la formation de morphine endogène. Ces enzymes (p.ex., TH) ne sont pas exprimées par les neurones « morphinergiques » décrits dans la première partie de ma thèse et ne sont pas non plus exprimées par les astrocytes (Jaeger, 1985). La capture de précurseurs postulée dans le paragraphe précédent semble donc être indispensable à la synthèse de morphine endogène par d'autres cellules. Cependant, la présence de dopamine dans l'urine de patients chez lesquels l'AADC est absente (Wassenberg et al., 2010), ainsi que la présence de dopamine chez des souris K.O. pour la TH (Rios et al., 1999), remettent en question la voie de synthèse de la dopamine. Ainsi, certains auteurs postulent l'existence d'autres enzymes capables d'aboutir à la formation de dopamine chez les mammifères, notamment la tyrosinase. En effet, la tyrosinase a été

décrite pour transformer la dopamine en L-DOPA chez des souris K.O. pour la TH (Eisenhofer et al., 2003). Cependant, les informations concernant la localisation de la tyrosinase au sein du SNC sont peu nombreuses. Les données connues concernant la localisation des enzymes de synthèse de la dopamine permettent d'imaginer différentes hypothèses pour la voie de synthèse de la morphine endogène (figure 17).

1.3.b. La monoamine-oxydase

Les deux isoenzymes de la MAO (MAO-A et MAO-B) sont les enzymes majeures impliquées dans la dégradation des catécholamines et de la sérotonine chez les mammifères. Elles sont responsables de la conversion de la dopamine en DOPAL, étape indispensable à la formation de THP, et donc de morphine endogène. Les deux types de MAO (MAO-A et MAO-B) sont retrouvés dans les neurones et les astrocytes de nombreuses structures du SNC (Ekblom et al., 1993; Ikemoto et al., 1997; Jahng et al., 1997). La présence de MAO dans des cellules non dopaminergiques permettrait à ces cellules de former de la DOPAL après recapture de dopamine. La condensation spontanée de DOPAL et de dopamine permettrait alors la formation de THP et ainsi, si les enzymes nécessaires sont présentes, de morphine endogène.

1.3.c. Les méthyltransférases

Au sein du SNC, les méthylations sont des réactions enzymatiques impliquées dans la synthèse et le métabolisme de nombreuses molécules (p. ex., neurotransmetteurs, drogues). Les méthyltransférases, qui sont retrouvées dans l'ensemble du SNC, possèdent des fonctions différentes. Les principales méthyltransférases connues au sein du SNC sont la PNMT (Phenylethanolamine N-Methyltransferase), la COMT (catéchol-O-méthyltransférase) et la HIOMT (hydroxyindole-O-méthyltransférase). Après formation de la THP, trois étapes de méthylation sont nécessaires à la formation de la Réticuline qui est un précurseur de la morphine endogène. Depuis quelques années, il a été postulé que la COMT et la PNMT pourraient être impliquées dans l'une ou plusieurs de ces trois étapes de méthylation (Mantione et al., 2008; Stefano and Kream, 2010). Ce n'est que récemment que la NMT a été décrite pour transformer la (R)-norreticuline en (R)-réticuline chez les mammifères, alors que la PNMT n'aurait aucune activité (Grobe et al., 2011). La NMT est initialement décrite pour catalyser la N-méthylation de la tryptamine (Thompson et al., 1999). Celle-ci est présente au sein du SNC (Boarder and Rodnight, 1976). Cependant, il n'existe actuellement pas d'information sur sa localisation cellulaire. L'étude de la localisation de la NMT pourrait fournir des indications quant aux cellules capables de méthyler la THP, et donc de synthétiser la morphine endogène (figure 17).

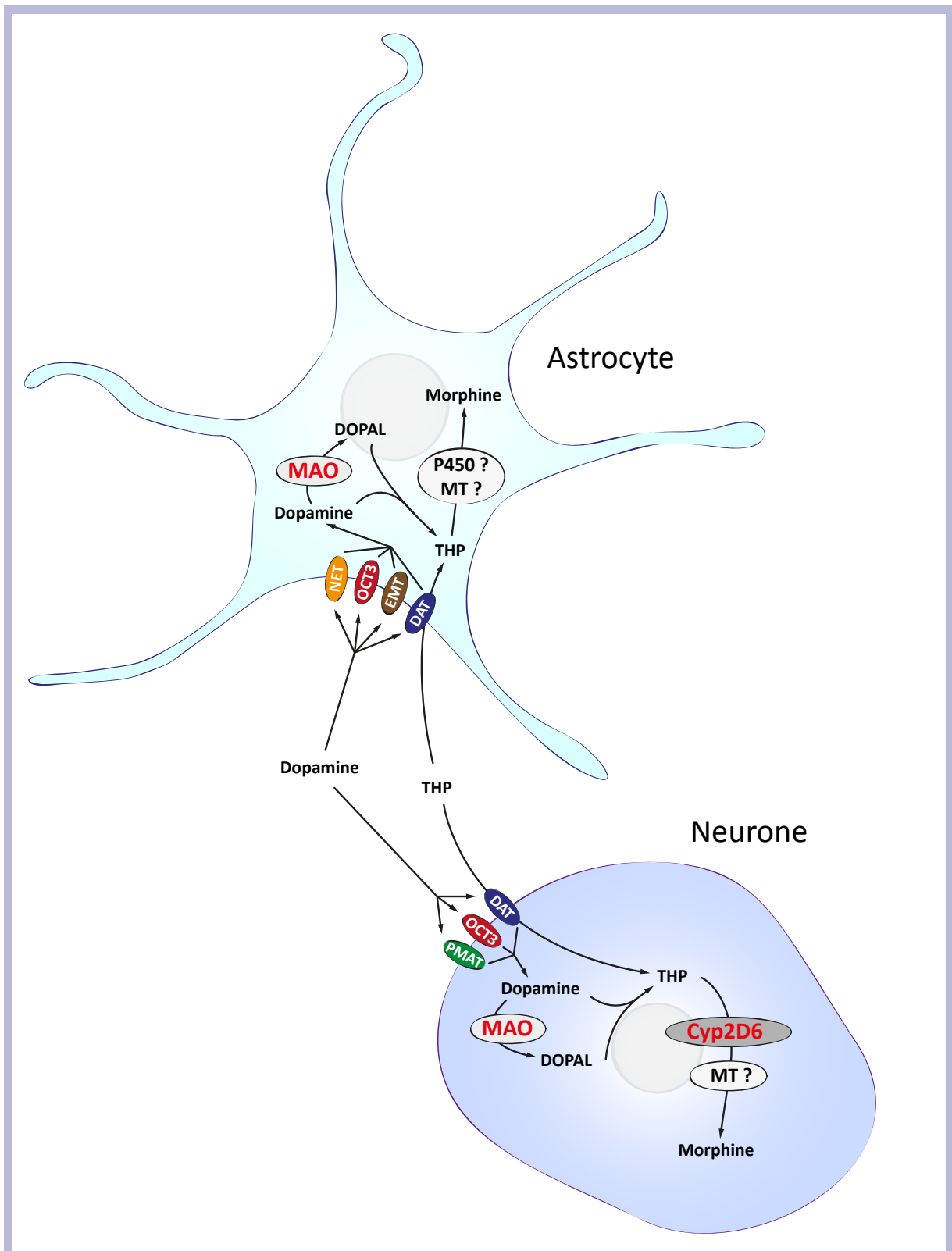


Figure 17 : Recapture de précurseurs et synthèse de morphine au sein des astrocytes et de neurones non dopaminergiques. Abréviations : DAT, Dopamine transporter; DOPAL, 3,4-Dihydroxyphénylacétaldéhyde; EMT, Extraneuronal monoamine transporter; MAO, Monoamine oxydase; MT, Méthyltransférase; NET, Norepinephrine transporter; OCT3, Organic cation transporter 3; P450, Cytochrome P450; PMAT, Plasmamembrane monoamine transporter; THP, Tétrahydropapavéroline.

1.3.d. CYP2D6

Les cytochromes P450 appartiennent à une famille d'enzymes capables de catalyser des réactions différentes et variées, aussi bien chez les plantes que chez les vertébrés (Coon, 2005). Parmi ceux-ci, le CYP2D6 est l'une des formes de P450 intervenant dans le métabolisme de nombreuses molécules (Ozaki, 2004). En raison de son implication dans de nombreuses réactions enzymatiques, le CYP2D6 est largement exprimé par les neurones du SNC (Norris et al., 1996; Siegle et al., 2001). Il n'est cependant pas exprimé par les astrocytes chez l'homme (Siegle et al., 2001). Le CYP2D6 est décrit pour catalyser quatre des étapes de la voie de synthèse de la morphine endogène. Ainsi, il intervient dans **(i)** l'hydroxylation de la tyramine en dopamine (Bromek et al., 2011), **(ii)** la transformation de la réticuline en salutaridine (Grobe et al., 2009), **(iii)** la O-déméthylation de thébaine en oripavine (Mikus et al., 1991) et **(iv)** de celle de la codéine en morphine (Dayer et al., 1988). La présence de cette enzyme au sein des cellules semble donc être déterminante pour la synthèse de la morphine endogène de *novo*. Son absence au sein des astrocytes suggère que ceux-ci sont incapables de synthétiser de la morphine endogène. Cependant, sa localisation ubiquitaire et son implication dans de nombreuses réactions la rendent inutilisable comme marqueur des cellules morphinergiques ou comme gène cible pour une souris K.O.

1.3.e. De nouvelles enzymes ?

La découverte des enzymes impliquées dans la voie de synthèse chez les plantes est très récente, puisque plus de la moitié de ces enzymes a été caractérisée et clonée ces 5 dernières années. Il n'est donc pas étonnant que si peu d'enzymes impliquées dans la voie de synthèse de la morphine chez les mammifères soient connues. En effet, jusqu'à présent les enzymes impliquées dans la synthèse de morphine endogène ont été découvertes par analogie de séquences avec celles décrites dans la synthèse de morphine chez les plantes. Il est donc envisageable que ces enzymes décrites récemment chez les plantes permettent dans les années à venir d'identifier de nouvelles enzymes chez les mammifères impliquées dans la synthèse de morphine endogène. La découverte de nouvelles enzymes permettra peut-être de produire un modèle de souris K.O., qui conduira à une compréhension plus approfondie des rôles de la morphine endogène.

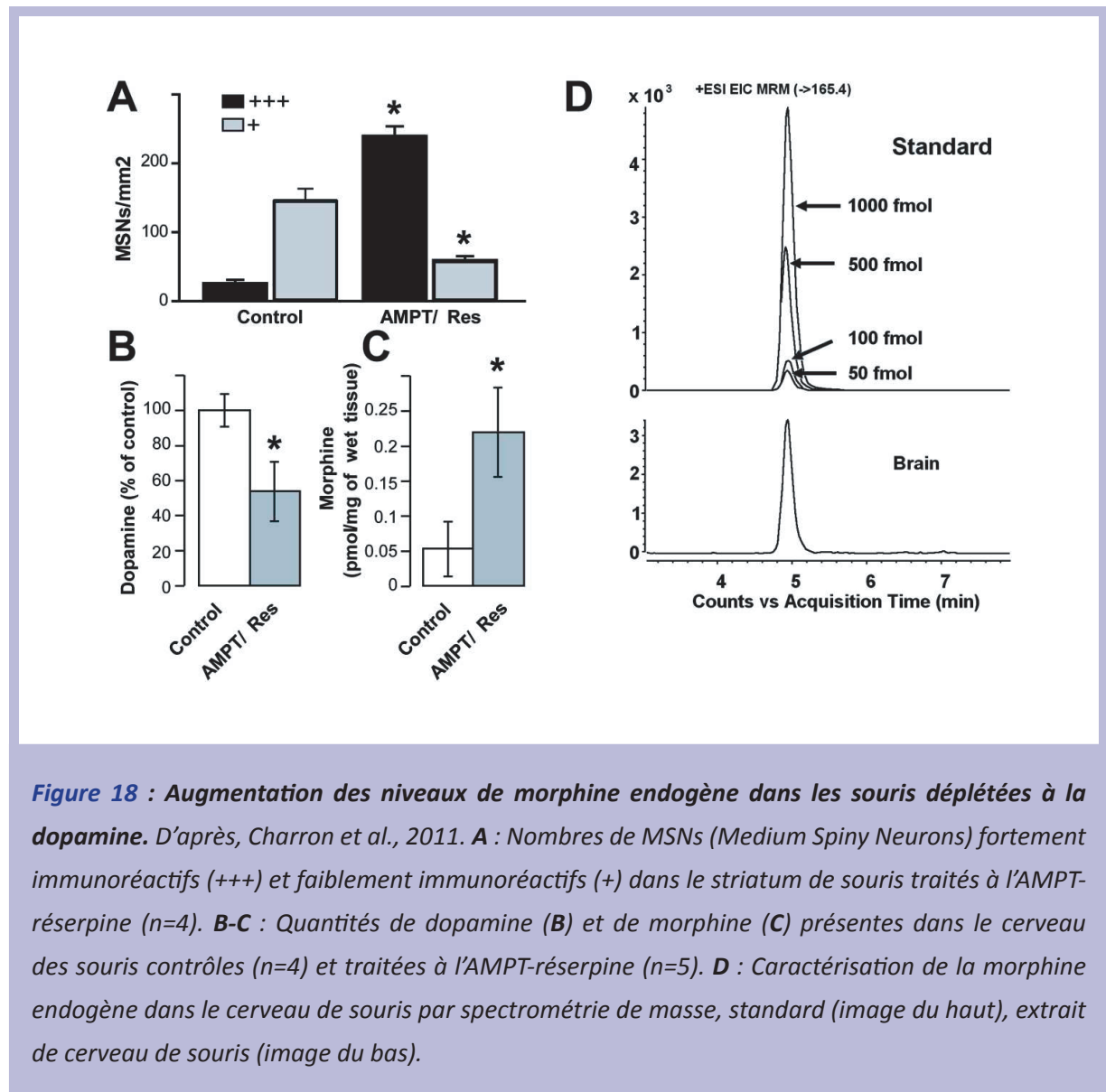


Figure 18 : Augmentation des niveaux de morphine endogène dans les souris déplétées à la dopamine. D'après, Charron et al., 2011. **A** : Nombres de MSNs (Medium Spiny Neurons) fortement immunoréactifs (+++) et faiblement immunoréactifs (+) dans le striatum de souris traitées à l'AMPT-réserpine (n=4). **B-C** : Quantités de dopamine (**B**) et de morphine (**C**) présentes dans le cerveau des souris contrôles (n=4) et traitées à l'AMPT-réserpine (n=5). **D** : Caractérisation de la morphine endogène dans le cerveau de souris par spectrométrie de masse, standard (image du haut), extrait de cerveau de souris (image du bas).

I.4. Les intermédiaires de synthèse

I.4.a. (R)-THP ou (S)-THP ?

Comme décrites dans l'introduction (cf. : I.Introduction, IV.2, p.41), deux hypothèses existent quant à la formation de la réticuline. En effet, dans le neuroblastome humain SH-SY5Y la voie de synthèse est décrite pour passer par la (S)-THP puis la (S)-réticuline (Boettcher et al., 2005; Poeknapo, 2005), alors que certaines données indiquent, *in vivo*, que la voie de synthèse passe par la (R)-THP puis la (R)-réticuline. En effet, la découverte récente d'une méthyltransférase (NMT) spécifique de la (R)-THP dans le cerveau de souris (Grobe et al., 2011), suggère que la voie de synthèse de la morphine endogène dans le SNC, dépendrait de la configuration R de la THP. Par ailleurs, j'ai récemment montré chez la souris après traitement à la réserpine et à l'AMPT induisant une déplétion de la dopamine, une augmentation des taux de morphine endogène présents dans le SNC (figure 18)

Dans la même étude, réalisée en collaboration avec l'équipe d'Erwan Bezard de Bordeaux, une augmentation du nombre de neurones immunoréactifs (à la codéine, la morphine, la M6G et/ou la M3G) est observée dans le striatum de rats, singes ou de patients parkinsoniens (Charron et al., 2011). C'est la première fois qu'une étude décrit une augmentation des quantités de morphine endogène dans des modèles où les taux de dopamine sont diminués (ici, la maladie de Parkinson). De plus, un traitement à la L-DOPA, précurseur de la dopamine et de la morphine, induit une normalisation (diminution) du nombre de neurones immunoréactifs à la morphine et ses dérivés dans le striatum des quatre modèles utilisés (Charron et al., 2011). Ces résultats sont contradictoires avec l'hypothèse dopaminergique de la voie de synthèse de la morphine endogène, mais apportent cependant de nouveaux éléments de compréhension concernant l'implication de la (R)- ou de la (S)-THP.

Chez les patients parkinsoniens (non traités à la L-DOPA), la description d'une augmentation des taux de THP dans l'urine (Cashaw, 1993) est corrélée avec l'augmentation des taux de morphine endogène décrite dans notre étude. De plus, une augmentation des taux de THP cérébraux est observée après traitement à la L-DOPA (Cashaw et al., 1987; Turner et al., 1974), et de manière surprenante, nos résultats indiquent une diminution des quantités de morphine endogène. Ces données suggèrent que la THP formée par la lésion des centres dopaminergiques, ainsi que de celle formée par l'administration de L-DOPA ne sont pas toutes les deux impliquées dans la voie de synthèse de la morphine endogène. Ainsi, dans le SNC, de la (R)-THP pourrait être formée dans le cas de la maladie de Parkinson. Celle-ci serait

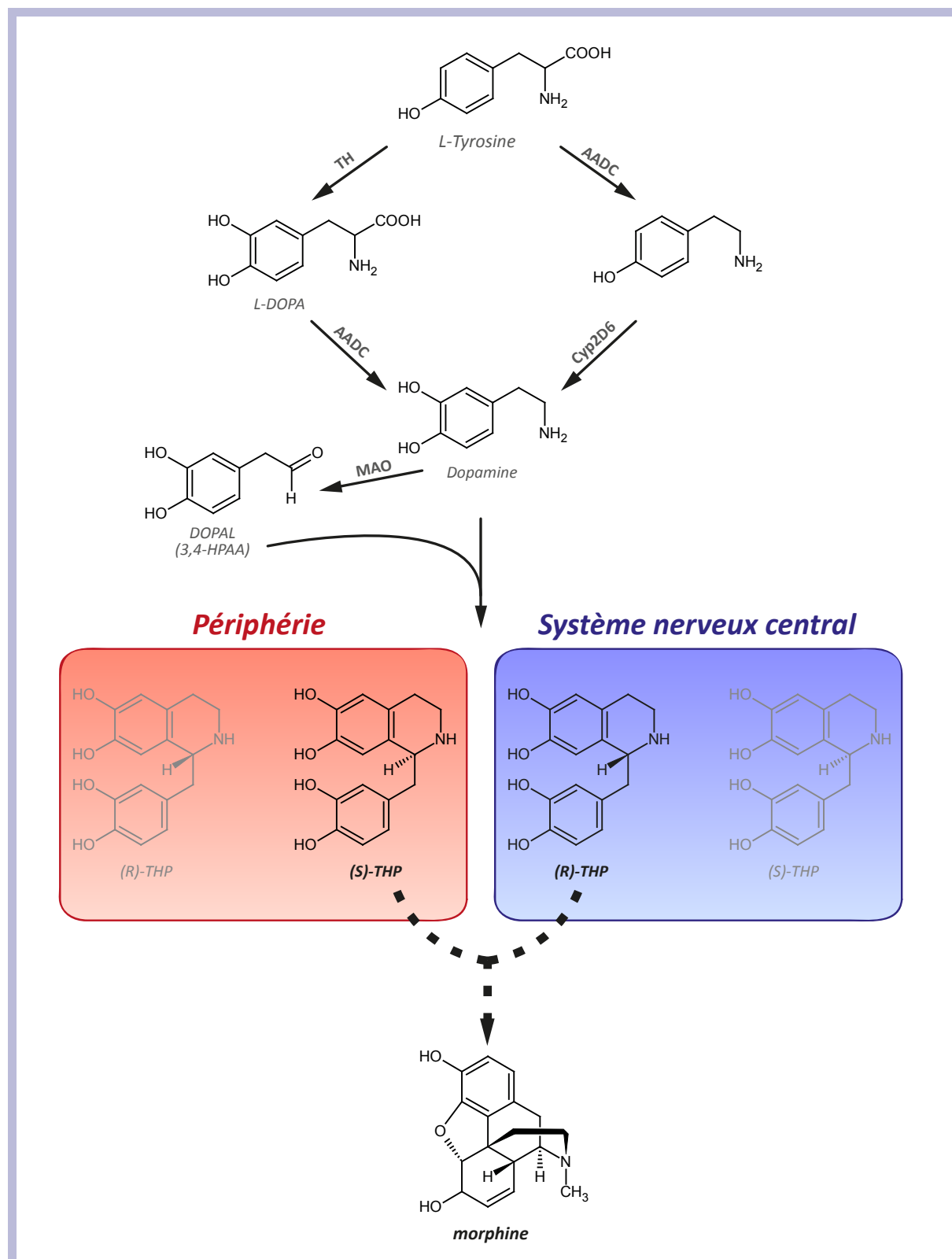


Figure 19 : Formation sélective des énantiomères de la THP. La (R)-THP semble être l'énantiomère impliqué dans la voie de synthèse de la morphine endogène dans le SNC, tandis que la (S)-THP celui impliqué en périphérie. Abréviations : AADC, Amino acid decarboxylase; MAO, Monoamine oxydase; TH, Tyrosine hydroxylase.

alors transformée *via* la NMT en réticuline, puis en morphine. Par ailleurs, la L-DOPA semble induire la formation de (S)-THP, puisqu'elle n'induit pas une élévation des taux cérébraux de morphine endogène (Grobe et al., 2010). Cependant, un traitement à la L-DOPA est décrit pour augmenter de manière significative les taux THP, de morphine et de codéine endogènes dans l'urine (Cashaw, 1993; Matsubara et al., 1992) suggérant, qu'en périphérie, la (S)-THP est impliquée dans la voie de synthèse de la morphine endogène.

En conclusion (figure 19), il semblerait que la (R)-THP soit nécessaire à la formation de morphine au sein du SNC, alors que la (S)-THP serait impliquée en périphérie. Un mécanisme de régulation et une enzyme spécifique pourraient être présents permettant une formation sélective de l'énantiomère de la THP.

1.4.b. Le 4-HPAA, un nouvel intermédiaire de synthèse ?

Les différents éléments cités dans les paragraphes ci-dessus postulant que la voie de synthèse de la morphine endogène ferait intervenir différents partenaires cellulaires *via* différentes enzymes et mécanismes de transports, ne sont pas les seules hypothèses possibles quant à la synthèse de morphine par des cellules non dopaminergiques. Par analogie avec la voie de synthèse des plantes, il est possible de postuler la présence de nouveaux intermédiaires dans la voie de synthèse de la morphine endogène. En effet, chez l'homme, les neutrophiles et les macrophages sont capables de produire du 4-HPAA (4/p-hydroxyphenylacétaldéhyde) à partir de la L-Tyrosine par l'intermédiaire d'une myéloperoxydase (Exner et al., 2001; Hazen et al., 1999; Hazen et al., 1998; Whitman et al., 1999). Le 4-HPAA est un intermédiaire retrouvé dans la voie de biosynthèse de la morphine chez les plantes, qui après sa condensation avec la dopamine, forme la norcoclaurine (cf. : I.Introduction, IV.2, p.41). Ces données suggèrent que les mammifères seraient capables, grâce à la formation du 4-HPAA, de produire de la norcoclaurine (figure 20, en vert). Cependant comme chez les plantes, cette réaction n'est pas spontanée et nécessite l'intervention d'une enzyme. La norcoclaurine n'a jamais été détectée de manière endogène chez les mammifères. Cependant, on ne peut pas exclure que sa formation, comme celle du 4-HPAA, soit réalisée dans des conditions physiologiques ou pathologiques particulières (Hazen et al., 2000; Heller et al., 2000).

1.4.c. Un autre intermédiaire possible, l'octopamine

L'octopamine est un neurotransmetteur formé à partir de l'hydroxylation de la tyramine chez les insectes (pour revue : Lange, 2009). Chez les mammifères l'octopamine est retrouvée

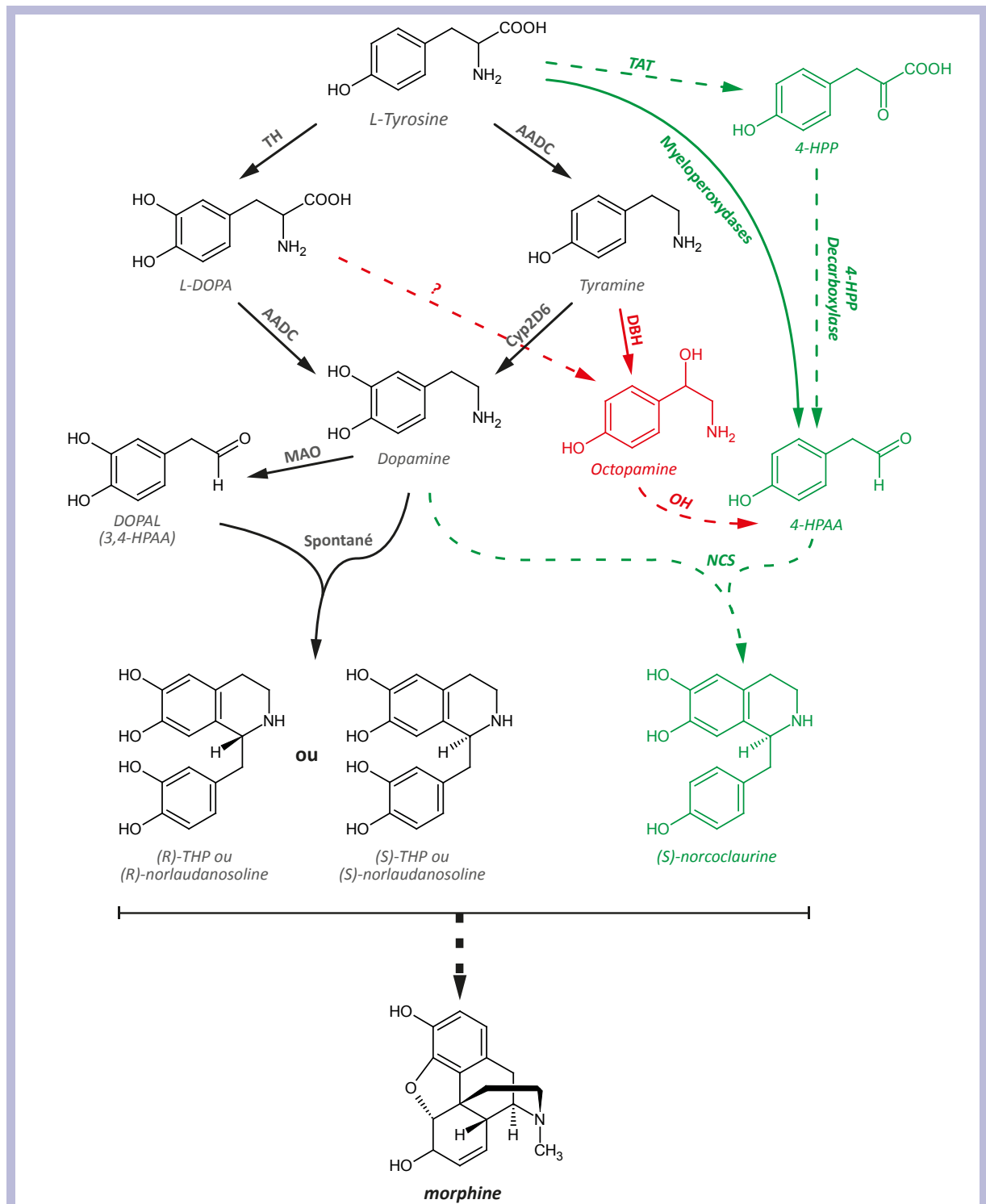


Figure 20 : De nouveaux intermédiaires pour la voie de synthèse de la morphine endogène. Les intermédiaires et les enzymes connus de la voie de synthèse de la morphine endogène chez les mammifères sont représentés en noir. En vert (partie 1.4.b) et en rouge (partie 1.4.c), sont représentés les nouvelles étapes, intermédiaires et enzymes potentiellement impliqués. Les flèches en pointillés et leurs enzymes en gras-italique sont des étapes décrites dans les autres règnes. Les flèches en trait plein et leurs enzymes en gras sont les étapes connues chez les mammifères. Abréviations : AADC, Amino acid decarboxylase; DBH, Dopamine- β -hydroxylase; MAO, Monoamine oxydase; NCS, Norcoclaurine synthase; OH, Octopamine hydroxylase; TAT, Tyrosine aminotransférase; TH, Tyrosine hydroxylase.

sous forme de traces au sein du SNC et dans la circulation sanguine. Elle est formée à partir de la tyrosine par la dopamine- β -hydroxylase (DBH). Les taux d'octopamine sont décrits comme étant plus élevés dans certaines pathologies cérébrales incluant de manière intéressante la maladie de Parkinson (D'Andrea et al., 2010), l'algie vasculaire de la face (D'Andrea et al., 2007), la schizophrénie et l'addiction (Berry, 2007). Etant donné que ces pathologies pourraient être « hypermorphinergiques » (cf. : IV.Discussion, III, p.199) et, sur la base des données décrites ci-après, l'octopamine pourrait représenter un nouvel intermédiaire de la synthèse de la morphine endogène chez les mammifères (figure 20, en rouge). Il est ainsi décrit que l'octopamine est transformée en 4-HPPA par l'octopamine hydroxylase (OH) chez *Pseudomonas aeruginosa* (Cuskey et al., 1987). De plus, chez les insectes, il a été postulé que la L-DOPA pourrait être un précurseur de l'octopamine (David et al., 1981). Nous pouvons émettre l'hypothèse que des enzymes capables d'effectuer ces réactions sont conservées dans l'évolution et sont toujours présentes chez les mammifères. Ainsi, le 4-HPPA formé à partir de l'octopamine pourrait, comme décrit dans la partie précédente, être impliqué dans la voie de synthèse de la morphine endogène (figure 20).

I.5. Un autre produit final que la morphine ?

I.5.a. M6G/M3G

Quelques études ont proposé que les glucuronides de la morphine peuvent représenter le produit final de la voie de synthèse de la morphine dans certaines cellules. En effet, la présence de M6G endogène et non de morphine endogène est décrite dans les cellules chromaffines des glandes surrénales bovines. Dans ces cellules, la M6G est présente dans les granules de sécrétion, alors que la morphine est absente. Ces données suggèrent que la M6G représente le produit final de la voie de synthèse des opiacés endogènes dans ce type cellulaire particulier (Glattard et al., 2006; Goumon et al., 2006). La cartographie des alcaloïdes endogènes présentée dans la première partie de ma thèse ne permet pas de différencier la présence de morphine, codéine, M6G ou M3G endogènes au sein des cellules. De plus, les UGTs, enzymes responsables de la formation des glucuronides, sont décrites pour être présentes au sein des astrocytes et de certains neurones du SNC (Heurtaux et al., 2006; Suleman et al., 1998). Il est donc possible, au même titre que dans les cellules chromaffines, que la M6G et/ou la M3G puissent représenter le produit final de la voie de synthèse des opiacés endogènes au sein de certaines cellules du SNC et en particulier dans les astrocytes.

