

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR-3212

THÈSE présentée par : Marion GABORIT

soutenue le : 06 septembre 2023

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Neurosciences

Douleur neuropathique, récepteurs opioïdes et cannabidiol

THÈSE dirigée par :

Mme. MASSOTTE Dominique Directeur de recherches, Université de Strasbourg, INCI

RAPPORTEURS :

M. LINGUEGLIA Eric Directeur de recherches, Université Côte d'Azur, IPMC

M. MARIE Nicolas Chargé de recherches, Université Paris Cité, T3S

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme. BEFORT Katia Chargé de recherches, Université de Strasbourg, LNCA

INVITES

M. GOUMON Yannick Chargé de recherches, Université de Strasbourg, INCI

Avant-Propos	7
Remerciement	9
Abréviations.....	11
Introduction	15
Partie 1 : Douleur.....	17
I. La douleur physiologique	17
1. Classification des types de douleurs	18
2. Le système nociceptif	19
3. Inflammation.....	28
II. Douleurs chroniques	29
1. Définition	29
2. Prévalence	30
3. Conséquences et poids économique.....	31
4. Classification.....	32
III. Douleurs neuropathiques	33
1. Définition et classification	33
2. Prévalence	34
3. Manifestations cliniques	35
4. Comorbidités.....	36
5. Mécanismes moléculaires et cellulaires.....	36
6. Traitements	39
7. Modèles animaux	40
Partie 2 : Système opioïde	43
I. Généralités	43
II. Les récepteurs opioïdes	45
III. Les peptides opioïdes endogènes	47
1. Pro-enkephaline	48
2. Pro-dynorphine	49
3. Pro-opiomélanocortine.....	49
4. Distribution	50
IV. Signalisation et trafic intracellulaire	51
1. Signalisation liée aux protéines G.....	51
2. Désensibilisation et internalisation	52
V. Distribution au sein du système nerveux.....	54

1.	Les récepteurs μ et δ dans le circuit de la douleur	54
2.	Les récepteurs μ et δ dans les contrôles descendants	56
VI.	Récepteur δ , douleurs chroniques et comorbidités	58
VII.	Interactions entre récepteurs opioïdes	59
3.	Les Hétéromères μ - δ	60
4.	Hétéromères δ -CB1	62
Partie 3 : Cannabidiol		65
I.	Les phytocannabinoïdes	66
1.	Origine	66
2.	Diversité	67
3.	Synthèse	67
II.	Le cannabidiol	68
1.	Pharmacocinétique	68
2.	Cibles moléculaires du CBD	69
3.	Le système opioïde	73
4.	Les autres cibles du CBD	73
III.	Le CBD dans la douleur neuropathique et ses comorbidités	76
1.	Etudes cliniques	76
2.	Etudes précliniques	76
Travail de thèse		83
Matériel et méthodes		85
I.	Modèles animaux	87
1.	Animaux	87
2.	Lignées génétiquement modifiées	87
3.	Modèles de douleur neuropathique	88
II.	Protocoles expérimentaux et test comportementaux	90
1.	Protocoles expérimentaux et décours temporels	90
2.	Modalités de traitement	91
3.	Test comportementaux	91
III.	Prélèvement et conditionnement des tissus	95
1.	Ponction intracardiaque et récupération des tissus frais	95
2.	Perfusion intracardiaque et récupération de tissus fixés	96
IV.	Neuroinflammation : dosage et détection de protéines	97
1.	Homogénéisation des tissus	97
2.	Dosage des protéines par la méthode de Bradford	97

3.	Kit d'analyse de cytokines	97
4.	Acquisition et analyse d'images	97
V.	Culture cellulaire et cinétique d'internalisation des récepteurs.....	98
1.	Préparation des plaques de cultures	98
2.	Dissection.....	98
3.	Digestion.....	98
4.	Ensemencement	98
5.	Cinétiques d'internalisation	99
VI.	Immunomarquage en coupe flottante.....	100
1.	Immunohistochimie sur coupes fines de cerveau et de DRGs.....	100
2.	Immunocytochimie sur culture cellulaire	100
VII.	Acquisition des images de fluorescence	101
1.	Coupes fines de cerveaux et DRGs.....	101
2.	Culture cellulaire.....	101
VIII.	Analyse des résultats et statistiques	101
1.	Comportement.....	102
2.	Neuroinflammation	102
3.	Neuroanatomie.....	102
4.	Culture cellulaire.....	103
	Resultats.....	104
	Chapitre I :	105
	Chapitre II :	141
I.	Introduction	141
II.	Résultats.....	143
1.	Effet de l'administration aiguë de CBD sur la sensibilité mécanique de souris neuropathiques	143
2.	Effet de l'administration répétée de CBD sur la sensibilité mécanique	144
III.	Discussion	155
IV.	Informations supplémentaires	161
	Chapitre III :	167
I.	Introduction	167
II.	Matériel et méthodes	169
1.	Animaux.....	169
2.	Modèle de douleur neuropathique	169
3.	Évaluation de l'allodynie mécanique	169

4.	Préparation des tissus et immunohistochimie	170
5.	Acquisition et analyse d'images	170
6.	Analyse statistique	171
III.	Résultats	172
1.	Développement de l'allodynie mécanique en condition neuropathique	172
2.	Co-expression neuronale δ -CB1 en condition contrôle et neuropathique	173
3.	Co-expression neuronale δ -CB1 dans la RVM.....	175
IV.	Discussion	177
Chapitre IV :		181
I.	Introduction	181
II.	Matériel et Méthodes	183
1.	Animaux.....	183
2.	Culture cellulaire.....	183
3.	Cinétiques d'internalisation	184
4.	Immunocytochimie	185
5.	Acquisition d'images	185
III.	Résultats.....	186
1.	Distribution subcellulaire des récepteurs δ à l'état basal.....	186
2.	Distribution subcellulaire des récepteurs CB1 à l'état basal	186
3.	Modification de la distribution des récepteurs δ par les ligands.....	187
4.	Modification de la distribution des récepteurs CB1 par les ligands	188
5.	Effet du CBD sur le trafic intracellulaire des récepteurs δ et CB1	190
IV.	Discussion	191
V.	Informations supplémentaires.....	194
Conclusion générale		199
Perspectives		201
Annexes		211
Revue 1		217
Revue 2.....		229
Article		251
Références bibliographiques.....		269

AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse a été financé par la fondation de l'Université de Strasbourg pendant les trois premières années. Le financement de la 4^{ème} année a été permis grâce à L'Ecole Universitaire de Recherche Interdisciplinaire sur la DOuLeur (EURIDOL - ANR-17-EURE-0022) dans le cadre du Dispositif COVID visant à soutenir les travaux de thèse ayant été impactés par la crise sanitaire en 2020, mais aussi grâce à l'ITI Neurostra.

Ce travail a donné lieu à la publication de deux revues de la littérature disponibles en annexe. En parallèle de mon projet, une collaboration sur le potentiel neurotoxique d'une mycotoxine, le déoxynivalénol a mené à la publication d'un article original lui aussi disponible en annexe.

Mon travail de thèse en lui-même devrait mener à la publication d'un article, présenté en chapitre I. Par ailleurs les données présentées en chapitre III devraient elles aussi mener à une publication.

REMERCIEMENT

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé sous la direction du Dr. Dominique Massotte dans l'équipe « Neuroanatomie, douleur, et psychopathologies » dirigée par Michel Barrot et Ipek Yalcin, pendant les trois premières années, puis dans l'équipe « Signalisation nociceptive dans la moelle épinière » dirigée par Rémi Schlichter et Dominique Massotte, pendant la quatrième année.

Tout d'abord je remercie les membres du jury Eric Lingueglia, Nicolas Marie et Katia Befort d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, en dépit de l'attrait de lectures estivales plus divertissantes. Merci pour votre temps, j'espère que vous apprécierez la lecture de ce manuscrit.

Domi, merci de m'avoir permis d'effectuer cette thèse à l'INCI. Que je reste dans la science ou pas, ces 4 années auront été très importantes pour moi et très formatrices. Merci d'avoir toujours été là quand j'en avais besoin et d'avoir toujours fait ton maximum pour m'aider et me soutenir.

Merci à Katia et Yannick, d'avoir veillé au bon déroulement de ma thèse lors des réunions de CST (officielles ou improvisées). Merci pour vos conseils et votre soutien. Merci également à Perrine et Sylvain, même si ce fut bref j'ai apprécié nos petits moments de discussion pendant la phase de rédaction.

Merci à toutes les personnes sans qui ce travail n'aurait pas pu être effectué, la plateforme comptOpt (Mélanie, Quentin, Noémie) qui a réalisé une partie des chirurgies et test comportementaux, Stéphane Doridot qui gère méticuleusement nos lignées, Perrine Inquimbert pour toute la partie SNI et Coline Sagot pour m'avoir aidé le temps de son stage sur l'avancement du projet. Merci également aux personnes de l'ombre qui ont aidé à régler bien des problèmes, le PAF (Julie, Cédric, Guillaume), le chronobiotron (Antoine (Grand maître de ENOS), Sophie, Dom, Noémie, Cynthia), Denis, Christophe, et tous les autres.

Merci aussi aux personnes qui ont rendu mon doctorat si formateur en prenant bien soin de me rendre la tâche difficile. Si on apprend mieux dans l'adversité, j'ai beaucoup appris.

Et surtout, merci à tous les amis qui ont égayé mes journées depuis l'entrée en M1 jusqu'à aujourd'hui : Angel, Souverain suprême de la joie de vivre, des défis intrépides et des tu préfères ; Toto, frère d'IDSN, coloc de confinement, nouveau voisin et maître en panzer kunst ;

Sarah, Maitresse incontestée du tricot et des asana (surtout celle du lion) ; Loulou, Grand Gourou de la contrée, des blagues subtiles et des tisanes ; Jamille, Gardienne des secrets ancestraux et Grande oracle sacrée des plantes, d'Instagram et des pauses cafés ; Jarod, Souverain suprême des tâches et des punaises ; Jean--tienne Guide éclairé des Ames éco-terroristes et grand instigateur de révolte ; Jarin, Barde suprême des contrées méridionales et grand maitre des maladresses facétieuses ; Robin Noble Gardien des Lapins et de la ponctuation ; Karim Grand Saint Patron des Baileys ; Tatin Grand chef spirituel des petits indiens. Merci pour tous les merveilleux moments de rires, d'ivresse, de discussion plus ou moins engagées, qu'on a passé ensemble et pour votre soutien dans les moments de déprime. J'ai hâte, de pouvoir fêter la fin de ma thèse avec vous tous.

Dédicace spéciale à Jamille, merci de m'avoir fait rencontrer, Bruce, Rosie, Kazu (paix à son âme), Paupiette, Francis, les wombats du mercredi, les milles autres dont j'ai oublié le nom et surtout bébé Léo (~~le plus beau~~). Merci pour les vendredi blind tests, pour les pauses café, pour avoir tempéré mes mails un peu trop passionnés, pour m'avoir transmis ton amour des plantes, et pour avoir été la voisine de bureau la plus merveilleuse du monde <3.

Angel-san, le mot merci à l'air bien vide de sens au vue de tout ce que je te dois. Sans toi je ne sais pas si j'aurais réussi à aller aussi loin, tu m'as aidé et soutenu depuis le master jusqu'à aujourd'hui. Merci pour ton enthousiasme a toute épreuve, ton soutien indéfectible, et pour tout le temps qu'on a passé ensemble. Il me tarde de continuer la route avec toi.

ABBREVIATIONS

- 5HT₁** : Serotonin type 1 receptor (Récepteur de type 1 à la sérotonine)
- 5HT_{2A}** : Serotonin type 2A receptor (Récepteur de type 2A à la sérotonine)
- 5HT₃** : Serotonin type 3 receptor (Récepteur de type 3 à la sérotonine)
- 7N** : Facial nerve nucleus (Noyau du nerf facial)
- A_{1A}** : Adrenergic receptor 1A (Récepteur adrénergique 1A)
- A_{2A}** : Adrenergic receptor 2A (Récepteur adrénergique 2A)
- AANAT** : Aralkylamine N-acetyltransferase (Aralkylamine N-acétyltransférase)
- AChE** : Acetylcholinesterase (Acétylcholinestérase)
- AEA** : Anandamide (N-arachidonoyléthanolamide)
- AMP** : Adenosine monophosphate (Adénosine monophosphate)
- AP2** : Adaptor protein 2 (Protéine adaptatrice 2)
- BB2** : Bombesin type 2 receptor (Récepteur à la bombésine de type 2)
- BChE** : Butyrylcholinesterase (Butyrylcholinestérase)
- CA1/3** : Ammon's horn region 1/3 (Corne d'Ammon région 1/3)
- CaMKII** : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (Protéine kinase dépendante du calcium/calmoduline de type II)
- CAT** : Central acoustic tract nucleus (Noyau du tractus acoustique central)
- CB1** : Cannabinoid receptor type 1 (Récepteur cannabinoïde de type 1)
- CB2** : Cannabinoid receptor type 2 (Récepteur cannabinoïde de type 2)
- CBD** : Cannabidiol (Cannabidiol)
- CCI** : Chronic constriction injury (Lésion par constriction chronique)
- CCR5** : C-C chemokine receptor type 5 (Récepteur à C-C chimiokine de type 5)
- CDC** : Centers for Disease Control and Prevention (Centres de contrôle et de prévention des maladies)
- CGRP** : Calcitonin gene-related peptide (Peptide relié au gène de la calcitonine)
- CINP** : Chemotherapy-induced neuropathic pain (Douleur neuropathique induite par la chimiothérapie)
- DR** : Dorsal raphe nucleus (Noyau du raphé dorsal)
- DRG** : Dorsal root ganglia (Ganglions rachidiens)
- DRt** : Dorsal reticular nucleus (Noyau réticulaire dorsal)

DSM-5 : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition (Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, 5e édition)

ECIC : External cortex of the inferior colliculus (Cortex externe du colliculus inférieur)

ED50 : Effective Dose 50 (Dose efficace 50)

eGFP : Enhanced green fluorescent protein (Protéine fluorescente verte améliorée)

ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinases 1/2 (Kinases régulées par les signaux extracellulaires 1/2)

Eve : Vestibular nerve efferent nucleus (Noyau d'origine des efférences du nerf vestibulaire)

GABA : Gamma-Aminobutyric Acid (Acide γ -aminobutyrique)

GAL-1 : Galanin receptor 1 (Récepteur à la galanine 1)

GDP : Guanosine diphosphate (Guanosine diphosphate)

Gi : Gigantocellular reticular nucleus (Noyau réticulaire gigantocellulaire)

GlyR : Glycine receptor (Récepteur à la glycine)

GPR : G-protein-coupled receptor (Récepteur couplé aux protéines G, appellation des récepteurs orphelins)

GRK : G-protein-coupled receptor kinases (Kinases des récepteurs couplés aux protéines G)

GTP : Guanosine triphosphate (Guanosine triphosphate)

IASP : International Association for the Study of Pain (Association internationale pour l'étude de la douleur)

IB4 : Isolectin B4 (Isolectine B4)

ICD-11 : International Classification of Diseases, 11th Edition (Classification internationale des maladies, 11e édition)

IFN γ : Interferon gamma (Interféron gamma)

IL : Interleukins (Interleukines)

Int : Interposed cerebellar nucleus (Noyau cérébelleux interposé)

K2P : Two-pore domain potassium channel (Canal potassique à domaine à deux pores)

K_{IR3} : Inward rectifier potassium channel 3 (Canal potassique rectifiant vers l'intérieur 3)

KO : Knock-out (Animal *knock-out*)

Kv : Voltage-gated potassium channel (Canal potassique activé par le voltage)

Lat : Lateral dentate cerebellar nucleus (Noyau cérébelleux denté latéral)

LC : Locus coeruleus (Locus cœruleus)

LENK / Leu-enk : Leu-enkephalin (Leu-enképhaline)

LL : Lateral lemniscus (Lémnisque latéral)

LPGi : Lateral paragigantocellular nucleus (Noyau latéral paragigantocellulaire)

MAPK : Mitogen-activated protein kinase (Protéine kinase activée par les signaux mitogènes)

Med : Medial cerebellar nucleus (Noyau cérébelleux médian)

MENK/Met-enk : Met-enkephalin (Met-enképhaline)

MnR : Median raphe nucleus (Noyau du raphé médian)

MS : Median septum (Septum médian)

Nav : Voltage-gated sodium channel (Canal sodium activé par le voltage)

NF200 : Neurofilament 200 (Neurofilament 200)

NFκB : Nuclear factor kappa B (Facteur nucléaire kappa B)

NGF : Nerve growth factor (Facteur de croissance des nerf)

NMDA : N-Methyl-D-aspartate (N-Méthyl-D-aspartate)

NOP : Nociceptin/orphanin FQ opioid receptor (Récepteur opioïdes à la nociceptin/orphanine FQ)

OIH : Opioid-induced hyperalgesia (Hyperalgésie induite par les opioïdes)

OMS : World Health Organization (Organisation mondiale de la santé)

P2X3 : Purinergic receptor P2X3 (Récepteur purinergique P2X3)

PAG : Periaqueductal gray (Substance grise périaqueducule)

PBP : Pigmented parabrachial nucleus of the VTA (Noyau pigmenté parabrachial de la VTA)

PcRtA : Parvocellular reticular nucleus pars alpha (Partie alpha du noyau réticulé parvocellulaire)

Pir : Piriform cortex (Cortex piriforme)

PKA : Protein kinase A (Protéine kinase A)

PKC : Protein kinase C (Protéine kinase C)

PnC : Caudal pontine reticular nucleus (Noyau réticulaire pontin, partie caudale)

PnO : Oral pontine reticular nucleus (Noyau réticulaire pontin, partie orale)

POMC : Pro-opiomelanocortin (Pro-opiomélanocortine)

PPARγ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes)

Pr5 : Principal sensory trigeminal nucleus (Noyau principal sensoriel du trijumeau)

pSNL : Partial sciatic nerve ligation (Ligature partielle du nerf sciatique)

Ptg : Pediculotegmental nucleus (Noyau pédiculotegmental)

RCPG : G-protein-coupled receptor (Récepteur couplé aux protéines G)

RMC : Magnocellular red nucleus (Noyau rouge, partie magnocellulaire)

RMg : Raphe magnus nucleus (Noyau du raphé magnus)

RtTg : Reticulotegmental nucleus of the pons (Noyau réticulotegmental du pont)

RVM : Rostral ventromedial medulla (Bulbe rachidien rostral ventromédian)

SC : spinal cord (moelle épinière)

SCI : Spinal cord injury (Lésion de la moelle épinière)

SNI : Spared nerve injury (Lésion du nerf « épargné »)

SNL : sciatic nerve ligation (Ligature du nerf sciatique)

SP : Substance P (Substance P)

Sp5 : Spinal trigeminal nucleus (Noyau trigéminal spinal)

Sp5c : Caudal spinal trigeminal nucleus (Noyau trigéminal spinal, partie caudale)

SPO : Superior paraolivary nucleus (Noyau supérieur paraolivaire)

THC : Δ 9-Tetrahydrocannabinol (Δ 9-Tétrahydrocannabinol)

TM : Transmembrane domain (domaine transmembranaire)

TNF α : Tumor necrosis factor alpha (Facteur de nécrose tumorale alpha)

TRPA : Transient receptor potential ankyrin (Récepteur à potentiel transitoire à Ankyrine)

TRPM : Transient receptor potential melastatin (Récepteur à potentiel transitoire à Melastatine)

TRPV : Transient receptor potential vanilloid (Récepteur à potentiel transitoire Vanilloïde)

Tz : Trapezoid body nucleus (Noyau du corps trapézoïde)

UGT : UDP-glucuronosyltransferase (UDP-glucuronosyltransférase)

VCA : Ventral cochlear nucleus (Noyau cochléaire ventral)

VDAC-1 : Voltage-dependent anion channel 1 (Canal anionique dépendant du voltage 1)

VDB : Vertical limb of the diagonal band of Broca nucleus (Noyau de la branche vertical de la bande diagonale de Broca)

Ve : Vestibular nucleus (Noyau vestibulaire)

VGCC : Voltage-gated calcium channel (Canal calcium activé par le voltage)

VIH : Human immunodeficiency virus (Virus de l'immunodéficience humaine)

VTAR : Ventral tegmental area rostral part (Aire tegmentale ventrale, partie rostrale)

α 7-nACh : Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor (Récepteur nicotinique à l'acétylcholine alpha 7)

δ : Delta opioid receptor (Récepteur opioïde delta)

κ : Kappa opioid receptor (Récepteur opioïde kappa)

μ : Mu opioid receptor (Récepteur opioïde mu)

INTRODUCTION

PARTIE 1 : DOULEUR

I. La douleur physiologique



Figure 1: Message préventif de la RATP, montrant Serge le lapin ressentant une vive douleur due à un pincement (*stimulus nociceptif*).

La douleur est définie par l'association internationale pour l'étude de la douleur (**IASP**) comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à, ou ressemblant à celle associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle (Raja *et al.*, 2020). Traditionnellement on distingue 3 composantes à la douleur: sensori-discriminative (intensité, localisation, durée, modalité), motivationnelle / émotionnelle (aspect aversif, désagréable, pénible) et cognitive (sens, interprétation ; (Melzack & Casey, 1968). La douleur est une expérience personnelle, très variable d'un individu à l'autre, et qui est influencée à des degrés divers par des facteurs biologiques (la diversité génétique, l'âge, le sexe), psychologiques (l'humeur, les attentes, l'attention, le stress, les émotions), et sociaux (l'environnement social, la culture, la classe sociale, le genre) (Fillingim, 2017).

La douleur est l'interprétation consciente de l'information nociceptive. La nociception est définie comme le processus neural d'encodage des stimuli nociceptifs, c'est-à-dire dommageables ou menaçant d'endommager les tissus de l'organisme (Loeser & Treede, 2008). Ainsi, la nociception comprend les processus de détection, transduction, encodage et transmission du message nociceptif du site d'origine vers les structures cérébrales supérieures où ces informations pourront être interprétées ou non comme douloureuses.

1. Classification des types de douleurs

Une des classifications les plus communes des types de douleur se base sur leur physiopathologie : les douleurs peuvent alors être nociceptives, neuropathiques ou nociplastiques. Les douleurs nociceptives sont des douleurs résultant d'une lésion avérée ou menaçant de l'être, d'un tissu non nerveux et résulte de l'activation des nocicepteurs. Ce terme décrit généralement des douleurs résultant de l'activation du système nerveux somatosensoriel, réseau de structures neuronales impliqué dans la perception haptique, la proprioception, la thermoception mais aussi la nociception. Les douleurs neuropathiques, quant à elles, sont définies comme des douleurs causées par une lésion ou une maladie du système nerveux somatosensoriel (Trouvin & Perrot, 2019). Cependant, ces deux termes laissant de côté de nombreux patients éprouvant des douleurs sans activation évidente des nocicepteurs ni lésion ou maladie du système nerveux, le concept de douleurs nociplastiques a été développé. Ainsi, les douleurs nociplastiques résultent d'une altération de la nociception malgré l'absence de preuve d'une lésion tissulaire réelle ou potentielle entraînant l'activation des nocicepteurs périphériques, ou de preuve d'une maladie ou d'une lésion du système somatosensoriel à l'origine des douleurs (i.e. Fibromyalgie).

Une autre classification usuelle se base sur la durée des symptômes douloureux. Ainsi, des douleurs de courte durée seront considérées comme aiguës et des douleurs dont les symptômes douloureux persistent au-delà de 3 mois seront considérées comme des douleurs chroniques (Merskey & Bogduk, 1994).

A noter qu'il existe d'autres classifications qui reposent sur la localisation anatomique des douleurs, leurs étiologies ou encore leurs intensités (Orr *et al.*, 2017).

2. Le système nociceptif

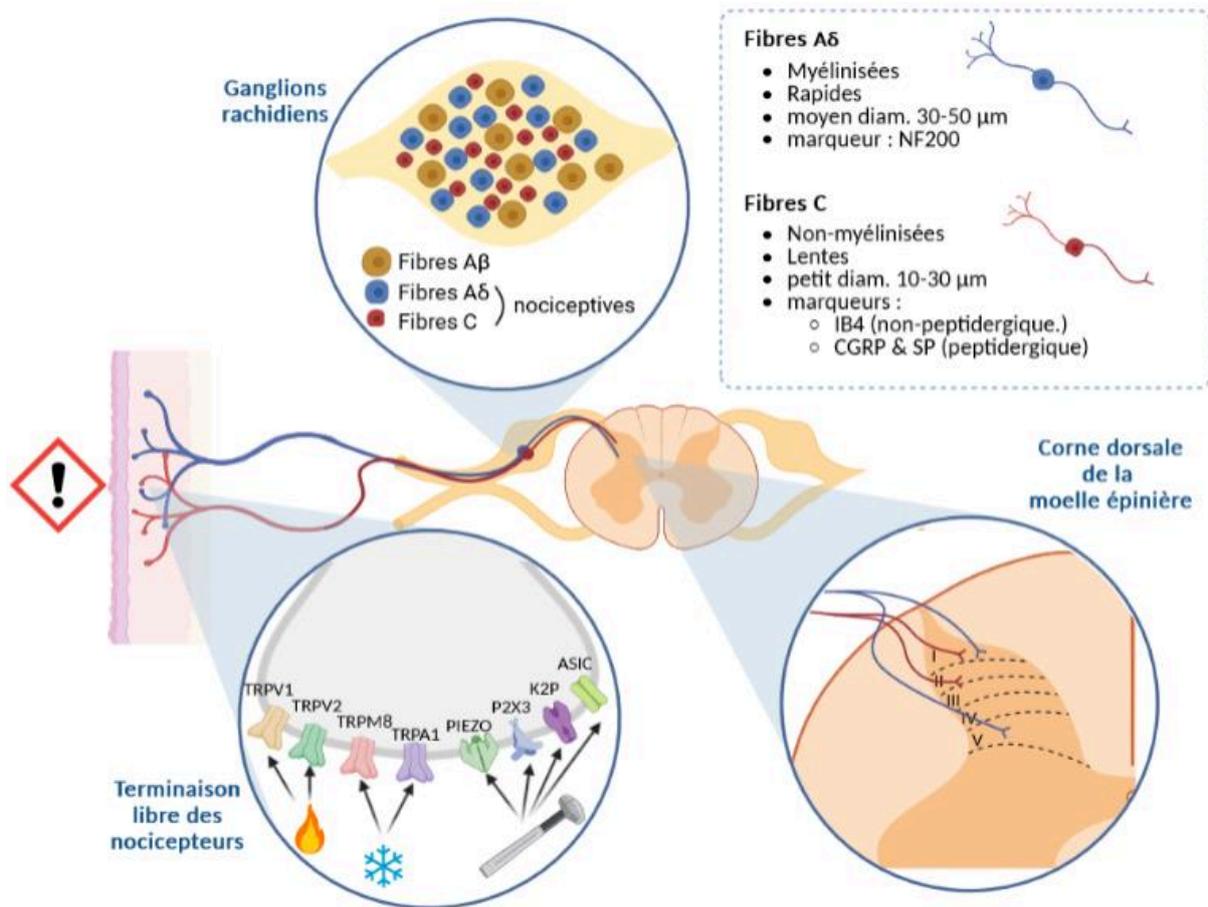


Figure 2: Schéma général illustrant la détection d'un stimulus nociceptif et la transduction du signal nociceptif par les fibres afférentes primaires de la périphérie vers la corne dorsale de la moelle épinière. Les différentes étapes sont détaillées dans les paragraphes ci-dessous.

Une des fonctions vitales de l'organisme est de traiter les informations relatives à l'imminence d'une lésion afin d'éviter la survenue d'une telle lésion. Le système nociceptif, permet la détection, la transmission et le traitement des informations nociceptives préjudiciables ou potentiellement préjudiciables pour l'organisme. Les nocicepteurs (Sherrington, 1906) sont les fibres spécialisées qui vont détecter les stimuli nociceptifs grâce aux différents récepteurs exprimés par leurs terminaisons libres présentes dans la peau mais aussi les muscles, les organes internes ou encore les articulations. Ils peuvent être activés par 3 modalités de stimuli : mécanique, thermique et chimique. Ces fibres sont portées par des neurones en T de type pseudo-unipolaire dont les corps cellulaires sont situés dans les ganglions rachidiens (DRG, *dorsal root ganglion*). A la suite de la détection d'un stimulus nociceptif, les fibres afférentes primaires, systématiquement excitatrices, transmettent le

message à la corne dorsale de la moelle épinière, premier lieu d'intégration de l'information nociceptive (McMahon & Koltzenburg, 2006).

A. Nocicepteurs et fibres afférentes primaires

Les nocicepteurs se différencient en deux groupes. Tout d'abord, les fibres A δ myélinisées, de diamètre moyen et traditionnellement considérées comme transmettant une première sensation de douleur, rapide et bien localisée. La présence de myéline est associée à une vitesse de conduction du signal électrique plus rapide. D'un point de vue fonctionnel, les fibres A δ peuvent être subdivisées en deux groupes. Les fibres **A δ de type I** répondent aux stimuli mécaniques et chimiques à des seuils modérés et aux stimuli thermiques au chaud avec des seuils de détection très élevés (>53°C). Les fibres **A δ de type II** ont un seuil de détection de la chaleur plus bas (>46°C) et un seuil de détection des stimuli mécaniques très haut (Basbaum *et al.*, 2009). Par ailleurs, certaines fibres A δ sont aussi activées par des stimuli thermiques et nociceptifs froids (Cain *et al.*, 2001).

Le deuxième grand groupe de fibres nociceptives correspond aux fibres C non-myélinisées de faible diamètre qui transmettent une sensation de douleur plus lente, diffuse et persistante. Ces fibres sont pour la plupart polymodales, c'est-à-dire qu'elles répondent aux stimuli mécaniques, thermiques chauds et froids ainsi que chimiques. Les fibres C peuvent aussi être divisées en deux sous populations, cette fois-ci d'un point de vue neurochimique. Une population de fibres C peptidergiques exprime le peptide lié au gène de la calcitonine (**CGRP**), et la substance P (**SP**). Une population de fibres C non-peptidergiques est caractérisée par sa liaison à l'isolectine B4 (**IB4**) du fait d'une forte teneur en α -D galactose (Fullmer *et al.*, 2004). Il convient de souligner que toutes les fibres C ne sont pas nociceptives. Certaines relayent les informations liées aux démangeaisons et d'autres, les fibres C-LTMR (*low threshold mechanical receptor*), sont impliquées dans la transduction des sensations tactiles légères (Bell 2018). Par ailleurs, les fibres A β fortement myélinisées et essentiellement impliquées dans la transduction de signaux sensoriels non nociceptifs auraient, pour certaines, des caractéristiques similaires aux fibres A δ de type I et pourraient être impliquées dans la douleur chronique (Djoughri & Lawson, 2004).

B. Récepteurs et canaux : Détection du message nociceptif

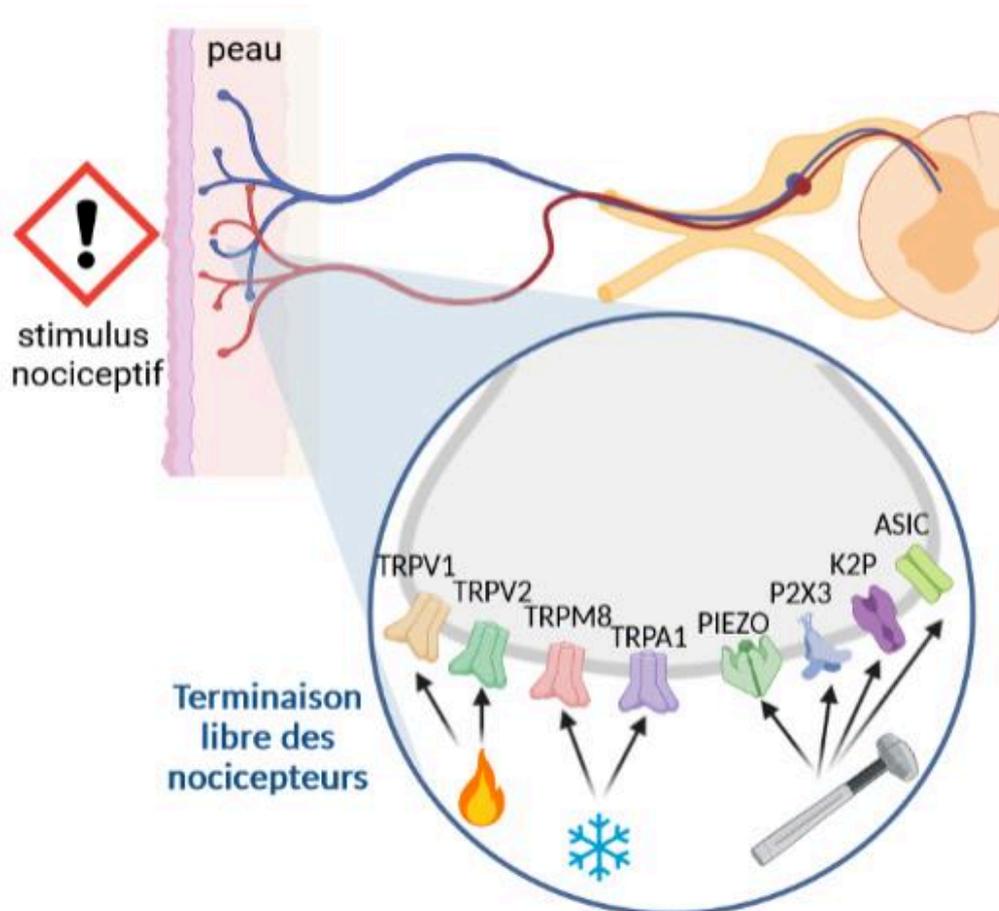


Figure 3: Schéma illustrant la détection d'un stimulus nociceptif par les nocicepteurs, les différents récepteurs impliqués dans cette détection et les modalités qu'ils détectent.

Les stimuli nociceptifs au chaud sont détectés principalement des canaux de la famille des TRP (*Transient Receptor Potential*), plus particulièrement par le récepteur **TRPV** (Vanilloïde) 1 qui est activé par des températures supérieures à 43°C mais aussi par la capsaïcine qui donne la sensation de chaleur lorsqu'on mange du piment. Le récepteur TRPV1 est exprimé dans la majorité des fibres nociceptives sensibles à la chaleur (Caterina *et al.*, 1997). Par ailleurs, des études ont révélé que des souris n'exprimant pas ce récepteur voyaient leur capacité à détecter les stimuli nociceptifs au chaud clairement diminuée (Caterina *et al.*, 2000). L'implication du TRPV2, exprimé dans une sous population de fibres A δ , a aussi été décrite dans la détection de températures supérieures à 52°C.

Un autre récepteur de la famille des TRP se distingue, quant à lui, par sa capacité à détecter les stimuli thermiques d'un froid modéré, il s'agit du récepteur **TRPM** (Mélastatine) 8 qui est activé par les températures non nociceptives inférieures à 25-30°C mais aussi par le menthol (Peier *et al.*, 2002). En effet, les souris déficientes pour le récepteur TRPM8 ont une

sensibilité au froid modéré nettement diminuée (Dhaka *et al.*, 2007) mais leur sensibilité au froid intense reste inchangée. D'un autre côté, des recherches utilisant des souris *knock-out* ont indiqué que le récepteur **TRPA** (Ankyrine) 1 serait impliqué dans la détection de stimuli thermiques nociceptifs d'un froid intense, inférieur à 0°C (Kwan *et al.*, 2006).

Encore aujourd'hui, la détection par les neurones nociceptifs des informations mécaniques nociceptives aiguës reste largement inconnue. Divers candidats ont été identifiés dans des modèles d'invertébrés comme les canaux **PIEZO 2**, les canaux **K2P**, les récepteurs **P2X3**, les récepteurs TRPA1, ou encore les canaux **ASIC** (*Acid-Sensing Ion Channel*) (Hill & Bautista, 2020). Le rôle de **PIEZO 2** a été démontré chez des souris grâce à une délétion conditionnelle du récepteur dans les neurones sensoriels. Ces souris présentent une sensibilité tactile accrue, et une nociception mécanique diminuée en l'absence du récepteur (Zhang *et al.*, 2019). Cependant, chez le rongeur, bien que le rôle des 3 autres récepteurs dans la sensibilité mécanique non-nociceptive ait été largement démontré, leur implication dans la détection de signaux mécaniques nociceptifs a été révélée seulement dans des conditions de sensibilisation à la douleur et non en condition basale (Hill & Bautista, 2020).

Enfin, la détection des stimuli chimiques est assurée par différents acteurs qui peuvent détecter autant les substances exogènes potentiellement dangereuses, que les molécules endogènes libérées lors d'une lésion ou d'une inflammation. Les canaux **ASICs**, sont des canaux ioniques activés par les protons, ils sont activés par une acidification du milieu extracellulaire qui intervient lors de lésions, ou dans des conditions d'inflammation ou d'ischémie (Kellenberger & Schild, 2015). Les récepteurs **TRPV1** sont également activés par l'acidification du milieu extracellulaire (Nilius & Szallasi, 2014). Par ailleurs, les récepteurs **TRP** sont activés par diverses molécules exogènes. On peut citer notamment : la capsaïcine contenue dans le piment pour le **TRPV1**, le menthol pour le récepteur **TRPM8**, ou encore des molécules présentes dans la moutarde et l'ail pour les **TRPA1** (Bell, 2018).

C. Les ganglions rachidiens

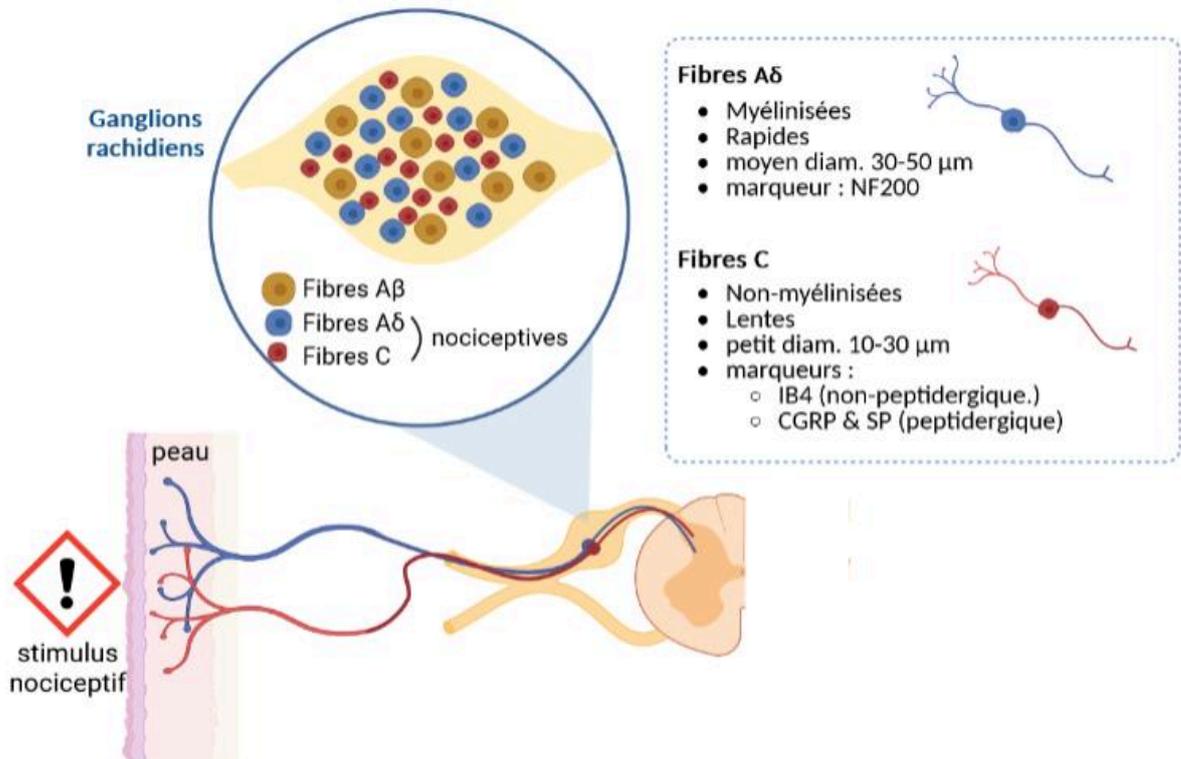


Figure 4: Schéma illustrant la transduction du signal nociceptif par les fibres afférentes primaires dont les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions rachidiens. Les propriétés des fibres sont indiquées dans l'encadré.

Les ganglions rachidiens, sont des ganglions nerveux disposés de part et d'autre de la moelle épinière et qui contiennent les corps cellulaires des fibres sensorielles primaires responsables de la transduction de l'information sensorielle, nociceptive ou non-nociceptive. Chaque paire est associée à un segment particulier de la moelle épinière et est logée dans les neuroforamen qui désignent les poches situées entre les vertèbres. Les corps cellulaires associés aux fibres nociceptives sont reconnaissables par leur taille mais également grâce à des marqueurs spécifiques détectables par immunohistochimie. Les corps cellulaires des fibres C sont de petit diamètre (10-30 μm). Lorsque celles-ci sont peptidergiques elles expriment la SP ou le CGRP, lorsqu'elles sont non peptidergiques, elles se lient à l'IB4. Les corps cellulaires des fibres Aδ sont de diamètre moyen (30-50 μm) en comparaison à ceux des fibres Aβ non nociceptives de grand diamètre (>50 μm), (Ruscheweyh *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2013). Tous deux expriment le Neurofilament 200 (NF200), (Lawson & Waddell, 1991).

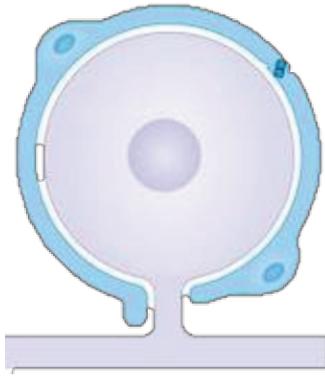


Figure 5: organisation neurone (gris) - cellules gliales satellites (bleu) au sein des ganglions rachidiens.

Parmi les cellules présentes dans les DRGs, se trouvent aussi des cellules gliales : les cellules gliales satellites et les cellules de Schwann. Les cellules gliales satellites enveloppent étroitement les corps cellulaires des neurones formant une organisation unique neurone-glie qui permet des interactions privilégiées entre ces deux acteurs. Elles interviennent ainsi dans le contrôle de l'environnement extracellulaire du neurone qu'elles entourent (Hanani & Spray, 2020). Elles interviennent également lors de lésion des nerfs ou d'inflammation, conditions qui vont activer les cellules gliales satellites et ainsi mener à une libération de médiateurs inflammatoires qui vont modifier les propriétés des neurones à proximité (Hanani & Spray, 2020).

Les cellules de Schwann quant à elles sont majoritairement connues pour leur rôle dans la myélinisation des axones permettant une conduction de l'information rapide et efficace. Il existe des cellules de Schwann myélinisantes et non-myélinisantes qui vont fournir un soutien structural et métabolique aux axones. Les cellules de Schwann jouent un rôle important lors de lésions nerveuses car elles permettent et soutiennent la régénération des nerfs en question, fonction particulièrement importante dans des cas de douleurs neuropathiques associées à des lésions des nerfs périphériques (Taveggia & Feltri, 2022).

D. Intégration dans la moelle épinière

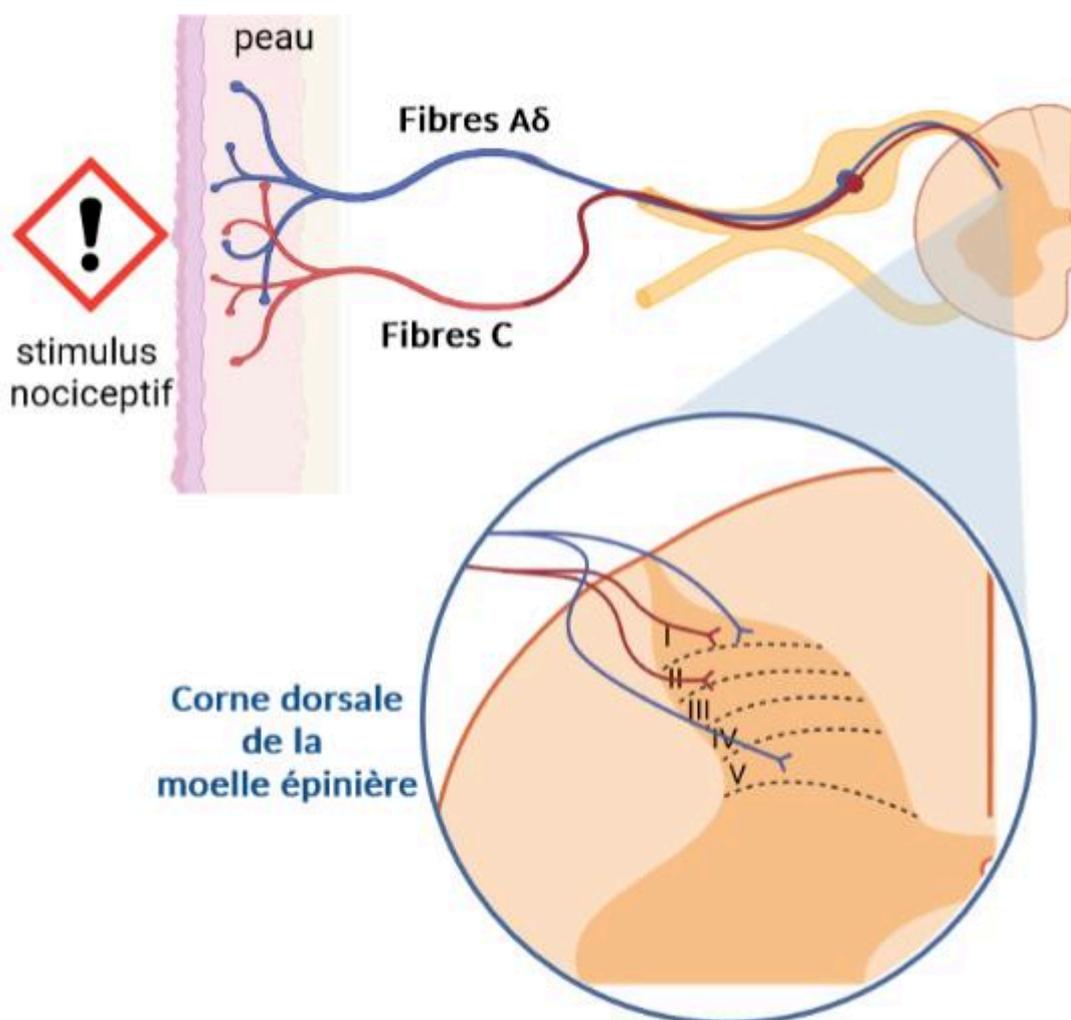


Figure 6: Schéma illustrant la transduction du signal nociceptif par les fibres afférentes primaires vers les différentes laminae de la corne dorsale de la moelle épinière.

A la suite de la détection d'un stimulus nociceptif, les fibres afférentes primaires transmettent le message à la moelle épinière, premier lieu d'intégration de l'information nociceptive. La « matière grise » de la moelle épinière est subdivisée en 10 laminae sur la base de leur cytoarchitecture (Rexed, 1952), réparties dans deux grandes subdivisions : la corne dorsale qui est impliquée principalement dans la réception des informations sensorielles et nociceptives (laminae I à VI), et la corne ventrale qui est impliquée principalement dans les fonctions motrices. Les fibres nociceptives projettent principalement dans les laminae superficielles de la corne dorsale, à savoir les laminae I et II. Ainsi, les fibres A δ innervent majoritairement la lamina I, les fibres C peptidergiques les laminae I et II et les fibres C non-peptidergiques la lamina III. Les fibres A β non nociceptives innervent quant à elles les laminae III à V. Ces fibres transmettent l'information nociceptive aux neurones de projection, soit par

contact direct, soit via un réseau local d'interneurones inhibiteurs et excitateurs. Les neurones de projection vont à leur tour transmettre l'information nociceptive vers les centres supraspinaux (Bell, 2018).

E. Projection vers les centres supraspinaux

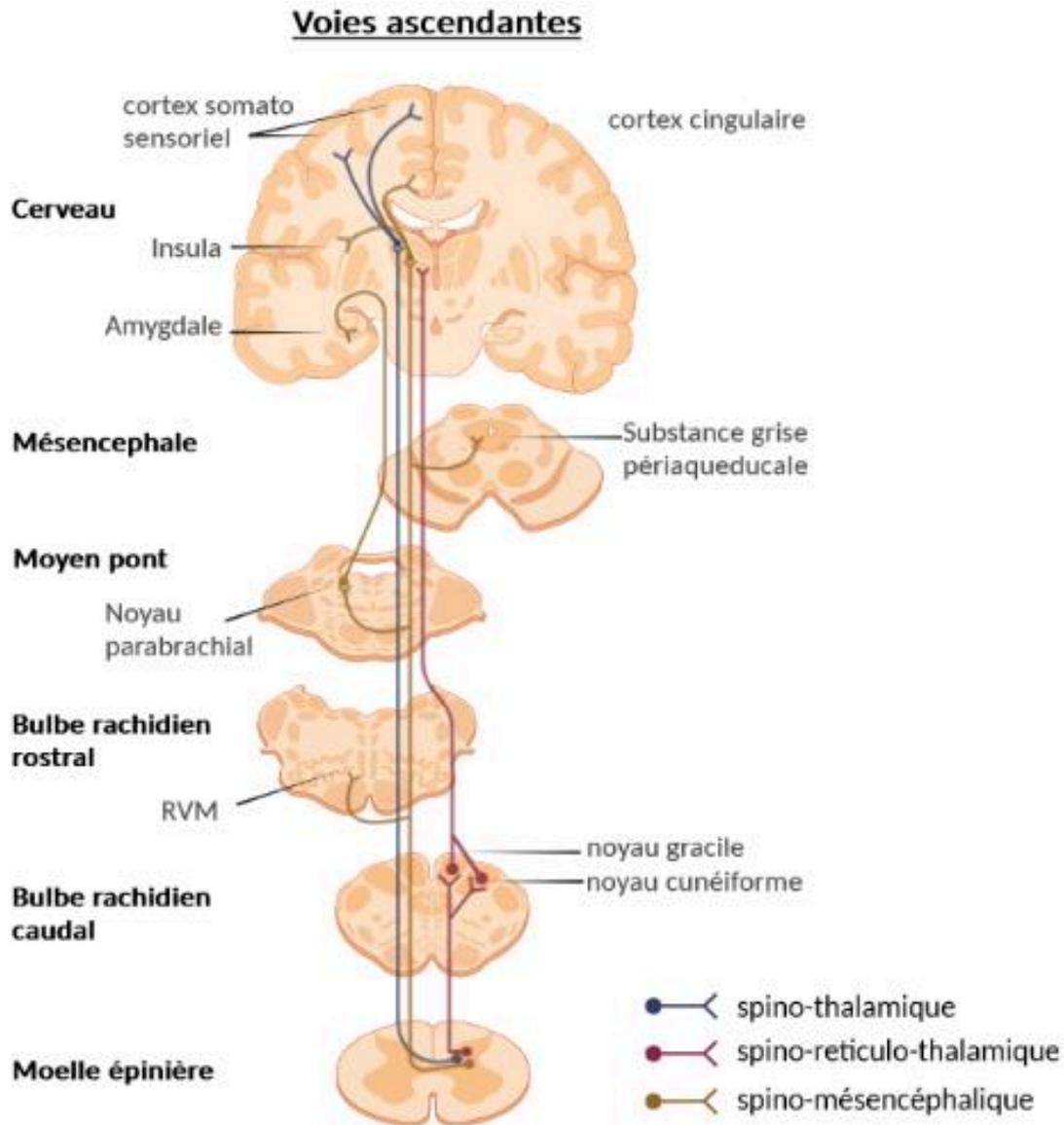


Figure 7 : Schéma illustrant les 3 voies ascendantes principales transmettant les informations nociceptives vers les centres supraspinaux.

Pour être interprétées comme douloureuses, les informations nociceptives doivent être transmises aux structures supraspinales. Les neurones de projection sont localisés dans la lamina I mais aussi dispersés dans les laminae III à VI. Ils sont le point de départ de nombreuses voies ascendantes distinctes dont les principales sont : la voie spino-thalamique (voie majoritaire chez l'humain), la voie spino-réticulo-thalamique, et la voie spino-

mésencéphalique (Millan, 1999). Les voies spino-thalamique et voie spino-mésencéphalique subissent une décussation dans la moelle épinière pour atteindre leur cible supraspinale du côté controlatéral au stimulus nociceptif.

La **voie spino-thalamique** est une voie directe vers de nombreux noyaux thalamiques ou les neurones effectuent un relais vers le cortex primaire somatosensoriel, mais aussi la substance grise périaqueducale (**PAG**, *Periaqueductal Gray*). Cette voie est indispensable à la composante sensori-discriminative de la douleur, c'est-à-dire l'intensité et la localisation du stimulus.

La **voie spino-mésencéphalique** est une voie véhiculant les composantes affectives, émotionnelles et motivationnelles de la douleur. Dans cette voie, les neurones de la moelle épinière vont projeter vers la formation réticulée rostrale ventro-médiane aussi appelé bulbe rachidien rostral ventro-médian (**RVM**, *Rostral Ventromedial Medulla*), vers la substance grise périaqueducale, mais aussi vers le noyau parabrachial qui, à son tour, enverra des projections vers l'amygdale et l'hypothalamus, et enfin vers les noyaux intralaminaires du thalamus qui projettent vers l'insula et le cortex cingulaire.

La **voie spino-réticulo-thalamique**, ou voie des cordons dorsaux, est impliquée dans les douleurs diffuses potentiellement liées aux douleurs viscérales. Dans cette voie, les neurones de la moelle épinière projettent vers les noyaux graciles et cunéens ipsilatéraux où ils contactent des neurones qui à leur tour projettent vers les noyaux ventro-postérieurs thalamiques controlatéraux. Ce passage, vers le côté controlatéral se fait via la décussation lemniscale. Les neurones des noyaux ventro-postérieurs thalamiques projettent, quant à eux, vers le cortex insulaire.

Ainsi, de nombreuses structures supraspinales participent à l'intégration et au traitement du message nociceptif, chacune étant impliquée dans différentes dimensions de l'expérience douloureuse. En plus de celles citées ci-dessus, d'autres structures sont également impliquées dans l'intégration de ce message douloureux, tel que révélé par des études d'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique (Hayes & Northoff, 2012). Parmi elles, l'hippocampe aurait un rôle à la fois dans le traitement de l'information douloureuse et sa modulation (Fasick *et al.*, 2015). En effet, des études ont démontré que l'injection d'un anesthésique local, la lidocaïne, dans le gyrus denté, produisait une analgésie (McKenna & Melzack, 1992), mais aussi qu'une lésion de l'hippocampe altérait la perception du message nociceptif (Al Amin *et al.*, 2004).

F. Modulation endogène de la douleur et contrôle descendants

Les contrôles descendants sont des voies qui projettent de régions du tronc cérébral vers la moelle épinière (*SC*, *spinal cord*) et qui permettent soit de faciliter, soit d'inhiber la transmission spinale des informations nociceptives. Ces mécanismes sont complexes et seul un bref aperçu en sera donné ici (pour une revue détaillée voir Millan, 2002). Les contrôles descendants ont pour origine des structures supra spinales diverses dont le cortex cérébral, les structures limbiques, l'hippocampe, l'hypothalamus, le noyau parabrachial, le noyau du tractus solitaire, la PAG, la RVM, le locus coeruleus (**LC**) ou encore le noyau réticulaire dorsal (**DRt**, *Dorsal Reticular nucleus*). Parmi ces structures, l'axe PAG-RVM-SC a été largement étudié. Les neurones de la PAG projettent dans la RVM qui elle-même projette directement dans la corne dorsale de la moelle épinière sur des interneurons et des neurones de projection des voies ascendantes. La RVM est composée de cellules dites de type ON ou OFF, participant respectivement aux contrôles descendants facilitateurs ou inhibiteurs, permettant ainsi une modulation du message nociceptif (Chen *et al.*, 2013).

De nombreux systèmes neuromodulateurs sont impliqués dans cette modulation des informations nociceptives, notamment la sérotonine, la noradrénaline, mais aussi les peptides opioïdes. Leur libération au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière participe directement à la modulation de la nociception. Le rôle du système opioïde dans la modulation de l'information nociceptive sera détaillé dans la partie « Système Opioïde ». Le système endocannabinoïde est également impliqué dans cette modulation (voir Le système endocannabinoïde dans la douleur).

3. Inflammation

Un stimulus nociceptif peut par son rôle de signal d'alarme permettre d'éviter une lésion ou une blessure mais lorsque la lésion survient malgré tout, celle-ci donne lieu à une inflammation. L'inflammation sert notamment à limiter les dommages, à contenir l'infection, à éliminer les agents pathogènes et les débris, et à faciliter la cicatrisation. Elle peut également devenir pathologique en cas d'inflammation chronique.

Au niveau moléculaire, l'inflammation est causée par des altérations dans la composition chimique du milieu entourant la fibre nerveuse. La modification de cet environnement est due à la libération de substances médiatrices de l'inflammation par les cellules environnantes : les cellules lésées (cellules endothéliales, kératinocytes, fibroblastes), les nocicepteurs, les cellules gliales, mais aussi les cellules du système immunitaire

(mastocytes, basophiles, plaquettes, macrophages, neutrophiles) recrutées au niveau du site de lésion ou d'inflammation. Le cocktail de molécules libérées par ces cellules est nommé « soupe inflammatoire ». Parmi les molécules de signalisation qui la composent se trouvent des neurotransmetteurs (ATP, sérotonine), des protons, des facteurs de croissance (**NGF**, *nerve growth factor*), des lipides (prostaglandines), les endocannabinoïdes, divers peptides (CGRP, SP, bradykinine, histamine), des cytokines (**IL**, Interleukines), etc. (Julius & Basbaum, 2001; Basbaum *et al.*, 2009; Gangadharan & Kuner, 2013).

L'inflammation induit une sensibilisation des nocicepteurs qui se traduit d'une part par l'augmentation de leur excitabilité, et d'autre part par l'abaissement du seuil nociceptif les activant. Ces changements reflètent les modifications des seuils d'activation des divers canaux ioniques présents sur les nocicepteurs. Par ailleurs, elle peut aussi résulter en l'apparition de décharges spontanées des neurones nociceptifs et en un élargissement de leur champ récepteur c'est-à-dire de la zone sensorielle qui, lorsque qu'elle est stimulée, entraîne l'activité de ces neurones. Cette sensibilisation périphérique amplifie donc l'activité des neurones sensoriels (Latremliere & Woolf, 2009).

Il existe également une sensibilisation centrale qui résulte de changements dans les propriétés des neurones dans le système nerveux central. La sensibilisation centrale représente un état anormal de réactivité ou d'augmentation de la sensibilité du système nociceptif. Par ailleurs, elle entraîne le recrutement de nouvelles entrées dans les voies nociceptives, telles que les fibres A β dont la stimulation peut alors devenir nociceptive (Latremliere & Woolf, 2009).

II. Douleurs chroniques

1. Définition

Historiquement, la douleur chronique est définie comme une douleur qui persiste au-delà du temps normal de guérison. Cependant, cette définition, avec cette notion de guérison, prend certes en compte les douleurs chroniques secondaires à une lésion ou une maladie mais occulte tout un pan des douleurs chroniques, notamment les douleurs chroniques primaires qui sont des douleurs sans cause sous-jacente clairement identifiable (voir [Classification](#)). Ainsi, une définition basée uniquement sur une durée précise a été déterminée : la douleur chronique est donc décrite comme une douleur qui dure ou se répète pendant plus de trois mois (Treede *et al.*, 2015, 2019).

2. Prévalence

De nombreuses études se sont concentrées sur l'épidémiologie et la prévalence de la douleur chronique au sein des différentes populations. En France, la prévalence de la douleur chronique chez l'adulte est comprise entre 27.2 et 32.7% (Chenaf *et al.*, 2018). Des études ou revues similaires ont été faites dans d'autres pays. En Grande Bretagne, la douleur chronique atteint de 35 à 51.3% de la population tandis que les douleurs chroniques à fort impact (sur la vie quotidienne), c'est à dire d'intensité moyenne à sévère, touchent de 10.4 à 14.3% de la population générale (Fayaz *et al.*, 2016). Aux Etats-Unis, c'est environ 20% d'adultes qui déclarent souffrir de douleur chronique (Dahlhamer *et al.*, 2018; Yong *et al.*, 2022) ce qui est similaire aux 19% décrit dans les pays européens (Breivik *et al.*, 2006). Par ailleurs, aux Etats-Unis, 8% des adultes déclarent souffrir de douleurs chroniques à fort impact (Dahlhamer *et al.*, 2018). La douleur chronique semble ainsi toucher entre 1/5 et 1/3 de la population générale pouvant même atteindre la moitié dans certaines études.

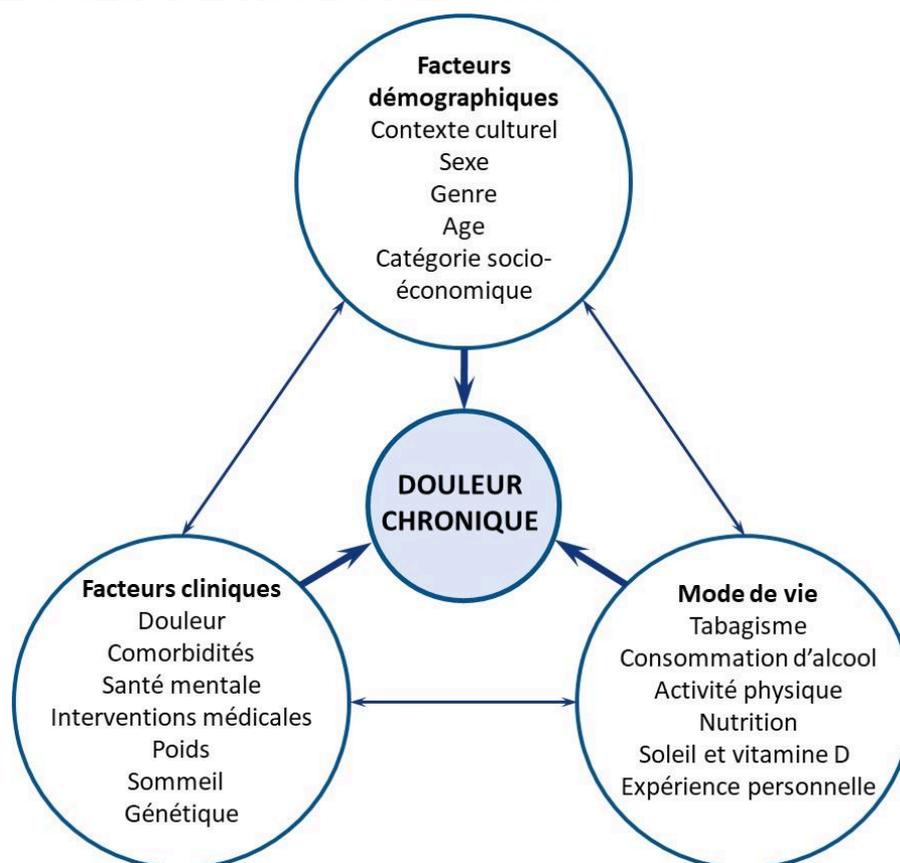


Figure 8: Facteurs associés avec le développement de douleurs chroniques. Adapté de Mills *et al.*, 2019

En outre, il est important de noter que la prévalence est accrue chez les femmes (Fayaz *et al.*, 2016; Chenaf *et al.*, 2018) et que cette prévalence augmente avec l'âge. Elle passe de 14.3% chez les 18-24 ans à 62% chez les plus de 75 ans (Fayaz *et al.*, 2016). L'âge et le genre ne sont

pourtant que deux des multiples facteurs associés au développement de la douleur chronique. Mills et collaborateurs ont identifié de nombreux facteurs et les ont séparés en 3 groupes : les facteurs démographiques, les facteurs liés au mode de vie et les facteurs cliniques. Ces facteurs sont détaillés en figure 8 (Mills *et al.*, 2019). Par exemple, les adultes issus des 25% les plus pauvres de la population ont plus de chance d'expérimenter des douleurs chroniques, mais aussi d'expérimenter une douleur plus intense avec un niveau plus élevé d'incapacité liée à la douleur (Dahlhamer *et al.*, 2018; Mills *et al.*, 2019). Cela s'explique en partie car les plus aisés bénéficient d'un accès à des soins de santé de meilleure qualité permettant de prévenir l'apparition ou de soulager les douleurs chroniques (Janevic *et al.*, 2017).

3. Conséquences et poids économique

En 2016, l'étude de l'organisation mondiale de la santé (OMS) « *Global burden of diseases* » sur la charge globale de morbidité qui quantifie la perte de vies ou d'activité humaines pour cause de décès précoce, de maladie et d'incapacité, a réaffirmé que la douleur et les maladies liées à la douleur sont les principales causes d'invalidité et de charge de morbidité dans le monde (Mills *et al.*, 2019).

La douleur chronique influence non seulement la santé mais aussi la qualité de vie des patients, car elle affecte la vie quotidienne des patients au niveau fonctionnel (sommeil, énergie), social (relations intimes, isolement), socio-économique (manque de productivité, invalidité) et émotionnel (irritabilité, colère, dépression, anxiété), (Pereira *et al.*, 2021). En effet, nombre de patients souffrant de douleurs chroniques se déclarent moins capables, voire incapables, d'effectuer des activités de tous les jours : deux tiers d'entre eux déclarent que la douleur impacte leur sommeil, et la moitié dit avoir des difficultés à marcher et à effectuer les tâches ménagères (Breivik *et al.*, 2006).

En ce qui concerne le poids économique de la douleur chronique, un rapport de 2010 de l'institut de médecine Américain a estimé que les coûts médicaux et le manque de productivité associés à la douleur chronique, coûtaient entre 560 et 635 milliards de dollars (USD) par an (Steglitz *et al.*, 2012).

4. Classification

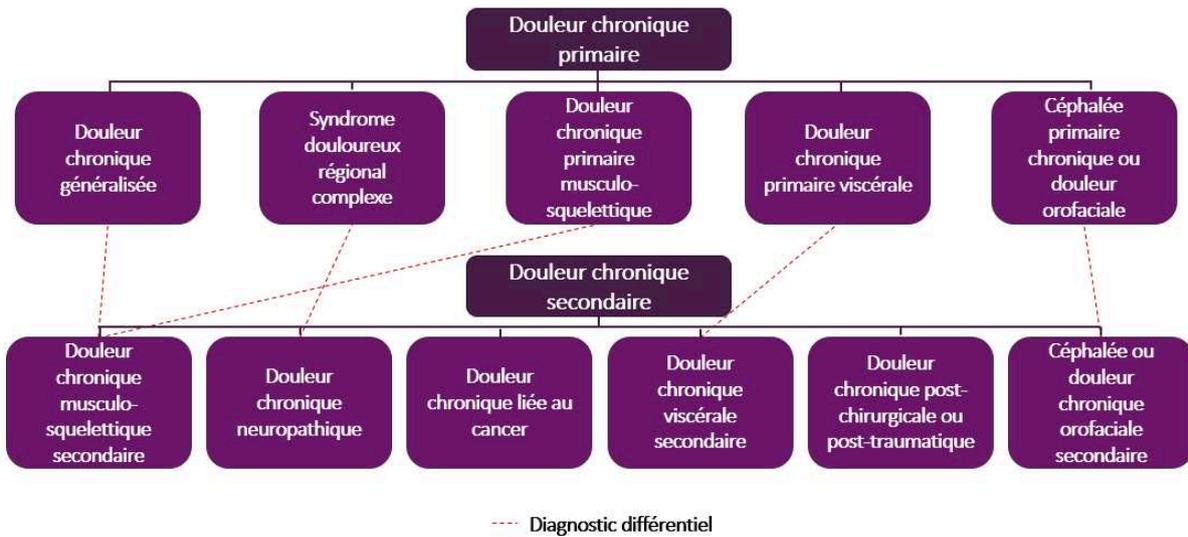


Figure 9: Classification simplifiée des douleurs chroniques (d'après Treede et al., 2019)

En 2018, un gros travail de classification des douleurs chroniques a été publié par les groupes de travail de l'IASP pour la onzième révision de la classification internationale des maladies (ICD-11, *International Classification of Diseases-11*) commandée par l'OMS. Ainsi, cette classification distingue deux grands types de douleurs : les douleurs chroniques primaires qui peuvent être considérées comme une maladie en soi et les douleurs chroniques secondaires qui font suite à une autre maladie, à un accident, une chirurgie, etc (Treede et al., 2019). Une classification détaillée des différents types de douleurs chroniques est disponible en annexe.