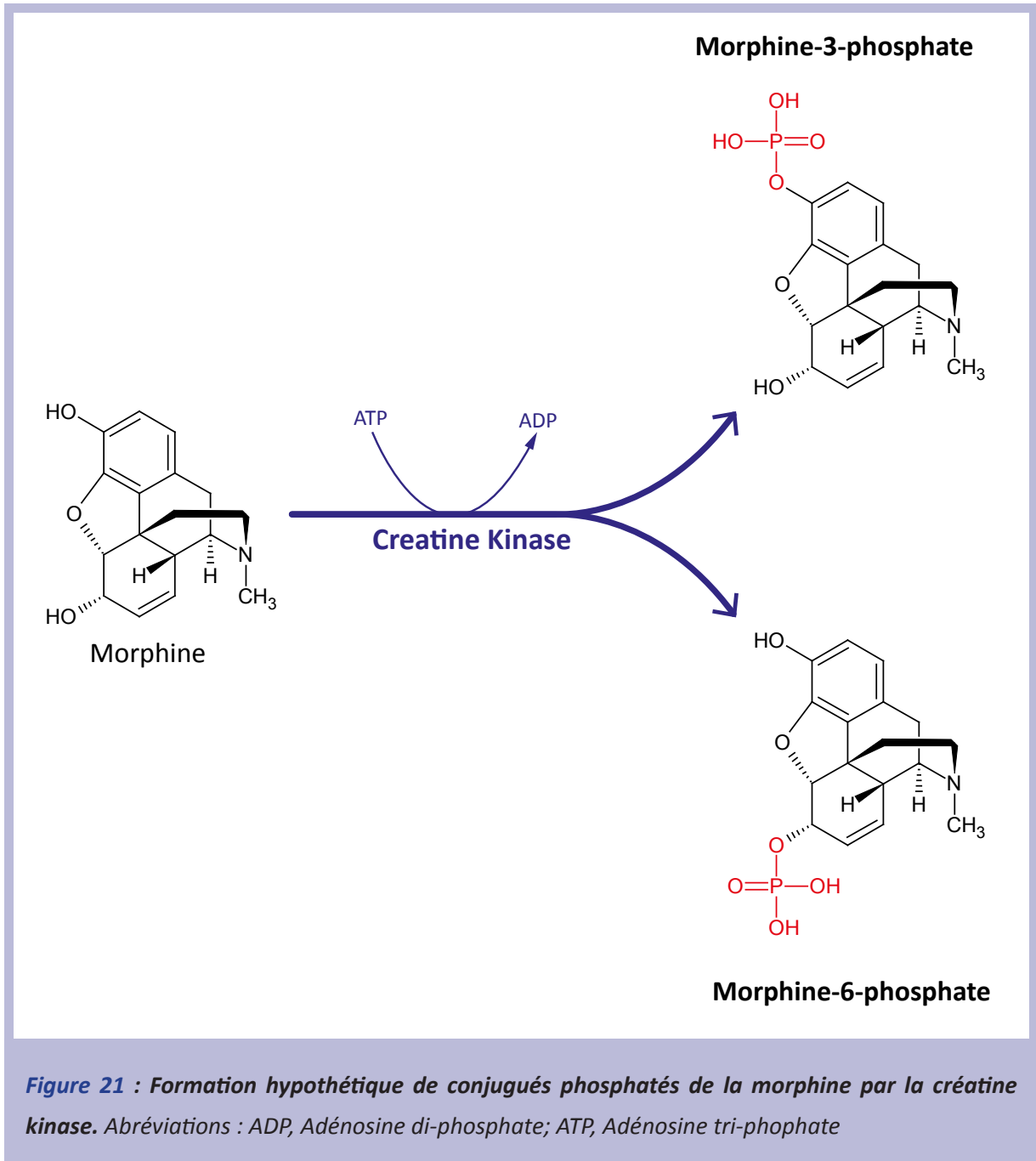


Figure 21 : Formation hypothétique de conjugués phosphatés de la morphine par la créatine kinase. Abréviations : ADP, Adénosine di-phosphate; ATP, Adénosine tri-phosphate

1.5.b. M6P/M3P

La description dans la seconde partie de ma thèse de la présence d'un complexe entre la créatine kinase et les alcaloïdes endogènes apporte de nombreuses questions quant aux rôles de cette association. Notamment, l'une des hypothèses pouvant être formulée est que la morphine est un substrat de la créatine kinase (figure 21). La créatine kinase pourrait alors phosphoryler la morphine sur l'un des deux groupements hydroxyles libres et ainsi former la morphine-6-phosphate (M6P) et/ou la morphine-3-phosphate (M3P). Or, la présence de ces composés dans un organisme vivant n'a jamais été démontrée, ni même postulée. Cependant, trois brevets décrivent la possibilité d'une synthèse de M3P et de M6P par un biais chimique, démontrant la possibilité d'associer un groupement phosphate aux hydroxyles présents sur les carbones 3 et 6 de la morphine (West and Kannar, 2005; West and Kannar, 2007; West et al., 2010). Les numéros CAS (CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE) de la M6P (CAS : 51025-97-7) et de la M3P (CAS : 51065-90-8) sont d'ailleurs déjà disponibles. Comme décrits précédemment (cf. : I.Introduction, I.5, p.19), les dérivés conjugués sur le carbone 3 (C3) de la morphine sont plus abondants que ceux conjugués sur le carbone 6 (C6). En effet, la conjugaison sur l'hydroxyle aromatique en C3 est plus facile que sur l'hydroxyle alicyclique en C6 (Coller et al., 2009). Il serait alors envisageable que la proportion de M3P formée soit plus importante que celle de M6P. La vérification de cette hypothèse démontrerait l'existence endogène d'un nouvel opiacé endogène et éventuellement d'un nouveau produit final de la voie de synthèse des opiacés endogènes.

1.5.c. Autres produits

Potentiellement, au sein du SNC, toutes les molécules présentes dans la voie de synthèse (cf. : I.Introduction, IV.2, p.19) ou dans le métabolisme (cf. : I.Introduction, I.5, p.19) de la morphine endogène pourraient représenter un composé final ou un intermédiaire possédant des effets physiologiques ou pathologiques dans certaines cellules. Ainsi, certaines études décrivent que des précurseurs (p. ex. : thébaine, oripavine, salutaridine) ou des produits du métabolisme (p. ex. : Conjugés sulfatés, normorphine, hydromorphine) possèdent une affinité pour les MORs, suggérant un rôle possible en tant qu'agonistes ou antagonistes endogènes de ces récepteurs (Frolich et al., 2011; Nikolaev et al., 2007). A titre d'exemple, la thébaine est décrite pour induire une analgésie chez la souris (Aceto et al., 1999) et la normorphine chez le rat (Sullivan et al., 1989). De plus, l'hydromorphone, un produit du catabolisme est utilisé pour le traitement de la douleur en milieu hospitalier depuis plusieurs années (Murray and

Hagen, 2005). De manière intéressante, certains de ces composés pourraient même posséder des actions indépendantes des récepteurs opioïdes. Ainsi, la THP est décrite pour représenter, *in vitro*, un bloqueur des transporteurs de la dopamine (Okada et al., 1998).

II. LOCALISATION, PROTÉINES DE LIAISONS ET RÔLES DE LA MORPHINE ENDOGÈNE AU SEIN DU SNC

II.1. La morphine endogène en tant que neurotransmetteur ou neuromédiateur ?

II.1.a. Le cas du cervelet

Le rôle de la morphine endogène en tant que neurotransmetteur est postulé depuis de nombreuses années. En effet, la morphine endogène possède plusieurs des critères nécessaires à la définition de neurotransmetteur : synthèse par les neurones, sécrétion calcium dépendante, localisation présynaptique et la présence de récepteurs postsynaptiques (cf. : I.Introduction, VI.2.a, p.51). Ces nombreux éléments suggèrent donc que la morphine endogène pourrait représenter un neurotransmetteur au sein du SNC.

Dans la première partie de ma thèse, j'ai recherché la présence d'alcaloïdes endogènes dans les terminaisons présynaptiques des neurones à travers tout le SNC de souris, ceci afin de déterminer dans quels processus physiologiques la morphine endogène pourrait intervenir. De manière surprenante, j'ai montré que la morphine endogène et ses dérivés sont localisés principalement dans la partie postsynaptique/dendritique des neurones, hormis dans le cas du cervelet. En effet, comme précédemment décrit par l'équipe (Muller et al., 2008), j'ai confirmé la présence d'alcaloïdes endogènes dans la terminaison présynaptique des cellules en paniers (basket cells ; BC) sur le corps cellulaire des cellules de Purkinje (publication 1; Laux et al., 2011). Cette localisation qui semble exclusive au cervelet remet en question l'hypothèse de la morphine en tant que neurotransmetteur. Cependant, il est possible que seule une proportion minoritaire de neurones soit capable d'exprimer la morphine endogène au sein de leurs terminaisons présynaptiques. Il n'est donc pas à exclure que cette proportion minoritaire de synapses « morphinergiques » n'ait pas été détectée lors de mon étude. Les résultats obtenus pour les BC du cervelet suggèrent que celles-ci, disposent de la machinerie enzymatique nécessaire : **(i)** à la synthèse de morphine après capture de précurseurs comme suggéré dans la partie précédente et **(ii)** au stockage de morphine dans des vésicules. Dans le cas des autres neurones, dans lesquels les alcaloïdes endogènes sont localisés dans la partie postsynaptique/dendritique, un autre rôle pour la morphine endogène doit être postulé.

II.1.b. Une libération rétrograde de morphine endogène

La neurotransmission est « classiquement » réalisée par la libération depuis la terminaison présynaptique de neurotransmetteurs entraînant l'activation de leurs récepteurs postsynaptiques. Cependant, certaines terminaisons présynaptiques ou dendritiques sont décrites pour libérer des neurotransmetteurs ou des neuromédiateurs de manière « rétrograde » afin d'activer des récepteurs présynaptiques. C'est notamment le cas de l'ocytocine, de l'arginine vasopressine (Freund-Mercier et al., 1994; Ludwig, 1995; Morris et al., 2000), mais également des endocannabinoides (Di et al., 2003; Maejima et al., 2001; Wilson and Nicoll, 2001). De plus, de nombreux travaux décrivent une libération dendritique/postsynaptique d'autres molécules/neuropeptides tels que les dynorphines, la dopamine et le GABA (Figure 22, pour revue : Ludwig and Pittman, 2003). La présence de morphine endogène et de ses dérivés dans les dendrites et les terminaisons postsynaptiques de nombreux neurones à travers tout le SNC n'est pas anodine. Ces résultats, décrits dans la première partie de ma thèse (cf. : III. Résultats, partie1, publications 1 & 2), suggèrent que la morphine et ses dérivés pourraient être libérés de manière rétrograde, au même titre que les neurotransmetteurs cités dans la figure 22. De plus, la présence de récepteurs aux opioïdes, et plus particulièrement des MORs sur la partie présynaptique de certains circuits neuronaux (Drake and Milner, 1999; Svingos et al., 2001; Zhang and Pan, 2010), suggère que la morphine contrôle, par son action rétrograde, la libération de neurotransmetteurs par la partie présynaptique. La morphine exogène est d'ailleurs déjà décrite pour inhiber, *via* les MORs, la libération de glutamate par les neurones corticaux en réduisant l'entrée de calcium (Yang et al., 2004).

II.2. Alcaloïdes endogènes et neurones GABAergiques

II.2.a. Une seule sous-population de neurones GABAergiques contient-elle de la morphine endogène ?

A travers tout le SNC, les neurones GABAergiques sont des acteurs extrêmement importants de la modulation des circuits neuronaux. Cependant, au fur et à mesure des avancées scientifiques concernant ces neurones, leur étude est devenue de plus en plus complexe car ils correspondent à la population cellulaire la plus diversifiée au sein du SNC. A titre d'exemple, dans le cas du cortex, les interneurones GABAergiques peuvent avoir des propriétés morphologiques, moléculaires et synaptiques différentes (DeFelipe, 1997; Flames and Marin, 2005; Kawaguchi and Kondo, 2002; Suzuki and Bekkers, 2007). Rien que dans

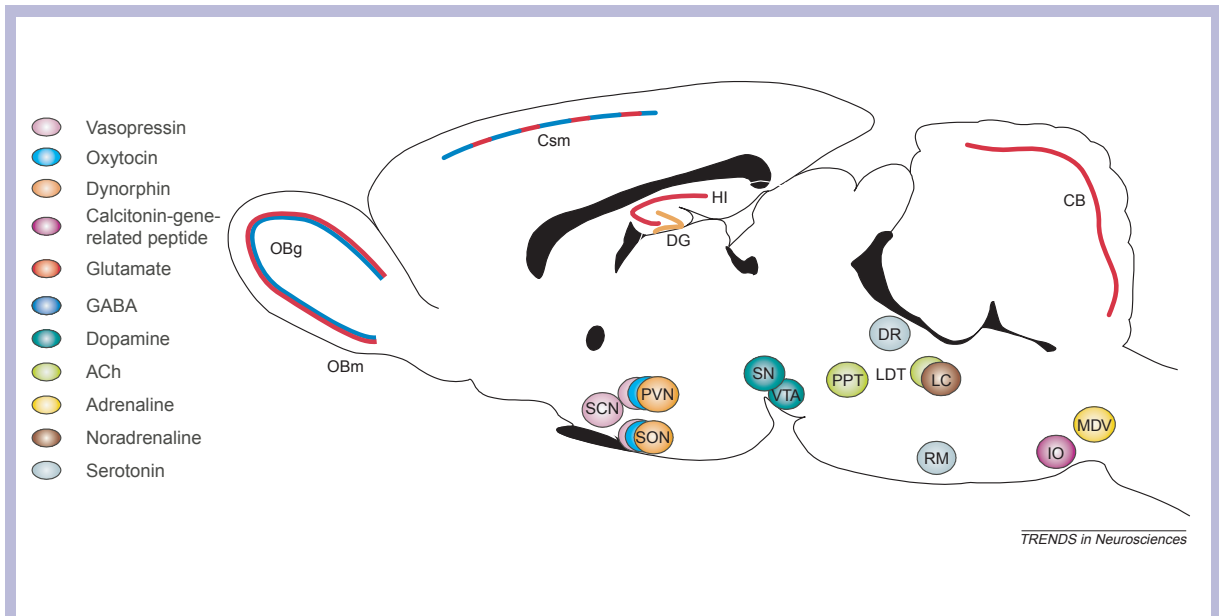


Figure 22 : Sites identifiés de libérations dendritiques de neurotransmetteurs. D'après, Ludwig and Pittman, 2003. Le monoxyde de carbone, l'acide arachidonique, le monoxyde d'azote et l'ATP sont également décrits pour être libérés par les dendrites des neurones, mais les sites connus ne sont pas représentés sur cette figure. Abréviations : CB, couche des neurones de Purkinje du cervelet; Csm, couches 2/3 du cortex somatosensoriel; DG, gyrus denté; DR, noyau du raphé dorsal; HI, hippocampe; IO, complexe de l'olive inférieure; LC, locus coeruleus; LDT, noyau tegmental latérodorsal; MDV, medulla ventrolatérale; OBg, cellules granulaires du bulbe olfactif; OBm, cellules mitrales du bulbe olfactif; PPT, noyau pédonculonpontin; PVN, noyau paraventriculaire; RM, noyau du raphé magnus; SCN, noyau suprachiasmatique; SN, substance noire; SON, noyau supraoptique; VTA, aire tegmentale ventrale.

l'hippocampe, plus de 16 sous-types de neurones GABAergiques ont été décrits (Somogyi and Klausberger, 2005).

Lors de mes travaux de thèse, j'ai décrit pour la première fois la présence d'alcaloïdes endogènes dans des neurones GABAergiques présents au sein du SNC. De manière intéressante les alcaloïdes endogènes ne sont pas présents dans tous les neurones GABAergiques suggérant que seule une sous-population de ces cellules est capable de les exprimer. Cette sous-population dispose donc des transporteurs et des enzymes nécessaires à la capture de précurseurs et à la finalisation de la synthèse de morphine endogène. L'identification et l'étude de cette sous-population pourraient donc apporter des informations importantes sur la voie de synthèse de la morphine endogène.

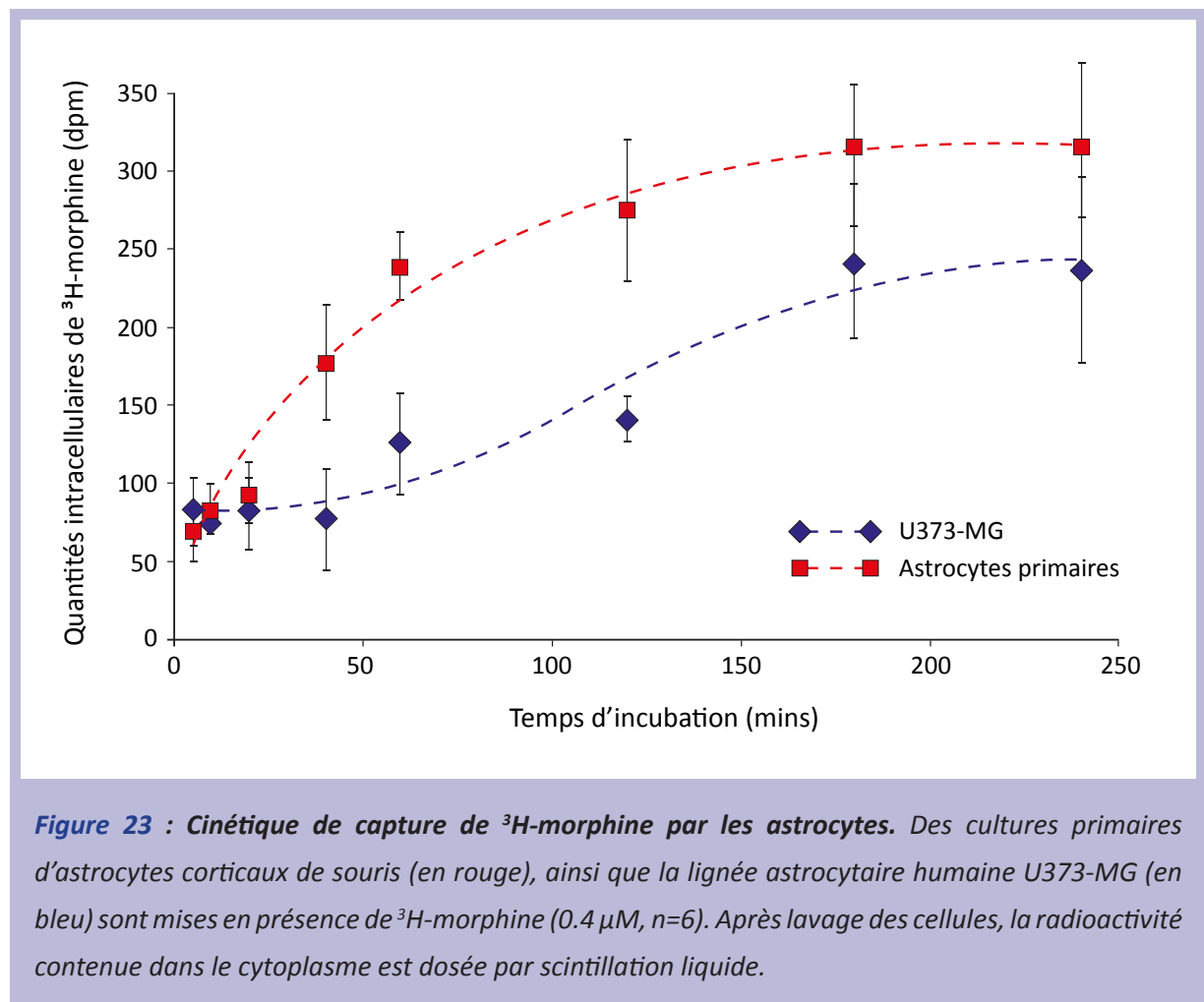
II.2.b. Alcaloïdes endogènes et cellules en paniers

De manière intéressante, mes résultats décrivent la présence d'alcaloïdes endogènes dans les cellules en paniers (Basket cells ; BC) du cervelet, ainsi que dans celles de la couche sous-granulaire du gyrus denté. De plus, les BC sont également décrites pour être présentes dans tout le cortex (Kawaguchi and Kondo, 2002; Suzuki and Bekkers, 2007), ainsi que dans la corne d'Amon de l'hippocampe (Cope et al., 2002) qui sont deux structures dans lesquelles j'ai également décrit la présence d'alcaloïdes endogènes au sein de neurones GABAergiques. Il est donc possible que ces interneurones « morphinergiques » décrits dans mes résultats correspondent à des BC. Le terme BC se réfère généralement aux cellules projetant leurs axones sur le corps cellulaire d'autres cellules. On distingue au sein des BC une grande variété de cellules possédant à la fois des morphologies et caractéristiques neurochimiques différentes. Ainsi, on peut observer dans les BC du cortex l'expression de parvalbumine, de cholécystokinine, de VIP (vaso-intestinal peptide), de somatostatine, du neuropeptide Y, de la calbinding ou de la calretinine (Wang et al., 2002). Mes données suggèrent que les alcaloïdes endogènes pourraient constituer un marqueur d'une ou de plusieurs sous-population de BC.

II.3. Alcaloïdes endogènes et astrocytes

II.3.a. Synthèse ou recapture ?

A travers tout le SNC, les alcaloïdes endogènes sont présents dans les astrocytes. Comme décrit dans la première partie de ma thèse, les alcaloïdes endogènes sont localisés aussi bien dans le corps cellulaire des astrocytes que dans leurs prolongements (p. ex., pieds astrocytaires).



Deux hypothèses peuvent être postulées quant à la présence d'alcaloïdes endogènes dans les astrocytes :

- ▶ La première hypothèse est que les astrocytes sont capables de synthétiser de la morphine endogène après capture de précurseurs à partir du milieu extracellulaire (dopamine, THP). Étant donné que le CYP2D6, une enzyme intervenant dans quatre des étapes de la voie de synthèse de morphine endogène, n'est pas exprimé par les astrocytes (Siegle et al., 2001), ces cellules seraient incapables de synthétiser de la morphine endogène. On ne peut cependant pas exclure qu'une enzyme inconnue, de la famille des cytochromes P450, soit exprimée par les astrocytes et soit capable de remplacer le CYP2D6.
- ▶ La seconde hypothèse est que les astrocytes peuvent capter de la morphine endogène à partir du milieu extracellulaire. Des expériences ont ainsi montré la capture de morphine radiomarquée par des coupes aiguës de cerveau de rat (Guarna et al., 1998). De plus, des résultats non publiés que j'ai obtenus pendant ma première année de thèse, mettent en évidence l'existence d'une recapture de ^3H -morphine par les astrocytes corticaux en culture primaire et de la lignée astrocytaire U373-MG (figure 23). Au sein du SNC, peu de transporteurs sont décrits pour transporter la morphine. La P-glycoprotéine (PgP) est décrite pour être responsable du transport de morphine à travers la BHE (Dagenais et al., 2001; Seelbach et al., 2007) et est exprimée par les astrocytes (Calatuzzolo et al., 2005; Chen et al., 2009; Gaillard et al., 2000). Ces données qui vont dans le sens de cette seconde hypothèse suggèrent que les astrocytes sont capables de capter la morphine endogène à partir du milieu extracellulaire (figure 24). De plus, cette capture concernerait également la morphine exogène.

11.3.b. Un catabolisme de la morphine

Différentes données montrent la présence d'un système de dégradation/catabolisme de la morphine au sein du SNC. En effet, la formation de *novo* de M3G et de M6G est décrite après l'ajout de morphine à des homogénats de cerveaux de rats (Nagano et al., 2000) et humains (Yamada et al., 2003). Une étude rapporte également la présence de l'UGT1A6 (impliquée dans la conversion de la morphine en M3G) et de l'UGT2B7 (impliquée dans la formation de M3G et de M6G) dans le SNC (King et al., 1999). La présence de l'UGT1A6 est par ailleurs décrite dans des astrocytes (Heurtaux et al., 2006; Suleman et al., 1998) et des neurones de rat en culture primaire (Suleman et al., 1998). Ces résultats, en plus de mes travaux montrant la présence de morphine, codéine, M6G et/ou M3G dans les astrocytes (publications 1 & 2; Laux et al., 2011),

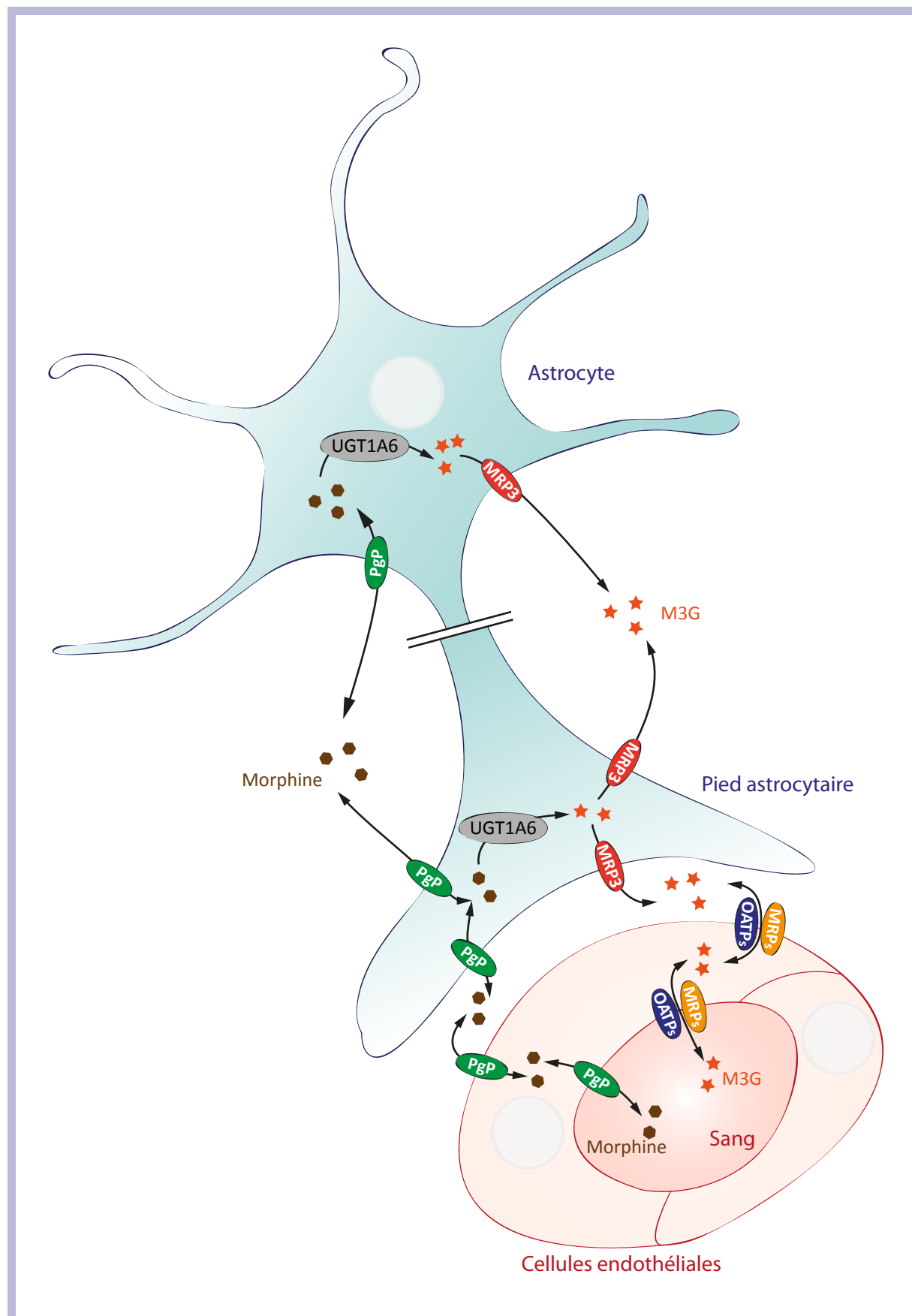


Figure 24 : Hypothèse de la capture, de la dégradation et du stockage de la morphine par les astrocytes. Abréviations : M3G, Morphine-3-glucuronide; MRP, Multidrug resistance protein; OATP, Organic anion-transporting polypeptide; P-gp, P-glycoprotéine; UGT, UDP-glucuronosyl transférase.

suggèrent que les astrocytes sont capables de dégrader la morphine en M3G, après recapture de morphine (cf. : paragraphe précédent). Par ailleurs, les astrocytes expriment le MRP3, un transporteur impliqué dans la sortie des glucuronides de la morphine hors de la cellule (Hirrlinger et al., 2005; van de Wetering et al., 2007). Les astrocytes pourraient ainsi, après dégradation de la morphine par les UGTs, excréter les dérivés glucuronidés *via* des transporteurs (figure 24). L'hypothèse d'un catabolisme de la morphine par les astrocytes n'a encore jamais été proposée et de ce fait, peu de données existent concernant les transporteurs impliqués dans la capture et les différents types d'UGTs exprimées par les astrocytes. La démonstration de l'existence d'un catabolisme de la morphine par les astrocytes ouvrira de nombreuses pistes de recherche, notamment dans le domaine de la tolérance à la morphine (cf. : IV.Discussion, III.1, p.199)

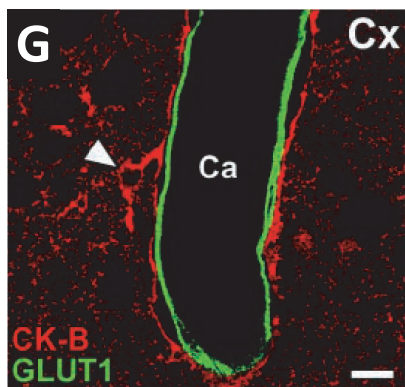
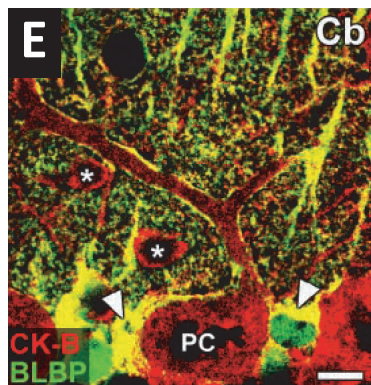
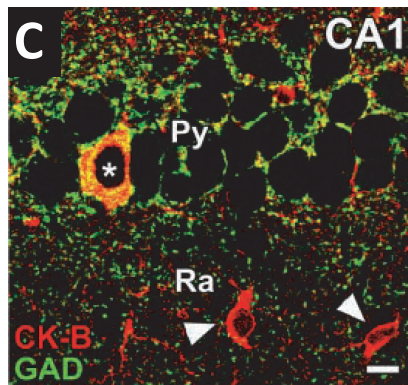
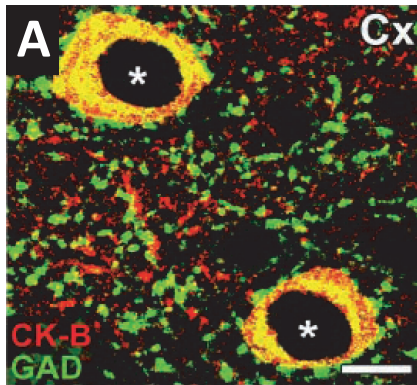
II.3.c. Les astrocytes : un réservoir d'alcaloïdes endogènes

Au sein de la BHE, les interactions entre les astrocytes et les cellules endothéliales sont nombreuses et ont pour rôle de protéger le SNC des agents circulants toxiques, ainsi que de réguler l'homéostasie cérébrale. Les astrocytes jouent plusieurs rôles importants dans la protection et l'homéostasie du SNC, le plus connu étant la capture du glucose à partir de la circulation sanguine (pour revue : Abbott and Romero, 1996).