III. Douleurs neuropathiques

1. Définition et classification

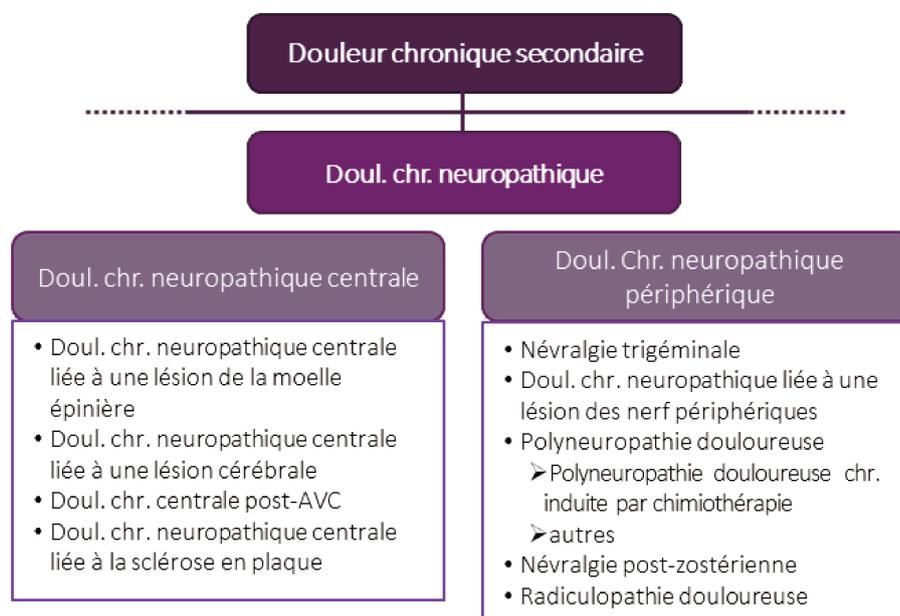


Figure 10: Classification des douleurs neuropathiques selon l'IASP (d'après Trouvin et al., 2019).

Les douleurs neuropathiques sont définies comme des douleurs consécutives à une lésion ou une maladie du système nerveux (Trouvin & Perrot, 2019). L'IASP précise que les douleurs neuropathiques correspondent à une description clinique (et non un diagnostic) qui nécessite une lésion démontrable ou une maladie répondant aux critères diagnostiques neurologiques établis. Selon la classification pour l'ICD-11, les douleurs chroniques neuropathiques peuvent être de 2 types : centrales ou périphériques. Celles de type central peuvent survenir à la suite d'une lésion de la moelle épinière, d'une lésion cérébrale ou d'un accident vasculaire cérébral ou encore être associées à la sclérose en plaque. Les douleurs périphériques, sont généralement causées par des névralgies (trigéminal ou post zostériennes), des polyneuropathies (les plus courantes étant liées au diabète, au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou à la chimiothérapie), des radiculopathies, mais surviennent également à la suite d'une lésion des nerfs périphériques (Sommer *et al.*, 2018; Scholz *et al.*, 2019). Le dos et les membres inférieurs constituent les parties du corps les plus affectées, suggérant que les radiculopathies lombaires et les lésions des nerfs périphériques constituent les causes les plus communes de ces douleurs (Bouhassira, 2019).

2. Prévalence

En France, une étude transversale sur plus de 30000 personnes a démontré que les douleurs neuropathiques touchaient environ 7% de la population générale, avec 5% déclarant des douleurs modérées à sévères, et représentaient 20 à 25% des cas de douleurs chroniques (Bouhassira *et al.*, 2008). Des études dans d'autres pays ont, quant à elles, décrit des prévalences allant de 3% pour le Japon à 10% pour le Maroc et le Brésil, tandis que certains pays présentent des valeurs proches de celles de la France (Benin 6.3%, Grande Bretagne 8.5%), (Bouhassira, 2019). Par ailleurs, pareillement aux douleurs chroniques, la prévalence des douleurs neuropathiques augmente avec l'âge et touche surtout les femmes. De plus, les douleurs neuropathiques seraient plus sévères que les autres types de douleurs, et auraient un impact négatif accru sur la qualité de vie des patients (Attal *et al.*, 2011).

3. Manifestations cliniques

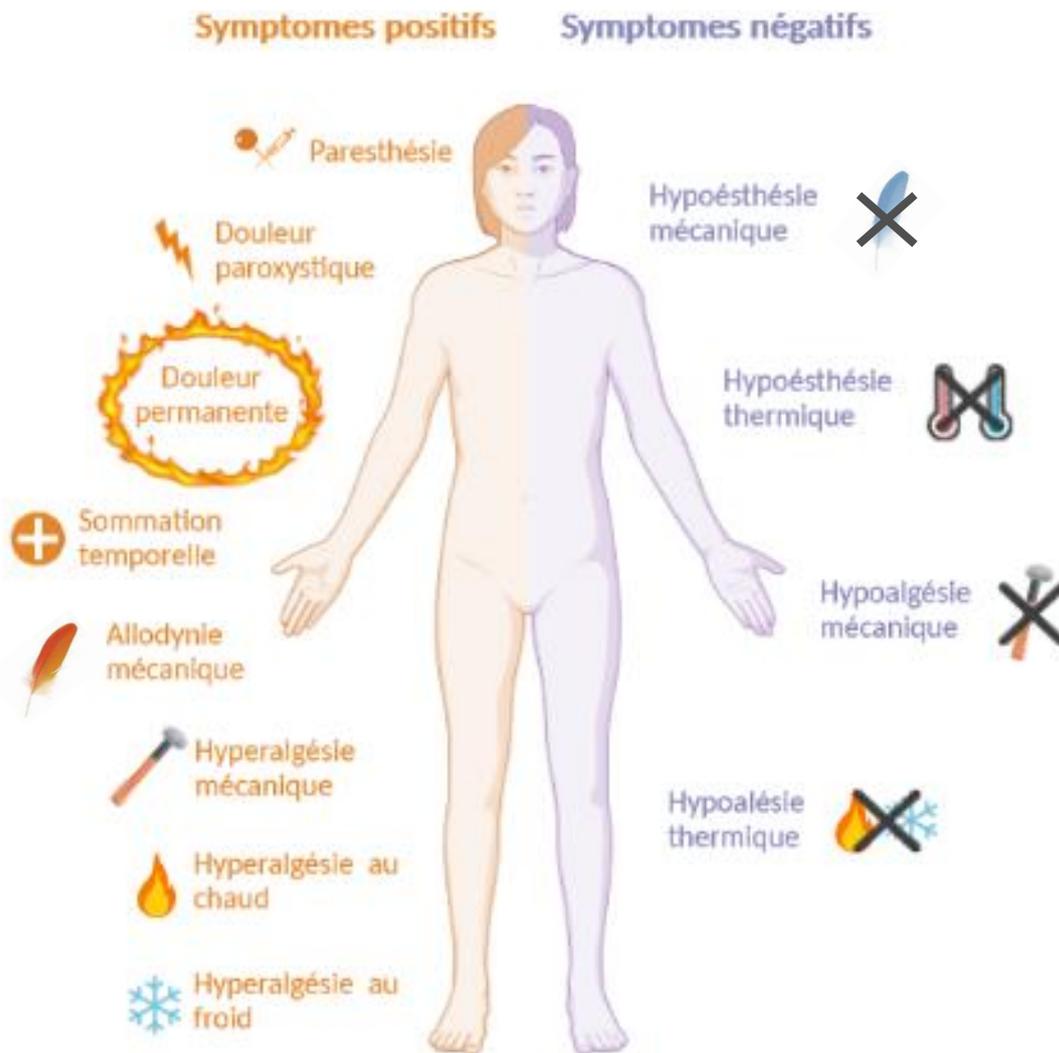


Figure 11: Manifestations cliniques des douleurs neuropathiques subdivisées en symptômes positifs et négatifs. Reproduit avec l'autorisation de Sarah Journée.

Les manifestations cliniques des douleurs neuropathiques peuvent être de diverses formes. Les patients se plaignent de douleurs spontanées, continues ou intermittentes qu'ils décrivent le plus souvent comme des sensations de brûlure, de tiraillement, de picotement, de fourmillement, d'étau ou de gelure (Finnerup *et al.*, 2021). Les douleurs neuropathiques sont caractérisées par la combinaison de symptômes positifs (en plus) et négatifs (en moins). Parmi les symptômes positifs, on trouve les symptômes douloureux décrits ci-dessus, mais aussi des sensations anormales (fourmillement, picotement, engourdissement, démangeaisons) désagréables (dysesthésies), ou non (paresthésies). Les dysesthésies, peuvent être spontanées ou évoquées par un stimulus. Parmi ces dernières, on peut mentionner notamment l'allodynie et l'hyperalgésie. L'allodynie est définie comme une douleur causée par un stimulus qui ne

provoque pas de douleur en condition normale (Loeser & Treede, 2008). L'hyperalgésie, quant à elle, est définie comme une augmentation de la douleur ressentie face à un stimulus normalement douloureux (Loeser & Treede, 2008). Les symptômes négatifs sont caractérisés par des déficits sensoriels dans les zones douloureuses (hypoesthésie, hypoalgésie) ainsi que par d'autres déficits (moteurs, cognitifs, etc.) selon la localisation de la lésion. Différents questionnaires incluant les dimensions précédemment citées ont ainsi été développés pour discriminer les douleurs neuropathiques des autres types de douleur (Bouhassira, 2019), parmi lesquels le questionnaire DN4 (NP4).

4. Comorbidités

Une étude française de 2011 sur plus de 4500 individus atteints de douleurs chroniques avec ou sans condition neuropathique a démontré que non seulement les patients neuropathiques avaient une qualité de vie, une santé mentale et un sommeil altérés mais que leurs scores d'anxiété et de dépression étaient accrus par rapport à des personnes saines mais aussi par rapport aux patients atteints de douleurs chroniques sans composante neuropathique (Attal *et al.*, 2011). En effet, Radat et al, ont observé que parmi des patients atteints de douleurs neuropathiques, 20% étaient atteints de troubles anxieux, et 30% de troubles de l'humeur. Parmi les troubles psychiatriques les plus courants, 12% étaient atteints d'un trouble de l'anxiété généralisée et 16.5% d'un trouble dépressif majeur (Radat *et al.*, 2013). Par ailleurs, une étude similaire en Autriche a estimé que chez les patients atteints de douleurs neuropathiques, 34% ressentait un sentiment de dépression et 25% un sentiment d'anxiété (Gustorff *et al.*, 2008).

5. Mécanismes moléculaires et cellulaires

A. Aspects sensoriels :

Les mécanismes qui sous-tendent les douleurs neuropathiques ont majoritairement été étudiés dans des conditions de lésions ou maladies du système nerveux périphérique. Les mécanismes que nous décrivons ci-dessous concernent donc une partie seulement des douleurs neuropathiques et ne peuvent être généralisées aux douleurs neuropathiques d'étiologies centrales.

a. Mécanismes périphériques des douleurs neuropathiques

Des lésions affectant les nerfs périphériques ou les DRG, peuvent prendre diverses formes, telles qu'un traumatisme, une compression, une hypoxie, une inflammation, une stimulation excessive ou encore des lésions chimiques. Ces lésions sont généralement accompagnées de la

libération de diverses molécules, des toxines, des cytokines et d'autres médiateurs inflammatoires. Les lésions et les molécules libérées peuvent affecter les nocicepteurs associés aux fibres C et A δ donnant lieu à des modifications des propriétés de ces fibres et de leurs corps cellulaires (densité accrue, composition en récepteur et canaux, hyper-excitabilité), et des propriétés des récepteurs et canaux qui les composent, voire même une dégénérescence des fibres en question. Ces modifications ont pour conséquence une activation ectopique (en dehors de leurs champs récepteurs) des nocicepteurs et une transmission excessive et erronée des signaux, autant de modifications qui interviennent dans le développement de la condition neuropathique (Meacham *et al.*, 2017).

Divers récepteurs et canaux ioniques présents sont impliqués dans la sensibilisation des neurones nociceptifs primaires. Les canaux sodiques activés par le voltage **Nav** voient ainsi leur expression, leur trafic intracellulaire et leur adressage à la membrane plasmique augmentés dans des conditions de douleur neuropathique. C'est le cas tout particulièrement des Nav_{V1.3} et Nav_{V1.6} présents sur les fibres A δ et des Nav_{V1.7} et Nav_{V1.8} présents sur les fibres C. Par ailleurs, des modifications de leurs propriétés (activation plus rapide et courant accru) participent également à l'hyperexcitabilité des neurones qui les expriment. Les canaux TRP sont également impliqués dans la sensibilisation des neurones (Mickle *et al.*, 2015). En effet, leur expression est augmentée dans des conditions d'inflammation et de lésion des nerfs périphériques, et des changements fonctionnels entraînent leur activation par des signaux d'intensité plus faible. D'autres acteurs essentiels sont les canaux potassiques activés par le voltage **Kv**, qui participent à la repolarisation des neurones à la suite d'un potentiel d'action. En condition neuropathique, l'expression de nombreuses isoformes (K_{V1.1}, K_{V1.2}, K_{V1.4}, K_{V2.1}, K_{V2.2}, K_{V4.3}, K_{V7.2}, K_{V7.3}, K_{V9.1}) de ces canaux est réduite, diminuant ainsi la repolarisation des neurones et participant à l'hyperexcitabilité neuronale (Meacham *et al.*, 2017).

b. Mécanismes centraux des douleurs neuropathiques

Les modifications affectant les propriétés de signalisation des fibres afférentes primaires conduisent à une transmission accrue des informations aux neurones nociceptifs de second ordre présents dans la moelle épinière. La stimulation répétée et intense des neurones spinaux peut entraîner leur sensibilisation qui peut perdurer et devenir inadaptée. Cette sensibilisation, dite centrale, est définie comme une réponse accrue d'un neurone nociceptif du système nerveux central à un signal d'intensité normale ou inférieure au seuil d'activation habituel du neurone. Des modifications des propriétés des neurones (perméabilité membranaire, expression des récepteurs, localisation des synapses) sont impliqués dans cette

sensibilisation. Par ailleurs, d'autres mécanismes comme le déséquilibre de la balance entre les contrôles descendants facilitateurs et inhibiteurs, ainsi qu'une plasticité corticale et sous corticale inadaptée participent à créer et maintenir cet état de douleur neuropathique (Meacham *et al.*, 2017).

B. Aspects émotionnels

Chez l'humain, des études d'imagerie fonctionnelle ont mis en lumière les modifications fonctionnelles et morphologiques liées aux douleurs neuropathiques. En effet, une réduction du volume de matière grise (névralgie trigéminal) dans des structures impliquées dans les troubles affectifs et cognitifs (Obermann *et al.*, 2013), mais aussi une altération du flux sanguin cérébral en lien avec le système limbique, ont été mis en évidence chez des patients atteints de douleurs neuropathiques. En 2019, un groupe a démontré l'importance de la voie Noyaux du Raphé dorsal - Amygdale centro-médiane dans la dépression associée à la douleur chronique (Zhou *et al.*, 2019). Cependant, l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent les conséquences anxio-dépressives des douleurs neuropathiques chez l'humain n'est pas aisée, et l'utilisation de modèles précliniques nous permet de mieux les décrypter (Yalcin *et al.*, 2014; Humo *et al.*, 2019). Ainsi, de nombreux facteurs et acteurs de la comorbidité entre douleur chronique et trouble anxio-dépressifs ont été identifiés, tant au niveau du génome (gènes, modifications épigénétiques, facteurs de transcription), qu'au niveau des acteurs moléculaires (neuromodulateurs, récepteurs, hormones, etc). Par exemple il a été montré une atrophie de l'hippocampe qui s'accompagne d'une diminution de la neurogénèse et de la potentialisation à long terme ainsi que d'une augmentation de la prolifération de cellules gliales, de l'IL-1 β , de l'IL-6, de l'interféron γ (IFN γ), de l'anandamide (AEA) ou encore du NF κ B (*nuclear factor κ B*). Des modifications similaires dans des structures comme le cortex cingulaire antérieur, le noyau accumbens, ou l'amygdale ont également été décrites (Yalcin *et al.*, 2014; Humo *et al.*, 2019).

6. Traitements

Il est difficile de traiter les patients souffrant de douleurs neuropathiques, car de nombreux traitements médicamenteux ne sont pas efficaces, ne soulagent leur douleur que partiellement ou entraînent de lourds effets indésirables.

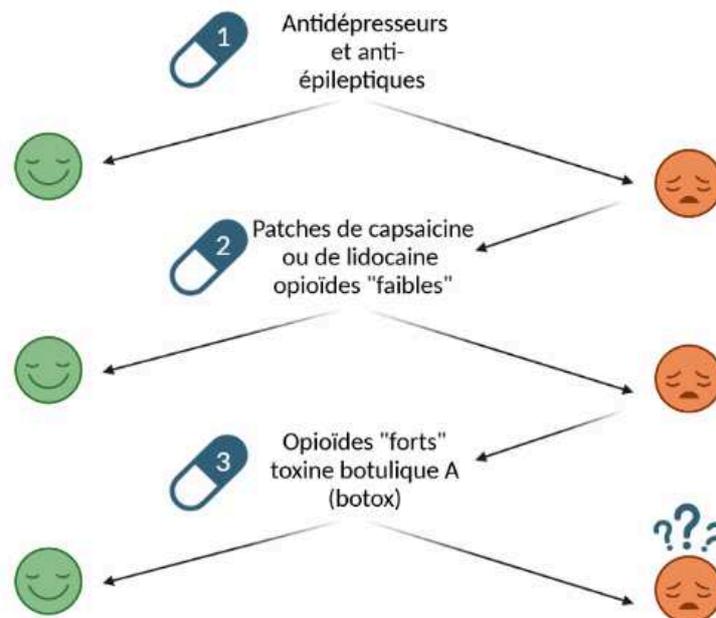


Figure 12: Stratégie thérapeutique actuelle pour soulager les douleurs neuropathiques.

Le « groupe d'intérêt spécial pour la douleur neuropathique » (NeuPSIG) a publié des recommandations pour la prise en charge pharmacologique (Finnerup *et al.*, 2015), mais aussi les interventions (Dworkin *et al.*, 2013) permettant de soulager des douleurs neuropathiques. Ainsi, les traitements pharmacologiques de première intention recommandés pour tous types de douleurs neuropathiques incluent les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (Duloxétine et Venlafaxine), les antidépresseurs tricycliques (amitriptyline), mais aussi certains antiépileptiques ou anti-convulsants dérivés du **GABA** (*γ aminobutyric acid* ; prégabaline, gabapentine, gabapentine énacarbil). Dans les traitements de seconde intention, on trouve le tramadol un opioïde dit « faible », mais également des patches de Capsaïcine ou de Lidocaïne pour les douleurs périphériques localisées. Enfin, les recommandations de troisième intention comprennent les opioïdes dits « forts » comme l'oxycodone et la morphine, mais aussi la toxine botulique A pour les douleurs périphériques (Finnerup *et al.*, 2015). A noter qu'il est également recommandé d'éviter l'utilisation de cannabinoïdes en raison du faible taux de succès des essais cliniques mais aussi des problèmes de sécurité liés à leur usage (Finnerup *et al.*, 2015). Cependant, cette recommandation se base

sur des essais réalisés avec du Sativex ou du Dronabinol à base, tous deux, de $\Delta 9$ -THC connu pour ses effets psychomimétiques.

7. Modèles animaux

De nombreux modèles animaux ont été développés afin d'étudier les douleurs neuropathiques provenant d'étiologies diverses et de décrypter les mécanismes sous-jacents, et de trouver des traitements efficaces (Jaggi *et al.*, 2011). Ici, nous développerons plus particulièrement les modèles de douleurs neuropathiques induites par une lésion des nerfs périphériques chez les rongeurs. Il est cependant important de garder à l'esprit que d'autres modèles reposant sur des lésions de la moelle épinière, l'injection d'agents chimiothérapeutiques ou anti-VIH, ou encore sur des maladies comme le diabète existent et que les douleurs neuropathiques induites par la lésion des nerfs périphériques ne représentent qu'une des multiples étiologies de ces douleurs. Plusieurs modèles de lésion des nerfs périphériques ciblent le nerf sciatique. C'est le cas du modèle de SNI (*spared nerve injury*) ou « lésion du nerf épargné » mais aussi du modèle de CCI (*chronic constriction injury*), (Bennett & Xie, 1988) qui est le plus courant. Dans le modèle du CCI, une grande variabilité expérimentale liée à un serrage variable des ligatures autour du nerf sciatique a mené Mosconi et Kruger à développer en 1996 le modèle du *cuff* (manchon), (Mosconi & Kruger, 1996). Dans ces trois modèles, la douleur neuropathique s'accompagne également du développement de symptômes de types anxieux et dépressifs (Kremer *et al.*, 2021). Les deux prochains paragraphes détaillent les modèles de SNI et de Cuff.

A. Modèle du SNI

Le modèle de SNI a été développé en 2000 chez des rats (Decosterd & Woolf, 2000) pour être ensuite adapté chez la souris 3 ans plus tard (Shields *et al.*, 2003). Dans ce modèle, on ligature puis on coupe 2 des trois branches du nerf sciatique laissant ainsi une branche intacte. Les souris développent alors une allodynie mécanique et thermique au froid qui se maintient dans le temps, pendant au moins 12 mois (Guida *et al.*, 2020). Ces souris développent également des symptômes de type dépressif comme démontré dans les tests de suspension par la queue et d'éclaboussement (Guida *et al.*, 2020). Le SNI induit des modifications à long terme au niveau supraspinal (i.e. plasticité synaptique et expression des gènes), (Guida *et al.*, 2020).

B. Modèle du cuff

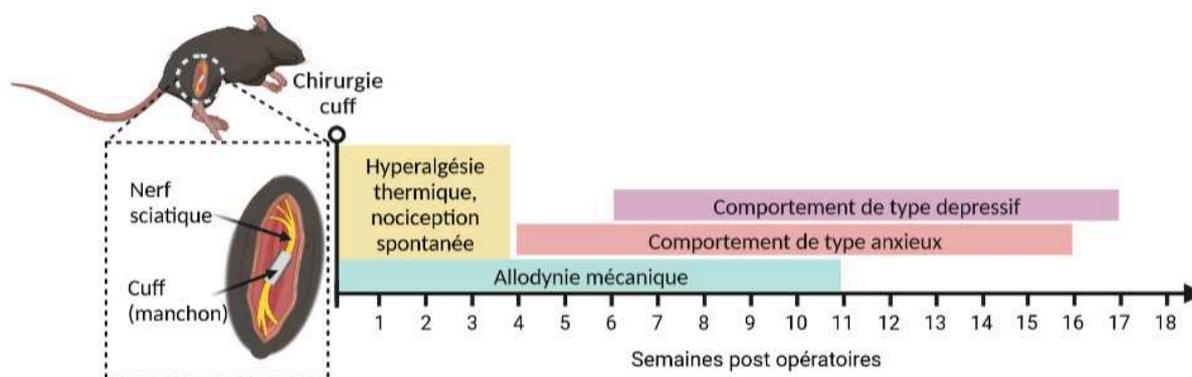


Figure 13 : Schéma illustrant le modèle de douleur neuropathique du Cuff ainsi que le déroulement temporel associé au développement des symptômes de type douloureux et anxio-dépressifs.

Le modèle du cuff a été développé chez des rats (Mosconi & Kruger, 1996) puis adapté chez des souris mâles C57Bl/6J (Cheng *et al.*, 2002; Benbouzid *et al.*, 2008a). Dans ce modèle, on place un manchon en polyéthylène autour de la branche commune du nerf sciatique. A la suite de la chirurgie, les souris développent une hyperalgésie transitoire aux stimuli thermiques chauds qui disparaît au bout de 3 semaines (Benbouzid *et al.*, 2008a; Sheehan *et al.*, 2021). Elles développent en parallèle une allodynie mécanique qui reste stable pendant 10 semaines et qui revient au seuil nociceptif basal à 12 semaines (Benbouzid *et al.*, 2008a; Sellmeijer *et al.*, 2018; Sheehan *et al.*, 2021). Par ailleurs, une étude de 2021 a mesuré les douleurs non-évoquées, paramètre important des douleurs neuropathiques chez l'humain rarement adressé dans les modèles murins, grâce à un dispositif de distribution pondérale dynamique et a mis en évidence que le cuff induisait des douleurs non-évoquées qui disparaissaient au bout d'une trentaine de jours (Sheehan *et al.*, 2021). Les femelles C57BL/6 quant à elles, développent aussi une hyperalgésie thermique au chaud et des douleurs non évoquées transitoires, associées à une allodynie mécanique se maintenant au moins 30 jours (Sheehan *et al.*, 2021). D'autre part, au bout de 4 à 6 semaines, les animaux mâles commencent à développer des symptômes de type anxieux tels qu'observés dans les tests du labyrinthe en croix surélevé, de l'enfouissement de bille, du clair-obscur, d'hyponéophagie, et d'interaction sociale (Benbouzid *et al.*, 2008a; Yalcin *et al.*, 2011). Des symptômes de type dépressif apparaissent plus tardivement, entre 6 et 8 semaines, mis en évidence par le test d'éclaboussement et de nage forcée (Yalcin 2011). Les symptômes de type anxio-dépressifs perdurent au-delà de la résolution de l'allodynie mécanique c'est-à-dire jusqu'à 16 semaines pour ceux de type anxieux et jusqu'à 17 semaines pour ceux de type dépressifs (Sellmeijer 2018). Par ailleurs, en ce qui

concerne les acteurs moléculaires intervenant dans la douleur neuropathique et les symptômes anxio-dépressifs dans ce modèle, des marqueurs de la neuroinflammation (**TNF α** (*Tumor necrosis factor α*), IL-6, IL-1 β , Iba-1) augmentent dans l'hippocampe de souris cuff mâles 14 jours après la chirurgie (Bai *et al.*, 2021).

PARTIE 2 : SYSTEME OPIOÏDE



Figure 14: Le système opioïde est impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques dont la douleur, la récompense aux stimuli naturels, l'humeur, l'immunité, les fonctions cardiovasculaires, rénales et hépatiques, la thermorégulation, le transit gastro-intestinal, les comportements sociaux, la locomotion ou encore l'apprentissage.

I. Généralités

Chez l'humain, le système opioïde est composé de 3 récepteurs opioïdes et de 3 types de peptides opioïdes endogènes. Ces récepteurs μ , δ et κ , sont respectivement issus des gènes *OPRM1*, *OPRD1* et *OPRK1*. On les trouve dans le cerveau mais également dans des organes périphériques tels que le cœur, les poumons, le foie, le tractus gastro-intestinal, les organes reproducteurs ou encore la peau (Wittert *et al.*, 1996; Bigliardi *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2012). Les peptides opioïdes appartiennent aux familles des enképhalines, des endorphines et des dynorphines et peuvent sélectivement activer chacun des récepteurs opioïdes avec des affinités relativement similaires. L'objet de notre étude portant majoritairement sur le récepteurs δ et dans un moindre mesure le récepteur μ , la littérature entourant le récepteur κ ne sera que peu développée.

Le système opioïde endogène est un système neuromodulateur impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, la plus connue étant très certainement la douleur et la nociception. Ce système intervient aussi dans l'humeur, le stress, les relations sociales, l'apprentissage et la mémoire, la récompense aux stimuli naturels (boissons et nourriture appétissantes, activité sexuelle, jeux), la locomotion, les fonctions autonomes (transit gastro-intestinal, respiration, thermorégulation, fonctions cardiovasculaire, hépatique et rénale) ou encore les fonctions immunitaires (Bodnar, 2022).

Le système opioïde est également la cible de molécules exogènes : les opiacés. On y trouve la morphine et ses dérivés qui ont largement été utilisés au fil des siècles notamment pour leurs vertus analgésiques mais aussi euphorisantes. Aujourd'hui, l'usage d'opiacés est recommandé pour traiter les douleurs aiguës d'intensité modérée à sévère, mais généralement peu recommandé pour les douleurs chroniques du fait de leur efficacité limitée dans ces conditions et des nombreux effets indésirables qui leur sont associés. En effet, l'usage aigu d'opiacés peut induire de la constipation, des nausées, des vomissements, de la somnolence, de la bradycardie, mais aussi de la dépression respiratoire. Utilisés de manière chronique, ils peuvent également induire d'autres types d'effets secondaires, tels qu'une dépendance physique et psychique ou de la tolérance mais aussi une hyperalgésie induite par leur usage (**OIH**, *opioid induced hyperalgesia*). Malgré cela, la prescription d'opiacés dans les pays d'Amérique du nord, a explosé à partir du milieu des années 2010, menant à ce qui est aujourd'hui appelé 'la crise des opioïdes', caractérisée par l'augmentation critique du nombre de mort par overdose induite par des opiacés. En effet, selon le **CDC** (*Centers for Disease control and prevention*), plus de 80000 personnes sont décédées en 2021 suite à une overdose d'opiacés aux Etats-Unis, un nombre qui ne cesse d'augmenter d'année en année.

Pour remédier à cela, de nombreuses recherches se sont focalisées d'une part sur le développement et la caractérisation de nouvelles molécules (opioïdes ou non) analgésiques qui seraient dépourvues de ces effets indésirables, et d'autre part, sur l'étude du système opioïde endogène en condition physiopathologique afin de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent leurs actions.

II. Les récepteurs opioïdes

Les récepteurs opioïdes sont des récepteurs couplés aux protéines G (**RCPG**). Classiquement, on distingue trois types de récepteurs opioïdes : mu (μ), delta (δ) et kappa (κ). Ces derniers présentent une forte homologie au niveau de la séquence d'acides aminés qui les compose avec 60% de résidus identiques, ce pourcentage est accru dans les régions transmembranaires (~75%) et intracellulaires (~65%) et considérablement diminué dans les régions extracellulaires (~37%). Ainsi, les régions extracellulaires participent grandement à donner la sélectivité au ligand bien que les domaines transmembranaires soient eux aussi impliqués (Minami & Satoh, 1995). Parfois, on considère qu'il existe un quatrième récepteur opioïde, le récepteur à la nociceptine/orphanineFQ (**NOP**). Cependant, malgré sa forte similarité de séquence avec les autres récepteurs opioïdes, il n'est pas classé comme tel en raison de sa pharmacologie. En effet, il possède une faible affinité pour les peptides opioïdes endogènes (enképhalines, endorphines, dynorphines) et son activité n'est pas inhibé par l'antagoniste Naloxone, ce qui est le cas des récepteurs μ , δ et κ (Takemori & Portoghesi, 1984).

L'existence de récepteurs opioïdes a été décrite chez une trentaine d'espèces de vertébrés allant du poisson-globe à l'humain, et selon la base de donnée « Ensembl » (Cunningham *et al.*, 2022) des gènes orthologues seraient présents dans plus de 200 espèces. Des études phylogénétiques ont suggéré, que les gènes des récepteurs opioïdes descendent tous d'un même gène ancestral qui se serait dupliqué une première fois donnant deux gènes ancestraux à μ/δ et à κ/NOP , qui à leur tour, se seraient dupliqués pour donner les gènes qu'on connaît aujourd'hui (Stevens, 2009). Bien qu'un seul gène ait été identifié pour chacun des récepteurs opioïdes, les premières études pharmacologiques ont soulevé l'hypothèse de l'existence de sous types pour chacun des récepteurs opioïdes (Reisine *et al.*, 1996). Aujourd'hui, cette hypothèse a été vérifiée uniquement pour les récepteurs opioïdes μ pour lequel il existe de nombreux variants d'épissage du gène *OPRM1*. Chez l'humain, on décompte 12 variants d'épissage du gène *OPRM1* pouvant donner lieu à des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (**TM**), (Pasternak & Pan, 2013). A noter qu'il existe des variants d'épissage donnant des récepteurs composés de 6TM ou de 1TM dont les rôles physiologiques ne sont pas

complètement élucidés (Pasternak & Pan, 2013; Liu *et al.*, 2021). Concernant les récepteurs κ et δ aucun variant d'épissage n'est à ce jour connu.

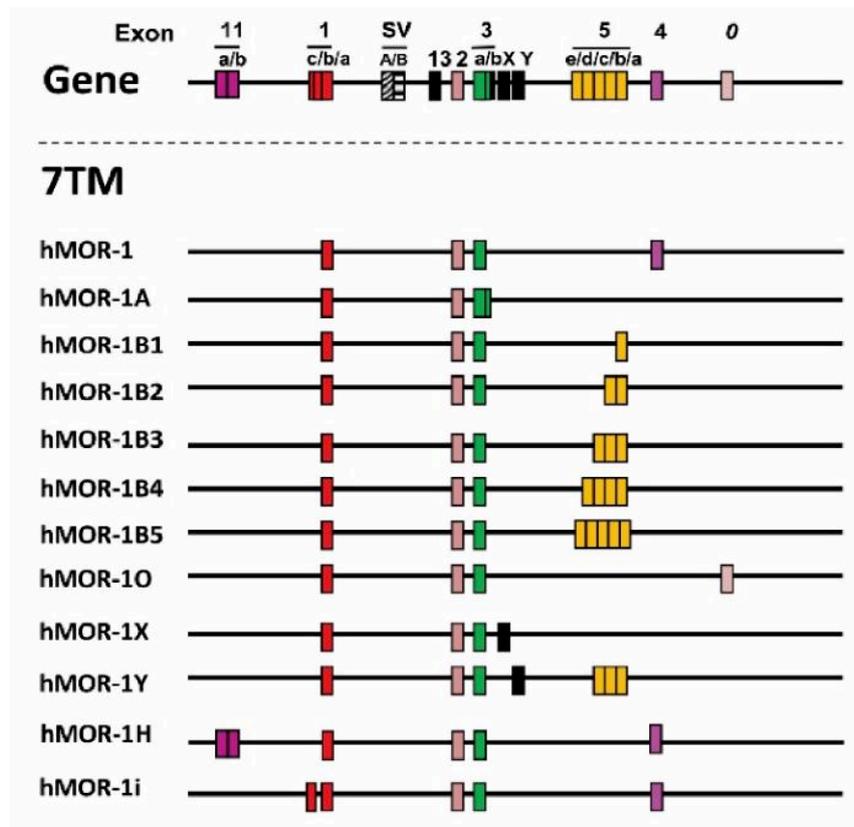


Figure 15: Représentation du gène *OPRM1* et des variant d'épissages du récepteur μ présents chez l'humain. Seuls les variants d'épissage donnant lieu à des récepteurs à 7TM ont été représentés. Adapté de Pasternak et Pan 2013

III. Les peptides opioïdes endogènes

Les peptides opioïdes endogènes sont généralement répartis en 3 classes principales : les endorphines, les enképhalines et les dynorphines, dont les précurseurs respectifs sont la pro-opiomélanocortine, la pro-enképhaline et la pro-dynorphine. Ces peptides, bien que de taille variable, sont pour la majorité caractérisés par la présence d'un motif Tyr-Gly-Gly-Phe qui leur confère leur sélectivité de liaison aux récepteurs opioïdes. En outre, l'existence d'une quatrième famille de peptide endogène, les endomorphines, a été proposée bien qu'aucun précurseur n'ait été identifié. Si on considère également la nociceptine/orphanine FQ, peptide endogène liant préférentiellement le récepteur NOP, on décompte au moins 25 peptides endogènes issus du clivage de ces pro-peptides (Margolis *et al.*, 2023). Bien que chaque famille de peptide endogène ait été décrite comme ciblant préférentiellement un récepteur en particulier ; les endorphines pour μ , les enképhalines pour δ et les dynorphines pour κ , la plupart de ces ligands présentent une affinité similaire pour les 3 récepteurs opioïdes (Figure 16), (Kosterlitz, 1987; Margolis *et al.*, 2023).

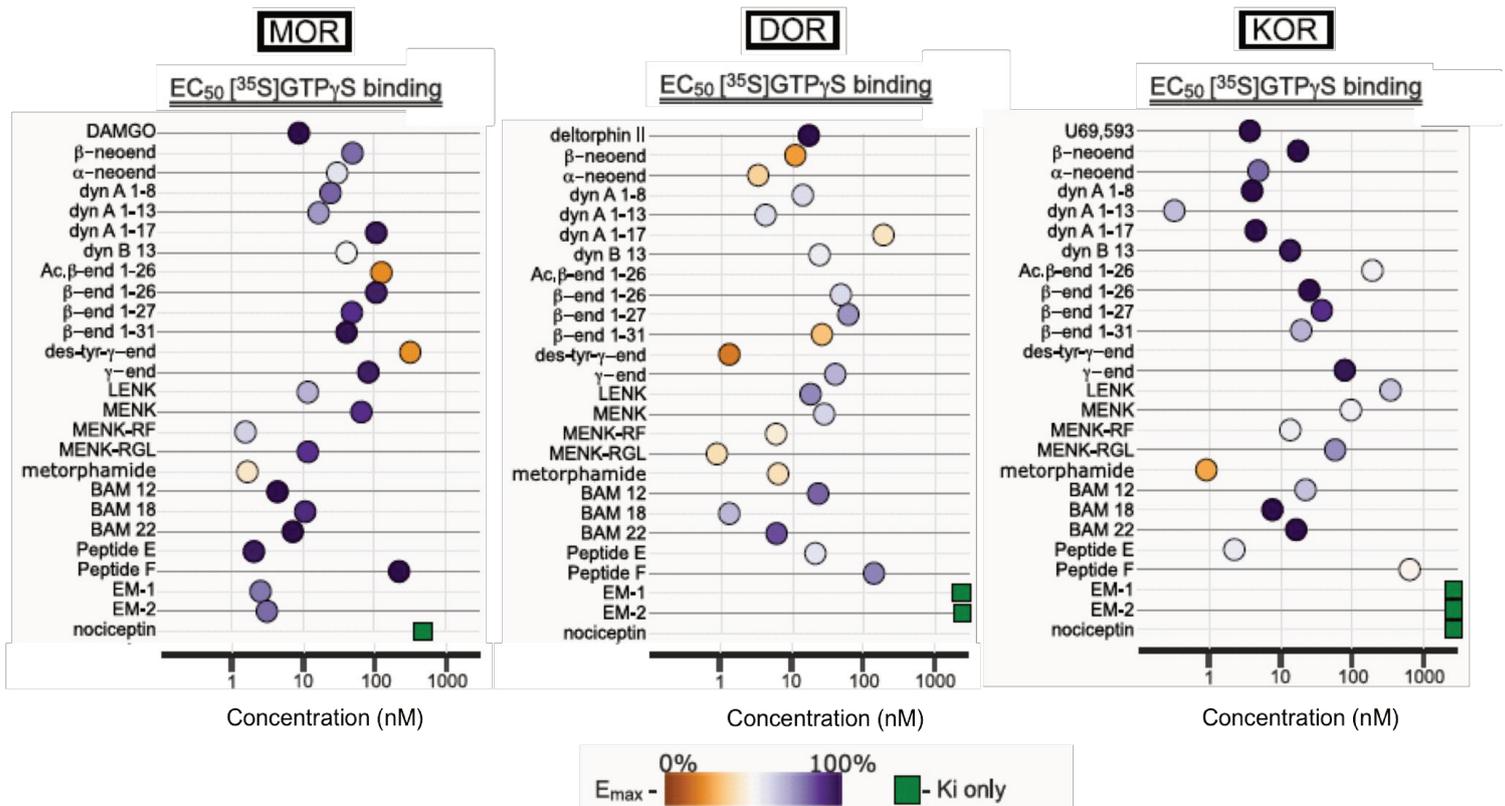


Figure 16: Liaison et activité des récepteurs opioïdes μ , δ et κ induite par les différents peptides opioïdes. La couleur indique l'efficacité relative des ligands à 10 μ M, et la position sur l'axe x indique l'EC₅₀ obtenu par des tests de GTP γ S. En absence de données, l'affinité (K_i) est représentée. Adapté de Margolis *et al.*, 2023.

Concernant la signalisation et l'internalisation, les différents peptides peuvent entraîner des réponses différentes pouvant ainsi favoriser une signalisation liée aux protéines G plutôt qu'une signalisation liée aux β -arrestines ou bien un recyclage plutôt qu'une dégradation des récepteurs internalisés, et *vice versa* (Thompson *et al.*, 2016; Margolis *et al.*, 2023). Ces réponses dépendantes des ligands ont aussi été observées pour des ligands exogènes. Par ailleurs, les peptides opioïdes sont aussi capables d'activer des récepteurs non-opioïdes dont des récepteurs de la bradykinine, de chimiokines mais aussi les canaux **NMDA** (N-méthyl D-Aspartate), (Palmer *et al.*, 2022).

1. Pro-enkephaline

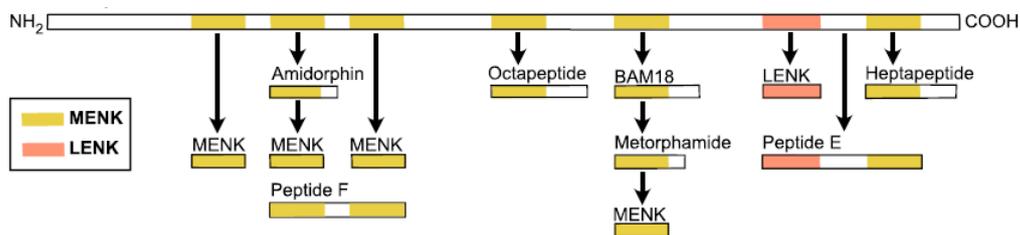


Figure 17 : Schéma représentant les différents peptides issus du clivage de la pro-enképhaline. Les séquences correspondant à la met-enképhaline (MENK) et à la leu-enképhaline (LENK) sont également représentées (Margolis 2023)

La pro-enképhaline (243 acides aminés) est le précurseur principal de la Met-enképhaline (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) peptide pour lequel elle possède 6 copies, mais aussi de la Leu-enképhaline (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) dont elle possède 1 copie. Parmi les 6 copies de Met-enképhaline, 4 possèdent les sites de clivages nécessaires à l'action des peptidases, à savoir des motifs dibasiques généralement composés de lysines (K) et/ou d'arginines (R), (Yoshikawa *et al.*, 1984). D'autres peptides plus longs peuvent également être issus du clivage de ce pro-peptide dont l'heptapeptide Met-enképhaline-Arg-Phe, l'octapeptide Met-enképhaline-Arg-Gly-Leu, BAM-18, la metorphamine, l'amidorphine ainsi que les peptides E et F (Figure 17), (Margolis *et al.*, 2023). Tous ces peptides peuvent activer les récepteurs opioïdes cependant pour la plupart, leur rôle physiologique n'a pas été évalué.

2. Pro-dynorphine

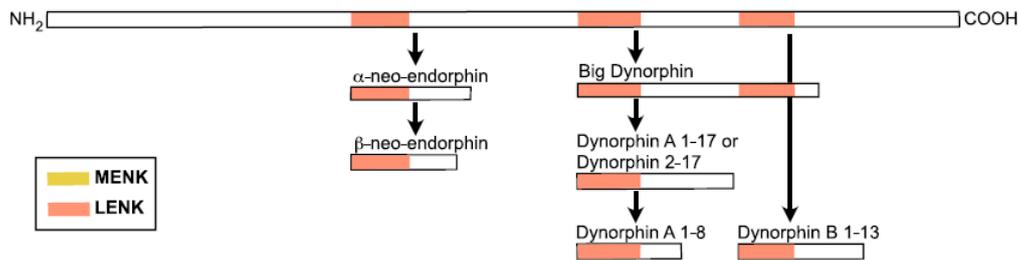


Figure 148 : Schéma représentant les différents peptides issus du clivage de la pro-dynorphine. Les séquences correspondant à la leu-enképhaline (LENK) sont également représentées (Margolis 2023)

La pro-dynorphine (256 acides aminés) est le précurseur des dynorphines. Parmi les différents peptides issus de ce pro-peptide, on trouve les dynorphines A1-8, A 1-17, B1-13, 2-17, la « grande » dynorphine et les néo-endorphines α et β (Figure 18). La pro-dynorphine contient 3 copies de la séquence de la Leu-enképhaline ainsi que les sites nécessaires à leur clivage. Cependant, bien qu'une production de Leu-enképhaline à partir de la pro-dynorphine ait été décrite dans la *substantia nigra* (Christensson-Nylander *et al.*, 1986) il semble que la vaste majorité de la Leu-enképhaline provienne de la pro-enképhaline (Margolis *et al.*, 2023).

3. Pro-opiomélanocortine

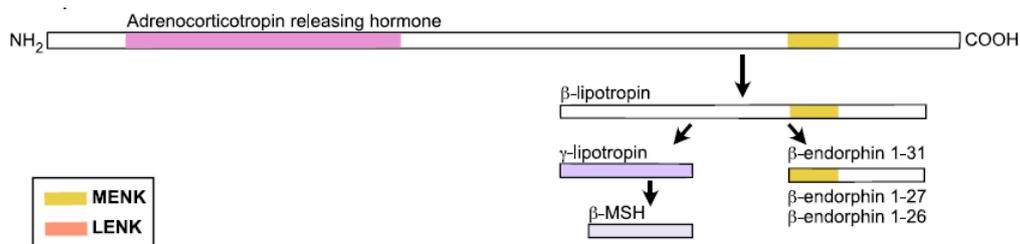


Figure 159 : Schéma représentant les différents peptides issus du clivage de la POMC. Les séquences correspondant à la met-enképhaline (MENK) sont également représentées (Margolis *et al.*, 2023)

La Pro-opiomélanocortine (POMC) est un pro-peptide de 241 acides aminés qui contient les séquences de plusieurs peptides opioïdes mais pas uniquement. De son clivage sont issues les β-endorphines, mais aussi des hormones : la MSH (*melanocyte stimulating hormone*) impliquée dans la synthèse de mélanine et l'ACTH (*adrenocorticotropic hormone*) impliquée dans la sécrétion de cortisol. Parmi ces peptides, seules les β-endorphines possèdent une affinité pour les récepteurs opioïdes. On en décompte 3 différentes, la β-endorphine 1-31, considérée comme la β-endorphine par excellence, mais aussi les β-endorphines 1-27 et 1-26. Par ailleurs,

bien que la β -endorphine possède une copie de la séquence de la Met-enképhaline, cette dernière ne peut pas être issue de la POMC du fait de l'absence des sites de clivages nécessaires (Margolis *et al.*, 2023).

4. Distribution

Les populations neuronales en mesure de synthétiser la POMC se situent dans le noyau arqué de l'hypothalamus impliqué dans la prise alimentaire, et dans le noyau du tractus solitaire (**NTS**, *nucleus tractus solitarii*) impliqué dans l'homéostasie (Jacobowitz & O'Donohue, 1978; Le Merrer *et al.*, 2009). Les neurones exprimant la pro-enképhaline et la pro-dynorphine, sont quant à eux distribués largement à travers tout le système nerveux (Le Merrer *et al.*, 2009; Margolis *et al.*, 2023). Par ailleurs, leur expression est accrue en condition de douleur chronique (Xu *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2008; Podvin *et al.*, 2016).

IV. Signalisation et trafic intracellulaire

1. Signalisation liée aux protéines G

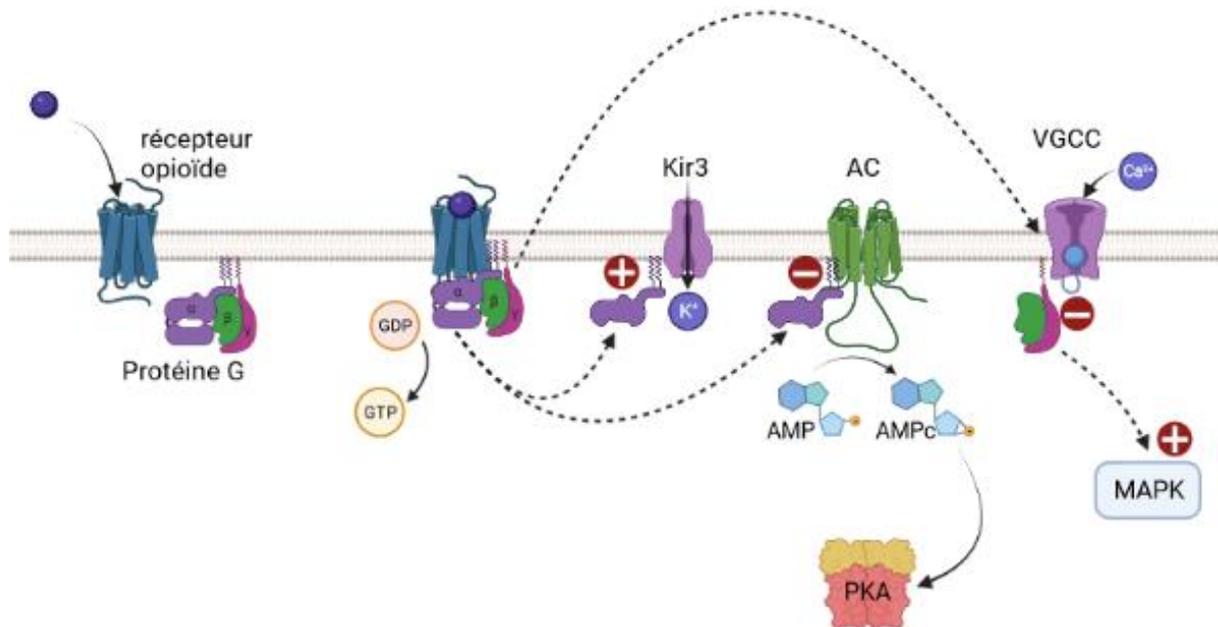


Figure 20: Signalisation des récepteurs opioïdes liés aux protéines G. Lorsqu'un agoniste se fixe au récepteur opioïde, celui-ci passe en conformation active favorisant le recrutement des protéines G. L'activation des protéines G va entraîner la dissociation des sous unités α des sous unités $\beta\gamma$. Les sous unités α vont activer les canaux potassiques à rectification entrante (Kir3), et inhiber l'adénylate cyclase (AC) entraînant une diminution du taux d'AMP cyclique (AMPC) et donc l'activation de la protéine kinase A (PKA). D'un autre côté les sous-unités $\beta\gamma$ vont inhiber les canaux calciques voltage-dépendants (VGCC) et activer les voies des kinases activées par les signaux mitogènes (MAPK).

Les récepteurs opioïdes sont couplés à des protéines $G_{\alpha i/o/z}$ inhibitrices. La liaison d'un agoniste dans la poche de liaison du récepteur entraîne le changement de conformation de celui-ci et va conduire à l'activation des protéines G. Les protéines G sont constituées de trois sous unités α , β et γ . A l'état basal, la sous unité α est liée au **GDP** (guanosine diphosphate), et est étroitement liée aux sous unités $\beta\gamma$. Le changement conformationnel du récepteur, consécutif à son activation par un ligand, va à son tour modifier la conformation de la sous-unité α , réduisant son affinité pour le GDP qui est alors remplacé par un **GTP** (guanosine triphosphate). La liaison du GTP va avoir pour conséquence la dissociation de la sous-unité α , des sous unités $\beta\gamma$, mais aussi la dissociation des sous-unités du récepteur. Cette dissociation permet l'interaction des sous-unités avec leurs effecteurs. La sous-unité α possède une activité GTPase intrinsèque qui va finalement mener à l'hydrolyse du GTP en GDP. Les sous-unités $\alpha_{i/o/z}$, vont avoir pour principal effet d'inhiber l'adénylate cyclase diminuant ainsi la production d'**AMP**

(adénosine monophosphate) cyclique. Cette diminution d'AMP cyclique va diminuer l'activité de la protéine kinase A (**PKA**) indispensable pour la phosphorylation de canaux calciques, l'influx de calcium sera donc diminué. Par ailleurs, dans le cas des récepteurs opioïdes, la sous-unité α va également activer les canaux potassiques à rectification entrante **K_{ir}3**. Les sous unités $\beta\gamma$ vont quant à elles directement inhiber les canaux calciques activés par le voltage (**VGCC**). Ensemble, ces mécanismes participent à l'hyperpolarisation du neurone portant les récepteurs opioïdes (Al-Hasani & Bruchas, 2011). Il convient de préciser que d'autres effecteurs sont également affectés par ces sous unités $\beta\gamma$, en effet, les kinases activées par les signaux mitogènes (**MAPK**) et plus particulièrement les kinases régulées par les signaux extracellulaires (**ERK1/2**) sont activées par ces sous unités et pourraient être impliquées dans des adaptations à plus long terme (Al-Hasani & Bruchas, 2011).

2. Désensibilisation et internalisation

Suite à l'activation du récepteur par un agoniste menant à la signalisation décrite ci-dessus, le RCPG va être découplé des protéines G menant ainsi à sa désensibilisation. Lors de ce processus, les sérines et thréonines des parties intracellulaires du récepteur, et plus particulièrement de la queue C-terminale, vont être phosphorylées par des kinases spécialisées : les **GRK** (*G-protein coupled Receptor Kinase*). Il existe 7 GRK différentes dans le corps humain, dont 5 se retrouvent dans le cerveau (GRK2, 3, 4, 5, 6), (Pitcher *et al.*, 1998). Les GRK2/3 semblent impliquées dans la primo-phosphorylation des récepteurs, phosphorylation qui permet alors la phosphorylation de résidus additionnels par les autres GRKs (Lemel *et al.*, 2020). La protéine kinase C (**PKC**) et la protéine kinases Ca²⁺/calmoduline-dépendante (**CaMKII**) interviennent aussi dans les processus de phosphorylation de ces récepteurs (Wang & Wang, 2006). Le récepteur μ possède 11 sites de phosphorylation au niveau de son extrémité C-terminale, la phosphorylation de la Ser375 est indispensable pour la phosphorylation des autres résidus (El Kouhen *et al.*, 2001). Le récepteur δ quant à lui possède 7 sites de phosphorylation supposés au niveau de son extrémité C-terminale, avec la Ser363 comme site primaire de phosphorylation (Lemel *et al.*, 2020). La phosphorylation va favoriser et stabiliser

l'interaction des β -arrestines avec le récepteur. La liaison de la β -arrestine va créer une barrière physique empêchant le couplage des protéines G au récepteur.

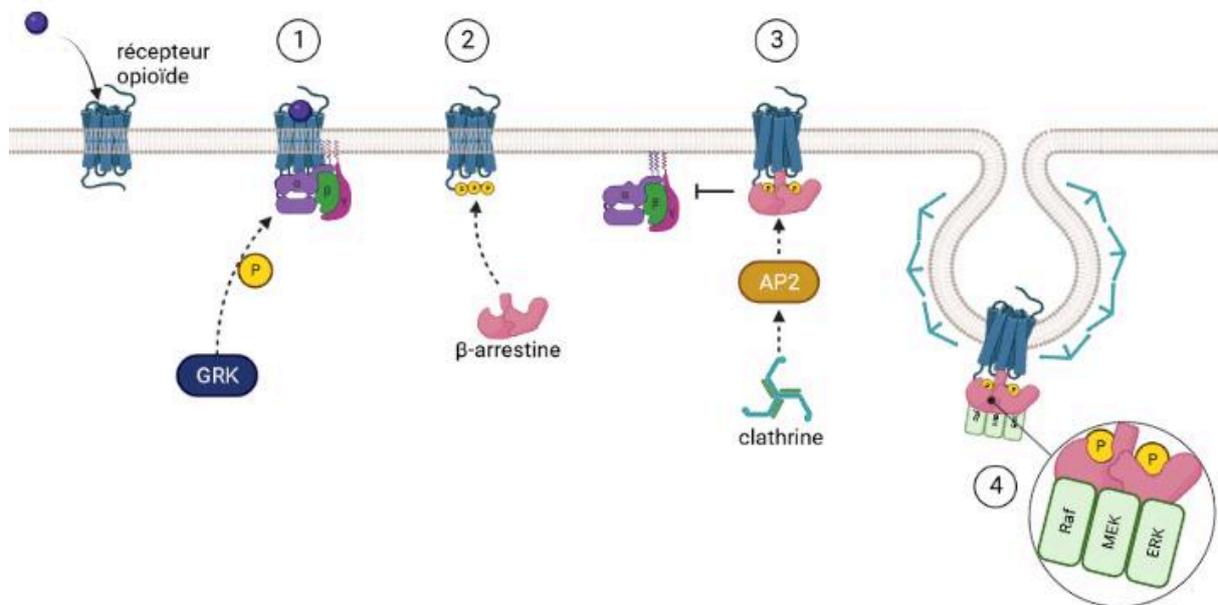


Figure 21: Désensibilisation, internalisation et signalisation secondaire. (1) la phosphorylation d'un récepteur opioïde par les GRK permet (2) le recrutement de la β -arrestine sur le récepteur et entraîne (3) une désensibilisation en empêchant la signalisation liée aux protéines G. La fixation de la β -arrestine initie l'internalisation du récepteur grâce aux protéines adaptatrices AP2 et à la clathrine. Le complexe récepteur- β -arrestine ainsi internalisé peut entraîner (4) une signalisation secondaire due à la liaison des MAPK aux β -arrestines.

L'interaction de la β -arrestine avec le récepteur va entraîner un changement de conformation et ainsi permettre l'interaction coordonnée de la β -arrestine avec les protéines adaptatrices 2 (AP2), les clathrines et les phosphoinositides (Tian *et al.*, 2014). Ensemble, ils vont avoir pour conséquence l'endocytose rapide des récepteurs dans des vésicules de clathrines. On parle d'internalisation des récepteurs. Suite à cette dernière, les récepteurs vont pouvoir suivre 2 voies différentes. Le récepteur δ est dégradé dans les lysosomes (Tsao & von Zastrow, 2000) tandis que les récepteurs μ et κ sont recyclés à la membrane plasmique (Li *et al.*, 2002; Tanowitz & von Zastrow, 2003; von Zastrow, 2010). Deux mécanismes particuliers ont été avancés comme régulant ce recyclage/dégradation : (1) la liaison covalente d'ubiquitine au récepteur comme initiant la dégradation (2) la présence d'une séquence LENLEAE au niveau de la queue C-terminale du récepteur μ comme moteur du recyclage (Tanowitz & von Zastrow, 2003; von Zastrow, 2010). Lors de l'internalisation, une signalisation secondaire liée aux MAPK a également été décrite, la plus étudiée étant la voie ERK1/2 (Al-Hasani & Bruchas, 2011).

Ensemble, la phosphorylation et l'internalisation participent au phénomène de désensibilisation du récepteur, processus par lequel la réponse des récepteurs à un stimulus est réduite. Le recyclage des récepteurs va de son côté participer à la resensibilisation, c'est-à-dire au rétablissement de la réponse des récepteurs suite à un stimulus. Cette resensibilisation va être favorisée par la déphosphorylation des récepteurs lors du processus de recyclage et par leur réinsertion à la membrane plasmique. La dégradation des récepteurs dans les lysosomes participe quant à elle au phénomène de régulation négative (*down-regulation*) des récepteurs en diminuant la quantité totale de récepteur présents dans une cellule.

V. Distribution au sein du système nerveux

Les récepteurs opioïdes μ , δ et κ sont distribués largement à travers tout le système nerveux central et périphérique (Le Merrer *et al.*, 2009; Erbs *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2020). Dans les neurones, les récepteurs opioïdes peuvent être localisés au niveau du soma mais aussi des éléments post- ou pré-synaptiques (Olive *et al.*, 1997; Reeves *et al.*, 2022). Ainsi, les récepteurs localisés au niveau post-synaptique ou au niveau du soma vont inhiber la neurotransmission directement en hyperpolarisant le neurone et ceux situés au niveau pré-synaptique en inhibant la libération de neurotransmetteurs excitateurs ou inhibiteurs (Reeves *et al.*, 2022).

1. Les récepteurs μ et δ dans le circuit de la douleur

Les récepteurs opioïdes, et plus particulièrement les récepteurs μ et δ sont exprimés dans la grande majorité des structures du circuit de la douleur. Ainsi, on les retrouve dans les neurones somatosensoriels primaires des ganglions rachidiens, dans la corne dorsale de la moelle épinière mais aussi dans les structures supraspinales (Zhu *et al.*, 1998; Corder *et al.*, 2018). Lorsqu'ils sont localisés sur les fibres afférentes primaires, l'activation de ces récepteurs diminue la neurotransmission excitatrice au niveau de la moelle épinière, et en conséquence, diminue la nociception. La distribution des récepteurs μ et δ parmi les différentes populations de fibre afférentes primaires est encore sujet à controverse. Les premières études utilisant des anticorps directement dirigés contre μ et δ , décrivent ces récepteurs comme tout exprimés dans les fibres C (Arvidsson *et al.*, 1995a; b). Des études plus récentes ont par ailleurs conforté cette hypothèse en utilisant des techniques d'hybridation *in situ* et de PCR (Wang *et al.*, 2010). D'un autre côté, des études utilisant des souris *knock-in* chez lesquelles le récepteur δ est fusionné avec une GFP (*Green fluorescent protein* ; protéine fluorescente verte) affirment au contraire que les récepteurs μ et δ sont exprimés principalement par des populations distinctes de fibres afférentes primaires bien qu'une proportion non négligeable soit co-exprimés dans les mêmes

neurones (Scherrer *et al.*, 2009; Bardoni *et al.*, 2014; Erbs *et al.*, 2015). Le récepteur μ serait exprimé en grande majorité dans des fibres C peptidergiques exprimant le récepteur TRPV1 sensible à la chaleur (Caterina *et al.*, 2000), et le récepteur δ dans des fibres myélinisées ($A\beta$ ou $A\delta$) et des fibres C non-peptidergiques. A noter que 17% (Scherrer *et al.*, 2009) des neurones sensoriels primaires expriment le récepteur δ et que 5% (Scherrer *et al.*, 2009; Bardoni *et al.*, 2014) ou 37% (Erbs *et al.*, 2015) de ces neurones co-exprimeraient le récepteur μ . A l'inverse un tiers des neurones exprimant le récepteur μ co-exprimeraient le récepteur δ (Erbs *et al.*, 2015).

Les récepteurs opioïdes sont aussi exprimés par des neurones nociceptifs secondaires dont le corps cellulaire est localisé dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les récepteurs μ et δ sont exprimés dans des populations distinctes d'interneurones excitateurs, et sont co-exprimés dans les neurones de projections situés de la lamina I (Wang *et al.*, 2018; Corder *et al.*, 2018).

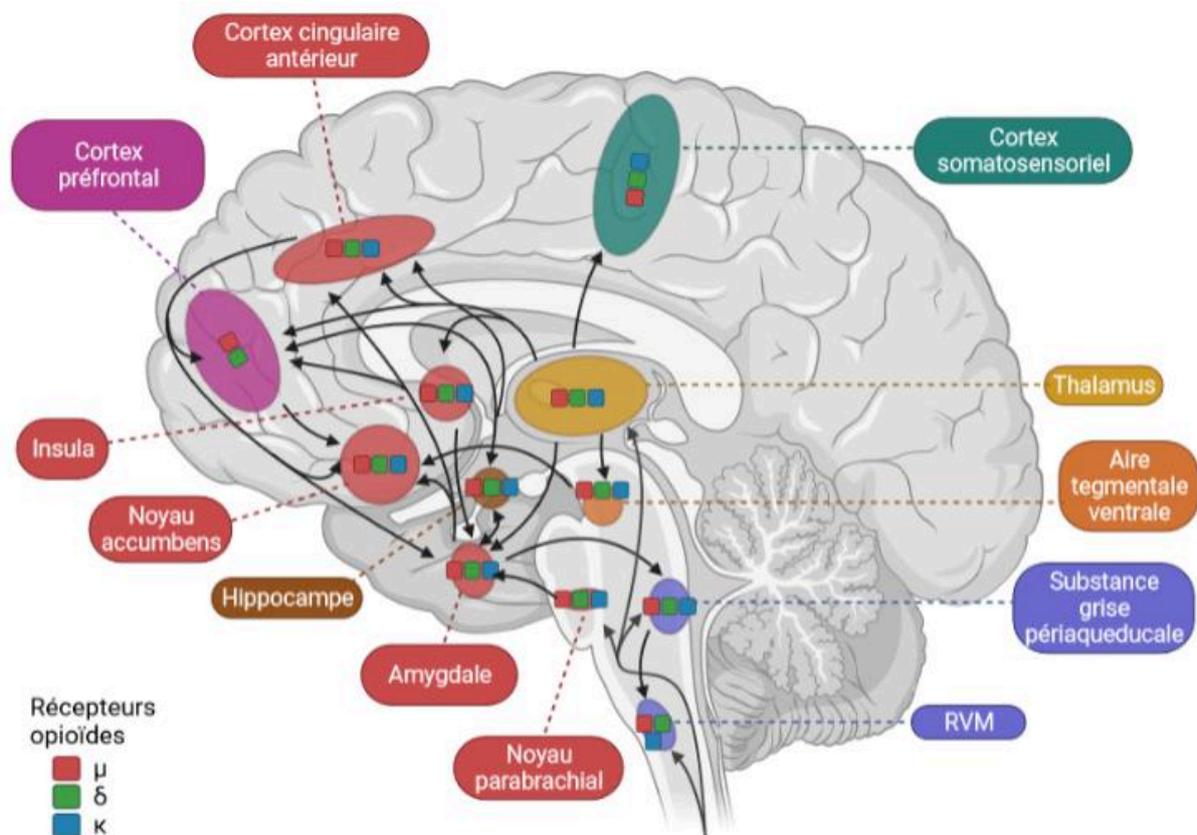


Figure 22: expression des récepteurs opioïdes dans les structures supraspinales du circuit de la douleur. Les structures participant à l'interprétation du message nociceptif forment un réseau largement interconnecté. Les récepteurs opioïdes sont exprimés dans la quasi-totalité de ces structures permettant une régulation de la douleur à divers niveaux (d'après Corder *et al.*, 2018).

Au niveau des structures supraspinales, les récepteurs μ et δ sont largement exprimés dans les structures des contrôles descendants de la douleur, à savoir la PAG et la RVM, mais aussi dans les structures impliquées dans ses aspects sensori-discriminatifs, cognitifs et émotionnels (Corder *et al.*, 2018).

2. Les récepteurs μ et δ dans les contrôles descendants

L'implication du récepteur μ dans les contrôles descendants de la douleur est connue depuis longtemps. En effet, des études menées au début des années 90 ont montrées que l'injection d'agonistes du récepteur μ directement dans la RVM ou la PAG induit une antinociception (al-Rodhan *et al.*, 1992; Rossi *et al.*, 1994).

Les neurones de projection de la PAG vers la RVM expriment le récepteur μ . Ils reçoivent entre autres des afférences dynorphinergiques en provenance de l'amygdale et endorphinergiques en provenance de l'hypothalamus. Les récepteurs μ sont aussi exprimés sur

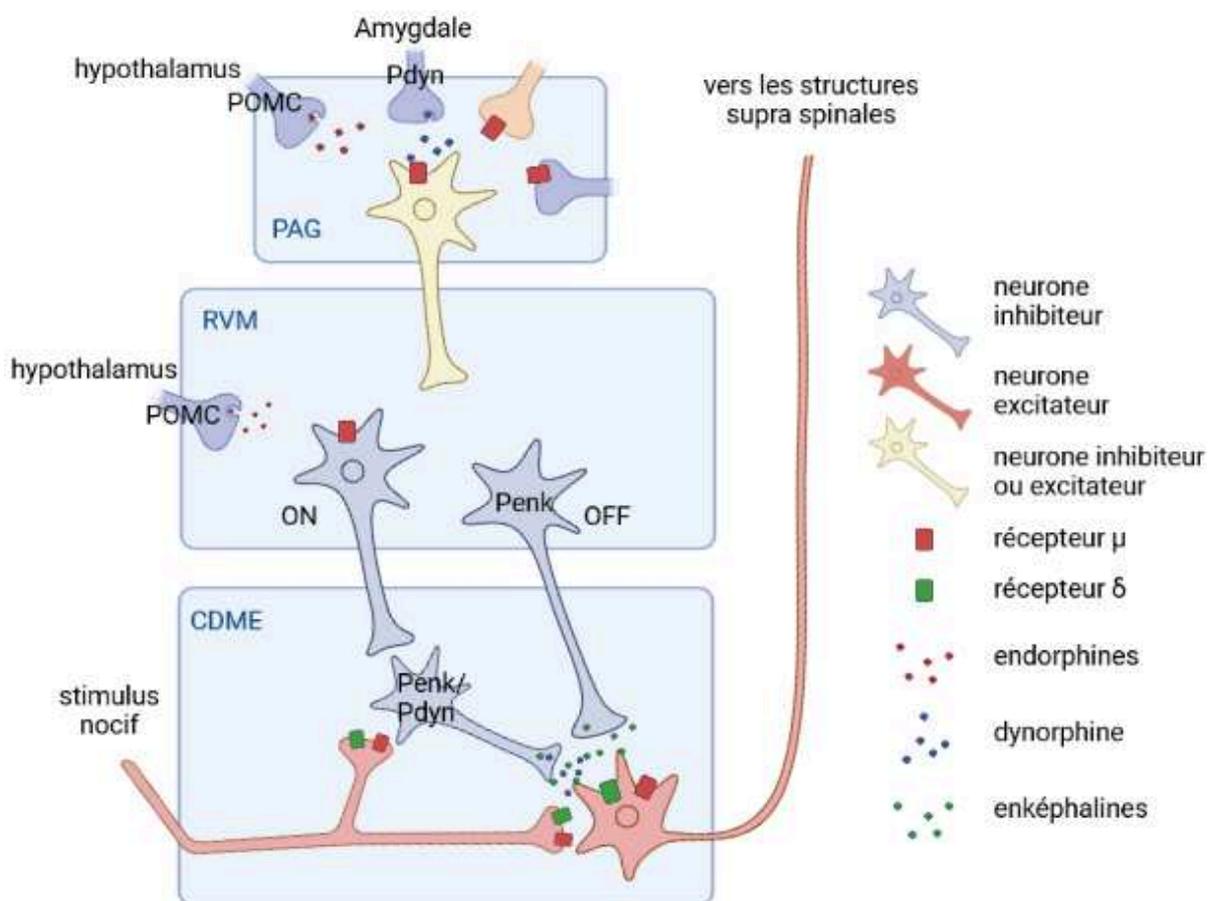


Figure 23: Influence du système opioïde endogène dans les contrôles descendants.

les terminaisons présynaptiques arrivant dans la PAG modulant la libération de

neurotransmetteurs (Reeves *et al.*, 2022). Dans la RVM, les neurones sont classés en 3 catégories, les neurones ON, pro-nociceptifs et directement sensibles aux opioïdes, les neurones OFF, antinociceptifs et les neurones neutres (Fields *et al.*, 1983). Les cellules ON GABAergiques expriment le récepteur μ et projettent dans la moelle épinière pour inhiber les interneurons inhibiteurs et ainsi faciliter la transmission du message nociceptif. L'activation dans ces neurones du récepteur μ va ainsi entraîner une levée d'inhibition, empêchant ainsi la facilitation de la douleur (François *et al.*, 2017). D'un autre côté les cellules OFF GABAergiques et enképhalinergiques provenant de la RVM n'expriment pas le récepteur μ et projettent dans la moelle épinière pour inhiber directement les neurones nociceptifs primaires et secondaires et donc inhiber la transmission du message nociceptif. En effet, la libération d'enképhalines active les récepteurs μ et δ présents sur les terminaisons des fibres afférentes inhibant la libération de neurotransmetteur, mais aussi ceux présents sur les neurones de projection diminuant ainsi l'excitabilité du neurone (Zhang *et al.*, 2015; Corder *et al.*, 2018).