Les astrocytes, en plus de cataboliser la morphine (endogène et exogène), pourraient servir de réservoirs d'alcaloïdes endogènes. En effet, la détection de codéine, de morphine, de M6G et/ou de M3G dans les pieds astrocytaires (Publications 1 & 2; Laux et al., 2011) suggère que les astrocytes seraient capables de capter/libérer la morphine et ses dérivés à partir/dans la circulation sanguine (figure 24). De plus, la présence de transporteurs de la morphine (p.ex., PgP) ou de ses dérivés glucuronidés (p.ex., MRPs) est décrite sur la membrane astrocytaire, ainsi que sur les membranes apicales et luminales des cellules endothéliales de la BHE (pour revues : Loscher and Potschka, 2005a; Loscher and Potschka, 2005b). Ainsi, la morphine et/ou ses glucuronides pourraient être captés et stockés par les astrocytes après passage des cellules endothéliales de la BHE. Ces cellules seraient également capables de libérer la morphine et/ou ses glucuronides dans la circulation sanguine ou dans le milieu extracellulaire cérébral par un trajet inverse (figure 24). Ces mécanismes permettraient alors de réguler la quantité d'alcaloïdes endogènes présente au sein du SNC, mais également de libérer les alcaloïdes endogènes afin d'activer des effecteurs périphériques ou centraux lors de situations physiologiques ou pathologiques particulières.

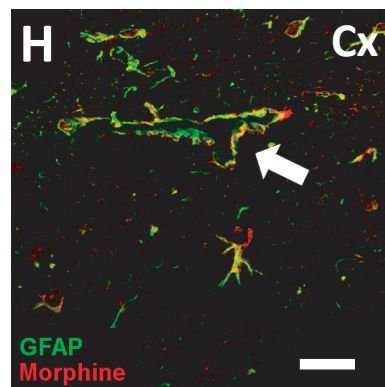
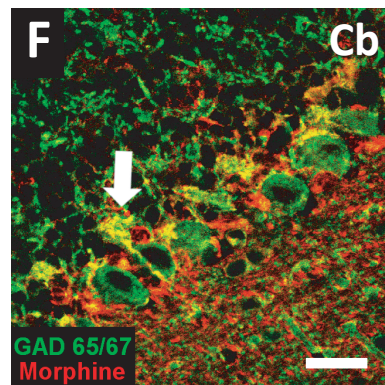
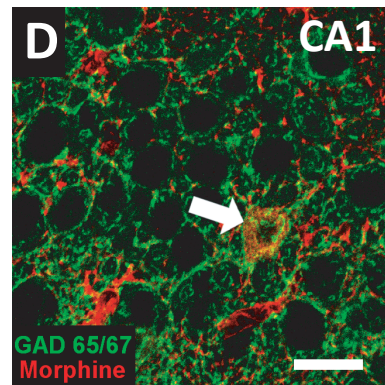
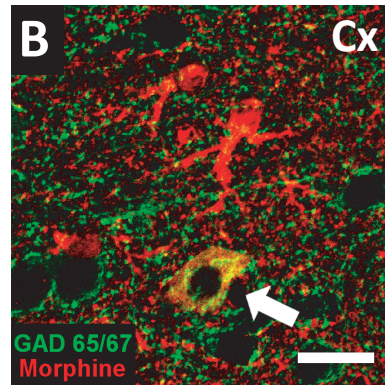
Créatine kinase B (CK-B)

D'après Tachikawa et al., 2004



Morphine endogène et ses dérivés

D'après Laux et al., 2011 (Publication 1)



II.4. Alcaloïdes endogènes et protéines de liaisons

II.4.a. La localisation dans le SNC de la créatine kinase, une similarité avec la localisation de la morphine endogène

Quatre iso-enzymes de la créatine kinase (CK) ont été identifiés (pour revue : Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000); la CK mitochondriale ubiquitaire (uCK-Mi), la CK mitochondriale sarcomérique (sCK-Mi), la CK cytoplasmique cérébrale (CK-B) et la CK cytoplasmique musculaire (CK-M). Dans la seconde partie de mes résultats, j'ai décrit l'existence de complexes de haute affinité entre la CK-B et la morphine endogène ou ses dérivés au sein du SNC de souris. Je n'ai cependant pas déterminé si ce complexe est présent *in situ*, ou si sa formation résulte de l'homogénéisation des tissus cérébraux. Il est donc intéressant de comparer la localisation de la CK-B à celle de la morphine endogène et de ses dérivés décrite dans la première partie de mes résultats figure 25).

La localisation de la CK-B au sein des cellules du SNC est décrite pour être principalement exprimée par certains interneurons GABAergiques et certains astrocytes (Bergen et al., 1993; Friedman and Roberts, 1994; Jost et al., 2002; Molloy et al., 1992; Tachikawa et al., 2004). De manière intéressante, la morphine endogène et ses dérivés sont présents dans les mêmes types cellulaires que la CK-B. Ils sont retrouvés dans le corps cellulaire et les dendrites de certains des interneurons du cortex (figure 25, A-B), de la corne d'Amon (figure 25, C-D) et des BC dans la couche des cellules de Purkinje du cortex cérébelleux (figure 25, E-F). De plus, la CK-B ainsi que la morphine endogène et ses dérivés sont présents également dans les astrocytes, ainsi que dans les pieds astrocytaires sur les capillaires sanguins (figure 25, G-H).

On observe cependant des différences entre les deux localisations. En effet, la CK-B est

Figure 25 : Comparaison de la localisation cérébrale de la CK-B (Tachikawa et al., 2004) et de la morphine endogène et de ses dérivés (Laux et al., 2011). Les anticorps utilisés sont indiqués en bas à gauche. L'immunoréactivité pour la CK-B et pour la morphine endogène et ses dérivés est indiquée en rouge. **A, C, E et G** : Les astérisques indiquent les interneurons exprimant la CK-B et les flèches les astrocytes. **B, D et F** : Les flèches indiquent les interneurons contenant la morphine endogène et ses dérivés. **H** : la flèche désigne les pieds astrocytaires contenant la morphine endogène et ses dérivés. Abréviations : Cx, Cortex; CA1, Corne d'amon 1; Cb, Cervelet; GAD, Glutamic acid decarboxylase; GFAP, Glial fibrillary acidic protein; BLBP, Brain lipid-binding protein; GLUT1, Glucose transporter 1. Échelles : A, C, E et G = 10µm ; B, D, F et H = 20µm

décrite pour être présente dans le cytoplasme des neurones de Purkinje, cellules dans lesquelles la morphine et ses dérivés sont absents. La CK-B est présente exclusivement dans des neurones GABAergiques, alors que la morphine endogène et ses dérivés sont retrouvés dans certaines populations de neurones serotoninergiques (p.ex., noyaux du raphé) ou glutamatergiques (p.ex., noyaux profonds du cervelet). J'ai également décrit que l'anticorps anti-morphine utilisé était incapable de reconnaître la morphine liée à la CK-B en condition non dénaturante (cf. : III.Résultats, partie 2, publication 4). Ces données suggèrent que l'immunoréactivité pour la morphine endogène ou ses dérivés observée dans le SNC représente leur forme libre, et non leur forme complexée à la CK-B.

Les similitudes et les différences de localisation de la CK-B vis-à-vis de la morphine endogène et de ses dérivés permettent de définir de nouvelles hypothèses quant au(x) rôle(s) de ce complexe. Ces hypothèses sont développées dans les parties suivantes.

II.4.b. La morphine endogène pourrait-elle avoir une implication dans le métabolisme énergétique au sein du SNC ?

La créatine kinase est décrite pour être impliquée dans le métabolisme énergétique du SNC (uCK-Mi et CK-B) et des muscles (sCK-Mi et CK-M). Les iso-enzymes mitochondriaux de la CK vont, en raison de l'excès d'ATP présent dans la mitochondrie, catalyser la réaction transformant la créatine en phosphocréatine. La phosphocréatine sert alors de réservoir énergétique au sein des cellules. Dans le cytoplasme, les iso-enzymes cytoplasmiques de la CK vont catalyser la réaction inverse (phosphocréatine → créatine) afin de former de l'ATP (pour revues : Beard and Braissant, 2010; Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000). La localisation de la morphine endogène et de la CK-B au sein des mêmes cellules, ainsi que leur association sous forme de complexe de haute affinité, posent une première question évidente, celle de l'implication de la morphine endogène dans l'homéostasie énergétique du SNC.

La morphine endogène est présente dans le cytoplasme des neurones et des astrocytes et pourrait ainsi moduler l'activité de la créatine kinase, être un cofacteur, ou même représenter un substrat de cette enzyme (cf. : IV.Discussion, I.5.b, p.179). Cependant, à l'heure actuelle aucune étude ne décrit les effets de la morphine sur l'activité de la créatine kinase. Seuls les travaux menés en 1973 par Nasello et coll., décrivent une diminution des taux d'ATP cérébraux après une administration aiguë de morphine et une augmentation après une administration chronique de morphine (Nasello et al., 1973) et suggèrent une implication de la morphine dans le métabolisme énergétique du SNC.

En plus de posséder une action sur le métabolisme énergétique au sein du SNC, la morphine endogène pourrait également contrôler les taux d'ATP intra- et extracellulaires. Or, il est connu que l'ATP et les purines en général (Adénosine, AMP, ADP), sont impliquées dans la communication neuronale ou neurone-glie et dans de nombreux processus physiologiques (pour revues : Burnstock, 2008; Fields and Burnstock, 2006; Majumder et al., 2007).

II.4.c. La créatine kinase en tant que chélateur ou transporteur des alcaloïdes endogènes

En plus de l'implication de la morphine dans le métabolisme énergétique du SNC, l'interaction de la CK avec la morphine ou ses dérivés endogènes suggère également une implication de la CK dans leur activité, leur biodisponibilité ou dans leur synthèse. Différentes hypothèses peuvent être postulées :

- ▶ La CK pourrait représenter un chélateur de la morphine ou de ses dérivés endogènes en empêchant alors leur liaison aux récepteurs opioïdes. Dans certaines conditions physiologiques ou pathologiques, le ligand opiacé endogène pourrait être libéré et ainsi augmenter les concentrations locales ou globales d'opiacés endogènes.
- ▶ Par ailleurs, la CK pourrait agir comme transporteur de la morphine vers la circulation sanguine. En effet, une élévation des taux sanguins de CK-MM, CK-MB ou CK-BB est décrite dans un certain nombre de pathologies et de lésions musculaires, cardiaques ou cérébrales (pour revue : Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000). La CK pourrait alors transporter la morphine endogène ou ses dérivés dans la circulation sanguine où le complexe pourrait alors être dissocié.
- ▶ Finalement, il est décrit que la CK est capable de lier de manière covalente la dopamine (Van Laar et al., 2009), suggérant que la CK pourrait reconnaître d'autres molécules de la voie de synthèse de la morphine. La CK serait ainsi un « partenaire » potentiel de la voie de synthèse de la morphine endogène.

II.4.d. La PEBP et l'effet analgésique de la M6G

La PEBP (phosphatidyl-ethanolamine binding protein) est décrite pour lier la phosphatidylethanolamine (PE), ainsi que des dérivés de la morphine incluant la β -bromoacetamidomorphine (Grandy et al., 1990) et la M6G (Goumon et al., 2006). La PEBP, qui est présente avec la M6G endogène dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines, pourrait représenter une protéine « chaperonne » sérique protégeant la M6G de sa clairance

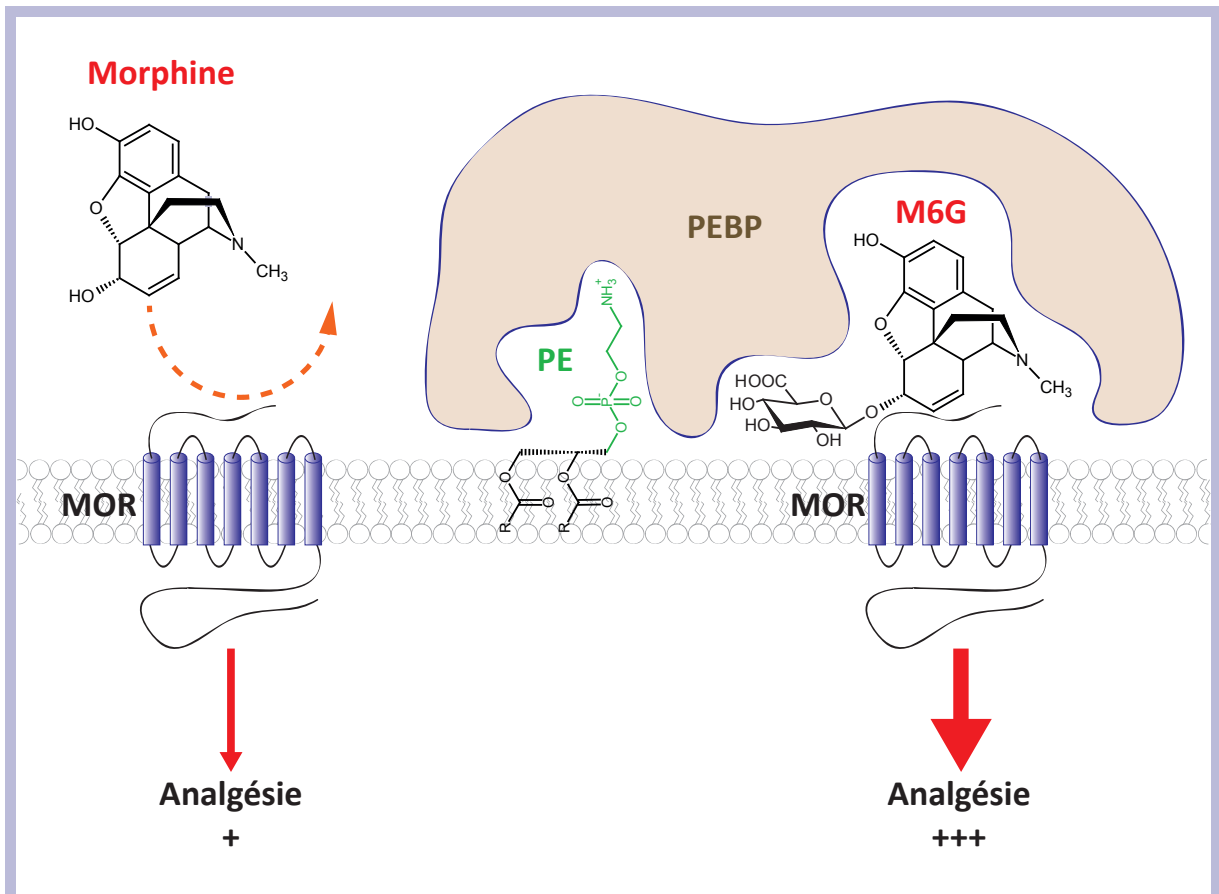


Figure 26 : Liaison simultanée de la PE et de la M6G par la PEBP. Représentation hypothétique de la présentation « prolongée » de la M6G aux récepteurs MORs par la PEBP. La liaison entre la PE et la PEBP permettrait de maintenir la M6G à proximité du récepteur malgré son affinité inférieure à celle de la morphine. Abréviations : M6G, Morphine-6-glucuronide; MOR, Mu opioid receptor; PE, Phosphatidylethanolamine; PEBP, Phosphatidylethanolamine-binding protein.

rénale (Bernier et al., 1986; Goumon et al., 2004; Goumon et al., 2006). Lors de ma thèse (publication 3; Atmanene et al., 2009), j'ai montré que la PEBP est incapable de lier la morphine, mais était capable de lier la M6G et la M3G sans entrer en compétition avec la PE qui est son ligand de référence. Cette sélectivité de liaison est intéressante et permet de proposer de nouvelles hypothèses quant à la différence d'activité analgésique entre la M6G et la morphine.

En effet, la M6G est décrite pour avoir de 1 à 600 fois plus d'activité analgésique que la morphine (pour revue : Lotsch and Geisslinger, 2001) tout en possédant une affinité moindre pour les MORs comparée à celle de la morphine (Brown et al., 1997; Kilpatrick and Smith, 2005; Pasternak et al., 1987). Cette absence de corrélation entre l'effet analgésique puissant de la M6G et les études d'affinité a suggéré l'existence d'un récepteur spécifique à la M6G. Certaines études ont d'ailleurs suggéré l'existence d'un tel récepteur (Lotsch and Geisslinger, 2006; Pan et al., 2009; Rossi et al., 1997; van Dorp et al., 2009). Cependant, la sélectivité de liaison de la PEBP pour la M6G permet de postuler une autre hypothèse concernant le pouvoir analgésique fort de la M6G. En effet, la liaison simultanée de la PE (un lipide présent dans la membrane cellulaire) et de la M6G à la PEBP suggère que la PEBP serait capable de présenter la M6G aux récepteurs MORs. La PEBP pourrait ainsi d'une part lier la PE sur la face externe de la membrane plasmique à proximité d'un MOR, et simultanément lier la M6G pour présenter celle-ci de manière prolongée aux récepteurs MORs (figure 26). La M6G endogène, mais également exogène, pourrait alors activer de manière prolongée les récepteurs MORs et induire une analgésie plus importante. Il est à noter que ce mécanisme, ainsi que celui de l'existence d'un récepteur spécifique, pourraient coexister.

II.5. Morphine endogène, quelles concentrations ?

II.5.a. Concentrations connues de la morphine endogène au sein du SNC.

Au sein du SNC de souris, j'ai décrit la présence de morphine (1.01 ± 0.31 pmoles/g) et de codéine (0.61 ± 0.22 pmoles/g). Ces valeurs sont similaires à celles décrites précédemment (cf. : I.Introduction, V.1, p.47). J'ai également pour la première fois décrit la présence de M6G (0.25 ± 0.15 pmoles/g) et de M3G (0.21 ± 0.22 pmoles/g) endogènes dans le SNC de souris (Publication 1, Laux et al., 2011). Les alcaloïdes endogènes sont présents dans le SNC, cependant, il est impossible d'estimer les concentrations réelles de morphine, codéine, M6G et M3G présentes dans le milieu extracellulaire (p. ex., fente synaptique) ou dans le cytoplasme des cellules. De plus, les taux cérébraux sont décrits pour augmenter dans certains états pathologiques

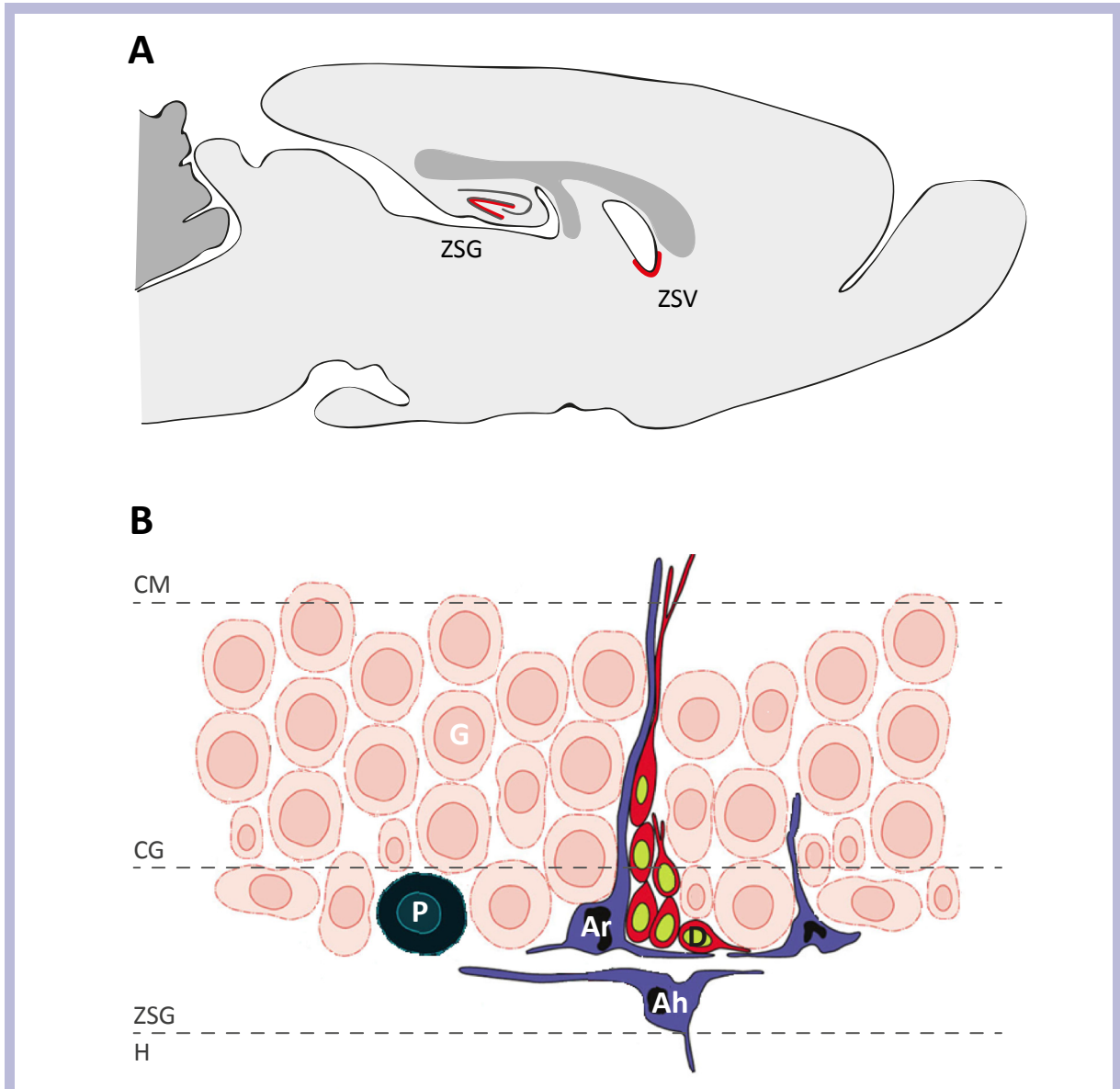


Figure 27 : Neurogenèse chez les mammifères. **A** : Représentation schématique d'une coupe sagittale de cerveau de rongeur, la ZSG et la ZSV sont représentées en rouge. **B** : Représentation des différents types cellulaires de la ZSG du gyrus denté. Abréviations : Ah, astrocytes horizontaux; Ar, astrocytes radiaires; CG, couche granulaire; CM, couche moléculaire; D, neurone postmitotique immature; H, Hile du gyrus denté; G, neurone en grain; P, neurone en panier; ZSG, zone sous granulaire.

comme la schizophrénie (Charlet et al., 2010, cf. : IV.Discussion, III.2, p.202), la maladie de Parkinson (Charron et al., 2011, cf. : IV.Discussion, III.3, p.204) ou encore dans certains états inflammatoires (Goumon et al., 2000a, cf. : I.Introduction, VI.1, p.50), suggérant des variations des concentrations effectives de morphine endogène.

II.5.b. Quels effets pour quelles concentrations ?

A l'heure actuelle, peu d'effets physiologiques de la morphine endogène sont décrits. La partie VI (p.50) de mon introduction en fait une revue, tandis que les discussions de la publication 1 (Laux et al., 2011) et de la publication 2 complètent cette revue avec les nouvelles hypothèses proposées suite à l'étude de la localisation des alcaloïdes endogènes. Cependant, ces discussions décrivent peu de l'importance de la concentration de la morphine endogène.

La morphine exogène semble posséder des effets différentiels, à hautes et faibles doses. En effet, une étude utilisant le test de la plaque chaude a montré qu'une injection d'une faible dose de morphine (entre 1 et 10 µg/kg, sous-cutanée) induisait une hyperalgésie, alors que de fortes doses de morphine (1 et 7 mg/kg, sous-cutanée) entraînaient une analgésie (Galeotti et al., 2006). La morphine posséderait ainsi deux effets opposés suivant sa concentration. Ces résultats confirment les études de Rubovitch et coll. qui ont montré que le DAMGO, un agoniste des récepteurs μ , stimule la production d'AMPc par une lignée SK-N-SH dérivant d'un neuroblastome à 10^{-9} M, mais inhibe la production d'AMPc à 10^{-7} M (Rubovitch et al., 2003).

Ces deux exemples montrent que la connaissance de la concentration effective de la morphine endogène est un élément primordial pour décrire ces effets physiologiques. De plus, il est à noter que les variations des concentrations de morphine endogène par exemple lors d'états pathologiques, pourraient inverser son action physiologique.

II.6. Morphine endogène, neurogenèse et plasticité structurale

II.6.a. Rôles connus de la morphine exogène dans la neurogenèse et la plasticité structurale

Dans le cerveau de mammifères, la zone sous-ventriculaire (ZSV) bordant le ventricule latéral et la zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe adulte sont les deux zones principales dans lesquelles une neurogenèse est observée (figure 27). La morphine est décrite pour réguler la survie et la production des progéniteurs neuronaux dans ces deux zones. Ainsi, la morphine exogène est décrite pour inhiber la neurogenèse dans la ZSG de souris ou de rat adulte *via* son action sur les MORs (Arguello et al., 2008; Fischer et al., 2008; Harburg et al., 2007; Sargeant et al., 2008).

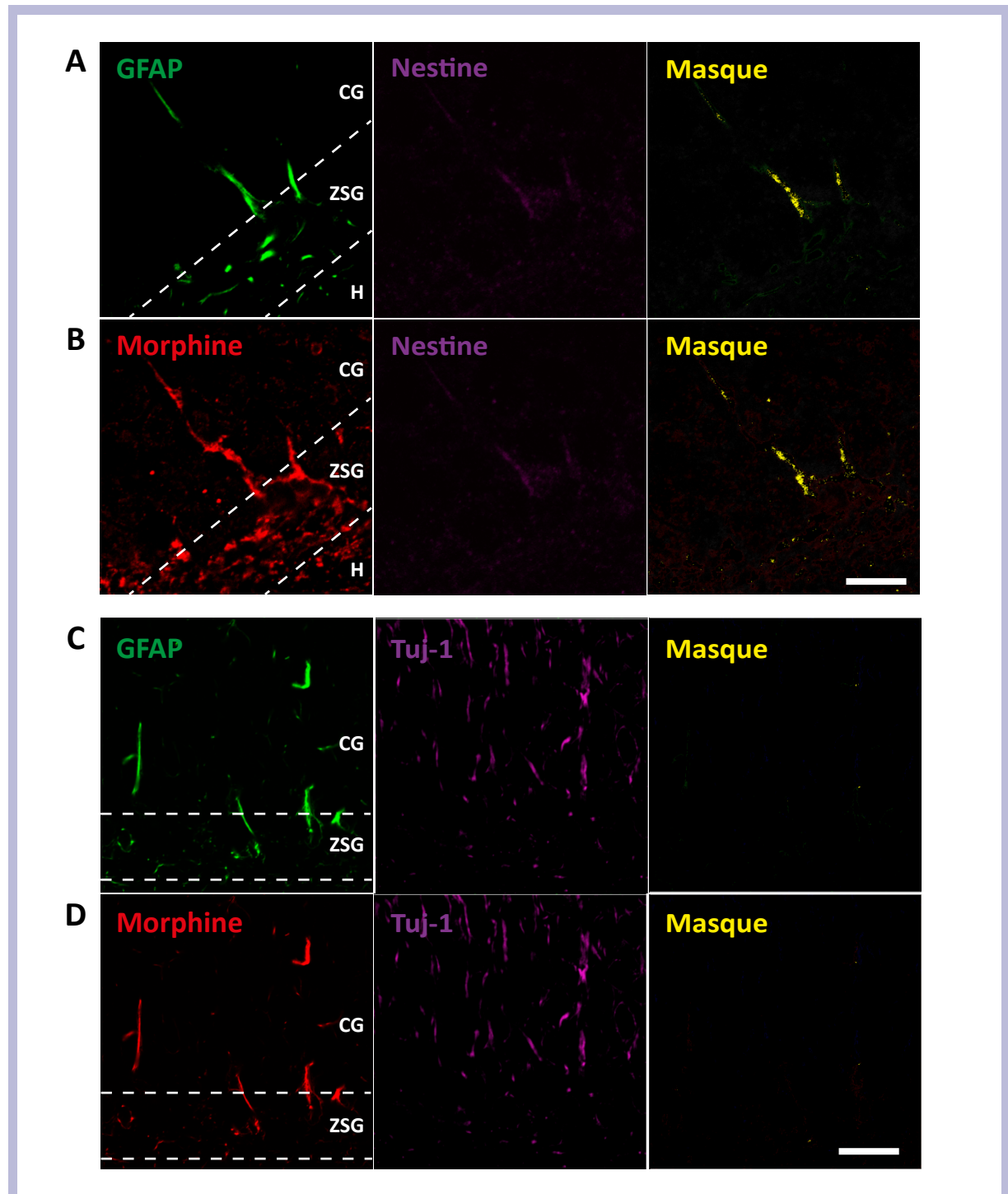


Figure 28 : Co-marquages de la morphine endogène et de ses dérivés avec la GFAP, la nestine et Tuj-1 dans le ZSG du gyrus denté de souris adulte. **A** : Co-marquage GFAP-nestine. **B** : Co-marquage morphine endogène-nestine. **C** : Co-marquages GFAP-Tuj-1. **D** : Co-marquage morphine endogène-Tuj-1. Le masque de colocalisation de chaque comarquage est visualisé en blanc (image de droite). Anticorps utilisé : Morphine (ref : 6D6, Aviva Systems Biology, 1/1000); Nestine (ref : ab5968, Abcam, 1/200); Tuj-1 (ref : 23005, Neuromics, 1/150). Echelles : A, B = 10 μm ; C, D = 20 μm . Abréviations : CG, Couche des cellules granulaires; CM, couche moléculaire; H, Hile; ZSG, zone sous granulaire; GFAP, Glial fibrillary acidic protein; Tuj-1, Neuron-specific class III beta-tubulin.