VI. Récepteur δ , douleurs chroniques et comorbidités

Bien que le récepteur μ soit considéré comme le récepteur opioïde le plus important quand il s'agit de soulager la douleur, des recherches sur le récepteur δ ont mis en lumière son potentiel dans le traitement de douleurs chroniques. En effet, les agonistes du récepteur δ induisent une analgésie robuste principalement en conditions de douleurs chroniques inflammatoires ou neuropathiques, mais aussi en cas d'auras migraineuses (Berthiaume *et al.*, 2020). Si on s'intéresse plus particulièrement à la douleur neuropathique, la deltorphine II, agoniste sélectif des récepteur δ , soulage l'hyperalgésie et l'allodynie au froid dans un modèle de rats CCI (Holdridge & Cahill, 2007). D'autres agonistes δ comme le SNC80 ou le DSLET soulagent quant à eux l'allodynie mécanique dans un modèle de **SNL** (*sciatic nerve ligation*) chez le rat (Obara *et al.*, 2009). De surcroît, ils ont des effets anxiolytiques (Perrine *et al.*, 2006; van Rijn *et al.*, 2010) et antidépresseurs (Broom *et al.*, 2002; Saitoh *et al.*, 2004), ce qui suggère qu'ils pourraient également exercer un effet bénéfique sur l'anxiété et la dépression, deux comorbidités fréquentes de la douleur neuropathique (Vicente-Sanchez *et al.*, 2016). Les agonistes ciblant le récepteur opioïde δ sont dépourvus de la plupart des effets indésirables associés aux récepteurs μ tels que la dépression respiratoire, la constipation, la sédation ou les effets récompensants, bien que pour certains, leur administration répétée s'accompagne de tolérance analgésique et de convulsions. A noter que la tolérance analgésique est diminuée par l'utilisation d'agonistes entraînant une faible internalisation voire même un recyclage du récepteur δ (Audet *et al.*, 2012; Berthiaume *et al.*, 2020).

VII. Interactions entre récepteurs opioïdes

Les récepteurs opioïdes peuvent interagir et s'influencer entre eux au niveau cellulaire, au niveau des réseaux mais aussi au niveau moléculaire. En effet, les récepteurs opioïdes peuvent s'associer pour former une nouvelle entité nommée hétéromère.

Un hétéromère est un complexe protéique, formé par l'association physique d'au moins deux récepteurs fonctionnels différents. Ce complexe présente des propriétés fonctionnelles spécifiques et différentes de celles des récepteurs individuels.

Ainsi, les hétéromères sont composés de récepteurs différents, en opposition aux homomères qui sont composés de récepteurs identiques. Par ailleurs, il est important de souligner que bien que la vaste majorité des études représentent les hétéromères comme une association de deux récepteurs, ils peuvent être constitués de plus de deux récepteurs. Les hétéromères sont également différents des hétérodimères. En effet, les hétérodimères sont formés par l'association de deux récepteurs qui sont non-fonctionnels lorsqu'ils sont seuls. C'est notamment le cas pour des RCPG de classe C tels que les récepteurs GABA_B dont la fonctionnalité nécessite la présence de deux récepteurs distincts GABA_{B1} et GABA_{B2} (Jones *et al.*, 1998). Les hétéromères doivent également présenter des propriétés fonctionnelles (pharmacologie, liaison des ligands, signalisation, internalisation, etc.) spécifiques, c'est à dire qui soient différentes, au moins en partie, des propriétés des récepteurs qui les composent.

Dans le cas des récepteurs opioïdes et plus généralement des RCPG de classe A, la première démonstration d'une hétéromérisation a été effectuée pour les hétéromères δ - κ en cellules co-transfectées (Jordan & Devi, 1999). Depuis lors, de multiples études en cellules co-transfectées ont suggéré l'existence de plus de 35 hétéromères différents, impliquant les récepteurs opioïdes μ , δ et κ (Borroto-Escuela *et al.*, 2014). Cependant, la démonstration de l'existence d'hétéromères in-vivo est bien moins aisée et est régie par trois critères : (1) l'association physique des récepteurs doit être démontrée, (2) les hétéromères doivent présenter des propriétés fonctionnelles propres, (3) ces propriétés disparaissent si on dissocie l'hétéromère (Pin *et al.*, 2007). A ce jour, l'ensemble de ces critères ont été réunis pour moins d'une dizaine d'hétéromères impliquant les récepteurs opioïdes. Parmi-eux, l'hétéromère δ -CB1 a attiré notre attention à la vue de son rôle dans la douleur neuropathique. Nous nous sommes également intéressés aux hétéromères μ - δ compte tenu de leur rôle bien décrit dans la douleur.

3. Les Hétéromères μ - δ

A. Distribution neuroanatomique

La proximité physique μ - δ a été mise en évidence dans les ganglions rachidiens, la moelle épinière, l'hippocampe et le noyau accumbens (Fig. 9). Cependant, la cartographie cérébrale des récepteurs a révélé une co-expression neuronale dans des structures essentielles à la perception et au traitement des stimuli aversifs, suggérant ainsi que l'hétéromérisation μ - δ pourrait être plus largement distribuée. Par ailleurs, l'administration répétée de morphine augmente la co-expression neuronale des récepteurs μ et δ ainsi que leur hétéromérisation dans ces mêmes circuits (Gaborit & Massotte, 2023). Cette augmentation coïncide avec une expression accrue du récepteur δ au niveau de la membrane plasmique, suggérant que dans d'autres états où la présence de récepteurs δ à la surface est accrue, comme la douleur chronique, la densité d'hétéromères μ - δ pourrait également être affectée (Quirion *et al.*, 2020).

B. Propriétés fonctionnelles

Une coopérativité positive a été mise en évidence dans les neuroblastomes SKNSH, où la liaison d'un ligand à l'un des récepteurs augmente l'affinité des agonistes pour l'autre (Fig. 10a) (Gomes *et al.*, 2000, 2004). Cette coopérativité positive conduit à une augmentation significative de la puissance et/ou de l'efficacité des agonistes μ en termes de signalisation des protéines G (Gomes *et al.*, 2004), de phosphorylation des protéines kinases associées à des signaux mitogènes (MAPK) (Gomes *et al.*, 2000) ou d'inhibition des canaux calciques voltage dépendants (Walwyn *et al.*, 2009). Ces effets disparaissent en l'absence du récepteur δ (Gomes *et al.*, 2004; Walwyn *et al.*, 2009) ou en présence d'anticorps spécifiques des hétéromères μ - δ (Gupta *et al.*, 2010).

Une modification du devenir intracellulaire du récepteur μ a également été décrite lorsque celui-ci est associé avec le récepteur δ . Habituellement recyclé à la membrane plasmique, le récepteur μ est co-dégradé dans les lysosomes avec le récepteur δ suite à l'administration de CYM51010, un agoniste présentant une sélectivité partielle pour les hétéromères μ - δ (Derouiche *et al.*, 2020). L'administration de DAMGO ou de deltorphine II, deux ligands ciblant les hétéromères, entraîne également un changement du devenir intracellulaire du récepteur μ en culture primaire d'hippocampe lorsqu'il est co-exprimé avec le récepteur δ dans les mêmes neurones (Figure 10b), (Derouiche *et al.*, 2020). Par ailleurs, ces deux derniers ligands induisent une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 lié aux β arrestines (Figure. 10c). Phosphorylation qui est absente dans des cellules prétraitées par un

ARN interférent ciblant le récepteur μ ou en présence d'un antagoniste μ ou δ (Rozenfeld & Devi, 2007).

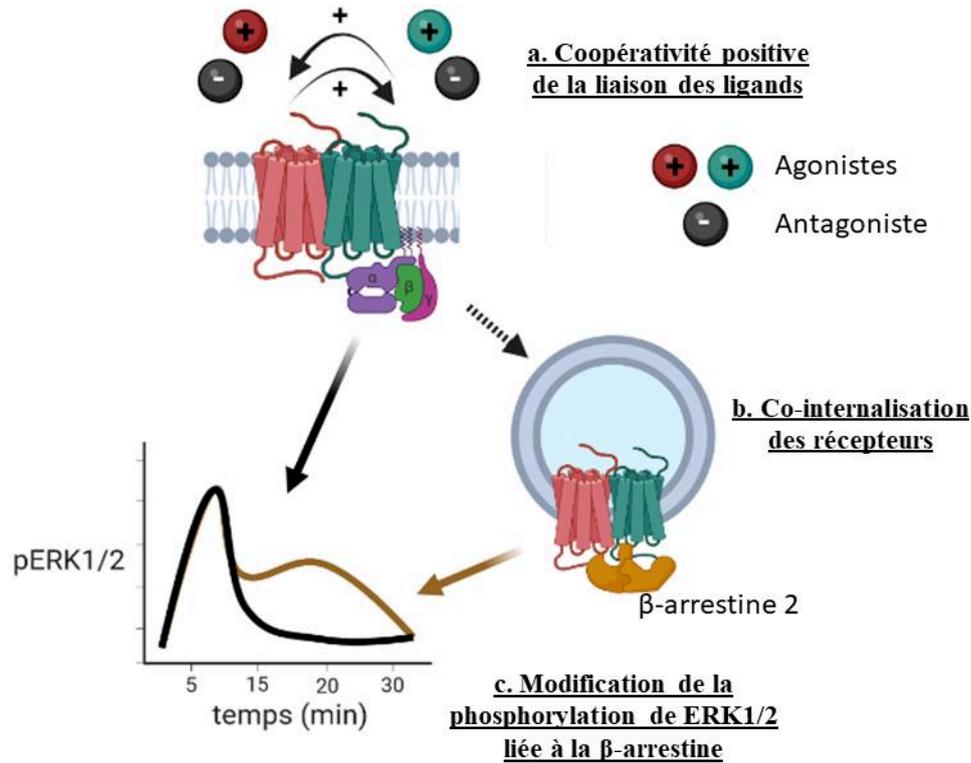


Figure 24 : Propriétés fonctionnelles des hétéromères μ - δ . (a) La liaison d'un ligand, à un récepteur facilite la liaison d'un agoniste à l'autre récepteur ce qui traduit une coopérativité positive. (b) L'activation des hétéromères μ - δ par un agoniste sélectif entraîne leur co-intériorisation et leur co-dégradation. (c) L'intériorisation s'accompagne d'une modification de la cinétique de phosphorylation de ERK1/2.

C. Implication dans la douleur

L'implication des hétéromères μ - δ dans la nociception thermique et mécanique a été démontrée en partie grâce à des ligands permettant le ciblage des hétéromères c'est-à-dire des petites molécules ou des ligands bivalents sélectifs des hétéromères. Parmi ces molécules, le CYM51010 (Gomes *et al.*, 2013; Tiwari *et al.*, 2020) et le MP135 (Faouzi *et al.*, 2020)) produisent une antinociception efficace chez l'animal naïf, ainsi que dans le cas du CYM51010, chez des souris neuropathiques traitées de façon chronique à la morphine (Tiwari *et al.*, 2020). L'effet antinociceptif du CYM51010 est inhibé par le blocage des hétéromères μ - δ par des anticorps sélectifs, suggérant une implication au moins partielle de ces derniers. Par ailleurs, le CYM51010 présente une tolérance analgésique diminuée par rapport à la morphine mais induit une dépression respiratoire similaire (Gomes *et al.*, 2013; Faouzi *et al.*, 2020). Le MP135 quant

à lui conserve des propriétés récompensantes et induit lui aussi de la dépression respiratoire (Faouzi *et al.*, 2020). Du côté des ligands bivalents, bien que le MDAN21 induise une analgésie thermique lorsqu'il est administré directement dans les ventricules cérébraux de souris (Daniels *et al.*, 2005), des tests chez les macaques rhésus ont montré qu'il était peu efficace lorsqu'administré en intra-musculaire (Aceto *et al.*, 2012). Plus récemment, le D24M, a été proposé comme un antagoniste sélectif des hétéromères μ - δ (Olson *et al.*, 2018; Keresztes *et al.*, 2022) et bloquerait l'analgésie induite par le CYM51010 (Olson *et al.*, 2018; Morgan *et al.*, 2021). Chez des souris naïves et neuropathiques, le D24M augmenterait également l'antinociception induite par l'oxymorphone, décrite par les auteurs comme un agoniste des hétéromères μ - δ (Keresztes *et al.*, 2022)

Par ailleurs, l'amélioration de l'analgésie thermique induite par une dose suboptimale de morphine en présence de l'antagoniste δ TIPP ψ pourrait être expliquée par une modulation allostérique positive de la liaison des ligands et de la signalisation du récepteur μ (Gomes *et al.*, 2004). Dans des modèles de douleur neuropathique ou inflammatoire, la dissociation de l'hétéromère μ - δ , rétablit l'hypersensibilité à la douleur chez des souris en rémission (Inyang *et al.*, 2021). Enfin, des interactions fonctionnelles entre les récepteurs μ et δ ont aussi été mises en évidence dans la RVM (Sykes *et al.*, 2007) cependant l'implication des hétéromères μ - δ n'a pas été établie.

4. Hétéromères δ -CB1

A. Distribution neuroanatomique

Le récepteur δ peut également s'associer avec le récepteur cannabinoïde de type 1 (**CB1** ; pour plus de détail sur le récepteur CB1 voir Les récepteurs cannabinoïdes). En condition basale, les hétéromères δ -CB1 ont été identifiés dans la moelle épinière et l'amygdale de souris. Par ailleurs, l'abondance des hétéromères δ -CB1 est accrue dans le cortex, l'hypothalamus et le mésencéphale de rats neuropathiques ayant subi une ligature du nerf spinal (Bushlin *et al.*, 2012) mais aussi dans la moelle épinière de souris neuropathiques par chimio-induction (Sierra *et al.*, 2019). On note aussi, une augmentation de l'abondance de ces hétéromères dans la moelle épinière de souris déficientes pour le récepteur μ , souffrant de neuropathie diabétique, et ayant reçu en plus un traitement chronique d'hémostressine, décrite par les auteurs comme soulageant l'allodynie (Toniolo *et al.*, 2022). Enfin, chez l'humain, une hétéromérisation accrue des hétéromères δ -CB1 a été observée post-mortem dans la moelle épinière de patients souffrant de neuropathie chimio-induite (Sierra *et al.*, 2019).

B. Propriétés fonctionnelles

Dans le cortex de souris naïves, la signalisation du récepteur CB1 est accrue en l'absence du récepteur δ suggérant qu'il agit comme un modulateur allostérique négatif de l'activité du récepteur CB1 (Rozenfeld *et al.*, 2012). Paradoxalement, cette modulation allostérique semble différente en condition neuropathique. En effet, dans le cortex de rats ayant subi une ligature du nerf spinal, un prétraitement avec un agoniste ou un antagoniste du récepteur CB1 augmente la liaison et la signalisation de l'agoniste δ DPDPE. Cet effet est bloqué par des anticorps sélectifs de l'hétéromère δ -CB1, ce qui suggère une modulation allostérique positive du récepteur δ au sein de l'hétéromère δ -CB1 dans ces conditions (Bushlin *et al.*, 2012).

C. Implication dans la douleur

Dans un modèle murin de neuropathie chimio-induite, la co-administration de l'agoniste CB1 Hu210 et de l'agoniste δ SNC80 réduit l'allodynie mécanique de manière synergique. Cette analgésie est abolie en présence d'anticorps spécifiques des hétéromères δ -CB1, suggérant leur implication dans l'effet observé (Sierra *et al.*, 2019). En revanche, en cas de neuropathie diabétique, l'utilisation d'agoniste CB1 n'affecte pas la signalisation du récepteur δ dans la moelle épinière. Toutefois, dans ce modèle, la présence accrue d'hétéromères δ -CB1 a été mise en évidence uniquement chez des souris n'exprimant pas le récepteur μ et pourrait résulter d'un phénomène de compensation. Ainsi, l'absence d'effet synergique pourrait révéler une expression faible, des hétéromères δ -CB1 lorsque le récepteur μ est présent (Toniolo *et al.*, 2022).

PARTIE 3 : CANNABIDIOL



Figure 25: Le Cannabidiol (CBD) ne présente pas d'effet psychomimétique contrairement au Δ^9 -THC. © T. Doudoux

Le cannabidiol ou **CBD** est un phytocannabinoïde issu de la plante *Cannabis sativa* au même titre que le **THC** (Δ^9 -Tétrahydrocannabinol), lui-même responsable de la grande majorité des effets psychomimétiques associés à la prise de cannabis (Whiting *et al.*, 2015; Bonini *et al.*, 2018). On attribue au CBD de nombreux effets bénéfiques. En effet, des études cliniques ont démontré que le CBD avait des effets bénéfiques sur l'épilepsie, la schizophrénie, l'anxiété, le sommeil et l'insomnie, le diabète, les troubles cardiovasculaires, les troubles de l'usage de substances psychoactives, la douleur ou encore le cancer (Karimi-Haghighi *et al.*, 2023; Peng *et al.*, 2022). Par ailleurs, des études précliniques ont aussi suggéré un potentiel thérapeutique du CBD dans la dépression, les troubles de stress post-traumatique, la maladie d'Alzheimer, ou encore dans la maladie de Parkinson notamment grâce à ses effets neuroprotecteurs (Premoli *et al.*, 2019). Ces nombreux effets bénéfiques, bien que pour beaucoup étudiés uniquement dans des modèles précliniques, ont ouvert la porte à un commerce florissant du CBD. En France, il est vendu sous des formes aussi diverses que de l'huile, des infusions, des cosmétiques ou même des bonbons, par des enseignes prônant ses nombreuses vertus. A ce jour, le seul traitement constitué exclusivement de CBD est l'Epidiolex. Il a été approuvé par l'Agence fédérale américaine des produits alimentaires et

médicamenteux (FDA) en 2018 pour traiter les syndromes épileptiques de Dravet et de Lennox-Gastaut (Abu-Sawwa *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2022). Le Sativex, quant à lui composé en quantité égales de CBD et de THC, est recommandé par la Haute Autorité de Santé (HAS) comme traitement d'appoint de la spasticité chez les personnes atteintes de sclérose en plaque (Meuth *et al.*, 2015). Cependant, malgré un intérêt thérapeutique certain, les mécanismes pharmacologiques qui sous-tendent l'action du CBD sont encore mal connus. En effet, le CBD interagit non seulement avec le système endocannabinoïde mais également avec les récepteurs de la sérotonine, du GABA, ou encore les récepteurs TRP. Au total, c'est près d'une trentaine de cibles pharmacologiques qui ont été identifiées à ce jour (Castillo-Arellano *et al.*, 2023).

I. Les phytocannabinoïdes

1. Origine

Les phytocannabinoïdes sont des métabolites spécialisés identifiés à l'origine dans la plante *Cannabis sativa L.* Cette dernière est une plante herbacée originaire d'Asie centrale et utilisée au fil des siècles pour ses propriétés médicinales et psychotropes mais aussi comme source de fibres, d'huile ou de nourriture. Les phytocannabinoïdes y sont synthétisés et stockés dans les trichomes glandulaires localisés pour la majorité sur les parties aériennes des plants femelles (Bonini *et al.*, 2018). La présence des phytocannabinoïdes a également été mise en évidence dans de nombreuses plantes à fleurs, comme les rhododendrons mais aussi dans les hépatiques, un type de plante apparenté aux mousses, et certains champignons (Gülck & Møller, 2020).



Figure 26: *Cannabis Sativa* (panneau gauche) et agrandissement des trichomes (panneaux droits) riches en phytocannabinoïdes et présents sur les parties aériennes de la plante (Bonini 2018).

2. Diversité

Du point de vue moléculaire, ce sont des méroterpénoïdes particulièrement lipophiles, composés en général de 21 à 22 atomes de carbone et qui contiennent le plus souvent une chaîne latérale propyl ou pentyl (Hanuš *et al.*, 2016; Gülck & Møller, 2020). Ils sont classifiés en fonction du terpénoïde dont ils sont issus, mais aussi de leur chaîne latérale principale. Ainsi, 10 types de phytocannabinoïdes ont été identifiés : cannabigérol (CBG), cannabichromène (CBC), cannabidiol (CBD), (-)- Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THCs), (-)- Δ^8 -trans-tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THCs), cannabicyclol (CBL), cannabielsoins (CBE), cannabinol (CBN), cannabiniol (CBND), et cannabitrinol (CBT). Bien que le CBD et le Δ^9 -THC soient les plus étudiés, le potentiel thérapeutique et l'effet de nombreux phytocannabinoïdes a été évalué et est résumé en figure 25 (Walsh *et al.*, 2021).

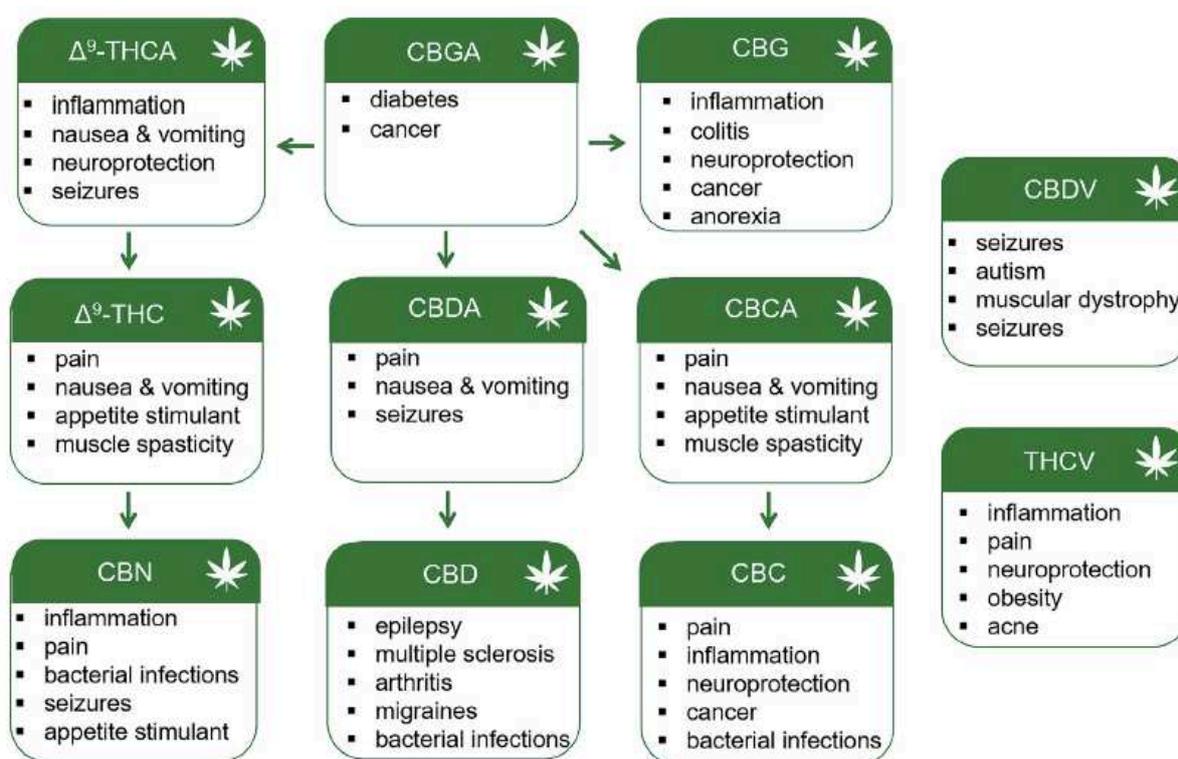


Figure 27: Effet thérapeutique potentiel des différents phytocannabinoïdes (Walsh *et al.*, 2021)

3. Synthèse

Plus d'une centaine de phytocannabinoïdes décrits à ce jour, sont issus du *C. sativa*. Ceux-ci dérivent de l'acide olivétolique et les plus représentés sont les formes neutres, Δ^9 -THC, CBD, CBC et CBG, ainsi que leurs formes acides, Δ^9 -THCA, CBDA, CBCA et CBGA (Gülck & Møller, 2020). Les formes acides Δ^9 -THCA, CBDA, et CBCA sont les produits finaux de la voie de synthèse enzymatique. La dernière étape de transformation de ces composés intervient

par une exposition à la chaleur (cuisson, fumée, déshydratation, etc.) entraînant leur décarboxylation pour donner leur forme neutre Δ^9 -THC, CBD et CBC (Gülck 2020).

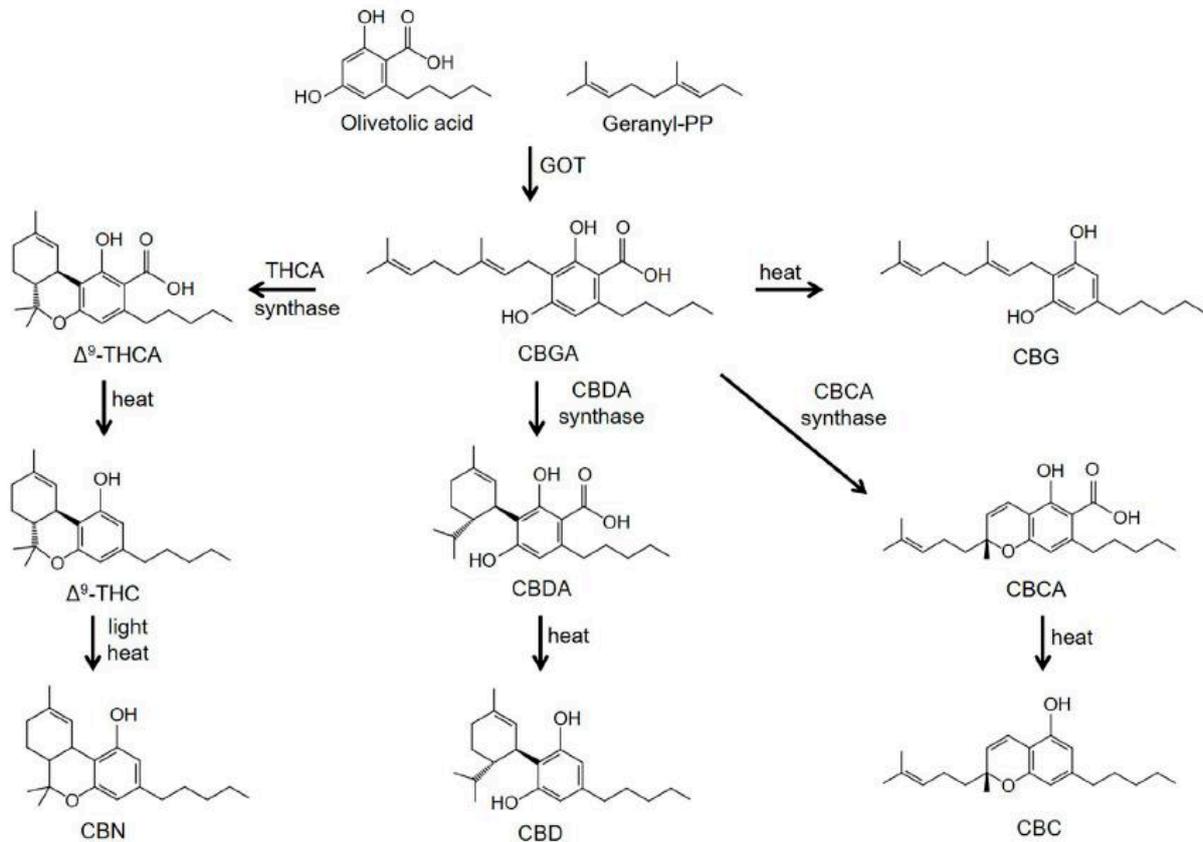


Figure 28 : Voies de synthèse des principaux phytocannabinoïdes dont le CBD et le THC (Walsh *et al.*, 2021)

Si on s'intéresse plus particulièrement au CBD, celui-ci a été isolé pour la première fois en 1963 par Mechoulam (Mechoulam & Shvo, 1963). Il est le second phytocannabinoïde majoritaire issu du *C. sativa*. Sa formule chimique est $C_{21}H_{30}O_2$ et son poids moléculaire est de 314.5g/mol, deux caractéristiques qu'il partage avec le Δ^9 -THC (Calapai *et al.*, 2020).

II. Le cannabidiol

1. Pharmacocinétique

Le CBD est très lipophile, ainsi il est rapidement distribué dans le cerveau et les tissus adipeux. De ce fait, il est probable que similairement au Δ^9 -THC, il s'accumule dans les tissus gras pour être ensuite libéré progressivement (Lemberger *et al.*, 1970; Gunasekaran *et al.*, 2009). La demi-vie du CBD dans le plasma est estimée entre 1 et 2h, mais du fait de cette libération prolongée, elle peut atteindre 32h chez l'humain (Chayasirisobhon, 2020). Le CBD est hydroxylé majoritairement par les cytochromes P450 3A et 2C. Chez l'humain, les métabolites le plus abondants issus du CBD sont le 7-COOH-CBD et ses dérivés qui sont

excrétés tel quel ou sous forme glucuronidée (Ujváry & Hanuš, 2016). Par ailleurs, certains de ses métabolites sont biologiquement actifs par exemple en tant qu'inhibiteurs de la FAAH (Bisogno *et al.*, 2001; Ujváry & Hanuš, 2016).

2. Cibles moléculaires du CBD

A. Le système endocannabinoïde

Le système endocannabinoïde est un système neuromodulateur impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques et cognitives telles que le mouvement et la coordination motrice, la mémoire et l'apprentissage, l'humeur, les comportements motivés ou encore la douleur. Il est composé de récepteurs membranaires dont les principaux sont les récepteurs CB1 et CB2, des ligands endogènes lipidiques, les endocannabinoïdes ainsi que des enzymes impliquées dans leur métabolisme (de Melo Reis *et al.*, 2021).

B. Les récepteurs cannabinoïdes

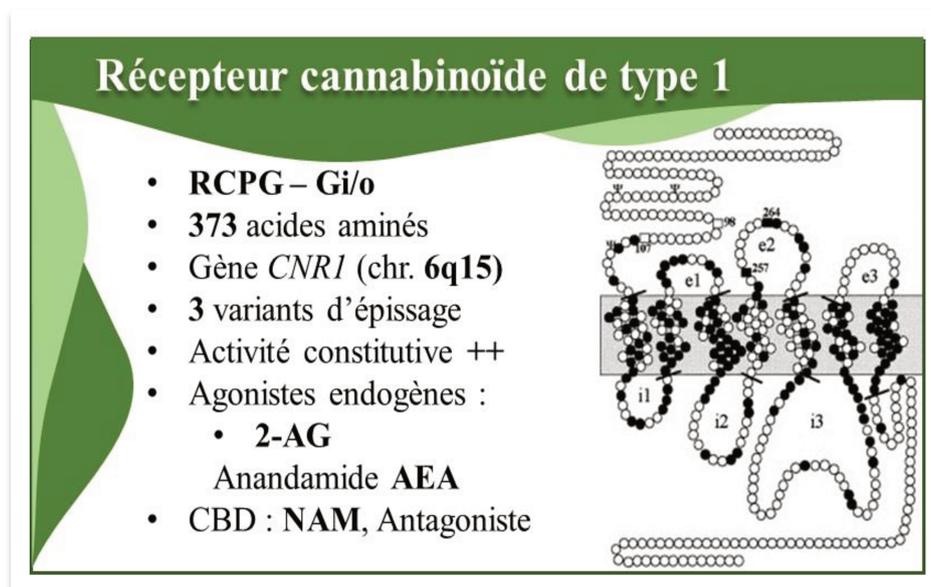


Figure 29 : carte de visite du récepteur cannabinoïde de type 1 (CB1R)

Suite à la découverte et à l'isolation des différents phytocannabinoïdes, l'idée que ces derniers interagissaient avec des récepteurs pour produire leurs multiples effets a mené en 1990 au clonage du premier récepteur cannabinoïde : le récepteur CB1 (Matsuda *et al.*, 1990). Trois ans après, un second récepteur, le récepteur cannabinoïde de type 2 (CB2), fut à son tour cloné (Munro *et al.*, 1993). Ces récepteurs ont une distribution anatomique très différente. En effet, l'expression du récepteur CB2 se cantonne majoritairement aux organes périphériques et aux cellules du système immunitaire (Amin & Ali, 2019), bien que sa présence dans le système nerveux central ait également été décrite (Van Sickle *et al.*, 2005 ; Grabon *et al.*, 2023). Le

récepteur CB1 en revanche est largement exprimé dans le système nerveux central et périphérique, il est même le RCPG le plus exprimé du système nerveux central (Howlett & Abood, 2017). Ces derniers sont majoritairement exprimés au niveau des terminaisons présynaptiques, en grande partie par des neurones GABAergiques, bien qu'il ne soit pas rare de les trouver dans des neurones glutamatergiques (Howlett & Abood, 2017). Dans une moindre mesure, leur présence a également été décrite dans les astrocytes (Han *et al.*, 2012). Similairement aux récepteurs opioïdes, les récepteurs cannabinoïdes sont tous deux des RCPG couplés à des protéines G de type inhibitrices. Leur activation entraîne, entre autres, l'inhibition des VGCC, réduisant l'entrée de calcium, l'activation des canaux potassiques à rectification entrante (Kir) augmentant l'influx de potassium, l'inhibition de la voie Adénylate cyclase-AMPC-PKA mais aussi l'activation des voies des MAPK. Par ailleurs, les récepteurs cannabinoïdes peuvent s'associer à la β -arrestine, initiant l'internalisation et la désensibilisation du récepteur et permettant une signalisation secondaire liée aux MAPK comme ERK1/2 (Nguyen *et al.*, 2012). Ainsi, lorsqu'ils sont exprimés dans des neurones, ils inhibent la transmission synaptique et le relargage de neurotransmetteurs. Le couplage des récepteur CB1 avec des protéines Gs et Gq/11 a également été décrit dans certaines conditions spécifiques mais ne constitue pas leur couplage privilégié (Zou & Kumar, 2018). Les récepteurs CB1 sont peu présents à la membrane plasmique et particulièrement abondants dans les vésicules intracellulaires. Par ailleurs, ils sont caractérisés par une activité basale particulièrement importante, résultant de l'activité constitutive du récepteur ou bien de son activation par les ligands endogènes (Rozenfeld, 2011). Cette activité basale qui se traduit par le fait que le récepteur CB1 est en permanence engagé dans un cycle d'endocytose et de recyclage à la membrane plasmique, explique la localisation intracellulaire majoritaire du récepteur (Leterrier *et al.*, 2004). Toutefois, il a également été décrit qu'une population de récepteurs CB1 serait également présente dans des endo/lysosomes et participerait à la libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique et des lysosomes (Brailoiu *et al.*, 2011). Enfin, il a également été montré qu'une autre sous population de récepteurs CB1 est exprimé dans les mitochondries et influencerait la respiration cellulaire (Bénard *et al.*, 2012).

C. Les endocannabinoïdes

Les endocannabinoïdes sont les agonistes endogènes des récepteurs cannabinoïdes. Les deux principaux sont le 2-arachidonoylglycerol (**2-AG**) et l'AEA, tous deux dérivés de l'acide arachidonique (Zou & Kumar, 2018). Toutefois, il existe d'autres molécules dérivées de l'acide arachidonique ainsi que des peptides (i.e. hémopressine) qui possèdent une activité sur les

récepteurs cannabinoïdes (Riquelme-Sandoval *et al.*, 2020). Le 2-AG est produit à partir du diacylglycérol (DAG) par les DAG lipases (DAGL), (Murataeva *et al.*, 2014), et dégradé par la monoacylglycérol lipase (MAGL). Son niveau basal est mille fois supérieur à celui de l'AEA. Ce dernier est produit à partir de la N-acyl-phosphatidylethanolamine (NAPE) par des phospholipases D spécifiques des NAPE (NAPE-PLD) et dégradé par l'hydrolase des amides d'acides gras (FAAH ; *fatty acid amide hydroxylase*). A noter que la FAAH est aussi impliquée dans l'hydrolyse du 2-AG. Le 2-AG est un agoniste complet tandis que l'AEA est un agoniste partiel des récepteurs CB1 (Pertwee *et al.*, 2010).

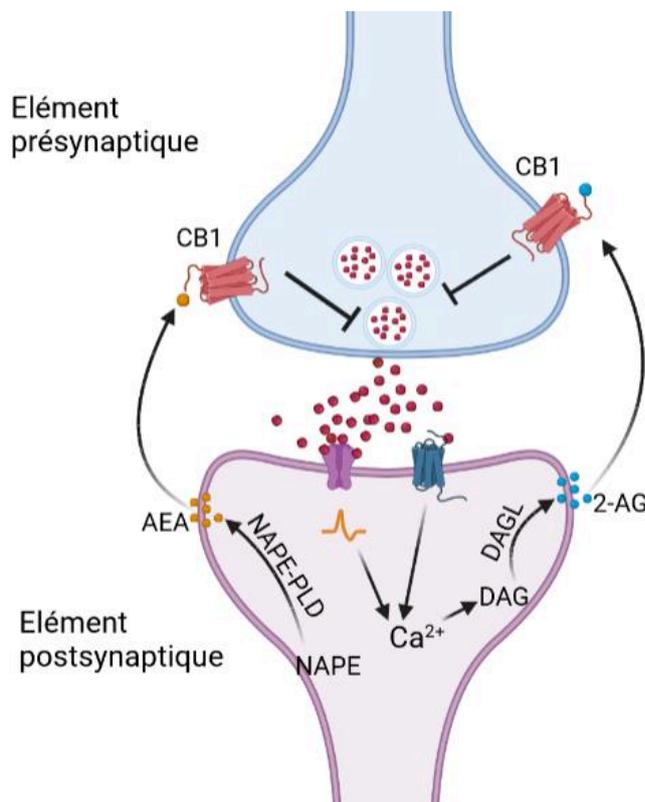


Figure 30 : Signalisation rétrograde des endocannabinoïdes

Généralement produits par l'élément post synaptique, les endocannabinoïdes, et plus particulièrement le 2-AG, sont synthétisés et libérés « sur demande » en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire. Ils traversent alors la fente synaptique pour aller activer les récepteurs CB1 localisés sur l'élément pré-synaptique. Ce mécanisme constitue un système de signalisation rétrograde participant à la modulation de la transmission synaptique notamment par des phénomènes de suppression d'inhibition ou d'excitation induit par la dépolarisation (DSI / DSE). Il est important de préciser que, grâce à leur

nature particulièrement lipophile, les endocannabinoïdes mais également les phytocannabinoïdes, pourraient passer les membranes et aller activer les récepteurs intracellulaires (Zou & Kumar, 2018).

D. Le système endocannabinoïde dans la douleur

Le système endocannabinoïde est impliqué dans de nombreux aspects physiologiques dont la régulation de l'appétit, de l'humeur, du cycle-veille sommeil ou encore la thermorégulation. Il joue également un rôle majeur dans la modulation de l'information nociceptive. En effet, on trouve le récepteur CB1 à différents niveaux du circuit de la douleur.

Ils sont présents dans les fibres afférentes primaires nociceptives et plus particulièrement dans les terminaisons synaptiques présentes au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Ainsi, l'activation de ces récepteurs inhibe la transmission du message nociceptif (Maldonado *et al.*, 2016). Les récepteurs CB1 permettent aussi la modulation de la douleur au niveau supra spinal. En effet, ils inhibent les voies ascendantes de l'information nociceptive directement dans le thalamus (Martin *et al.*, 1999) et modulent les aspects émotionnels de la douleur, notamment via leur action au niveau de l'amygdale (Manning *et al.*, 2003). Enfin, ils modulent également les contrôles descendants de la douleur via une levée d'inhibition des cellules OFF de la RVM (Martin *et al.*, 1998) mais aussi au niveau de la PAG (Martin *et al.*, 1995). Le récepteur CB2 est également impliqué dans la douleur, principalement dans la régulation des réponses immunitaires responsables de la sensibilisation durant les états de douleur chronique (Maldonado *et al.*, 2016). Si on s'intéresse plus particulièrement à la douleur neuropathique, des études précliniques sur des modèles *knock-out* ont révélé que la délétion des récepteurs CB1 spécifiquement dans les neurones nociceptifs périphériques augmente l'hypersensibilité mécanique et thermique au froid de souris SNI, et diminue l'effet analgésique des cannabinoïdes synthétiques (Agarwal *et al.*, 2007). Par ailleurs, la délétion constitutive du récepteur CB1 accroît les comportements de type anxieux et dépressif associés à la douleur neuropathique suggérant un rôle majeur des récepteurs CB1 dans cet aspect (Rácz *et al.*, 2015; Maldonado *et al.*, 2016). Des études pharmacologiques ont également mis en lumière le rôle du système endocannabinoïde dans la douleur neuropathique, en particulier l'une d'elle a décrit que le blocage pharmacologique de la FAAH produit une antinociception thermique et mécanique chez des animaux neuropathiques (Schlosburg *et al.*, 2010; Maldonado *et al.*, 2016).

E. Action du Cannabidiol sur le système endocannabinoïde

Selon une méta-analyse de 2014, l'affinité moyenne du CBD pour les récepteurs CB1 est de $K_i=3.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$. Cette affinité a été obtenue en faisant la moyenne des affinités observées par une quinzaine d'études différentes dont une chez l'homme, 3 chez la souris et 11 chez le rat. (McPartland *et al.*, 2015). La majorité des études d'efficacité, notamment dans des tests d'activité des protéines G via l'incorporation de [³⁵S]GTPγS rapporte l'absence de réponse induite par le CBD. Par ailleurs, le CBD semble antagoniser l'effet d'agonistes CB1 (CP55,940, WIN55212-2) dans ce même test à des concentrations parfois bien inférieures aux valeurs de K_i décrites plus haut. Toutefois, des études ont également montré que le CBD a un effet *in vivo*, qui est bloqué par l'usage d'agonistes inverses du récepteur CB1 et dans des souris CB1 *knock-out* suggérant plutôt une activité de type agoniste pour le récepteur CB1

(McPartland *et al.*, 2015). Aujourd'hui ces disparités sont expliquées principalement par deux facettes du CBD. Tout d'abord le CBD a plus récemment été décrit comme un modulateur allostérique négatif des récepteurs CB1 (Laprairie *et al.*, 2015). En effet, celui-ci inhibe de manière dose-dépendante et non compétitive l'association du récepteur CB1 à la β -arrestine induite par le 2-AG ou le THC à des concentrations entre 0.5 et 1 μ M, selon une courbe qui correspond à un modèle d'allostérie (Laprairie *et al.*, 2015). D'un autre côté, le CBD a été décrit en tant qu'inhibiteur de l'enzyme FAAH (Bisogno *et al.*, 2001), induisant indirectement une activation des récepteurs CB1 accrue via l'augmentation du taux d'endocannabinoïdes. Cet effet sur la FAAH permet d'expliquer en partie les effets de type agoniste observés *in vivo*. Par ailleurs, le CBD agit également en tant que modulateur allostérique négatif du récepteur CB2 (Martínez-Pinilla *et al.*, 2017) bien qu'il ait également été décrit en tant qu'antagoniste mais aussi agoniste inverse de ce récepteur (Peng *et al.*, 2022).

3. Le système opioïde

Une étude de Kathmann *et al.*, a suggéré que les récepteurs opioïdes μ et δ pourraient être des cibles du CBD. En effet, dans des préparations de membranes corticales de rat, le CBD à 100 μ M accélère la dissociation de DAMGO (agoniste μ) et de naltrindole (antagoniste δ) tritiés respectivement induites par la naloxone (antagoniste opioïde non sélectif) et le naltrindole. Ces résultats suggèrent que le CBD pourrait agir comme un modulateur allostérique positif des récepteurs μ et δ (Kathmann *et al.*, 2006). D'autres ont également suggéré que le CBD 10 μ M inhibait significativement la liaison des ligands pour chacun des récepteurs opioïdes (Foss *et al.*, 2021).

4. Les autres cibles du CBD

Le CBD cible de nombreuses protéines dont des récepteurs couplés aux protéines G, des canaux ioniques, des enzymes ou encore des récepteurs nucléaires (Figure 6), (Castillo-Arellano *et al.*, 2023).

Parmi les RCPGs, le CBD a été décrit comme ayant une activité de type agoniste sur les récepteurs sérotoninergiques **5HT₁** (Russo *et al.*, 2005), les récepteurs à l'adénosine **A_{1A}** (Gonca & Darici, 2015) et **A_{2A}** (Ribeiro *et al.*, 2012) mais également sur les récepteurs **D₂** à la dopamine (Seeman, 2016). En revanche il serait un antagoniste partiel des récepteurs **5HT_{2A}** (Russo *et al.*, 2005), un antagoniste des récepteurs orphelins **GPR55** (Ryberg *et al.*, 2007),

GPR18 (McHugh *et al.*, 2010), et un agoniste inverse des récepteurs orphelins **GPR3**, **GPR6** et **GPR12** (Brown *et al.*, 2017).

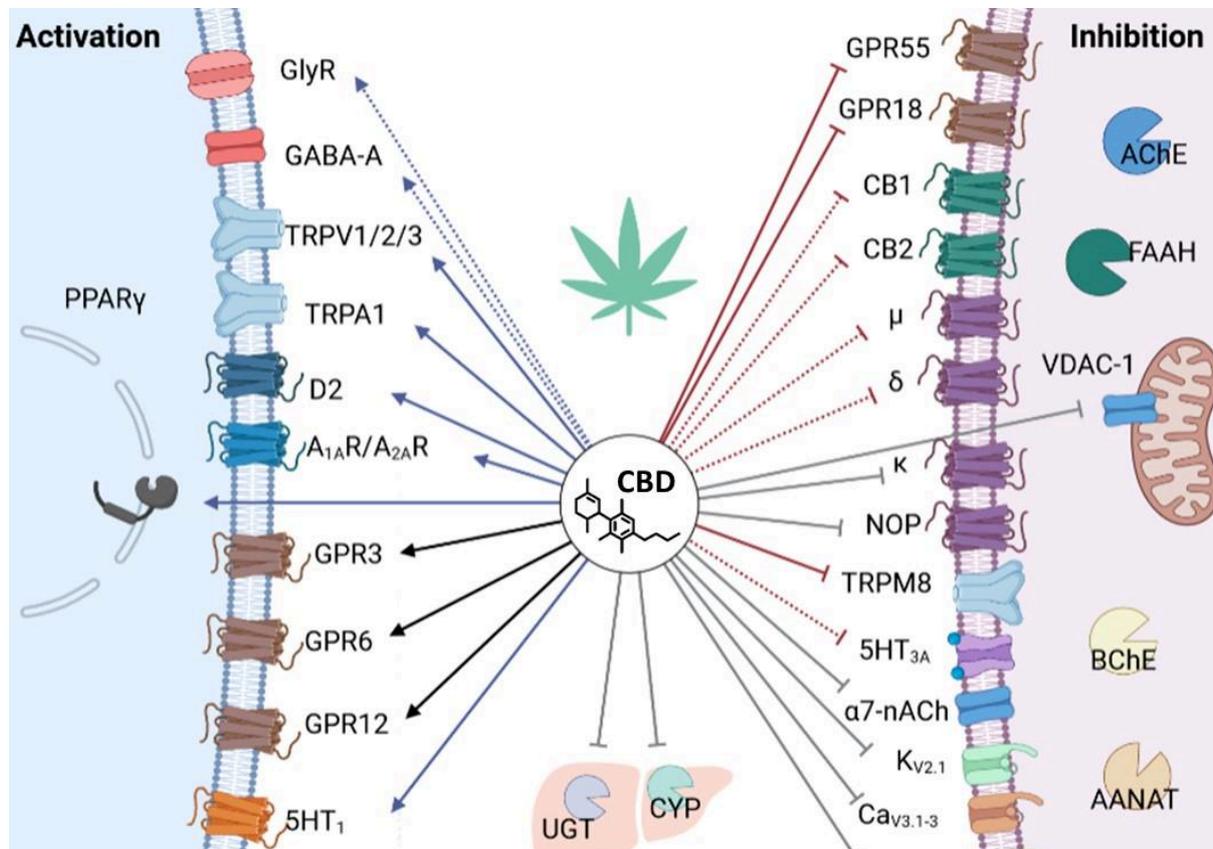


Figure 31: Cibles moléculaires du CBD. Du côté gauche, les cibles moléculaires sur lequel le CBD à une activité de type agoniste (flèche bleue pleine), de type modulateur allostérique positif (flèche bleue en pointillé), ou de type agoniste inverse (flèche noire). Du côté droit, les cibles moléculaires sur lesquelles le CBD à une activité de type antagoniste (flèche pleine rouge), de type modulateur allostérique négatif (flèche rouge en pointillé), ou de type inhibiteur (flèche grise) (Figure adapté de Castillo-Arellano *et al.*, 2023).

Du côté des canaux ionotropes, le CBD exerce un effet sur de nombreux récepteurs de la famille des TRP particulièrement impliquée dans la détection de stimuli nociceptifs. En effet, c'est un agoniste des récepteurs TRPV1 (Iannotti *et al.*, 2014), TRPV2 (Qin *et al.*, 2008) et TRPV3 (De Petrocellis *et al.*, 2012) ainsi que du récepteur TRPA1 (Kowalski *et al.*, 2020). En revanche il semble avoir un effet antagoniste sur le récepteur TRPM8 (De Petrocellis *et al.*, 2008). Le CBD agit aussi sur d'autres récepteurs canaux, tels que les récepteurs glycinergiques **GlyR** sur lesquels il exerce une modulation allostérique positive, ce qui est également le cas pour les récepteurs GABA-A (Bakas *et al.*, 2017). D'un autre côté, il agit en tant que modulateur allostérique négatif des récepteurs **5HT₃** (Xiong *et al.*, 2011) ainsi que des récepteurs à l'acétyl-choline **α7-nACh** (Chrestia *et al.*, 2022). Il inhibe également les canaux sodiques, calciques et potassiques activés par le voltage **Ca_v3.1-3** et **K_v2.1** (Ghovanloo *et al.*,

2018) ainsi que le canal mitochondrial anionique dépendant du voltage **VDAC-1** (Rimmerman *et al.*, 2013).

Le CBD agit également sur des enzymes. En effet, ce dernier inhibe l'activité enzymatique de l'acétylcholine-estérase **AChE**, la butyrylcholine-estérase **BChE** ou encore l'arylalkylamine N-acétyltransférase **AANAT** (Castillo-Arellano *et al.*, 2023). Par ailleurs, le CBD inhibe également l'activité catalytique de nombreuses enzymes hépatiques indispensables à la métabolisation de nombreux médicaments, comme diverses isoformes de cytochromes P450 mais aussi d'**UGT** (Nasrin *et al.*, 2021).

Enfin, le CBD, a été décrit comme un agoniste du récepteur **PPAR γ** (*Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ*), récepteurs nucléaire impliqué dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose de divers types cellulaires (Esposito *et al.*, 2011).

Ainsi, la grande variété des actions thérapeutiques induites par le CBD correspond à la multiplicité de cibles moléculaires. A ce jour, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'action thérapeutique du CBD sont encore mal compris et l'implication de certaines de ces cibles n'a même jamais été évaluée *in vivo*. Compte tenu de notre intérêt pour la douleur neuropathique et ses comorbidités nous allons donc développer l'effet et l'implication du CBD dans cette pathologie dans la partie suivante.

III. Le CBD dans la douleur neuropathique et ses comorbidités

1. Etudes cliniques

Du côté de la recherche clinique, peu d'études se sont penchées sur l'effet analgésique du CBD dans la douleur neuropathique. Wade et al, ont évalué le potentiel thérapeutique du CBD chez des patients atteints de troubles neurologiques, dont 14 atteints de sclérose en plaque, 4 de lésions de la moelle épinière, un de lésion du plexus associée à une neuropathie et un d'une amputation associée à des douleurs du membre fantôme (Wade *et al.*, 2003). Chez les 12 patients évalués par rapport à leurs douleurs, le CBD soulage la douleur significativement plus que le placebo, il a toutefois un effet relativement modeste (avant traitement 30.1/100, placebo 44.5/100, CBD 54.8/100 ; 0 représentant le pire état possible et 100 le meilleur) (Wade *et al.*, 2003). Notcutt et al, quant à eux se sont intéressés à 34 patients atteints de douleur neuropathique de différentes étiologies. Ils ont demandé aux patients de choisir 2 symptômes principaux associés à leur pathologie (douleurs, spasmes, tremblements, etc.) et d'évaluer l'amélioration de ces symptômes après administration de CBD. Les résultats obtenus suggèrent une absence d'amélioration de ces symptômes (le plus souvent la douleur) par le CBD (Notcutt *et al.*, 2004). D'autres études ont évalué le potentiel sur la douleur chronique de traitements riches en CBD mais contenant malgré tout du THC (van de Donk *et al.*, 2019; Capano *et al.*, 2020; Urits *et al.*, 2020). Actuellement, on ne sait pas avec certitude si le CBD est efficace pour soulager la douleur neuropathique, et il est nécessaire de mener des études cliniques plus approfondies afin de mieux comprendre son potentiel dans le traitement de ces douleurs.

2. Etudes précliniques

Une vingtaine d'études précliniques se sont penchées sur le rôle du CBD dans la douleur neuropathique. Parmi celles-ci, 3 modèles de douleurs neuropathiques prédominent : les douleurs neuropathiques dues à une lésion du nerf périphérique, la neuropathie chimio-induite par des agents anti-cancéreux et la neuropathie diabétique.

L'administration aiguë de CBD, provoque un effet antinociceptif dans chacun de ces 3 modèles. Concernant son administration intrapéritonéale, les études ayant étudié son action aiguë ont montré un effet antinociceptif significatif du CBD à 30 min (Jesus *et al.*, 2022), 1h (Harris *et al.*, 2016; Jesus *et al.*, 2019; Baron-Flores *et al.*, 2022) et 2h (Casey *et al.*, 2017; Jesus *et al.*, 2019; Baron-Flores *et al.*, 2022). L'administration locale intraplantaire de CBD

chez des souris dont le nerf sciatique est compressé entraîne, quant à elle, un effet antiallodynique plus rapide dès 10 minutes avec un effet pic à 15 minutes (Aguiar *et al.*, 2023). Par ailleurs, chez la souris, la dose efficace 50 (ED50) de CBD pour obtenir un effet antinociceptif est de 11 à 20 nmol i.t (Casey *et al.*, 2022) et de 3.6 à 3.5 mg/kg s.c. (Casey *et al.*, 2017).

Dans un modèle murin de neuropathie diabétique induite par la Streptozocine (tableau 1), l'administration intranasale ou intra péritonéale répétée de CBD empêche le développement de l'allodynie thermique et tactile associée au diabète (Toth *et al.*, 2010). Toutefois, lorsque le CBD est administré après la mise en place de la neuropathie, aucune amélioration notable de l'allodynie tactile ou thermique n'est visible (Toth *et al.*, 2010). Ces résultats sont en contradiction avec l'étude de Jesus *et al.*, qui suggère que l'administration i.p. de CBD pendant 14 jours chez des rats ayant développé une neuropathie diabétique soulage l'allodynie mécanique associée (Jesus *et al.*, 2019).

Chez des souris souffrant de neuropathie chimio-induite par un agent anticancéreux (CINP, chemotherapy-induced neuropathic pain), le plus souvent, cysplatine ou paclitaxel (tableau 1), les résultats sont assez contradictoires. En effet, certains auteurs montrent que le CBD a un effet préventif sur le développement d'une allodynie mécanique et ou thermique, lorsque celui-ci est administré conjointement au paclitaxel (Ward *et al.*, 2014; Foss *et al.*, 2021; Kumar Kalvala *et al.*, 2022). En revanche, d'autres études indiquent que le CBD ne prévient pas le développement de la neuropathie lorsque que celle-ci est induite par le cysplatine (Harris *et al.*, 2016). Ceci pointe vers un effet préventif du CBD qui est différent selon l'agent anticancéreux utilisé. Sepulveda *et al.*, suggèrent également que les différences observées dans les différentes études utilisant du CBD pourraient être liées à la provenance de ce dernier. En effet, l'administration de CBD synthétique dans un modèle de CINP, ne soulage pas l'allodynie associée, à l'inverse d'un CBD extrait directement de la plante (Sepulveda *et al.*, 2022). Cette différence peut s'expliquer par une faible concentration de Δ^9 -THC qui pourrait être présente dans les extraits botaniques.

Dans des modèles de neuropathies induites par une lésion des nerfs périphériques ou de la moelle épinière (tableau 2), l'administration orale de CBD durant les 14 jours suivant la chirurgie cuff prévient le développement de l'allodynie mécanique chez les rats mâles mais pas chez les femelles (Linher-Melville *et al.*, 2020). De plus, cet effet s'accompagne d'une régulation différentielle de l'expression de marqueurs neuro-inflammatoires à 9 semaines de chirurgie chez les mâles et les femelles (Linher-Melville *et al.*, 2020). En outre, un traitement au CBD commencé 7 jours après une chirurgie CCI, et administré pendant 7 jours, améliore également l'hyperalgésie et l'allodynie associées à la neuropathie (Costa *et al.*, 2007). Par ailleurs, De Gregorio *et al.*, suggèrent que l'administration répétée de CBD débutée après la mise en place de la neuropathie entraîne un rétablissement des seuils nociceptifs au bout de 7 jours (De Gregorio *et al.*, 2019).

L'implication potentielle de plusieurs cibles du CBD a été évaluée dans l'effet anti-allodynique. Plusieurs études ont suggéré l'implication des récepteurs TRPV1 (De Gregorio *et al.*, 2019; Aguiar *et al.*, 2023) et 5HT1A (Ward *et al.*, 2014; Jesus *et al.*, 2019; Aguiar *et al.*, 2023) dans l'effet antinociceptif du CBD. Plusieurs études suggèrent que les récepteurs CB1 et CB2 ne seraient pas impliqués dans cet effet (Costa *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2014; Jesus *et al.*, 2019) cependant ces résultats sont contestés par Casey *et al.*, qui ont suggéré leur implication dans l'hypersensibilité au froid (Casey *et al.*, 2017, 2022), mais aussi l'implication du récepteur CB1 dans l'allodynie mécanique (Casey *et al.*, 2022). Par ailleurs, l'administration de CBD potentialise l'augmentation de l'expression des récepteurs TRPV1 et CB1 induite par la douleur neuropathique dans un modèle de CCI (Silva-Cardoso *et al.*, 2021).

Enfin, concernant les **comorbidités anxio-dépressives associées à la douleur neuropathique**, trois articles ont abordé la question. Dans le premier, De Gregorio et al, suggèrent que, dans un modèle de SNI dans lequel les rats présentent des comportements de type anxieux accrus, le CBD améliore l'anxiété dans le test de champ ouvert (*open field*), le test de labyrinthe en croix surélevé (*elevated plus maze*) ainsi que dans le test d'hyponéophagie (*novelty suppressed feeding*), (De Gregorio *et al.*, 2019). Silva-Cardoso et al., montrent également un effet anxiolytique du CBD dans le test de champ ouvert chez des rats CCI anxieux (Silva-Cardoso *et al.*, 2021). Cet effet anxiolytique semble impliquer le récepteur 5HT1A car l'effet anxiolytique du CBD est aboli par la co-administration de WAY 100635, antagoniste de ce récepteur (De Gregorio *et al.*, 2019). Du côté des comportements de type dépressif, Malvestio et al, montrent que l'administration de CBD directement dans le cortex pré-limbique, atténue des comportements de type dépressif mesurés dans le test de la nage forcée chez des rats CCI (Malvestio *et al.*, 2021).

TRAVAIL DE THESE

L'objectif de ma thèse est d'évaluer le potentiel thérapeutique du CBD dans la douleur neuropathique et d'examiner l'implication potentielle du récepteur opioïde δ et plus particulièrement des hétéromères δ -CB1 dans cet effet. A ces fins, nous avons organisé le projet autour de quatre axes.

Nous avons tout d'abord caractérisé le modèle du cuff chez nos souris de fond génétique C57BL/6J : 129svPas (50 : 50), chez les mâles et les femelles exprimant ou non le récepteur opioïde δ . Nous avons évalué les modifications comportementales induites par la chirurgie au niveau de la sensibilité mécanique ainsi que l'impact sur l'état émotionnel des souris. Par ailleurs, nous avons également examiné les variations de médiateurs de l'inflammation (cytokines, facteurs de croissances, etc.) quatre semaines après la chirurgie, dans le sérum mais aussi dans le tronc cérébral et l'hippocampe.

Nous avons ensuite évalué l'effet thérapeutique du CBD dans le modèle du cuff ainsi que l'implication du récepteur opioïde δ dans cet effet. Pour cela, nous avons dans un premier temps étudié l'effet dose-dépendant et la cinétique d'action d'une injection aiguë de CBD sur la sensibilité mécanique de souris sauvages. Ensuite, nous avons évalué l'effet d'un traitement répété de CBD. Afin de déterminer l'effet de l'administration répétée de CBD sur l'état émotionnel des souris neuropathiques, deux doses ont été sélectionnées en fonction de leur impact sur la sensibilité mécanique lorsqu'administrées de façon aiguë, c'est-à-dire, une dose soulageant l'hypersensibilité mécanique (10 mg/kg) et une dose faible (1 μ g/kg) sans effet sur cette hypersensibilité. Ces administrations répétées ont été effectuées chez des animaux mâles et femelles, exprimant ou non le récepteur opioïde δ .

En parallèle, nous avons effectué une cartographie complète des régions de colocalisation neuronale des récepteurs δ et CB1 dans le cerveau en conditions basale et neuropathique (Cuff et SNI). La colocalisation cellulaire des récepteurs étant un prérequis indispensable à la formation d'hétéromères, cette approche permet d'identifier les régions au sein desquelles les récepteurs δ et CB1 peuvent s'associer en hétéromères. Elle nous renseigne également sur l'impact de la condition neuropathique sur la distribution des deux récepteurs dans les circuits associés à la douleur.

Enfin, nous avons abordé *ex vivo* l'hétéromérisation des récepteurs δ et CB1 ainsi que leur activation par le CBD. Pour cela, nous avons étudié la co-internalisation des récepteurs δ et CB1 en tant qu'indicateur de l'hétéromérisation telle que décrite dans le cas des hétéromères μ - δ (Derouiche 2020) dans des cultures primaires d'hippocampe. Nous avons ainsi examiné l'impact de la co-application de CBD et de ligands sélectifs des récepteur δ ou CB1 sur cette co-internalisation.

MATERIEL ET METHODES

I. Modèles animaux

1. Animaux

Les animaux sont élevés et fournis par le Chronobiotron UMS3415 (numéro d'agrément B6748225). Les souris sont hébergées 2 à 5 par cage, dans une pièce ayant un cycle jour/nuit de 12h/12h avec une phase lumineuse de 8h à 20h, une température de 24 +/- 2°C et une humidité de 45+/- 5%. Tous les tests comportementaux ont eu lieu pendant la phase lumineuse. La nourriture et l'eau sont accessibles *ad libitum* et la cage est agrémentée d'un tunnel, d'un barreau en bois à ronger et du matériel nécessaire à la réalisation d'un nid (pads en coton). Toutes les expériences ont été réalisées par des personnes qualifiées en conformité avec la directive européenne relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (n°2010/63/EU). Ces expériences ont reçu l'agrément du ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation et du comité d'éthique en expérimentation animale (APAFIS#23672-2020011418165945 v3 (APAFIS#23672)).

2. Lignées génétiquement modifiées

La majorité des expériences ont été faites sur différentes lignées de souris transgéniques de fond génétique hybride C57Bl/6J : 129SvPas (50 : 50) (Figure 1). Les souris δ *knock-out* (KO) sont dépourvues du récepteur opioïde δ (Filliol *et al.*, 2000) ce qui nous permet de questionner son implication dans les mécanismes que nous étudions en comparant avec les résultats obtenus chez des souris possédant ce récepteur. Les souris *knock-in* δ -eGFP (Scherrer *et al.*, 2006) présentent un récepteur opioïde δ en fusion avec la protéine fluorescente verte eGFP. Cette construction nous permet de pallier l'absence d'anticorps spécifiques du récepteur opioïde δ . Les souris μ -mCherry (Erbs *et al.*, 2015) possèdent le récepteur opioïde μ en fusion avec la protéine fluorescente rouge mCherry. Ces constructions permettent la visualisation des deux récepteurs sans immunomarquage. Par ailleurs, aucune modification dans le comportement de ces animaux n'a été détectée. Finalement, des souris double *knock-in* δ -eGFP/ μ -mCherry (Erbs *et al.*, 2015), obtenues suite à un croisement des deux lignées précédentes nous permettent la visualisation simultanée des deux récepteurs.

Une petite partie des expériences a également été réalisée sur des souris congéniques C57Bl/6J possédant ou non le récepteur opioïde δ . Les souris B6- δ -KO sont dérivées des souris δ -KO décrites précédemment et ont été rétro-croisées sur au moins 10 générations avec des souris C57BL6/J (Benbouzid *et al.*, 2008a).

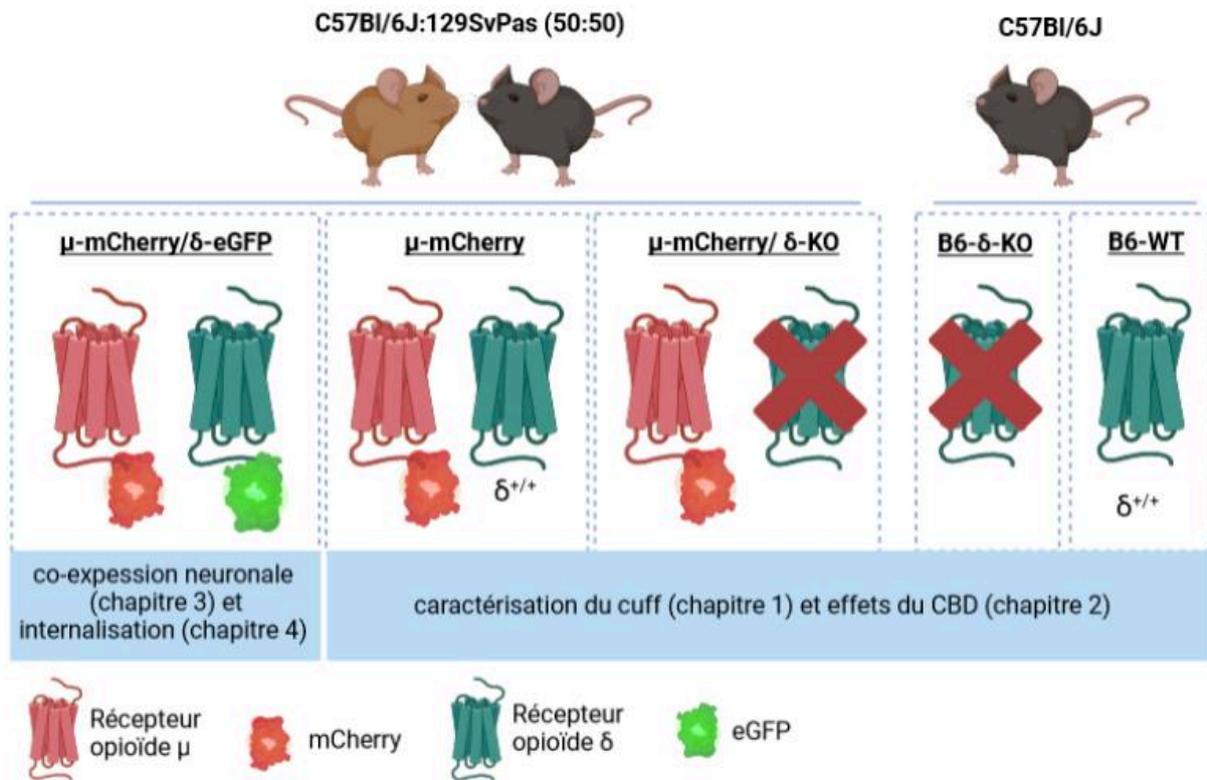


Figure 32 : Schéma illustrant le fond génétique ainsi que le génotype des souris en fonction des expériences dans lesquelles elles sont impliquées

Par soucis de clarté, nous appellerons « sauvage » les souris possédant le récepteur δ , et δ -KO celles chez qui il est absent, indépendamment de leur fond génétique et de la présence ou non d'une protéine fluorescente sur le récepteur μ .

3. Modèles de douleur neuropathique

A. Le modèle du « Cuff »

Des souris mâles et femelles âgées de 8 à 14 semaines sont anesthésiées avec une solution de kétamine 20 mg/kg (Kétamine 1000, Virbac, France) et d'un mélange de tilétamine et de zolazépam 80 mg/kg (Zoletil 50, Virbac, France). La patte droite des souris est tondu et désinfectée avec un spray anti-bactérien (Apaisyl cleanspray, Vidal, France). Une incision est effectuée au niveau de la cuisse. A l'aide de 2 cure-dents stériles, la branche principale du nerf sciatique est dégagée. Un manchon (cuff) en polyéthylène stérile (longueur 2mm, diamètre

interne 0.38mm, diamètre externe 1.09mm, Py2 59-8323, Harvard apparatus, UK) est déposé autour du nerf, le manchon est resserré autour du nerf pour une bonne compression. La plaie est suturée puis les animaux sont placés sous lampe chaude avec de la nourriture en gel à disposition. Les animaux possédant un manchon sont appelés animaux cuff. Des animaux ayant subi la procédure chirurgicale sans pose de manchon sont appelés animaux sham et sont utilisés comme animaux contrôles.

B. Le modèle du « SNI » ou lésion du nerf épargné

La chirurgie est effectuée sous anesthésie générale par inhalation d'isoflurane (3 % pour l'induction et 2 % pour le maintien ; IsoVet® B. BRAUN, Espagne). En condition d'asepsie, la patte gauche est rasée et nettoyée avec de l'éthanol. Une incision est réalisée au niveau de la cuisse et les muscles sont séparés afin d'exposer le nerf sciatique au niveau de la trifurcation. Les branches tibiales et péronéales du nerf sont ligaturées et coupées du côté distal de la ligature. La branche surale du nerf sciatique reste intacte. Les tissus conjonctifs et les muscles sont alors suturés, et la plaie refermée par la pose d'une agrafe. Les chirurgies Cuff et SNI étant similaires, les animaux contrôles (sham) sont les mêmes que pour la chirurgie Cuff.

II. Protocoles expérimentaux et test comportementaux

1. Protocoles expérimentaux et décours temporels

Pour les études incluant du comportement, 3 protocoles différents ont été réalisés sur les animaux.

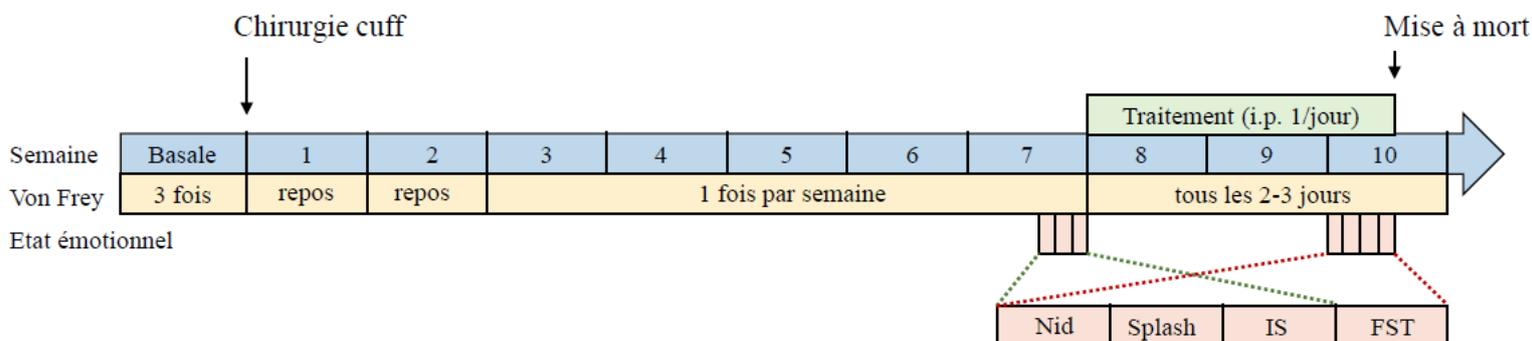


Figure 33 : Déroulement temporel du protocole expérimental de 10 semaines utilisé pour la caractérisation du modèle du cuff (chapitre 1), et l'étude de l'effet du CBD (chapitre 2). IS : test d'interaction sociale, FST : test de la nage forcée (Forced Swim Test)

Un protocole de 10 semaines a été effectué chez des souris sauvages et δ -KO. Ce protocole a servi à la caractérisation du modèle du cuff (Chapitre I :), et à l'étude de l'effet du CBD (Chapitre II :). Le déroulement temporel des tests comportementaux est décrit dans la figure ci-dessus (figure 31). Suite à la mise à mort des animaux, les tissus sont prélevés comme décrits dans Ponction intracardiaque et récupération des tissus frais.

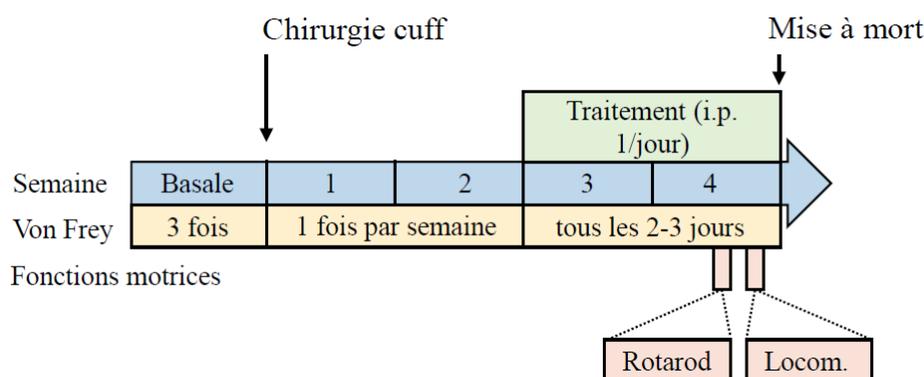


Figure 34 : Déroulement temporel du protocole expérimental de 4 semaines complémentaire utilisé pour la caractérisation du modèle du cuff (chapitre 1), et l'étude de l'effet du CBD (chapitre 2). Locom. : test de locomotion.

Un protocole de 4 semaines (figure 32) a été effectué chez des souris sauvages pour compléter la caractérisation du modèle du cuff (Chapitre I :), et l'étude de l'effet du CBD (Chapitre II :).

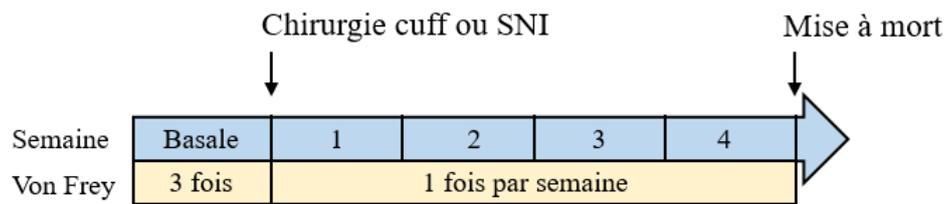


Figure 35: Déroulé temporel du protocole expérimental de 4 semaines utilisé pour la cartographie des zones de co-expression neuronale des récepteur δ et CB1 (chapitre3).

Un autre protocole de 4 semaines (figure 33) a été effectué chez des souris μ -mCherry/ δ -eGFP. Les souris issues de ce protocole ont été utilisées pour l'étude des régions de colocalisation neuronale des récepteurs δ et CB1 (Chapitre III :). Dans ce protocole le seuil de sensibilité mécanique est mesuré afin de s'assurer que les animaux développent une hypersensibilité.

2. Modalités de traitement

Remarque : les références des produits écrits en violet sont indiquées en [Annexes](#)

Le traitement prolongé avec le Cannabidiol est commencé 7 semaines après la chirurgie cuff et dure 15 jours. Le cannabidiol synthétique étant une substance particulièrement hydrophobe, il est dilué dans un excipient composé de NaCl 0.9% et **Tween 80** (polysorbate 80) 2%. Il est délivré chaque jour par une seule injection intra-péritonéale le matin. Trois traitements sont administrés : les contrôles avec uniquement l'excipient, les groupes avec une dose de **CDB** 1 μ g/kg, et les groupes avec une dose de CBD 10 mg/kg. Compte tenu des effets indésirables associés au polysorbate 80 (Varma *et al.*, 1985) qui est contenu dans l'excipient, nous avons réduit le volume injecté à 30 μ l/10g.

3. Test comportementaux

Sauf indication contraire, les animaux sont déplacés dans la salle de test une heure avant le début de celui-ci, afin de s'habituer à la salle de test.

A. Seuil de sensibilité mécanique : Test des filaments de Von Frey

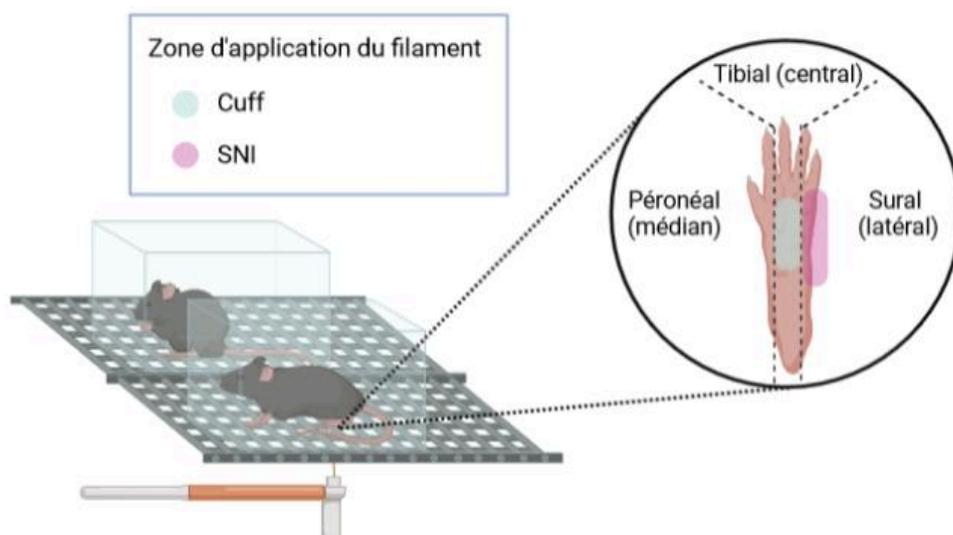


Figure 36 : Illustration du test des filaments de Von Frey montrant également la zone d'application du filament en fonction du modèle de douleur neuropathique

Ce test a pour but de déterminer le seuil nociceptif mécanique des souris. Il est systématiquement effectué tout au long des expériences de comportement afin de déterminer le seuil nociceptif basal des souris avant chirurgie, d'évaluer la mise en place et le maintien de l'allodynie mécanique induite par la chirurgie cuff et le soulagement de cette allodynie par les différents traitements.

Le dispositif est constitué d'une grille de métal surélevée surmontée d'une ligne de petites enceintes en plastique de 10 x 7cm. Les souris sont placées dans les petites enceintes pendant 30 minutes 2 jours consécutifs afin de s'habituer au dispositif les jours précédents le premier test. Les jours de test, les souris sont placées dans les petites enceintes 5 à 10 minutes avant le début de celui-ci. Des filaments de grammage croissant (de 1 à 8g) sont alors appliqués successivement sous les pattes arrières droites et gauches des souris. Chaque filament est appliqué 3 à 5 fois sous chaque patte jusqu'à obtenir 3 réponses identiques. Est considéré comme une réponse nociceptive tout retrait, léchage ou secousse de la patte consécutif à l'application du filament. En absence de réponse suite à 3 applications d'un même filament, le filament supérieur est utilisé. Ce processus est répété jusqu'à obtenir 3 réponses nociceptives pour 2 filaments consécutifs. Le plus léger des deux filaments ayant entraîné une réponse est considéré comme celui déterminant le seuil nociceptif mécanique de la patte testée.

B. Etat émotionnel

Les tests d'éclaboussement, d'interaction sociale et de nage forcée ont été filmés et analysés avec l'aide du logiciel ANY-maze™ (Stoelting Europe, Ireland).

a. Test d'éclaboussement

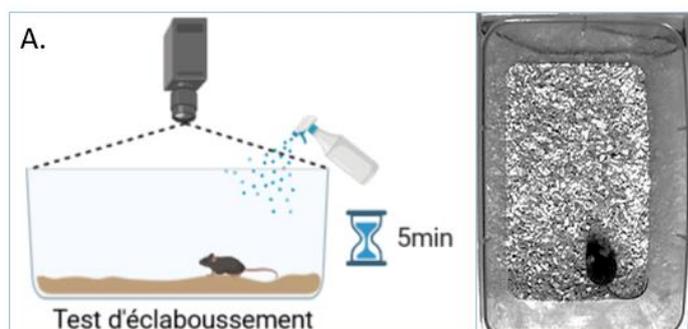


Figure 37: Schéma illustrant le test d'éclaboussement (Splash) accompagné d'une photo représentative

Ce test a pour but de déterminer le temps de toilettage des souris comme indicateur de symptômes de type dépressif. L'incapacité à maintenir les activités quotidiennes essentielles telles que l'hygiène corporelle est en effet considérée chez l'homme comme un critère pour le diagnostic de troubles dépressifs majeurs par le **DSM-5**.

Chaque souris est placée seule dans une cage garnie de litière propre, et aspergée d'une solution d'eau et de sucrose 20%. Pendant les 5 minutes suivant l'aspersion, la souris est filmée, et les épisodes de toilettage comptés et chronométrés en discriminant le toilettage de la tête du reste du corps.

b. Test du nid

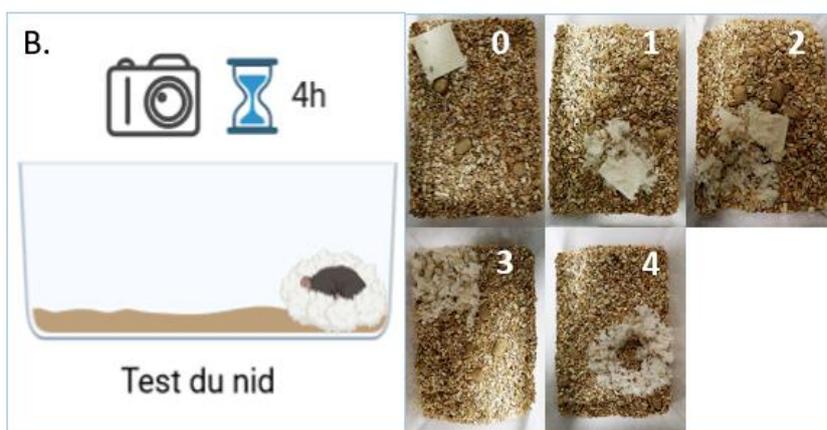


Figure 38 : Schéma illustrant le test du nid, accompagné de 5 photos représentatives des différentes notes de 0 à 4 attribuées en fonction de la qualité du nid.

Ce test est utilisé en tant qu'indicateur du niveau de bien-être des animaux (Jirkof, 2014). Les souris sont individualisées dans des cages propres avec de l'eau et de la nourriture à disposition. Au bout d'une heure, un carré de coton nécessaire à la confection

du nid est ajouté dans la cage. Au bout de 4h, les souris sont remises ensemble dans leur cage initiale et la cage et le nid sont photographiés. Sur la base des photos, la qualité de chaque nid

est évaluée en aveugle, avec une note de 0 à 4 (Deacon, 2006). 0 indique que le carré de coton est intact à plus de 90%, 1 indique qu'il est partiellement déchiré (de 50 à 90% intact), 2 indique que plus de la moitié du carré de coton est déchiré, 3 indique que plus de 90% du carré de coton est déchiré et rassemblé en nid plat dans un coin de la cage, 4 indique que plus de 90 % du carré de coton est déchiré et rassemblé dans un coin de la cage en un nid formant un cratère.

c. Test d'interaction sociale

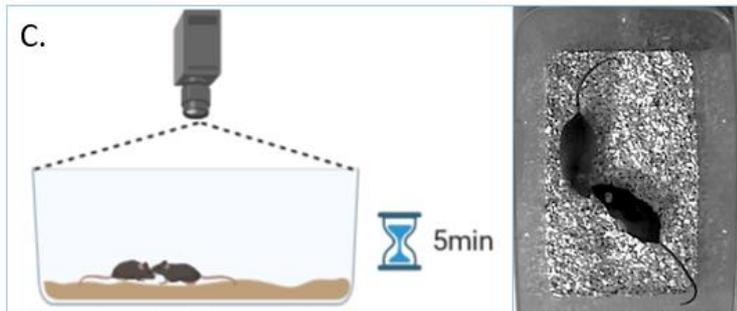


Figure 39 : Schéma illustrant le test d'interaction sociale, accompagné d'une photo représentative

Ce test a pour but de déterminer le temps d'interaction sociale comme indicateur de symptômes de type anxieux.

Deux souris étrangères l'une à l'autre sont placées en même temps dans une cage garnie de litière propre: l'une est la souris qui doit être évaluée (souris test) et l'autre une souris de même sexe et de gabarit similaire (interacteur). Pendant les 5 minutes suivant leur rencontre, les souris sont filmées, et les épisodes de reniflements initiés par la souris test sont comptés et chronométrés.

d. Test de la nage forcée



Figure 40 : Schéma illustrant le test de la nage forcée, accompagné d'une photo représentative

Ce test permet de mesurer le temps d'immobilité des animaux dans une tâche de nage forcée, comme un indicateur de renoncement et, par association, de comportement de type dépressif (Porsolt *et al.*, 1977).

Ce test étant générateur de stress, les souris ne sont pas déplacées ensemble dans la pièce mais y sont amenées une par une dans les quelques minutes précédant le test. La souris est placée dans un bécher de 2L rempli d'eau à 24 \pm 1 °C. Pendant les 6 minutes de test, on compte le nombre d'épisodes d'immobilité, le temps total d'immobilité ainsi que la latence avant le premier épisode d'immobilité. A la fin du test, la souris est séchée et remise dans sa cage.

C. Coordination motrice et activité locomotrice

a. Coordination motrice : Rotarod

L'appareil est constitué d'un cylindre horizontal tournant sur lui-même, séparé en quatre compartiments de sorte à éviter tout contact entre les souris. La veille du test, les animaux sont habitués et entraînés à tenir sur le dispositif dont la rotation est réglée à 4 RPM. Une fois que chaque souris a réussi à se maintenir sur le cylindre pendant une minute à 3 reprises, l'apprentissage est considéré comme terminé. Le jour du test, les animaux sont placés sur le dispositif, celui-ci est réglé de sorte que la rotation du cylindre accélère de 4 RPM à 40 RPM en 5 minutes. Lorsque la souris chute, la latence et la vitesse atteinte par le cylindre sont notées.

b. Activité locomotrice

Chaque souris est placée dans une cage remplie de sciure fraîche. La distance parcourue par la souris pendant une période de 15 minutes est mesurée grâce au logiciel ANY-maze™.

III. Prélèvement et conditionnement des tissus

1. Ponction intracardiaque et récupération des tissus frais

Les animaux sont anesthésiés avec une injection i.p. d'un mélange de kétamine (Kétamine 1000, 300 mg/kg), et de xylazine 20 mg/kg (Paxman, Virbac, France), ainsi qu'une injection locale s.c. de lidocaïne 10 mg/kg (Lurocaïne, Vetoquinol S.A. France) au niveau des côtes. Après avoir vérifié l'absence de réflexes, la peau de l'animal puis le plan musculaire sont incisés horizontalement au niveau du diaphragme. Le diaphragme est ouvert et les côtes sont coupées de chaque côté de la cage thoracique afin de dégager le cœur. Une ponction intracardiaque est alors effectuée dans le ventricule gauche du cœur de la souris. Le sang ainsi collecté dans des tubes Eppendorf est maintenu à température ambiante pendant 2h pour permettre sa coagulation. Les tubes sont ensuite centrifugés 15 minutes à 2000g, puis le surnageant, c'est-à-dire le sérum est récupéré avant d'être stocké à -80°C.

Immédiatement après la collecte du sang, la souris est décapitée afin de récupérer le cerveau et de collecter les régions d'intérêt : le cortex, le striatum, l'hippocampe, le cervelet, le tronc cérébral, et une partie du cerveau moyen. Le tout est effectué sur glace pour limiter la dégradation des tissus. Pendant ce temps, la moelle épinière est récupérée par extrusion avec une solution de PBS 1X à 4°C. Les tissus sont ensuite mis dans des tubes Eppendorf et mis sur carboglace avant d'être stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

2. Perfusion intracardiaque et récupération de tissus fixés

Une heure avant l'anesthésie, du **SNC80** 10 mg/kg i.p. est administré pour permettre l'internalisation et une meilleure visualisation des récepteurs opioïdes δ . De la même manière, l'**ACEA** 5 mg/kg i.p. est injecté 30 minutes avant l'anesthésie, pour mieux visualiser les récepteurs CB1.

L'anesthésie des animaux et la chirurgie sont effectuées de la même manière que pour la ponction intracardiaque, jusqu'à l'accès au cœur. Une aiguille de 26G est alors insérée dans le ventricule gauche de la souris. Elle est reliée par un tube à une pompe péristaltique au préalablement rempli de paraformaldéhyde (**PFA**) 4% dans du PBS froid. L'oreillette gauche est perforée pour permettre au sang de sortir et une perfusion rapide (5 min, 20 ml/minute) est réalisée. Les tissus d'intérêt (cerveau, moelle épinière, ganglions rachidiens) sont récupérés.

A. Ganglions rachidiens

La colonne vertébrale est découpée pour permettre l'extraction des ganglions rachidiens puis stockée dans du PBS avec du PFA 4% jusqu'à utilisation. Les colonnes vertébrales sont rincées 3 fois avec du PBS. Les dernières côtes flottantes sont insérées au niveau du segment T13 de la colonne vertébrale, ce dernier est immédiatement suivi des segments lombaires L1 à L6. Chaque vertèbre est coupée en deux afin de libérer l'accès aux DRG associés aux segments spinaux L3 à L5. Ceux-ci sont alors placés dans une solution de PBS contenant 30% de sucrose pendant 24h. Le lendemain, les DRGs sont inclus dans de l'**OCT** et stockés à -80°C. Les DRGs sont alors coupés en sections de 16 μm d'épaisseur avec un cryostat (CM3050, Leica) et récoltés dans 4 puits différents. Les 3 DRGs étant inclus dans le même bloc d'OCT et récupérés en coupes flottantes, il est impossible de distinguer de quel niveau lombaire proviennent les coupes.

B. Cerveau

La souris est décapitée afin de récupérer le cerveau. Ce dernier est conservé 24h dans du PFA 4% en PBS froid puis est rincé 3 fois avec du PBS avant d'être coupé au vibratome (VT1000S, Leica). Le vibratome est réglé afin d'effectuer des tranches de 30 μm d'épaisseur. Les coupes flottantes sont récupérées en PBS dans des plaques 24 puits de sorte qu'un même puits ne contienne jamais 2 coupes successives.

IV. Neuroinflammation : dosage et détection de protéines

1. Homogénéisation des tissus

Les tissus sont maintenus sur carboglace jusqu'à utilisation. Les tissus provenant de 4 à 5 animaux de même condition sont rassemblés. Sur glace, dans un broyeur de tissus de type Potter-Elvehjem, les tissus sont homogénéisés dans un milieu contenant du PBS et des inhibiteurs de protéases de type **cOmplete**. Une fois homogénéisés, du Triton X-100 est ajouté pour une concentration finale de 1%. Les échantillons sont alors centrifugés à 10 000g à 4°C pendant 5 minutes, pour se débarrasser des débris cellulaires.

2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Afin d'évaluer la quantité de protéines présente dans nos échantillons, un dosage de protéine est effectué par la méthode de Bradford. L'échantillon est mis en contact avec le **réactif de Bradford** (dilution finale 1/5). Une courbe étalon est réalisée en ajoutant des quantités croissantes d'albumine bovine (BSA) allant de 0 µg à 20 µg. En présence de protéines, le réactif prend une teinte bleu caractéristique, dont l'absorbance à 595nm est proportionnelle à la quantité de protéine présente.

3. Kit d'analyse de cytokines

Le **Mouse XL Cytokine Array Kit** permet la détection simultanée dans 4 échantillons, de 111 protéines solubles dont majoritairement des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance. Le principe de ce kit est le suivant : des membranes de nitrocellulose, présentant les différents anticorps de capture, déposés en duplicata sous forme de points sont incubées avec les échantillons préalablement dilués ; 200µl de sérum ou 200 µg de protéines pour les homogénats de tissus. Les membranes sont rincées dans du tampon de rinçage puis incubées avec un cocktail d'anticorps de détection biotinylés selon les instructions du fabricant. Les membranes sont à nouveau rincées puis incubées avec la Streptavidine-HRP. Après une dernière phase de rinçage, les membranes sont mises en présence de réactifs chimio-luminescents. Le signal ainsi produit indique pour chaque point la proportion relative de protéines liées.

4. Acquisition et analyse d'images

Le signal est détecté à l'aide d'un imageur AmershamTM 680, et l'analyse est effectuée sur le logiciel Fiji/ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Grace à ce logiciel, nous déterminons des

régions d'intérêt (ROI) d'une aire définie de 0.028 cm² autour de chaque point, puis nous relevons la densité moyenne des niveaux de gris représentative de la proportion relative de chaque protéine.

V. Culture cellulaire et cinétique d'internalisation des récepteurs

1. Préparation des plaques de cultures

Des **lamelles en verre** de 12 mm de diamètre sont réparties dans des plaques 24 puits dans lesquels sont ajoutés 500 µl de solution de poly-L-Lysine (tampon borate pH 8.4, 50 M, **Poly-L-lysine** 30 µg/ml). Les plaques sont ensuite incubées de 2 à 16 heures à 37°C puis stockées à 4°C. Avant utilisation, les plaques sont rincées 3 fois avec de l'eau, puis avec du milieu **Neurobasal A** ou du **DMEM**.

2. Dissection

Des souriceaux âgés de 0 à 3 jours sont décapités, le cerveau est récupéré et aussitôt placé dans une boîte de pétri contenant 2 ml d'**Hibernate** à 4°C. Les deux hippocampes sont isolés, déposés dans 0.5 ml d'Hibernate et maintenus sur glace. La dissection de 2 souriceaux permet d'ensemencer une plaque de culture de 24 puits.

3. Digestion

Les hippocampes sont incubés au bain-Marie à 37°C dans une solution composée d'Hibernate et de **papaïne** (15-20 U/ml final) pour un volume final de 1 ml. Au bout de 20 minutes, la **désoxyribonucléase I** (1 mg/ml final) est ajoutée dans chaque tube. Au bout de 30 minutes d'incubation, le milieu de chaque tube est renouvelé avec 1 ml d'Hibernate. Les tissus sont alors dissociés mécaniquement avec une pipette Pasteur en verre filtrée et stérile ayant été au préalable flammée à son extrémité. Les tubes sont alors centrifugés 5 minutes à 1000 g. Le surnageant est enlevé et les cellules remises en suspension dans 1 ml de milieu d'ensemencement (DMEM 4.5 g/l glucose, 10% sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, **L-Glutamine** 2 mM, **Pénicilline** 100 U/ml, **Streptomycine** 100 µg/ml)

4. Ensemencement

Les homogénats sont regroupés et filtrés sur un **tamis cellulaire** (porosité 70 µm) afin d'éliminer les amas cellulaires. La concentration et la viabilité des cellules sont déterminées en présence de **bleu de Trypan** 0.06% à l'aide d'une cellule de Fuchs-Rosenthal. Les cellules

sont ensuite réparties dans les plaques 24 puits préalablement recouvertes de poly-L-Lysine de sorte que chaque puits contienne entre 100000 et 200000 cellules. Les plaques sont incubées pendant 1h à 37°C et 5% CO₂ puis rincées avec du milieu Neurobasal A à température ambiante. Le milieu de rinçage est alors remplacé par du milieu Neurobasal complet (Neurobasal A, **B27** 20 µl/ml, L-Glutamine 0.5 mM, **Glutamax** 2 mM, Pénicilline 100 U/ml, Streptomycine 100 µg/ml). Les cultures sont incubées pendant 12 à 17 jours à 37°C, 5% CO₂ et la moitié du milieu est remplacé par du milieu frais tous les 4-5 jours.

5. Cinétiques d'internalisation

Pour chaque ligand (tableau 3) ou combinaison de ligands, une cinétique sur 6 temps a été réalisée, un temps 0 minute qui correspond à l'état basal de la culture sans application de ligands, ainsi que des temps d'incubation de 5, 15, 30, 60 et 120 minutes. L'antagoniste est ajouté dans les puits 15 à 30 minutes avant le dépôt du premier ligand.

Ligand	activité	concentrations utilisées
Delt II	agoniste δ	1, 10, 100 nM
Met-enk	agoniste non selectif des récepteurs opioïdes	100 nM
SNC80	agoniste δ	10, 100 nM
ACEA	agoniste CB1	10 pM 1, 10, 100 nM 1, 10 µM
CBD	modulateur allostérique δ et CB1	1 pM 1, 100, 400 nM 1, 2, 10 µM
NTI	antagoniste δ	100, 200 nM

Tableau 3 : tableau récapitulatif des ligands et doses utilisés pour étudier les cinétiques d'internalisation des récepteurs (les références des ligands sont indiquées en Annexes)

Au terme des 120 minutes, les plaques sont rincées 3 fois avec du PBS à 4°C, avant l'ajout de 500 µl de PFA 4% dilué dans du PBS froid dans chaque puits. Au bout de 15 à 20 minutes, on effectue 3 nouveaux rinçages au PBS froid. Les plaques sont alors stockées à 4°C.

VI. Immunomarquage en coupe flottante

Tous les anticorps utilisés ainsi que leurs dilutions et leurs références sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Espèce hôte	Antigène	conjugué	dilution	détection	tissus	référence
lapin	CB1		1/1000	Primaire	cerveau	1006590, cayman chemical
poulet	GFP		1/1000	Primaire	cerveau	GFP-1020, Aves Labs
âne	lapin	AF647	1/2000	Secondaire	cerveau	A31573, Invitrogen
chèvre	poulet	AF488	1/2000	Secondaire	cerveau	A11039, Invitrogen
lapin	CB1		1/1000	Primaire	DRG	1006590, cayman chemical
souris	NF200		1/1000	Primaire	DRG	N0142, Sigma-Aldrich
souris	CGRP		1/1000	Primaire	DRG	ab81887, Abcam
	IB4 (lectine)	biotine	1/100	Primaire	DRG	L2140, Sigma-Aldrich
chèvre	lapin	AF750	1/250	Secondaire	DRG	A21039, Invitrogen
chèvre	souris	AF647	1/500	Secondaire	DRG	A21240, Invitrogen
	streptavidine	Cy5	1/200	Secondaire	DRG	JAC016170084, Jackson Immunoresearch
lapin	CB1		1/10000	Primaire	Culture	1006590, cayman chemical
poulet	GFP		1/1000	Primaire	Culture	GFP-1020, Aves Labs
chèvre	lapin	AF594	1/2000	Secondaire	Culture	A11012, Invitrogen
chèvre	poulet	AF488	1/2000	Secondaire	Culture	A11039, Invitrogen

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des anticorps utilisés pour les étapes d'immunomarquage

1. Immunohistochimie sur coupes fines de cerveau et de DRGs

Dans une plaque 24 puits, les coupes sont incubées avec une solution de blocage contenant du PBST (PBS 1x + **Tween 20** 0.2%), du **sérum normal de chèvre** (1.5%) et du **sérum d'âne** (1.5%) pour les coupes de cerveau, ou bien du PBST et du sérum normal de chèvre (3%) pour les DRGs. Les coupes sont ensuite mises en présence d'anticorps primaires (tableau 1) dilués dans la solution de blocage pendant toute la nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, les coupes sont rincées 3 fois 10 minutes avec du PBST puis incubées avec la solution d'anticorps secondaires dilués dans du PBST pendant 2h à température ambiante en prenant soin de les protéger de la lumière. Les coupes sont ensuite rincées à nouveau 3 fois 10 minutes avec du PBS avant d'être déposées sur lames. Une fois sèches les coupes sont rincées à l'eau pour enlever toute trace de sel puis remises à sécher. Les coupes sont alors montées entre lame et lamelles avec un milieu **Mowiol 4-88** auquel est ajouté du **DAPI** à 0.5 µg/ml. Les lames sont ensuite stockées à -20°C et peuvent être imagées à partir du lendemain.

2. Immunocytochimie sur culture cellulaire

L'immunomarquage des cultures est similaire à celui utilisé pour les coupes de cerveaux et de DRGs, hormis les points qui vont suivre. 1) La solution de blocage utilisée est composée de PBST et de sérum normal de chèvre (NGS 3%). 2) Du DAPI (0.5 µg/ml) est ajouté dans le

premier rinçage succédant à l'incubation des anticorps secondaires. Les deux rinçages suivants sont réalisés sans DAPI. 3) Les lamelles sont sorties de leurs puits et rincées à l'eau déminéralisée, puis une fois sèches, elles sont montées sur lames avec un milieu **ProLong** avant d'être stockées à -20°C.

VII. Acquisition des images de fluorescence

1. Coupes fines de cerveaux et DRGs

L'acquisition des images des **coupes de cerveau** a été réalisée avec le scanner de lames **NanoZoomer S60** et le module de fluorescence L11600-21 (Hamamatsu Photonics, Japon). La source lumineuse LX2000 (Hamamatsu Photonics, Japon) consiste en une lampe à mercure à ultra-haute pression couplée à une fibre optique. L'acquisition RVB simple a été réalisée en mode épifluorescence avec un jeu de filtres optimisé pour la détection du DAPI, de la fluorescéine, de la tétraméthylrhodamine ou du Cy5. L'acquisition a été réalisée à l'aide d'un objectif sec 20x (NA : 0,75). La résolution de 40x a été obtenue grâce à un convertisseur de lentilles. Ce dernier mode utilise toute la capacité de la caméra (résolution : 0,23 $\mu\text{m}/\text{pixel}$). Les neurones exprimant un marqueur fluorescent donné sont visualisés à l'aide du système de visualisation NDP:view avec un zoom haute résolution intégré et la possibilité de séparer les différents composants fluorescents.

En ce qui concerne les DRGs, les images sont acquises par microscopie confocale à l'aide d'un microscope Stellaris 8 (Leica, Allemagne) équipé d'un objectif à huile 63x (N.A. 1.4).

2. Culture cellulaire

La majorité des images a été acquise avec un microscope à épifluorescence (Leica DM R) équipé d'un objectif 63X à immersion à huile. Des observations avec un microscope confocal (SP5RS, Leica) utilisant des objectifs à huile 40x (NA : 1,25) et 63x (NA : 1,4) ont été utilisées pour valider la colocalisation des récepteurs opioïdes μ et δ . Les images ont été acquises avec le logiciel LCS (Leica). Les acquisitions confocales ont été réalisées en mode séquentiel (faisceaux d'excitation uniques : 405, 488 et 568 nm) afin d'éviter une éventuelle interférence entre les différentes émissions de fluorescence.

VIII. Analyse des résultats et statistiques

Lorsque nécessaire, l'analyse statistique a systématiquement été effectuée grâce au logiciel GraphPad Prism version 9.2.0 (GraphPad Software, San Diego, California USA).

1. Comportement

Pour la grande partie des test comportementaux, l'analyse a été effectuée grâce à des tests d'analyse de variance de type ANOVA à deux ou trois facteurs. A chaque fois nous avons regardé l'effet des facteurs, seuls ou en interaction.

En condition basale (pas de mesure répétée), les résultats de Von Frey ont été analysés avec une ANOVA à 2 facteurs (chirurgie, génotype), suivie d'un test de comparaison multiple de Šidák. Les résultats des tests évaluant l'état émotionnel, la coordination motrice, l'activité locomotrice et la température ont été eux aussi analysés grâce à des ANOVA à deux (sexe, chirurgie) ou trois (sexe, chirurgie, génotype) facteurs.

Les résultats de Von Frey, impliquant des mesures répétées, ont été analysés soit avec une ANOVA à trois facteurs à mesures répétées (sexe/fond génétique, chirurgie, temps), suivie d'un test de comparaison multiples de Tukey, soit par un modèle mixte (REML) suivi d'un test de comparaison multiples de Dunnett. L'ANOVA à mesures répétées ne peut pas traiter des données comprenant des valeurs manquantes. Nous avons donc analysé les données en les ajustant via un modèle mixte. Ce modèle mixte utilise le Maximum de Vraisemblance Restreint (REML *Restricted Maximum Likelihood*). En l'absence de valeurs manquantes, cette méthode donne les mêmes P valeurs que l'ANOVA à mesures répétées. En présence de valeurs manquantes (au hasard), les résultats peuvent être interprétés comme une ANOVA à mesures répétées. Les tests utilisés sont précisés dans la légende de chaque figure.

L'effet du CBD sur l'état émotionnel, a été analysé par des T-test appariés multiples pour les tests du nid, d'éclaboussement et d'interaction sociale. Pour le test de nage forcée, les résultats n'étant pas appariés, nous avons utilisé une ANOVA à deux facteurs (chirurgie, traitement) suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunnett.

2. Neuroinflammation

Pour chaque condition, les expériences ont été réalisées en duplicata sur n=1 échantillon, regroupant n=4 animaux. Ces données sont préliminaires et l'effectif ne permet pas de réaliser des tests statistiques.

3. Neuroanatomie

Les régions cérébrales ont été identifiées à l'aide de la 4e édition du Mouse Brain Atlas de Paxinos et Franklin (Paxinos & Franklin, 2012). Le comptage a été effectué sur des sections non consécutives dans la RVM (Bregma : -5,5 mm à -6,5 mm) sur des zones comprenant les

noyaux du raphé postérieur (pallidus, magnus, obscurus, interpositus), le noyau parapyramidal, la partie alpha du noyau réticulaire gigantocellulaire et le noyau paragigantocellulaire latéral.

Les changements d'expression des récepteurs dans la RVM entre la condition contrôle (sham) et les deux conditions neuropathiques (cuff et SNI) ont été analysés en utilisant une ANOVA à un facteur, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett ou Tukey. Toutes les données étaient normalement distribuées, comme vérifié à l'aide du test de normalité de Shapiro-Wilk. L'analyse statistique des résultats de von Frey a été effectuée à l'aide du test non paramétrique de Kruskal Wallis.

L'analyse de la distribution des récepteurs a été effectuée de manière qualitative en relevant le nom des structures dans lesquelles, les deux signaux correspondant aux récepteurs δ et CB1 étaient colocalisés dans les mêmes neurones.

4. Culture cellulaire

Une analyse qualitative en aveugle a été effectuée, afin de déterminer dans chaque condition (temps, ligands) si les récepteurs δ et CB1 étaient internalisés ou non. Un signal continu localisé dans la zone membranaire et péri-membranaire a été considéré comme un récepteur non internalisé, et un signal punctiforme localisé dans le soma ou dans la zone péri-nucléaire a été considéré comme un récepteur internalisé.

RESULTATS

CHAPITRE I :

(Article en préparation)

Mechanical allodynia and emotional symptoms in WT and δ KO mice following cuff-induced neuropathic pain.

¹Gaborit M. ¹Leboulleux Q. ¹Sagot C. ²Doridot S. ¹Mélanie K. ¹Massotte D

¹ Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg, France. ² Chronobiotron, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France

Abstract

Neuropathic pain is a debilitating condition caused by damage to the somatosensory nervous system. It affects a significant portion of the population and is often associated with comorbid symptoms such as anxiety and depression. Despite its prevalence, the underlying mechanisms of neuropathic pain remain poorly understood, and current treatments are often ineffective. Animal models, such as the cuff model, have been developed to study neuropathic pain and its associated symptoms. This study aimed to investigate sex differences in mechanical sensitivity and emotional states associated with neuropathic pain using the cuff model in mice. The results showed that naïve female mice were more sensitive to mechanical stimuli than males. Male mice developed long-lasting mechanical allodynia after cuff surgery, accompanied by decreased well-being. In contrast, female mice did not develop mechanical allodynia and did not show altered well-being. The study also explored the role of the δ opioid receptor and found that its deletion did not affect basal nociception in males or females. However, δ knockout (KO) female mice exhibited transient mechanical allodynia, suggesting the involvement of the δ opioid receptor in nociceptive threshold. Strain differences were also considered, highlighting their influence on nesting behaviour in both sexes. In conclusion, this study underscores sex differences in neuropathic pain and highlights the role of the δ opioid receptor and strain effects on pain-related behaviours.

Introduction

The International Association for the Study of Pain (IASP) defines neuropathic pain as pain caused by a lesion or disease of the somatosensory nervous system (Trouvin & Perrot, 2019). It can arise from damage in either the central or peripheral nervous system. Neuropathic pain affects approximately 7% of the general population, with pain of peripheral origin being among the most prevalent. Examples of conditions associated with neuropathic pain include neuralgia, polyneuropathy, radiculopathy, or pain that occurs as a result of peripheral nerve damage (Bouhassira, 2019). Neuropathic pain manifestations can take various forms, it can be spontaneous or evoked by a stimulus. When the pain is evoked, neuropathic patients exhibit abnormal sensations such as allodynia (pain due to a stimulus that does not normally provoke pain) and hyperalgesia (increased pain in response to a noxious stimulus), (Finnerup *et al.*, 2021). Additionally, in neuropathic patients, pain does not come alone and is often associated with comorbid symptoms such as anxiety and depression (Bair *et al.*, 2003; Radat *et al.*, 2013).

To address the mechanisms underlying neuropathic pain and associated comorbidities, various animal models have been developed (Jaggi *et al.*, 2011). In the cuff model, a standardized polyethylene cuff is wrapped around the common branch of the sciatic nerve. Mosconi and Kruger initially developed this model in rats with the aim of overcoming the variability of ligature tightness in the chronic constriction injury (CCI) model (Mosconi & Kruger, 1996). It was later adapted to C57Bl/6J mice (Cheng *et al.*, 2002; Benbouzid *et al.*, 2008a). In this model, males developed transient hot thermal hyperalgesia as well as spontaneous pain that last 3 to 4 weeks. They also developed mechanical allodynia that lasted up to 12 weeks (Benbouzid *et al.*, 2008a; Yalcin *et al.*, 2011; Sheehan *et al.*, 2021). In males, anxiety-like symptoms appeared 4 to 6 weeks after surgery and depressive-like symptoms at 6 to 8 weeks after surgery. These symptoms lasted beyond the recovery of mechanical allodynia (Benbouzid *et al.*, 2008a; Yalcin *et al.*, 2011). The impact of nerve cuffing on the mechanical threshold has been poorly examined in females and anxiodepressive-like symptoms not at all. One study reported that females exhibited comparable spontaneous pain, thermal hyperalgesia and mechanical allodynia lasting for at least 30 days (Sheehan *et al.*, 2021). Another study observed similar mechanical allodynia in males and females after nerve cuffing (Ceredig *et al.*, 2018).

Regarding the underlying mechanisms, accumulating evidence both in clinical and preclinical models support an important contribution of neuroinflammation in the peripheral

and central nervous systems as indicated by an imbalance in a large number of pro and anti-inflammatory markers (Jiang *et al.*, 2020; Bohren *et al.*, 2022). In line, the pro-inflammatory cytokines TNF α , IL-6, and IL-1 β were upregulated in the hippocampus of males 2 weeks after the cuff surgery (Bai *et al.*, 2021).

The opioid system, especially the delta (δ) opioid receptor, represents another critical modulator of neuropathic pain and mood disorders (Lutz & Kieffer, 2013; Nadal *et al.*, 2013). Studies exploring the role of δ receptors in neuropathic models consistently indicated that it exerted a protective function. Indeed, exacerbated mechanical allodynia has been observed in δ deficient mice with partial sciatic nerve ligation (pSNL), (Nadal *et al.*, 2006; Martínez-Navarro *et al.*, 2020). However, a recent study showed that conditional deletion of δ opioid receptors in astrocytes reduced cold allodynia in pSNL female mice but not in male mice (Reiss *et al.*, 2021) suggesting that the mechanisms involved may be more complex. The analgesic property of δ opioid receptors agonists in chronic and neuropathic pain conditions, is also well established (Berthiaume *et al.*, 2020). Moreover, in the cuff model, peripheral δ opioid receptors are mandatory for the anti-allodynic effect of tricyclic antidepressants (Benbouzid *et al.*, 2008b), SNRI (Ceredig *et al.*, 2018) and beta mimetics (Ceredig *et al.*, 2020).

δ opioid receptors also modulate stress responses, mood and emotions including anxiety and depression. Deletion of δ opioid receptors increased the basal level of anxiety (Filliol *et al.*, 2000; Chu Sin Chung *et al.*, 2015; Browne & Lucki, 2019; Dremencov *et al.*, 2023) and increased anxious and depressive like symptoms in pSNL animals (Martínez-Navarro *et al.*, 2020).

In this context, we evaluated sex-differences in mechanical allodynia and emotional state following the cuff surgery in C57BL/6J:129cvPas 50:50 mice. We addressed the contribution of the δ opioid receptor in the development of neuropathy and comorbid symptoms. Finally, we determined whether the expression of neuroinflammatory markers was affected by the neuropathic conditions in the serum and in two brain regions of male and female mice.

Materials and methods

Animals

A mouse line expressing μ opioid receptor fused with the fluorescent protein mCherry (μ -mCherry), (Erbs *et al.*, 2015), was used as control (WT), and a mouse line knocked-out for the δ opioid receptor (δ -KO) with the μ opioid receptor fused to mCherry was used to assess the implication of δ opioid receptor. The latter was obtained by crossing previously generated δ -KO mice (Filliol *et al.*, 2000) with μ -mCherry mice. The genetic background of all animals is 50:50 C57Bl/6J:129SvPas (50:50). Male and female mice were bred and provided by the Chronobiotron UMS3415 (approval number B6748225). Mice were housed 2 to 5 per cage with a 12-hour light/dark cycle and a light phase from 8 am to 8 pm. The room temperature was maintained at $23 \pm 2^\circ\text{C}$, and the humidity set at $45 \pm 5\%$. All behavioural tests took place during the light phase. Food and water were provided ad libitum, and the cage was enriched with nesting material (cotton pads). All experiments were conducted in agreement with the European Directive on the protection of animals used for scientific purposes (no. 2010/63/EU), approved by the French Ministry of Higher Education, Research, and Innovation, and the animal experimentation ethics committee (APAFIS#23672-2020011418165945 v3 (APAFIS#23672)).

Cuff model of neuropathic pain

Neuropathic pain was induced by cuffing the main branch of the sciatic nerve of the right hindpaw as previously described (Yalcin *et al.*, 2011). Mice aged 8 to 14 weeks were anesthetized with a solution of ketamine 20 mg/kg (Ketamine 1000, Virbac, France) and a mixture of tiletamine and zolazepam (Zoletil 50, Virbac, France) 80 mg/kg. The right leg of the mice is then shaved and disinfected with an anti-bacterial spray (Apaisyl cleanspray, Vidal, France). An incision was made at the level of the thigh. Using two sterile toothpicks, the main branch of the sciatic nerve was exposed. A sterile polyethylene cuff (length 2mm, internal diameter 0.38 mm, external diameter 1.09 mm, Py2 59-8323, Harvard apparatus, UK) was then placed around the nerve, and the cuff was tightened around the nerve for proper compression. The wound was sutured, and the animals were placed under a warm lamp with gel food available. Sham-operated animals underwent the same surgical procedure without the placement of a cuff.

Assessment of mechanical sensitivity

Mechanical allodynia was tested before surgery and every week after surgery using von Frey filaments. Calibrated von Frey filaments were being applied to the plantar surface of each hindpaw until they just bend, in a series of ascending forces up to the mechanical threshold. The filaments were applied five times per paw, and the mechanical threshold was defined as the lower of two consecutive filaments for which three or more withdrawals of the paw out of the five trials are observed. Tests were performed by a single experimenter.

Evaluation of the emotional state

Behavioural tests aiming to assess the emotional state were performed 7 to 8 weeks after the surgery during the light phase. Each subject underwent a series of behavioural tests, beginning with the nest test, followed by the splash test the next day, and concluding with the social interaction test on the subsequent day.

- Splash test

In this test, the grooming time is considered an indicator of depressive-like symptoms. Mice were habituated to the testing room for one hour. Each mouse was placed alone in a cage filled with clean bedding and sprayed with a 20% sucrose solution. Animals were videotaped for 5 minutes. The number and duration of the grooming episodes were determined.

- Nest test

This test is used as an indicator of animal well-being (Jirkof, 2014). Mice were individually housed in clean cages with water and food for one hour before the test to habituate to the new environment. A pressed cotton square was provided for nest building and the quality of the nest rated 4 hours later using a scale from 0 to 4 with 0. nestlet not noticeably touched (more than 90% intact). 1. nestlet partially torn (50-90% remaining intact). 2. nestlet mostly shredded but often no identifiable nest site: less than 50% of the nestlet remain intact, but less than 90% is within a quarter of the cage floor area. 3. An identifiable but flat nest: more than 90% of the nestlet is torn and the material is gathered into a nest within a quarter of the cage floor area, but the nest is flat for more than 50% of its circumference. 5. A (near) perfect nest: more than 90% of the nestlet is torn and the nest is a crater, with walls higher than mouse body height for more than 50% of its circumference (Deacon, 2006).

- Social interaction test

Social interaction was used to assess the level of anxiety of the animals (Castanheira *et al.*, 2018). Mice were moved in the testing room one hour prior to the test. Two unfamiliar mice, one being the mouse under evaluation (test mouse) and the other being a mouse of the same sex and similar size, were simultaneously placed in a cage filled with clean bedding. During the 5 minutes following their encounter, the mice were recorded, and episodes of sniffing initiated by the test mouse were counted and timed.

Motor coordination and locomotor activity

Rotarod and locomotor activity were assessed 4 weeks post-surgery.

- Rotarod

One day before testing, animals were habituated and trained to stay on the device consisting in a horizontal rotating cylinder, divided into four compartments to prevent any contact between mice. Once each mouse successfully maintained its position on the cylinder set at 4 RPM, for one minute, the learning phase was considered complete. On the test day, animals were placed on the device, and the cylinder rotation was set to accelerate for 5 minutes, starting at 4 RPM and ending at 40 RPM. The latency to fall and the speed reached by the cylinder were recorded.

- Locomotor activity

Each mouse was placed in a cage filled with fresh bedding, and the distance travelled by the mouse was measured for a period of 15 minutes using the ANI-maze™ software (Stoelting Europe, Ireland) equipped with a camera that allows automated tracking of each animal.

Sample collection:

Four weeks after the surgery, mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of Ketamine (Ketamine 1000, 300 mg/kg) and Xylazine 20 mg/kg (Paxman, Virbac, France). Lidocaine 10 mg/kg s.c. (Lurocaine, Vetoquinol S.A. France) was administered locally. Blood was collected by intracardiac puncture in the left ventricle of the heart. Mice were decapitated, and brains removed. The hippocampus and brainstem were collected.

Serum: blood samples were allowed to clot for two hours at room temperature before being centrifuged for 15 minutes at 2000g. The serum (supernatant) was stored at -20°C before use.

Tissue lysate : tissue were homogenized in a medium containing PBS and cOmplete-type protease inhibitors (Roche, 11836170001). Once homogenized, Triton X-100 was added at a final concentration of 1%. The samples were centrifuged at 10,000g at 4°C for 5 minutes to remove cellular debris and supernatants immediately used for cytokine array experiments.

Cytokine arrays

The micro-array was realised based on the instructions of the Proteome Profiler Mouse XL Cytokine array kit, (Biotechne, ARY028). Briefly, this array is a membrane-based sandwich immunoassay. Capture antibodies spotted in duplicate on nitrocellulose membranes bind to specific target proteins (supplementary table 1) present in the sample. Captured proteins are detected with biotinylated detection antibodies and then visualized using chemiluminescent detection reagents. The signal produced is proportional to the amount of analyte bound. One array was performed in duplicate for each condition, using a sample composed of pooled serum or tissues from four animals.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 9.2.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA). For Von Frey test, we analysed data by fitting a mixed model. Repeated measures ANOVA cannot handle missing values. We analyzed the data instead by fitting a mixed model as implemented in GraphPad Prism 8.0. This mixed model uses a compound symmetry covariance matrix, and is fit using Restricted Maximum Likelihood (REML). In the absence of missing values, this method gives the same P values and multiple comparisons tests as repeated measures ANOVA. In the presence of missing values (missing completely at random), the results can be interpreted like repeated measures ANOVA. This analysis was followed by Tukey's multiple comparisons test.

For other tests, two or three way ANOVA followed by Šídák's or Tukey's multiple comparisons test were used. To assess correlation between weight and mechanical sensitivity, a linear regression was used

Results

Female mice were more sensitive to mechanical stimuli than males

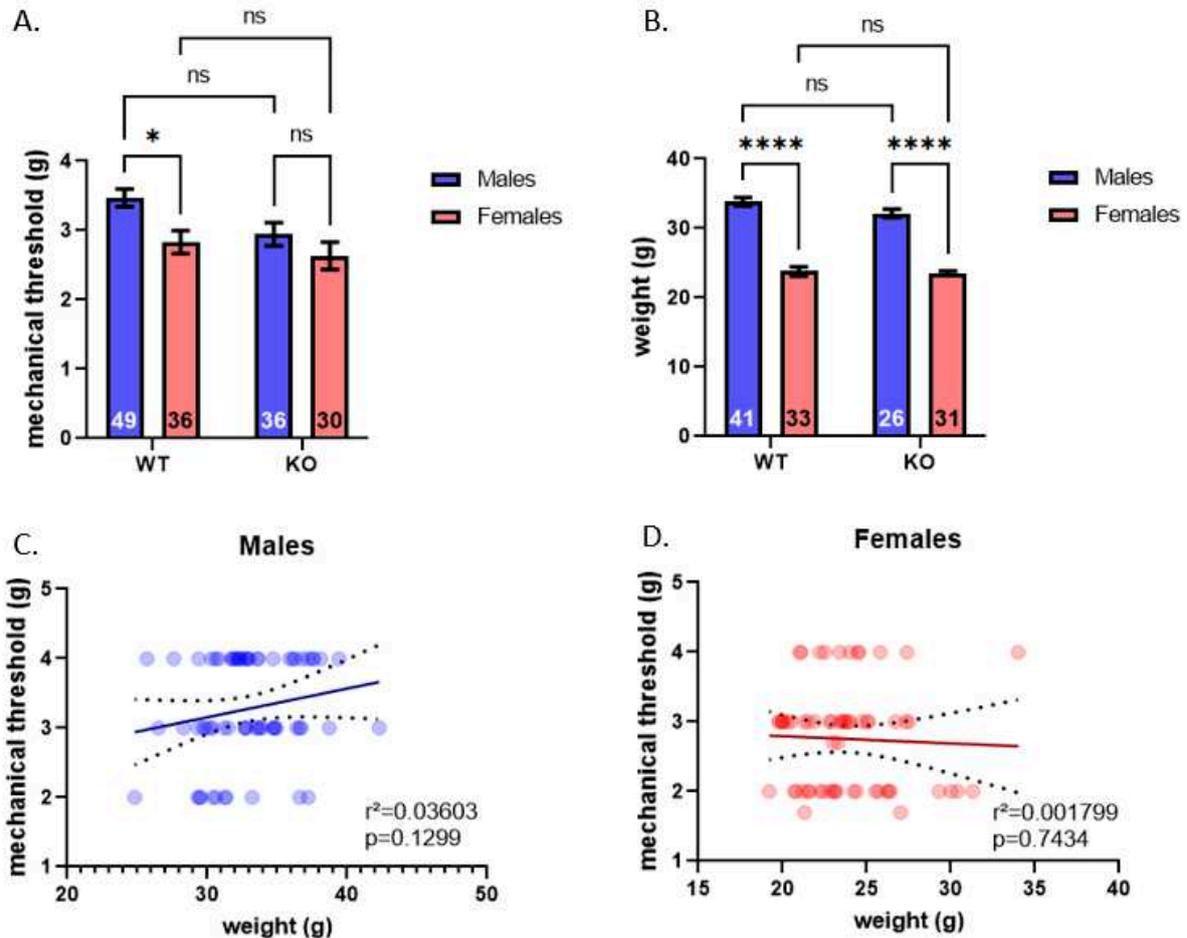


Figure 1: Sex-difference in basal mechanical sensitivity measured by Von Frey test in WT and δ knock-out mice (A). Body weight of WT and δ knock-out mice (B). Two-way ANOVA, results are expressed in means \pm SEM, post-hoc: Šidák's multiple comparisons test, ns $p>0.05$, * $p<0.05$, **** $p<0.0001$. The number of animals per group is indicated at the bottom of each bar. Linear regression plot between mechanical threshold and weight in males $n=66$ (C) and females $n=62$ (D) mice of the two genotypes.

We first assessed the basal mechanical threshold in males and females of the two genotypes. Two-way ANOVA revealed a significant effect of genotype ($p=0.0276$, $F(1, 147) = 4.948$) and a significant effect of sex ($p=0.0042$, $F(1, 147) = 8.446$) on the mechanical threshold (Figure 1.A.). However, post hoc analysis only detected a significant difference between WT males and females ($p=0.0227$) suggesting that female mice are more sensitive to mechanical stimuli than males. We then determined whether this sex-dependent difference in mechanical threshold was linked to body weight differences (Figure 1.B). Two-way ANOVA

revealed a significant effect of sex ($p > 0.0001$, $F(1, 127) = 237.0$), with females being significantly lighter than males. No effect of genotype or interaction was found. Then, we correlated weight and mechanical threshold separately in males (Figure 1.C.) and females (Figure 1.D.) to avoid the confounding variable sex. Linear regression in both males and females did not reveal any correlation between weight and mechanical sensitivity neither in males nor in females. Taken together, these results suggest that the mechanical threshold is influenced by sex-dependent variables that are not related to the body weight.

Cuff surgery induced mechanical allodynia in males and females

We evaluated the impact of the cuff surgery on the nociceptive threshold in relation to the sex in WT and δ knock-out mice. In WT animals (Figure 2, A), a three-way ANOVA analysis revealed a significant effect of time ($p > 0.0001$, $F(5, 360) = 13.69$), sex ($p < 0.0001$, $F(1, 81) = 43.52$) and surgery ($p < 0.0001$, $F(1, 81) = 48.68$) with significant interactions between time and sex ($p > 0.0001$, $F(5, 360) = 5.762$), sex and surgery ($p > 0.0001$, $F(1, 81) = 33.25$), time and surgery ($p > 0.0001$, $F(5, 360) = 5.682$) and time, sex and surgery ($p = 0.0029$, $F(5, 360) = 3.677$). Post-hoc analysis confirmed that cuff surgery induced a higher sensitivity to mechanical stimuli in male up to 7 weeks. Females also developed mechanical hypersensitivity that was significant a week after surgery. Mechanical sensitivity of cuff females was not different from cuff males.

In δ knock-out animals (Figure 2, B), the three-way ANOVA analysis revealed a significant effect of time ($p > 0.0001$, $F(5, 269) = 12.14$), sex ($p < 0.0001$, $F(1, 62) = 70.27$) and surgery ($p < 0.0001$, $F(1, 62) = 174.4$) with significant interactions between time and surgery ($p > 0.0001$, $F(5, 269) = 13.92$), sex and surgery ($p = 0.0041$, $F(1, 62) = 8.885$), and time, sex and surgery ($p = 0.0006$, $F(5, 269) = 4.471$). Post-hoc analysis confirmed that cuff surgery induced a higher sensitivity to mechanical stimuli in male mice, and in females compared to sham animals. Additionally, females sham displayed significantly lower mechanical sensitivity than sham males at several time point after surgery. No differences were noticeable between males and females in cuff animals.

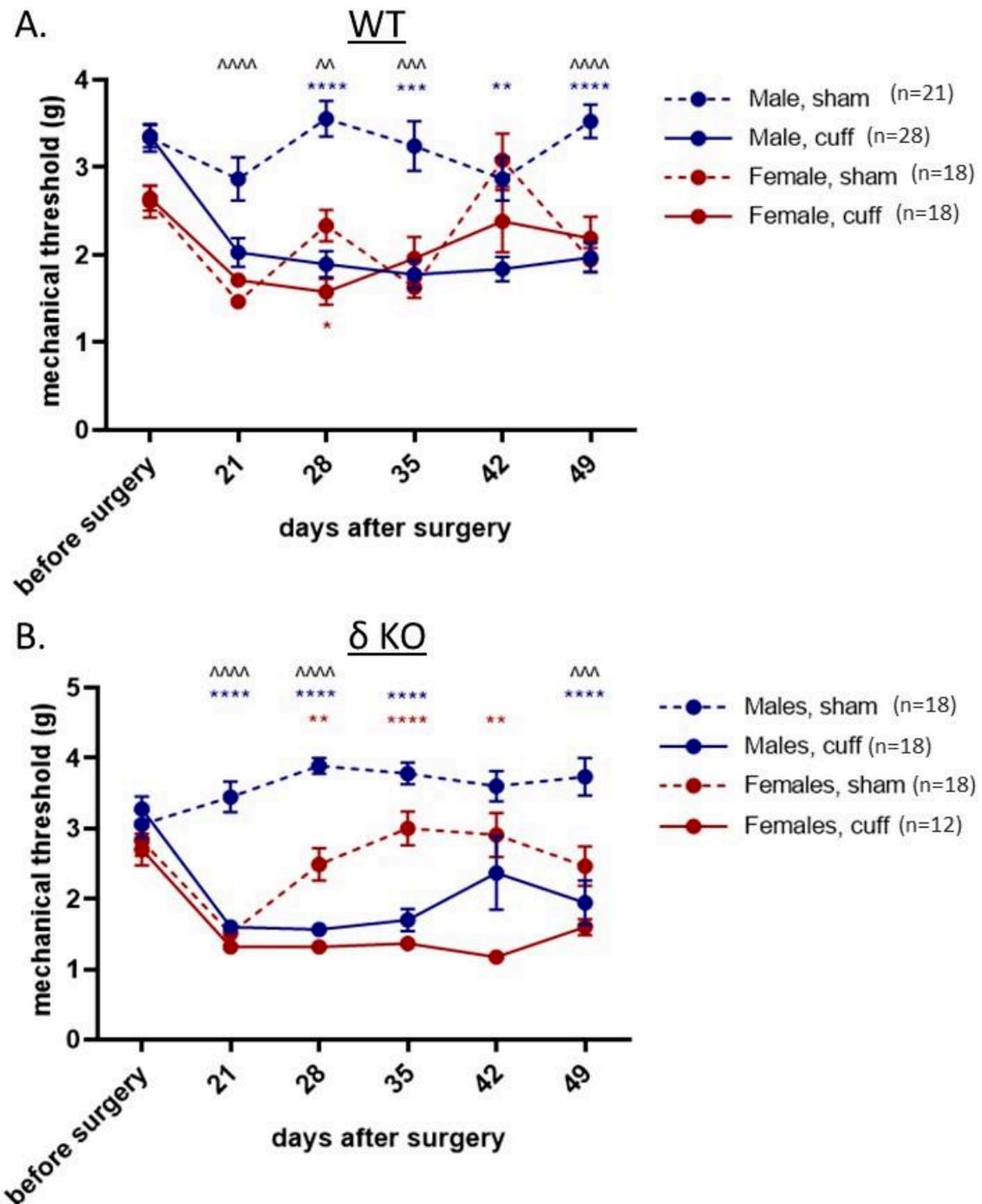


Figure 2: Mechanical allodynia induced by the cuff surgery in WT (A) and δ knock-out (B) male and female mice measured by Von Frey test. Mixed model analysis using restricted maximum likelihood (REML) results are expressed in means +/- SEM, post-hoc: Tukey's multiple comparisons test, ^ sham males vs sham females; *sham vs cuff. * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. In A, considering the variability of sham, females cuff post hoc comparison were done compared to "before surgery".

Cuff surgery had no effect on locomotor activity and motor coordination

We first verified whether the cuff surgery induced locomotor changes. We assessed motor coordination using the Rotarod test (Figure 3, A). The two-way ANOVA analysis failed to detect any significant differences related to sex or surgery. Although a significant interaction was found between sex and surgery ($p=0.0358$, $F(1, 33) = 4.791$), post-hoc analysis did not reveal any differences. Subsequently, we assessed locomotor activity (Figure 3.B.). The two-way ANOVA analysis did not detect any significant effects of sex or surgery on locomotor activity, nor any interaction between these factors. Taken together, our data indicate that the cuff surgery had no effect on locomotion that could be a confoundant factor in other behavioural tests.

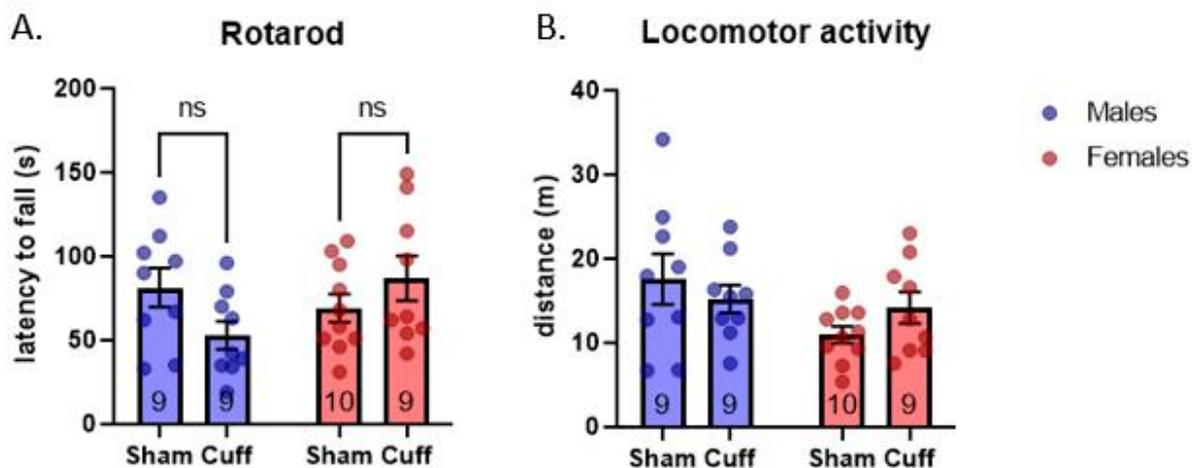


Figure 3: Motor coordination (A) and locomotor activity (B) in sham and cuff male (blue) and female (red) WT mice. A. The motor coordination was defined as the latency to fall in the Rotarod test. B. The locomotor activity was measured for 15 minutes by tracking the mouse in a homepage. Two-way ANOVA, results are expressed as means \pm SEM, post-hoc: Tukey's multiple comparisons test, the number of animals per group is indicated at the bottom of each bar.

Cuff surgery did not affect depressive-like behaviour in males or females

Next, we proceeded to assess whether cuff surgery could induce depressive-like behaviour, as measured by the Splash test (Figure 4.). Three-way ANOVA revealed a significant effect of genotype ($p > 0.0001$, $F(1, 127) = 38.85$, $P < 0.0001$) but no effect of sex, surgery or interaction. Post-hoc analysis demonstrated that δ knock-out males spent more time grooming than WT for both sham and cuff animals. In females, the difference was only significant in sham animals. These results suggest that the depressive-like behaviour was not affected by the cuff surgery.