La morphine exogène est également décrite pour avoir une action sur la plasticité structurale. *In vitro*, ses effets sont dépendants de sa concentration. Ainsi, une concentration élevée de morphine (1 mM) inhibe la croissance des neurites de neurones hippocampiques ou de neurones en grains du cervelet en culture primaire *via* les MORs (Brailoiu et al., 2004). A l’opposé, une faible concentration (< 1 pM) stimule la croissance des neurites de cellules PC-12 et des neurones de la moelle épinière ou du cortex indépendamment des MORs (Brailoiu et al., 2004; Tenconi et al., 1996). *In vivo*, la morphine exogène est également décrite pour provoquer des modifications structurales dans différentes zones du SNC (p. ex., noyau accumbens), et notamment de la structure des dendrites et des épines dendritiques (Badiani and Robinson, 2004; Harston et al., 1980; Ikeda et al., 2010; Robinson and Kolb, 2004). La morphine exogène est également capable de favoriser la régénération axonale et synaptique, dans la moelle épinière de souris lésée (Zeng et al., 2007).

II.6.b. Morphine endogène, neurogenèse et plasticité structurale

Les effets de la morphine exogène sur la neurogenèse et la plasticité structurale suggèrent que la morphine endogène pourrait également posséder de tels effets. Les résultats mentionnés dans la publication 1 (Laux et al., 2011) montrent que la morphine endogène et ses dérivés sont présents dans des cellules de la ZSG et de la ZSV. Dans les deux cas, la morphine endogène et ses dérivés sont plus particulièrement présents au sein des astrocytes de phénotype glie radiaires. J’ai décrit (résultats non publiés, figure 2,A-B) que ces astrocytes, contiennent la morphine endogène ou ses dérivés ainsi que la nestine qui est un marqueur des progéniteurs de phénotype glie radiaire. L’utilisation de Tuj-1, un marqueur des neurones postmitotiques immatures (von Bohlen Und Halbach, 2007; von Bohlen Und Halbach, 2011), a permis de montrer que la morphine endogène et ses dérivés ne sont pas présents dans les neurones postmitotiques (figure 28, C-D). La présence de morphine endogène et de ses dérivés dans les astrocytes de phénotype glie radiaire suggère une implication de ces composés endogènes dans la neurogenèse. Par ailleurs, l’expression des MORs par les progéniteurs de phénotype glie radiaire (Persson et al., 2003) et par les neurones postmitotiques (Harburg et al., 2007) indique une action potentielle des alcaloïdes endogènes sur la neurogenèse. Or, l’action d’opioïdes endogènes sur les MORs est décrite pour inhiber la neurogenèse induite par une ischémie dans la ZSG (Kolodziej et al., 2008). Par ailleurs, le gyrus denté de souris K.O. pour les MORs contient une plus grande quantité de neurones postmitotiques immatures (Harburg et al., 2007).

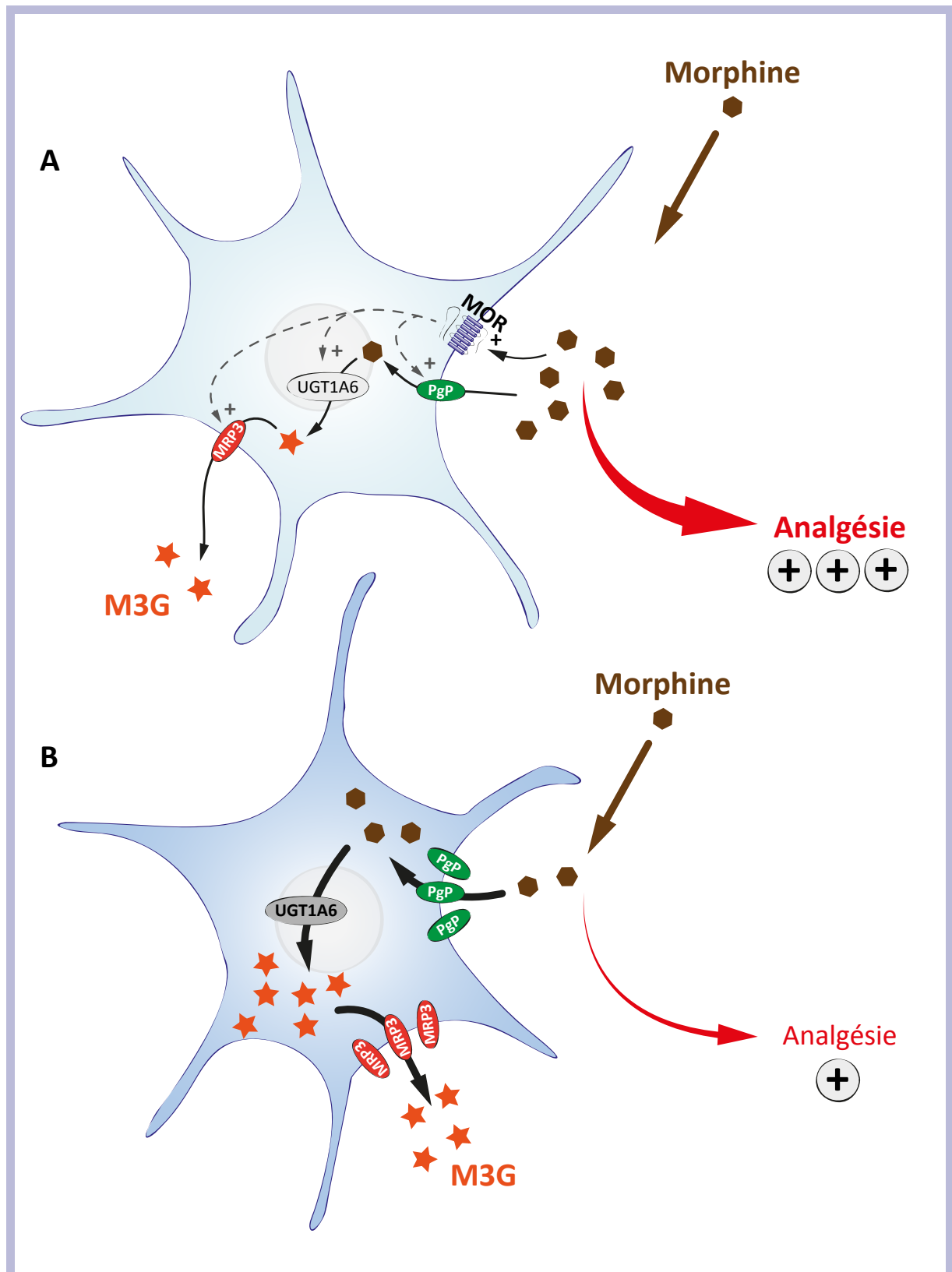


Figure 29 : Hypothèse de la mise en place de la tolérance impliquant le catabolisme de la morphine par les astrocytes. **A :** Induction de la surexpression des transporteurs et des enzymes intervenant dans le catabolisme de la morphine, suite au traitement à la morphine exogène. **B :** Tolérance à la morphine causée par un système de catabolisme plus «performant», qui réduit les quantités disponibles de morphine. Abréviations : M3G, Morphine-3-glucuronide; MOR, Mu opioid receptor; MRP, Multidrug resistance protein; PgP, P-glycoprotéine; UGT, UDP-glucuronosyl transférase.

L'ensemble de ces données suggère que la morphine endogène et ses dérivés pourraient contrôler la prolifération et la survie des progéniteurs. Ces résultats indiquent notamment qu'ils pourraient être impliqués dans les mécanismes d'inhibition de la neurogenèse. De plus, en fonction de leurs concentrations effectives (dépendantes de l'état physiologique ou pathologique) leurs effets sur la neurogenèse pourraient être différents.

III. MORPHINE ENDOGÈNE ET PATHOLOGIES

III.1. Tolérance, hyperalgésie induite par les opiacés et catabolisme

III.1.a. Tolérance et catabolisme des opiacés

La tolérance, du latin *tolerare*, signifie supporter ou accepter. D'un point de vue pharmacologique, la tolérance consiste lors de la prise répétée d'une drogue, en une atténuation progressive voire une disparition de ses effets. Les mécanismes neurobiologiques de la tolérance aux analgésiques opioïdes sont encore mal compris et deux grandes hypothèses sont proposées dans la littérature (Koch and Holtt, 2008; Ueda and Ueda, 2009).

- ▶ La première hypothèse décrit que les analgésiques opioïdes perdent de leur efficacité suite à une modification des mécanismes cellulaires responsables de l'effet analgésique. A titre d'exemple, la tolérance serait le résultat de l'internalisation des récepteurs, ne permettant plus aux opioïdes d'induire une analgésie. Cependant, ces résultats sont controversés puisque la morphine n'est pas, dans toutes les situations, capable d'induire l'internalisation des MORs, notamment *in vivo* (pour revue : Lopez-Gimenez and Milligan, 2010)
- ▶ La seconde hypothèse serait que l'opioïde garde son efficacité analgésique, mais que, paradoxalement, il entraînerait simultanément l'activation des voies « pronociceptives » conduisant finalement à l'absence d'effets analgésiques et donc à la tolérance (pour revues : Lee et al., 2011; Simonnet and Laboureyras, 2009).

La présence de morphine endogène ou de ses dérivés dans les astrocytes à travers tout le SNC (cf. : III.Résultats, partie 1, publications 1 & 2) m'a conduit à émettre l'hypothèse d'un catabolisme de la morphine par les astrocytes (cf. : IV.Discussion, II.3.b, p.185). Ce catabolisme pourrait être intégré dans une nouvelle hypothèse permettant d'expliquer en partie les phénomènes de tolérance (figure 29). Les astrocytes expriment les récepteurs aux opioïdes et la morphine est connue pour induire la surexpression de certaines protéines et l'activation

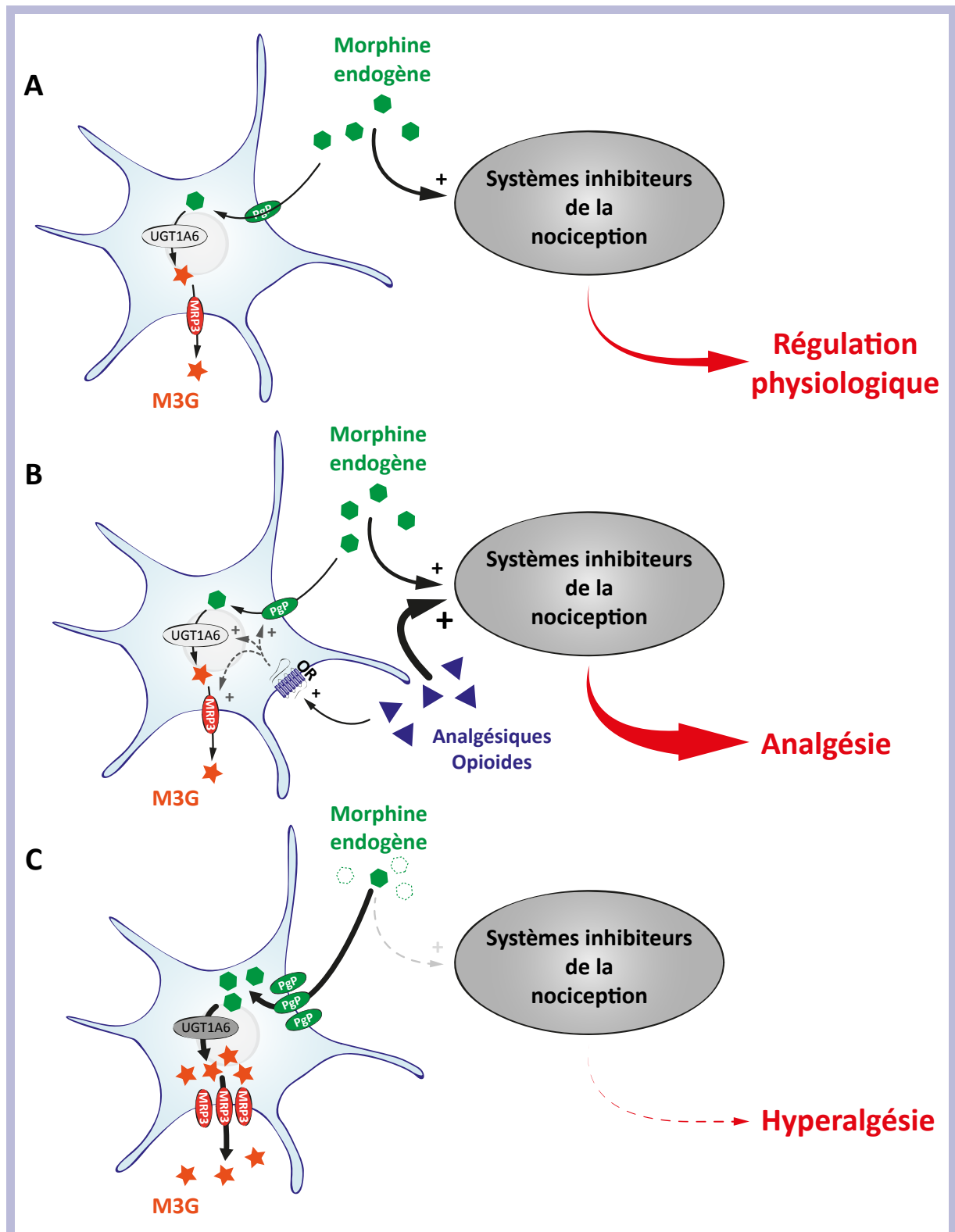


Figure 30 : Hyperalgésie induite par les analgésiques opioïdes, hypothèse de l'implication de la morphine endogène et de son système de catabolisme. **A :** Activation tonique physiologique des systèmes inhibiteurs de la nociception par la morphine endogène. **B :** Analgésie induite par les analgésiques opioïdes et surexpression du système de catabolisme de la morphine endogène. **C :** Apparition de l'hyperalgésie suite à la surexpression du système de catabolisme de la morphine endogène. Abréviations : M3G, Morphine-3-glucuronide; MOR, Mu opioid receptor; MRP, Multidrug resistance protein; PgP, P-glycoprotéine; UGT, UDP-glucuronosyl transférase.

de certains facteurs de transcription au sein de ces cellules (Ikeda et al., 2010; Mahajan et al., 2005; Mahajan et al., 2002). Dans le cas d'une exposition prolongée à la morphine exogène, il est envisageable qu'une surexpression des mécanismes de transport et de dégradation se mette en place (cf. : IV.Discussion, II.3, p.183). Ainsi, des mécanismes de catabolisme plus performants permettraient de réduire les quantités actives de morphine pour une dose administrée identique. L'effet analgésique serait alors moindre.

La même hypothèse peut être postulée pour les autres analgésiques opiacés. En effet ceux-ci sont pour la plupart catabolisés par la même famille d'enzymes de dégradation, les UGT (Armstrong and Cozza, 2003; Kiang et al., 2005). Ainsi, la surexpression de ce système de catabolisme pourrait représenter un moyen pour l'organisme de compenser l'excès d'opioïdes exogènes présents et contribuerait à la mise en place de la tolérance à ces substances. Cependant, la surexpression du système de catabolisme de la morphine peut également perturber les fonctions physiologiques de la morphine endogène en diminuant ses quantités. Plusieurs autres hypothèses peuvent ainsi être formulées.

III.1.b. Implication de la morphine endogène dans l'hyperalgésie induite par les opioïdes exogènes.

En plus de l'effet antalgique recherché, les substances opioïdes vont induire, une période d'hyperalgésie pouvant être de longue durée. Ce phénomène d'hypersensibilité à la douleur induit par un traitement aux opioïdes est appelé « opioid-induced hyperalgesia » (OIH). Ce phénomène est encore mal connu et différentes hypothèses sont proposées dans la littérature. Ainsi, les substances analgésiques activeraient simultanément des systèmes inhibiteurs (effet analgésique) et facilitateurs (effet hyperalgésique) de la nociception. L'activation de système facilitateur est prolongée dans le temps et est décrite pour dépendre des récepteurs NMDA. D'autres systèmes semblent être également impliqués dans l'OIH, notamment l'augmentation des taux de dynorphine, une activation des contrôles descendants et des facteurs génétiques (pour revues : Chu et al., 2008; Lee et al., 2011; Simonnet and Laboureyras, 2009).

Quelques études décrivent l'implication de la morphine endogène dans les contrôles de la douleur et suggèrent son implication dans une activation tonique des systèmes inhibiteurs de la nociception (cf. : I.Introduction, VI.2.b, p.52). Lors de mon doctorat, j'ai décrit la présence de morphine endogène dans des structures impliquées dans le contrôle de la nociception incluant la PAG, le noyau du raphé magnus et la corne dorsale de la moelle épinière (cf. : III. Résultats, partie 1, publications 1 & 2). Ces données, en plus de l'hypothèse du catabolisme de

la morphine par les astrocytes développée précédemment, suggèrent plusieurs indications sur une implication éventuelle de la morphine endogène dans l'OIH (figure 30).

La morphine endogène qui posséderait un effet activateur tonique sur les systèmes inhibiteurs de la nociception (p.ex., contrôles descendants de la PAG ou du raphé Magnus), pourrait maintenir une sensibilité à la douleur à un niveau « homéostasique ». Comme décrits dans la partie précédente, les taux de morphine endogène pourraient être diminués suite à l'administration d'une substance analgésique ou de toutes autres substances induisant la surexpression des mécanismes de son catabolisme. Ainsi, la suppression de l'activation tonique de la morphine endogène sur les systèmes inhibiteurs de la nociception conduirait, en absence de la substance analgésique exogène, à une hyperalgésie (figure 30).

Cette hypothèse supplémentaire pourrait contribuer, avec les autres mécanismes suggérés dans la littérature, à la complexité du phénomène de l'OIH.

III.2. La Schizophrénie

III.2.a. Une pathologie « hypermorphinergique » ?

La schizophrénie est une psychose qui se manifeste par des signes de dissociation mentale, de discordance affective et d'activité délirante. C'est l'une des principales causes d'invalidité au niveau mondial (Murray and Lopez, 1996). L'hypothèse dopaminergique de la schizophrénie est actuellement la principale hypothèse sur les mécanismes neurobiologiques de cette maladie. Cette hypothèse postule qu'un excès de dopamine dans la voie mésolimbique serait responsable de certains des symptômes de la schizophrénie (pour revues : Cousins et al., 2009; Heinz and Schlagenhauf, 2010; Miyake et al., 2011). La dopamine étant un précurseur de la morphine endogène, il était intéressant d'étudier les taux de morphine endogène dans cette pathologie hyperdopaminergique.

Ainsi, j'ai eu l'occasion de participer à une étude portant sur les souris STOP, un modèle animal possédant certains troubles moléculaires et cellulaires de la schizophrénie et étant hyperdopaminergiques (Andrieux et al., 2002; Brun et al., 2005). Nous avons décrit une augmentation des taux de morphine endogène cérébraux chez les souris STOP comparées aux souris sauvages (cf. : IV.Discussion, figure 15, p.166)(Charlet et al., 2010).

De manière intéressante, la COMT qui est potentiellement impliquée dans la méthylation des précurseurs de la morphine (cf. : IV.Discussion, I.3.c, p.169), est décrite comme étant plus active dans certaines régions cérébrales de patients schizophrènes. Cette activité plus

importante est due le plus souvent à la présence du polymorphisme Val105/158Met (pour revue : Sagud et al., 2010). De plus, les patients schizophrènes sont décrits comme possédant des quantités de CK-B et des taux d'ARN messenger de la CK-B inférieurs à ceux trouvés chez des patients sains (Burbaeva et al., 2003; MacDonald et al., 2006). Ces données sont corrélées avec des études montrant que le métabolisme énergétique est perturbé dans cette maladie (Martins-de-Souza et al., 2009). La mise en évidence d'un complexe de haute affinité entre la CK et les alcaloïdes endogènes (cf. : III.Résultats, publication 4) suggère que la diminution des quantités de CK-B observée chez les patients schizophrènes pourrait conduire à l'augmentation des taux de morphine endogène libre et donc potentiellement actifs.

Toutes ces données suggèrent que la schizophrénie pourrait correspondre à une maladie « hypermorphinergique ». Cependant, à l'heure actuelle aucune donnée concernant les taux de morphine endogène n'est disponible chez des patients schizophrènes. De manière intéressante, il est décrit dans certains cas l'utilisation d'antagonistes opioïdes (p.ex., naloxone, naltrexone) pour le traitement de la schizophrénie associée à une addiction, ce qui suggère leur implication dans cette maladie (McNicholas and Martin, 1984; Welch and Thompson, 1994; Wonodi et al., 2004). Ainsi, les taux élevés de morphine endogène pourraient être liés à certains des symptômes observés dans cette pathologie.

III.2.b. Morphine endogène, schizophrénie et hypoalgésie

Parmi les symptômes de la schizophrénie, les observations cliniques rapportent une absence d'expression de la douleur lors de situations normalement douloureuses chez les patients schizophrènes (p.ex., brûlures, fractures ...). Cependant, ce phénomène est mal connu et deux hypothèses prédominent dans la littérature : **(i)** la modification des contrôles endogènes de la douleur et **(ii)** une interprétation consciente différente des signaux nociceptifs (Autie et al., 2009; Blumensohn et al., 2002; Bonnot et al., 2009).

L'hypermorphinergie retrouvée chez les schizophrènes pourrait expliquer différentes modifications fonctionnelles des contrôles endogènes de la douleur. Ainsi, ces taux élevés de morphine endogène pourraient activer, *via* les MORs, les contrôles inhibiteurs de la nociception. Un certain nombre de données suggèrent par ailleurs l'implication de la morphine endogène dans l'activation des systèmes inhibiteurs de la douleur (cf. : I.Introduction, VI.2.b, p.52).

Il est également décrit que le polymorphisme A118G du gène OPRM1 est présent de manière plus fréquente chez les patients schizophrènes, ce qui suggère l'implication des MORs

et du système opioïde/opiacé endogène dans la schizophrénie (Sery et al., 2010). De manière intéressante, les patients possédant ce polymorphisme sont décrits pour être moins sensibles à la morphine (pour revue : Mague and Blendy, 2010). La question se pose alors sur l'origine de l'élévation des taux de morphine endogène. En effet, l'élévation des taux de morphine endogène pourrait être d'une part la conséquence de l'hyperdopaminergie ou d'autre part d'un mécanisme adaptatif permettant de compenser le manque de sensibilité à la morphine du polymorphisme A118G des MORs.

Les résultats décrits dans cette partie montrent l'importance de l'étude de la morphine endogène dans cette pathologie. En effet, l'étude de la morphine endogène pourrait constituer une nouvelle approche permettant d'apporter de nouveaux éléments sur la compréhension ou le traitement de la schizophrénie.

III.3. La maladie de Parkinson

III.3.a. Une autre pathologie « hypermorphinergique ».

La maladie de Parkinson est responsable de troubles essentiellement moteurs. Cette maladie est caractérisée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte qui se traduit par une déplétion en dopamine dans le SNC. Nous nous sommes intéressés, en collaboration avec le laboratoire d'Erwan Bezard à Bordeaux, aux taux de morphine endogène retrouvés dans la pathologie de Parkinson chez l'homme et dans différents modèles animaux. Nous avons décrit dans ces différents modèles une augmentation des taux de morphine endogène, alors que les taux de dopamine sont diminués (Charron et al., 2011). Ces résultats surprenants, en contradiction avec la voie de synthèse jusqu'à présent décrite de la morphine endogène, sont détaillés dans la partie I.4.a de la discussion.

Mes données sur les taux de morphine endogène suggèrent que la maladie de Parkinson représente une pathologie « hypermorphinergique » et que ces taux élevés de morphine endogène pourraient être à l'origine ou la conséquence de certains des symptômes observés.

III.3.b. La morphine endogène et les troubles moteurs dans la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson se caractérise par des troubles moteurs dont les principaux sont la lenteur (akinésie), la rigidité des mouvements (hypertonie), ainsi que des tremblements. L'étude que j'ai réalisée sur la localisation de la morphine endogène et de ses dérivés au sein

du SNC (cf. : III.Résultats, partie 1, Publications 1 & 2) montre la présence de ces composés dans des structures impliquées dans le contrôle de la motricité, des mouvements et de la posture. La morphine endogène et ses dérivés pourraient ainsi être impliqués dans le contrôle de la motricité et de la posture (publication 1; Laux et al., 2011). L'augmentation de l'immunoréactivité pour la morphine endogène et ses dérivés, observée dans les modèles parkinsoniens (Charron et al., 2011) indique une augmentation des quantités de morphine endogène et de ses dérivés. Cette augmentation pourrait avoir différentes implications : **(i)** être responsable de certains des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson ou **(ii)** être un des nombreux mécanismes de compensation mis en place par le SNC (Bezard and Gross, 1998; Bezard et al., 2003). Ainsi, l'élévation des taux de morphine endogène serait-elle la conséquence d'un dysfonctionnement des fonctions motrices, ou directement liée à la modification du métabolisme de la dopamine, son précurseur ? Ces questions restent en suspens.

III.3.c. Symptômes douloureux dans la maladie de Parkinson et morphine endogène

En plus des symptômes moteurs, la maladie de Parkinson est également associée, avec une prévalence d'environ 40%, à des symptômes douloureux variés (pour revues : Chaudhuri and Odin, 2010; Ford, 2010). Ainsi, une hyperalgésie thermique au chaud est observée chez certains patients (Schestatsky et al., 2007), alors qu'une autre étude décrit une hypoalgésie thermique au froid (Brefel-Courbon et al., 2005). Dans les deux cas, une amélioration de ces symptômes est observée après traitement à la L-DOPA. De la même manière, nous avons décrit un retour à la normale des taux de morphine endogène lors d'un traitement à la L-DOPA chez les patients et dans nos modèles parkinsoniens (Charron et al., 2011). La morphine endogène et ses dérivés pouvant intervenir dans le contrôle de la nociception (cf. : I.Introduction, VI.2.b, p.52), l'augmentation de leurs taux pourrait être à l'origine de certains des symptômes douloureux observés chez les patients parkinsoniens. La corrélation entre le traitement à la L-DOPA et la diminution des quantités de morphine endogène, ainsi que l'atténuation des symptômes douloureux, renforce l'hypothèse de l'implication de la morphine endogène dans ces symptômes. Cependant, comme décrit dans la partie précédente, il n'est pas possible de déterminer à l'heure actuelle si cette élévation des taux de morphine endogène correspond à la cause ou à la conséquence de ces symptômes. De plus, la prévalence des symptômes douloureux de la maladie de Parkinson étant de 40%, il serait intéressant d'étudier les différences et les similarités (p.ex., taux de morphine endogène, polymorphismes) entre les patients parkinsoniens « douloureux » et les autres.

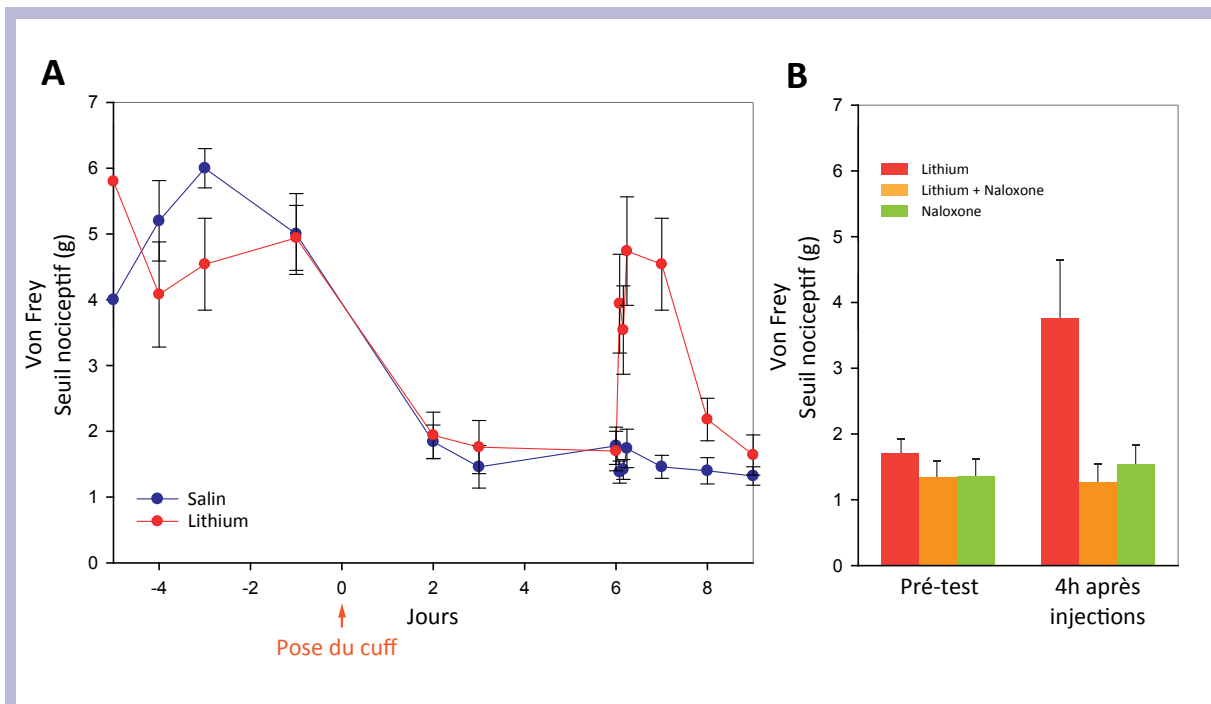


Figure 31 : Effet du lithium sur la sensibilité mécanique de la patte ipsilatérale à la pose d'un cuff d'un modèle de souris neuropathique. La pose du manchon de polyéthylène sur le nerf sciatique de souris est réalisée comme décrit précédemment et induit une hyperalgésie post-opératoire, puis chronique (Benbouzid et al., 2008; Mosconi and Kruger, 1996). Aucun effet de la pose du cuff et du traitement au lithium n'est observé sur la sensibilité nociceptive de la patte controlatérale (non représentée). **A** : Représentation de la sensibilité mécanique (patte ipsilatérale) avant l'opération, après l'opération et après un traitement au lithium (injection unique, 100 mg/kg, i.p.). Groupe contrôle (n=10, bleu) et groupe traité au lithium (n=10, rouge). **B** : Sensibilité mécanique (patte ipsilatérale) observée 5 semaines après l'opération, avant (Pré-test) et 4h après injection de lithium (n=5, 100 mg/kg, i.p., rouge), de Naloxone (n=5, 0.1 mg/kg, s.c., vert) ou des deux (orange).