Surprisingly, the basal level of grooming was increased when the δ opioid receptor was not expressed compared to WT.

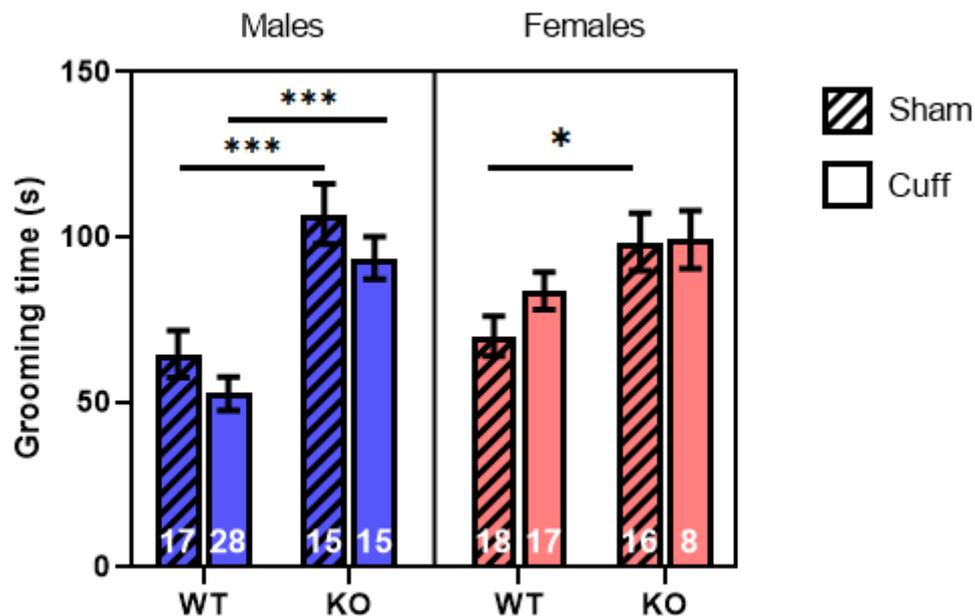


Figure 4: Splash test. The grooming time was measured in WT (hatched) and δ knock-out (plain) male (blue) and female (red) mice. Three-way ANOVA, results are expressed in means \pm SEM, post-hoc: Šídák's multiple comparisons test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, the number of animals per group is indicated at the bottom of each bar.

Cuff surgery decreased wellbeing in WT males only

We then examined how cuff surgery affected the quality of the nest as an indication of animal wellbeing (figure 5A). Preliminary tests were performed to determine the optimal duration of the test. We observed that the nest quality was insufficient at 2 hours, and that there was no further improvement at 6-hour compared to the 4-hour duration (unpublished observations). Consequently, we decided to set the test duration at 4 hours. The three-way ANOVA analysis revealed no significant effect of sex, surgery or genotype, however it unveiled significant interaction between genotype and sex ($p=0.0092$, $f(1, 136) = 6.983$), sex and surgery ($p=0.0134$, $f(1, 136) = 6.284$) and genotype, sex and surgery ($p=0.0378$, $f(1, 136) = 4.399$). Post hoc analysis showed that WT cuff males were building nests of significantly lower quality than WT sham males, KO cuff males and WT cuff females. Because the temperature of the body can affect the quality of the nest (Greenberg *et al.*, 2016), we measured body temperature of sham and cuff WT mice of both sexes to see if the drop of nesting quality in cuff males could be linked to a drop in body temperature (figure 5.B.). The two-way ANOVA analysis did not evidence any significant effect of surgery or sex on body temperature in WT mice. Taken together, those results suggest that cuff surgery induced sex and genotype specific decrease in well-being in WT males only.

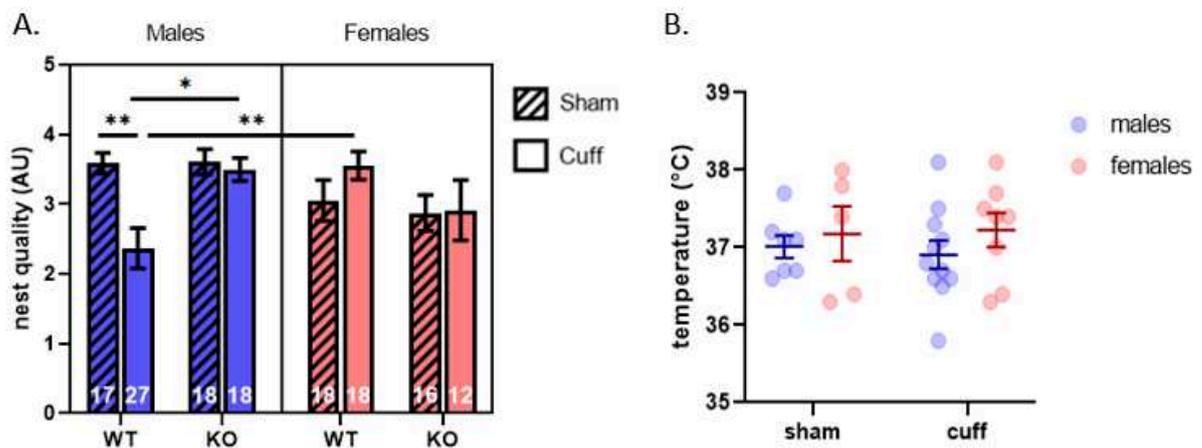


Figure 5: A. Nest quality. The quality of the nest was assessed in WT (hatched) and δ knock-out (plain) male (blue) and female (red) mice. Three-way ANOVA, results are expressed as means \pm SEM, post-hoc: Šidák's multiple comparisons test, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$, the number of animals per group is indicated at the bottom of each bar. B. Body temperature of WT mice depending on sex and surgery. Two-way ANOVA, results are expressed in means \pm SEM.

Social interaction in cuff animals was differentially influenced by the sex and genotype

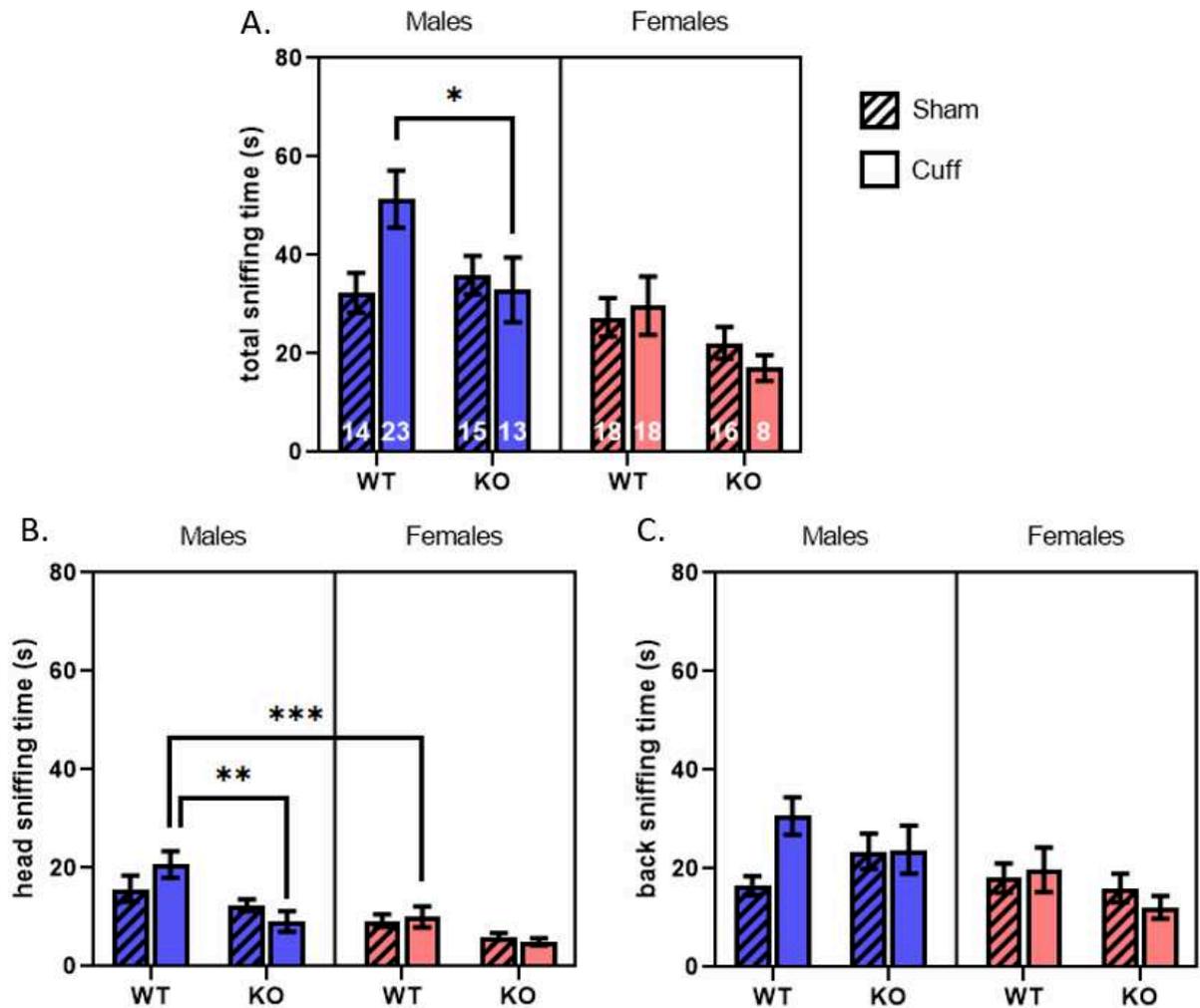


Figure 6: Social interaction test. Total (A), head (B) and back (C) restricted sniffing times were measured in WT (hatched) and δ knock-out (plain) male (blue) and female (red) mice. Three-way ANOVA, results are expressed as means \pm SEM, post-hoc: Šídák's multiple comparisons test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, the number of animals per group is indicated at the bottom of each bar.

In a separate set of tests, we assessed whether cuff surgery influenced social interaction as a marker of the level of anxiety. The three-way ANOVA analysis revealed a significant effect of sex ($p = 0.0003$, $F(1, 117) = 13.75$) and genotype ($p = 0.0327$, $F(1, 117) = 4.671$) on the total sniffing time (Figure 6.A.) but no effect of surgery or interaction between the two parameters. Of note, the statistical analysis showed a tendency for an interaction between genotype and surgery ($p = 0.0545$, $F(1, 117) = 3.771$). Post hoc analysis revealed that WT cuffed males interacted more than their δ KO counterpart. Dividing, total sniffing time in head-directed

(Figure 6.B.) or back-directed (Figure 6.C), results revealed that the head sniffing time was significantly modified by the sex ($p > 0.0001$, $F(1, 117) = 19.97$) and the genotype ($p = 0.0003$, $F(1, 117) = 13.97$) but not the back sniffing time. Those results suggest that males interacted more than females, and that δ knock-out interacted less than WT, particularly in cuff males. Since social interaction can be used as a measure of anxiety (File & Seth, 2003), our data suggest that δ KO animals were more anxious than WT animals.

Strain-differences between C57Bl/6J and C57BL/6J:129svPas 50:50

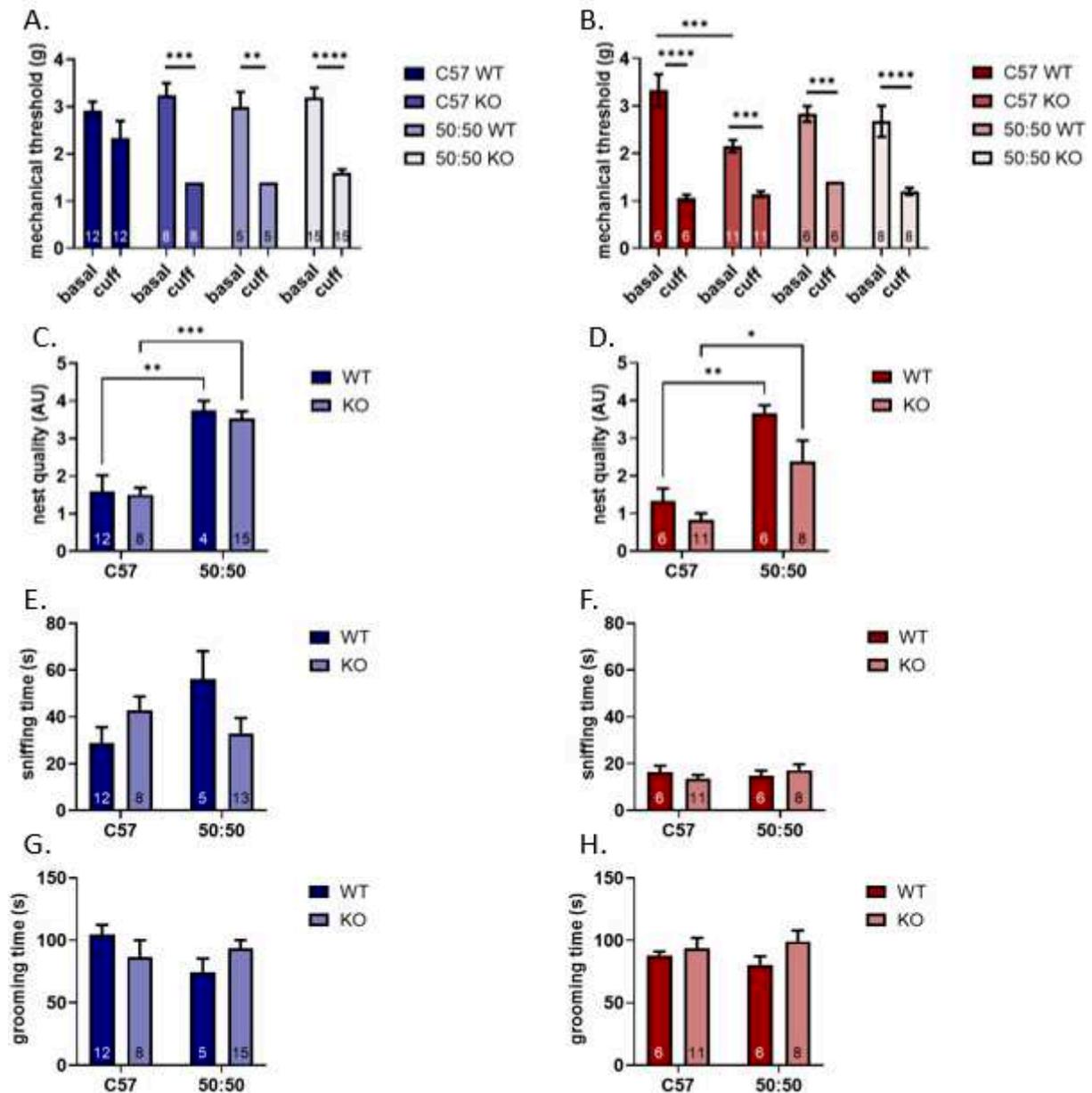


Figure 7: Strain and genotype-induced differences of cuff mice in the von Frey test (A, B), nest test (C, D), social interaction test (E, F) and splash test (G, H). The results for WT and δ

knock-out males are represented in blue (A, C, E, G) and for WT and δ knock-out females in red (B, D, F, H). Results are represented by means \pm SEM and statistical analysis was done using three-way ANOVA followed by Šídák's multiple comparisons test (A, B), or two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test (C, D, E, F, G, H). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Experiences were conducted to evaluate strain-induced differences in cuff mice. As the number of sham mice was too low for statistical analysis in these cohorts, the strain-induced differences were only analyzed in cuff animals. Three-way ANOVA analysis in males (Figure 7.A.) revealed a main effect of surgery ($p < 0.0001$, $F(1, 36) = 76.07$) but no effect of genotype or strain on the mechanical threshold. Similar results were obtained in females (Figure 7.B.) with a main effect of surgery ($p < 0.0001$, $F(1, 27) = 168.6$) and genotype ($p = 0.0121$, $F(1, 27) = 7.246$) however no effect of strain was detected. Additionally, interaction effects between surgery and genotype ($p = 0.0166$, $F(1, 27) = 6.518$) and surgery, strain and genotype ($p = 0.0111$, $F(1, 27) = 7.442$) were found in females. Next, we investigated the effect of the strain in the nest test. In males (Figure 7.C.), the two-way ANOVA analysis revealed a main effect of the strain ($p < 0.0001$, $F(1, 35) = 33.22$) without any effect of genotype or interaction. In females (Figure 7.D.), a main effect of the strain was also detected ($p < 0.0001$, $F(1, 27) = 28.42$) together with an effect of the genotype ($p = 0.0199$, $F(1, 27) = 6.130$) without any interaction. In the social interaction (Figure 7.E, F.) and splash (Figure 7.G, H.) tests, no main effect of strain or genotype was detected neither in males nor in females. However, in males, the two-way ANOVA analysis detected an interaction between strain and genotype ($p = 0.0244$, $F(1, 34) = 5.553$) in the splash test (Figure 7. E). Taken together, these results suggest that the strain influenced greatly the nesting behaviour in both sexes. Additionally, although the strain by itself had no effect on social interaction or mechanical sensitivity, its interaction with other factors such as genotype or surgery may explain some of the observed differences.

Sex and Neuropathy-Related Changes in Neuroinflammatory Markers

In order to better understand the molecular mechanisms underlying neuropathic pain and sex-differences in mechanical sensitivity we studied the regulation of neuroinflammatory markers in WT animals. To this aim, we screened for the presence of these inflammatory molecules 4 weeks after surgery in the serum, hippocampus, and brainstem of male and female

mice, with or without neuropathic pain using a micro-array that includes 111 molecules involved in inflammatory processes such as cytokine, chemokines or growth factors.

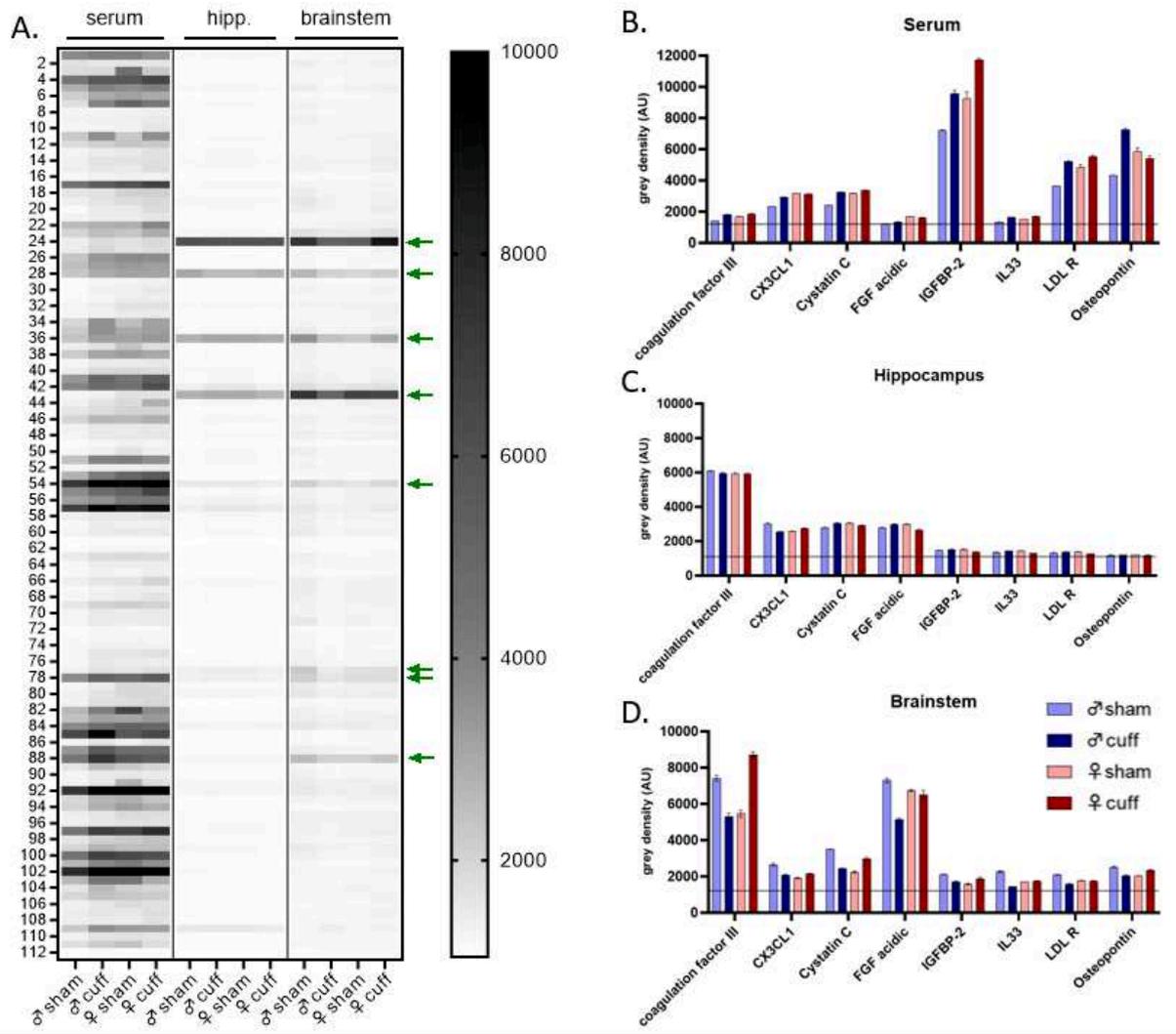


Figure 8: Relative expression of neuroinflammatory markers in the serum, hippocampus, and brainstem of male and female mice 4 weeks after cuff surgery or in male and female sham mice using the Proteome Profiler Mouse XL Cytokine array. A. Heatmap representing the relative expression of inflammatory markers in grayscale. The relative expression of markers indicated by green arrows in A. are detailed in B, C and D. Row 24 : coagulation factor III, row 28 : CX3CL1, row 36 : Cystatin C, row 43 : FGF acidic, row 54: IGFBP-2, row 77 : IL-33, row 78 : LDL-R, row 88 : osteopontine and row 112 : negative control. B, C and D. Bar plots illustrating the relative expression of 8 inflammatory markers selected for their detection in brain tissues. B Expression of these molecules in the serum, C in the hippocampus, and D in the brainstem. Experiment were done in duplicate for each sample explaining presence of SEM.

Our preliminary data show that a higher number of inflammatory molecules were present in the serum (Figure 7.A) compared to the two brain regions. In the hippocampus, four molecules stood out of the background: coagulation factor III (24), CX3CL1 (28), Cystatin C (36) and FGF acidic (43). Those molecules were also present in the brainstem together with IGFBP-2 (54), IL-33 (77), LDL-R (78) and osteopontin (88). Among these eight molecules, CX3CL1, Cystatin C, IGFBP-2, LDL-R and osteopontin were also present in the serum (Figure 7.B). Looking at the relative expression of these eight molecules, we did not notice any difference related to sex or surgery in the hippocampus (Figure 7.C). In the brainstem (Figure 7.D), the expression of the coagulation factor III seemed higher in males than in females and differentially regulated by cuff surgery as the expression dropped in cuff males and rose in cuff females. The expression levels of cystatin, FGF acidic and IL-33 also dropped in cuff males compared to the sham condition. However, these changes in expression showed a different profile in the serum (Figure 7.B.). Further investigations are now needed to confirm these modifications in expression levels.

Discussion

In this study, we demonstrated that naïve female mice are more sensitive to mechanical stimuli than males. We observed that the cuff model of neuropathic pain surgery induced mechanical allodynia in males and females without altering motor coordination or locomotor activity. Male mice that underwent cuff surgery exhibited decreased well-being but female mice did not. In mice lacking the δ opioid receptor, no difference in basal nociception was observed between males and females. Both males and females developed mechanical allodynia similarly to their WT counterparts although no modification of well-being was noticeable. Taken together, these results indicate sex-differences in basal nociception and emotional states associated with neuropathic pain and confirm that the δ opioid receptor plays a role in both of them. In addition, our preliminary analysis of inflammatory markers identified a handful of candidates.

Strain differences

The use of multiple strains has been an important issue in the reproducibility crisis in science (Leo *et al.*, 2008; Smith, 2019). The most commonly used strain is C57BL/6 congenic mice. These mice are often crossed with 129 strains when it comes to the construction of transgenic mice, resulting in hybrid C57Bl/6:129 50:50 mice. Nonetheless, it is common to backcross these mice with C57BL/6, so that approximately 99.9% of genes are C57BL/6-derived.

It is now well established that behaviour may vary across mouse strains. Indeed, compared to C57BL/6, 129S6/SvEv mice displayed longer hot plate latencies (Abramov *et al.*, 2008). Additionally, compared to C57BL/6J mice, 129S6/SvEv and 50:50 animals are more sensitive to neuropathic pain (SNI) condition especially when considering mechanical stimuli (Leo *et al.*, 2008). These results are in line with older data showing that 129J mice had lower basal mechanical thresholds and increased mechanical hypersensitivity following peripheral nerve injury compared to C57Bl/6J animals although no statistical analysis was available in the article (Mogil *et al.*, 1999), for a review on strain differences related to pain see (Smith, 2019).

In our study, we found that the threshold of mechanical sensitivity was similar between C57BL/6J mice and 50:50 hybrids. However, in females but not in males, the strain in

interaction with genotype and surgery affected the mechanical sensitivity. Therefore, in our condition strain alone does not appear to modify mechanical sensitivity

Emotional behaviours are also influenced by the genetic background. Compared to C57BL/6, 129 mice displayed lower exploratory activity in the plus-maze test, spent more time immobile in the forced swim test and engaged more in social interactions (Abramov *et al.*, 2008).

Here, we showed that male and female C57BL/6J mice built nest of lower quality compared to 50:50 hybrid mice but no effect was detected in the splash test. In the social interaction test, the strain has no effect by itself but led to significant differences when considered in interaction with the genotype in males. These results highlight that the choice of the behavioural test represents an additional important factor as the impact of the genetic background varies across tests.

Our 50:50 hybrid mice express the μ opioid receptor in fusion with the red fluorescent protein mCherry at the C terminus (μ -mCherry), (Erbs *et al.*, 2015). In these mice, binding and signaling properties of μ agonists are unchanged. Behavioural experiment also revealed that thermal nociception, and locomotor activity were also unchanged compared to WT μ expressing mice with similar response to morphine administration. Additionally, the fluorescent fusion protein showed normal subcellular localization and trafficking response with kinetics similar to previous reports for the untagged receptor expressed in neurons (Erbs *et al.*, 2015). Therefore, the fusion of mCherry does not appear to overtly modify the functional properties of the μ opioid receptor although we cannot exclude subtle changes in μ -dependent behavioural outcomes.

Mechanical allodynia

Our results suggest that WT females display a basal mechanical threshold significantly lower than males in the Von Frey test. Our data are in agreement with a previous study using mice of the C57BL/6J:129svPas 50:50 background (Ceredig *et al.*, 2018). However, sex difference in basal nociception remains debated although it has been shown in several studies using C57BL/6 mice (Li *et al.*, 2009, Naomi *et al.*, 2006, Mogil *et al.*, 2006). In particular, Mogil *et al.* tested in C57Bl/6 mice the effect of sex in 15 nociceptive assays and found significant differences in only 3 of them, among which the Von Frey test (Mogil *et al.*, 2006).

According to a study focused on identifying factors that affect nociception, sex by itself has little influence. However, sex may significantly affect nociception through interactions with the environment and genotype (Elissa 2002).

In our conditions, the cuff surgery led to a decrease in mechanical sensitivity in WT males that lasted at least seven weeks. This is consistent with previous literature showing that males developed mechanical allodynia that lasted up to 12 weeks (Benbouzid *et al.*, 2008a; Yalcin *et al.*, 2011). In females, the cuff surgery significantly increased the mechanical sensitivity at 4 weeks in agreement with previous reports indicating that mechanical hypersensitivity persisted at least 30 days after surgery in female mice (Ceredig *et al.*, 2018; Sheehan *et al.*, 2021). Of note, in our conditions, the sham group displayed high variability in the mechanical threshold. Increased variability in measures is often regarded as dependent on the ovarian cycle. However, Zhao *et al.* demonstrated in C57BL/6J mice that the estrous cycle did not contribute to the variability of pain-related behaviours, in particular in Von frey test (Zhao *et al.*, 2021). A high level of environmental stress is more likely to explain the lower mechanical threshold of the female mice (Mogil, 2017), which points to a crucial confoundant.

Assessment emotional state

Previous work using the cuff model showed that males exhibited anxiety-like behaviours from 4 to 16 weeks and depressive-like behaviours from 6 to 17 weeks (Benbouzid *et al.*, 2008a; Yalcin *et al.*, 2011; Sellmeijer *et al.*, 2018). Details of the various test results from the literature are shown in the table below.

	Weeks after cuff surgery															
	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	14	15	16	17	18	21
forced swim test	na	na	na	na	X	O	O	O	na	na	O	na	na	O	X	X
tail suspensaion test	na	X	na	X	na											
splash	na	X	na	X	O	na	O	O	na	O	O	na	X	na	na	na
novelty suppressed feeding	X	na	X	O	na	na	O	na	O	na	na	na	O	na	X	X
light-dark	X	na	O	na	na	O	O	na	X	na	na	X	na	na	na	na
marble burying	X	na	O	na	O	na										
social interaction	X	na	O	na												
elevated plus maze	na	na	O	na												

*Table 1 : Summary table of results obtained in behavioural tests for depression (forced swim test, tail suspension test, splash test) and anxiety (novelty suppressed feeding, light dark, marble burying, social interaction, elevated plus maze) as a function of the number of weeks elapsed since surgery. Adapted from (Benbouzid *et al.*, 2008; Yalcin *et al.*, 2011 ; Sellmeijer *et al.*, 2018)*

In our conditions, the cuff surgery had no effect on the depressive-like behaviour in the splash test. In male cuff mice, Benbouzid *et al.* found a decrease in social interaction compared to sham at 4 weeks although no methodological details are provided (Benbouzid *et al.*, 2008a). Similarly, in ddY mice, pSNL (partial sciatic nerve ligation) surgery induced a decrease in social interaction at 6 and 8 weeks compared to sham animals (Hisaoka-Nakashima *et al.*, 2019). Here we found no significant effect of cuff surgery on the social interaction time. However, we measured a decrease in well-being in the nest test that was not documented before.

The behavioural testing was conducted in the morning, at the beginning of the light phase corresponding to the resting phase of the animals whereas previous studies were performed during the active phase (night) of the mice (Benbouzid *et al.*, 2008a; Yalcin *et al.*, 2011; Sellmeijer *et al.*, 2018) which may account for the observed differences. Different testing times indeed greatly impair the reproducibility of behavioural results (Bodden *et al.*, 2019). DBA mice tested in the modified hole board showed an increase in anxiety like-behaviours when tested during the resting (light) phase as shown by an increase in unfamiliar food exploration latency (Roedel *et al.*, 2006) but also a decrease in social interaction test (Richetto *et al.*, 2019).

After cuff surgery, we did not observe any difference in the nest, splash and social interaction test in WT females compared to sham. However, female mice exhibited less social interaction than males. It is important to note that sex differences in social interaction may not reflect increased anxiety in females as social interaction serves a different function in male and female (File & Seth, 2003).

Critical assessment of the behavioural tests

Mechanical sensitivity

Assessing paw withdrawal in Von Frey testing contains a part of subjectivity as the investigator must determine whether the animal withdrew the paw due to the aversive nature of the stimuli or for another reason (tickle, grooming, ambulation) and is thus, at least in part, experimenter dependent (Deuis *et al.*, 2017). Mouse may also respond to the initial contact with a filament with a “touch on” response if the filament is not applied perpendicularly or smoothly or if it moves during application. Additionally, different methods are used such as “up-down”, the “ascending stimulus” or the “percent response” adding variabilities when comparing results between studies (Deuis *et al.*, 2017). Of note, among these three methods,

the “ascending stimulus” was chosen because it reduces the number of simulation thereby limiting the sensitization induced by repeated stimulation of the paw (Deuis *et al.*, 2017). Despite many limitations, manual Von Frey filament testing is the only method available to assess mechanical allodynia in neuropathic pain mice model in which automated Von Frey is not recommended (Nirogi *et al.*, 2012; Deuis *et al.*, 2017).

Depressive like behaviour

The splash test is based on grooming, a form of self-oriented motivational behaviour. Grooming, which is an important aspect of rodent behaviour, is often altered in animal models of depression (Kremer *et al.*, 2021) and decreased grooming behaviour is considered to reflect the loss of motivation and the apathetic behaviour observed in depression (Flerlage *et al.*, 2023). Indeed, numerous studies have established that antidepressants such as Fluoxetine (David *et al.*, 2009; Isingrini *et al.*, 2010; Mutlu *et al.*, 2012), Kétamine (Brachman *et al.*, 2016) or Olanzapine (Mutlu *et al.*, 2012) reverse the decrease in grooming behaviour in various models of depression. To date, only one study suggested that the splash test could measure anxiety like behaviour in rats. Specifically, they assessed the latency to groom as an indicator of anxiety and the time spent grooming as an indicator of depression (Quadir *et al.*, 2022) but, to our knowledge, no effect of anxiogenic or anxiolytic drugs has been evidenced in the splash test.

Well-being

Nest building is a natural behaviour observed in mice, that reflects their daily life activities (Deacon, 2012). Therefore, assessing performance in nest building can provide insights into the well-being of rodents (Deacon, 2012; Jirkof, 2014) and has also been used as an indicator of a depressive like state as it can be improved by treatment with antidepressant fluoxetine (Otabi *et al.*, 2017). Mice housed in animal facilities and exposed to temperatures below their thermoneutral range, build nests for thermoregulatory purposes due to the beneficial effects of nest material in reducing heat loss (Gaskill *et al.*, 2012; Jirkof, 2014). We therefore questioned the hypothesis that variations in nest building may be related to differences in thermoregulation by monitoring the internal temperature of mice. In our conditions, we did not find any significant differences in temperature among mice that could explain the change in behaviour suggesting that it may rather reflect a depressive like state in our conditions.

Anxiety-like behaviour

The social interaction test (SI) was first developed in male rats (File & Hyde, 1978) to measure the impact of anxiety on ethological behaviours. An increase in social interaction, without a concomitant increase in motor activity, is indicative of an anxiolytic effect, whereas a specific decrease in social interaction indicates an anxiogenic effect. This test was shown to be sensitive to anxiogenic (yohimbine, benzodiazepine receptor antagonists, picrotoxin) and anxiolytic drugs (lorazepam, diazepam, buspirone), (File & Seth, 2003). However, drugs that have clear anxiolytic and anxiogenic profiles in rats such as buspirone, ondansetron or tianeptine did not have anxiolytic effects in mice (File & Seth, 2003). Which questions the relevance of social interaction as a measure of anxiety in mice. Decreased social interaction was also interpreted as a decrease in motivation for social reward that reflects anhedonia, a marker of depression (Höflich *et al.*, 2019)

The three tests we used (splash, nest and social interaction) were mainly described as assessing respectively depression, well-being and anxiety. However, all three can also be considered as measures of depressive-like states. However, this interpretation does not provide a more consistent picture of the emotional state of the cuff animals with the nest test remaining the only indicator of a degraded emotional state in male neuropathic mice. To confirm the impact of the cuff surgery on the male emotional state, it might be worthwhile evaluating anxiety in the EPM or open field tests, the depression in the FST and wellbeing by the coat state.

Differences induced by the deletion of δ opioid receptor

Both males and females δ knock-out mice exhibit thermal and mechanical nociceptive thresholds similar to their WT counterparts (Filliol *et al.*, 2000; Martínez-Navarro *et al.*, 2020). Our results are thus in line with the literature as post hoc analysis found no differences between WT and δ knock-out mice.

Exacerbated mechanical allodynia has been observed in δ deficient mice with partial sciatic nerve ligation (pSNL) (Nadal *et al.*, 2006; Martínez-Navarro *et al.*, 2020). However, in the cuff model, it was reported that mechanical hypersensitivity was similar between δ knock-out and WT males (Kremer *et al.*, 2020). Our results support this observation as male or female cuff δ knock-out animals has similar mechanical threshold to cuff WT mice.

δ opioid receptors also modulate stress responses and emotions such as anxiety and depression. Deletion of the δ opioid receptor induced an increase in anxiety like behaviour in the light-dark and the elevated plus maze tests (Filliol *et al.*, 2000). Increased basal level of

anxiety in δ knock-out mice was also reported by others (Chu Sin Chung *et al.*, 2015; Browne & Lucki, 2019; Martínez-Navarro *et al.*, 2020; Dremencov *et al.*, 2023). Our results suggest that anxiety level is not modified in sham δ knock-out animals compared to WT although in males δ knock-out cuff displayed decreased social interaction compared to WT cuff. The effect of neuropathic pain on anxiety was evaluated in pSNL mice, δ -KO animals did not develop anxiety-like behaviour in the elevated plus maze or light-dark tests compared to sham (Martínez-Navarro *et al.*, 2020). Similarly, in our conditions, deletion of the δ opioid receptor did not induce an increase in anxiety in the social interaction test following cuff surgery.

Deletion of the δ opioid receptor has also been associated with increased depressive like behaviour of naïve mice in the forced swim test (Filliol *et al.*, 2000; Martínez-Navarro *et al.*, 2020). Surprisingly in our conditions, sham δ KO males exhibited higher grooming time than WT males in the splash test. This difference was also present between sham WT and δ KO females. Additionally, our results showed no marked difference in the nest quality between sham WT and δ knock-out mice. These data suggest that the deletion of the δ receptor in our conditions did not appear to impact on the animal depressive-like state.

In pSNL mice, δ -KO animals develop depressive-like behaviour in the forced swim test compared to sham (Martínez-Navarro *et al.*, 2020). Our results suggest that the grooming time of cuff δ knock-out mice was similar to WT in both male and females and that the nest quality was not affected by the deletion of the δ receptor in cuff animals of both sexes.

As the splash test was not influenced by strain differences between C57BL6 and 50:50 hybrids, it is unlikely that genetic background of the mice could account for the observed discrepancy. Excessive grooming can also be interpreted as a stereotypic behaviour indicative of compulsivity. The implication of the δ receptor in such behaviour remains however to be investigated.

Changes in Neuroinflammatory Markers

In various neuropathic pain models induced by a lesion of peripheral nerves, an increase in IL-1 β , TNF α or IL-6 was described at different time points after surgery, and their implication not only in the establishment but also in the maintenance of neuropathic pain was suggested (Bohren *et al.*, 2022). A recent study also demonstrated that these markers (TNF α , IL-6, and IL-1 β) are upregulated in the hippocampus of males 2 weeks after the cuff surgery (Bai *et al.*, 2021). However, our preliminary data using a cytokine microarray 4 weeks after cuff surgery failed to detect any change in expression of these markers (supplementary table

X; $\text{TNF}\alpha = 108$, $\text{IL-6} = 65$, and $\text{IL-1}\beta = 59$) in this region, which may reflect the different time points. Moreover, increase in these inflammatory markers was not detected in the brainstem and serum. Considering that cuff animal spontaneously recovered from thermal allodynia and spontaneous pain around 3 to 4 weeks (Benbouzid *et al.*, 2008a; Sheehan *et al.*, 2021), the inflammation may be reduced and/or may recess more quickly compared to other models where no recovery took place. This hypothesis is also supported by the unchanged level of $\text{IFN}\gamma$ in our analysis (line 52).

Coagulation factor III, CX3CL1, Cystatin C and FGF acidic were detected in the hippocampus and brainstem. In the brainstem, but not hippocampus, the expression level of the coagulation factor III, Cystatin C and FGF acidic seemed to vary across conditions. In the brainstem, four additional markers (IGFBP2, IL-33, LDL-R and osteopontin) were detectable, without major changes in expression levels according to sex or treatment. Among these eight molecules, the pro-inflammatory CX3CL1, Cystatin C, IGFBP-2, osteopontin and anti-inflammatory LDL-R and were also detected in the serum and affected by the sex and/or cuff surgery. However, further confirmation using ELISA is needed to draw definitive conclusions.

CX3CL1 or Fractalkine is a chemokine mostly expressed by neurons that target the CX3CR1 receptor mostly expressed by microglial cells. The level of CX3CL1 is increased in the CSF of rats after noxious stimulation, 7 days after partial sciatic nerve ligation (Clark *et al.*, 2009). Clark *et al.* found that i.t. injection of CX3CL1 induces mechanical allodynia and hyperalgesia in rats and mice. Accordingly neutralizing CX3CL1 with antibodies reversed PSNL-induced neuropathic pain (Clark *et al.*, 2007). Similar results have been observed in rats with spinal nerve ligation (Zhuang *et al.*, 2007). Additionally, in CX3CR1 KO mice, the development of neuropathic pain in PSNL animals is impaired (Staniland *et al.*, 2010) and injection of CX3CR1 siRNA nanoparticles alleviates mechanical allodynia induced by spinal nerve ligation in rats (Noh *et al.*, 2020).

IL-33 is the latest member of the interleukin family. It is involved in neuropathic pain as IL-33 is increased in CCI mice up to 21 days after surgery and that mechanical hyperalgesia is reduced in CCI mice deficient for IL-33 receptor (ST2). Additionally, the authors suggest that IL-33 effect is dependent of $\text{IL-1}\beta$ and $\text{TNF}\alpha$ (Zarpelon *et al.*, 2016). The low expression of these markers in our conditions appears consistent with low grade inflammation in the cuff model four weeks after surgery.

Elevated plasma osteopontin levels have been found in patients with pain. Nerve injury induced an increase in osteopontin in DRG sensory neurons, and osteopontin knockout reversed mechanical hypersensitivity in mice with neuropathic pain (Marsh *et al.*, 2007). In addition, increased osteopontin levels were detected in the sera of patients with postherpetic neuralgia, which was positively associated with pain intensity in patients supporting a role in pain pathogenesis (Yang *et al.*, 2022). In line, we observed higher level in the serum of male cuff mice but also in female sham mice suggesting a role in the mechanical threshold.

Cystatine C is mainly known as a marker of liver function. Cystatin C in the CSF could be a biomarker for persistent pain state as it was shown in a rat model of inflammatory pain (Yang *et al.*, 2001). It has been associated with sciatica (Liu *et al.*, 2005) and has recently been identified as a predictive maker of diabetic polyneuropathy (Allwright *et al.*, 2023). However, a clinical observed that Cystatin C level are similar between healthy and neuropathic patients (Eisenach *et al.*, 2004). Accordingly, we did not observe major variations in its expression in our study.

Activation of **LDL-R** (low-density lipoprotein receptor) decreases the production of inflammatory mediators. LDL-R1 activation also decreases reactive astrogliosis and turns macrophages from a pro-inflammatory phenotype (M1) to an anti-inflammatory phenotype (M2). LDL-R1 is also involved in the maturation of oligodendrocytes and in the activation, migration, and repair phenotype of Schwann cells, suggesting a major role in restoring the myelin sheaths upon injury. LDL-R 1 activation can therefore indirectly decrease neurodegeneration and neuropathic pain by attenuation of the inflammatory environment. In addition, activation of LDL-R1 attenuated neuropathic pain (García-Fernández *et al.*, 2021). We observed an increased in its serum concentration in cuff males and females suggesting that it could be part of the compensatory mechanisms developed to reduce cuff induced allodynia.

Fibroblast growth factor (**FGF**) acidic or FGF-1 is produced by macrophages and has been recently tested in stem cell therapy to treat neuropathic pain. Injection of FGF-1-transfected adipose-derived mesenchymal stem cells reduced apoptosis and inflammation in the model of chronic constriction injury in rats (Forouzanfar *et al.*, 2020). In line, we observed a decrease in its expression in the brainstem of cuff males.

Finally, the role of IGFBP2 and coagulation factor III does not seem to have been investigated in neuropathic or chronic pain condition and little is known about their action in the CNS. **IGFBP2** (insulin growth factor binding protein 2) is most abundant in CSF and act as

an important modulator of IGFs signaling in the CNS and may contribute to neuronal rescue and/or brain repair processes (Khan, 2019). It appears upregulated in the serum of male and female cuff mice and deserved additional investigation to evaluate its potential as novel biomarker of the neuropathic condition. The **coagulation factor III** (also known as tissue factor) is the primary cellular initiator of blood coagulation in brain and is involved in coagulopathy following traumatic brain injury (Hubbard *et al.*, 2022). Its opposite regulation in the brains stem of cuff male and female mice makes its role another interesting factor to explore in more detail.

Conclusion

Altogether, we have evidenced sex differences in the basal response to mechanical stimuli. We confirmed that the cuff surgery induced mechanical allodynia in male and female mice and decreased animal well-being in wild-type males only. The absence of other anxio-depressive-like behaviours associated with the cuff in our condition emphasized the fact that the behavioural consequences of cuff surgery are highly dependent on environmental and experimental factors. We confirmed that both male and female δ KO mice developed mechanical allodynia following cuff surgery although we did not observe any alteration in the anxio-depressive state of these animals in neuropathic conditions. Finally, preliminary findings from our screening of inflammatory markers suggest potential alterations in neuropathic conditions. We observed increased concentrations of pro-inflammatory osteopontin, along with elevated levels of anti-inflammatory markers LDL-R1 and FGF-acidic, aligning with previous literature. Our results also pointed to IGFBP2 as a potential marker and to the coagulation factor III as a novel actor in the context of neuropathic pain, although further investigation is required to confirm and draw conclusive interpretations

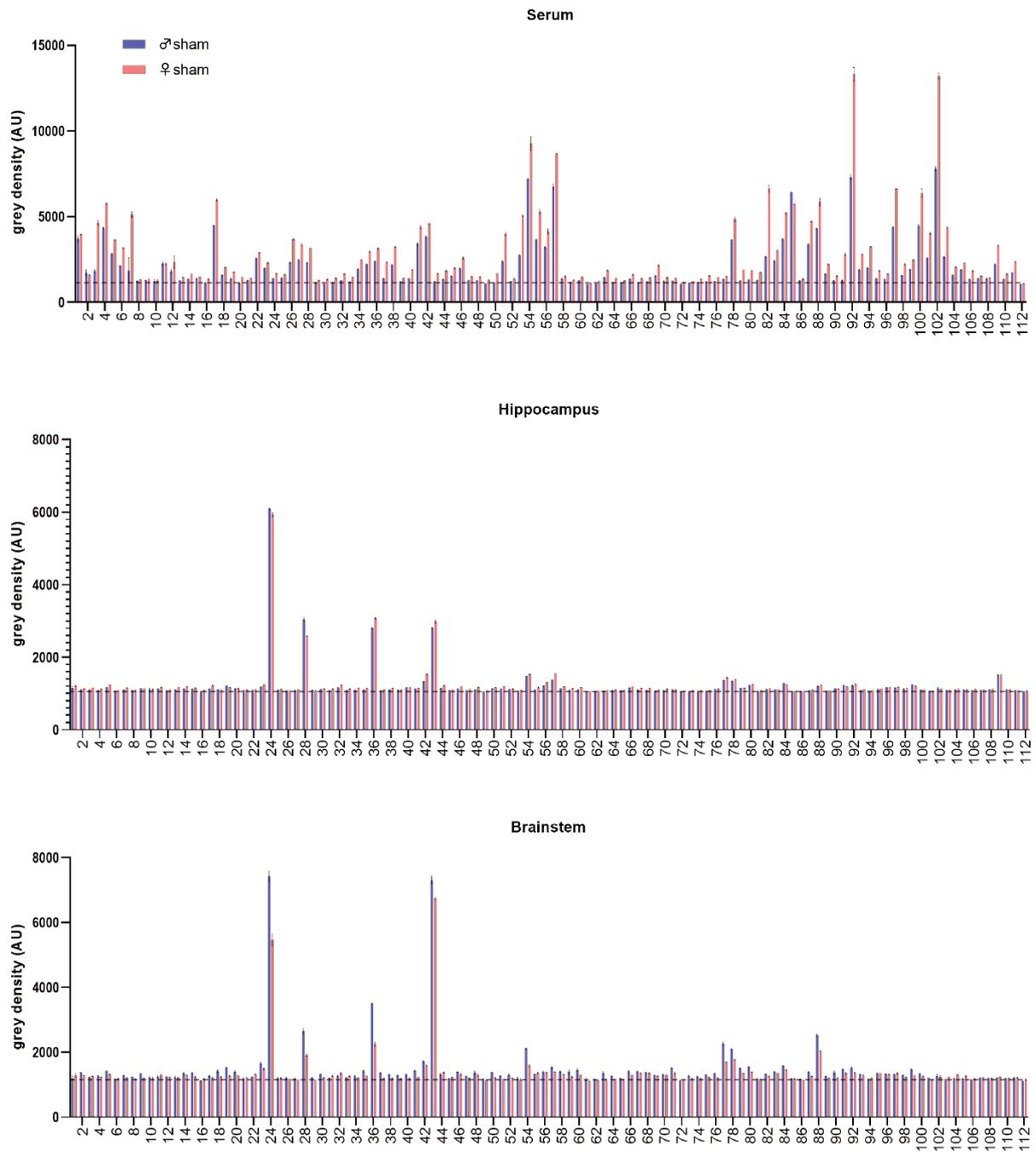
Supplementary informations

Supplementary Table 1: List of inflammatory markers analysed in the Mouse XL Cytokine Array Kit and their corresponding numbers.

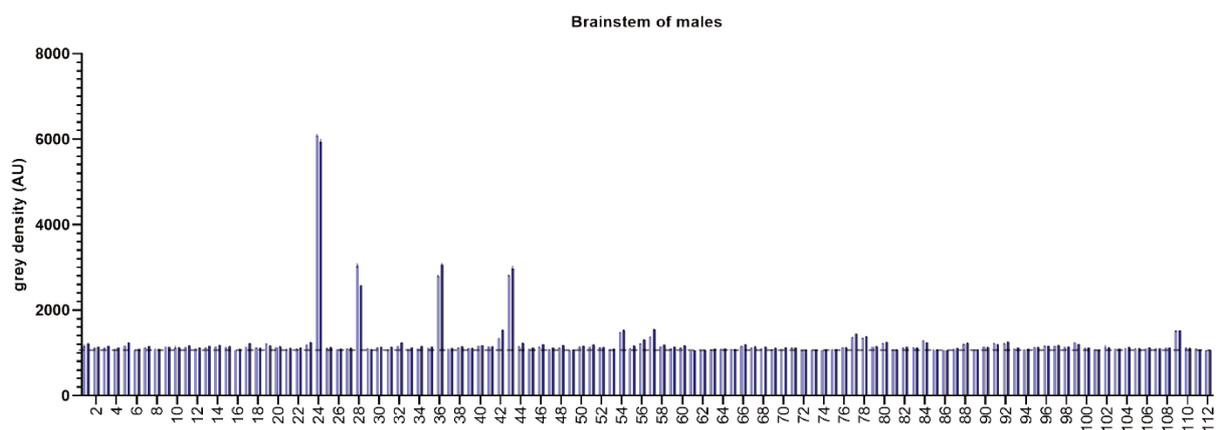
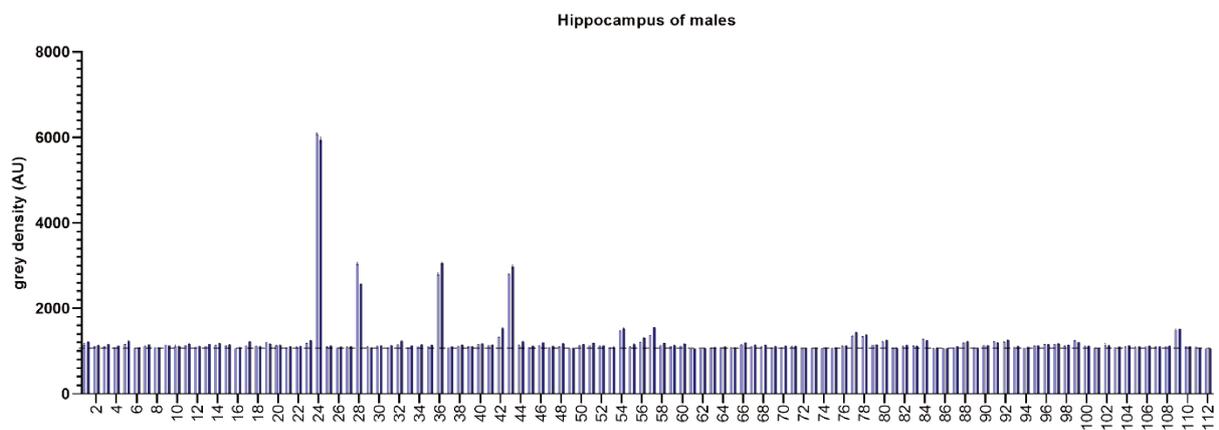
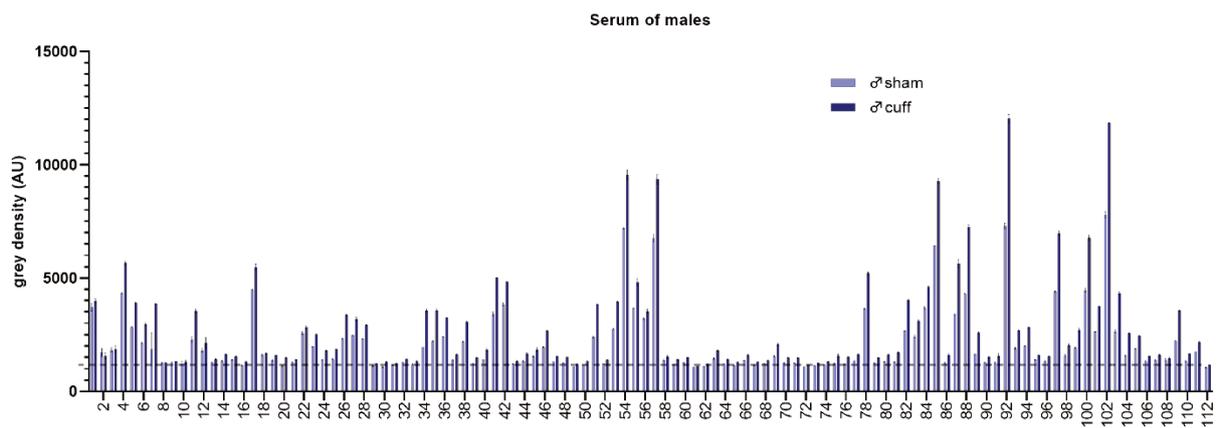
1	Adiponectin/Acrp30	41	Endostatin
2	Amphiregulin	42	Fetuin A/AHSG
3	Angiopoietin-1	43	FGF acidic
4	Angiopoietin-2	44	FGF-21
5	Angiopoietin-like 3	45	Flt-3 Ligand
6	BAFF/BLyS/TNFSF13B	46	Gas6
7	C1q R1/CD93	47	G-CSF
8	CCL2/JE/MCP-1	48	GDF-15
9	CCL3/CCL4 MIP-1 α/β	49	GM-CSF
10	CCL5/RANTES	50	HGF
11	CCL6/C10	51	ICAM-1/CD54
12	CCL11/Eotaxin	52	IFN- γ
13	CCL12/MCP-5	53	IGFBP-1
14	CCL17/TARC	54	IGFBP-2
15	CCL19/MIP-3 β	55	IGFBP-3
16	CCL20/MIP-3 α	56	IGFBP-5
17	CCL21/6Ckine	57	IGFBP-6
18	CCL22/MDC	58	IL-1 α /IL1F1
19	CD14	59	IL-1 β /IL-1F2
20	CD40/TNFRSF5	60	IL-1ra/IL-1F3
21	CD160	61	IL-2
22	Chemerin	62	IL-3
23	Chitinase 3-like 1	63	IL-4
24	Coagulation Factor III/Tissue Factor	64	IL-5
25	Complement Component C5/C5a	65	IL-6
26	Complement Factor D	66	IL-7
27	C-Reactive Protein/CRP	67	IL-10
28	CX3CL1/Fractalkine	68	IL-11
29	CXCL1/KC	69	IL-12p40
30	CXCL2/MIP-2	70	IL-13
31	CXCL9/MIG	71	IL-15
32	CXCL10/IP-10	72	IL-17A
33	CXCL11/I-TAC	73	IL-22
34	CXCL13/BLC/BCA-1	74	IL-23
35	CXCL16	75	IL-27
36	Cystatin C	76	IL-28
37	Dkk-1	77	IL-33
38	DPPIV/CD26	78	LDL R
39	EGF	79	Leptin
40	Endoglin/CD105	80	LIF

81	Lipocalin-2/NGAL,	97	Proprotein Convertase 9/PCSK9
82	LIX	98	RAGE
83	M-CSF	99	RBP4
84	MMP-2	100	Reg3G
85	MMP-3	101	Resistin
86	MMP-9	102	E-Selectin/CD62E
87	Myeloperoxidase	103	P-Selectin/CD62P
88	Osteopontin (OPN)	104	Serpin E1/PAI-1
89	Osteoprotegerin/TNFRSF11B	105	Serpin F1/PEDF
90	PD-ECGF/Thymidine phosphorylase	106	Thrombopoietin
91	PDGF-BB	107	TIM-1/KIM-1/HAVCR
92	Pentraxin 2/SAP	108	TNF α
93	Pentraxin 3/ TSG-14	109	VCAM-1/CD106
94	Periostin/OSF-2	110	VEGF
95	Pref-1/DLK-1/FA1	111	WISP-1/CCN4
96	Proliferin	112	Negative control (no antibodies)

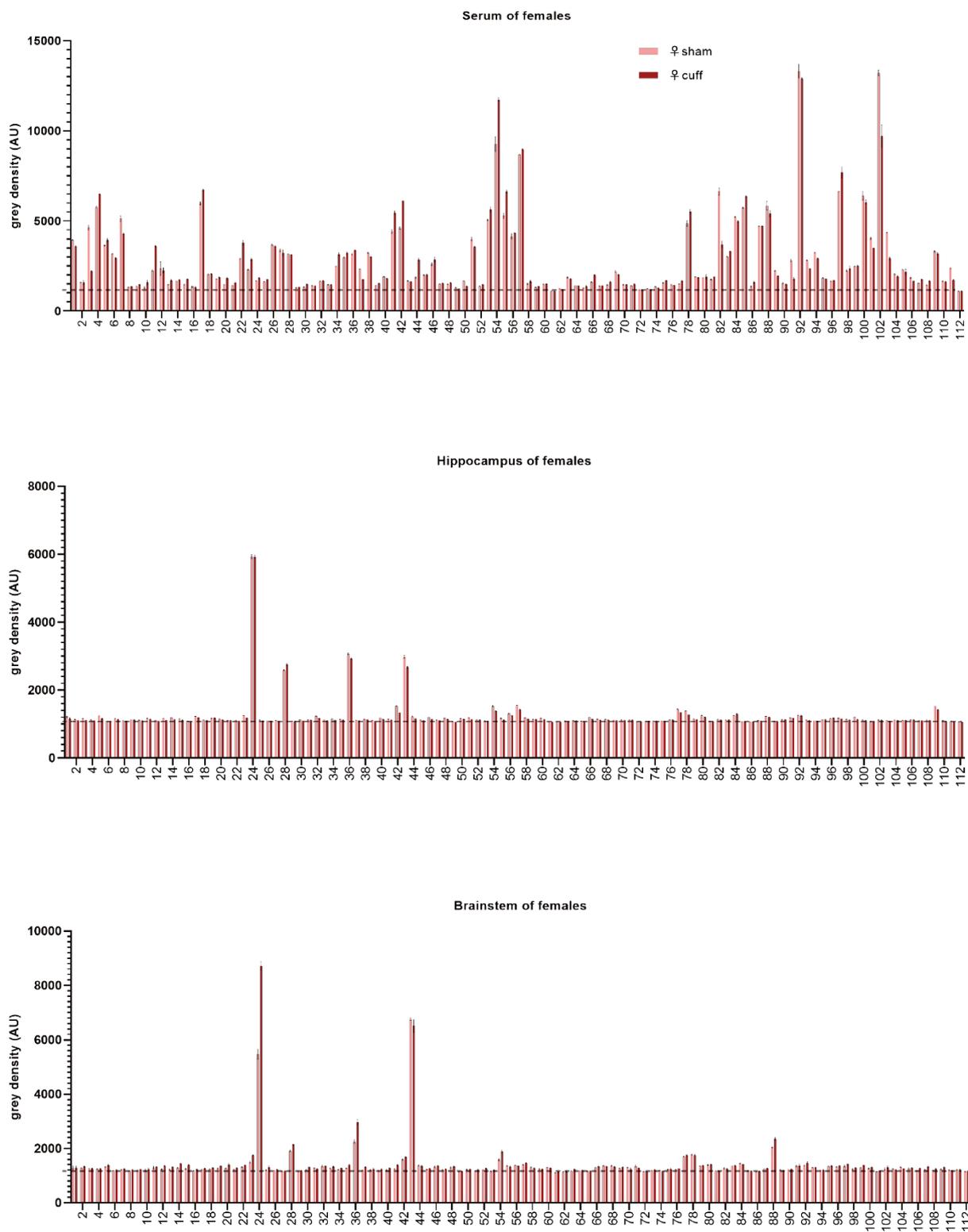
Supplementary figure 1



Supplementary Figure 16 : Relative expression of inflammatory markers in male and female sham groups in the serum (top), the hippocampus (center), and the brainstem (bottom). Corresponding markers are listed in Supplementary Table 1.



Supplementary Figure 17 : Relative expression of inflammatory markers in male sham and cuff groups in the serum (top), the hippocampus (center), and the brainstem (bottom). Corresponding markers are listed in Supplementary Table 1.



Supplementary Figure 18 : Relative expression of inflammatory markers in female sham and cuff groups in the serum (top), the hippocampus (center), and the brainstem (bottom). Corresponding markers are listed in Supplementary Table 1.

Acknowledgement

The authors would like to thank Chronobiotron animal facility and the behavioural experiment platform (ComptOpt) of the Institute of Cellular and Integrative Neuroscience for their assistance. This study was funded (PhD funding) by the “Fondation Université de Strasbourg”, EURIDOL graduate school of Pain (ANR-17-EURE-0022), and ITI neurostra.

Author contributions

D.Massotte conceived, designed, and supervised the project. M.Gaborit. conducted most of the experiments; follow up of the animals, data analysis. Q.Leboulleux. and M.Kremer. took care of von Frey testing. S. Doridot. managed mice colony and reproduction and genotypes animals. C.Sagot. performed some experiments. M.Gaborit and D.Massotte wrote the manuscript.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

CHAPITRE II :

Effets du CBD sur l'hypersensibilité mécanique et les symptômes émotionnels liés à la douleur neuropathique

I. Introduction

Les douleurs neuropathiques affectent 7 % de la population générale (Bouhassira, 2019). Elles apparaissent en conséquence d'une lésion ou d'une maladie du système nerveux central ou périphérique (Trouvin & Perrot, 2019) et sont fréquemment accompagnées de troubles tels que l'anxiété et la dépression (Bair *et al.*, 2003). Actuellement, les traitements recommandés (Finnerup *et al.*, 2015) sont peu efficaces, et s'accompagnent de nombreux effets indésirables. Ainsi, le soulagement de ces douleurs constitue un défi complexe.

La littérature suggère que l'administration aiguë de cannabidiol (CBD), soulagerait les symptômes de type douloureux chez des rongeurs souffrant de douleur neuropathique avec un effet compris entre 30 min et 2h (Casey *et al.*, 2017; Baron-Flores *et al.*, 2022; Jesus *et al.*, 2022) et une dose efficace 50 (ED50) de 3.5 mg/kg sous cutanée (s.c.) (Casey *et al.*, 2017). Son administration répétée prévient le développement de l'allodynie mécanique chez les rats cuff (Linher-Melville *et al.*, 2020) et rétablit les seuils nociceptifs au bout de 7 jours (Costa *et al.*, 2007; De Gregorio *et al.*, 2019).

Le CBD possède de nombreuses cibles pharmacologiques (Castillo-Arellano *et al.*, 2023). Parmi elles, le récepteur CB1 serait impliqué dans le soulagement de l'hypersensibilité au froid (Casey *et al.*, 2017). En revanche, il ne serait pas impliqué dans le soulagement de l'allodynie mécanique (Costa *et al.*, 2007; Casey *et al.*, 2022). Des études ont également suggéré l'implication des récepteurs TRPV1 (De Gregorio *et al.*, 2019; Aguiar *et al.*, 2023) et 5HT1A (Ward *et al.*, 2014; Jesus *et al.*, 2019; Aguiar *et al.*, 2023) dans l'effet antinociceptif du CBD.

Le CBD améliore également les symptômes de type anxieux chez les rongeurs dans les modèles de douleurs neuropathiques périphériques SNI ou CCI (De Gregorio *et al.*, 2019; Silva-Cardoso *et al.*, 2021). Cet effet semble impliquer le récepteur 5HT1A car il est aboli par la co-administration d'antagoniste de ce récepteur (De Gregorio *et al.*, 2019). Par ailleurs, le

CBD administré directement dans le cortex pré-limbique, atténue des comportements de type dépressifs chez des rats CCI (Malvestio *et al.*, 2021).

Des études ont suggéré que le CBD pourrait agir sur le récepteur opioïde δ . En effet, à 100 μM il agirait comme un modulateur allostérique de ce récepteur (Kathmann *et al.*, 2006), et à 10 μM inhiberait la liaison des ligands à celui-ci (Foss *et al.*, 2021). Le récepteur δ est largement distribué dans des structures clés des circuits de la douleur (DRG, SC, RVM, cortex somatosensoriel). Les agonistes du récepteur δ induisent une analgésie robuste principalement en conditions de douleurs chroniques inflammatoires ou neuropathiques, mais aussi en cas d'auras migraineuses (Vicente-Sanchez *et al.*, 2016). Par ailleurs, ils sont dépourvus de la plupart des effets indésirables associés aux récepteurs μ bien que pour certains leur administration répétée s'accompagne de tolérance analgésique et de convulsions. De surcroît, ils ont des effets anxiolytiques et antidépresseurs, ce qui suggère qu'ils pourraient également soulager l'anxiété et la dépression associées aux douleurs neuropathiques (Berthiaume *et al.*, 2020).

Les récepteurs δ et CB1 peuvent s'associer pour former un hétéromère dont les propriétés fonctionnelles ont été décrites dans des conditions de douleur neuropathique. Les hétéromères δ -CB1 ont été identifiés dans la moelle épinière et l'amygdale de souris et leur expression est accrue dans le cortex, l'hypothalamus, le mésencéphale dans un modèle de transection du nerf spinal L5 (Bushlin *et al.*, 2012), et dans la moelle épinière de rongeurs dans un modèle de douleur neuropathique chimio-induite (Sierra *et al.*, 2019). Par ailleurs, la liaison et la signalisation de l'agoniste δ DPDPE est accrue par la co-application d'un ligand sélectif du récepteur CB1 chez des rats ayant subi une ligature du nerf spinal (Bushlin *et al.*, 2012). Cette modulation allostérique positive, se traduit également par une antinociception accrue lors de la co-application d'agonistes δ et CB1 chez les souris souffrant de neuropathies chimio induites par le paclitaxel (Sierra *et al.*, 2019). Ces propriétés sont abolies par le blocage des hétéromères δ -CB1 grâce à des anticorps sélectifs (Bushlin *et al.*, 2012; Sierra *et al.*, 2019).

Ainsi, nous avons évalué l'impact d'une administration répétée de CBD sur l'hypersensibilité mécanique et l'état émotionnel de souris mâles et femelles dans le modèle de douleur neuropathique du cuff. Nous avons évalué l'effet d'une dose non analgésique sur l'état émotionnel des souris. Nous avons réalisé ces expériences à la fois chez des souris exprimant le récepteur opioïde δ et chez des souris δ KO afin d'évaluer l'implication potentielle de ce récepteur dans l'effet du CBD.