III.4. Lithium et morphine endogène

Le lithium est un composé couramment utilisé en milieu hospitalier pour le traitement de différents types de pathologies : **(i)** psychiatriques incluant la schizophrénie (Buckley, 2008), la dépression (Ratanajamit et al., 2006) et l'alcoolisme (Frye and Salloum, 2006), **(ii)** douloureuses comme l'algie vasculaire de la face (Leroux and Ducros, 2008), l'herpes douloureux (Gaby, 2006) et la fibromyalgie (Fontrier, 2004), **(iii)** immunitaires comme les leucopénies (Focosi et al., 2009), et **(iv)** hormonales comme l'hyperthyroïdie (Akin et al., 2008) et l'hyponatrémie (Zietse et al., 2009).

Actuellement, l'effet du lithium est mal compris. Ce composé semble traverser les membranes par diffusion passive ou par des transports membranaires actifs dépendant des ions sodium, potassium et calcium. Dans la cellule, le lithium est décrit pour agir sur l'adénylate cyclase et la phospholipase C. Il affecterait également le transport de certains précurseurs (p.ex., choline, tryptophane) et l'activité (p.ex., potentialisation du GABA) de certains neurotransmetteurs (pour revues : Pasquali et al., 2010; Phiel and Klein, 2001). Cependant ces effets, n'ont pas été corrélés avec ses effets thérapeutiques.

J'ai décrit dans la seconde partie de mes résultats (cf. : III.Résultats, partie 2, publications 4 & 5), que le lithium est capable de dissocier les complexes CK-alcaloïdes endogènes ainsi que les complexes sériques protéines-alcaloïdes endogènes inconnus. Le lithium serait donc capable, *in vivo*, de provoquer une augmentation des quantités libres de morphine endogène ou de ses dérivés. Des résultats préliminaires réalisés au laboratoire (par M. Aouad) ont montré que le lithium possède un effet analgésique sur la sensibilité mécanique de souris neuropathiques (modèle du cuff). Ainsi, l'hyperalgésie observée dans ce modèle, après l'opération, est atténuée par un traitement au lithium, que ce soit 1 semaine (figure 31A, hyperalgésie post-opératoire) ou 5 semaines après l'opération (figure 30B, hyperalgésie chronique). L'analgésie induite par le lithium est maintenue durant 48h après une injection unique et est bloquée par l'administration de naloxone, un antagoniste des récepteurs opioïdes (figure 31B), suggérant que l'effet analgésique du lithium serait dépendant d'un ligand endogène de ces récepteurs.

Ainsi, les effets du lithium dans le traitement des pathologies citées ci-dessus et de la neuropathie dans notre modèle murin pourraient être expliqués par la « libération », après dissociation de complexes protéine-morphine, de morphine endogène ou de ses dérivés.



Chapitre 5 :

PERSPECTIVES

PERSPECTIVES

I. UTILISATION DU LITHIUM ET IDENTIFICATION D'UN PEPTIDE DE LIAISON

L'identification d'un complexe de haute affinité impliquant la créatine kinase et la morphine (ou ses dérivés endogènes), ainsi que la découverte de la dissociation de ce complexe par le lithium, ouvrent de nombreuses perspectives biotechnologiques et thérapeutiques (publication 4). Ce peptide devra être modifié afin de le protéger des protéases, mais également afin de modifier ses caractéristiques pharmacologiques, notamment sa capacité à traverser ou non la BHE ou à lier plus spécifiquement un alcaloïde particulier. Ce chapitre présente les perspectives et les intérêts de ces découvertes.

II. PERSPECTIVES BIOTECHNOLOGIQUES

II.1. Dissociation des complexes protéines-morphine pour le dosage de la morphine endogène et exogène

La morphine endogène est présente en faibles quantités et les rendements des techniques d'extraction et de quantification actuelles sont très bas. L'ensemble des données décrites et citées précédemment dans ce manuscrit suggère que la morphine endogène et ses dérivés interviennent dans un grand nombre de processus physiologiques et pathologiques, aussi bien au sein du SNC qu'en périphérie. De plus, lors de pathologies, la morphine endogène pourrait être utilisée comme marqueur sérique ou tissulaire, comme déjà décrit dans les cas d'infections systémiques (chocs septiques)(Glattard et al., 2010).

Les dosages de la morphine exogène sont couramment pratiqués, notamment lors de tests toxicologiques ou pharmacologiques. Cependant, aucun consensus concernant son dosage n'existe jusqu'à présent et chaque année des études décrivent de nouveaux protocoles de détection, de la morphine dans les cheveux, le sang ou l'urine humaine (Heltsley et al., 2010; Musshoff et al., 2011; Wang and Burns, 2009).

Cependant, la présence de protéines de liaison à la morphine, qu'elles soient de hautes ou de basses affinités, sériques ou tissulaires, diminue la quantité de morphine « libre » détectable. En effet, dans ma publication 5, il apparaît que plus de la moitié de la morphine endogène/exogène n'est pas détectée (test ELISA) probablement en raison de sa liaison à des protéines sériques. J'ai montré l'importance de l'utilisation d'un tube lithium-hépariné, qui permet de doser la majorité de la morphine présente. Par ailleurs, dans la publication 4, j'ai décrit qu'un traitement au lithium permet la dissociation du complexe de haute affinité entre la créatine kinase et la morphine endogène ou ses dérivés.

Le développement de kits diagnostics utilisant le lithium ou l'héparinate de lithium permettrait d'augmenter les quantités de morphine endogène ou exogène « libres », détectables, dans des échantillons sanguins, de tissus ou de cheveux et ainsi améliorer son rendement de détection.

II.2. Détection de la morphine endogène à l'aide d'un peptide de liaison.

Comme cité précédemment, les anticorps anti-morphine représentent le moyen de détection le plus fréquemment utilisé pour doser la morphine exogène ou endogène. Les anticorps sont ainsi aussi bien utilisés pour les dosages (p. ex., tests ELISA) que pour les études immunohistochimiques/cytochimiques. Cependant, ces anticorps souffrent en général d'un manque de spécificité. En effet, lors de ma thèse, sur une dizaine d'anticorps commerciaux testés (vendus pour être spécifiques de la morphine), seulement six d'entre eux sont bloqués par la morphine (test ELISA par compétition), mais aussi par la codéine, la M6G et la M3G. De plus, cette détection est en général de faible affinité, hormis pour deux anticorps (6D6 et 3A6, AVIVA biosciences) pour lesquels l'affinité est très importante.

Le développement d'un peptide de liaison de haute affinité spécifique de la morphine pourrait être utilisé en lieu et place d'un anticorps. Ce peptide pourrait alors être utilisé pour développer des outils de dosage et de détection de la morphine endogène/exogène et pourrait par exemple être directement conjugué à un élément permettant sa visualisation (p. ex., fluorophores, enzymes).

II.3. « Chélation » de la morphine endogène, *in vivo*, à but technologique

Actuellement, les connaissances portant sur les enzymes impliquées dans la voie de synthèse de la morphine endogène ne sont pas suffisantes pour développer un modèle de

souris K.O. permettant d'abolir la synthèse de morphine endogène. Un tel modèle permettrait d'avancer dans la compréhension des rôles de la morphine endogène. Cependant, un peptide liant à forte affinité et spécifiquement la morphine endogène ou ses dérivés pourrait être utilisé comme agent « chélateur ». Si la liaison de ce peptide à la morphine inhibe l'activité de celle-ci, cet outil permettrait de créer des modèles n'ayant plus de morphine endogène fonctionnelle. Ainsi, sans agir sur les récepteurs et les peptides opioïdes endogènes, cette approche permettra de bloquer spécifiquement la morphine endogène afin d'en étudier ses fonctions. Ce peptide pourrait être injecté de différentes manières pour « chélater » la morphine endogène présente dans le sang, le SNC ou dans une aire cérébrale particulière (micro-injection).

III. PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES

III.1. Traitement des maladies « hypermorphinergiques ».

Le développement d'un peptide liant à haute affinité la morphine endogène est d'un point de vue thérapeutique intéressant puisqu'il pourrait être utilisé dans des maladies où les taux de morphine endogène sont élevés et sont responsables de certains des symptômes. En effet, comme précédemment cité dans ce manuscrit, certaines pathologies sont décrites pour être « hypermorphinergiques ». C'est le cas de pathologies cérébrales comme la maladie de Parkinson (cf. : IV.Discussion, III.3, p.204) et de la schizophrénie (cf. : IV.Discussion, III.2, p.202), mais également des pathologies comme les infections septiques, les stress chirurgicaux (cf. : I.Introduction, VI.1, p.50), la boulimie ou l'anorexie (Marrazzi et al., 1997) ou encore l'addiction (cf. : I.Introduction, VI.2.d, p.53). Cependant les connaissances actuelles concernant l'implication fonctionnelle de la morphine endogène dans ces pathologies sont limitées et on ne peut dire si cette élévation des taux de morphine endogène est la cause ou la conséquence de la pathologie. De plus, l'augmentation des taux de morphine endogène pourrait avoir deux effets :

- ▶ Un effet bénéfique, p. ex., dans le cas de pathologies inflammatoires, la morphine *via* son rôle immunosuppresseur pourrait diminuer les mécanismes inflammatoires.
- ▶ Un effet aggravant, p.ex., dans le cas de la schizophrénie cette élévation pourrait être responsable de l'insensibilité à la douleur observée chez certains patients. Elle pourrait aussi, dans le cas de la prise de substance addictive, renforcer l'effet addictif de la drogue.

Dans le cas des pathologies « hypermorphinergiques », un tel peptide pourra être utilisé pour lier et inhiber la morphine endogène présente. Cependant, on ne sait pas à l'heure

actuelle quel sera l'effet de la liaison du peptide à la morphine. Ce peptide pourrait inhiber l'activité de la morphine endogène en l'empêchant de se lier aux MORs (dans le cas d'un effet aggravant de la morphine endogène) ou à l'inverse, la liaison de la morphine endogène au peptide pourrait accroître son effet (dans le cas d'un effet bénéfique de la morphine endogène). Ainsi, il serait envisageable d'utiliser ce peptide comme « médicament » afin de traiter ces pathologies « hypermorphinergiques », mais également de prévenir ces pathologies dans le cas où la morphine en serait la cause.

III.2. Augmentation de l'efficacité de la morphine

III.2.a. *Co-injection peptide de liaison-morphine*

Le développement d'un peptide de liaison de haute affinité à la morphine ouvre également la voie à des applications thérapeutiques applicables à la morphine exogène. En effet, en considérant que la liaison peptide-morphine ne bloque pas l'action de la morphine, différentes hypothèses sur l'intérêt d'une co-injection de peptide et de la morphine peuvent être postulées :

- ▶ Si la liaison peptide-morphine stimule l'activité de la morphine, une même dose de morphine aura un effet plus important si elle est injectée avec le peptide. Ainsi les doses de morphine injectées pourraient être réduites.
- ▶ La liaison peptide-morphine pourrait également augmenter la demi-vie plasmatique de la morphine en diminuant la clairance rénale et en empêchant sa dégradation par les glucuronidases. Ainsi, l'effet de la morphine serait plus long et la durée entre deux injections pourrait ainsi être allongée.

Cependant, si la liaison peptide-morphine inhibe totalement l'activité de la morphine, alors une co-injection n'aurait pas d'intérêt thérapeutique.

III.2.b. *3.2.b. Co-injection Lithium-morphine*

L'utilisation du lithium comme agent dissociant les complexes protéines-morphine pourrait également être utilisé en co-injection avec de la morphine. Il est démontré que plus de 50% de la morphine est « chélatée » par des protéines sériques (cf. : I.Introduction, I.6, p.22) et j'ai décrit que la présence de lithium ou de lithium héparine dissocie la plupart de ces complexes (cf. : III.Résultats, publications 4 & 5). La co-injection de lithium et de morphine permettrait de diminuer la liaison de la morphine aux protéines de manière à augmenter sa biodisponibilité

et donc son efficacité. Les doses de morphine administrées pourraient ainsi être diminuées. Il serait donc envisageable de créer une composition pharmaceutique comprenant à la fois le lithium et la morphine. Ce point est d'autant plus intéressant que le lithium est déjà utilisé pour le traitement de certaines maladies et que sa toxicité et sa pharmacodynamique sont bien caractérisées.

III.3. Utilisation du lithium pour la dissociation de complexes protéines-alcaloïdes endogènes à des fins thérapeutiques

Le lithium est utilisé pour le traitement de certaines pathologies, mais son mode d'action n'est pas bien défini. La corrélation entre les maladies traitées au lithium et les maladies « hypermorphinergique » suggère que les effets du lithium pourraient passer par la dissociation de complexes alcaloïdes endogènes-protéines (cf. : IV. Discussion, III.4, p.207).

La description de l'existence endogène de complexes entre la CK (B ou M) et la morphine endogène ou ses dérivés, ainsi que de la dissociation de ces complexes par le lithium (cf. : III.Résultats, publication 4), permet de postuler de nouvelles hypothèses quant à l'utilisation du lithium lors du traitement de certaines maladies. Le lithium pourrait ainsi être utilisé pour augmenter les taux de morphine endogène au niveau sanguin ou cérébral et notamment dans des pathologies dans lesquelles les niveaux de CK-B ou CK-M sanguins sont importants. Or, des lésions tissulaires cérébrales ou musculaires (p. ex., accident vasculaire cérébral, infarctus du myocarde, rhabdomyolyse) sont décrites pour augmenter les taux de CK-BB, CK-MB et CK-MM sanguins (Cervellin et al., 2010; Navin and Hager, 1979). Dans ces pathologies, le lithium pourrait permettre la dissociation des complexes CK-morphine sanguins et induire l'augmentation des taux de morphine endogène. Celle-ci aurait alors différents effets bénéfiques sur les effets post-lésionnels. Ainsi, La morphine pourrait avoir un rôle, **(i)** immunosuppresseur (cf. : I.Introduction, VI.1.b, p.50) sur l'inflammation, **(ii)** analgésique (cf. : I.Introduction, VI.2.b, p.52) sur les douleurs, et **(iii)** protecteur, voire régénératif, sur le tissu lésé (Zeng et al., 2007).

Dans le cadre du traitement des pathologies douloureuses ou inflammatoires, les analgésiques ou anti-inflammatoires opioïdes sont actuellement massivement utilisés. Le lithium pourrait permettre, dans ce type de pathologies, de dissocier les complexes CK-morphine endogène (et protéines-morphine endogène sériques non caractérisés), d'augmenter la biodisponibilité de la morphine endogène dans l'organisme et ainsi permettre une action analgésique et immunosuppressive sans avoir recours à des opioïdes exogènes.



LISTES

LISTE DES ABRÉVIATIONS

O

4-HPAA : 4-hydroxyphénylacétaldéhyde

A

AADC : Aromatic-L-Amino-Acid Dopa
Decarboxylase

AC : Adénylate Cyclase

ACTH : Adrenocorticotropic Hormone

ADP : Adénosine Di-Phosphate

AMP : Adénosine Mono-Phosphate

AMP_c : Adénosine Mono-Phosphate Cyclique

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

ATV : Aire Tegmentale Ventrale

B

BC : Basket Cells

BHE : Barrière Hémato Encéphalique

C

CAS : Chemical Abstracts Service

CB1 : Cannabinoid receptor type 1

CCK : Cholécystokinine

Cf. : Confer (se reporter à)

CK-B : Créatine Kinase Cérébrale

CK-M : Créatine Kinase Musculaire

CLIP : Corticotropin-Like Intermediate Peptide

COMT : Catéchol-O-Méthyltransférase

CREB: CRE-Binding Protein

CTZ : Chemoreceptor Trigger Zone

CYP : Cytochrome P450

D

DAT : Dopamine Transporter

DBH : Dopamine-β-Hydroxylase

DOPAL: 3,4-Dihydroxyphénylacétaldéhyde

DOR : Delta Opioid Receptor

Dyn : Dynorphine

E

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EMT : Extraneuronal Monoamine Transporter

Enk : Enképhaline

G

GABA : Gamma-AminoButyric Acid

GAD : Glutamic Acid Decarboxylase

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

GIRK: G Protein Activated Inwardly Rectifying K⁺
Conductance

H

HIOMT : HydroxyIndole-O-Méthyltransférase

HPLC : High Performance Liquid

Chromatography

I

ICV : intracerebroventriculaire

IgLON-CAM : ImmunoGlobulin Cell Adhesion
Molecules

INCB : International Narcotic Control Board

IP3 : Inositol Trisphosphate

K

K.O. : Knock-Out

KOR : Kappa Opioid Receptor

L

LCR : Liquide Céphalo Rachidien

L-DOPA : L-3,4-Dihydroxyphénylalanine

LH : Héparinate de Lithium

LPS : Lipopolysaccharide

M

M3G : Morphine-3-Glucuronide

M6G : Morphine-6-Glucuronide

MAO : Monoamine Oxydase

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MDP : Muramyl Dipeptide

MFB : Middle Forebrain Bundle

MLC: Morphine-Like Compounds

MN : Mononuclear cells

MOR : Mu Opioid Receptor

MRP : Multidrug Resistance Protein

MSH : Melanocyte-Stimulating Hormones

MSNs : Medium Spiny Neurons

MT : Méthyltransférase

N

N/OAQ : Nociceptine/ Orphanine FQ

NCS : Norcoclaurine Synthase

NET : Norepinephrine Transporter

NF-κB: Nuclear Factor-Kappa B

NK1 : Neurokinin 1

NMDA : N- Méthyl D Aspartate

NMT : N-MéthylTransférase

NO : Monoxyde d'Azote

NPFF : Neuropeptide FF

O

OATP : Organic Anion-Transporting Polypeptide

OBCAM : Opioid-Binding Cell Adhesion

Molecule

OCT3 : Organic Cation Transporter 3

OH : Octopamine Hydroxylase

OIH : Opioid-Induced Hyperalgesia

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPRM1 : Opioid Receptor Mu 1

ORL1 : Opioid Receptor-Like 1

P

P.ex., : Par Exemple

P450 : Cytochrome P450

PAG : Substance Grise Périaqueducule

PEA : Proenkephaline A

PEBP: Phosphatidyléthanolamine

PEBP : Phosphatidyléthanolamine-Binding Protein

PgP : P-Glycoprotéine

PKC : Protéine Kinase C

PLC : Phospholipase C

PMAT : Plasmamembrane Monoamine transporter

PMN : Polymorphonuclear Cells

PNMT : Phényléthanolamine

N-Méthyltransférase

PNOC : Prépronocéptine

POMC : Pro-opiomélanocortine

PPO : Polyphénol Oxydase

PST : Phenolsulphotransférases

PVDF : Polyvinylidifluorène

R

RIA : Radioimmunoassay

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RVM : Rostroventral Medulla

S

sCK-MI : Créatine Kinase Mitochondriale Sarcomérique

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate

Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SNC : Système Nerveux Central

STOP : Stable Tubule Only Peptide

T

TH : Tyrosine Hydroxylase

THP: Tétrahydropapavéroline

TLR : Toll-Like Receptors

TYDC: Tyrosine Décarboxylase

U

uCK-MI : Créatine Kinase Mitochondriale Ubiquitaire

UGT : UDP- Glucuronosyl Transférase

V

VIP : Vaso-Intestinal Peptide

VMAT : Vesicular monoamine transporter

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Photos de plants de pavot (<i>Papaver somniferum</i>). | 6 |
| Figure 2 : Découvertes archéologiques relatant de l'utilisation de l'opium. | 6 |
| Figure 3 : Structure de la molécule de morphine. | 8 |
| Figure 4 : Seringue hypodermique (1870). | 8 |
| Figure 5 : Opioides et quelques chiffres. | 10 |
| Figure 6 : Transmission de l'information nociceptive. | 12 |
| Figure 7 : Le contrôle de l'information nociceptive. | 14 |
| Figure 8 : Le catabolisme de la morphine chez l'homme. | 18 |
| Figure 9 : Les autres catabolites de la morphine. | 20 |
| Figure 10 : Représentations des différents variants d'épissage des MOR-1 chez la souris et chez l'homme. | 24 |
| Figure 11 : Voies de signalisation intracellulaires des récepteurs MORs | 28 |
| Figure 12 : Représentation schématique des principaux produits de la maturation des précurseurs opioïdes | 34 |
| Figure 13 : La voie de synthèse de la morphine, une analogie entre les mammifères et les plantes, partie 1 : L-tyrosine → (R)-réticuline. | 42 |
| Figure 14 : La voie de synthèse de la morphine, une analogie entre les mammifères et les plantes, partie 2 : (R)-réticuline → morphine. | 44 |
| Figure 15 : Quantités de morphine endogène détectées dans le SNC de souris sauvages ou de souris STOP | 166 |
| Figure 16 : Déplétion de la morphine endogène et de la dopamine intracellulaire dans les SH-SY5Y par un traitement à la résérpine. | 166 |
| Figure 17 : Recapture de précurseurs et synthèse de morphine au sein des astrocytes et de neurones non dopaminergiques. | 170 |
| Figure 18 : Augmentation des niveaux de morphine endogène dans les souris déplétées à la dopamine. | 172 |
| Figure 19 : Formation sélective des énantiomères de la THP. | 174 |

| | |
|--|-----|
| Figure 20 : De nouveaux intermédiaires pour la voie de synthèse de la morphine endogène. | 176 |
| Figure 21 : Formation hypothétique de conjugués phosphatés de la morphine par la créatine kinase. | 178 |
| Figure 22 : Sites identifiés de libérations dendritiques de neurotransmetteurs | 182 |
| Figure 23 : Cinétique de capture de ³ H-morphine par les astrocytes. | 184 |
| Figure 24 : Hypothèse de la capture, de la dégradation et du stockage de la morphine par les astrocytes. | 186 |
| Figure 25 : Comparaison de la localisation cérébrale de la CK-B et de la morphine endogène et de ses dérivés. | 188 |
| Figure 26 : Liaison simultanée de la PE et de la M6G par la PEBP. | 192 |
| Figure 27 : Neurogenèse chez les mammifères. | 194 |
| Figure 28 : Co-marquages de la morphine endogène et de ses dérivés avec la GFAP, la nestine et Tuj-1 dans le ZSG du gyrus denté de souris adulte. | 196 |
| Figure 29 : Hypothèse de la mise en place de la tolérance impliquant le catabolisme de la morphine par les astrocytes. | 198 |
| Figure 30 : Hyperalgésie induite par les analgésiques opioïdes, hypothèse de l'implication de la morphine endogène et de son système de catabolisme. | 200 |
| Figure 31 : Effet du lithium sur la sensibilité mécanique de la patte ipsilatérale à la pose d'un cuff d'un modèle de souris neuropathique. | 206 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Séquence des différents peptides opioïdes endogènes. | 32 |
| Tableau 2 : Affinité des ligands opioïdes et opiacés endogènes vis-à-vis des différents types de récepteurs opioïdes. | 36 |
| Tableau 3 : Quantités décrites de morphine et de codéine endogènes dans le système nerveux central de mammifères. | 46 |

LISTE DES PUBLICATIONS

PUBLICATIONS

- ▶ **1.** Muller A., Glattard E., Taleb O., Kemmel V., **Laux A.**, Miehe M., Delalande F., Roussel G., Van Dorsselaer A., Metz-Boutigue M.H., Aunis D. & Goumon Y. Endogenous Morphine in SH-SY5Y Cells and the Mouse Cerebellum. *PLoS ONE*. 2008 Feb; Epub www.plosone.org/doi/pone.0001641.
- ▶ **2.** Atmanene C., **Laux A.**, Glattard E., Muller A., Schoentgen F., Metz-Boutigue MH., Aunis D., Van Dorsselaer A., Stefano GB., Sanglier-Cianféran S., Goumon Y. Characterization of human and bovine phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP) interactions with morphine and morphine-glucuronides determined by noncovalent mass spectrometry. *Med Sci Monit*. 2009 Jul;15(7):BR178-87.
- ▶ **3.** Goumon Y., **Laux A.**, Muller A. & Aunis, D. Central and Peripheral Endogenous Morphine. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 2009 - 75, 389-418.
- ▶ **4.** Goumon Y., **Laux A.** & Muller AH. Physiological implications of endogenous morphine. 2009, *Douleur et Analgésie*; 22(4):210-5.
- ▶ **5.** Glattard E., Welters I.D., Lavaux T., Muller A.H., **Laux A.**, Zhang D., R.Schmidt A., Delalande F., Laventie B.J., Dirrig-Grosch S., A.Colin D., Van Dorsselaer A., Aunis D., Metz-Boutigue M.H., Schneider F. & Goumon Y. Endogenous Morphine Levels Are Increased in Sepsis: A Partial Implication of Neutrophils. *PLoS ONE*. 2010 5(1): e8791. doi:10.1371/journal.pone.0008791
- ▶ **6.** Charlet A., Muller A.H., **Laux A.**, Kemmel V., Schweitzer A., Deloulme J.C., Stuber D., Delalande F., Bianchi E., Van Dorsselaer A., Aunis D., Andrieux A., Poisbeau P. & Goumon Y. Abnormal nociception and opiate sensitivity of STOP null mice exhibiting elevated levels of the endogenous alkaloid morphine. *Mol Pain*. 2010 Dec 20;6:96.
- ▶ **7.** **Laux A.**, Muller A.H., Miehe M., Dirrig-Grosch S., Deloulme J.C., Delalande F., Stuber D., Sage D., Van Dorsselaer A., Poisbeau P., Aunis D. & Goumon Y. Mapping of endogenous morphine-like compounds in the adult mouse brain: Evidence of their localization in astrocytes and GABAergic cells. *J Comp Neurol*. 2011. Aug. 15; 519;12, 390-416. 10.1002/cne.22633
- ▶ **8.** Charron G., Doudnikoff E., **Laux A.**, Berthet A., Porras G., Canron M.H., Li Q., Chuan Q., Nosten M., Giros B., Delalande F., Van Dorsselaer A., Bloch B., Vital A., Goumon Y. & Bezaud E. Endogenous morphine-like compound immunoreactivity increases in parkinsonism. *Brain* 2011, doi: 10.1093/brain/awr166.
- ▶ **9.** **Laux A.**, Delalande F., Mouheiche J., Stuber D., Van Dorsselaer A., Bianchi E., Poisbeau P., Goumon Y. Localization of endogenous morphine-like compounds in the mouse spinal cord. *J Comp Neurol*. In press. DOI: 10.1002/cne.22811
- ▶ **10.** **Laux-Biehlmann A.**, Gräfe N., Mouheiche J., Stuber D., Welters I.D., Poisbeau P., Schneider F. & Goumon Y. Comparative Use of Serum and Lithium-Heparinate Plasma for the Effective Measurements of Endogenous and Exogenous Morphine Levels. *British Journal of Clinical Pharmacology*. In press

BREVETS

- ▶ **1.** Goumon Y., **Laux-Biehlmann A.**, Stuber D. – Brevet N°, BIP209236FR01 : « Utilisation de la créatine kinase pour la prévention ou le traitement d'une addiction ».
- ▶ **2.** Goumon Y., **Laux-Biehlmann A.**, Stuber D., Gräfe N. – Brevet N°, BIP209949FR00 : « Utilisation du lithium pour la dissociation et/ou la prévention de la formation d'un complexe protéine-alcaloïdes »
- ▶ **3.** Goumon Y., **Laux-Biehlmann A.**, Stuber D., Schneider F., Welter I.D., Gräfe N. – Brevet N°, BIP210330FR00 : « Utilisation du lithium et de ses dérivés pour le dosage des alcaloïdes »

LISTE DES COMMUNICATIONS

POSTERS

- ▶ **1.** Muller A., Glattard E., Roussel G., Delalande F., Taleb O., Kemmel V., **Laux A.**, Aunis D. & Goumon Y. Endogenous morphine as a new neuromediator ? - 2008, FENS, Geneve, Suisse
- ▶ **2.** Glattard E., Welters I., Lavaux T., Muller A., Zhang D., Kemmel V., **Laux A.**, Aunis D., Metz-Boutigue MH., Schneider F. & Goumon Y Study of the variation of morphine levels during human sepsis: a possible role of endogenous morphine secretion by neutrophils. – 2008, Société de neuroendocrinologie, Strasbourg, France
- ▶ **3.** Glattard E., Welters I., Lavaux T., Muller A., Zhang D., Kemmel V., **Laux A.**, Aunis D., Metz-Boutigue MH., Schneider F. & Goumon Y Study of the variation of morphine levels during human sepsis : a possible role of endogenous morphine secretion by neutrophils. – 2008, Society of NeuroImmune Pharmacology (SNIP), Charleston, SC, U.S.A.
- ▶ **4.** Goumon Y., Welters I.D., **Laux A.**, Muller H., Glattard E., Metz-Boutigue MH., Poisbeau P., Schneider F., Aunis D. - Endogenous morphine and stress – 2010, FENS, Amsterdam, Holland
- ▶ **5.** **Laux A.**, Arnaud M., Glattard E., Aunis D., Poisbeau P. & Goumon Y. - Localization of endogenous morphine in brain cells. – 2010, FENS, Amsterdam, Holland
- ▶ **6.** **Laux A.**, Arnaud M., Glattard E., Aunis D., Poisbeau P. & Goumon Y. - Localization of endogenous morphine in brain cells. – 2011, SSN annual meeting, Bale, Suisse
- ▶ **7.** Goumon Y., Doudnikoff E., **Laux A.**, Berthet A., Porras G., Canron M.H., Li Q., Chuan Q., Nostan-Bertrand M., Giros B., Delalande F., Van dorsselaer A., Vital A., Fernagut P.O., Bezar E. & Charron G. - Dramatic rise in endogenous morphine-like compounds in parkinsonism. - 2011, Soc. Neurosciences, Marseille, France



BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott NJ, Romero IA. 1996. Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Mol Med Today* 2(3):106-113.
- Aceto MD, Harris LS, Abood ME, Rice KC. 1999. Stereoselective mu- and delta-opioid receptor-related antinociception and binding with (+)-thebaine. *Eur J Pharmacol* 365(2-3):143-147.
- Aghajanian GK, Wang YY. 1986. Pertussis toxin blocks the outward currents evoked by opiate and alpha 2-agonists in locus coeruleus neurons. *Brain Res* 371(2):390-394.
- Akil H, Mayer DJ, Liebeskind JC. 1972. [Comparison in the rat between analgesia induced by stimulation of periaqueductal gray matter and morphine analgesia]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 274(26):3603-3605.
- Akin F, Yaylali GF, Bastemir M. 2008. The use of lithium carbonate in the preparation for definitive therapy in hyperthyroid patients. *Med Princ Pract* 17(2):167-170.
- Andrieux A, Salin PA, Vernet M, Kujala P, Baratier J, Gory-Faure S, Bosc C, Pointu H, Proietto D, Schweitzer A, Denarier E, Klumperman J, Job D. 2002. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev* 16(18):2350-2364.
- Arguello AA, Harburg GC, Schonborn JR, Mandyam CD, Yamaguchi M, Eisch AJ. 2008. Time course of morphine's effects on adult hippocampal subgranular zone reveals preferential inhibition of cells in S phase of the cell cycle and a subpopulation of immature neurons. *Neuroscience* 157(1):70-79.
- Armstrong SC, Cozza KL. 2003. Pharmacokinetic drug interactions of morphine, codeine, and their derivatives: theory and clinical reality, part I. *Psychosomatics* 44(2):167-171.
- Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S, Lee JH, Nakano AH, Dado RJ, Loh HH, Law PY, Wessendorf MW, Elde R. 1995. Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J Neurosci* 15(5 Pt 1):3328-3341.
- Atmanene C, Laux A, Glattard E, Muller A, Schoentgen F, Metz-Boutigue MH, Aunis D, Van Dorsselaer A, Stefano GB, Sanglier-Cianferani S, Goumon Y. 2009. Characterization of human and bovine phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP) interactions with morphine and morphine-glucuronides determined by noncovalent mass spectrometry. *Med Sci Monit* 15(7):BR178-187.
- Autie A, Montreuil M, Moulrier V, Braha S, Wojakiewicz A, Januel D. 2009. [Pain and schizophrenia: myth and reality]. *Encephale* 35(4):297-303.
- Badiani A, Robinson TE. 2004. Drug-induced neurobehavioral plasticity: the role of environmental context. *Behav Pharmacol* 15(5-6):327-339.
- Bare LA, Mansson E, Yang D. 1994. Expression of two variants of the human mu opioid receptor mRNA in SK-N-SH cells and human brain. *FEBS Lett* 354(2):213-216.
- Beard E, Braissant O. 2010. Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. *J Neurochem* 115(2):297-313.
- Beckett AH. 1956. Analgesics and their antagonists: some steric and chemical considerations. I. The dissociation constants of some tertiary amines and synthetic analgesics, the conformations of methadone-type compounds. *J Pharm Pharmacol* 8(11):848-859.
- Beckett AH, Casy AF. 1954. Synthetic analgesics: stereochemical considerations. *J Pharm Pharmacol* 6(12):986-1001.
- Benbouzid M, Pallage V, Rajalu M, Waltisperger E, Doridot S, Poisbeau P, Freund-Mercier MJ, Barrot M. 2008. Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *Eur J Pain* 12(5):591-599.
- Bergen HT, Pentecost BT, Dickerman HW, Pfaff DW. 1993. In situ hybridization for creatine kinase-B messenger RNA in rat uterus and brain. *Mol Cell Endocrinol* 92(1):111-119.
- Bernier I, Tresca JP, Jolles P. 1986. Ligand-binding studies with a 23 kDa protein purified from bovine brain cytosol. *Biochim Biophys Acta* 871(1):19-23.

- Berque-Bestel I, Lezoualc'h F, Jockers R. 2008. Bivalent ligands as specific pharmacological tools for G protein-coupled receptor dimers. *Curr Drug Discov Technol* 5(4):312-318.
- Berry MD. 2007. The potential of trace amines and their receptors for treating neurological and psychiatric diseases. *Rev Recent Clin Trials* 2(1):3-19.
- Bezard E, Gross CE. 1998. Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach. *Prog Neurobiol* 55(2):93-116.
- Bezard E, Gross CE, Brotchie JM. 2003. Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. *Trends Neurosci* 26(4):215-221.
- Bhargava KP, Dixit KS, Gupta YK. 1981. Enkephalin receptors in the emetic chemoreceptor trigger zone of the dog. *Br J Pharmacol* 72(3):471-475.
- Bianchi E, Alessandrini C, Guarna M, Tagliamonte A. 1993. Endogenous codeine and morphine are stored in specific brain neurons. *Brain Res* 627(2):210-215.
- Bianchi E, Guarna M, Tagliamonte A. 1994. Immunocytochemical localization of endogenous codeine and morphine. *Adv Neuroimmunol* 4(2):83-92.
- Bilka F, Balazova A, Bilkova A, Psenak M. 2000. Purification of polyphenol oxidase from opium poppy latex. *Pharmazie* 55(2):155-156.
- Bilkova A, Bezakova L, Bilka F, Psenak M. 2005. An amine oxidase in seedlings of *Papaver somniferum* L. *Biologia plantarum* 49(3):389-394.
- Blume AJ, Shorr J, Finberg JP, Spector S. 1977. Binding of the endogenous nonpeptide morphine-like compound to opiate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(11):4927-4931.
- Blumensohn R, Ringler D, Eli I. 2002. Pain perception in patients with schizophrenia. *J Nerv Ment Dis* 190(7):481-483.
- Boarder MR, Rodnight R. 1976. Tryptamine-N-methyltransferase activity in brain tissue: a re-examination. *Brain Res* 114(2):359-364.
- Boettcher C, Fellermeier M, Drager B, Zenk MH. 2005. How human neuroblastoma cells make morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(24):8495-8500.
- Boettcher C, Fischer W, Zenk MH. 2006. Comment on «Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation». *J Immunol* 176(10):5703-5704; author reply 5704.
- Bonini JA, Jones KA, Adham N, Forray C, Artymyshyn R, Durkin MM, Smith KE, Tamm JA, Boteju LW, Lakhiani PP, Raddatz R, Yao WJ, Ogozalek KL, Boyle N, Kouranova EV, Quan Y, Vaysse PJ, Wetzel JM, Branchek TA, Gerald C, Borowsky B. 2000. Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF. *J Biol Chem* 275(50):39324-39331.
- Bonnot O, Anderson GM, Cohen D, Willer JC, Tordjman S. 2009. Are patients with schizophrenia insensitive to pain? A reconsideration of the question. *Clin J Pain* 25(3):244-252.
- Borner U, Abbott S. 1973. New observations in the metabolism of morphine. The formation of codeine from morphine in man. *Experientia* 29(2):180-181.
- Bourguignon JJ, Simonnet G, Simonin F. 2006. [RF9, a powerful and selective antagonist of the neuropeptide FF receptors, prevents the development of the tolerance to opioids]. *Med Sci (Paris)* 22(6-7):579-580.
- Bradbury AF, Smyth DG, Snell CR. 1976. Biosynthetic origin and receptor conformation of methionine enkephalin. *Nature* 260(5547):165-166.
- Braenden OJ, Eddy NB, Halbach H. 1955. Synthetic substances with morphine-like effect; relationship between chemical structure and analgesic action. *Bull World Health Organ* 13(6):937-998.
- Brailoiu E, Hoard J, Brailoiu GC, Chi M, Godbolde R, Dun NJ. 2004. Ultra low concentrations of morphine increase neurite outgrowth in cultured rat spinal cord and cerebral cortical neurons. *Neurosci Lett* 365(1):10-13.
- Brefel-Courbon C, Payoux P, Thalamas C, Ory F, Quelven I, Chollet F, Montastruc JL, Rascol O. 2005. Effect of levodopa on pain threshold in Parkinson's disease: a clinical and positron emission tomography study. *Mov Disord* 20(12):1557-1563.
- Brix-Christensen V, Goumon Y, Tonnesen E, Chew M, Bilfinger T, Stefano GB. 2000. Endogenous morphine is produced in response to cardiopulmonary bypass in neonatal pigs. *Acta Anaesthesiol Scand* 44(10):1204-1208.
- Brix-Christensen V, Tonnesen E, Sanchez RG, Bilfinger TV, Stefano GB. 1997. Endogenous morphine levels increase following cardiac surgery as part of the antiinflammatory response? *Int J Cardiol* 62(3):191-197.
- Brown GP, Yang K, Ouerfelli O, Standifer KM, Byrd D, Pasternak GW. 1997. 3H-morphine-6beta-glucuronide binding in brain membranes and an MOR-1-transfected cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 282(3):1291-1297.

- Brun P, Begou M, Andrieux A, Mouly-Badina L, Clerget M, Schweitzer A, Scarna H, Renaud B, Job D, Suaud-Chagny MF. 2005. Dopaminergic transmission in STOP null mice. *J Neurochem* 94(1):63-73.
- Buckley DB, Klaassen CD. 2007. Tissue- and gender-specific mRNA expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in mice. *Drug Metab Dispos* 35(1):121-127.
- Buckley PF. 2008. Update on the treatment and management of schizophrenia and bipolar disorder. *CNS Spectr* 13(2 Suppl 1):1-10; quiz 11-12.
- Bunzow JR, Saez C, Mortrud M, Bouvier C, Williams JT, Low M, Grandy DK. 1994. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett* 347(2-3):284-288.
- Burbaeva G, Savushkina OK, Boksha IS. 2003. Creatine kinase BB in brain in schizophrenia. *World J Biol Psychiatry* 4(4):177-183.
- Burnstock G. 2008. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7(7):575-590.
- Cadet P. 2004. Mu opiate receptor subtypes. *Med Sci Monit* 10(6):MS28-32.
- Calatozzolo C, Gelati M, Ciusani E, Sciacca FL, Pollo B, Cajola L, Marras C, Silvani A, Vitellaro-Zuccarello L, Croci D, Boiardi A, Salmaggi A. 2005. Expression of drug resistance proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 and GST-pi in human glioma. *J Neurooncol* 74(2):113-121.
- Cardinale GJ, Donnerer J, Finck AD, Kantrowitz JD, Oka K, Spector S. 1987. Morphine and codeine are endogenous components of human cerebrospinal fluid. *Life Sci* 40(3):301-306.
- Casares FM, McElroy A, Mantione K, Baggermann G, Zhu W, Stefano GB. 2005. The American lobster, *Homarus americanus*, contains morphine that is coupled to nitric oxide release in its nervous and immune tissues: Evidence for neurotransmitter and hormonal signaling. *Neuro Endocrinol Lett* 26(2):89-97.
- Cashaw JL. 1993. Determination of tetrahydropapaveroline in the urine of parkinsonian patients receiving L-dopa-carbidopa (Sinemet) therapy by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 613(2):267-273.
- Cashaw JL, Geraghty CA, McLaughlin BR, Davis VE. 1987. A method for determination of subpicomole concentrations of tetrahydropapaveroline in rat brain by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Biochem* 162(1):274-282.
- Cervellin G, Comelli I, Lippi G. 2010. Rhabdomyolysis: historical background, clinical, diagnostic and therapeutic features. *Clin Chem Lab Med* 48(6):749-756.
- Chakrabarti S, Chang A, Gintzler AR. 2010. Subcellular localization of mu-opioid receptor G(s) signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 333(1):193-200.
- Charlet A, Muller AH, Laux A, Kemmel V, Schweitzer A, Deloulme JC, Stuber D, Delalande F, Bianchi E, Van Dorsselaer A, Aunis D, Andrieux A, Poisbeau P, Goumon Y. 2010. Abnormal nociception and opiate sensitivity of STOP null mice exhibiting elevated levels of the endogenous alkaloid morphine. *Mol Pain* 6:96.
- Charron G, Doudnikoff E, Laux A, Berthet A, Porras G, Canron M-Hln, Barroso-Chinea P, Li Q, Qin C, Nosten-Bertrand M, Giros B, Delalande Fo, Van Dorsselaer A, Vital A, Goumon Y, Bezard E. 2011. Endogenous morphine-like compound immunoreactivity increases in parkinsonism. *Brain*.
- Chaudhuri KR, Odin P. 2010. The challenge of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 184:325-341.
- Chemuturi NV, Donovan MD. 2007. Role of organic cation transporters in dopamine uptake across olfactory and nasal respiratory tissues. *Mol Pharm* 4(6):936-942.
- Chen L, Cheng X, Tian L, Yang T, Hermann S, Zhou D. 2009. Inhibition of P-glycoprotein over-expression by shRNA-mdr1b in rat astrocytes. *Neurochem Res* 34(3):411-417.
- Chen XY, Zhao LM, Zhong DF. 2003. A novel metabolic pathway of morphine: formation of morphine glucosides in cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 55(6):570-578.
- Chen Y, Fan Y, Liu J, Mestek A, Tian M, Kozak CA, Yu L. 1994. Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FEBS Lett* 347(2-3):279-283.
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L. 1993. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 44(1):8-12.
- Chen Y, Sommer C. 2009. The role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in morphine tolerance and dependence. *Mol Neurobiol* 40(2):101-107.

- Cho TM, Ge BL, Yamato C, Smith AP, Loh HH. 1983. Isolation of opiate binding components by affinity chromatography and reconstitution of binding activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(17):5176-5180.
- Christie MJ. 2006. Opioid and cannabinoid receptors: friends with benefits or just close friends? *Br J Pharmacol* 148(4):385-386.
- Chu LF, Angst MS, Clark D. 2008. Opioid-induced hyperalgesia in humans: molecular mechanisms and clinical considerations. *Clin J Pain* 24(6):479-496.
- Chuang LF, Killam KF, Jr., Chuang RY. 1997. Induction and activation of mitogen-activated protein kinases of human lymphocytes as one of the signaling pathways of the immunomodulatory effects of morphine sulfate. *J Biol Chem* 272(43):26815-26817.
- Ciliax BJ, Heilman C, Demchyshyn LL, Pristupa ZB, Ince E, Hersch SM, Niznik HB, Levey AI. 1995. The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. *J Neurosci* 15(3 Pt 1):1714-1723.
- Coller JK, Christrup LL, Somogyi AA. 2009. Role of active metabolites in the use of opioids. *Eur J Clin Pharmacol* 65(2):121-139.
- Cone EJ, Caplan YH, Moser F, Robert T, Black D. 2008. Evidence that morphine is metabolized to hydromorphone but not to oxycodone. *J Anal Toxicol* 32(4):319-323.
- Cone EJ, Heit HA, Caplan YH, Gourlay D. 2006. Evidence of morphine metabolism to hydromorphone in pain patients chronically treated with morphine. *J Anal Toxicol* 30(1):1-5.
- Connor M, Christie MD. 1999. Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26(7):493-499.
- Connor M, Henderson G. 1996. delta- and mu-opioid receptor mobilization of intracellular calcium in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol* 117(2):333-340.
- Coon MJ. 2005. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:1-25.
- Cope DW, Maccaferri G, Marton LF, Roberts JD, Cobden PM, Somogyi P. 2002. Cholecystokinin-immunopositive basket and Schaffer collateral-associated interneurons target different domains of pyramidal cells in the CA1 area of the rat hippocampus. *Neuroscience* 109(1):63-80.
- Corbett AD, Henderson G, McKnight AT, Paterson SJ. 2006. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S153-162.
- Cousins DA, Butts K, Young AH. 2009. The role of dopamine in bipolar disorder. *Bipolar Disord* 11(8):787-806.
- Cox BM, Opheim KE, Teschemacher H, Goldstein A. 1975. A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. 2. Purification and properties. *Life Sci* 16(12):1777-1782.
- Cuskey SM, Peccoraro V, Olsen RH. 1987. Initial catabolism of aromatic biogenic amines by *Pseudomonas aeruginosa* PAO: pathway description, mapping of mutations, and cloning of essential genes. *J Bacteriol* 169(6):2398-2404.
- D'Andrea G, Nordera G, Pizzolato G, Bolner A, Colavito D, Flaibani R, Leon A. 2010. Trace amine metabolism in Parkinson's disease: low circulating levels of octopamine in early disease stages. *Neurosci Lett* 469(3):348-351.
- D'Andrea G, Nordera GP, Perini F, Allais G, Granella F. 2007. Biochemistry of neuromodulation in primary headaches: focus on anomalies of tyrosine metabolism. *Neurol Sci* 28 Suppl 2:S94-96.
- Dagenais C, Zong J, Ducharme J, Pollack GM. 2001. Effect of *mdr1a* P-glycoprotein gene disruption, gender, and substrate concentration on brain uptake of selected compounds. *Pharm Res* 18(7):957-963.
- Dahlin A, Xia L, Kong W, Hevner R, Wang J. 2007. Expression and immunolocalization of the plasma membrane monoamine transporter in the brain. *Neuroscience* 146(3):1193-1211.
- Daly J, Inscoc JK, Axelrod J. 1965. The Formation of O-Methylated Catechols by Microsomal Hydroxylation of Phenols and Subsequent Enzymatic Catechol O-Methylation. Substrate Specificity. *J Med Chem* 8:153-157.
- David JC, Coulon JF, Lafon-Cazal M, Vinson D. 1981. Can L-dopa be a precursor of m-octopamine in the cephalic ganglions of the locust? *Locusta migratoria*; L? *Cellular and Molecular Life Sciences* 37(8):804-805.
- Davis VE, Walsh MJ. 1970. Alcohol, amines, and alkaloids: a possible biochemical basis for alcohol addiction. *Science* 167(920):1005-1007.

- Daye P, Desmeules J, Leemann T, Striberni R. 1988. Bioactivation of the narcotic drug codeine in human liver is mediated by the polymorphic monooxygenase catalyzing debrisoquine 4-hydroxylation (cytochrome P-450 db1/bufl). *Biochem Biophys Res Commun* 152(1):411-416.
- DeFelipe J. 1997. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* 14(1):1-19.
- Deitrich R, Erwin V. 1980. Biogenic amine-aldehyde condensation products: tetrahydroisoquinolines and tryptolines (beta-carbolines). *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20:55-80.
- Devillers JP, Boisserie F, Laulin JP, Larcher A, Simonnet G. 1995. Simultaneous activation of spinal antioioid system (neuropeptide FF) and pain facilitatory circuitry by stimulation of opioid receptors in rats. *Brain Res* 700(1-2):173-181.
- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG. 2003. Nongenomic glucocorticoid inhibition *via* endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* 23(12):4850-4857.
- Dinda A, Gitman M, Singhal PC. 2005. Immunomodulatory effect of morphine: therapeutic implications. *Expert Opin Drug Saf* 4(4):669-675.
- Ding YQ, Kaneko T, Nomura S, Mizuno N. 1996. Immunohistochemical localization of mu-opioid receptors in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 367(3):375-402.
- Donnerer J, Cardinale G, Coffey J, Lisek CA, Jardine I, Spector S. 1987. Chemical characterization and regulation of endogenous morphine and codeine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 242(2):583-587.
- Donnerer J, Oka K, Bossi A, Rice KC, Spector S. 1986. Presence and formation of codeine and morphine in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(12):4566-4567.
- Doyle GA, Rebecca Sheng X, Lin SS, Press DM, Grice DE, Buono RJ, Ferraro TN, Berrettini WH. 2007a. Identification of three mouse mu-opioid receptor (MOR) gene (*Oprm1*) splice variants containing a newly identified alternatively spliced exon. *Gene* 388(1-2):135-147.
- Doyle GA, Sheng XR, Lin SS, Press DM, Grice DE, Buono RJ, Ferraro TN, Berrettini WH. 2007b. Identification of five mouse mu-opioid receptor (MOR) gene (*Oprm1*) splice variants containing a newly identified alternatively spliced exon. *Gene* 395(1-2):98-107.
- Drake CT, Milner TA. 1999. Mu opioid receptors are in somatodendritic and axonal compartments of GABAergic neurons in rat hippocampal formation. *Brain Res* 849(1-2):203-215.
- Eisenhofer G, Tian H, Holmes C, Matsunaga J, Roffler-Tarlov S, Hearing VJ. 2003. Tyrosinase: a developmentally specific major determinant of peripheral dopamine. *FASEB J* 17(10):1248-1255.
- Eklblom J, Jossan SS, Bergstrom M, Orelund L, Walum E, Aquilonius SM. 1993. Monoamine oxidase-B in astrocytes. *Glia* 8(2):122-132.
- Epple A, Navarro I, Horak P, Spector S. 1993. Endogenous morphine and codeine: release by the chromaffin cells of the eel. *Life Sci* 52(16):PL117-121.
- Evans CJ, Keith DE, Jr., Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. 1992. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258(5090):1952-1955.
- Exner M, Alt E, Hermann M, Hofbauer R, Kapiotis S, Quehenberger P, Speiser W, Minar E, Gmeiner B. 2001. p-Hydroxyphenylacetaldehyde, the major product of tyrosine oxidation by the activated myeloperoxidase system can act as an antioxidant in LDL. *FEBS Lett* 490(1-2):28-31.
- Facchini PJ. 2001. ALKALOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:29-66.
- Facchini PJ, De Luca V. 1994. Differential and tissue-specific expression of a gene family for tyrosine/dopa decarboxylase in opium poppy. *J Biol Chem* 269(43):26684-26690.
- Facchini PJ, Park SU. 2003. Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry* 64(1):177-186.
- Fallon JH, Leslie FM. 1986. Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. *J Comp Neurol* 249(3):293-336.
- Faura CC, Collins SL, Moore RA, McQuay HJ. 1998. Systematic review of factors affecting the ratios of morphine and its major metabolites. *Pain* 74(1):43-53.
- Fichna J, Janecka A, Costentin J, Do Rego JC. 2007. The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol Rev* 59(1):88-123.
- Fields RD, Burnstock G. 2006. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7(6):423-436.

- Finley JC, Lindstrom P, Petrusz P. 1981a. Immunocytochemical localization of beta-endorphin-containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology* 33(1):28-42.
- Finley JC, Maderdrut JL, Petrusz P. 1981b. The immunocytochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 198(4):541-565.
- Fischer A, Udem BJ. 1999. Naloxone blocks endomorphin-1 but not endomorphin-2 induced inhibition of tachykinergic contractions of guinea-pig isolated bronchus. *Br J Pharmacol* 127(3):605-608.
- Fischer SJ, Arguello AA, Charlton JJ, Fuller DC, Zachariou V, Eisch AJ. 2008. Morphine blood levels, dependence, and regulation of hippocampal subgranular zone proliferation rely on administration paradigm. *Neuroscience* 151(4):1217-1224.
- Flames N, Marin O. 2005. Developmental mechanisms underlying the generation of cortical interneuron diversity. *Neuron* 46(3):377-381.
- Florang VR, Rees JN, Brogden NK, Anderson DG, Hurley TD, Doorn JA. 2007. Inhibition of the oxidative metabolism of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde, a reactive intermediate of dopamine metabolism, by 4-hydroxy-2-nonenal. *Neurotoxicology* 28(1):76-82.
- Focosi D, Azzara A, Kast RE, Carulli G, Petrini M. 2009. Lithium and hematology: established and proposed uses. *J Leukoc Biol* 85(1):20-28.
- Foldes A, Meek JL. 1973. Rat brain phenolsulfotransferase: partial purification and some properties. *Biochim Biophys Acta* 327(2):365-374.
- Fontrier T. 2004. Lithium for fibromyalgia. *Anesth Analg* 98(5):1505.
- Ford B. 2010. Pain in Parkinson's disease. *Mov Disord* 25 Suppl 1:S98-103.
- Frantzides CT, Cowles V, Salaymeh B, Tekin E, Condon RE. 1992. Morphine effects on human colonic myoelectric activity in the postoperative period. *Am J Surg* 163(1):144-148; discussion 148-149.
- Freed C, Revay R, Vaughan RA, Kriek E, Grant S, Uhl GR, Kuhar MJ. 1995. Dopamine transporter immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 359(2):340-349.
- Freund-Mercier MJ, Stoeckel ME, Klein MJ. 1994. Oxytocin receptors on oxytocin neurones: histoautoradiographic detection in the lactating rat. *J Physiol* 480 (Pt 1):155-161.
- Fricchione G, Zhu W, Cadet P, Mantione KJ, Bromfield E, Madsen J, DeGirolami U, Dworetzky B, Vaccaro B, Black P, Stefano GB. 2008. Identification of endogenous morphine and a mu3-like opiate alkaloid receptor in human brain tissue taken from a patient with intractable complex partial epilepsy. *Med Sci Monit* 14(6):CS45-49.
- Friedman DL, Roberts R. 1994. Compartmentation of brain-type creatine kinase and ubiquitous mitochondrial creatine kinase in neurons: evidence for a creatine phosphate energy shuttle in adult rat brain. *J Comp Neurol* 343(3):500-511.
- 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(10):1248-1254.
- Fromm MF, Eckhardt K, Li S, Schanzle G, Hofmann U, Mikus G, Eichelbaum M. 1997. Loss of analgesic effect of morphine due to coadministration of rifampin. *Pain* 72(1-2):261-267.
- Frye MA, Salloum IM. 2006. Bipolar disorder and comorbid alcoholism: prevalence rate and treatment considerations. *Bipolar Disord* 8(6):677-685.
- Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M, Takeshima H, Iwabe N, Miyata T, Houtani T, Sugimoto T. 1994. cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett* 343(1):42-46.
- Gaby AR. 2006. Natural remedies for Herpes simplex. *Altern Med Rev* 11(2):93-101.
- Gaillard PJ, van der Sandt IC, Voorwinden LH, Vu D, Nielsen JL, de Boer AG, Breimer DD. 2000. Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an *in vitro* model of the blood-brain barrier. *Pharm Res* 17(10):1198-1205.
- Galeotti N, Stefano GB, Guarna M, Bianchi E, Ghelardini C. 2006. Signaling pathway of morphine induced acute thermal hyperalgesia in mice. *Pain* 123(3):294-305.
- Galligan JJ, Burks TF. 1983. Centrally mediated inhibition of small intestinal transit and motility by morphine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 226(2):356-361.
- Gasser PJ, Orchinik M, Raju I, Lowry CA. 2009. Distribution of organic cation transporter 3, a corticosterone-sensitive monoamine transporter, in the rat brain. *J Comp Neurol* 512(4):529-555.
- Gaveriaux-Ruff C, Matthes HW, Peluso J, Kieffer BL. 1998. Abolition of morphine-immunosuppression in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11):6326-6330.

- Gerardy R, Zenk MH. 1993. Purification and characterization of salutaridine: NADPH 7-oxidoreductase from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 34(1):125-132.
- Gesell A, Rolf M, Ziegler J, Diaz Chavez ML, Huang FC, Kutchan TM. 2009. CYP719B1 is salutaridine synthase, the C-C phenol-coupling enzyme of morphine biosynthesis in opium poppy. *J Biol Chem* 284(36):24432-24442.
- Gianoulakis C. 2009. Endogenous opioids and addiction to alcohol and other drugs of abuse. *Curr Top Med Chem* 9(11):999-1015.
- Gilbert PE, Martin WR. 1976. The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent, morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 198(1):66-82.
- Gintzler AR, Levy A, Spector S. 1976. Antibodies as a means of isolating and characterizing biologically active substances: presence of a non-peptide, morphine-like compound in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(6):2132-2136.
- Gintzler AR, Pasternak GW. 1983. Multiple mu receptors: evidence for mu2 sites in the guinea pig ileum. *Neurosci Lett* 39(1):51-56.
- Glattard E, Muller A, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Stefano GB, Goumon Y. 2006. Rethinking the opiate system? Morphine and morphine-6-glucuronide as new endocrine and neuroendocrine mediators. *Med Sci Monit* 12(6):SR25-27.
- Glattard E, Welters ID, Lavaux T, Muller AH, Laux A, Zhang D, Schmidt AR, Delalande F, Laventie BJ, Dirrig-Grosch S, Colin DA, Van Dorsselaer A, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Schneider F, Goumon Y. 2010. Endogenous morphine levels are increased in sepsis: a partial implication of neutrophils. *PLoS One* 5(1):e8791.
- Goldstein A, Barrett RW, James IF, Lowney LI, Weitz CJ, Knipmeyer LL, Rapoport H. 1985. Morphine and other opiates from beef brain and adrenal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(15):5203-5207.
- Goldstein A, Ghazarossian VE. 1980. Immunoreactive dynorphin in pituitary and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(10):6207-6210.
- Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L. 1979. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(12):6666-6670.
- Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V, Devi LA. 2000. Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* 20(22):RC110.
- Gouarderes C, Quelven I, Mollereau C, Mazarguil H, Rice SQ, Zajac JM. 2002. Quantitative autoradiographic distribution of NPFF1 neuropeptide FF receptor in the rat brain and comparison with NPFF2 receptor by using [125I]YVP and [(125I)]EYF as selective radioligands. *Neuroscience* 115(2):349-361.
- Goumon Y, Angelone T, Schoentgen F, Chasserot-Golaz S, Almas B, Fukami MM, Langley K, Welters ID, Tota B, Aunis D, Metz-Boutigue MH. 2004. The hippocampal cholinergic neurostimulating peptide, the N-terminal fragment of the secreted phosphatidylethanolamine-binding protein, possesses a new biological activity on cardiac physiology. *J Biol Chem* 279(13):13054-13064.
- Goumon Y, Bouret S, Casares F, Zhu W, Beauvillain JC, Stefano GB. 2000a. Lipopolysaccharide increases endogenous morphine levels in rat brain. *Neurosci Lett* 293(2):135-138.
- Goumon Y, Casares F, Pryor S, Ferguson L, Brownawell B, Cadet P, Rialas CM, Welters ID, Sonetti D, Stefano GB. 2000b. *Ascaris suum*, an intestinal parasite, produces morphine. *J Immunol* 165(1):339-343.
- Goumon Y, Casares F, Zhu W, Stefano GB. 2001. The presence of morphine in ganglionic tissues of *Modiolus deminissus*: a highly sensitive method of quantitation for morphine and its derivatives. *Brain Res Mol Brain Res* 86(1-2):184-188.
- Goumon Y, Laux A, Muller A, Aunis D. 2009a. Central and peripheral endogenous morphine. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 75(3):389-418.
- Goumon Y, Laux A, Muller AH. 2009b. Physiological implications of endogenous morphine | [Implications physiologiques potentielles de la morphine endogène]. *Douleur et Analgesie* 22(4):210-215.
- Goumon Y, Muller A, Glattard E, Marban C, Gasnier C, Strub JM, Chasserot-Golaz S, Rohr O, Stefano GB, Welters ID, Van Dorsselaer A, Schoentgen F, Aunis D, Metz-Boutigue MH. 2006. Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules. *J Biol Chem* 281(12):8082-8089.
- Goumon Y, Stefano GB. 2000. Identification of morphine in the rat adrenal gland. *Brain Res Mol Brain Res* 77(2):267-269.
- Goumon Y, Strub JM, Stefano GB, Van Dorsselaer A, Aunis D, Metz-Boutigue MH. 2005. Characterization of a morphine-like molecule in secretory granules of chromaffin cells. *Med Sci Monit* 11(5):MS31-34.