II. Résultats

1. Effet de l'administration aiguë de CBD sur la sensibilité mécanique de souris neuropathiques

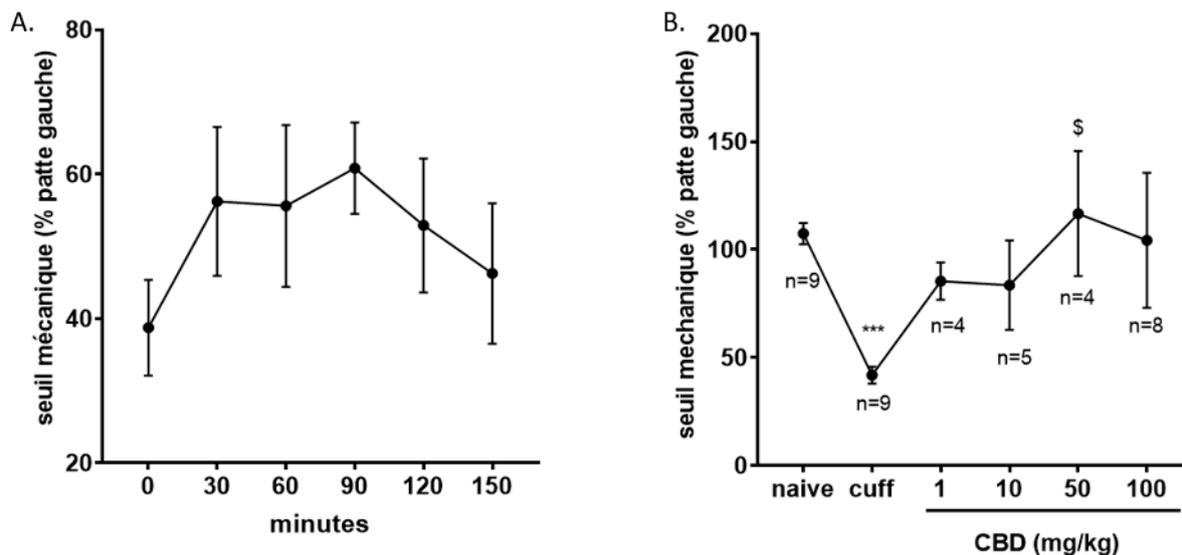


Figure 1: Effet du CBD sur le seuil de sensibilité mécanique. A. Décours temporel du CBD 100 mg/kg, B. Dose-réponse. Les résultats sont représentés par leur valeur moyenne +/- SEM. A. Test non paramétrique de Friedman, $n=8$ B. Test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn. *** $p < 0.001$ vs naïve ; \$ $p < 0.05$ vs cuff

Nous avons dans un premier temps évalué la durée d'effet du cannabidiol (figure 1.A) et avons effectué une dose-réponse (Figure 1.B.) pour déterminer une dose efficace pour soulager l'hypersensibilité mécanique associée au modèle du cuff. L'analyse statistique de la cinétique d'action d'une injection de CBD 100 mg/kg ne détecte pas de différences significative. En revanche si on regarde l'allure de la courbe on observe une forme en cloche caractéristique des courbes illustrant le décours temporel de l'action d'une drogue avec un effet qui perdurerait de 30 à 120 minutes après l'injection. Sur la base de ces résultats tous nos tests comportementaux ont été effectués commencés 45 à 60 minutes après injection. En ce qui concerne la courbe dose-réponse, on observe que le seule la dose de CBD de 50 mg/kg soulage significativement l'hypersensibilité mécanique. De façon surprenante, la dose de 100 mg/kg n'induit pas d'effet anti-allodynie significatif. Les doses de 1 et 10 mg/kg quant à elles semblent soulager partiellement l'allodynie mécanique bien que le faible effectif des groupes et l'absence d'effet statistiquement significatif ne permette pas de l'assurer.

2. Effet de l'administration répétée de CBD sur la sensibilité mécanique

Dans le modèle du cuff, les symptômes de type anxieux apparaissent 4 à 6 semaine après la chirurgie et les symptômes de type dépressif 7 à 8 semaines après la chirurgie et persistent au-delà de la récupération de l'hypersensibilité mécanique (Yalcin *et al.*, 2011). Sur la base de la littérature et de nos résultats, nous avons choisi d'utiliser la dose de CBD de 10 mg/kg, induisant un effet sous-optimal sur l'hypersensibilité mécanique, 8 semaines après la chirurgie cuff afin de déterminer l'effet de son administration répétée sur les symptômes émotionnels associé à la douleur neuropathique. Nous avons aussi testé une dose de 1 µg/kg afin d'observer si une faible dose pouvait elle aussi par son administration répétée améliorer ces symptômes émotionnels ou bien soulager l'hypersensibilité mécanique.

A. Effet antinociceptif

a. Chez les mâles de type sauvage traités 8 semaines après la chirurgie

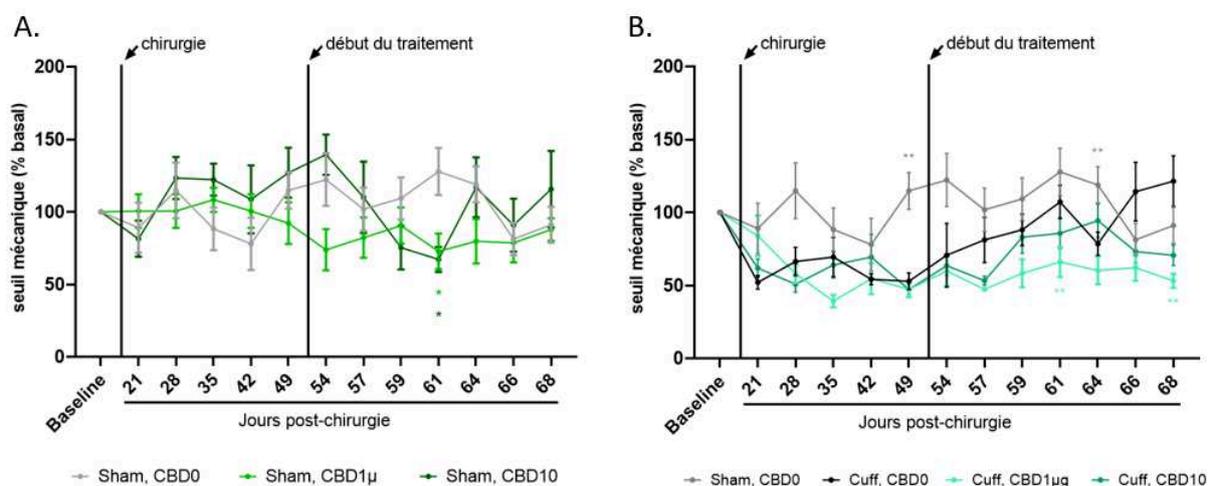


Figure 2 : Effet d'une administration i.p. répétée de CBD chez des souris sauvages mâles contrôles (A) et neuropathiques (B). Les résultats sont représentés par leur moyenne +/- SEM. Modèle mixte (REML) suivi d'un test de comparaison multiples de Dunnett A. * $p < 0.05$ Vs/ Sham, CBD0 (courbe grise). B ** $p < 0.01$ Vs/ Cuff CBD0 (courbe noire)

Nous avons donc administré de manière répétée soit l'excipient (CBD0 ; Tween 80 2%, NaCl 0.9%), soit une dose de 1 µg/kg (CBD1µ) soit une dose de 10 mg/kg (CBD10) chez des souris mâles de type sauvage sham et cuff. Chez les souris sham (Figure 2.A), l'analyse statistique ne détecte aucun effet significatif de la chirurgie ou bien du traitement. Cependant, elle détecte un effet d'interaction significatif entre le temps et le traitement ($p = 0.0078$; $F(24,$

206) = 1.928) qui se reflète dans une différence significative entre les animaux traités avec l'excipient et ceux traités avec une dose de 1 µg/kg (p=0.0339) ou 10 mg/kg (p=0.0124). Cependant, si on observe les courbes, la variabilité importante des résultats pourrait expliquer cette différence sans pour autant qu'elle soit liée au traitement. Nous avons également testé l'effet de ces mêmes doses chez des animaux neuropathiques (cuff). L'analyse statistique révèle un effet significatif du temps ($P < 0.0001$, $F(7.495, 287.9) = 7.172$), du traitement ($P < 0.001$, $F(3, 40) = 9.991$) mais aussi un effet d'interaction entre ces deux facteurs ($P < 0.0001$, $F(36, 461) = 2.897$). Cependant, il est impossible d'apporter une conclusion concernant l'effet du CBD car le groupe d'animaux cuff traités avec l'excipient récupère de l'hypersensibilité mécanique durant la période de traitement, c'est-à-dire à partir de 8 semaines post-chirurgie. Ces résultats sont surprenant si on considère la littérature qui décrit une récupération spontanée des animaux cuff entre 10 et 12 semaines après la chirurgie (Yalcin *et al.*, 2011). L'analyse approfondie des résultats individuels des animaux du groupe cuff traités avec l'excipient a révélé que 50% (8/16) des animaux avaient déjà récupéré au jour 49 (c'est-à-dire avant le début du traitement). Ces animaux ont été exclus de l'analyse présentée en figure 2. Nous avons regardé la récupération des animaux cuff traités avec l'excipient dans les différents lots d'animaux composant ce groupe et nous avons observé que dans chacun des 4 lots, les animaux récupéraient (informations supplémentaires, Figure 1).

b. Chez les femelles de type sauvage traitées 8 semaines après la chirurgie

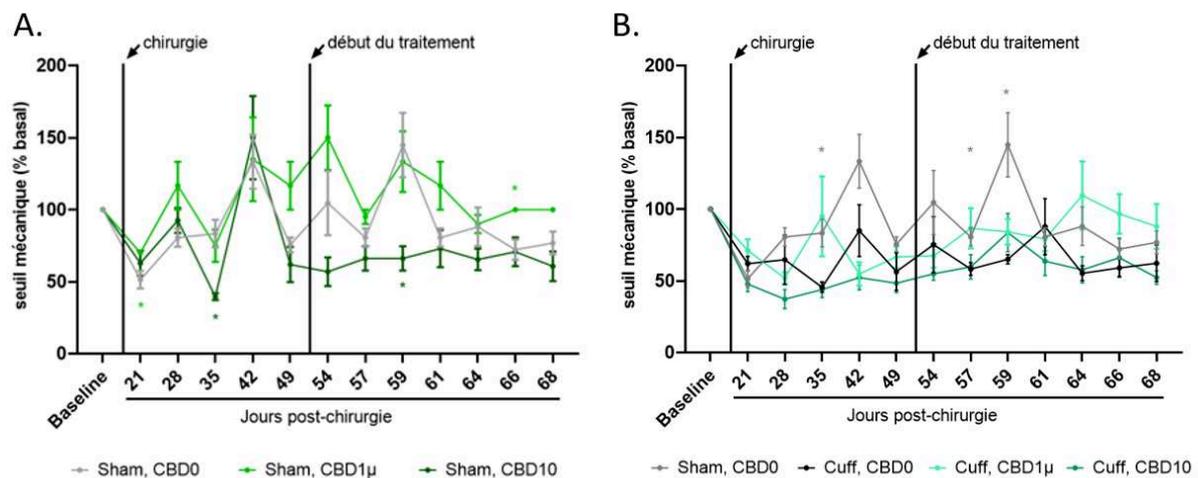


Figure 3 : Effet d'une administration i.p. répétée de CBD réalisée à partir de 54 jours post-chirurgie chez des souris sauvages femelles contrôles (A) et neuropathiques (B). Les résultats sont représentés par leur moyenne \pm SEM. Modèle mixte (REML) suivi d'un test de comparaison multiples de Dunnett A. * $p < 0.05$ Vs/ Sham, CBD0 (courbe grise). B * $p < 0.05$ Vs/ Cuff CBD0 (courbe noire)

Parallèlement, nous avons testé l'effet de l'administration répétée de CBD chez des femelles de type sauvage à la fois chez des animaux sham (Figure 3.A.) et des animaux cuff (figure 3.B.). Les analyses statistiques ont révélé un effet significatif du temps ($P=0.0002$, $F(3.326, 47.67) = 7.751$) et du traitement ($P=0.0040$, $F(2, 15) = 8.166$) ainsi qu'une interaction ($P=0.0030$, $F(24, 172) = 2.124$) entre ces deux facteurs chez les animaux sham. Chez les animaux cuff, un effet du temps ($P<0.0001$, $F(5.928, 116.1) = 6.334$) un effet du groupe ($p=0.0034$, $F(3, 21) = 6.217$) et un effet d'interaction entre le temps et le groupe ($P<0.0001$, $F(36, 235) = 2.619$) ont été détectés. Cependant, les comparaisons deux à deux ne détectent pas de différences entre les groupes traités avec l'excipient et les groupes traités avec du CBD. Ces résultats suggèrent que l'administration répétée de CBD ne soulage pas l'hypersensibilité mécanique chez les souris cuff femelles.

c. Chez des souris sauvages traitées 2 semaines après la chirurgie

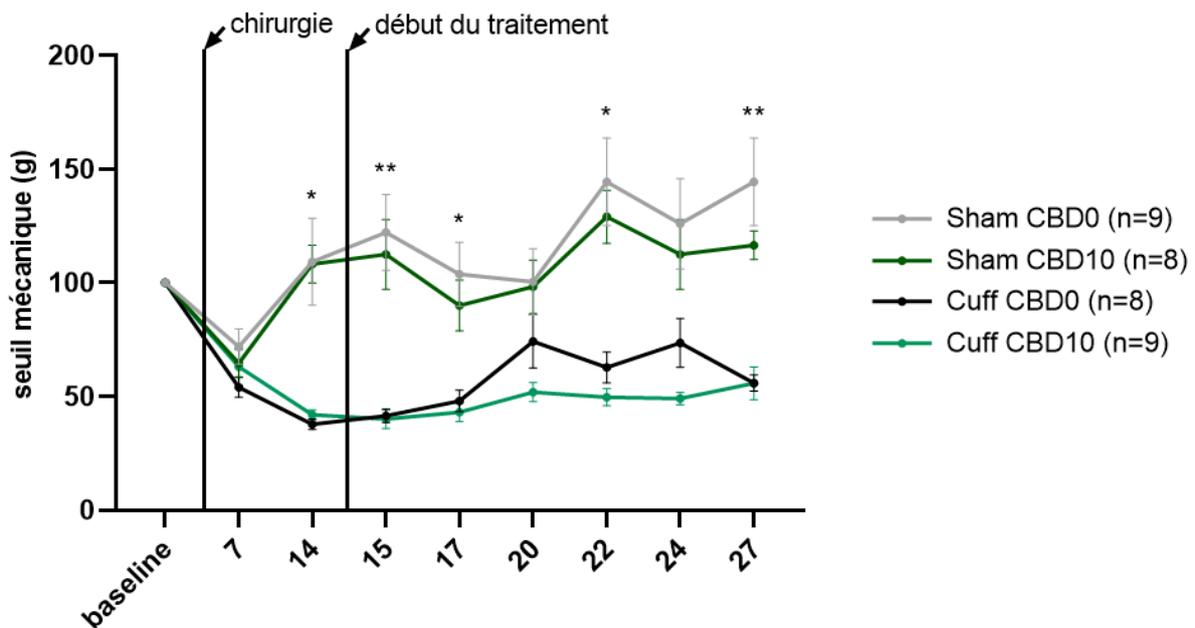


Figure 4 : Effet d'une administration i.p. répétée de CBD effectuée à partir de 15 jours post-chirurgie chez des souris (mâles et femelles en proportion égale) contrôles et neuropathiques. Les résultats sont représentés par leur moyenne +/- SEM. ANOVA à deux facteurs suivi d'un test de comparaison multiples de Tukey. * $p<0.05$ ** $p<0.01$ Cuff CBD0 (courbe noire) Vs/ Sham CBD0 (courbe grise).

Afin de pouvoir conclure sur un effet analgésique potentiel du CBD chez les animaux de types sauvage en distinguant une récupération liée au traitement d'une récupération spontanée, nous avons reproduit l'expérience chez des souris mâles et femelles en commençant le traitement 2 semaines après la chirurgie (Figure 4). L'analyse statistique révèle un effet

significatif du temps ($p > 0.0001$, $F(5.208, 156.2) = 8.677$), et du groupe ($p < 0.0001$, $F(3, 30) = 19.17$) ainsi qu'un effet d'interaction ($p < 0.0001$, $F(24, 240) = 4.610$). En effet, les analyses de comparaisons multiples deux à deux mettent en évidence une différence significative entre les animaux Sham (courbe grise) et Cuff (courbe noire) ayant reçu l'excipient montrant bien la présence d'une allodynie mécanique chez les animaux cuff. Si on s'intéresse maintenant à l'effet du CBD, aucune différence significative entre les animaux cuff traités et non traités n'a été détectée. Il en va de même pour les animaux sham. Cela suggère que le CBD 10 mg/kg ne soulage pas l'hypersensibilité mécanique chez les souris neuropathiques. A noter que le 29^{ème}

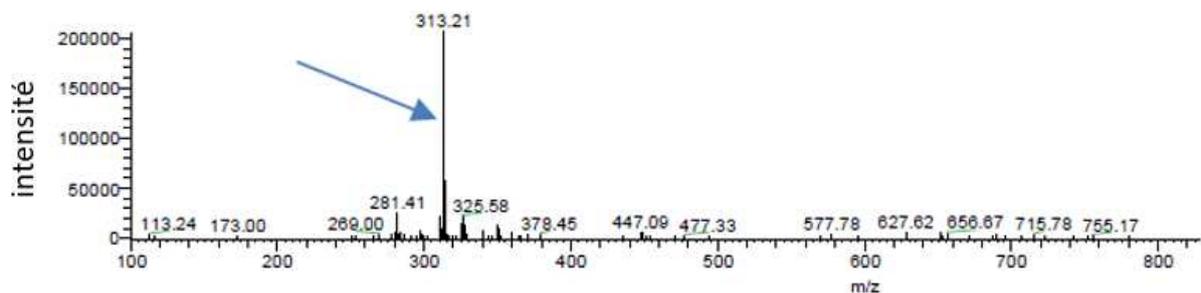


Figure 5 : Profil des molécules en full scan de l'infusion d'une solution de 25mM de CBD (313,21 g/mol) dans le spectromètre de masse.

jour, une dose de 50 mg/kg a été administrée aux animaux et la sensibilité mécanique testée une heure après mais aucune élévation du seuil mécanique n'a été observée. Nous nous sommes demandés si l'absence d'effet du CBD dans les expériences d'administration chronique pouvait venir du lot de CBD utilisé. En effet, des raisons financières nous ont poussées à changer de fournisseur entre tests d'administration aiguë et chronique en prenant soin de rester sur une molécule d'origine synthétique, sous forme solide et avec une pureté supérieure à 99%. Le CBD utilisé pour l'administration aiguë a été commandé chez Cayman chemical ((-)-CBD, Cayman chem, 90080) et le CBD utilisé pour l'administration chronique chez THC pharm (THC Pharm, THC-1073G-1). Nous avons remis en question le lot de CBD commandé auprès de THC pharm et nous l'avons donc analysé par spectrométrie de masse.

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse en tandem Endura équipé d'une source électrospray et d'un triple quadripôle (Thermo Electron). Le CBD est dissout dans 99.9% d'acétonitrile et 0.1% d'acide formique. L'échantillon a été infusé directement dans le spectromètre de masse en mode « full scan » à une concentration de 25mM. Ce mode permet d'analyser la composition d'une solution en scannant l'ensemble des rapports masse/charge compris dans une certaine gamme. Une fois le rapport correspondant à l'ion parent qui nous intéresse sélectionné, son profil de fragmentation a été déterminé. La masse molaire du CBD

étant de 314g/mol on s'attend à détecter un ion parent avec un rapport masse/charge de 313 en état de charge négative et de 315 en état de charge positif. En effet, l'analyse de l'échantillon montre la présence d'un ion parent en état de charge négatif ayant un rapport masse/charge de 313.21 (Figure 5). Par ailleurs, les 3 principaux fragments issus de la fragmentation de cet ion parent, ont des rapports masse/charge de 311, 179 et 245 ce qui est cohérent avec les données de la littérature (Pellati 2018, Koch 2020) et nous permet de confirmer l'identité de notre molécule comme étant bien du CBD.

d. Chez les souris δ KO traités 8 semaines après la chirurgie

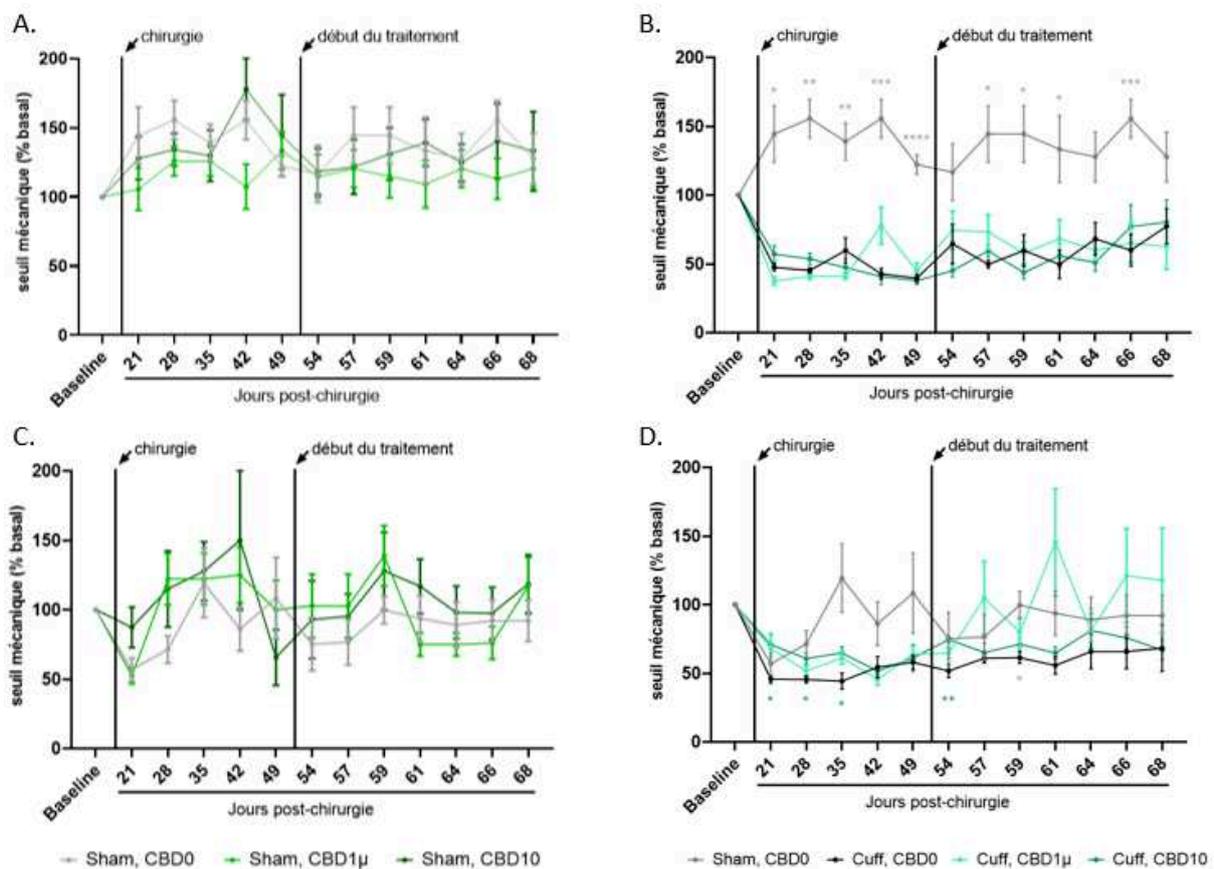


Figure 6 : Effet d'une administration *i.p.* répétée de CBD chez des souris δ knock-out : mâles contrôles (A), mâles neuropathiques (B), femelles contrôles (C) et femelles neuropathiques (D). Les résultats sont représentés par leur moyenne \pm SEM. Modèle mixte (REML) suivi d'un test de comparaison multiples de Dunnett. B et D. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ Vs. Cuff CBD0 (courbe noire).

L'effet des deux doses de CBD a également été évalué chez des souris de génotype δ KO, parallèlement aux animaux sauvages. Chez les mâles sham (Figure 5.A), l'analyse statistique ne détecte pas d'effet du traitement ou du temps ni d'effet d'interaction. Chez les

mâles cuff (Figure 5.B) en revanche on observe un effet significatif du temps ($p=0.0020$, $F(5.125, 132.8) = 3.972$) et du groupe ($p<0.0001$, $F(3, 28) = 26.49$) ainsi qu'un effet d'interaction ($p<0.0001$, $F(36, 311) = 2.888$). Cela se traduit au niveau des comparaisons multiples deux à deux par une différence significative entre les animaux sham ayant reçu l'excipient (courbe grise) et les animaux cuff ayant eux aussi reçu l'excipient (courbe noire). En revanche il n'existe aucune différence significative entre les animaux cuff ayant reçu l'excipient et ceux ayant reçu du CBD. Ces résultats suggèrent que chez des souris mâles dépourvues du récepteur opioïde δ , le CBD ne modifie pas la sensibilité mécanique et ne soulage l'hypersensibilité associée à la neuropathie.

Chez les femelles sham, (Figure 5. C) seul un effet significatif du temps a été révélé par l'analyse statistique ($p= 0.192$, $F(5.506, 86.72) = 2.772$). Cependant, les comparaisons multiples deux à deux ne présentent aucune différence significative entre les groupes comparés. Pour les femelles cuff, on observe un effet significatif du temps ($p=0.0005$, $F(4.307, 98.35) = 5.260$) ainsi qu'un effet d'interaction ($p<0.0010$, $F(36, 274) = 2.012$). Encore une fois, il est plus délicat d'interpréter les comparaisons deux à deux. En effet, bien que les animaux sham aient en moyenne un seuil plus élevé que les animaux cuff traités avec l'excipient, cette différence n'est significative qu'au 59^{ème} jour. Cependant, durant la période précédant le traitement ainsi que le premier jour du traitement les animaux cuff recevant l'excipient sont significativement différents de ceux recevant le CBD à $1 \mu\text{g}/\text{kg}$. Malgré cela, le CBD ne semble pas induire de modification du seuil mécanique chez les souris cuff.

Ensemble, ces résultats suggèrent que dans nos conditions, le CBD ne soulage pas l'hypersensibilité mécanique associée à la neuropathie dans le modèle du cuff, ni chez les souris sauvages, ni chez les souris ne possédant pas le récepteur opioïdes δ qu'elles soient mâles ou femelles.

B. Effet sur les fonctions motrices

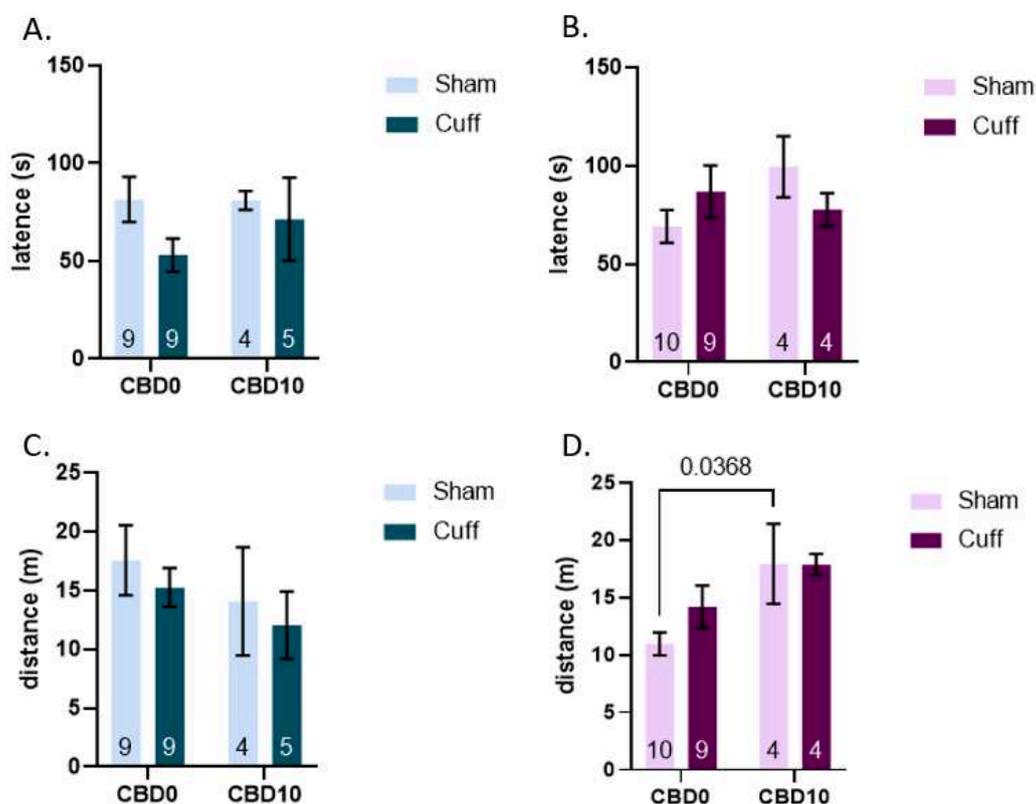


Figure 7 : Effet d'une administration i.p. répétée de CBD sur les fonctions motrices de souris sauvages. Evaluation de la coordination motrice dans le test du rotarod chez des mâles (A) et des femelles (B). Evaluation de la locomotion chez des mâles (C) et des femelles (D). Les tests sont effectués au bout de 13 (rotarod) et 14 (locomotion) jours d'un traitement débuté 15 jours après la chirurgie. Les résultats sont représentés par leur moyenne +/- SEM. ANOVA à deux facteurs (chirurgie, traitement) suivi d'un test de comparaison multiples de Šidák.

L'impact d'une administration répétée de CBD 10 mg/kg sur les fonctions motrices a été vérifié. L'analyse statistique suggère que l'administration de CBD pendant 13 jours ne modifie pas la coordination motrice dans le test du rotarod chez des souris mâles et femelles (figure 7A et B). Si on s'intéresse à la locomotion, l'administration répétée de CBD pendant 14 jours, ne modifie pas la distance parcourue par des mâles sham ou cuff, en accord avec les données de la littérature qui suggèrent qu'une administration répétée de CBD 5 mg/kg i.p. pendant 7 jours ne modifie pas la distance totale parcourue dans le test de champs ouvert chez des rats wistar mâles sham et SNI (De Gregorio *et al.*, 2019). Par ailleurs, l'administration répétée de CBD jusqu'à 21 jours à des doses allant de 1 à 50 mg/kg chez des mâles C57BL/6JArc naïfs ne modifie pas la distance totale parcourue dans le test du champs ouvert (Long 2010). En

revanche chez les souris femelles, l'administration de CBD influencerait la locomotion. En effet, les résultats de l'ANOVA décrivent un effet significatif du traitement ($p=0.0124$, $F(1, 23) = 7.370$). Ainsi, le CBD 10mg/kg induirait un effet hyperlocomoteur chez les femelles sham.

C. Effet sur l'état émotionnel

a. Effet de l'administration répétée de CBD sur l'état émotionnel des mâles WT

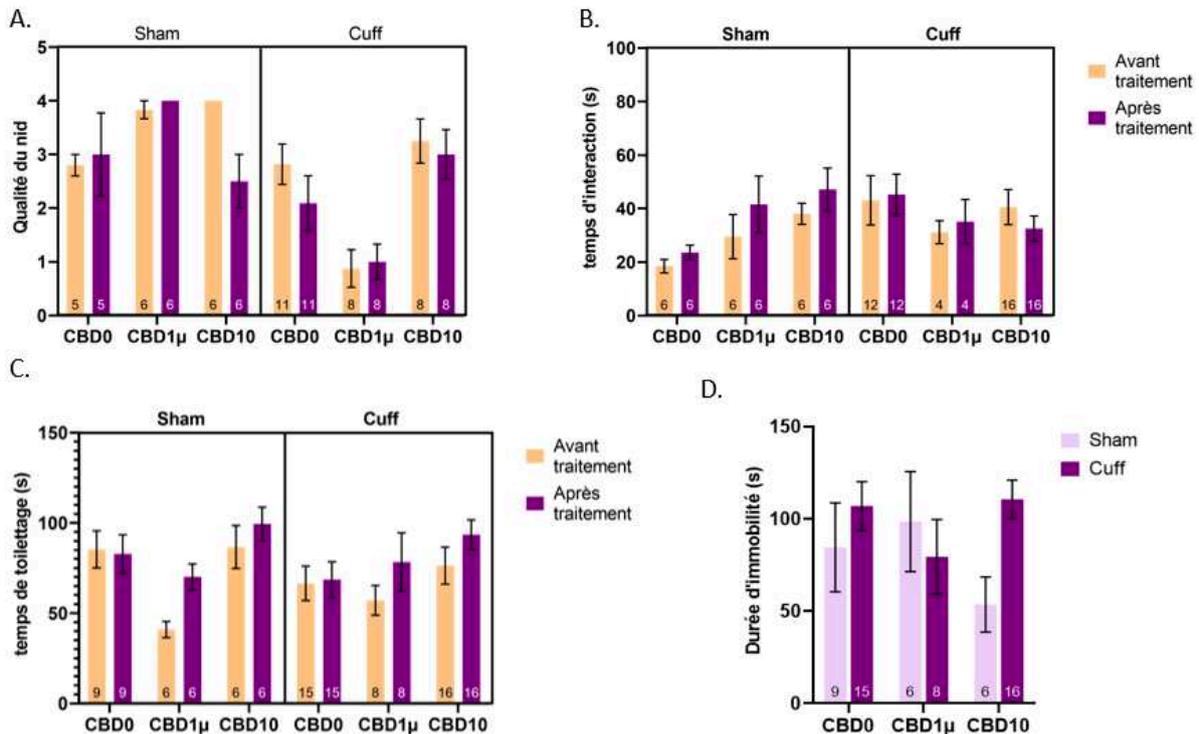


Figure 8 : Effet de l'administration i.p. répétée de CBD (0 mg/kg, 1 μg/kg, 10 mg/kg) sur les symptômes émotionnels de souris mâles de génotype sauvage. A. Test du nid, B. test d'interaction sociale, C. test d'éclaboussement, D. test de nage forcée. Les tests en A, B et C ont été effectués avant (orange) et après (violet) un traitement journalier d'au moins 15 jours. Le test en D a été effectué uniquement après traitement. Les résultats sont représentés en moyenne +/- SEM. A, B et C : T-test appariés multiples, D : ANOVA à deux facteurs

Nous avons évalué l'effet de l'administration i.p. répétée de CBD sur les symptômes émotionnels des souris mâles de type sauvage. Nous avons évalué l'effet sur le bien être dans le test du nid, l'effet sur les symptômes de type anxieux dans le test d'interaction sociale et l'effet sur les symptômes de type dépressif dans les tests d'éclaboussement et de nage forcée. Dans ces 4 tests, aucun effet significatif du CBD n'a été mis en évidence par l'analyse statistique. De surcroît aucun effet de la chirurgie n'a été détectée dans le test de la nage forcée. Ces résultats suggèrent que le CBD n'améliore pas l'état émotionnel des souris males sauvages qu'ils soient ou non neuropathiques.

b. Effet de l'administration répétée de CBD sur l'état émotionnel des femelles WT

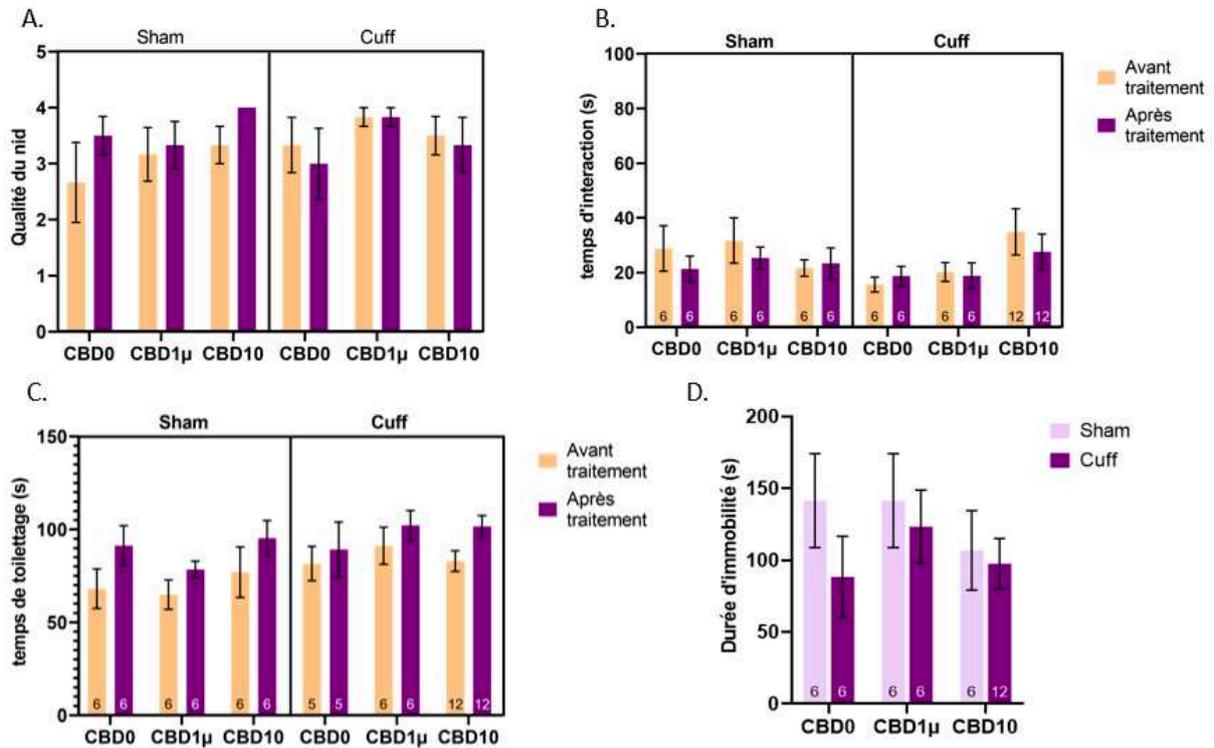


Figure 9 : Effet de l'administration i.p. répétée de CBD (0 mg/kg, 1 μ g/kg, 10 mg/kg) sur les symptômes émotionnels de souris femelles de génotype sauvage. A. Test du nid, B. test d'interaction sociale, C. test d'éclaboussement, D. test de nage forcée. Les tests en A, B et C ont été effectués avant (orange) et après (violet) un traitement journalier d'au moins 15 jours. Le test en D a été effectué uniquement après traitement. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM. A, B et C : T-test appariés multiples, D : ANOVA à deux facteurs.

De manière similaire, le CBD ne semble pas modifier l'état émotionnel des souris femelles sauvages, comme le révèle l'analyse statistique. En effet, aucune différence significative due à l'un des traitements au CBD n'a été détectée dans aucun des 4 tests comportementaux.

c. Effet de l'administration répétée de CBD sur l'état émotionnel des souris δ KO

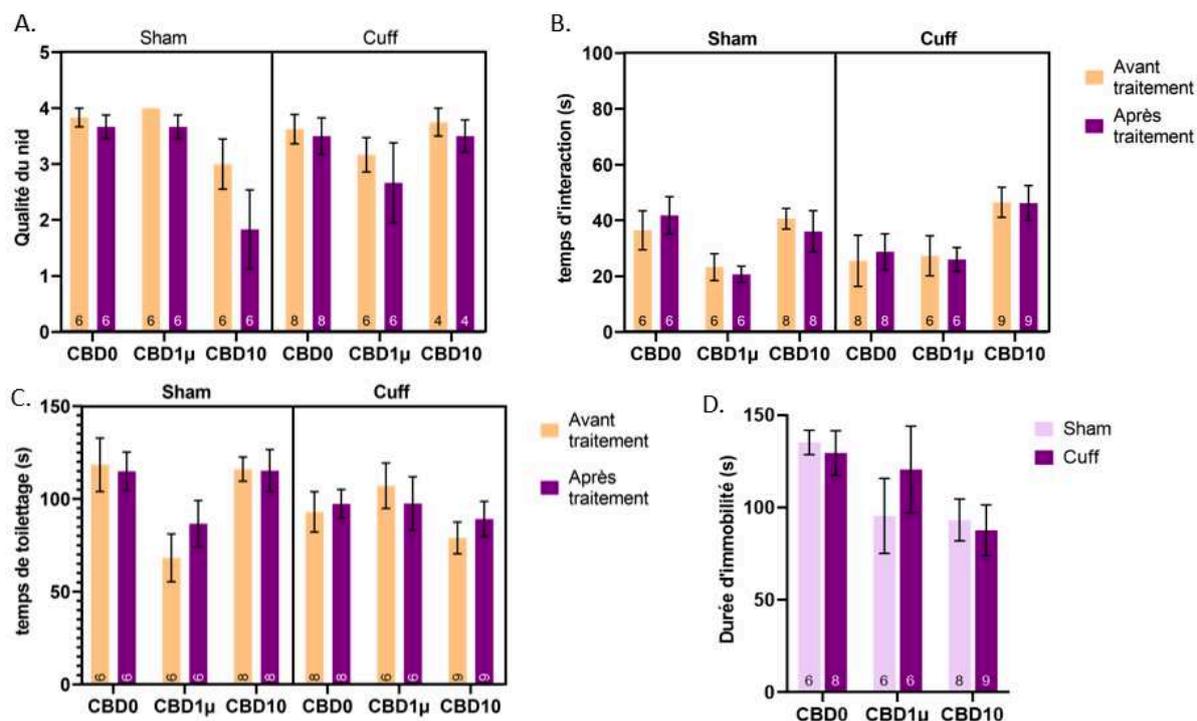


Figure 10 : Effet de l'administration i.p. répétée de CBD (0 mg/kg, 1 μ g/kg, 10 mg/kg) sur les symptômes émotionnels de souris mâles de génotype δ KO. A. Test du nid, B. test d'interaction sociale, C. test d'éclaboussement, D. test de nage forcée. Les tests en A, B et C ont été effectués avant (orange) et après (violet) un traitement journalier d'au moins 15 jours. Le test en D a été effectué uniquement après traitement. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM. T-test appariés multiples, D : ANOVA à deux facteurs suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunnett.

Nous avons en parallèle, évalué l'effet de l'administration i.p. répétée de CBD sur les symptômes émotionnels des souris de génotype δ KO. Chez les mâles, aucun effet du CBD n'a été mis en évidence dans les tests du nid, d'interaction sociale et d'éclaboussement. En revanche dans le test de la nage forcée, l'ANOVA à 2 facteurs détecte un effet significatif du traitement ($p=0.0231$, $F(2, 37) = 4.180$) cependant les comparaisons multiples deux à deux de Dunnett ne présentent aucune différence significative dans les groupes comparés. Il est cependant à noter que chez les animaux cuff traités avec 10 mg/kg de CBD (CBD10), il existe une tendance ($P=0.0689$) à la diminution de la durée d'immobilité par rapport aux animaux traités avec l'excipient (CBD0). Ces résultats suggèrent que l'administration i.p. répétée de CBD pourrait avoir un effet bénéfique sur les symptômes de type dépressifs chez les souris mâles δ KO.

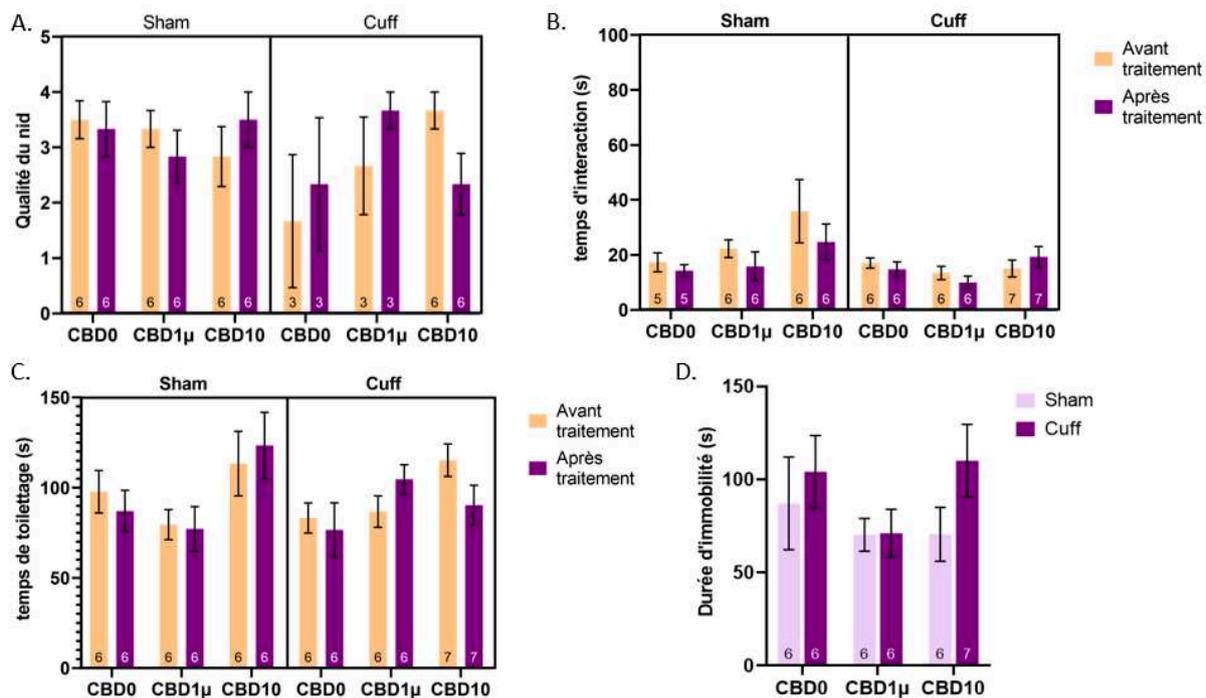


Figure 11 : Effet de l'administration i.p. répétée de CBD (0 mg/kg, 1 μ g/kg, 10 mg/kg) sur les symptômes émotionnels de souris femelles de génotype δ KO. A. Test du nid, B. test d'interaction sociale, C. test d'éclaboussement, D. test de nage forcée. Les tests en A, B et C ont été effectués avant (orange) et après (violet) un traitement journalier d'au moins 15 jours. Le test en D a été effectué uniquement après traitement. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM. A, B et C : T-test appariés multiples, D : ANOVA à deux facteurs.

Ces mêmes tests chez des souris femelles δ KO, n'ont en revanche révélé aucun effet significatif du CBD dans aucun des quatre tests comportementaux.

III. Discussion

Dans cette étude, nous avons étudié les effets du CBD sur le seuil de sensibilité mécanique et sur l'état émotionnel de souris mâles et femelles.

Récupération spontanée de l'hypersensibilité mécanique des souris contrôles

Plusieurs études chez des souris C57BL/6J montrent que les mâles ayant subi une chirurgie cuff développent une hypersensibilité mécanique qui reste stable pendant au moins 10 semaines et qui disparaît au bout de douze semaines (Benbouzid *et al.*, 2008a; Yalcin *et al.*, 2011; Sellmeijer *et al.*, 2018). De même, l'allodynie mécanique induite par le cuff reste stable au moins 8 semaines chez des souris mâles et femelles de fonds C57BL/6J :129svPas (50 :50) (Ceredig *et al.*, 2018, 2020). Dans nos conditions, nous observons que le groupe de souris mâles cuff ayant reçu l'excipient commence à récupérer à partir du premier jour de traitement (jour 54), c'est-à-dire entre 7 et 8 semaines après la chirurgie. Au 8^{ème} jour de traitement (jour 61) le seuil de sensibilité mécanique est identique au celui avant la chirurgie. Nos groupes étant chacun constitués de souris provenant de plusieurs lots, nous avons vérifié que cette récupération n'était pas spécifique d'un lot en particulier (figure supplémentaire 1). L'excipient est composé de solution saline (NaCl 0.9%) et de polysorbate 80 (Tween80) et on pourrait imaginer qui serait responsable de la récupération des animaux. Cependant, chez des souris cuff dont l'administration répétée de l'excipient a été débutée deux semaines après la chirurgie (figure 4), aucune récupération n'est observée. Aucun effet de l'excipient n'est non plus observé chez les souris cuff déficientes pour le récepteur δ (Figure 6.B.) Par ailleurs, cet excipient a été utilisé dans plusieurs études y compris sur la douleur neuropathique (Jesus *et al.*, 2019; Sepulveda *et al.*, 2022) et aucun effet antinociceptif n'a été décrit. Il est donc peu probable que la récupération observée soit liée à l'excipient utilisé.

Ainsi, dans nos conditions, l'allodynie mécanique induite par le cuff semble perdurer moins longtemps et de manière moins stable que dans la littérature. Parmi les trois groupes de mâles cuff ayant reçu des injections répétées, le groupe ayant reçu l'excipient récupère, celui ayant reçu le CBD 10 mg/kg semble récupérer partiellement, mais celui ayant reçu la dose de 1 μ g/kg ne récupère pas. L'absence totale de récupération chez les animaux traités à 1 μ g/kg suggère que la récupération des animaux vers 8 semaines n'est pas systématique. Bien que très peu probable, nous ne pouvons exclure que le hasard de la répartition des souris dans les différents groupes soit à l'origine de ces différences. Par ailleurs, la position du manchon en polyéthylène (cuff) a été vérifiée post mortem chez les souris ayant récupéré spontanément, suggérant que

cette récupération n'est pas due à un mauvais positionnement du cuff. Il faut également mentionner que le nombre d'agressions chez les mâles WT dans le groupe cuff ayant reçu l'excipient était particulièrement important or il est connu que les agressions entre mâles modifient la sensibilité à la douleur (Mogil, 2017). Par ailleurs, la récupération de ce groupe contrôle peut également refléter la très grande variabilité des réponses au test comportemental (voir partie variabilité des résultats).

Absence d'effet du CBD 10 mg/kg sur le seuil de sensibilité mécanique

La littérature suggère que l'administration aiguë de CBD, soulagerait l'hypersensibilité mécanique chez des souris ayant subi une constriction du nerf sciatique (CCI) avec un effet compris entre 1h et 2h et une dose efficace 50 (ED50) de 3.6 mg/kg s.c. (Casey *et al.*, 2017). Des résultats similaires ont également été montrés chez des rats CCI (Jesus *et al.*, 2022) des rats SCI (Baron-Flores *et al.*, 2022) mais aussi chez des souris souffrant de douleur neuropathique chimio-induite par le cisplatine (Harris *et al.*, 2016) ainsi que chez des souris atteintes de neuropathie diabétique (Jesus *et al.*, 2019). Il a également été rapporté que son administration répétée pouvait prévenir le développement de l'allodynie mécanique chez les rats cuff (Linher-Melville *et al.*, 2020) mais aussi qu'elle entraînait un rétablissement des seuils nociceptifs au bout de 7 jours chez des rats SNI (Costa *et al.*, 2007; De Gregorio *et al.*, 2019). Des résultats similaires ont également été obtenus dans des modèles murins de douleur neuropathique chimio-induite (Ward *et al.*, 2011, 2014; Foss *et al.*, 2021; Kumar Kalvala *et al.*, 2022) ou de neuropathie diabétique (Toth *et al.*, 2010; Jesus *et al.*, 2019).

Chez des souris cuff, l'analyse du décours temporel de l'effet de l'administration aiguë de CBD 100 mg/kg 2 semaines après la chirurgie ne montre pas d'effet significatif du CBD. Cependant, la courbe présente une allure en cloche, forme typique de l'effet analgésique d'une molécule en fonction du temps. Cela suggère que le CBD induirait un effet antinociceptif à partir de 30 minutes jusqu'à 2h après l'injection, ce qui est cohérent avec la littérature. Par ailleurs, la courbe dose réponse de l'effet d'une injection aiguë de CBD chez des souris cuff, montre un effet significatif du CBD à une dose de 50 mg/kg. Bien que la différence ne soit pas significative, il semblerait que les doses de 1 et 10 mg/kg produisent un effet intermédiaire. Sur la base de ces résultats et de l'ED50 décrite dans la littérature (Casey *et al.*, 2017), nous avons choisi une dose de CBD à 10 mg/kg c'est-à-dire une dose analgésique sous-optimale pour l'expérience d'administration répétée.

Nous avons observé que l'administration répétée de CBD chez les souris cuff 2 semaines après leur chirurgie ne soulage pas l'hypersensibilité mécanique. Une hypothèse serait que la dose de 10 mg/kg administrée en aigu ne serait pas analgésique. Une hypothèse alternative est également à considérer. Des raisons financières nous ont poussé à changer de fournisseur de CBD en cours d'expérience. Ainsi, les courbes doses réponses et le décours temporel ont été réalisés avec un CBD de chez Cayman (Cayman chem ; 90080) et les études d'administration répétée avec un CBD de chez THC pharm (THC pharm : THC-1073-G1). Nous avons par ailleurs prêté une attention particulière à ce que les deux CBD soient tout deux d'origine synthétique et de pureté similaire. Malheureusement, THC pharm ayant arrêté de fournir du CBD à des fins scientifiques en 2021, il nous a été impossible d'obtenir à posteriori plus d'information sur la synthèse et les caractéristiques du CBD fourni. Nous avons cependant confirmé par spectrométrie de masse qu'il s'agissait bien de CBD.

Absence d'effet du CBD 10 mg/kg sur l'état émotionnel

Le CBD a des effets de type antidépresseurs chez les souris et les rats naïfs (Silote *et al.*, 2019). En particulier, un effet antidépresseur du CBD a été mis en évidence chez des souris mâles Swiss dans le test du FST à des doses de 10 mg/kg (Sales *et al.*, 2018, 2019), 30 mg/kg (Zanelati *et al.*, 2010) et 200 mg/kg (El-Alfy *et al.*, 2010). En revanche, ces deux dernières études ne trouvent pas d'effet antidépresseur du CBD à des doses de 10 mg/kg (Zanelati *et al.*, 2010) et 20 mg/kg (El-Alfy *et al.*, 2010). Par ailleurs, aucun effet antidépresseur du CBD n'a été démontré chez des souris mâles DBA/2 (El-Alfy *et al.*, 2010), ni chez des souris C57BL/6 (Silote *et al.*, 2021) dans le test de suspension de la queue. Dans nos conditions le CBD 10 mg/kg ne soulage pas les symptômes de types anxieux ou dépressifs chez les souris sauvages. L'absence d'effet antidépresseur du CBD dans nos conditions pourrait refléter une différence liée à la souche de souris et/ou une dose trop faible.

Impact de la délétion du récepteur δ

Chez les souris δ *knock-out*, aucune récupération des animaux n'a été observée chez les mâles neuropathiques ceci est en accord avec l'exacerbation de l'allodynie mécanique en l'absence du récepteur δ chez les souris neuropathiques (pSNL) (Nadal *et al.*, 2006; Martínez-Navarro *et al.*, 2020). Par ailleurs, le CBD ne soulage pas l'allodynie mécanique chez ces souris ce qui suggère que le récepteur δ pourrait être nécessaire à l'effet antinociceptif du CBD comme c'est le cas pour les antidépresseurs et les beta-mimétiques (Ceredig *et al.*, 2018, 2020). Toutefois, ceci devra être confirmé.

Chez les souris mâles δ KO sham ou cuff, l'ANOVA révèle un effet du CBD. Par ailleurs, les mâles cuff traités au CBD 10 mg/kg présentent une tendance à une diminution du temps d'immobilité dans le test de la nage forcée par rapport aux animaux traités avec l'excipient. Ces résultats, pourraient suggérer un effet antidépresseur du CBD. Si tel est le cas, le récepteur δ ne serait donc pas nécessaire à l'effet antidépresseur du CBD.

Variabilité des résultats

Les résultats des tests comportementaux sont extrêmement variables. Cela est particulièrement visible dans le test de Von Frey avec des variabilités intragroupes et intergroupes fortes. En effet, pour les animaux sauvages ayant subi une chirurgie sham, les barres d'erreur (SEM) sont particulièrement grandes et les résultats varient de façon importante d'une semaine à l'autre. Par ailleurs, pour des conditions identiques, des différences significatives sont parfois présentes (particulièrement chez les femelles sham avant traitement).

- **Influence cohorte-dépendante**

Chaque cohorte est composée de 30 à 36 souris. Les animaux ont été fournis par le Chronobiotron, animalerie agréée interne à l'institut. La proportion mâle / femelle et la proportion sauvages / δ KO au sein de chaque lot d'animaux dépendait des naissances. Il nous a été impossible de représenter chacun des 24 groupes expérimentaux au sein de chaque lot expérimental d'animaux. Ainsi, de fortes différences inter-cohorte ont été observées comme illustrées dans le test du splash (figure supplémentaire 6). A posteriori, il aurait été plus judicieux de séparer cette expérience en plusieurs parties afin d'avoir une représentation homogène de chaque groupe. Par exemple en commençant par effectuer l'étude chez des animaux WT uniquement pour ensuite poser la question de l'effet chez les animaux δ *knock-out*.

- **Influence des conditions d'hébergement**

Les résultats de Von Frey sont grandement dépendant de l'expérimentateur (Deuis *et al.*, 2017) et de l'expérience de celui-ci. Après avoir moi-même réalisé de nombreux Von Frey sur des animaux d'entraînement, nous avons choisi de faire réaliser les tests de Von Frey par une personne plus expérimentée de la plateforme de comportement de l'institut. Cette personne a réalisé tous les tests pour diminuer la variabilité liée à l'expérimentateur.

Dans la recherche sur la douleur en particulier, les facteurs de stress liés aux conditions d'hébergement et de laboratoire peuvent induire une grande variabilité. En effet, on sait que le

stress peut induire des augmentations (hyperalgésie induite par le stress) ou des diminutions (analgésie induite par le stress) de la sensibilité nociceptive (Mogil, 2017). Le stress chronique en particulier augmente les comportements de type douloureux (Bardin *et al.*, 2009; Scheich *et al.*, 2017; Piardi *et al.*, 2020; Dalanon *et al.*, 2021; Fülöp *et al.*, 2023). Par ailleurs, des modèles de stress chronique comme les modèles d'UCMS (*unpredictable chronic mild stress*), (Burstein & Doron, 2018) ou de *social defeat* sont régulièrement utilisés comme modèles précliniques d'anxiété et de dépression (Nestler & Hyman, 2010). Dans le modèle d'UCMS, des stressseurs fréquemment utilisés sont l'humidification de la litière, les stress sociaux, mais aussi la perturbation du cycle veille sommeil (Burstein & Doron, 2018). D'autres facteurs comme le bruit influencent également le seuil nociceptif chez les rongeurs (Helmstetter & Bellgowan, 1994; Shankar *et al.*, 1999) mais aussi la déprivation de sommeil qui augmente les comportements de type douloureux (Araujo *et al.*, 2011; Arora *et al.*, 2021) et les comportements de type dépressifs (Moon *et al.*, 2018).

Tous nos animaux sont hébergés dans une animalerie avec la lumière de 8h à 20h. Cela signifie que de 8 h à 20h nos animaux sont en phase de sommeil. La salle où sont hébergés nos animaux, contient de nombreux animaux issus de diverses procédures, ainsi dans cette salle sont présent des animaux en procédure dans des modèles de douleur chronique, de stress chronique, d'anxiété et ou de dépression, des modèles d'autismes, des animaux recevant chroniquement des doses de morphine (100 mg/kg), etc. Par ailleurs, le manque de place au sein de l'animalerie fait que de nombreux gestes dont les injections de substance, les habituations des animaux à l'expérimentateur, le réveil des animaux après une chirurgie, sont effectués dans les pièces de stabulation. A plusieurs reprises, les cages de certains animaux se sont retrouvées détremées par un biberon défectueux menant à la fois à un stress due à la litière mouillée mais aussi à un stress hydrique dû au manque d'eau. Par ailleurs, il est également arrivé plusieurs fois que, dans les pièces de stabulation, des souris mettent bas à cause d'une mauvaise séparation mâles / femelles. A cela s'ajoute les allées et venues ininterrompues de différents expérimentateurs et animaliers plus ou moins bruyants dans cette pièce. Une expérience interne à notre animalerie a montré que le seuil de sensibilité mécanique des souris diminuait au cours de la semaine et revenait à son maximum pendant le week-end mettant en relief l'influence des conditions d'hébergement sur le seuil de sensibilité mécanique des souris.

Nous avons essayé de mettre en place des stratégies afin de minimiser les sources de stress induites par l'hébergement. Nous avons changé nos animaux de pièce pour une pièce moins bruyante. Nous avons pris en charge le change de tous nos animaux à partir de leur arrivée dans

la salle de stabulation, et ce, jusqu'à la fin des procédures. Nous avons essayé d'ajouter des tunnels dans les cages des animaux pour diminuer le stress lié à la manipulation (Hurst & West, 2010), cependant la présence de ce tunnel a augmenté les agressions chez les mâles qui se battaient pour le tunnel. Cependant, il est probable que les stratégies mises en place n'ait eu que peu d'impact compte tenu de l'étendue du problème.

Conclusion

En conclusion, cette étude nous permet de nous interroger sur l'importance des conditions expérimentales et des conditions d'hébergement et sur la place qu'elles prennent dans la crise de la reproductibilité en science. Nos résultats ne nous permettent pas de conclure à un potentiel effet anti-allodynique du CBD dans la douleur neuropathique, ni à un potentiel effet anxiolytique ou antidépresseur chez les souris sauvages. Chez les souris δ *knock-out* en revanche, le CBD ne soulage pas l'hypersensibilité mécanique ni n'améliore les symptômes émotionnels.

IV. Informations supplémentaires

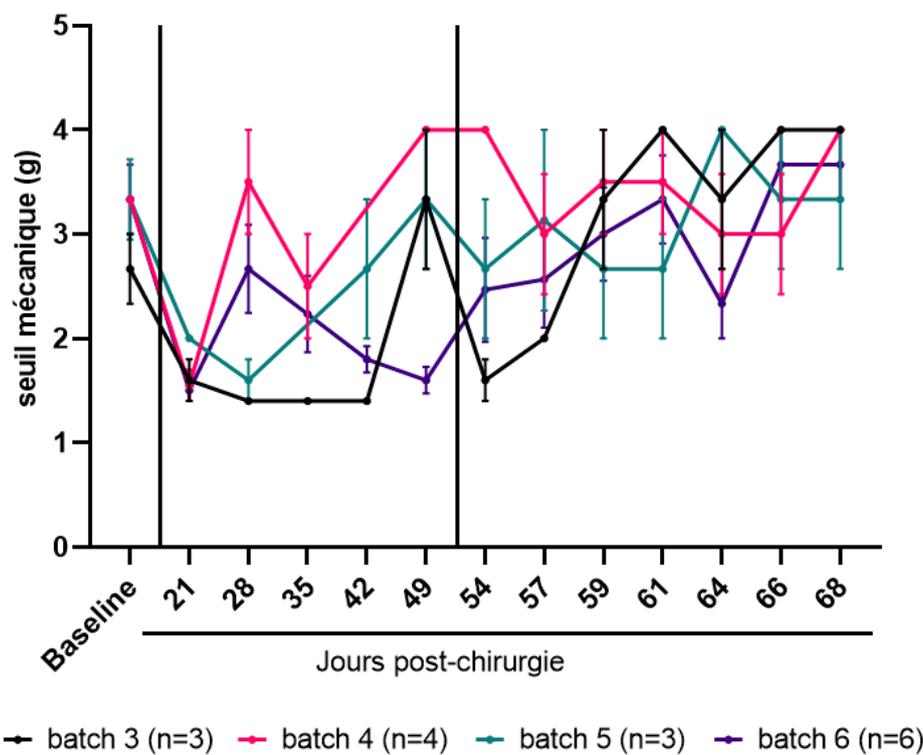


Figure supplémentaire 1 : Récupération du groupe contrôle de souris sauvages mâles neuropathiques ayant reçu l'excipient en fonction du lot d'animaux dont elles proviennent.

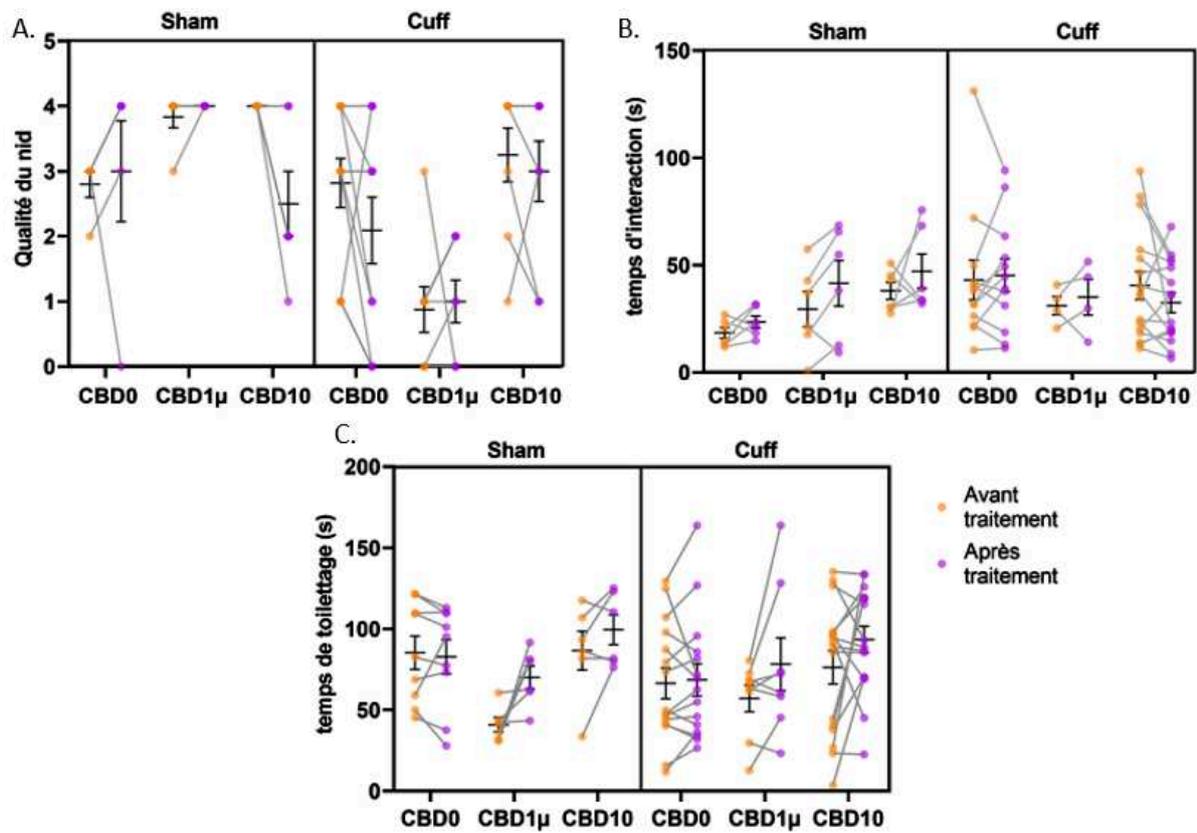


Figure supplémentaire 2 : Effet de l'administration i.p. répétée de CBD (0 mg/kg, 1 µg/kg, 10 mg/kg) sur les symptômes émotionnels de souris mâles de génotype sauvage. A. Test du nid, B. test d'interaction sociale, C. test d'éclaboussement, Les tests ont été effectués avant (orange) et après (violet) un traitement journalier d'au moins 15 jours. Les résultats sont représentés en moyenne +/- SEM. Les points individuels sont reliés pour visualiser les variations intra-individuelles.

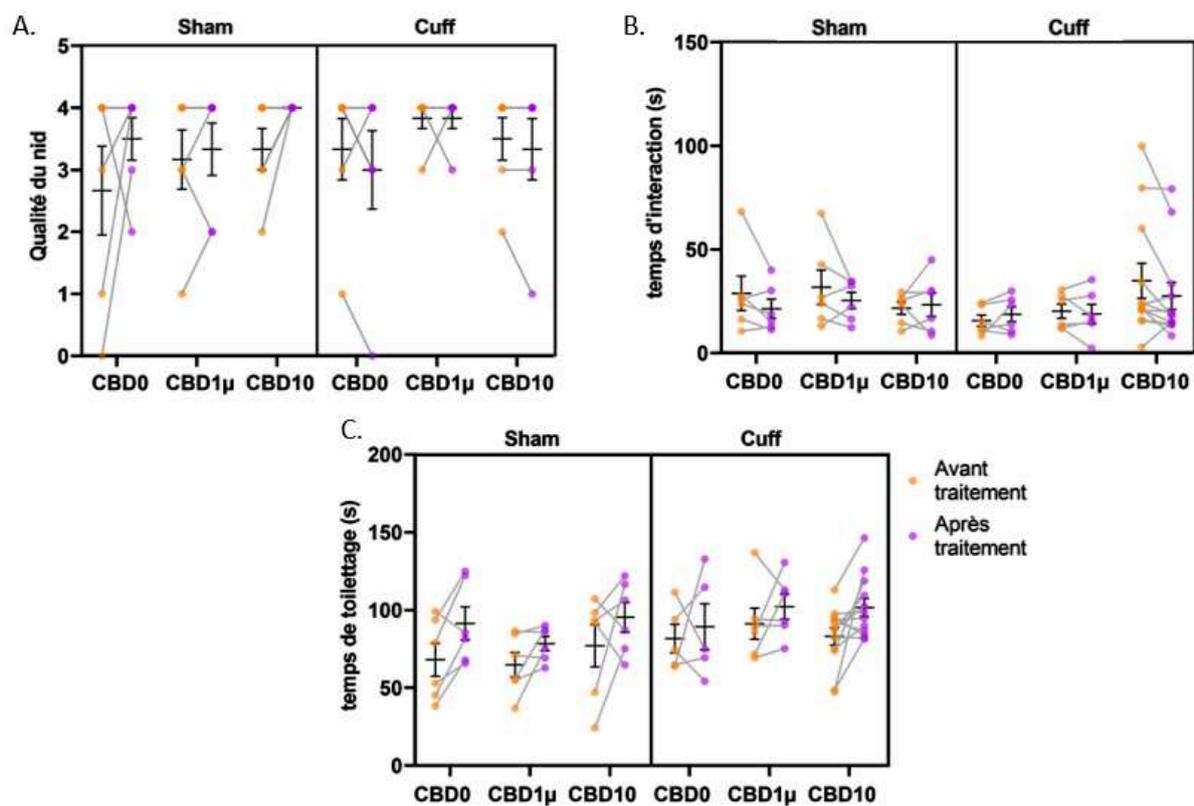


Figure supplémentaire 3 : Effet de l'administration i.p. répétée de CBD (0 mg/kg, 1 µg/kg, 10 mg/kg) sur les symptômes émotionnels de souris femelles de génotype sauvage. A. Test du nid, B. test d'interaction sociale, C. test d'éclaboussement, Les tests ont été effectués avant (orange) et après (violet) un traitement journalier d'au moins 15 jours. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM. Les points individuels sont reliés pour visualiser les variations intra-individuelles.

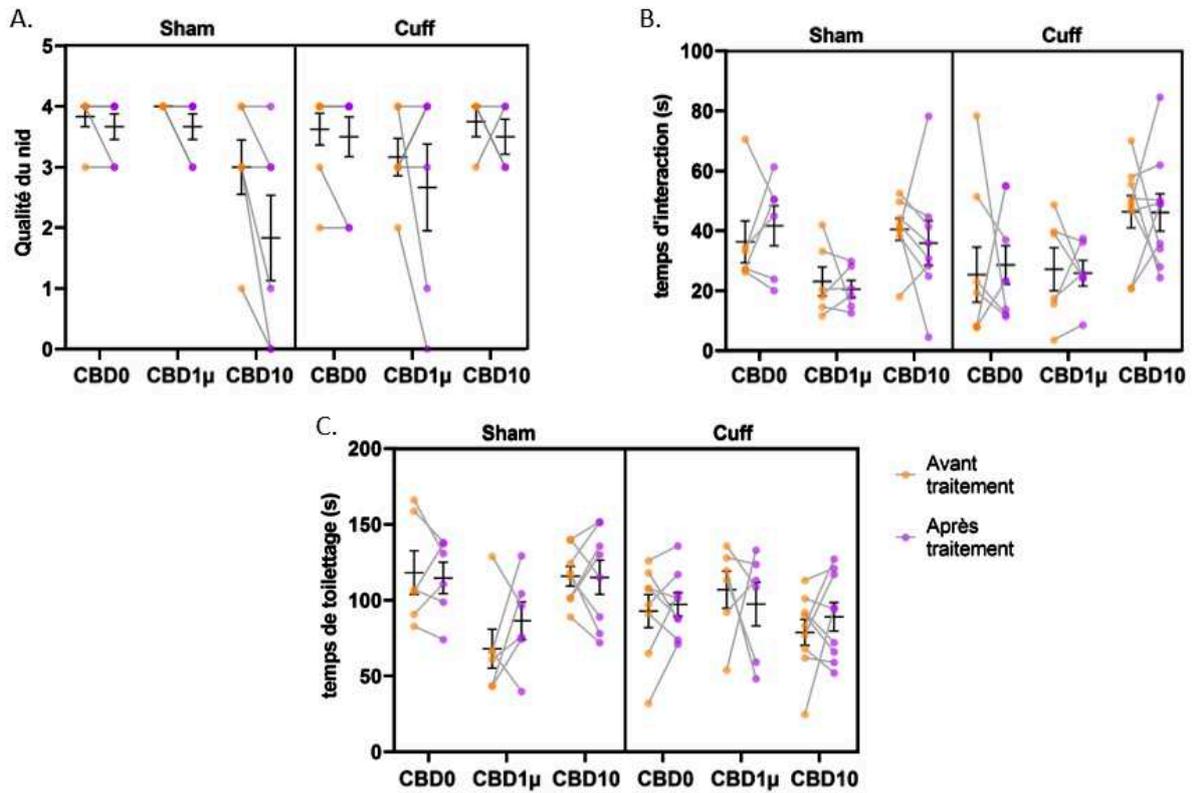


Figure supplémentaire 4 : Effet de l'administration i.p. répétée de CBD (0 mg/kg, 1 μ g/kg, 10 mg/kg) sur les symptômes émotionnels de souris males de génotype δ KO. A. Test du nid, B. test d'interaction sociale, C. test d'éclaboussement, Les tests ont été effectués avant (orange) et après (violet) un traitement journalier d'au moins 15 jours. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM. Les points individuels sont reliés pour visualiser les variations intra-individuelles.

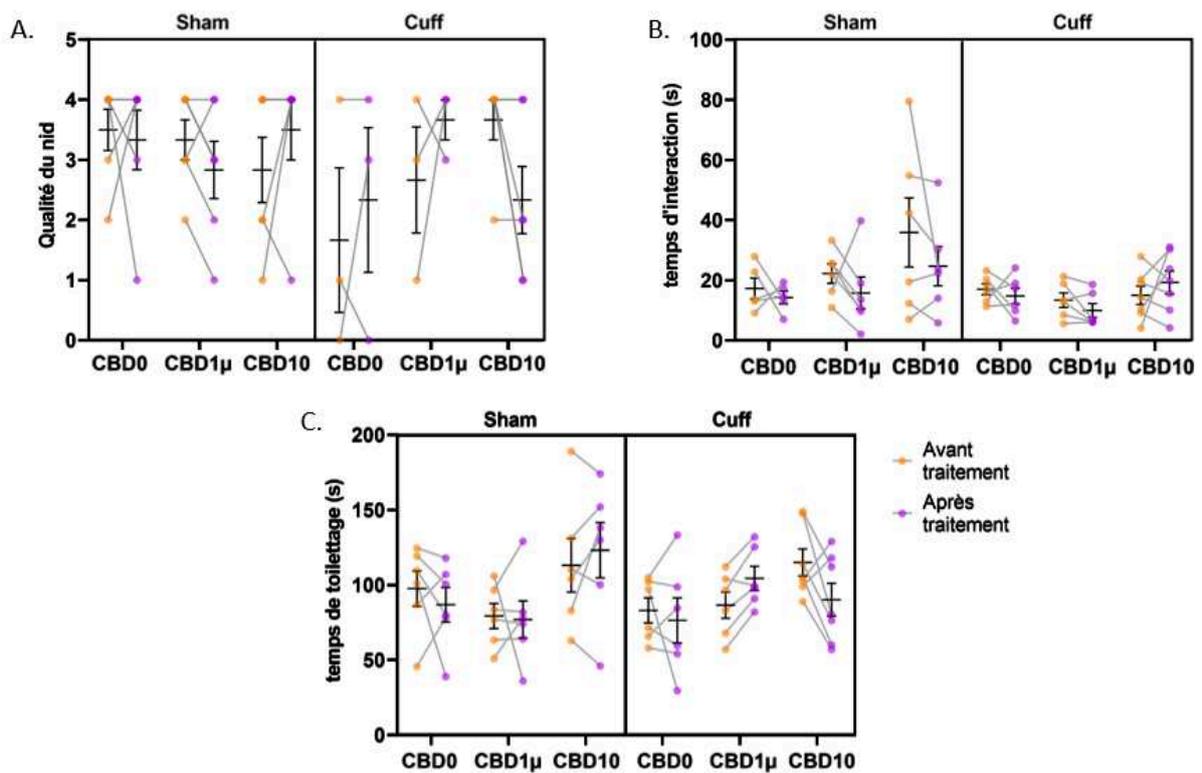


Figure supplémentaire 5 : Effet de l'administration i.p. répétée de CBD (0 mg/kg, 1 μ g/kg, 10 mg/kg) sur les symptômes émotionnels de souris femelles de génotype δ KO. A. Test du nid, B. test d'interaction sociale, C. test d'éclaboussement, Les tests ont été effectués avant (orange) et après (violet) un traitement journalier d'au moins 15 jours. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM. Les points individuels sont reliés pour visualiser les variations intra-individuelles.

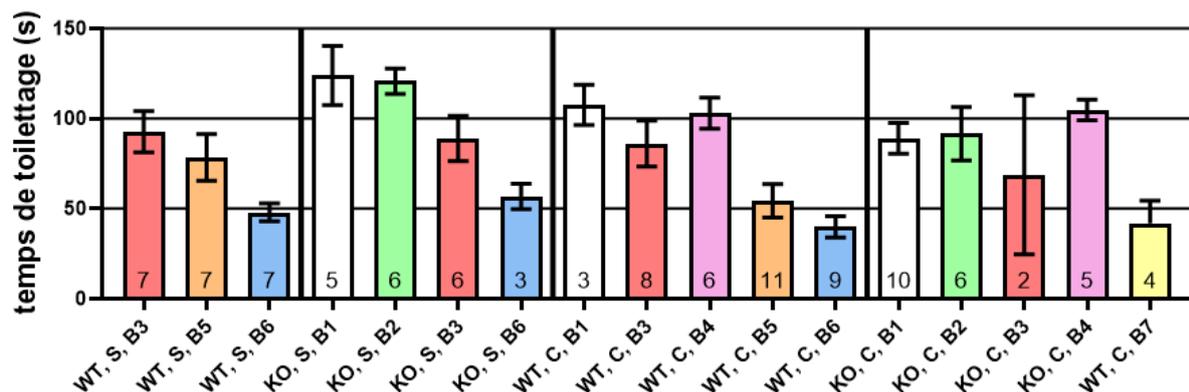


Figure supplémentaire 6 : Effet de la cohorte sur le temps de toilettage des animaux. Le temps de toilettage des souris mâles sauvages (WT) ou δ knock-out (KO), sham (S) ou cuff (C), sont représenté en fonction de la cohorte (B1-B7) d'origine des animaux. Les résultats sont représenté sous la forme moyenne \pm SEM.

CHAPITRE III :

Distribution des neurones co-exprimant les récepteurs δ et CB1 dans le système nerveux de souris neuropathiques

I. Introduction

Les récepteurs opioïdes δ et cannabinoïdes CB1 sont tous deux impliqués dans la modulation des stimuli nociceptifs et sensoriels (Nadal *et al.*, 2013; Donvito *et al.*, 2018). Tous deux sont largement distribués dans le système nerveux central et périphérique (Bridges *et al.*, 2003; Erbs *et al.*, 2015; Bouchet & Ingram, 2020) mais les données concernant leur co-expression neuronale restent fragmentaires. Cette information est cependant primordiale pour postuler l'existence d'hétéromères associant les deux récepteurs. Ces derniers ont été détectés par ELISA en utilisant des anticorps spécifiques dans les membranes de striatum, d'hippocampe, d'hypothalamus, de cervelet et du cerveau médian (Bushlin *et al.*, 2012). Leur abondance est augmentée dans toutes ces régions, à l'exception de l'hippocampe, en condition neuropathique dans un modèle de transection du nerf spinal L5 (Bushlin *et al.*, 2012). L'activation des hétéromères δ -CB1 dans le cortex entraîne par ailleurs une augmentation de l'activité du récepteur δ en présence de ligands du récepteur CB1 à des doses n'entraînant pas de signalisation (Bushlin *et al.*, 2012). De plus, dans un modèle de douleur neuropathique induite par la chimiothérapie (paclitaxel), l'expression des hétéromères δ -CB1 est accrue dans la moelle épinière y compris chez l'humain, chez des patients cancéreux traités par chimiothérapie (Sierra *et al.*, 2019). La co-administration d'agoniste CB1 à des doses n'entraînant pas de signalisation et d'un agoniste δ réduit l'allodynie mécanique dans ce modèle chez la souris (Sierra *et al.*, 2019). Ces résultats suggèrent que les hétéromères δ -CB1 pourraient représenter une cible thérapeutique intéressante dans le contexte de la douleur neuropathique.

Le cannabidiol (CBD) est un modulateur allostérique du récepteur CB1 (Laprairie *et al.*, 2015) et du récepteur δ (Kathmann *et al.*, 2006; Foss *et al.*, 2021). Il pourrait par conséquent être également un modulateur des hétéromères δ -CB1. Nous nous sommes donc intéressés à la co-expression neuronale des deux récepteurs dans le cerveau, condition prérequis à la

proximité physique des récepteurs. Pour cartographier les deux récepteurs dans le cerveau, nous avons utilisé une lignée de souris knock-in exprimant le récepteur opioïde δ en fusion avec la protéine fluorescente verte eGFP pour pallier l'absence d'anticorps sélectifs de ce récepteur. Un anticorps pour le récepteur CB1, a été utilisé pour le détecter spécifiquement.

II. Matériel et méthodes

1. Animaux

Des souris *knock-in* δ -eGFP exprimant le récepteur δ fusionné à une protéine fluorescente verte ont été générées par recombinaison homologue comme décrit précédemment (Scherrer *et al.*, 2006). Le fonds génétique des souris δ -eGFP était C57BL/6J:129SvPas (50 : 50). Les expériences ont été réalisées sur des souris mâles et femelles âgées de 8 à 20 semaines, pesant 18-32 g pour les femelles et 20-38 g pour les mâles.

2. Modèle de douleur neuropathique

La douleur neuropathique a été induite par deux modèles différents de lésion du nerf sciatique, le modèle du manchon (cuff) et le modèle de *spared-nerve injury* littéralement « lésion du nerf épargné » (SNI). Pour le modèle du cuff, la branche principale du nerf sciatique droit a été comprimée comme décrit précédemment (Yalcin *et al.*, 2014). Les chirurgies ont été réalisées sous anesthésie avec : kétamine 20 mg/kg et un mélange de tilétamine et de zolazépan (Zoletil 50) 80 mg/kg. La branche commune du nerf sciatique droit a été exposée et un manchon en polyéthylène de longueur standardisée (2 mm) a été inséré unilatéralement autour du nerf (groupe cuff). Les animaux sham ont subi la même procédure chirurgicale sans implantation du manchon (groupe Sham).

Pour le modèle SNI, la chirurgie est effectuée sous anesthésie générale par inhalation d'isoflurane (3 % pour l'induction et 1.5 à 2 % pour le maintien). Une incision est réalisée au niveau de la cuisse et les muscles sont séparés afin d'exposer le nerf sciatique au niveau de la trifurcation. Les branches tibiales et péronéales du nerf sont ligaturées et coupées du côté distal de la ligature. La branche surale du nerf sciatique reste intacte. Les chirurgies cuff et SNI étant similaires, les animaux sham issus de la procédure de cuff constituent également le groupe contrôle pour les SNI.

3. Évaluation de l'allodynie mécanique

L'allodynie mécanique a été testée à l'aide de filaments de nylon calibrés (filaments de von Frey). Brièvement, des filaments de von Frey (Bioseb, Vitrolles, France) ont été appliqués sur la surface plantaire (modèle du manchon) ou latérale (modèle SNI) de chaque patte arrière selon une série de force ascendante de 1 à 10g (modèle du cuff) et de 0,07 à 10g (modèle du SNI). Le seuil est déterminé par le premier filament entraînant au moins 3 retraits de la patte sur 5 applications successives.

4. Préparation des tissus et immunohistochimie

Les animaux ont été perfusés 4 semaines après la chirurgie. Ils ont été injectés avec l'agoniste sélectif δ SNC80 1 heure avant la perfusion pour faciliter la détection du soma des neurones δ -eGFP (Erbs *et al.*, 2015). De la même manière, ils ont été injectés avec l'agoniste sélectif CB1 ACEA, à 3 mg/kg 30 minutes avant la perfusion. La préparation des tissus et l'amplification des signaux eGFP et CB1 par immunohistochimie ont été réalisées comme suit. Les souris ont été anesthésiées avec de la kétamine / xylazine (300 / 20 mg/kg, i.p.) et perfusées par voie intracardiaque avec 100 ml de paraformaldéhyde (PFA) à 4% (à 4°C) dans du PBS 1x à 20 ml/min. Les cerveaux ont été post-fixés pendant 24 heures à 4°C dans une solution de PFA à 4%, cryoprotégés à 4°C dans une solution de sucrose à 30%, PBS 1x, inclus dans un milieu OCT, congelés et conservés à -80°C. Des coupes de cerveau flottantes de 30 μ m d'épaisseur ont été coupées à l'aide d'un vibratome et incubées dans une solution de blocage (PBS 1x, 0,3% de Tween20, 1,5% de sérum de chèvre normal, 1,5% de sérum d'âne) pendant 1 heure à température ambiante. Les coupes ont été incubées pendant une nuit à 4°C dans la solution de blocage avec un anticorps anti-GFP de poulet (Aves Lab GFP-1020, dilution 1:1000) et un anticorps anti-CB1 de lapin (Cayman Chemical 1006590 1:1000). Les coupes ont été lavées trois fois avec du PBS 1x, 0,3% Tween20, incubées pendant 2 heures à température ambiante avec des anticorps secondaires de chèvre anti-poulet conjugués à l'AlexaFluor 488 (Molecular Probes A-11034, dilution 1:2000) et des anticorps secondaires d'âne anti-lapin conjugués à l'AlexaFluor 647 (Molecular Probes A-31537 dilution 1:2000). Les coupes ont été lavées trois fois et montées sur lame avec du Mowiol et du DAPI (0,5 μ g/ml).

5. Acquisition et analyse d'images

L'acquisition des images a été réalisée avec le scanner de lames NanoZoomer S60 et le module de fluorescence L11600-21 (Hamamatsu Photonics, Japon). La source lumineuse LX2000 (Hamamatsu Photonics, Japon) consistait en une lampe à mercure à ultra-haute pression couplée à une fibre optique. L'acquisition RVB a été réalisée en mode épifluorescence avec un jeu de filtres optimisé pour la détection du DAPI, de la fluorescéine ou du Cy5. L'acquisition a été réalisée à l'aide d'un objectif sec 20x (NA : 0,75). La résolution de 40x a été obtenue grâce à un adaptateur objectif/caméra (résolution : 0,23 μ m/pixel). Les neurones exprimant un marqueur fluorescent donné sont visualisés à l'aide du système de visualisation NDP avec un zoom haute résolution intégré et la possibilité de séparer les différents composants fluorescents. Les régions cérébrales ont été identifiées à l'aide de la 4e édition du

Mouse Brain Atlas de Paxinos et Franklin (Paxinos & Franklin, 2012). Le comptage a été effectué sur 3 à 5 sections non consécutives dans la RVM (Bregma -5,5 à -6,5) sur des zones comprenant les noyaux du raphé postérieur (pallidus, magnus, obscurus, interpositus), le noyau parapyramidal, la partie alpha du noyau réticulaire gigantocellulaire et le noyau paragigantocellulaire latéral.

6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée avec Graph-Pad Prism (GraphPad, San Diego, CA). Les changements d'expression des récepteurs entre la condition contrôle (sham) et les deux conditions neuropathiques (cuff et SNI) ont été analysés en utilisant une ANOVA à un facteur, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett ou Tukey. Toutes les données étaient normalement distribuées, comme vérifié à l'aide du test de normalité de Shapiro-Wilk. L'analyse statistique des résultats de von Frey a été effectuée à l'aide du test non paramétrique de Kruskal Wallis.

III. Résultats

1. Développement de l'allodynie mécanique en condition neuropathique

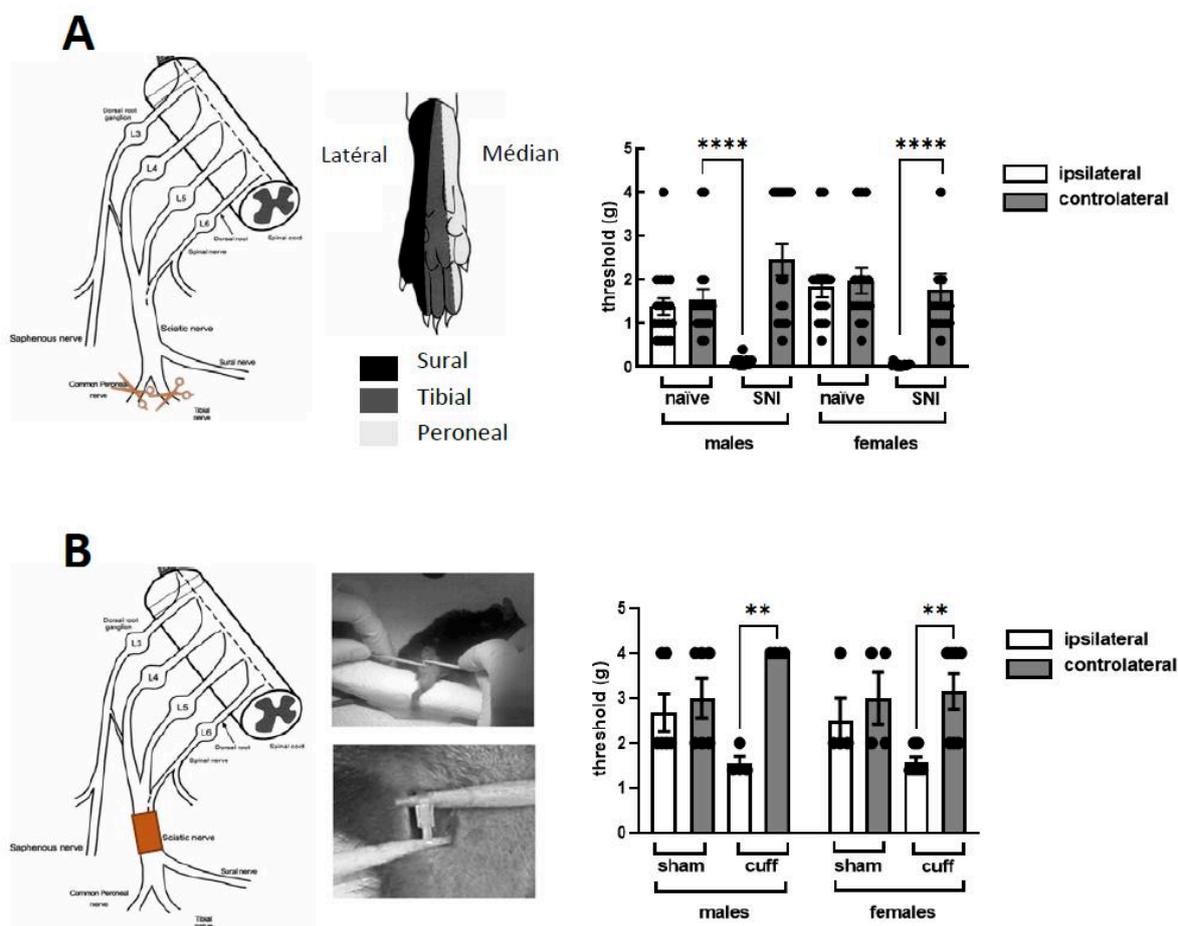


Figure 1 : Développement de l'hypersensibilité mécanique chez les mâles et les femelles (A) 10 jours après chirurgie SNI ou (B) 21 jours après pose d'un manchon sur le nerf sciatique. Le seuil mécanique de retrait de la patte a été mesuré à l'aide de filaments calibrés de von Frey. La patte ipsilatérale est la patte ayant subi la chirurgie. Les données sont exprimées en tant que moyenne \pm SEM. Test statistique de Kruskal Wallis suivis d'un test de comparaisons multiples de Dunn. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. A. $n = 18$ (mâles naïfs), $n = 16$ (femelles naïves), $n = 18$ (SNI mâles), $n = 15$ (SNI femelles). B. $n = 6$ (sham mâles), $n = 4$ (sham femelles), $n = 4$ (cuff mâles), $n = 7$ (cuff femelles).

Le modèle du SNI induit une hypersensibilité mécanique chez les animaux mâles (0.145 ± 0.027 g vs 2.463 ± 0.361 g pour la patte ipsilatérale et contralatérale respectivement, $p < 0.001$) et femelles (0.056 ± 0.009 g vs 1.773 ± 0.365 g pour la patte ipsilatérale et contralatérale respectivement, $p < 0.001$) (Figure 1A) tandis que le modèle du cuff induit une hypersensibilité mécanique chez les mâles (1.550 ± 0.1500 g vs 4.000 ± 0.0 g pour la patte ipsilatérale et

contralatérale respectivement, $p < 0.001$) et chez les femelles (1.571 ± 0.1107 g vs 3.143 ± 0.4041 g pour la patte ipsilatérale et contralatérale respectivement) (Figure 1B).

2. Co-expression neuronale δ -CB1 en condition contrôle et neuropathique (cuff)

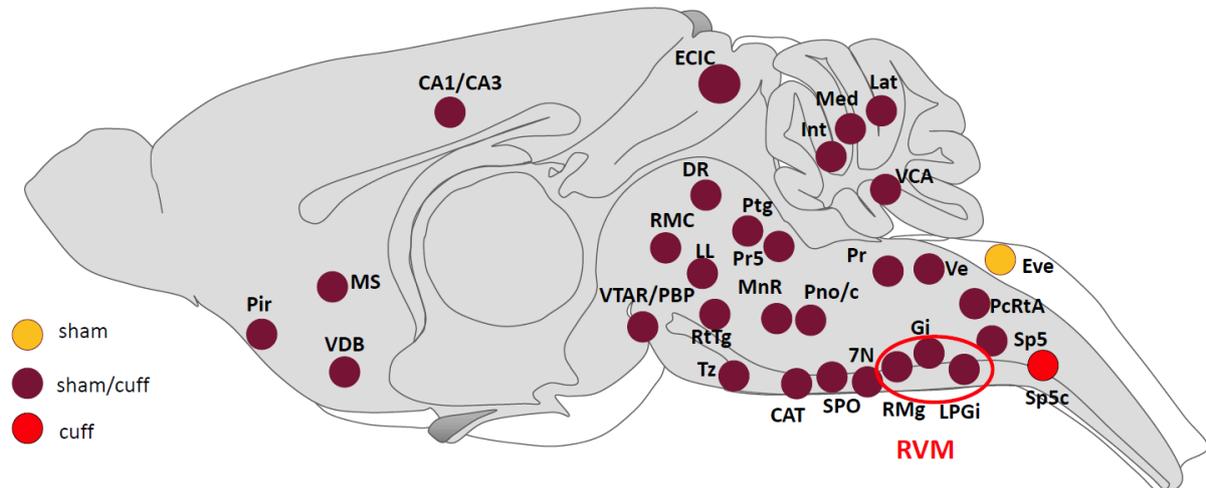


Figure 2 : Distribution des neurones co-exprimant le récepteur opioïde δ et le récepteur cannabinoïde CB1 dans le cerveau de souris en condition contrôle (sham) ou neuropathique 4 semaines après la chirurgie (cuff). Abréviations : 7N noyau du nerf facial ; CA1 corne d'Ammon région 1 ; CA3 corne d'Ammon région 3 ; CAT noyau du tractus acoustique central ; DR noyau du raphé dorsal ; ECIC cortex externe du colliculus inférieur ; Eve noyau d'origine des efférences du nerf vestibulaire ; Gi noyau réticulaire gigantocellulaire ; Int noyau cérébelleux interposé ; Lat noyau cérébelleux denté latéral ; LL lemnisque latéral ; LPGi noyau latéral paragigantocellulaire ; MeD noyau cérébelleux médian ; MnR noyau du raphé médian ; MS septum median ; PcRtA partie alpha du noyau réticulé parvocellulaire ; Pir cortex piriforme ; PnC noyau réticulaire pontin (partie caudale), PnO noyau réticulaire pontin (partie orale), Pr5 noyau principal sensoriel trigéminal ; Ptg noyau pediculotegmental ; RMC noyau rouge partie magnocellulaire ; RMg noyau du raphé magnus ; RtTg noyau réticulotegmental du pons ; RVM bulbe rachidien rostral ventromédian ; Sp5 noyau trigéminal spinal ; Sp5c noyau trigéminal spinal (partie caudale), SPO noyau supérieur paraolivaire ; Tz noyau du corps trapézoïde ; VCA noyau cochléaire ventral, VDB noyau du branche vertical de la bande diagonale de Broca ; Ve noyau vestibulaire ; VTAR/PBP aire tegmentale ventrale (partie rostrale)/noyau pigmenté parabrachial de la VTA.

Notre analyse préliminaire de la distribution des neurones co-exprimant les récepteurs δ et CB1 a montré, qu'en condition contrôle (sham), ils sont pour l'essentiel situés dans le mésencéphale et le cerveau postérieur (Figure 2 et 3). Parmi les régions identifiées se trouvent le bulbe rachidien rostral ventromédian (RVM), le pons (Pn, Ptg), les noyaux du raphé (DR, MnR, RMg), la partie magocellulaire du noyau rouge (RMC), les noyaux vestibulaires (Ve) ou

encore la partie alpha du noyau réticulaire parvocellulaire (**PCRtA**) ainsi que dans les noyaux associés aux nerfs facial (**7N**) et trigéminal (Pr5, Sp5). La co-expression est également observée dans les noyaux profonds du cervelet (**Lat, Int, Med**) et dans des régions associées à l'audition telles que le noyau cochléaire (**VCA**) ou le corps trapézoïde (**Tz**). Les régions présentes dans le télencéphale appartiennent au circuit septohippocampique et correspondent à l'hippocampe ainsi qu'une de ses afférences, la bande diagonale de Broca, et une de ses efférences, le septum médian. Il est à noter que le nombre de somas identifiés dans l'hippocampe est faible (moins de 5 par coupe) et que le CB1 est très fortement exprimé au niveau des terminaisons présynaptiques.

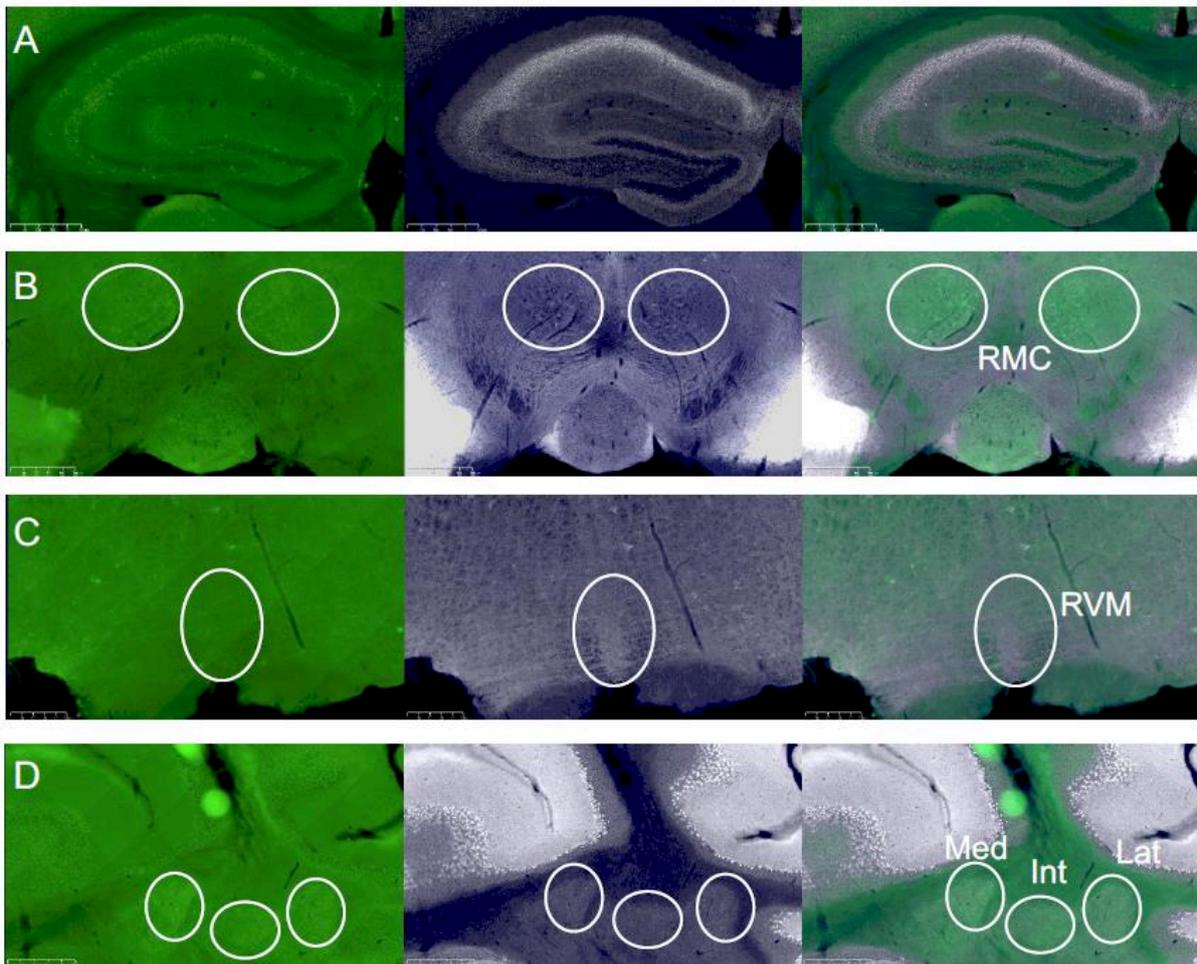


Figure 3 : Images représentatives de la co-expression neuronale des récepteurs opioïdes δ et cannabinoïdes CB1 (A) hippocampe, (B) RMC, (C) RVM, (D) cervelet. De gauche à droite : DAPI (bleu), δ -eGFP (vert), CB1 (blanc), superposition.

En condition neuropathique, soit 4 semaines après la chirurgie (cuff), les régions identifiées sont les mêmes qu'en condition contrôle à l'exception du noyau d'origine des efférences du nerf vestibulaire (**eVe**). La co-expression est également détectée dans une

nouvelle région, la partie caudale du noyau spinal du trijumeau (Sp5c). Contrairement à ce que laisse penser son nom, cette structure est localisée dans le bulbe rachidien et non dans la moelle épinière. De façon globale, notre analyse préliminaire ne semble pas révéler de différence importante du nombre de neurones co-exprimant les deux récepteurs entre condition contrôle et neuropathique. La distribution chez les animaux SNI reste encore à analyser.

3. Co-expression neuronale δ -CB1 dans la RVM

Au vu de l'importance de la RVM dans la douleur, nous avons réalisé une analyse quantitative de l'expression des neurones δ -CB1 en condition contrôle et neuropathique soit 4 semaines après la chirurgie dans le modèle du manchon et le modèle SNI. La proportion de neurones co-exprimant δ et CB1 reste similaire entre les deux modèles de neuropathie et la condition contrôle. En effet, le pourcentage de neurones δ exprimant également le récepteur

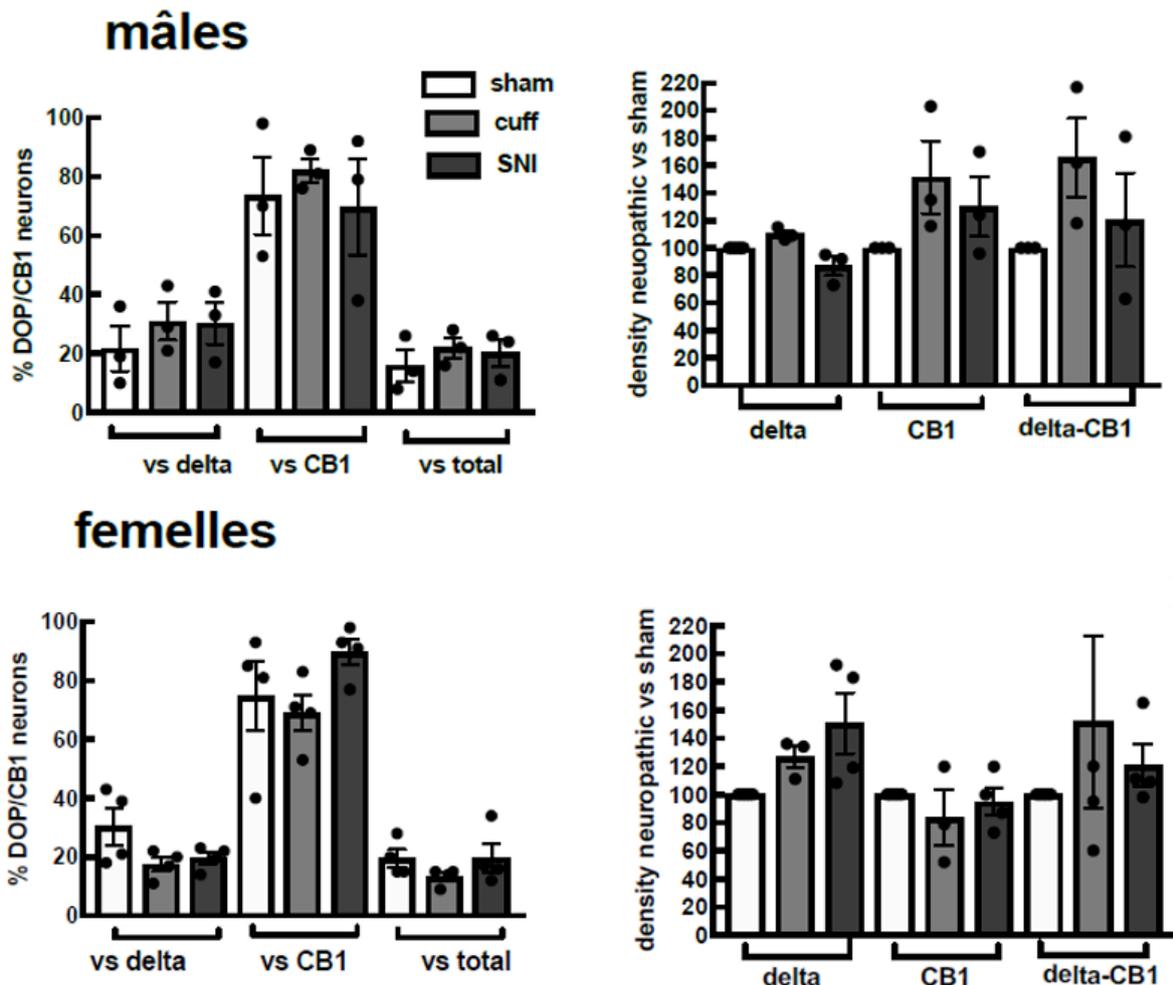


Figure 4 : Quantification des neurones co-exprimant le récepteur opioïde δ et le récepteur cannabinoïde CB1 dans la RVM de souris mâles et femelles contrôle (sham) et neuropathiques (modèles cuff et SNI). Les données sont exprimées en tant que moyenne \pm SEM. $n=3-4$ par condition

CB1 ne varie pas. De façon similaire, le pourcentage de neurones CB1 qui expriment également le récepteur δ n'est pas modifié (Figure 4). Les résultats sont similaires chez les mâles et chez les femelles suggérant l'absence de différences liées au sexe sur ce paramètre. De même, aucune différence significative n'apparaît dans la densité des neurones δ -CB1 tant chez les mâles que chez les femelles.

De manière générale, notre analyse de la distribution des neurones δ -CB1 n'a pas identifié de différence dans la distribution des neurones δ -CB1 entre condition contrôle et neuropathique que ce soit chez les mâles ou chez les femelles.

IV. Discussion

Afin de déterminer les régions du cerveau dans lesquelles le récepteur opioïde δ et le récepteur cannabinoïde CB1 pourraient s'associer pour former des hétéromères, nous avons cartographié la distribution des neurones les co-exprimant. Nous avons également examiné les changements induits dans cette distribution en condition neuropathique dans les deux sexes.

La détection de la co-expression neuronale des récepteurs opioïdes δ et cannabinoïdes CB1 repose sur la visualisation concomitante des deux signaux fluorescents, mais aussi sur notre capacité à identifier en tant que neurone les cellules qui les expriment.

La détection des neurones exprimant le récepteur opioïde δ repose sur l'utilisation de souris knock-in δ -eGFP exprimant une version fluorescente de ce récepteur. Cette construction fluorescente est détectée dans toutes les régions où l'expression des récepteurs δ de type sauvage a été décrite (Erbs *et al.*, 2015). Cependant, les niveaux d'expression des récepteurs δ varient de 10 à 60 fmol/mg dans la plupart des régions du cerveau (Kitchen *et al.*, 1997). Il est donc possible que certaines régions présentant les niveaux d'expression les plus faibles ne soient pas détectées. La fluorescence verte associée au récepteur δ doit donc être amplifiée avec des anticorps spécifiques de l'eGFP. L'identification des corps cellulaires a également été améliorée en traitant les animaux avec l'agoniste δ SNC 80 qui concentre la fluorescence verte dans le soma comme décrit précédemment (Erbs *et al.*, 2015). La combinaison de l'amplification de la fluorescence et du traitement par l'agoniste a permis d'améliorer considérablement la sensibilité de notre approche ainsi que l'identification des neurones δ et, par conséquent, des neurones δ -CB1 positifs. Toutefois, la proportion de neurones δ -CB1 détectés représente probablement une estimation basse de la population co-exprimant les récepteurs δ et CB1.

Le récepteur cannabinoïde CB1 a été détecté à l'aide d'un anticorps polyclonal dont nous avons précédemment établi la spécificité en le testant sur des cerveaux de souris n'exprimant pas ce récepteur. Toutefois, la détection du récepteur dépend directement de son niveau d'expression. Ce dernier varie de 10 à 100 fmol/mg en fonction des régions (Sayers *et al.*, 2012). De la même façon que pour le récepteur δ , nous avons traité les souris avec un agoniste CB1, l'ACEA, à 3 mg/kg 30 minutes avant la perfusion pour faciliter la détection des somas. Toutefois, à la différence du récepteur δ , nous n'avons pas observé de différence significative dans la distribution des neurones positifs.

Notre étude préliminaire montre que les neurones δ -CB1 sont essentiellement présents dans le mésencéphale et le cerveau postérieur, en particulier le bulbe rachidien. Ils sont également détectés dans les noyaux profonds du cervelet et dans l'hippocampe en accord avec la détection d'hétéromères δ -CB1 (Bushlin *et al.*, 2012). Toutefois, nous n'avons pas observé de neurones δ -CB1 dans le striatum et l'hypothalamus, deux régions dans lesquelles les hétéromères δ -CB1 semblent également présents (Bushlin *et al.*, 2012). Cette différence peut être due à notre approche essentiellement basée sur la visualisation des somas ainsi qu'aux limites décrites ci-dessus. Notre stratégie peut en effet conduire à la non détection des neurones pour lesquels l'expression d'au moins un récepteur serait trop faible et ne permet pas de détecter la co-expression au niveau des terminaisons.

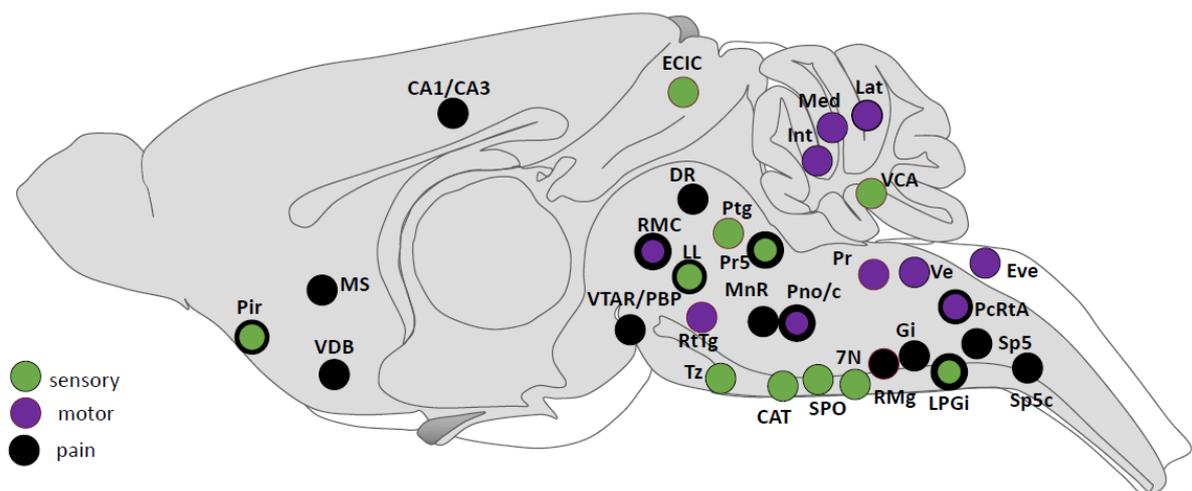


Figure 5 : Les neurones co-exprimant le récepteur opioïde δ et le récepteur cannabinoïde CB1 sont présents dans les circuits associés à la douleur (ronds noirs), sensoriels (ronds verts) et moteurs (ronds mauves).

Les régions de co-expression neuronale δ -CB1 appartiennent en grande partie aux circuits impliqués dans les fonctions sensorimotrices mais aussi dans la détection et le traitement de la douleur (Figure 5). La co-expression δ -CB1 est présente dans les noyaux sensoriels associés au nerf trigéminal et dans plusieurs régions associées à l'audition dont le noyau cochléaire, le corps trapézoïde, le cortex externe du colliculus inférieur, le noyau du tractus acoustique central, le noyau supérieur paraoliveaire, le lemnisque latéral et le noyau réticulaire latéral paragigantocellulaire qui fait partie de la RVM. Cette distribution indique une implication forte dans le traitement de l'information sensorielle. Les neurones δ -CB1 sont également présents dans plusieurs régions motrices au nombre desquelles le noyau du nerf facial, le noyau rouge, le pont, le système vestibulaire et réticulaire, les noyaux profonds dentés

et interposés du cervelet. La présence de neurones δ -CB1 dans le système vestibulaire et le système auditif suggère par ailleurs un rôle dans l'équilibre.

Dans le télencéphale, la co-expression neuronale δ -CB1 a été identifiée dans le circuit septohippocampique au niveau de la bande diagonale de Broca, une afférence majeure de l'hippocampe dorsal, des régions CA3 et CA1 de l'hippocampe et du septum médian, une efférence principale (Swanson & Cowan, 1979).

Plusieurs régions de co-expression δ -CB1 sont impliquées dans la détection et la perception des stimuli douloureux dont la RVM (Jaggi & Singh, 2011), le noyau rouge (Yang *et al.*, 2020), le raphe dorsal (De Gregorio *et al.*, 2019), l'hippocampe dorsal (Wei *et al.*, 2021), le septum médian (Chen *et al.*, 2022), la bande diagonale de Broca (Hosoi *et al.*, 1997), le nerf trigéminal (Takemura *et al.*, 2006). Dans le raphé, les neurones δ -CB1 sont présents dans les noyaux du raphé dorsal et médian ainsi que dans le noyau du raphé magnus. Les deux premiers sont impliqués dans le contrôle de l'humeur mais aussi de l'anxiété et de la dépression (Bruschetta *et al.*, 2020; Borroto-Escuela *et al.*, 2021), deux comorbidités fréquentes de la douleur chronique. Le raphe magnus, tout comme le noyau réticulaire gigantocellulaire et le noyau latéral paragigantocellulaire, font partie quant à eux du bulbe rachidien rostral ventromédian, un relais critique du contrôle descendant des voies de la douleur (Jaggi & Singh, 2011). De façon intéressante, les neurones δ -CB1 sont également présents dans le noyau parabrachial pigmenté de l'aire tegmentale ventrale qui projette sur le noyau accumbens et joue un rôle dans le traitement des stimuli aversifs douloureux chez l'homme (Singh *et al.*, 2022). Par ailleurs, le noyau médian du raphé est une afférence de l'hippocampe dorsal (Abela *et al.*, 2020) suggérant également un rôle, avec le circuit septohippocampique, dans le traitement de la composante cognitive de la douleur.

Une étude récente en IRM fonctionnelle a confirmé chez l'homme l'implication du noyau parabrachial pigmenté de l'aire tegmentale ventrale, du complexe vestibulaire, du noyau réticulaire parvocellulaire, des noyaux du raphé magnus et médian, du noyau pedunculotegmental et du noyau pontin réticulaire (Singh *et al.* 2021).

En condition neuropathique, nous n'avons pas observé de changement majeur dans la distribution des neurones δ -CB1. Les régions identifiées sont les mêmes que celles de la condition contrôle. La co-expression δ -CB1 ne semble donc pas un marqueur du seuil nociceptif à l'exception de la région caudale du noyau trigéminal spinal (Sp5c) seulement identifiée chez les animaux neuropathiques. Le fait que cette structure se démarque seulement

chez les cuff est surprenant si on considère que cette structure est impliquée dans le traitement des informations sensorielles issues de la face.

CHAPITRE IV :

Etude de l'internalisation des récepteurs δ et CB1

I. Introduction

Les récepteurs opioïdes δ et cannabinoïdes CB1 sont tous deux impliqués dans la modulation des stimuli nociceptifs et sensoriels (Nadal *et al.*, 2013; Donvito *et al.*, 2018).

Ces récepteurs peuvent s'associer sous forme d'hétéromère présentant des propriétés fonctionnelles spécifiques et différentes de celles des récepteurs individuels. En condition basale, l'association physique des récepteurs δ et CB1, a été montrée dans la moelle épinière et l'amygdale de souris (Bushlin *et al.*, 2012; Sierra *et al.*, 2019). Concernant les propriétés fonctionnelles de ces hétéromères, une coopérativité positive, c'est-à-dire une modulation positive du récepteur δ au sein de l'hétéromère δ -CB1 a été décrite chez des rongeurs neuropathiques. En effet, un prétraitement avec un agoniste ou un antagoniste du récepteur CB1 augmente la liaison et la signalisation de l'agoniste δ DPDPE. Cet effet est bloqué par des anticorps sélectifs de l'hétéromère δ -CB1 (Bushlin *et al.*, 2012).

Le récepteur δ peut également s'associer au récepteur opioïde μ . Quand ils sont associés sous forme d'hétéromère, on observe alors des propriétés fonctionnelles distinctes : une coopérativité positive, une co-internalisation des récepteurs ainsi qu'une signalisation ERK1/2 soutenue dans le temps. Une coopérativité positive, ou plus précisément la modulation positive de l'activité d'un récepteur suite à l'activation de l'autre récepteur, a été observé chez d'autres couples de récepteurs, c'est le cas des hétéromères δ -CB1, μ 1D-**BB₂** (récepteur de la bombésine de type 2), μ -NMDA, μ -**GAL1** (récepteur de la galanine de type 1) et μ -**CCR5** (récepteur à C-C chimiokines de type 5 ; pour revue voir Gaborit & Massotte, 2023). La co-internalisation est une propriété qui a été montrée uniquement dans le cas des hétéromères μ - δ . Habituellement recyclé à la membrane plasmique (Tanowitz & von Zastrow, 2003), le récepteur μ est co-dégradé avec le récepteur δ dans les lysosomes à la suite de l'activation de l'hétéromère μ - δ (Derouiche *et al.*, 2020). Comme le récepteur μ , le récepteur CB1 est recyclé à la membrane

plasmique des neurones (Wu *et al.*, 2008). Cependant, l'influence de l'hétéromérisation avec le récepteur δ sur le trafic intracellulaire du récepteur CB1 n'a pas été examinée.

Le CBD est décrit comme un modulateur allostérique négatif des récepteurs CB1 à des concentrations comprises entre 0.5 et 1 μ M (Laprairie *et al.*, 2015). Il agirait également comme un modulateur allostérique des récepteurs δ à des concentrations comprises entre 10 et 100 μ M (Kathmann *et al.*, 2006; Foss *et al.*, 2021).

Nous proposons d'étudier, en culture primaire d'hippocampe, une potentielle hétéromérisation des récepteurs δ et CB1 à travers l'observation du trafic intracellulaire des récepteurs en réponse à divers agonistes et antagonistes δ et CB1. Par ailleurs, nous étudierons l'impact du CBD sur la modulation du trafic intracellulaire des récepteur δ et CB1.

II. Matériel et Méthodes

1. Animaux

Les cultures cellulaires sont effectuées à partir de souriceaux âgés de 1 à 3 jours. Nous avons utilisé des souris knock-in DOR-eGFP (Scherrer 2006) de fond génétique hybride C57Bl/6J : 129svPas (50 :50). Ces souris présentent un récepteur opioïde δ en fusion avec la protéine fluorescente verte eGFP. Cette construction nous permet de pallier l'absence d'anticorps spécifiques du récepteur opioïde δ .

2. Culture cellulaire

A. Préparation des plaques de cultures

Des lamelles en verre de 12 mm de diamètre sont réparties dans des plaques 24 puits dans lesquels sont ajoutés 500 μ l de solution de poly-L-Lysine (tampon borate pH 8.4, 50 M, Poly-L-lysine 30 μ g/ml). Les plaques sont ensuite incubées de 2 à 16 heures à 37°C puis stockée à 4°C. Avant utilisation, les plaques sont rincées 3 fois avec de l'H₂O, puis avec du milieu Neurobasal A ou du DMEM.

B. Dissection

Les souriceaux sont décapités, le cerveau est récupéré et aussitôt placé dans une boîte de pétri contenant 2 ml d'Hibernate à 4°C. Les deux hippocampes sont isolés, déposés dans 0.5 ml d'Hibernate et maintenus sur glace. La dissection de 2 souriceaux permet d'ensemencer une plaque de culture de 24 puits.

C. Digestion

Les hippocampes sont incubés au bain-Marie à 37°C dans une solution composée d'Hibernate et de papaïne (15-20 U/ml final) pour un volume final de 1 ml. Au bout de 20 minutes, la Désoxyribonucléase I (1 mg/ml final) est ajoutée dans chaque tube. Au bout de 30 minutes d'incubation, le milieu de chaque tube est renouvelé avec 1 ml d'Hibernate. Les tissus sont alors dissociés mécaniquement avec une pipette Pasteur en verre filtrée et stérile ayant été au préalable flammée à son extrémité. Les tubes sont alors centrifugés 5 minutes à 1000 g. Le surnageant est enlevé et les cellules remises en suspension dans 1 ml de milieu d'ensemencement (DMEM 4.5 g/l glucose, 10% sérum de veau foetal inactivé par la chaleur, L-Glutamine 2 mM, Pénicilline 100 U/ml, Streptomycine 100 μ g/ml)

D. Ensemencement

Les homogénats sont regroupés et filtrés sur un tamis cellulaire (porosité 70 μm) afin d'éliminer les amas cellulaires. La concentration et la viabilité des cellules sont déterminées en présence de bleu de Trypan 0.06% à l'aide d'une cellule de Fuchs-Rosenthal. Les cellules sont ensuite réparties dans les plaques 24 puits préalablement recouvertes de poly-L-Lysine de sorte que chaque puits contienne entre 100000 et 200000 cellules. Les plaques sont incubées pendant 1h à 37°C et 5% CO₂ puis rincées avec du milieu Neurobasal A à température ambiante. Le milieu de rinçage est alors remplacé par du milieu Neurobasal complet (Neurobasal A, B27 20 $\mu\text{l/ml}$, L-Glutamine 0.5 mM, Glutamax 2 mM, Pénicilline 100 U/ml, Streptomycine 100 $\mu\text{g/ml}$). Les cultures sont incubées pendant 12 à 17 jours à 37°C, 5% CO₂ et la moitié du milieu est remplacé par du milieu frais tous les 4-5 jours.

3. Cinétiques d'internalisation

Pour chaque ligand ou combinaison de ligands, une cinétique sur 6 temps a été réalisée, un temps 0 minutes qui correspond à l'état basal de la culture sans application de ligands, ainsi que des temps d'incubation de 5, 15, 30, 60 et 120 minutes. L'antagoniste est ajouté dans les puits 15 à 30 minutes avant le dépôt du premier ligand.

Ligand	activité	concentrations utilisées
Delt II	agoniste δ	1, 10, 100 nM
Met-enk	agoniste non selectif des récepteurs opioïdes	100 nM
SNC80	agoniste δ	10, 100 nM
ACEA	agoniste CB1	10 pM 1, 10, 100 nM 1, 10 μM
CBD	modulateur allostérique δ et CB1	1 pM 1, 100, 400 nM 1, 2, 10 μM
NTI	antagoniste δ	100, 200 nM

Tableau 1: tableau récapitulatif des ligands et doses utilisés

En tout, plus de 50 combinaisons différentes ont été testées. Les résultats des observations de chacune de ces conditions sont détaillés dans les informations supplémentaires (tableau supplémentaire 1).

Au terme des 120 minutes, les plaques sont rincées 3 fois avec du PBS à 4°C, avant l'ajout de 500 μl de PFA 4% dilué dans du PBS froid dans chaque puits. Au bout de 15 à 20 minutes, on effectue 3 nouveaux rinçages au PBS froid. Les plaques sont alors stockées à 4°C.

4. Immunocytochimie

Les plaques sont incubées 1h avec une solution de blocage contenant du PBST (PBS 1x + Tween 20 0.2%) et du sérum normal de chèvre (NGS 3%). Elles sont ensuite incubées à 4°C sous agitation pendant la nuit avec une solution de blocage contenant les anticorps primaires : anticorps de lapin anti-CB1 (1/10000), anticorps de poulet anti-GFP (1/1000). Les plaques sont rincées 3 fois 10 minutes avec du PBST puis incubées dans le noir 2h à température ambiante avec le PBST contenant les anticorps secondaires : anticorps de chèvre anti-lapin couplé à l’Alexa Fluor 594 (1/2000), anticorps de chèvre anti-poulet couplé à l’Alexa Fluor 488 (1/2000). Les plaques sont à nouveau rincées 3 fois 10 minutes comme précédemment, avec ajout de DAPI (0.5 µg/ml) lors du premier rinçage. Les lamelles sont sorties de leurs puits et rincées à l’eau. Une fois sèches, elles sont montées sur lames avec un milieu ProLong avant d’être stockées à -20°C.

5. Acquisition d’images

La majorité des images est acquise avec un microscope à épifluorescence (Leica DM R) équipé d’un objectif 63X à immersion à huile. Quelques images sont acquises par microscopie confocale (Leica SP5) équipé d’un objectif 63X à immersion à huile (Ouverture numérique 1.4). Une analyse qualitative a été réalisée par un expérimentateur ne connaissant pas les conditions expérimentales.

III. Résultats

1. Distribution subcellulaire des récepteurs δ à l'état basal

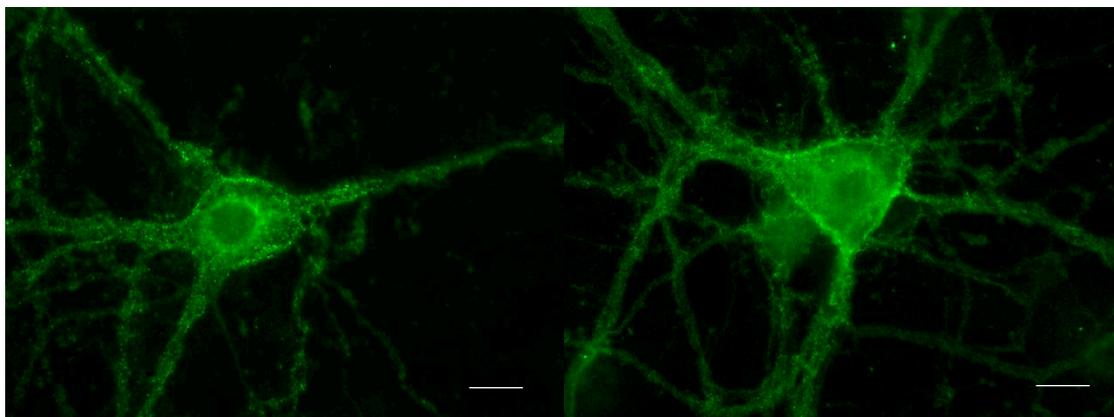


Figure 1 : Images représentatives de la distribution subcellulaire du récepteur opioïde δ à l'état basal. Réalisées au microscope à épifluorescence, échelle 10 μm .

Conformément à des résultats antérieurs utilisant les souris knock-in fluorescentes δ -eGFP, le récepteur opioïde δ est détecté à la membrane plasmique des neurones à l'état basal (Figure 1), (Pradhan *et al.*, 2009; Derouiche *et al.*, 2020).

2. Distribution subcellulaire des récepteurs CB1 à l'état basal

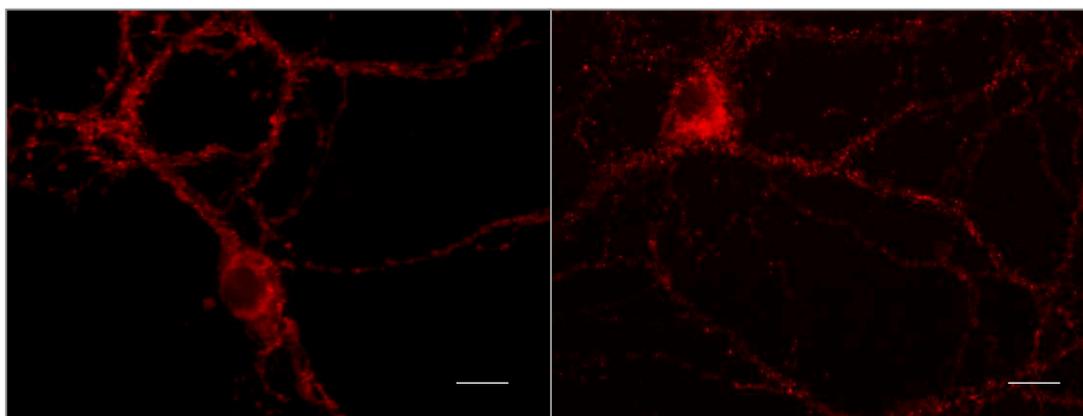


Figure 2 : Images représentatives de la distribution subcellulaire des récepteurs CB1 à l'état basal. Réalisées au microscope à épifluorescence, échelle 10 μm .

À l'état basal, la distribution des récepteurs CB1 est variable. Certains neurones sont caractérisés par une distribution membranaire du récepteur sous forme d'un marquage en partie continu (Figure 2A). Dans ces neurones, le récepteur ne semble pas internalisé. D'autres neurones sont plutôt caractérisés par une localisation intracellulaire sous forme d'un marquage punctiforme (Figure 2B). Dans ces neurones, le récepteur semble déjà internalisé. Les deux

images en figure 2 représentent deux distributions radicalement opposées des récepteurs CB1 et de nombreuses distributions intermédiaires existent. Cette distribution hétérogène des récepteurs CB1 semble refléter l'activité constitutive du récepteur CB1 qui se traduit par le fait que le récepteur CB1 est en permanence engagé dans un cycle d'endocytose et de recyclage à la membrane plasmique (Leterrier *et al.*, 2004).

3. Modification de la distribution des récepteurs δ par les ligands

Nos résultats suggèrent que le récepteur δ est internalisé par la Deltorphine II entre 1 et 100 nM, par la Met-enképhaline à 100 nM et par le SNC80 à 100 nM. En revanche le SNC80 10 nM ne semble pas internaliser le récepteur δ . Cette internalisation prend place selon une cinétique bien précise. A l'état basal, le récepteur δ est localisé à la membrane plasmique. 5 minutes après l'ajout d'agoniste (Figure 3, Figures supplémentaires 1 et 2), on observe la formation de structures punctiformes suggérant l'internalisation du récepteur δ dans des vésicules. Ces structures punctiformes sont également présentes à 15, 30, 60 et 120 minutes après application du ligand avec une localisation principalement périnucléaire aux temps 60 et 120 minutes. L'internalisation du récepteur δ par la Deltorphine et la Met-enképhaline est bloquée par un prétraitement avec l'antagoniste δ Naltrindole à 100 et 200 nM. En revanche, les résultats sont moins prononcés pour le SNC80 (Figure supplémentaire 3, Tableau supplémentaire 1). L'agoniste CB1 ACEA ne modifie pas la localisation subcellulaire du récepteur δ entre 10 pM et 10 μ M.

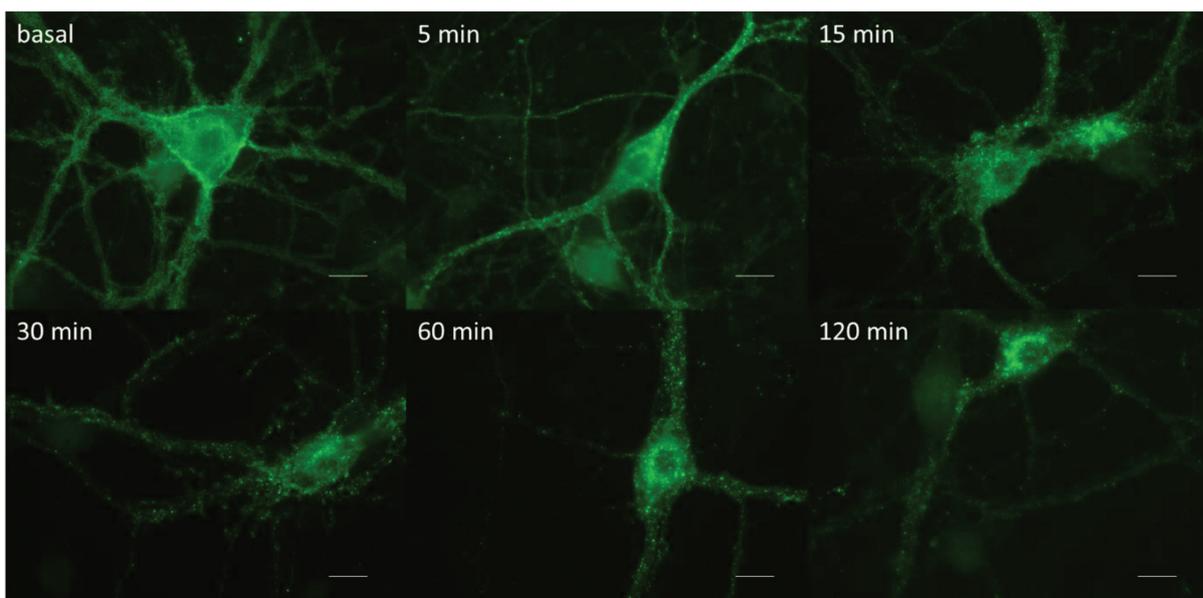


Figure 3 : Cinétique d'internalisation du récepteur opioïde δ par l'agoniste Deltorphine II (10 nM). Images représentatives réalisées au microscope à épifluorescence, échelle 10 μ m.

4. Modification de la distribution des récepteurs CB1 par les ligands

Compte tenu de la grande diversité de la distribution des récepteurs à l'état basal, il est à première vue difficile d'émettre une interprétation sur l'internalisation du récepteur CB1. L'observation des lames au microscope, par un expérimentateur ne connaissant pas les conditions expérimentales, semble tout de même indiquer que l'ACEA à 10 μ M et 100 nM induirait une internalisation accrue du récepteur CB1 (tableau supplémentaire 1). Les résultats à 10 nM et 1 nM sont ambigus car ils varient en fonction des cultures observées. A ces concentrations, l'agoniste pourrait tout de même avoir un effet subtil difficile à discerner à cause de l'internalisation constitutive du récepteur. L'ACEA à 10 pM ne semble pas modifier la localisation intracellulaire du récepteur CB1.

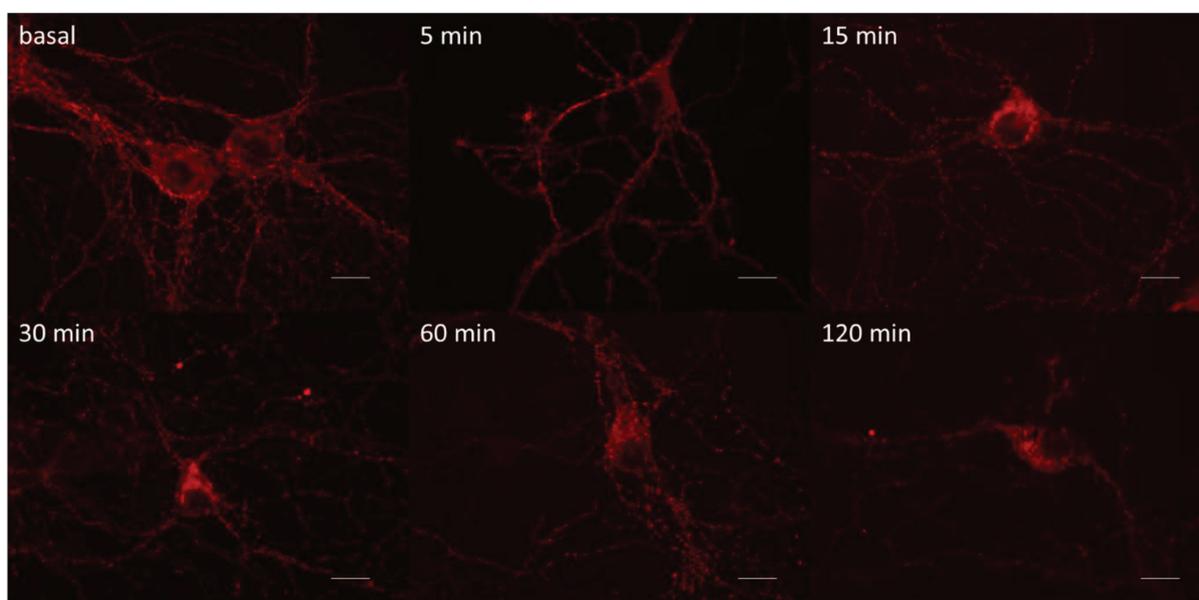


Figure 4 : Cinétique d'internalisation du récepteur CB1 par l'agoniste ACEA (100 nM). Images représentatives réalisées au microscope à épifluorescence, échelle 10 μ m.