- Goumon Y, Zhu W, Weeks BS, Casares F, Cadet P, Bougaeva M, Brownawell B, Stefano GB. 2000c. Identification of morphine in the adrenal medullary chromaffin PC-12 cell line. *Brain Res Mol Brain Res* 81(1-2):177-180.
- Graf L, Ronai A, Bajusz S, Csheh G, Szekely JI. 1976. Opioid agonist activity of beta-lipotropin fragments: a possible biological source of morphine-like substances in the pituitary. *FEBS Lett* 64(1):181-184.
- Grandy DK, Hanneman E, Bunzow J, Shih M, Machida CA, Bidlack JM, Civelli O. 1990. Purification, cloning, and tissue distribution of a 23-kDa rat protein isolated by morphine affinity chromatography. *Mol Endocrinol* 4(9):1370-1376.
- Grobe N, Lamshoft M, Orth RG, Drager B, Kutchan TM, Zenk MH, Spitteller M. 2010. Urinary excretion of morphine and biosynthetic precursors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(18):8147-8152.
- Grobe N, Ren X, Kutchan TM, Zenk MH. 2011. An (R)-specific N-methyltransferase involved in human morphine biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 506(1):42-47.
- Grobe N, Zhang B, Fisinger U, Kutchan TM, Zenk MH, Guengerich FP. 2009. Mammalian cytochrome P450 enzymes catalyze the phenol-coupling step in endogenous morphine biosynthesis. *J Biol Chem* 284(36):24425-24431.
- Grothe T, Lenz R, Kutchan TM. 2001. Molecular characterization of the salutaridinol 7-O-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *Papaver somniferum*. *J Biol Chem* 276(33):30717-30723.
- Guarna M, Bianchi E, Bartolini A, Ghelardini C, Galeotti N, Bracci L, Neri C, Sonetti D, Stefano G. 2002. Endogenous morphine modulates acute thermoreception in mice. *J Neurochem* 80(2):271-277.
- Guarna M, Ghelardini C, Galeotti N, Bartolini A, Noli L, Neri C, Stefano GB, Bianchi E. 2004. Effects of endogenous morphine deprivation on memory retention of passive avoidance learning in mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 7(3):311-319.
- Guarna M, Ghelardini C, Galeotti N, Stefano GB, Bianchi E. 2005. Neurotransmitter role of endogenous morphine in CNS. *Med Sci Monit* 11(6):RA190-193.
- Guarna M, Neri C, Petrioli F, Bianchi E. 1998. Potassium-induced release of endogenous morphine from rat brain slices. *J Neurochem* 70(1):147-152.
- Haber H, Roske I, Rottmann M, Georgi M, Melzig MF. 1997. Alcohol induces formation of morphine precursors in the striatum of rats. *Life Sci* 60(2):79-89.
- Hachisuka A, Nakajima O, Yamazaki T, Sawada J. 1999. Localization of opioid-binding cell adhesion molecule (OBCAM) in adult rat brain. *Brain Res* 842(2):482-486.
- Hackler L, Zadina JE, Ge LJ, Kastin AJ. 1997. Isolation of relatively large amounts of endomorphin-1 and endomorphin-2 from human brain cortex. *Peptides* 18(10):1635-1639.
- Hagel JM, Facchini PJ. 2010. Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nat Chem Biol* 6(4):273-275.
- Harburg GC, Hall FS, Harrist AV, Sora I, Uhl GR, Eisch AJ. 2007. Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons. *Neuroscience* 144(1):77-87.
- Harston CT, Morrow A, Kostrzewa RM. 1980. Enhancement of sprouting and putative regeneration of central noradrenergic fibers by morphine. *Brain Res Bull* 5(4):421-424.
- Hasselstrom J, Sawe J. 1993. Morphine pharmacokinetics and metabolism in humans. Enterohepatic cycling and relative contribution of metabolites to active opioid concentrations. *Clin Pharmacokinet* 24(4):344-354.
- Hazen SL, Gaut JP, Crowley JR, Hsu FF, Heinecke JW. 2000. Elevated levels of protein-bound p-hydroxyphenylacetaldehyde, an amino-acid-derived aldehyde generated by myeloperoxidase, are present in human fatty streaks, intermediate lesions and advanced atherosclerotic lesions. *Biochem J* 352 Pt 3:693-699.
- Hazen SL, Heller J, Hsu FF, d'Avignon A, Heinecke JW. 1999. Synthesis, isolation, and characterization of the adduct formed in the reaction of p-hydroxyphenylacetaldehyde with the amino headgroup of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine. *Chem Res Toxicol* 12(1):19-27.
- Hazen SL, Hsu FF, d'Avignon A, Heinecke JW. 1998. Human neutrophils employ myeloperoxidase to convert alpha-amino acids to a battery of reactive aldehydes: a pathway for aldehyde generation at sites of inflammation. *Biochemistry* 37(19):6864-6873.
- Hazum E, Sabatka JJ, Chang KJ, Brent DA, Findlay JW, Cuatrecasas P. 1981. Morphine in cow and human milk: could dietary morphine constitute a ligand for specific morphine (mu) receptors? *Science* 213(4511):1010-1012.
- Heinz A, Schlagenhaut F. 2010. Dopaminergic dysfunction in schizophrenia: salience attribution revisited. *Schizophr Bull* 36(3):472-485.

- Heller JI, Crowley JR, Hazen SL, Salvay DM, Wagner P, Pennathur S, Heinecke JW. 2000. p-hydroxyphenylacetaldehyde, an aldehyde generated by myeloperoxidase, modifies phospholipid amino groups of low density lipoprotein in human atherosclerotic intima. *J Biol Chem* 275(14):9957-9962.
- Heltsley R, Zichterman A, Black DL, Cawthon B, Robert T, Moser F, Caplan YH, Cone EJ. 2010. Urine drug testing of chronic pain patients. II. Prevalence patterns of prescription opiates and metabolites. *J Anal Toxicol* 34(1):32-38.
- Heurtaux T, Benani A, Moulin D, Muller N, Netter P, Minn A. 2006. Induction of UGT1A6 isoform by inflammatory conditions in rat astrocytes. *Neuropharmacology* 50(3):317-328.
- Hirata K, Poeaknapo C, Schmidt J, Zenk MH. 2004. 1,2-Dehydroreticuline synthase, the branch point enzyme opening the morphinan biosynthetic pathway. *Phytochemistry* 65(8):1039-1046.
- Hirrlinger J, Moeller H, Kirchhoff F, Dringen R. 2005. Expression of multidrug resistance proteins (Mrps) in astrocytes of the mouse brain: a single cell RT-PCR study. *Neurochem Res* 30(10):1237-1244.
- Hojo M, Sudo Y, Ando Y, Minami K, Takada M, Matsubara T, Kanaide M, Taniyama K, Sumikawa K, Uezono Y. 2008. μ -Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. *J Pharmacol Sci* 108(3):308-319.
- Horak P, Haberman F, Spector S. 1993. Endogenous morphine and codeine in mice--effect of muramyl dipeptide. *Life Sci* 52(23):PL255-260.
- Hughes J, Smith T, Morgan B, Fothergill L. 1975. Purification and properties of enkephalin - the possible endogenous ligand for the morphine receptor. *Life Sci* 16(12):1753-1758.
- Hussey HH, Katz S. 1950. Infections resulting from narcotic addiction; report of 102 cases. *Am J Med* 9(2):186-193.
- Hutchinson MR, Loram LC, Zhang Y, Shridhar M, Rezvani N, Berkelhammer D, Phipps S, Foster PS, Landgraf K, Falke JJ, Rice KC, Maier SF, Yin H, Watkins LR. 2010a. Evidence that tricyclic small molecules may possess toll-like receptor and myeloid differentiation protein 2 activity. *Neuroscience* 168(2):551-563.
- 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. 2010b. Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain Behav Immun* 24(1):83-95.
- Ikedda H, Miyatake M, Koshikawa N, Ochiai K, Yamada K, Kiss A, Donlin MJ, Panneton WM, Churchill JD, Green M, Siddiqui AM, Leinweber AL, Crews NR, Ezerskiy LA, Rendell VR, Belcheva MM, Coscia CJ. 2010. Morphine modulation of thrombospondin levels in astrocytes and its implications for neurite outgrowth and synapse formation. *J Biol Chem* 285(49):38415-38427.
- Ikemoto K, Kitahama K, Seif I, Maeda T, De Maeyer E, Valatx JL. 1997. Monoamine oxidase B (MAOB)-containing structures in MAOA-deficient transgenic mice. *Brain Res* 771(1):121-132.
- Ilari A, Franceschini S, Bonamore A, Arengi F, Botta B, Macone A, Pasquo A, Bellucci L, Boffi A. 2009. Structural basis of enzymatic (S)-norcoclaurine biosynthesis. *J Biol Chem* 284(2):897-904.
- Inazu M, Takeda H, Matsumiya T. 2003a. Expression and functional characterization of the extraneuronal monoamine transporter in normal human astrocytes. *J Neurochem* 84(1):43-52.
- Inazu M, Takeda H, Matsumiya T. 2003b. Functional expression of the norepinephrine transporter in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 84(1):136-144.
- Ingram SL, Williams JT. 1994. Opioid inhibition of Ih via adenylyl cyclase. *Neuron* 13(1):179-186.
- International_narcotic_control_board. 2010. Narcotic Drugs : Estimated World Requirements for 2011 / Statistics for 2009. United-Nation-Publication http://www.incb.org/pdf/technical-reports/narcotic-drugs/2010/Narcotic_drugs_publication_2010.pdf.
- Inturrisi CE. 2002. Clinical pharmacology of opioids for pain. *Clin J Pain* 18(4 Suppl):S3-13.
- Iversen LL. 1996. How does morphine work? *Nature* 383(6603):759-760.
- Jaeger CB. 1985. Cytoarchitectonics of substantia nigra grafts: a light and electron microscopic study of immunocytochemically identified dopaminergic neurons and fibrous astrocytes. *J Comp Neurol* 231(1):121-135.
- Jahng JW, Houpt TA, Wessel TC, Chen K, Shih JC, Joh TH. 1997. Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by in situ hybridization. *Synapse* 25(1):30-36.

- Jedlitschky G, Cassidy AJ, Sales M, Pratt N, Burchell B. 1999. Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem J* 340 (Pt 3):837-843.
- Jordan BA, Devi LA. 1999. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399(6737):697-700.
- Jost CR, Van Der Zee CE, In 't Zandt HJ, Oerlemans F, Verheij M, Streijger F, Fransen J, Heerschap A, Cools AR, Wieringa B. 2002. Creatine kinase B-driven energy transfer in the brain is important for habituation and spatial learning behaviour, mossy fibre field size and determination of seizure susceptibility. *Eur J Neurosci* 15(10):1692-1706.
- Kawaguchi Y, Kondo S. 2002. Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol* 31(3-5):277-287.
- Kiang TK, Ensom MH, Chang TK. 2005. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther* 106(1):97-132.
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. 1992. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(24):12048-12052.
- Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C. 2002. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol* 66(5):285-306.
- Killian AK, Schuster CR, House JT, Sholl S, Connors M, Wainer BH. 1981. A non-peptide morphine-like compound from brain. *Life Sci* 28(7):811-817.
- Kilpatrick GJ, Smith TW. 2005. Morphine-6-glucuronide: actions and mechanisms. *Med Res Rev* 25(5):521-544.
- King CD, Rios GR, Assouline JA, Tephly TR. 1999. Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Arch Biochem Biophys* 365(1):156-162.
- Kitanaka N, Sora I, Kinsey S, Zeng Z, Uhl GR. 1998. No heroin or morphine 6beta-glucuronide analgesia in mu-opioid receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* 355(1):R1-3.
- Kline RH, Wiley RG. 2008. Spinal mu-opioid receptor-expressing dorsal horn neurons: role in nociception and morphine antinociception. *J Neurosci* 28(4):904-913.
- Koch T, Holtt V. 2008. Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. *Pharmacol Ther* 117(2):199-206.
- Kolodziej A, Stumm R, Becker A, Holtt V. 2008. Endogenous opioids inhibit ischemia-induced generation of immature hippocampal neurons *via* the mu-opioid receptor. *Eur J Neurosci* 27(6):1311-1319.
- Kream RM, Sheehan M, Cadet P, Mantione KJ, Zhu W, Casares F, Stefano GB. 2007. Persistence of evolutionary memory: primordial six-transmembrane helical domain mu opiate receptors selectively linked to endogenous morphine signaling. *Med Sci Monit* 13(12):SC5-6.
- Lachowicz JE, Shen Y, Monsma FJ, Jr., Sibley DR. 1995. Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. *J Neurochem* 64(1):34-40.
- Lake JR, Hammond MV, Shaddox RC, Hunsicker LM, Yang HY, Malin DH. 1991. IgG from neuropeptide FF antiserum reverses morphine tolerance in the rat. *Neurosci Lett* 132(1):29-32.
- Lange AB. 2009. Tyramine: from octopamine precursor to neuroactive chemical in insects. *Gen Comp Endocrinol* 162(1):18-26.
- Laux A, Muller AH, Miede M, Dirrig-Grosch S, Deloulme JC, Delalande F, Stuber D, Sage D, Van Dorsselaer A, Poisbeau P, Aunis D, Goumon Y. 2011. Mapping of endogenous morphine-like compounds in the adult mouse brain: Evidence of their localization in astrocytes and GABAergic cells. *J Comp Neurol* 519(12):2390-2416.
- Law PY, Erickson-Herbrandson LJ, Zha QQ, Solberg J, Chu J, Sarre A, Loh HH. 2005. Heterodimerization of mu- and delta-opioid receptors occurs at the cell surface only and requires receptor-G protein interactions. *J Biol Chem* 280(12):11152-11164.
- Lazarus LH, Ling N, Guillemin R. 1976. beta-Lipotropin as a prohormone for the morphinomimetic peptides endorphins and enkephalins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(6):2156-2159.
- Lee CS, Spector S. 1991. Changes of endogenous morphine and codeine contents in the fasting rat. *J Pharmacol Exp Ther* 257(2):647-650.
- Lee M, Silverman SM, Hansen H, Patel VB, Manchikanti L. 2011. A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. *Pain Physician* 14(2):145-161.
- Lenz R, Zenk MH. 1995. Purification and properties of codeinone reductase (NADPH) from *Papaver somniferum* cell cultures and differentiated plants. *Eur J Biochem* 233(1):132-139.
- Leow KP, Wright AW, Cramond T, Smith MT. 1993. Determination of the serum protein binding of oxycodone and morphine using ultrafiltration. *Ther Drug Monit* 15(5):440-447.

- Leroux E, Ducros A. 2008. Cluster headache. *Orphanet J Rare Dis* 3:20.
- Lewis RV, Stern AS, Kimura S, Rossier J, Stein S, Udenfriend S. 1980. An about 50,000-dalton protein in adrenal medulla: a common precursor of [Met]- and [Leu]enkephalin. *Science* 208(4451):1459-1461.
- Li CH, Chung D. 1976. Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(4):1145-1148.
- Li CH, Chung D, Doneen BA. 1976. Isolation, characterization and opiate activity of beta-endorphin from human pituitary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 72(4):1542-1547.
- Li Y, Li H, Zhang Y, Sun X, Hanley GA, LeSage G, Sun S, Peng Y, Yin D. 2010. Toll-like receptor 2 is required for opioids-induced neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 391(1):426-430.
- Li Y, Sun X, Zhang Y, Huang J, Hanley G, Ferslew KE, Peng Y, Yin D. 2009. Morphine promotes apoptosis *via* TLR2, and this is negatively regulated by beta-arrestin 2. *Biochem Biophys Res Commun* 378(4):857-861.
- Ling GS, Pasternak GW. 1983. Spinal and supraspinal opioid analgesia in the mouse: the role of subpopulations of opioid binding sites. *Brain Res* 271(1):152-156.
- Loeffler S, Deus-neumann B, Zenk MH. 1995. S-Adenosyl-L-methionine:(S)-coclaurine-N-methyl-transferase from *tinospora cardifolia*. *Phytochemistry* 38(6):1387-1395.
- Lopez-Gimenez JF, Milligan G. 2010. Opioid regulation of mu receptor internalisation: relevance to the development of tolerance and dependence. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9(5):616-626.
- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. 1977. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267(5611):495-499.
- Loscher W, Potschka H. 2005a. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx* 2(1):86-98.
- Loscher W, Potschka H. 2005b. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol* 76(1):22-76.
- Lotsch J, Geisslinger G. 2001. Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clin Pharmacokinet* 40(7):485-499.
- Lotsch J, Geisslinger G. 2006. Relevance of frequent mu-opioid receptor polymorphisms for opioid activity in healthy volunteers. *Pharmacogenomics J* 6(3):200-210.
- Lotsch J, Stockmann A, Kobal G, Brune K, Waibel R, Schmidt N, Geisslinger G. 1996. Pharmacokinetics of morphine and its glucuronides after intravenous infusion of morphine and morphine-6-glucuronide in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 60(3):316-325.
- Lowney LI, Gentleman SB, Goldstein A. 1979. A pituitary endorphin with novel properties. *Life Sci* 24(25):2377-2384.
- Ludwig M. 1995. Functional role of intrahypothalamic release of oxytocin and vasopressin: consequences and controversies. *Am J Physiol* 268(4 Pt 1):E537-545.
- Ludwig M, Pittman QJ. 2003. Talking back: dendritic neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 26(5):255-261.
- MacDonald ML, Naydenov A, Chu M, Matzilevich D, Konradi C. 2006. Decrease in creatine kinase messenger RNA expression in the hippocampus and dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Bipolar Disord* 8(3):255-264.
- Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, Nebert DW. 2005. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 15(10):677-685.
- Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW. 1997. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7(4):255-269.
- Madbouly KM, Senagore AJ, Delaney CP. 2010. Endogenous morphine levels after laparoscopic versus open colectomy. *Br J Surg* 97(5):759-764.
- Maejima T, Hashimoto K, Yoshida T, Aiba A, Kano M. 2001. Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* 31(3):463-475.
- Mague SD, Blendy JA. 2010. OPRM1 SNP (A118G): involvement in disease development, treatment response, and animal models. *Drug Alcohol Depend* 108(3):172-182.

- Mahajan SD, Schwartz SA, Aalinkeel R, Chawda RP, Sykes DE, Nair MP. 2005. Morphine modulates chemokine gene regulation in normal human astrocytes. *Clin Immunol* 115(3):323-332.
- Mahajan SD, Schwartz SA, Shanahan TC, Chawda RP, Nair MP. 2002. Morphine regulates gene expression of alpha- and beta-chemokines and their receptors on astroglial cells *via* the opioid mu receptor. *J Immunol* 169(7):3589-3599.
- Majumder P, Trujillo CA, Lopes CG, Resende RR, Gomes KN, Yuahasi KK, Britto LR, Ulrich H. 2007. New insights into purinergic receptor signaling in neuronal differentiation, neuroprotection, and brain disorders. *Purinergic Signal* 3(4):317-331.
- Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. 1995a. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 18(1):22-29.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Akil H, Watson SJ. 1995b. Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *J Chem Neuroanat* 8(4):283-305.
- Mantione KJ, Angert RM, Cadet P, Kream RM, Stefano GB. 2010. Identification of a micro opiate receptor signaling mechanism in human placenta. *Med Sci Monit* 16(11):BR347-352.
- Mantione KJ, Cadet P, Zhu W, Kream RM, Sheehan M, Fricchione GL, Goumon Y, Esch T, Stefano GB. 2008. Endogenous morphine signaling *via* nitric oxide regulates the expression of CYP2D6 and COMT: autocrine/paracrine feedback inhibition. *Addict Biol* 13(1):118-123.
- Marrazzi MA, Luby ED, Kinzie J, Munjal ID, Spector S. 1997. Endogenous codeine and morphine in anorexia and bulimia nervosa. *Life Sci* 60(20):1741-1747.
- Martin G, Ahmed SH, Blank T, Spiess J, Koob GF, Siggins GR. 1999. Chronic morphine treatment alters NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 19(20):9081-9089.
- Martin WR. 1967. Opioid antagonists. *Pharmacol Rev* 19(4):463-521.
- Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, Novello JC, Marangoni S, Turck CW, Dias-Neto E. 2009. Proteome analysis of schizophrenia patients Wernicke's area reveals an energy metabolism dysregulation. *BMC Psychiatry* 9:17.
- Matsubara K, Fukushima S, Akane A, Kobayashi S, Shiono H. 1992. Increased urinary morphine, codeine and tetrahydropapaveroline in parkinsonian patient undergoing L-3,4-dihydroxyphenylalanine therapy: a possible biosynthetic pathway of morphine from L-3,4-dihydroxyphenylalanine in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 260(3):974-978.
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL. 1996. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383(6603):819-823.
- Mavrojiannis M. 1903. Action Cataleptique de la Morphine chez les Rats. Contribution a la Theorie Toxique da la Catalepsie. *Comptes rendues Soc Biol* 55:1092-1094.
- McCoy JG, Strawbridge C, McMurtrey KD, Kane VB, Ward CP. 2003. A re-evaluation of the role of tetrahydropapaveroline in ethanol consumption in rats. *Brain Res Bull* 60(1-2):59-65.
- McDonald J, Lambert DG. 2005. Opioid receptors. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 5:22-25.
- McDonough PC, Levine B, Vorce S, Jufer RA, Fowler D. 2008. The detection of hydromorphone in urine specimens with high morphine concentrations. *J Forensic Sci* 53(3):752-754.
- McNicholas LF, Martin WR. 1984. New and experimental therapeutic roles for naloxone and related opioid antagonists. *Drugs* 27(1):81-93.
- Meijerink WJ, Molina PE, Abumrad NN. 1999. Mammalian opiate alkaloid synthesis: lessons derived from plant biochemistry. *Shock* 12(3):165-173.
- Mellon RD, Bayer BM. 1998a. Evidence for central opioid receptors in the immunomodulatory effects of morphine: review of potential mechanism(s) of action. *J Neuroimmunol* 83(1-2):19-28.
- Mellon RD, Bayer BM. 1998b. Role of central opioid receptor subtypes in morphine-induced alterations in peripheral lymphocyte activity. *Brain Res* 789(1):56-67.
- Mellon RD, Bayer BM. 1999. The effects of morphine, nicotine and epibatidine on lymphocyte activity and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses. *J Pharmacol Exp Ther* 288(2):635-642.
- Merskey H. 1991. The definition of pain. *European Psychiatry* 6(4):153-159.

- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, et al. 1995. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377(6549):532-535.
- Miksys S, Rao Y, Hoffmann E, Mash DC, Tyndale RF. 2002. Regional and cellular expression of CYP2D6 in human brain: higher levels in alcoholics. *J Neurochem* 82(6):1376-1387.
- Mikus G, Somogyi AA, Bochner F, Eichelbaum M. 1991. Thebaine O-demethylation to oripavine: genetic differences between two rat strains. *Xenobiotica* 21(11):1501-1509.
- Millan MJ. 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66(6):355-474.
- Miller RJ, Pickel VM. 1980. Immunohistochemical distribution of enkephalins: interactions with catecholamine-containing systems. *Adv Biochem Psychopharmacol* 25:349-359.
- Milligan G. 2008. A day in the life of a G protein-coupled receptor: the contribution to function of G protein-coupled receptor dimerization. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S216-229.
- Minami M, Toya T, Katao Y, Maekawa K, Nakamura S, Onogi T, Kaneko S, Satoh M. 1993. Cloning and expression of a cDNA for the rat kappa-opioid receptor. *FEBS Lett* 329(3):291-295.
- Misra AL, Mitchell CL, Woods LA. 1971. Persistence of morphine in central nervous system of rats after a single injection and its bearing on tolerance. *Nature* 232(5305):48-50.
- Misra AL, Vadlamani NL, Pontani RB, Mule SJ. 1974. Some physicochemical and pharmacological properties of morphine-2,3-quinone, the morphine metabolite in the rat brain. *J Pharm Pharmacol* 26(12):990-992.
- Miyake N, Thompson J, Skinbjerg M, Abi-Dargham A. 2011. Presynaptic dopamine in schizophrenia. *CNS Neurosci Ther* 17(2):104-109.
- Molina PE, Hashiguchi Y, Meijerink WJ, Naukam RJ, Boxer R, Abumrad NN. 1995. Modulation of endogenous opiate production: effect of fasting. *Biochem Biophys Res Commun* 207(1):312-317.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC. 1994. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341(1):33-38.
- Molloy GR, Wilson CD, Benfield P, de Vellis J, Kumar S. 1992. Rat brain creatine kinase messenger RNA levels are high in primary cultures of brain astrocytes and oligodendrocytes and low in neurons. *J Neurochem* 59(5):1925-1932.
- Morishige T, Tsujita T, Yamada Y, Sato F. 2000. Molecular characterization of the S-adenosyl-L-methionine:3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *J Biol Chem* 275(30):23398-23405.
- Morris JF, Christian H, Ma D, Wang H. 2000. Dendritic secretion of peptides from hypothalamic magnocellular neurosecretory neurones: a local dynamic control system and its functions. *Exp Physiol* 85 Spec No:131S-138S.
- Mosconi T, Kruger L. 1996. Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* 64(1):37-57.
- Moskowitz AS, Goodman RR. 1985. Autoradiographic analysis of mu1, mu2, and delta opioid binding in the central nervous system of C57BL/6BY and CXBK (opioid receptor-deficient) mice. *Brain Res* 360(1-2):108-116.
- Mrkusich EM, Kivell BM, Miller JH, Day DJ. 2004. Abundant expression of mu and delta opioid receptor mRNA and protein in the cerebellum of the fetal, neonatal, and adult rat. *Brain Res Dev Brain Res* 148(2):213-222.
- Muller A, Glattard E, Taleb O, Kimmel V, Laux A, Miede M, Delalande F, Roussel G, Van Dorsselaer A, Metz-Boutigue MH, Aunis D, Goumon Y. 2008. Endogenous morphine in SH-SY5Y cells and the mouse cerebellum. *PLoS One* 3(2):e1641.
- Mullis KB, Perry DC, Finn AM, Stafford B, Sadee W. 1979. Morphine persistence in rat brain and serum after single doses. *J Pharmacol Exp Ther* 208(2):228-231.
- Munjal ID, Minna JD, Manneckjee R, Bieck P, Spector S. 1995. Possible role of endogenous morphine and codeine on growth regulation of lung tissue. *Life Sci* 57(5):517-521.
- Murray A, Hagen NA. 2005. Hydromorphone. *J Pain Symptom Manage* 29(5 Suppl):S57-66.
- Murray CJL, Lopez AD. 1996. The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. Cambridge, MA: Harvard University Press.

- Musshoff F, Kirschbaum KM, Graumann K, Herzfeld C, Sachs H, Madea B. 2011. Evaluation of two immunoassay procedures for drug testing in hair samples. *Forensic Sci Int*.
- Nagamatsu K, Hasegawa A. 1992. Covalent binding of morphine to isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 43(12):2631-2635.
- Nagamatsu K, Hasegawa A. 1993. Effect of sodium selenite on morphine-induced hepatotoxicity in mice. *Drug Chem Toxicol* 16(3):241-253.
- Nagamatsu K, Kido Y, Terao T, Ishida T, Toki S. 1983. Studies on the mechanism of covalent binding of morphine metabolites to proteins in mouse. *Drug Metab Dispos* 11(3):190-194.
- Nagano E, Yamada H, Oguri K. 2000. Characteristic glucuronidation pattern of physiologic concentration of morphine in rat brain. *Life Sci* 67(20):2453-2464.
- Nasello AG, Depiante R, Tannhauser M, Izquierdo I. 1973. Effect of morphine on the RNA and ATP concentration of brain structures of the rat. *Pharmacology* 10(1):56-59.
- Navin TR, Hager WD. 1979. Creatine kinase MB isoenzyme in the evaluation of myocardial infarction. *Curr Probl Cardiol* 3(12):1-32.
- Neal CR, Jr., Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Watson SJ, Jr. 1999. Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 406(4):503-547.
- Neri C, Ghelardini C, Sotak B, Palmiter RD, Guarna M, Stefano G, Bianchi E. 2008. Dopamine is necessary to endogenous morphine formation in mammalian brain *in vivo*. *J Neurochem* 106(6):2337-2344.
- Neri C, Guarna M, Bianchi E, Sonetti D, Matteucci G, Stefano GB. 2004. Endogenous morphine and codeine in the brain of non human primate. *Med Sci Monit* 10(6):MS1-5.
- Nikolaev VO, Boettcher C, Dees C, Bunemann M, Lohse MJ, Zenk MH. 2007. Live cell monitoring of mu-opioid receptor-mediated G-protein activation reveals strong biological activity of close morphine biosynthetic precursors. *J Biol Chem* 282(37):27126-27132.
- Norris PJ, Hardwick JP, Emson PC. 1996. Regional distribution of cytochrome P450 2D1 in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 366(2):244-258.
- Oka K, Kantrowitz JD, Spector S. 1985. Isolation of morphine from toad skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(6):1852-1854.
- Okada T, Shimada S, Sato K, Kotake Y, Kawai H, Ohta S, Tohyama M, Nishimura T. 1998. Tetrahydropapaveroline and its derivatives inhibit dopamine uptake through dopamine transporter expressed in HEK293 cells. *Neurosci Res* 30(1):87-90.
- Oleskevich S, Clements JD, Williams JT. 1993. Opioid-glutamate interactions in rat locus coeruleus neurons. *J Neurophysiol* 70(3):931-937.
- Olianas MC, Onali P. 1999. Mediation by G protein beta-gamma subunits of the opioid stimulation of adenylyl cyclase activity in rat olfactory bulb. *Biochem Pharmacol* 57(6):649-652.
- Olsen GD. 1975. Morphine binding to human plasma proteins. *Clin Pharmacol Ther* 17(1):31-35.
- Olsen GD, Bennett WM, Porter GA. 1975. Morphine and phenytoin binding to plasma proteins in renal and hepatic failure. *Clin Pharmacol Ther* 17(6):677-684.
- Onali P, Olianas MC. 1991. Naturally occurring opioid receptor agonists stimulate adenylate cyclase activity in rat olfactory bulb. *Mol Pharmacol* 39(4):436-441.
- Osborne R, Joel S, Trew D, Slevin M. 1990. Morphine and metabolite behavior after different routes of morphine administration: demonstration of the importance of the active metabolite morphine-6-glucuronide. *Clin Pharmacol Ther* 47(1):12-19.
- Oyler JM, Cone EJ, Joseph RE, Jr., Huestis MA. 2000. Identification of hydrocodone in human urine following controlled codeine administration. *J Anal Toxicol* 24(7):530-535.
- Ozaki N. 2004. Pharmacogenetics of antipsychotics. *Nagoya J Med Sci* 67(1-2):1-7.
- Pan L, Xu J, Yu R, Xu MM, Pan YX, Pasternak GW. 2005a. Identification and characterization of six new alternatively spliced variants of the human mu opioid receptor gene, Oprm. *Neuroscience* 133(1):209-220.
- Pan YX. 2002. Identification and characterization of a novel promoter of the mouse mu opioid receptor gene (Oprm) that generates eight splice variants. *Gene* 295(1):97-108.
- Pan YX, Xu J, Bolan E, Abbadie C, Chang A, Zuckerman A, Rossi G, Pasternak GW. 1999. Identification and characterization of three new alternatively spliced mu-opioid receptor isoforms. *Mol Pharmacol* 56(2):396-403.
- Pan YX, Xu J, Bolan E, Chang A, Mahurter L, Rossi G, Pasternak GW. 2000. Isolation and expression of a novel alternatively spliced mu opioid receptor isoform, MOR-1F. *FEBS Lett* 466(2-3):337-340.

- Pan YX, Xu J, Bolan E, Moskowitz HS, Xu M, Pasternak GW. 2005b. Identification of four novel exon 5 splice variants of the mouse mu-opioid receptor gene: functional consequences of C-terminal splicing. *Mol Pharmacol* 68(3):866-875.
- Pan YX, Xu J, Mahurter L, Bolan E, Xu M, Pasternak GW. 2001. Generation of the mu opioid receptor (MOR-1) protein by three new splice variants of the Oprm gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24):14084-14089.
- Pan YX, Xu J, Mahurter L, Xu M, Gilbert AK, Pasternak GW. 2003. Identification and characterization of two new human mu opioid receptor splice variants, hMOR-1O and hMOR-1X. *Biochem Biophys Res Commun* 301(4):1057-1061.
- Pan YX, Xu J, Xu M, Rossi GC, Matulonis JE, Pasternak GW. 2009. Involvement of exon 11-associated variants of the mu opioid receptor MOR-1 in heroin, but not morphine, actions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(12):4917-4922.
- Pasquali L, Busceti CL, Fulceri F, Paparelli A, Fornai F. 2010. Intracellular pathways underlying the effects of lithium. *Behav Pharmacol* 21(5-6):473-492.
- Pasternak GW. 1981. Opiate, enkephalin, and endorphin analgesia: relations to a single subpopulation of opiate receptors. *Neurology* 31(10):1311-1315.
- Pasternak GW. 2007. When it comes to opiates, just say NO. *J Clin Invest* 117(11):3185-3187.
- Pasternak GW, Bodnar RJ, Clark JA, Inturrisi CE. 1987. Morphine-6-glucuronide, a potent mu agonist. *Life Sci* 41(26):2845-2849.
- Perea-Sasiain J. 2008. Biosynthesis of morphine: It's importance in parkinson disease. *RevFacMed* 56:161-189.
- Persson AI, Thorlin T, Bull C, Zarnegar P, Ekman R, Terenius L, Eriksson PS. 2003. Mu- and delta-opioid receptor antagonists decrease proliferation and increase neurogenesis in cultures of rat adult hippocampal progenitors. *Eur J Neurosci* 17(6):1159-1172.
- Pert CB, Snyder SH. 1973. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179(77):1011-1014.
- Pfeiffer M, Kirscht S, Stumm R, Koch T, Wu D, Laugsch M, Schroder H, Holtt V, Schulz S. 2003. Heterodimerization of substance P and mu-opioid receptors regulates receptor trafficking and resensitization. *J Biol Chem* 278(51):51630-51637.
- Phiel CJ, Klein PS. 2001. Molecular targets of lithium action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:789-813.
- Poeaknapo C. 2005. Mammalian morphine: de novo formation of morphine in human cells. *Med Sci Monit* 11(5):MS6-17.
- Poeaknapo C, Schmidt J, Brandsch M, Drager B, Zenk MH. 2004. Endogenous formation of morphine in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(39):14091-14096.
- Pol O, Valle L, Sanchez-Blazquez P, Garzon J, Puig MM. 1999. Antibodies and antisense oligodeoxynucleotides to mu-opioid receptors, selectively block the effects of mu-opioid agonists on intestinal transit and permeability in mice. *Br J Pharmacol* 127(2):397-404.
- Prabhu PR, Hudson AO. 2010. Identification and Partial Characterization of an L-Tyrosine Aminotransferase (TAT) from Arabidopsis thaliana. *Biochem Res Int*:549572.
- Pryor SC, Elizee R. 2000. Evidence of opiates and opioid neuropeptides and their immune effects in parasitic invertebrates representing three different phyla: Schistosoma mansoni, Theromyzon tessulatum, Trichinella spiralis. *Acta Biol Hung* 51(2-4):331-341.
- Quock RM, Burkey TH, Varga E, Hosohata Y, Hosohata K, Cowell SM, Slate CA, Ehlert FJ, Roeske WR, Yamamura HI. 1999. The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. *Pharmacol Rev* 51(3):503-532.
- Raehal KM, Bohn LM. 2005. Mu opioid receptor regulation and opiate responsiveness. *AAPS J* 7(3):E587-591.
- Ratanajamit C, Soorapan S, Doang-ngern T, Waenwaisart W, Suwanchavalit L, Suwansiri S, Jantasaro S, Yanate I. 2006. Appropriateness of therapeutic drug monitoring for lithium. *J Med Assoc Thai* 89(11):1954-1960.
- Rein G, Glover V, Sandler M. 1982. Multiple forms of phenolsulphotransferase in human tissues: selective inhibition by dichloronitrophenol. *Biochem Pharmacol* 31(10):1893-1897.
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ, Jr., Civelli O. 1995. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270(5237):792-794.
- Rios M, Habecker B, Sasaoka T, Eisenhofer G, Tian H, Landis S, Chikaraishi D, Roffler-Tarlov S. 1999. Catecholamine synthesis is mediated by tyrosinase in the absence of tyrosine hydroxylase. *J Neurosci* 19(9):3519-3526.
- Robinson TE, Kolb B. 2004. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:33-46.

- Rossi GC, Brown GP, Leventhal L, Yang K, Pasternak GW. 1996. Novel receptor mechanisms for heroin and morphine-6 beta-glucuronide analgesia. *Neurosci Lett* 216(1):1-4.
- Rossi GC, Leventhal L, Pan YX, Cole J, Su W, Bodnar RJ, Pasternak GW. 1997. Antisense mapping of MOR-1 in rats: distinguishing between morphine and morphine-6beta-glucuronide antinociception. *J Pharmacol Exp Ther* 281(1):109-114.
- Rossi GC, Standifer KM, Pasternak GW. 1995. Differential blockade of morphine and morphine-6 beta-glucuronide analgesia by antisense oligodeoxynucleotides directed against MOR-1 and G-protein alpha subunits in rats. *Neurosci Lett* 198(2):99-102.
- Rozenfeld R, Devi LA. 2007. Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *FASEB J* 21(10):2455-2465.
- Rubovitch V, Gafni M, Sarne Y. 2003. The mu opioid agonist DAMGO stimulates cAMP production in SK-N-SH cells through a PLC-PKC-Ca⁺⁺ pathway. *Brain Res Mol Brain Res* 110(2):261-266.
- Rueffer M, Zenk MH. 1987. Distant precursors of benzyloquinoline alkaloids and their enzymatic formation. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C, Biosciences* 42(2):319-322.
- Sacerdote P. 2006. Opioids and the immune system. *Palliat Med* 20 Suppl 1:s9-15.
- Sagud M, Muck-Seler D, Mihaljevic-Peles A, Vuksan-Cusa B, Zivkovic M, Jakovljevic M, Pivac N. 2010. Catechol-O-methyl transferase and schizophrenia. *Psychiatr Danub* 22(2):270-274.
- Samanani N, Facchini PJ. 2002. Purification and characterization of norcoclaurine synthase. The first committed enzyme in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in plants. *J Biol Chem* 277(37):33878-33883.
- Samways DS, Henderson G. 2006. Opioid elevation of intracellular free calcium: possible mechanisms and physiological relevance. *Cell Signal* 18(2):151-161.
- Sango K, Maruyama W, Matsubara K, Dostert P, Minami C, Kawai M, Naoi M. 2000. Enantio-selective occurrence of (S)-tetrahydropapaveroline in human brain. *Neurosci Lett* 283(3):224-226.
- Sargeant TJ, Miller JH, Day DJ. 2008. Opioidergic regulation of astroglial/neuronal proliferation: where are we now? *J Neurochem* 107(4):883-897.
- Schestatsky P, Kumru H, Valls-Sole J, Valldeoriola F, Marti MJ, Tolosa E, Chaves ML. 2007. Neurophysiologic study of central pain in patients with Parkinson disease. *Neurology* 69(23):2162-2169.
- Schofield PR, McFarland KC, Hayflick JS, Wilcox JN, Cho TM, Roy S, Lee NM, Loh HH, Seeburg PH. 1989. Molecular characterization of a new immunoglobulin superfamily protein with potential roles in opioid binding and cell contact. *EMBO J* 8(2):489-495.
- Schuller AG, King MA, Zhang J, Bolan E, Pan YX, Morgan DJ, Chang A, Czick ME, Unterwald EM, Pasternak GW, Pintar JE. 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(2):151-156.
- Schulz S, Holtt V. 1998. Opioid withdrawal activates MAP kinase in locus coeruleus neurons in morphine-dependent rats *in vivo*. *Eur J Neurosci* 10(3):1196-1201.
- Seelbach MJ, Brooks TA, Egleton RD, Davis TP. 2007. Peripheral inflammatory hyperalgesia modulates morphine delivery to the brain: a role for P-glycoprotein. *J Neurochem* 102(5):1677-1690.
- Sery O, Prikryl R, Castulik L, St'astny F. 2010. A118G polymorphism of OPRM1 gene is associated with schizophrenia. *J Mol Neurosci* 41(1):219-222.
- Shorr J, Foley K, Spector S. 1978. Presence of a non-peptide morphine-like compound in human cerebrospinal fluid. *Life Sci* 23(20):2057-2062.
- Siegle I, Fritz P, Eckhardt K, Zanger UM, Eichelbaum M. 2001. Cellular localization and regional distribution of CYP2D6 mRNA and protein expression in human brain. *Pharmacogenetics* 11(3):237-245.
- Silber D, McLaughlin D, Sinoway L. 1991. Leg exercise conditioning increases peak forearm blood flow. *J Appl Physiol* 71(4):1568-1573.
- Simantov R, Snyder SH. 1976. Morphine-like peptides, leucine enkephalin and methionine enkephalin: interactions with the opiate receptor. *Mol Pharmacol* 12(6):987-998.
- Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Matthes H, Nappay V, Lannes B, Micheletti G, Kieffer B. 1994. The human delta-opioid receptor: genomic organization, cDNA cloning, functional expression, and distribution in human brain. *Mol Pharmacol* 46(6):1015-1021.

- Simonin F, Gaveriaux-Ruff C, Befort K, Matthes H, Lannes B, Micheletti G, Mattei MG, Charron G, Bloch B, Kieffer B. 1995. kappa-Opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(15):7006-7010.
- Simonin F, Schmitt M, Laulin JP, Laboureyras E, Jhamandas JH, MacTavish D, Matifas A, Mollereau C, Laurent P, Parmentier M, Kieffer BL, Bourguignon JJ, 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(2):466-471.
- Simonnet G, Laboureyras E. 2009. Opioids revisited: from analgesia to hyperalgesia | [Les opioïdes : de l'analgésie à l'hyperalgésie. Des dogmes à réexaminer]. *Douleur et Analgesie* 22(4):216-228.
- Somogyi P, Klausberger T. 2005. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562(Pt 1):9-26.
- Sonetti D, Mola L, Casares F, Bianchi E, Guarna M, Stefano GB. 1999. Endogenous morphine levels increase in molluscan neural and immune tissues after physical trauma. *Brain Res* 835(2):137-147.
- Sonetti D, Peruzzi E, Stefano GB. 2005. Endogenous morphine and ACTH association in neural tissues. *Med Sci Monit* 11(5):MS22-30.
- Stefano GB, Bianchi E, Guarna M, Fricchione GL, Zhu W, Cadet P, Mantione KJ, Casares FM, Kream RM, Esch T. 2007. Nicotine, alcohol and cocaine coupling to reward processes *via* endogenous morphine signaling: the dopamine-morphine hypothesis. *Med Sci Monit* 13(6):RA91-102.
- Stefano GB, Digenis A, Spector S, Leung MK, Bilfinger TV, Makman MH, Scharrer B, Abumrad NN. 1993. Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23):11099-11103.
- Stefano GB, Goumon Y, Casares F, Cadet P, Fricchione GL, Rialas C, Peter D, Sonetti D, Guarna M, Welters ID, Bianchi E. 2000. Endogenous morphine. *Trends Neurosci* 23(9):436-442.
- Stefano GB, Hartman A, Bilfinger TV, Magazine HI, Liu Y, Casares F, Goligorsky MS. 1995. Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation. *J Biol Chem* 270(51):30290-30293.
- Stefano GB, Kream RM. 2007. Endogenous morphine synthetic pathway preceded and gave rise to catecholamine synthesis in evolution (Review). *Int J Mol Med* 20(6):837-841.
- Stefano GB, Kream RM. 2010. Dopamine, morphine, and nitric oxide: an evolutionary signaling triad. *CNS Neurosci Ther* 16(3):e124-137.
- Stefano GB, Scharrer B, Smith EM, Hughes TK, Jr., Magazine HI, Bilfinger TV, Hartman AR, Fricchione GL, Liu Y, Makman MH. 1996. Opioid and opiate immunoregulatory processes. *Crit Rev Immunol* 16(2):109-144.
- Stinus L, Allard M, Gold L, Simonnet G. 1995. Changes in CNS neuropeptide FF-like material, pain sensitivity, and opiate dependence following chronic morphine treatment. *Peptides* 16(7):1235-1241.
- Stone AN, Mackenzie PI, Galetin A, Houston JB, Miners JO. 2003. Isoform selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human udp-glucuronosyltransferases: evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7. *Drug Metab Dispos* 31(9):1086-1089.
- Stumm RK, Zhou C, Schulz S, Holtt V. 2004. Neuronal types expressing mu- and delta-opioid receptor mRNA in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 469(1):107-118.
- Suleman FG, Abid A, Gradinaru D, Daval JL, Magdalou J, Minn A. 1998. Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch Biochem Biophys* 358(1):63-67.
- Sullivan AF, McQuay HJ, Bailey D, Dickenson AH. 1989. The spinal antinociceptive actions of morphine metabolites morphine-6-glucuronide and normorphine in the rat. *Brain Res* 482(2):219-224.
- Suzuki N, Bekkers JM. 2007. Inhibitory interneurons in the piriform cortex. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(10):1064-1069.
- Svingos AL, Garzon M, Colago EE, Pickel VM. 2001. Mu-opioid receptors in the ventral tegmental area are targeted to presynaptically and directly modulate mesocortical projection neurons. *Synapse* 41(3):221-229.
- Tachikawa M, Fukaya M, Terasaki T, Ohtsuki S, Watanabe M. 2004. Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest a novel neuron-glia relationship for brain energy homeostasis. *Eur J Neurosci* 20(1):144-160.

- Takeda H, Inazu M, Matsumiya T. 2002. Astroglial dopamine transport is mediated by norepinephrine transporter. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366(6):620-623.
- Takita K, Herlenius EA, Lindahl SG, Yamamoto Y. 1997. Actions of opioids on respiratory activity *via* activation of brainstem mu-, delta- and kappa-receptors; an *in vitro* study. *Brain Res* 778(1):233-241.
- Tang T, Stevens BA, Cox BM. 1996. Opioid regulation of intracellular free calcium in cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci Res* 44(4):338-343.
- Tenconi B, Lesma E, DiGiulio AM, Gorio A. 1996. High opioid doses inhibit whereas low doses enhance neurogenesis in PC12 cells. *Brain Res Dev Brain Res* 94(2):175-181.
- Thompson MA, Moon E, Kim UJ, Xu J, Siciliano MJ, Weinshilboum RM. 1999. Human indolethylamine N-methyltransferase: cDNA cloning and expression, gene cloning, and chromosomal localization. *Genomics* 61(3):285-297.
- Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. 2008. Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11(2 Suppl):S133-153.
- Turner AJ, Baker KM, Algeri S, Erigerio A, Garattini S. 1974. Tetrahydropapaveroline: formation *in vivo* and *in vitro* in rat brain. *Life Sci* 14(11):2247-2257.
- Ueda H, Ueda M. 2009. Mechanisms underlying morphine analgesic tolerance and dependence. *Front Biosci* 14:5260-5272.
- van de Wetering K, Zelcer N, Kuil A, Feddema W, Hillebrand M, Vlaming ML, Schinkel AH, Beijnen JH, Borst P. 2007. Multidrug resistance proteins 2 and 3 provide alternative routes for hepatic excretion of morphine-glucuronides. *Mol Pharmacol* 72(2):387-394.
- van Dorp EL, Kest B, Kowalczyk WJ, Morariu AM, Waxman AR, Arout CA, Dahan A, Sarton EY. 2009. Morphine-6beta-glucuronide rapidly increases pain sensitivity independently of opioid receptor activity in mice and humans. *Anesthesiology* 110(6):1356-1363.
- Van Laar VS, Mishizen AJ, Cascio M, Hastings TG. 2009. Proteomic identification of dopamine-conjugated proteins from isolated rat brain mitochondria and SH-SY5Y cells. *Neurobiol Dis* 34(3):487-500.
- Vaughan CW, Christie MJ. 1997. Presynaptic inhibitory action of opioids on synaptic transmission in the rat periaqueductal grey *in vitro*. *J Physiol* 498 (Pt 2):463-472.
- Vaughan CW, Ingram SL, Connor MA, Christie MJ. 1997. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature* 390(6660):611-614.
- Villardaga JP, Nikolaev VO, Lorenz K, Ferrandon S, Zhuang Z, Lohse MJ. 2008. Conformational crosstalk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. *Nat Chem Biol* 4(2):126-131.
- von Bohlen Und Halbach O. 2007. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 329(3):409-420.
- von Bohlen Und Halbach O. 2011. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*.
- Wachtel SR, Abercrombie ED. 1994. L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dopamine release in the striatum of intact and 6-hydroxydopamine-treated rats: differential effects of monoamine oxidase A and B inhibitors. *J Neurochem* 63(1):108-117.
- Waldhoer M, Fong J, Jones RM, Lunzer MM, Sharma SK, Kostenis E, Portoghese PS, Whistler JL. 2005. A heterodimer-selective agonist shows *in vivo* relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(25):9050-9055.
- Wang HL, Hsu CY, Huang PC, Kuo YL, Li AH, Yeh TH, Tso AS, Chen YL. 2005. Heterodimerization of opioid receptor-like 1 and mu-opioid receptors impairs the potency of micro receptor agonist. *J Neurochem* 92(6):1285-1294.
- Wang HY, Burns LH. 2006. Gbetagamma that interacts with adenylyl cyclase in opioid tolerance originates from a Gs protein. *J Neurobiol* 66(12):1302-1310.
- Wang HY, Burns LH. 2009. Naloxone's pentapeptide binding site on filamin A blocks Mu opioid receptor-Gs coupling and CREB activation of acute morphine. *PLoS One* 4(1):e4282.
- Wang JB, Johnson PS, Imai Y, Persico AM, Ozenberger BA, Eppler CM, Uhl GR. 1994a. cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Lett* 348(1):75-79.
- Wang JB, Johnson PS, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Uhl GR. 1994b. Human mu opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett* 338(2):217-222.
- Wang S, Wei Y, Chen G, Liu X, Jin H, Yan Z, Wu Q, Du H. 2009. Generation and utilization of anti-drug monoclonal antibodies for screening of 36 drug users by dot-ELISA. *Hybridoma (Larchmt)* 28(2):145-148.

- Wang Y, Gupta A, Toledo-Rodriguez M, Wu CZ, Markram H. 2002. Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 12(4):395-410.
- Wassenberg T, Willemsen MA, Geurtz PB, Lammens M, Verrijp K, Wilmer M, Lee WT, Wevers RA, Verbeek MM. 2010. Urinary dopamine in aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: the unsolved paradox. *Mol Genet Metab* 101(4):349-356.
- Weinstein DD, Spector S, Nanney LB, King LE, Jr. 2002. Endogenous opiate alkaloids and human skin. *J Invest Dermatol* 119(3):709-710.
- Weitz CJ, Faull KF, Goldstein A. 1987. Synthesis of the skeleton of the morphine molecule by mammalian liver. *Nature* 330(6149):674-677.
- Weitz CJ, Lowney LI, Faull KF, Feistner G, Goldstein A. 1986. Morphine and codeine from mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(24):9784-9788.
- Welch EB, Thompson DF. 1994. Opiate antagonists for the treatment of schizophrenia. *J Clin Pharm Ther* 19(5):279-283.
- West SM, Kannar D; 2005 No.: US2005/0089495 A1. Transdermal transport of compounds. AU.
- West SM, Kannar D; 2007 No.: US2007/0042999 A1. Phosphate derivatives of pharmaceutical products. AU.
- West SM, Verdicchio RJ, Kannar D; 2010 No.: US2010/0261670 A1. Complexes of phosphate derivatives. AU, US.
- Whitman SC, Hazen SL, Miller DB, Hegele RA, Heinecke JW, Huff MW. 1999. Modification of type III VLDL, their remnants, and VLDL from ApoE-knockout mice by p-hydroxyphenylacetaldehyde, a product of myeloperoxidase activity, causes marked cholesteryl ester accumulation in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(5):1238-1249.
- Wilding TJ, Womack MD, McCleskey EW. 1995. Fast, local signal transduction between the mu opioid receptor and Ca²⁺ channels. *J Neurosci* 15(5 Pt 2):4124-4132.
- Willis WD, Westlund KN. 1997. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* 14(1):2-31.
- Wilson RI, Nicoll RA. 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410(6828):588-592.
- Wimpey TL, Chavkin C. 1991. Opioids activate both an inward rectifier and a novel voltage-gated potassium conductance in the hippocampal formation. *Neuron* 6(2):281-289.
- Wollemann M, Benyhe S. 2004. Non-opioid actions of opioid peptides. *Life Sci* 75(3):257-270.
- Wonodi I, Adami H, Sherr J, Avila M, Hong LE, Thaker GK. 2004. Naltrexone treatment of tardive dyskinesia in patients with schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 24(4):441-445.
- Wood JD, Galligan JJ. 2004. Function of opioids in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 2:17-28.
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R. 2000. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80(3):1107-1213.
- Yamada H, Ishii K, Ishii Y, Ieiri I, Nishio S, Morioka T, Oguri K. 2003. Formation of highly analgesic morphine-6-glucuronide following physiologic concentration of morphine in human brain. *J Toxicol Sci* 28(5):395-401.
- Yang HY, Fratta W, Majane EA, Costa E. 1985. Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(22):7757-7761.
- Yang TT, Hung CF, Lee YJ, Su MJ, Wang SJ. 2004. Morphine inhibits glutamate exocytosis from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes) by reducing Ca²⁺ influx. *Synapse* 51(2):83-90.
- Yeh SY. 1974. Absence of evidence of biotransformation of morphine to codeine in man. *Experientia* 30(3):264-266.
- Yeh SY. 1975. Urinary excretion of morphine and its metabolites in morphine-dependent subjects. *J Pharmacol Exp Ther* 192(1):201-210.
- Yeh SY, Gorodetzky CW, Krebs HA. 1977a. Isolation and identification of morphine 3- and 6-glucuronides, morphine 3,6-diglucuronide, morphine 3-ethereal sulfate, normorphine, and normorphine 6-glucuronide as morphine metabolites in humans. *J Pharm Sci* 66(9):1288-1293.
- Yeh SY, Krebs HA, Gorodetzky CW. 1979. Isolation and identification of morphine n-oxide alpha- and beta-dihydromorphines, beta- or gamma-isomorphine, and hydroxylated morphine as morphine metabolites in several mammalian species. *J Pharm Sci* 68(2):133-140.

- Yeh SY, McQuinn RL, Gorodetzky CW. 1977b. Biotransformation of morphine to dihydromorphinone and normorphine in the mouse, rat, rabbit, guinea pig, cat, dog, and monkey. *Drug Metab Dispos* 5(4):335-342.
- Yoshida S, Ohta J, Yamasaki K, Kamei H, Harada Y, Yahara T, Kaibara A, Ozaki K, Tajiri T, Shirouzu K. 2000. Effect of surgical stress on endogenous morphine and cytokine levels in the plasma after laparoscopic or open cholecystectomy. *Surg Endosc* 14(2):137-140.
- Zadina JE. 2002. Isolation and distribution of endomorphins in the central nervous system. *Jpn J Pharmacol* 89(3):203-208.
- Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. 1997. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386(6624):499-502.
- Zeng YS, Nie JH, Zhang W, Chen SJ, Wu W. 2007. Morphine acts *via* mu-opioid receptors to enhance spinal regeneration and synaptic reconstruction of primary afferent fibers injured by sciatic nerve crush. *Brain Res* 1130(1):108-113.
- Zhang Y, Pan YX, Kolesnikov Y, Pasternak GW. 2006. Immunohistochemical labeling of the mu opioid receptor carboxy terminal splice variant mMOR-1B4 in the mouse central nervous system. *Brain Res* 1099(1):33-43.
- Zhang Z, Pan ZZ. 2010. Synaptic mechanism for functional synergism between delta- and mu-opioid receptors. *J Neurosci* 30(13):4735-4745.
- Zhu W. 2008. CYP2D6: a key enzyme in morphine synthesis in animals. *Med Sci Monit* 14(11):SC15-18.
- Zhu W, Baggerman G, Goumon Y, Casares F, Brownawell B, Stefano GB. 2001a. Presence of morphine and morphine-6-glucuronide in the marine mollusk *Mytilus edulis* ganglia determined by GC/MS and Q-TOF-MS. Starvation increases opiate alkaloid levels. *Brain Res Mol Brain Res* 88(1-2):155-160.
- Zhu W, Baggerman G, Secor WE, Casares F, Pryor SC, Fricchione GL, Ruiz-Tiben E, Eberhard ML, Bimi L, Stefano GB. 2002. *Dracunculus medinensis* and *Schistosoma mansoni* contain opiate alkaloids. *Ann Trop Med Parasitol* 96(3):309-316.
- Zhu W, Bilfinger TV, Baggerman G, Goumon Y, Stefano GB. 2001b. Presence of endogenous morphine and morphine 6 glucuronide in human heart tissue. *Int J Mol Med* 7(4):419-422.
- Zhu W, Cadet P, Baggerman G, Mantione KJ, Stefano GB. 2005. Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation. *J Immunol* 175(11):7357-7362.
- Zhu W, Esch T, Kream RM, Stefano GB. 2008. Converging cellular processes for substances of abuse: endogenous morphine. *Neuro Endocrinol Lett* 29(1):63-66.
- Zhu W, Ma Y, Bell A, Esch T, Guarna M, Bilfinger TV, Bianchi E, Stefano GB. 2004. Presence of morphine in rat amygdala: evidence for the mu3 opiate receptor subtype *via* nitric oxide release in limbic structures. *Med Sci Monit* 10(12):BR433-439.
- Zhu W, Mantione KJ, Casares FM, Cadet P, Kim JW, Bilfinger TV, Kream RM, Khalil S, Singh S, Stefano GB. 2006a. Alcohol-, nicotine-, and cocaine-evoked release of morphine from invertebrate ganglia: model system for screening drugs of abuse. *Med Sci Monit* 12(5):BR155-161.
- Zhu W, Mantione KJ, Shen L, Lee B, Stefano GB. 2006b. Norlaudanosoline and nicotine increase endogenous ganglionic morphine levels: nicotine addiction. *Cell Mol Neurobiol* 26(4-6):1037-1045.
- Ziegler J, Diaz-Chavez ML, Kramell R, Ammer C, Kutchan TM. 2005. Comparative macroarray analysis of morphine containing *Papaver somniferum* and eight morphine free *Papaver* species identifies an O-methyltransferase involved in benzyloquinoline biosynthesis. *Planta* 222(3):458-471.
- Ziegler J, Facchini PJ, Geissler R, Schmidt J, Ammer C, Kramell R, Voigtlander S, Gesell A, Pienkny S, Brandt W. 2009. Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry* 70(15-16):1696-1707.
- Zietse R, van der Lubbe N, Hoorn EJ. 2009. Current and future treatment options in SIADH. *NDT Plus* 2(Suppl_3):iii12-iii19.

RÉSUMÉ

C'est au milieu des années 80 que la morphine endogène (ME), ayant une structure identique à la morphine produite par le pavot, a été détectée dans le système nerveux central (SNC) de mammifères. En 2005, la voie de synthèse de la ME est décrite pour la première fois chez les mammifères. Celle-ci suit en grande partie celle des plantes, et dérive de la voie de synthèse de la dopamine, un neurotransmetteur impliqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques au sein du SNC. Actuellement, très peu d'équipes étudient cet opiacé endogène et les processus physiologiques ou pathologiques dans lesquels la ME pourrait-être impliquée. Déterminer les rôles de la ME au sein du SNC est ainsi difficile puisqu'il existe très peu de données la concernant. En effet, qu'il s'agisse de sa localisation cellulaire, de modèles d'études ou encore des protocoles de détection ou de quantification, il y a un manque d'outils d'étude de la ME. Lors de ma thèse, je me suis fixé comme objectifs de fournir des outils et des bases permettant l'étude et la compréhension des rôles de la ME au sein du SNC à l'aide d'approches d'immunologie, de biologie cellulaire et de biochimie. Ce manuscrit décrit les travaux réalisés pendant mes trois années de thèse ; les résultats obtenus se décomposent en trois parties.

La première partie de mes résultats décrit la localisation de la ME au sein du SNC de souris adulte. Après avoir effectué une caractérisation complète de l'anticorps anti-morphine utilisé, j'ai montré la présence de ME et de ses dérivés dans des neurones et astrocytes à travers tout le SNC. De manière intéressante, la ME et ses dérivés sont retrouvés principalement dans des interneurons GABAergiques alors qu'ils sont absents des neurones dopaminergiques. Par ailleurs, la ME et ses dérivés, en plus d'être présents dans des structures impliquées dans le contrôle de la douleur, sont également retrouvés dans des structures impliquées dans la mémorisation ou le contrôle de la motricité.

La seconde partie de mes résultats présente deux études mettant en évidence deux protéines de liaison aux alcaloïdes endogènes et exogènes. Dans la première étude, nous avons décrit par une approche de spectrométrie de masse non covalente que la PEBP (PhosphatidylEthanolamine Binding Protein) était capable de lier la M6G et la M3G de la même manière qu'elle lie la PE (PhosphatidylEthanolamine), son ligand de référence. Dans la seconde étude, j'ai mis en évidence que la créatine kinase (CK) musculaire et cérébrale est capable de lier à haute affinité (résistante à la migration sur gel SDS-PAGE) la ME ou l'un de ses dérivés. Ce complexe morphine-CK est dissociable suite à une dénaturation thermique, uniquement en présence d'urée, mais également par un traitement au lithium.

La dernière partie de mes résultats, sur la base des résultats obtenus dans la seconde partie, montre que l'utilisation du lithium lors de prélèvements sanguins permet d'augmenter jusqu'à quatre fois le rendement de détection de la morphine endogène.

Pour conclure, pendant mes trois ans de thèse j'ai développé de nouveaux outils permettant l'étude et la compréhension des rôles de la morphine endogène au sein du SNC (cartographie, protéine de liaison, amélioration de la quantification). Mes données, en plus d'être des outils, apportent également de nombreuses pistes de recherches quant aux rôles et aux modes d'actions possibles des alcaloïdes endogènes au sein du SNC.