Nous avons également remarqué que la Met-enképhaline à 100 nM semblait internaliser le récepteur CB1 et que cette internalisation était bloquée par l'ajout de Naltrindole. En revanche la Deltorphine II (1, 10 et 100 nM) ne modifie pas la distribution intracellulaire du récepteur CB1. Pour le SNC 80, les observations ont été différentes en fonction des cultures et ne nous permettent pas de conclure.

Etant donné l'internalisation des récepteurs δ et CB1 par la Met-enképhaline, nous avons étudié si dans les neurones co-exprimant les deux récepteurs, ceux-ci étaient co-internalisés dans les mêmes vésicules. Nous avons observé, dans des neurones exprimant à la fois les récepteurs

δ et CB1, que l'application de Met-enképhaline pendant 120 minutes semble entraîner l'internalisation des récepteurs δ et CB1 dans des vésicules distinctes (Figure 5 et 6).

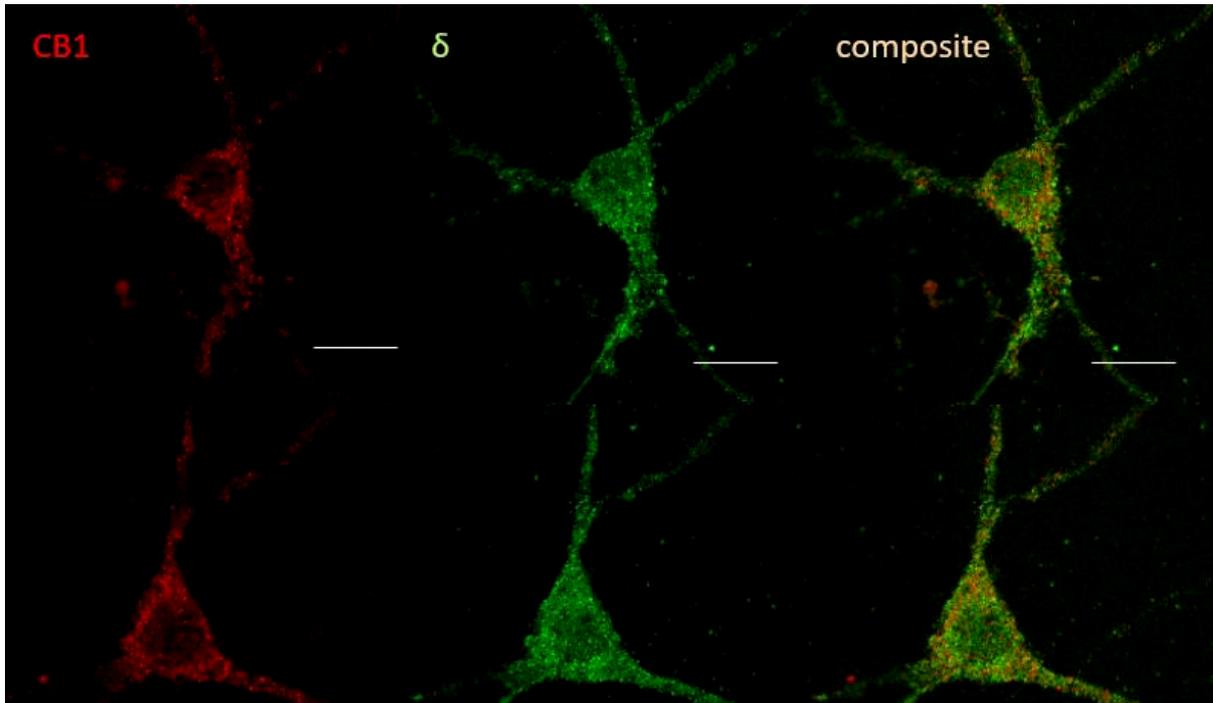


Figure 5 : Distribution subcellulaire des récepteurs CB1 (rouge) et δ (vert) 120 minutes après l'administration de 100 nM de Met-enképhaline dans les neurones co-exprimant les deux récepteurs. Une image composite montre la faible colocalisation (orange) des signaux. Images réalisées par microscopie confocale, échelle 10 μ m.

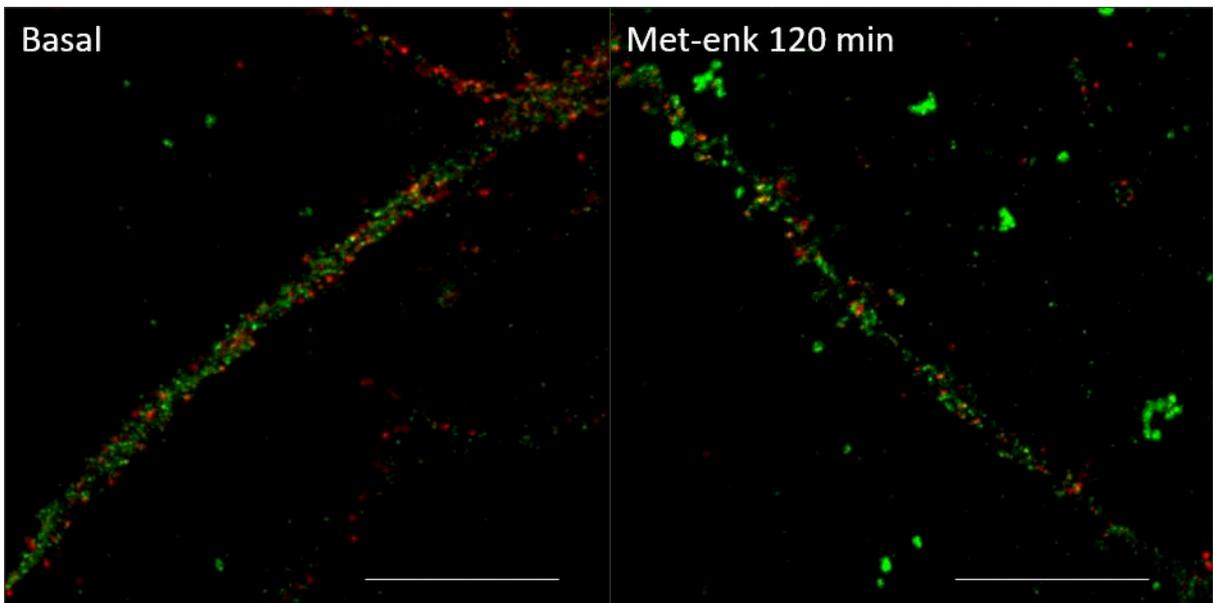


Figure 6 : Distribution des récepteurs CB1 (rouge) et δ (vert) dans les neurites de neurones co-exprimant les deux récepteurs, à l'état basal (panneau gauche) et 120 minutes après application de 100 nM Met enképhaline 100 nM (panneau droit). Images réalisées par microscopie confocale, échelle 10 μ m

5. Effet du CBD sur le trafic intracellulaire des récepteurs δ et CB1

Nos observations suggèrent que le CBD entre 1 nM et 1 μ M n'internalise ni les récepteurs δ ni les récepteurs CB1. La co-application d'ACEA à 10 μ M ou 100 nM et de CBD à 2 μ M, induit l'internalisation du récepteur CB1, suggérant que le CBD ne modifie pas l'internalisation du récepteur CB1 induite par de fortes doses d'ACEA. Quand le CBD est co-appliqué avec de l'ACEA à 1 nM, aucune internalisation du récepteur CB1 n'est observée. A cette dose, rappelons que l'ACEA seul induit l'internalisation du récepteur CB1 dans 2 cultures sur 4. Il est possible que le CBD module négativement l'internalisation du récepteur CB1 par des doses plus faibles d'ACEA. Par ailleurs, le CBD à 2 μ M ou 1 nM ne modifie pas l'internalisation du récepteur δ induite par la Deltorphine II, la Met-enképhaline ou le SNC80.

IV. Discussion

L'analyse qualitative de l'internalisation des récepteurs δ et CB1 confirme que les récepteurs δ sont internalisés par les agonistes Deltorphine II, Met Enképhaline et SNC80. Cette internalisation est bloquée par l'utilisation de l'antagoniste Naltrindole. Nos résultats confirment également une internalisation constitutive forte du récepteur CB1 à l'état basal, et une internalisation accrue de celui-ci à la suite de l'application de l'agoniste ACEA. Par ailleurs, nos résultats semblent indiquer que la met-enképhaline entraîne l'internalisation à la fois des récepteurs δ et CB1. L'internalisation des deux récepteurs est bloquée par le Naltrindole suggérant une internalisation du récepteur CB1 dépendante du récepteur δ . Cependant, les récepteurs ne semblent pas co-internalisés dans les mêmes vésicules, il est donc peu probable que cette internalisation implique les hétéromères δ -CB1. Par ailleurs, aucun impact du CBD sur l'internalisation des récepteurs δ n'a été observé. Il pourrait en revanche inhiber l'internalisation des récepteurs CB1 par de faibles doses d'ACEA.

Les récepteurs CB1 (Pettit *et al.*, 1998; Tsou *et al.*, 1998) et les récepteurs opioïdes δ (Erbs *et al.*, 2012) sont présents dans toutes les couches de l'hippocampe (oriens, pyramidale, radiatum, lacunosum-moleculare). Dans nos cultures primaires d'hippocampe peu de neurones co-exprimaient les deux récepteurs δ et CB1. Ces résultats sont en accord avec les données observées dans le chapitre 3, c'est-à-dire que dans l'hippocampe, peu de neurones co-expriment les récepteurs δ et CB1. Par ailleurs, à l'état basal, l'association physique des récepteurs δ et CB1 a été montré uniquement dans la moelle épinière (Sierra *et al.*, 2019). Ainsi, les cultures d'hippocampes ne sont pas optimales pour l'étude des récepteurs δ et CB1 et d'autres options pourraient être envisagées telles que des cultures primaires de moelle épinière (Eldeiry *et al.*, 2017).

Notre étude se base sur l'observation de la localisation subcellulaire des récepteurs δ et CB1. Pour cela nous estimons si les récepteurs sont situés à la membrane ou sont internalisés dans des vésicules en se basant sur l'apparence du signal (continu, punctiforme) et sa localisation par rapport au noyau (proche, éloigné). Des marqueurs des compartiments cellulaires nous permettraient de confirmer et d'affiner ces résultats, notamment par l'utilisation de marqueurs membranaires fluorescents tels que les colorants carbocyaniques lipophiles (Biotium, CellBrite® Red 30023). Nous pourrions également utiliser des anticorps dirigés contre des marqueurs d'endocytose tels que les protéines EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*) (Mu *et al.*, 1995) ou Rab 5 (Stenmark *et al.*, 1995) spécifiques des endosomes

précoces, les protéines Rab11 (Stenmark & Olkkonen, 2001) spécifiques des endosomes de recyclage, ou encore la protéine LAMP1 spécifique des lysosomes. La colocalisation des récepteurs avec ces différents marqueurs nous permettrait de confirmer leur localisation membranaire ou leur engagement dans un cycle d'internalisation.

Dans notre étude, la nature de la cellule (neurone, astrocyte, microglie) est déduite à partir de la morphologie de la cellule. Dans l'hippocampe de souris knock-in δ -eGFP, le récepteur δ est uniquement localisé dans les neurones, principalement de type GABAergiques (Erbs *et al.*, 2012). Des études antérieures menées dans le laboratoire suggèrent que cette distribution est similaire dans les cultures primaires d'hippocampe. La mise en place d'un autre type de culture cellulaire, comme les cultures de moelle épinière, nécessiterait en revanche la caractérisation des cellules qui expriment les récepteurs. Cela pourra être effectué grâce à des marqueurs des différents types cellulaires comme Map2 ou NeuN pour les neurones, Iba1 pour les microglies, la GFAP pour les astrocytes et olig2 pour les oligodendrocytes.

L'étude de l'internalisation des récepteurs réalisée ici se base sur une analyse qualitative réalisée en aveugle par l'expérimentateur. Une étude quantitative pourrait être envisagée telle qu'elle a été décrite dans le cas des hétéromères μ - δ (Derouiche *et al.*, 2018). Dans cette étude, les images sont analysées avec le logiciel ICY (de Chaumont *et al.*, 2012), (<http://icy.bioimageanalysis.org/>). Brièvement, cette méthode consiste en un détourage manuel des neurones afin de déterminer les régions d'intérêt (ROI) correspondant au cytoplasme et à la périphérie cellulaire, puis le logiciel détecte automatiquement les spots fluorescents présents dans ces ROIs et évalue le degré de colocalisation entre les marqueurs (Derouiche *et al.*, 2018). L'utilisation de cette méthode nécessite que les images soient réalisées par microscopie confocale. Par ailleurs, l'utilisation d'un marqueur membranaire tel que proposé précédemment permettrait un détourage précis des neurones même quand les récepteurs sont internalisés voire l'automatisation du détourage des neurones.

Nos résultats suggèrent que la Met-enképhaline internalise à la fois les récepteurs δ et CB1. Toutefois, cette internalisation est bloquée par l'utilisation d'un antagoniste du récepteur δ suggérant un mécanisme d'internalisation du récepteur CB1 dépendant du récepteur δ . Par ailleurs, dans les cellules exprimant les deux récepteurs, les récepteurs δ et CB1 ne semblent pas internalisés dans les mêmes vésicules suggérant un mécanisme indépendant des hétéromères. Des études ont montré que l'administration d'enképhaline excite le réseau hippocampique via un mécanisme d'inhibition des interneurons inhibiteurs (Zieglgänsberger

et al., 1979). D'un autre côté, La dépolarisation d'un neurone peut induire la libération d'endocannabinoïdes en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire, participant au mécanisme de signalisation rétrograde des endocannabinoïdes bien décrits dans l'hippocampe (Castillo *et al.*, 2012). Ainsi, il est envisageable que l'application de met-enképhaline, en activant le récepteur δ , participe à la levée d'inhibition sur des neurones excitateurs qui en excitant les neurones suivants vont mener à la libération d'endocannabinoïdes induisant à leur tour l'internalisation des récepteurs CB1. En revanche cela n'expliquerait pas le fait que la deltorphine II et le SNC80 n'induisent pas l'internalisation du récepteur CB1. Une explication pourrait être que ce mécanisme impliquerait non seulement le récepteur δ , mais aussi les récepteurs opioïdes μ et/ou κ tous deux activés par la met-enképhaline à des concentrations similaires au récepteur δ .

V. Informations supplémentaires

Tableau supplémentaire 1 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus en fonction des ligands et combinaisons de ligands utilisés pour les expériences de co-internalisation des récepteurs δ et CB1

# culture	Ligand 1	Antagoniste	n=	internalisation		# culture	Ligand 1	Ligand 2	Antagoniste	n=	internalisation	
				δ	CB1						δ	CB1
38-1-1A	ACEA10 μ M		2	-	+	29-1B		CBD 1 μ M		1	-	-
38-2-1A	ACEA10 μ M		2	-	+	29-1A		CBD 10 μ M		1	-	-
28-3A	ACEA 100nM		1	-	-	29-1C		CBD 100nM		1	-	-
38-1-1B	ACEA 100nM		2	-	+	28-2D		CBD 1nM		1	-	-
38-2-1B	ACEA 100nM		2	-	+	29-1D		CBD 1nM		1	-	-
39-3C	ACEA 10nM		2	-	+	38-1-2A	ACEA10 μ M	CBD 2 μ M		2	-	+
28-3B	ACEA 10nM		2	-	-	38-2-2A	ACEA10 μ M	CBD 2 μ M		2	-	+
38-1-1C	ACEA 1nM		4	-	+	38-1-2B	ACEA100nM	CBD 2 μ M		2	-	+
38-2-1C	ACEA 1nM		4	-	+	38-2-2B	ACEA100nM	CBD 2 μ M		2	-	+
39-3D	ACEA 1nM		4	-	?	28-3D	ACEA 10nM	CBD 1nM		1	-	-
28-3C	ACEA 1nM		4	-	-	38-1-2C	ACEA 1nM	CBD 2 μ M		2	-	-
38-1-1D	ACEA 10pM		2	-	-	38-2-2C	ACEA 1nM	CBD 2 μ M		2	-	-
38-2-1D	ACEA 10pM		2	-	-	38-1-2D	ACEA 10pM	CBD 2 μ M		2	-	+
						38-2-2D	ACEA 10pM	CBD 2 μ M		2	-	-
33-1	Delt II 100nM		2	+	-	28-1C	Delt II 100nM	CBD 1nM		1	+	-
28-1A	Delt II 100nM		2	+	-	34-2B	Delt II 10nM	CBD 2 μ M		1	+	?
39-3A	Delt II 10nM		3	+	-	28-1D	Delt II 10nM	CBD 1nM		1	+	-
34-2A	Delt II 10nM		3	+	-	33-3	Delt II 100nM	CBD 1nM	NTI 200nM	1	-	-
28-1B	Delt II 10nM		3	+	-	33-4	Delt II 100nM	CBD 2 μ M	NTI 200nM	1	-	-
39-3B	Delt II 1nM		1	+	-	28-2C	Delt II 10nM	CBD 1nM	NTI 100nM	1	-	-
28-2A	Delt II 100nM	NTI 100nM	1	-	-	34-2A	Delt II 10nM	CBD 2 μ M	NTI 200nM	1	-	-
33-2	Delt II 100nM	NTI 200nM	1	-	-	39-4A	Delt II 10nM	ACEA 1nM		1	+	+ et -
28-2B	Delt II 10nM	NTI 100nM	1	-	-	39-4B	Delt II 1nM	ACEA 10nM		1	+	+
34-2B	Delt II 10nM	NTI 200nM	1	-	-	39-4C	Delt II 10nM	ACEA 1nM	NTI 200nM	1	-	+
						39-4D	Delt II 1nM	ACEA 10nM	NTI 200nM	1	?	+
39-1A	Met-Enk 100nM		3	+	+	29-2A	Met-Enk 100nM	CBD 1nM		1	+	?
33-9	Met-Enk 100nM		3	+	+	39-1B	Met-Enk 100nM	CBD 2 μ M		1	+	?
29-2B	Met-Enk 100nM		3	+	?	29-3B	Met-Enk 100nM	CBD 1nM	NTI 100nM	1	+	-
29-3A	Met-Enk 100nM	NTI 100nM	1	-	-	33-11	Met-Enk 100nM	CBD 1nM	NTI 200nM	1	-	-
39-1C	Met-Enk 100nM	NTI 200nM	2	-	-	39-1D	Met-Enk 100nM	CBD 2 μ M	NTI 200nM	2	+	-
33-10	Met-Enk 100nM	NTI 200nM	2	+	-	33-12	Met-Enk 100nM	CBD 2 μ M	NTI 200nM	2	-	-
39-2A	SNC80 100nM		3	+	+ et -	29-2D	SNC80 100nM	CBD 1nM		1	+	?
33-5	SNC80 100nM		3	+	?	39-2B	SNC80 100nM	CBD 2 μ M		1	+	?
29-2C	SNC80 100nM		3	+	?	29-4C	SNC80 10nM	CBD 1nM		1	-	-
29-4A	SNC80 10nM		1	-	-	29-3D	SNC80 100nM	CBD 1nM	NTI 100nM	1	+	-
29-3C	SNC80 100nM	NTI 100nM	1	-	-	33-7	SNC80 100nM	CBD 1nM	NTI 200nM	1	+	?
39-2C	SNC80 100nM	NTI 200nM	2	+	?	39-2D	SNC80 100nM	CBD 2 μ M	NTI 200nM	2	-	-
33-6	SNC80 100nM	NTI 200nM	2	?	?	33-8	SNC80 100nM	CBD 2 μ M	NTI 200nM	2	-	-
29-4B	SNC80 10nM	NTI 100nM	1	-	-	29-4D	SNC80 10nM	CBD 1nM	NTI 100nM	1	-	-

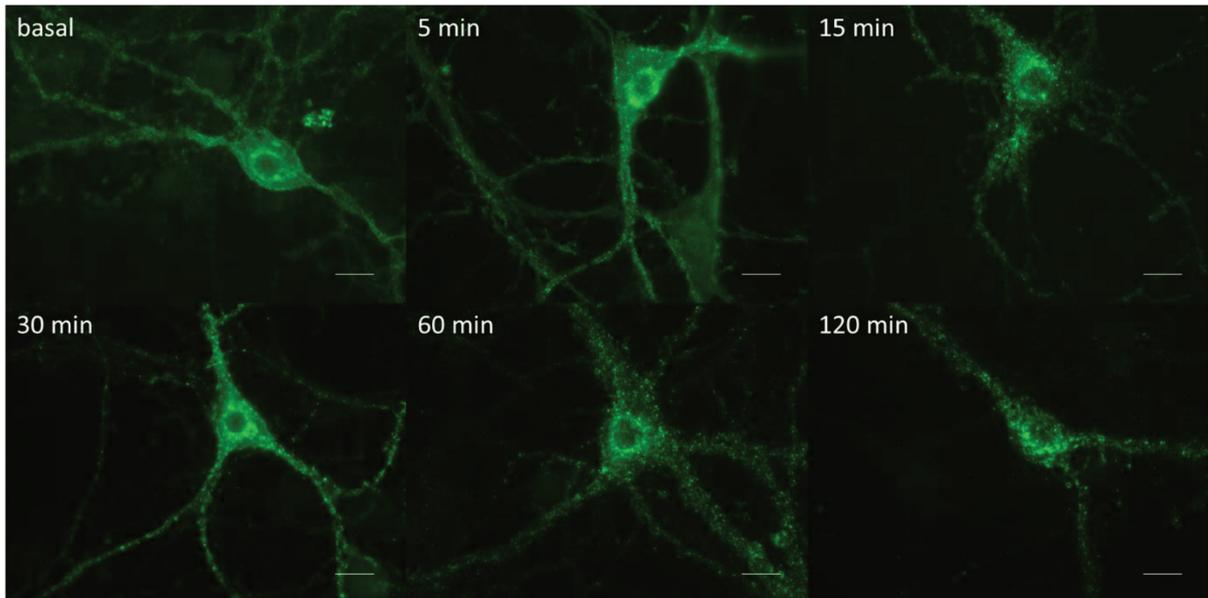


Figure supplémentaire 1 : Cinétique d'internalisation du récepteur opioïde δ par l'agoniste SNC80 (100nM). Images représentatives réalisées au microscope à épifluorescence, échelle 10 μ m

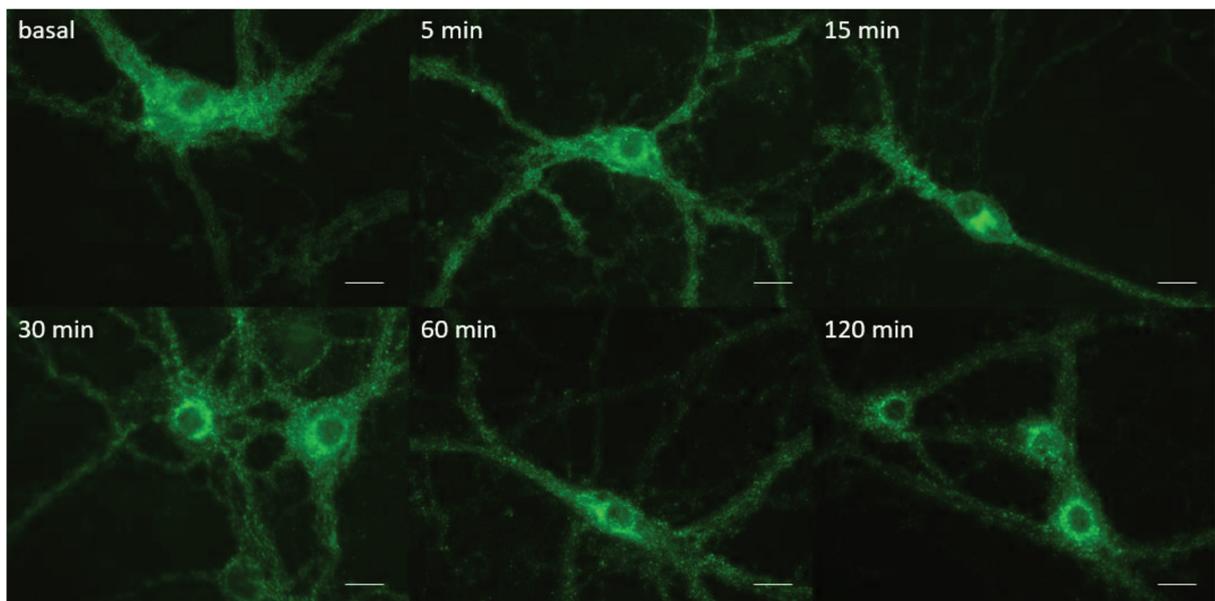


Figure supplémentaire 2 : Cinétique d'internalisation du récepteur opioïde δ par l'agoniste Met-enképhaline (100nM). Images représentatives réalisées au microscope à épifluorescence, échelle 10 μ m

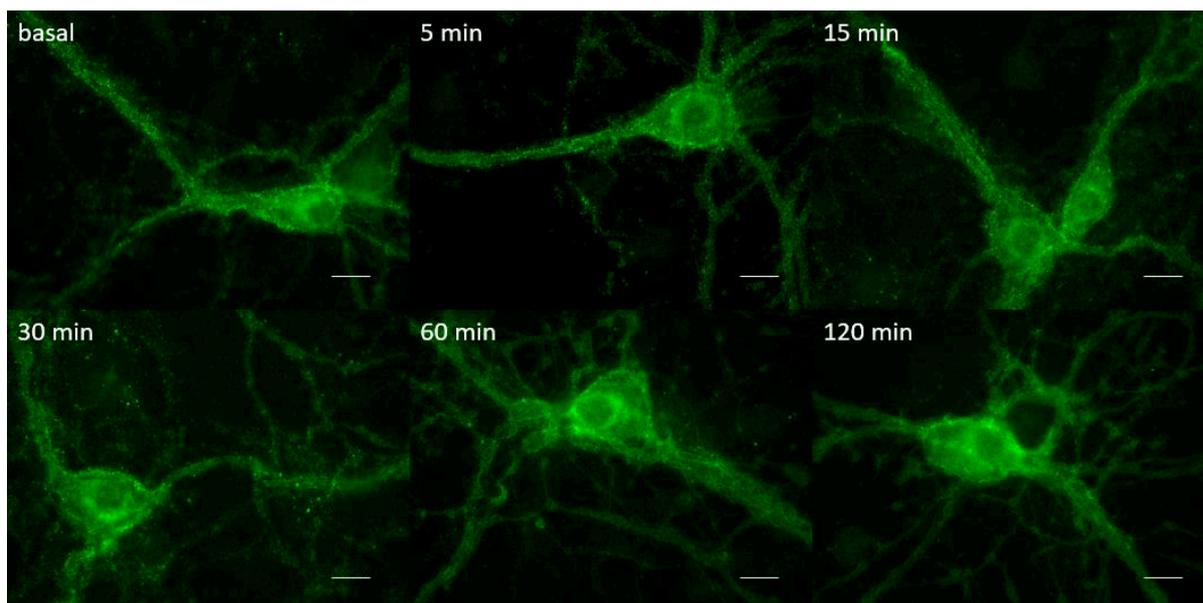


Figure supplémentaire 3 : Distribution intracellulaire des récepteurs δ suite à l'application de Met Enképhaline 100nM dans des cultures prétraitées avec du Naltrindole 200nM. Images représentatives réalisées au microscope à épifluorescence, échelle 10 μ m.

CONCLUSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

La douleur neuropathique est souvent accompagnée de troubles émotionnels tels que l'anxiété et la dépression. L'implication du récepteur opioïde δ dans la douleur neuropathique a été montrée à de nombreuses reprises (Berthiaume *et al.*, 2020). Par ailleurs, ce récepteur module également l'humeur de sorte que son activation soulage l'anxiété et la dépression. Le récepteur δ peut s'associer avec le récepteur cannabinoïde CB1, lui aussi impliqué dans la modulation de la nociception. L'expression des hétéromères δ -CB1 est accrue en condition de douleur neuropathique et leurs propriétés fonctionnelles ont été mises en évidence chez des rongeurs neuropathiques. Le cannabidiol (CBD) possède des propriétés analgésiques, anxiolytiques et antidépressives. Parmi ses cibles, on trouve les récepteurs CB1 et les récepteurs opioïdes δ sur lesquels il exerce une activité de modulateur allostérique.

Dans ce contexte, l'objectif général de ma thèse a été d'évaluer le potentiel thérapeutique du CBD dans la douleur neuropathique et d'examiner l'implication potentielle du récepteur opioïde δ et plus particulièrement des hétéromères δ -CB1 dans cet effet. Ce projet a été subdivisé en quatre parties distinctes correspondant chacune à un chapitre de la thèse.

Nous avons tout d'abord évalué les modifications comportementales induites par la douleur neuropathique dans le modèle du cuff en nous intéressant plus particulièrement à la sensibilité mécanique et aux troubles émotionnels. Le rôle du récepteur δ dans ces modifications comportementales a été étudié grâce à l'utilisation de souris ne l'exprimant pas. Enfin, nous avons examiné les variations de médiateurs de l'inflammation quatre semaines après la chirurgie, dans le sérum, le tronc cérébral et l'hippocampe. Nous avons ensuite évalué l'effet thérapeutique du CBD dans le modèle du cuff. Nous avons étudié l'effet d'une injection aiguë de CBD sur la sensibilité mécanique (décours temporel, courbe dose-réponse) ainsi que l'effet de l'administration répétée de CBD (1 μ g/kg et 10 mg/kg) sur la sensibilité mécanique et les troubles émotionnels. Ces administrations répétées ont été effectuées chez des animaux mâles et femelles, exprimant ou non le récepteur opioïde δ .

Afin d'identifier les régions au sein desquelles les récepteurs δ et CB1 peuvent s'associer en hétéromères, nous avons effectué une cartographie complète des régions de colocalisation neuronale des récepteurs δ et CB1 dans le cerveau. Cette approche a été réalisée en condition contrôle et neuropathique (cuff et SNI) et nous a renseignés sur l'impact de la condition neuropathique sur la distribution des deux récepteurs dans les circuits associés à la

douleur. Enfin, nous avons examiné *ex-vivo*, en culture primaire d'hippocampe, l'hétéromérisation des récepteurs δ et CB1. Pour cela, nous avons étudié la co-internalisation des récepteurs δ et CB1 en tant qu'indicateur de l'hétéromérisation telle que décrite dans le cas des hétéromères μ - δ (Derouiche 2020). Nous avons ainsi examiné l'impact de la co-application de CBD et de ligands sélectifs des récepteurs δ ou CB1 sur cette co-internalisation.

Nos résultats montrent que la chirurgie cuff induit une hypersensibilité mécanique chez les souris des deux sexes et que celle-ci s'accompagne d'une diminution du bien-être chez les mâles uniquement. Nous avons également mis en évidence que la chirurgie cuff induit une hypersensibilité mécanique chez les souris mâles et femelles δ KO sans pour autant modifier l'état émotionnel des animaux. Enfin, des résultats préliminaires suggèrent que des altérations des taux de marqueurs inflammatoires en condition neuropathique perdurent jusqu'à 4 semaines. Nos résultats ne nous ont pas permis de conclure à un potentiel effet anti-allodynique du CBD dans la douleur neuropathique, ni à un potentiel effet anxiolytique ou antidépresseur chez les souris sauvages. Chez les souris δ *knock-out* en revanche, le CBD ne soulage pas l'hypersensibilité mécanique, mais pourrait améliorer les symptômes émotionnels.

Nos résultats préliminaires montrent que les récepteurs δ et CB1 sont en grande partie co-exprimés par les neurones distribués dans des régions impliquées dans les fonctions sensorimotrices mais aussi dans la détection et le traitement de la douleur. Aucun changement majeur n'a été observé dans la distribution des neurones δ -CB1 en condition neuropathique. Enfin, l'étude *ex-vivo* de l'hétéromérisation des récepteurs δ et CB1 en culture primaire d'hippocampe semble indiquer qu'il existe des interactions fonctionnelles entre les récepteurs δ et CB1 mais nos résultats ne soutiennent pas l'implication des hétéromères dans cette interaction.

PERSPECTIVES

Chapitre I : Hypersensibilité mécanique et symptômes émotionnels chez des souris neuropathiques WT et δ KO dans le modèle du cuff

A court terme :

Nos résultats préliminaires suggèrent des variations des taux d'expression de molécules médiatrices de l'inflammation dans le tronc cérébral 4 semaines après la chirurgie. Ce criblage initial réalisé sur un échantillon de tissus provenant de 4-5 souris a permis de tester l'implication potentielle de plus de cent molécules impliquées dans l'inflammation. Il est maintenant nécessaire d'effectuer une étude plus approfondie de ces variations d'expression et d'inclure un nombre de souris plus important. Ainsi, la prochaine étape inclut la confirmation et la quantification des modifications observées en ELISA. Nous souhaiterions quantifier l'expression des 8 molécules détectées dans le tronc cérébral dans notre expérience préliminaire, à savoir la chimiokine CX3XL1, l'interleukine 33 (IL-33), l'ostéopontine, la Cystatine C, le récepteur des LDL, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF acidic), l'IGFBP2 et le facteur de coagulation III. Par ailleurs, nous souhaiterions vérifier l'expression de molécules dont l'implication dans la douleur neuropathique a été suggérée à de nombreuses reprises (Bohren *et al.*, 2022) y compris dans le modèle du cuff (Bai *et al.*, 2021) à savoir l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α . Une alternative à cette méthode pourrait également être l'analyse par qPCR de l'expression des ARNm codant pour ces molécules, bien que la traduction des ARNm ne reflète pas nécessairement l'expression des protéines.

A long terme :

L'analyse quantitative des molécules médiatrices de l'inflammation en condition de douleur neuropathique induite par les cuff va nous permettre d'identifier des molécules dont le niveau d'expression varie avec la chirurgie et d'évaluer leur effet sur l'hypersensibilité mécanique. Par exemple, nos données préliminaires suggèrent que l'ostéopontine, molécule pro-inflammatoire est augmentée dans le sérum de mâles cuff. Si ces résultats sont confirmés, il serait intéressant de voir si l'injection aiguë ou répétée d'un inhibiteur de l'ostéopontine permet de soulager l'hypersensibilité mécanique chez des souris cuff. Jusqu'à maintenant, les inhibiteurs de l'ostéopontine tels que la bréfélamide ont été étudiés principalement pour leur potentiel anti-tumoral (Zhang *et al.*, 2016). En complément, nous pourrions nous intéresser à l'effet sur les seuils nociceptifs de l'injection aiguë ou répétée d'ostéopontine chez des souris

naïves pour voir si l'ostéopontine suffit à induire une hypersensibilité mécanique. Bien entendu, cette approche peut s'appliquer à toute autre molécule d'intérêt.

Nous nous sommes intéressés aux symptômes douloureux et émotionnels associés à la chirurgie cuff jusqu'à sept semaines après la chirurgie. La littérature suggère que les symptômes de type douloureux se maintiennent jusqu'à 10 semaines après la chirurgie pour une récupération totale à 12 semaines (Benbouzid *et al.*, 2008a; Yalcin *et al.*, 2011). Cependant, nos résultats chez des animaux mâles traités avec l'excipient suggèrent qu'une partie des animaux récupèrent à partir de la 8^{ème} semaine (Chapitre II). Ainsi, il pourrait être intéressant de caractériser ce modèle plus en détail et, sur une période plus longue. Nous pourrions ainsi mieux documenter la récupération de ces animaux et aborder de façon plus approfondie les mécanismes sous-jacents de la récupération.

En parallèle, nous pourrions étudier comment les molécules de l'inflammation sont impliquées dans la récupération spontanée des souris. De nombreuses études décrivent en effet l'expression des cytokines dans la mise en place de la neuropathie à différents temps suivant la chirurgie (Borsani *et al.*, 2008; Martucci *et al.*, 2008; Sacerdote *et al.*, 2013; Bai *et al.*, 2016) mais, à ma connaissance, aucune d'entre elles n'a étudié la récupération. Nous pourrions comparer les niveaux d'expression de ces molécules avant la chirurgie, 1 heure après la chirurgie, 3 et 7 jours après la chirurgie, puis toutes les deux semaines jusqu'à récupération des animaux. Par ailleurs, des études ont montré une régulation différentielle de ces molécules en fonction des tissus avec une expression rapide (quelques heures à quelques jours) dans les tissus lésés, suivi d'une expression dans les DRGs et la moelle épinière plus tardive (quelques jours) (Sacerdote *et al.*, 2013; Bohren *et al.*, 2022). Une expression accrue dans des structures supraspinales tel que l'hippocampe a également été montrée 4 semaines après la chirurgie. Ainsi, l'étude à différents temps, dans le site de lésion, les DRGs, la moelle épinière mais aussi des structures supraspinales permettrait d'aborder les mécanismes neuroinflammatoires associés à la douleur neuropathique et à la récupération. Le choix de la structure supraspinale pourrait se porter sur une structure du tronc cérébral impliquée dans la modulation de la douleur tel que la RVM ou la PAG. Nous pourrions également réaliser cette analyse dans une structure cérébrale impliquée dans les comorbidités anxio-dépressives de la douleur neuropathique. On pourrait citer par exemple, le cortex cingulaire antérieur (Barthas *et al.*, 2015) ou encore l'hippocampe dorsal dont l'activation soulage la douleur neuropathique chez des souris SNI (Wei *et al.*, 2021).

Chapitre II : Effets du CBD sur l'hypersensibilité mécanique et les symptômes de type anxieux et dépressifs associés à la douleur neuropathique

A court terme :

Si on considère les différents problèmes entourant ce projet (variabilité, récupération des mâles cuff non traités, etc.), il est peu probable que l'ajout d'animaux dans les groupes pour augmenter l'effectif modifie nos conclusions actuelles. Nos efforts à court terme devraient se concentrer sur une optimisation des conditions d'hébergement et un raffinement des conditions expérimentales qui sont responsables en grande partie de la variabilité des résultats (cycle jour-nuit, design des cohortes, optimisation des tests comportementaux, etc.).

À long terme :

Les résultats de cette étude ne permettant pas de tirer de conclusions définitives sur l'effet anti-allodynique du CBD, il est difficile d'imaginer des perspectives à long terme avec les données actuelles. Plusieurs choix s'offrent à nous. Il serait possible de persister à étudier l'effet du CBD dans la douleur neuropathique en prenant soin de trouver un modèle plus adapté. Une autre option serait d'étudier l'effet du CBD et l'implication du récepteur opioïde δ dans d'autres conditions pathologiques. Ces deux propositions sont détaillées dans les paragraphes suivants.

Le fait que le CBD induise un effet de type antidépresseur dans nos animaux δ -KO semble indiquer que ce dernier n'est pas impliqué dans cette comorbidité. Cependant, la question d'une implication du récepteur δ dans l'effet du CBD dans la douleur neuropathique reste sans réponse. Nos injections aiguës de CBD à 50 mg/kg ainsi suggèrent que le CBD induirait un effet antinociceptif chez des souris sauvages neuropathiques. Dans la littérature, ces effets ont été montrés chez le rat dans des modèles de douleur neuropathique périphérique (Costa *et al.*, 2007; De Gregorio *et al.*, 2019; Linher-Melville *et al.*, 2020; Silva-Cardoso *et al.*, 2021; Baron-Flores *et al.*, 2022; Jesus *et al.*, 2022), mais aussi chez la souris dans des modèles de douleur neuropathique périphérique (Casey *et al.*, 2017, 2022; Aguiar *et al.*, 2023) ou chimio-induite par le cisplatine (Ward *et al.*, 2011, 2014; Harris *et al.*, 2016; Foss *et al.*, 2021; Kumar Kalvala *et al.*, 2022). Par ailleurs, un effet préventif du CBD sur le développement de la neuropathie a également été décrit (Ward *et al.*, 2011, 2014; Linher-Melville *et al.*, 2020; Foss *et al.*, 2021; Kumar Kalvala *et al.*, 2022). Il serait intéressant, après optimisation des conditions d'administration (dose, route, décours temporel) d'évaluer l'implication du récepteur δ à la fois dans l'effet curatif, mais aussi dans un effet préventif du CBD sur le

développement de la neuropathie. A noter qu'un modèle de SNI sera préféré au modèle du cuff du fait que dans ce modèle les souris développent une allodynie mécanique et une hyperalgésie thermique stables pendant au moins 12 mois (Guida *et al.*, 2020). La présence de l'hyperalgésie au froid permettrait aussi de tester l'effet du CBD sur une deuxième modalité nociceptive. Par ailleurs, du fait de sa plus grande homologie avec l'humain, il serait également intéressant de vérifier si nos résultats sont généralisables chez le rat (Bryda, 2013). L'administration d'un antagoniste du récepteur δ (Naltrindole), conjointement au CBD ou en prétraitement, permettrait de mieux cerner le rôle de ce dernier en l'absence de rat δ *knock-out*.

Les récepteurs δ périphériques sont impliqués dans l'effet anti-allodynique des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (Ceredig *et al.*, 2018) et des β 2-mimétiques (Ceredig *et al.*, 2020) dans le modèle du cuff. Il serait intéressant, d'étudier plus particulièrement la contribution des récepteurs δ périphériques. Pour cela une première approche pharmacologique pourra être envisagée avec de la Tic-deltorphine, un antagoniste peptidique des récepteurs opioïdes δ (Schiller *et al.*, 1992; Snook *et al.*, 2008). Par la suite, une approche complémentaire via la délétion conditionnelle du récepteur δ dans les neurones nociceptifs primaires exprimant les canaux sodiques activés par le voltage (NaV1.8) telles que précédemment décrite (Gaveriaux-Ruff *et al.*, 2011; Ceredig *et al.*, 2020) pourra également être mise en place.

Ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées à l'impact du CBD sur les troubles de l'usage de substances, et plus particulièrement les troubles de l'usage d'opioïdes (OUD, *opioid use disorder*). Chez le rat, le CBD réduit les comportements de recherche d'héroïne (Ren *et al.*, 2009), il diminue les propriétés récompensantes de la morphine dans un test de préférence de place conditionnée (Markos *et al.*, 2018) et réduit le rétablissement, par la morphine ou le stress, d'une préférence de place conditionnée à la morphine (de Carvalho & Takahashi, 2017). Chez l'humain, le CBD atténue l'envie de consommer de l'héroïne induite par des stimuli associés à la drogue (Hurd *et al.*, 2015, 2019). Des résultats similaires ont également été montrés chez des patients ayant un diagnostic d'OUD et recevant un traitement de substitution tel que la buprénorphine ou la méthadone. Chez ces patients, le CBD atténue l'envie de consommer des opioïdes induite par des stimuli associés à la drogue (Suzuki *et al.*, 2023).

L'exposition à la morphine augmente l'expression des récepteurs opioïdes δ à la surface des neurones dans les DRG (Gendron *et al.*, 2006), la moelle épinière (Cahill *et al.*, 2001) et l'hippocampe (Erbs 2016). Par ailleurs, certaines études en souris δ -KO ont suggéré que le

récepteur δ pourrait être impliqué dans le conditionnement de préférence de place à la morphine (Le Merrer *et al.*, 2011) et plus particulièrement dans l'association au contexte (Le Merrer *et al.*, 2012). Ainsi, après avoir vérifié dans nos conditions que le CBD diminue les propriétés récompensantes de la morphine, nous pourrions étudier l'implication du récepteur opioïdes δ dans ces effets. Des expériences de préférence de place conditionnée et d'auto administration de morphine pourront être envisagées.

Dans l'optique d'étudier plus en détail l'implication des récepteurs δ et CB1, seuls ou sous forme d'hétéromères, dans l'effet du CBD, il serait informatif de réaliser une étude de la liaison des ligands sur des membranes de cerveaux de souris exprimant ces deux récepteurs mais aussi sur des souris n'en exprimant qu'un seul (Zimmer *et al.*, 1999; Filliol *et al.*, 2000). Plus particulièrement, nous pourrions étudier le déplacement d'un agoniste radio-marqué de l'un ou l'autre des récepteurs induit par des doses croissantes de CBD pour évaluer l'affinité du CBD pour les récepteurs δ et CB1 mais aussi de voir si la présence d'un des récepteurs modifie l'affinité du CBD pour l'autre récepteur, propriété proposée comme caractéristique des hétéromères μ - δ (Gomes *et al.*, 2000, 2004). En complément, nous pourrions étudier comment et à quelle concentration le CBD module l'activité des récepteurs δ et CB1 suite à une activation par leurs agonistes respectifs grâce à un test de [³⁵S]GTP γ S.

Chapitre III : Distribution des neurones co-exprimant les récepteurs δ et CB1 dans le système nerveux de souris neuropathiques mâles et femelles

À court terme :

Dans un premier temps, il est prioritaire de terminer l'analyse de la distribution des récepteurs sur l'ensemble des animaux mâles et femelles pour confirmer les changements induits par la condition neuropathique et identifier de potentielles différences liées au sexe. Par ailleurs, l'analyse de la colocalisation neuronale dans la RVM a été réalisée à la fois chez des souris cuff mais aussi dans le modèle SNI. La distribution neuroanatomique des récepteurs δ et CB1 sera donc comparée dans les deux modèles. Cela permettra d'une part d'identifier des mécanismes communs à la condition neuropathique, et d'autre part d'identifier de potentielles différences en relation avec l'intensité de la neuropathie, plus intense dans le modèle de SNI.

Cette comparaison sera poursuivie sur les tissus des DRGs et de la moelle épinière. L'association physique entre les récepteurs δ et CB1 a en effet déjà été mise en évidence dans

la moelle épinière en condition basale et neuropathique (Bushlin *et al.*, 2012; Sierra *et al.*, 2019).

Nos résultats actuels suggèrent que la condition neuropathique a peu d'impact sur la distribution des régions de co-expression neuronale des récepteurs δ et CB1. Cependant, une région apparaît chez les animaux cuff, il s'agit du Sp5c qui correspond à la partie caudale du noyau spinal du trijumeau et est associée à la transmission des informations sensorielles en provenance de la face et des sinus (Waite, 2004). Il serait intéressant de voir si cette augmentation est également détectée chez des animaux SNI ce qui permettrait de confirmer qu'elle est liée à la condition neuropathique. L'analyse des niveaux thoraciques et cervicaux de la moelle épinière permettra de déterminer si cette augmentation est généralisée aux structures recevant directement des informations somato-sensorielles. Il serait également intéressant de voir si d'autres modifications interviennent dans le Sp5c en condition de douleur neuropathique liée à une atteinte du nerf sciatique. En effet, des phénomènes de sensibilisation centrale pourraient être à la base de cette augmentation. En utilisant des techniques d'électrophysiologie ex-vivo, sur tranche aiguë de bulbe rachidien, nous pourrions étudier la présence d'une modification de l'excitabilité ou du seuil d'activation des neurones. En parallèle, nous pourrions vérifier si l'augmentation de la co-expression s'accompagne d'un changement du seuil de sensibilité mécanique ou thermique dans la région de la face. Le Sp5c, comme la moelle épinière, reçoit des afférences provenant de la RVM (Aicher *et al.*, 2012), mais aussi d'autres structures comme le cortex sensoriel primaire, ou le cortex insulaire (Kobayashi & Nakaya, 2020). Si nos résultats d'électrophysiologie et de comportement soutiennent l'hypothèse d'une sensibilisation centrale, il pourrait être envisagé de poursuivre cette étude par l'identification des circuits impliqués dans cette sensibilisation et dans l'augmentation de la co-expression δ -CB1. Cela pourra être effectué en première approche par des techniques de traçage rétrograde, et pourra être poursuivi par une étude plus spécifique d'une ou plusieurs voies par des techniques de DREADD ou d'optogénétique.

À long terme :

Nous avons identifié plusieurs structures co-exprimant les récepteurs δ et CB1 dans les mêmes neurones. La co-expression neuronale des récepteurs est un prérequis à la formation d'hétéromères. L'étape suivante serait, dans les régions identifiées, d'étudier l'hétéromérisation des récepteurs δ et CB1. Plusieurs techniques existent pour vérifier la proximité physique des récepteurs telles que la co-immunoprécipitation, le test de liaison de proximité, et l'utilisation d'anticorps sélectifs des hétéromères (Gaborit & Massotte, 2022). La

co-immunoprécipitation nécessite une quantité assez importante de tissus ce qui rend son utilisation difficile dans les structures de petite taille. Les régions de colocalisation neuronale étant principalement localisées dans le tronc cérébral, nous pourrions cependant tester cette approche de façon globale sur cette partie du cerveau.

Des anticorps monoclonaux sélectifs des hétéromères permettent leur détection directe par immunofluorescence. Ils ont été utilisés pour la détection des hétéromères δ -CB1 dans le cerveau de souris et de rat neuropathiques (Bushlin *et al.*, 2012). Dans cet article, la détection des hétéromères a été effectuée par ELISA grâce à ces anticorps. Cette technique nécessite également une quantité importante de tissus compte tenu des faibles niveaux d'expression des récepteurs et pourrait ne pas être applicable pour les petites structures du tronc cérébral.

La technique de liaison de proximité, permet de détecter des protéines proches (<40nm) grâce à des anticorps spécifiques de chaque récepteur fusionné à des oligonucléotides complémentaires qui vont se circulariser. Cette séquence sera ensuite amplifiée et reconnue par des sondes fluorescentes. Cette technique a été utilisée par Sierra *et al.*, pour montrer la présence d'hétéromères δ -CB1 dans la moelle épinière de patients souffrant de neuropathie associée à la chimiothérapie (Sierra *et al.*, 2019). Nous pourrions donc tenter de l'implémenter en utilisant des anticorps dirigés contre la GFP pour pallier le manque d'anticorps sélectifs du récepteur δ murin.

Une fois la proximité physique des récepteurs δ et CB1 établie, nous pourrions être à même de choisir une structure parmi celles identifiées pour étudier l'implication des hétéromères δ -CB1 dans la douleur neuropathique et ses comorbidités.

Deux techniques ont déjà été décrites pour l'étude des hétéromères au niveau du comportement. L'une se base sur l'utilisation d'anticorps sélectifs pour les hétéromères afin de bloquer la signalisation liée à ceux-ci. Dans le cas des hétéromères δ -CB1, l'administration d'anticorps monoclonaux spécifiques dans la moelle épinière de souris neuropathiques contrecarre l'effet antinociceptif induit par de faibles doses d'agonistes δ et CB1 (Sierra *et al.*, 2019). Une autre technique a été décrite dans le cas des hétéromères μ - δ (Xie *et al.*, 2009; He *et al.*, 2011; Kabli *et al.*, 2014; Inyang *et al.*, 2021) et δ - κ (Jacobs *et al.*, 2018) et consiste en la dissociation de l'hétéromère par un peptide interférent. Les peptides interférents sont composés d'un peptide de pénétration cellulaire de type TAT (Zou *et al.*, 2017) fusionné à un segment du récepteur participant à l'interface de contact. Cependant, aucune étude n'a étudié l'interface de contact entre les récepteurs δ et CB1 au sein de l'hétéromère. Une étude *in silico* (Filizola

et al., 2002; Liu *et al.*, 2009) ou de mutagénèse dirigée (O'Dowd *et al.*, 2012) telles que réalisées dans le cadre des hétéromères μ - δ pourrait permettre l'identification des résidus impliqués dans cette interface. L'efficacité des peptides interférents utilisés pour la dissociation des hétéromères μ - δ et δ - κ pourrait cependant être testée pour dissocier les hétéromères δ CB1. Les peptides utilisés correspondent aux séquences de la seconde boucle intracellulaire du récepteur δ (Xie *et al.*, 2009), de son premier domaine transmembranaire (Jacobs *et al.*, 2018) ou encore de son extrémité C-terminale (Kabli *et al.*, 2014; Inyang *et al.*, 2021). Il pourrait être utile de tester leur efficacité in-vitro, dans des systèmes d'expression hétérologue (i.e. HEK 293). Par exemple en co-immunoprécipitant les récepteurs δ et CB1 en présence ou non de ces peptides. Une fois l'efficacité vérifiée après optimisation des conditions d'administration, l'implication des hétéromères δ -CB1 dans douleur neuropathique et ses comorbidités pourra être vérifiée suite à l'injection systémique (He *et al.*, 2011) ou intracérébrale du peptide interférent identifié. Une injection locale intracérébrale ou intrathécale pourrait être envisagée si la proximité physique des hétéromères δ -CB1 est montrée dans une structure du système nociceptif (voir partie suivante).

Chapitre IV : Internalisation des récepteurs δ et CB1

A long terme :

Nous avons étudié l'internalisation des récepteurs δ et CB1 en culture primaire d'hippocampe comme indicateur d'une potentielle hétéromérisation, telle que décrite pour les hétéromères μ - δ (Derouiche *et al.*, 2020).

Dans nos cultures primaires d'hippocampe, les neurones co-exprimant les récepteurs δ et CB1 sont peu nombreux, de telle sorte que nous n'avons pas pu observer ces neurones dans toutes les conditions. Notre étude neuroanatomique montre que très peu de neurones co-expriment les deux récepteurs dans l'hippocampe. Les cultures primaires d'hippocampe ne semblent donc pas être un choix optimal pour étudier les hétéromères δ -CB1. Les régions de co-expression neuronale des récepteurs δ et CB1 sont principalement situées dans le tronc cérébral. Nous pourrions mettre en place des cultures ainsi que déjà réalisé à partir de tronc cérébral d'embryons de rats ou de raton nouveau-nés (Kivell *et al.*, 2000, 2001). La réalisation de cultures primaires de moelle épinière de souris âgées de 1 à 3 jours à elle aussi été documentée (Eldeiry *et al.*, 2017). La proximité physique des récepteurs δ et CB1 a été montrée dans la moelle épinière de souris naïves (Sierra *et al.*, 2019). Ainsi, la réalisation de culture de

moelle épinière pourrait être la une solution à privilégier pour l'étude des hétéromères δ -CB1. Par ailleurs, une fois que l'étude de la colocalisation neuronale aura été réalisée dans les DRG, il sera également envisageable de réaliser des cultures de DRG (Shekarabi *et al.*, 2021). Ces dernières ont l'avantage de pouvoir être réalisées à partir de souris adultes et offrent la possibilité de travailler sur des cultures de DRGs issues d'animaux neuropathiques.

Notre étude des hétéromères s'est basée sur une propriété mise en évidence chez les hétéromères μ - δ , la co-internalisation des récepteurs (Derouiche *et al.*, 2020). Compte tenu de l'internalisation constitutive forte du récepteur CB1, cette approche n'est pas idéale. Une première étape serait tout d'abord de vérifier l'association physique des récepteurs δ et CB1 en culture primaire (celle que nous choisirons parmi les options énumérées ci-dessus). Cela pourra être réalisé par co-immunoprécipitation, ou par un test de liaison de proximité (comme décrit précédemment). Ensuite nous pourrions étudier les propriétés des hétéromères δ -CB1. Il a été montré via un test de $[35S]GTP\gamma S$ que l'activité du récepteur δ induite par l'agoniste DPDPE était accrue en présence de ligands CB1 (agoniste Hu-210 ou antagoniste PF-514273) et que cette augmentation était abolie en présence d'un anticorps sélectif des hétéromères. Cela suggère donc qu'une coopérativité positive prend place au sein de l'hétéromère δ -CB1. Cependant, celle-ci n'a été montrée que dans des membranes corticales de rat neuropathiques (L5SNT). Une étape indispensable serait également de vérifier l'impact de cette coopérativité positive en cultures primaires à la fois sur l'activité des récepteurs, mais aussi sur la liaison des ligands comme étudié pour les hétéromères μ - δ (Gomes *et al.*, 2000, 2004). Chez les hétéromères μ - δ la co-internalisation des récepteurs s'accompagne d'une phosphorylation de ERK1/2 qui se prolonge dans le temps. En effet, dans des cellules de neuroblastome SKNSH, le traitement avec l'agoniste μ DAMGO ou l'agoniste δ deltorphine II entraîne une phosphorylation soutenue de ERK1/2, absente chez les cellules prétraitées avec un ARN interférent ciblant le récepteur μ ou avec un antagoniste des récepteur μ ou δ (Rozenfeld & Devi, 2007). L'utilisation d'un ARN interférent ciblant la β -arrestine (impliquée dans l'internalisation des récepteurs) inhibe également la phosphorylation soutenue de ERK1/2 (Rozenfeld & Devi, 2007). Cette propriété a également été mise en évidence chez les hétéromères μ -V1b en cellules HEK-293 (Koshimizu *et al.*, 2018) et μ -sst2 en cellules PANC-1 (Jorand *et al.*, 2016). Nous pourrions donc étudier cette propriété chez les hétéromères δ -CB1. Pour cela, nous pourrions dans un premier temps utiliser les ligands déjà décrits par Bushlin et al, comme générant une coopérativité positive, à savoir l'agoniste δ (et μ) DPDPE, l'agoniste CB1 Hu-210 ou l'antagoniste CB1 PF-514273 (Bushlin *et al.*, 2012). Ensemble, ces

perspectives nous permettraient de mieux comprendre les propriétés des hétéromères δ -CB1 en tissus natifs.

En résumé nous proposons :

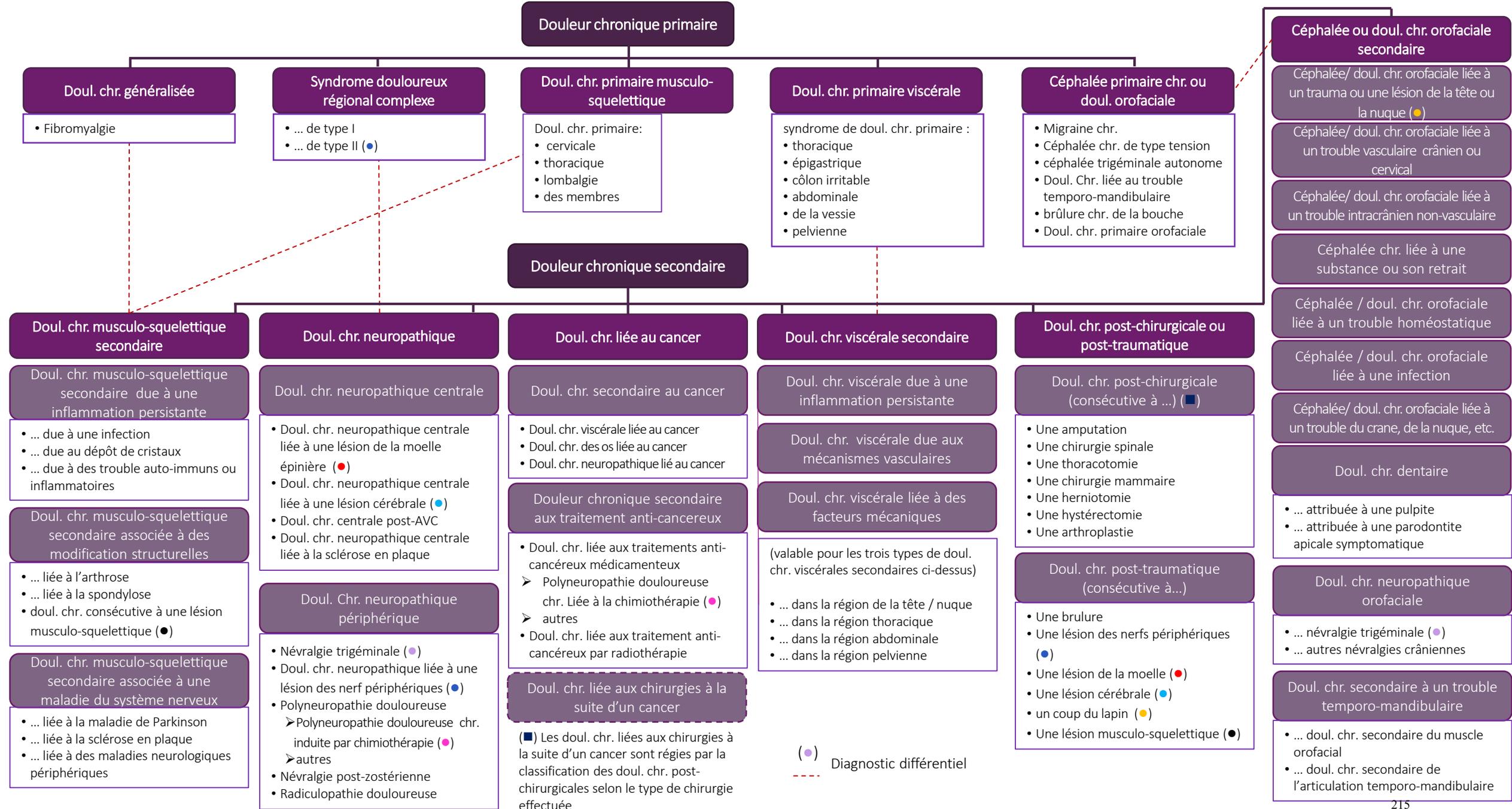
- I.** D'étudier les mécanismes neuro-inflammatoires associés à la douleur neuropathique et ses comorbidités en analysant les variations de l'expression des molécules médiatrices de l'inflammation dans le développement de la neuropathie et sa récupération. A la suite de quoi nous évaluerons leur potentiel thérapeutique dans le soulagement ou la prévention du développement de la neuropathie.
- II.** D'étudier l'implication du récepteur opioïde δ dans les effets thérapeutiques du CBD. L'effet du CBD sera évalué dans différents modèles de douleur neuropathique, mais aussi dans des modèles animaux de trouble de l'usage d'opioïdes. L'implication du récepteur δ sera abordée via l'utilisation de souris δ -KO
- III.** D'étudier le rôle potentiel des hétéromères δ CB1 dans la douleur neuropathique. Leur proximité physique sera analysée dans les régions du système nerveux contenant des neurones co-exprimant ces récepteurs. Leur implication dans la douleur neuropathique sera examinée en dissociant les récepteurs composant l'hétéromère δ -CB1.
- IV.** D'étudier les propriétés fonctionnelles des hétéromères δ -CB1 en culture primaire afin de mieux comprendre les mécanismes sous tendant leurs effets.

Dans l'ensemble une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait ouvrir la voie à de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des douleurs neuropathiques et les troubles de l'usage de substance.

ANNEXES

nom	nom d'achat	société	ref
ACEA		Tocris	1319
B27	Supplément B-27 Plus Gibco (50X)	Gibco™	A3582801
Bleu de Trypan	Solution au bleu de trypan, 0,4 %	Gibco™	15250061
CBD	cannabidiol	THC Pharm	THC-1073G-1
CBD	cannabidiol (-)-CBD	Cayman chem	90080
Tamis cellulaire 70µm	Falcon® 70 µm Cell Strainer, White, Sterile, Individually Packaged	Life sciences	352250
cOmlplete	cOmlplete™, Mini EDTA-free protease Inhibitor cocktail	Roche	11836170001
DAPI	DAPI	Roche	10236276001
Delt II	Deltorphine II	Sigma-aldrich	T-0675
DMEM	DMEM, high glucose, pyruvate	Gibco™	41966-029
Désoxyribonucléase I	Deoxyribonuclease I from bovine pancreas	Sigma-aldrich	DN25-100MG
Glutamax	Supplément GlutaMAX™	Gibco™	35050-061
Glutamine	L- Glutamine (200mM)	Gibco™	25030081
Hibernate	Hibernate A minus phenol red	Brainbits	HAPR
kit cytokine	<i>Proteome profiler - Mouse XL Cytokine Array Kit</i>	Bio-techne	ARY028
Lamelles 12mm	Lamelles de précision	Marienfeld Superior™	15820692
Met-enk	Met-enképhaline	Sigma-aldrich	M-6638
Mowiol	MOWIOL® 4-88 Reagent	Calbiochem®	475904
Neurobasal	Milieu neurobasal A	Gibco™	10888022
NTI	Naltrindole	Sigma-aldrich	N115
OCT	Tissue-Tek™ O.C.T. Compound	Sakura Finetek™	4583
Papaine	Papain, suspension	Worthington biochemical	LS003126
Pen/step	Pénicilline-streptomycine (10 000 U/ml)	Gibco™	15140122
Poly-L-Lysine	Poly-L-lysine hydrobromide	Sigma-aldrich	P2636-25MG
Prolong	Milieu de montage anti-atténuation Or ProLong™	Invitrogen™	P36930
Réactif de Bradford	Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad	5000006
sérum d'âne	Non-sterile donkey serum collected from normal healthy donkeys	Sigma-aldrich	S30
sérum de chèvre	Non-sterile goat serum collected from normal healthy goats	Sigma-aldrich	S26
SNC80		Tocris	0764
Tween20	TWEEN® 20	Euromedex	2001-B
Tween80	TWEEN® 80	sigma-aldrich	P1754-500ML

Annexe 1: tableau des références des produits utilisés pour les expériences



REVUE 1

Les hétéromères impliquant le récepteur opioïde δ : des cibles potentielles pour soulager la douleur chronique ?

Delta Opioid Heteromers: Potential Targets to Alleviate Chronic Pain?

M. Gaborit · D. Massotte

Reçu le 20 juin 2022 ; accepté le 2 septembre 2022
© Lavoisier SAS 2022

Résumé Une douleur qui persiste plus de 3 mois est considérée comme chronique. La douleur chronique touche entre 20 et 45 % de la population mondiale et les traitements habituellement prescrits sont peu efficaces. Certains antidépresseurs, mais aussi des antiépileptiques sont recommandés en première intention. En l'absence d'effet analgésique, des traitements à base d'opiacés sont ensuite envisagés. Ces derniers agissent sur les récepteurs opioïdes mu (μ), responsables à la fois des effets analgésiques et des nombreux effets indésirables. Dans ce contexte, il est nécessaire de concevoir des analgésiques opiacés efficaces et dépourvus d'effets secondaires. Un autre récepteur opioïde, le récepteur delta (δ), est largement distribué dans les régions du circuit de la douleur. Toutefois, les agonistes de ce récepteur ont une faible puissance analgésique chez l'humain. Par ailleurs, le récepteur δ peut s'associer avec d'autres pour former une nouvelle entité appelée hétéromère dont les propriétés fonctionnelles ont attiré l'attention. Nous évaluons ici leur rôle dans la douleur aiguë et chronique.

Mots clés Douleur chronique · Hétéromères · Opiacés · Récepteurs opioïdes · Récepteurs couplés aux protéines G

Abstract Chronic pain is defined as a pain lasting for more than 3 months and affects between 20% and 45% of the population worldwide. To date, medication remains poorly effective. Some antidepressants, but also antiepileptic drugs, are recommended as first-line treatment. In the absence of analgesic effect, opiate-based treatments are then considered. Opiates act on mu (μ) opioid receptors, which are responsible for both analgesic and unwanted side effects. In this context, there is a great need for new effective opioid anal-

gesics devoid of side effects. Interestingly, the delta (δ) opioid receptor is widely distributed in the pain circuit, but δ agonists have low analgesic potency in humans. However, δ receptors can associate with others to form a new entity called heteromer whose functional properties have attracted attention. Here, we will evaluate their role in the context of acute and chronic pain.

Keywords Chronic pain · G-protein coupled receptors · Heteromers · Opiates · Opioid receptors

Introduction

Selon l'Association internationale pour l'étude de la douleur (IASP), la douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à, ou ressemblant à celle associée à, une lésion tissulaire réelle ou potentielle [1]. Ce phénomène complexe implique des dimensions sensorielles, émotionnelles et cognitives qui peuvent être influencées par des facteurs tels que l'état émotionnel, l'attention, la culture ou l'expérience personnelle. Dans des conditions physiologiques, la douleur joue un rôle protecteur mais devient pathologique lorsqu'elle persiste ou récidive pendant plus de 3 mois [2]. La douleur chronique est une condition invalidante interférant avec la vie quotidienne qui touche entre 20 et 45 % de la population mondiale. Les traitements tels que les opiacés, habituellement prescrits pour la douleur aiguë, sont souvent peu efficaces quand il s'agit de douleur chronique. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont généralement recommandés comme traitements de première intention pour les douleurs chroniques de type nociplastiques. Pour les douleurs neuropathiques, les traitements incluent des antidépresseurs tricycliques, des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, mais aussi des antiépileptiques comme les gabapentinoïdes. En l'absence d'effet analgésique, des traitements à

M. Gaborit · D. Massotte (✉)
Centre national de la recherche scientifique,
Institut des neurosciences cellulaires et intégratives,
Université de strasbourg, 8, allée du Général-Rouillois,
F-67000 Strasbourg, France
e-mail : d.massotte@unistra.fr

Abréviations

5'-GNTI : 5'-guanidinonaltrindole
 6'-GNTI : 6'-guanidinonaltrindole
 ADL5747 : N,N-Diethyl-3-hydroxy-4-(spiro[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl) Benzamide
 ADL5859 : N,Ndiethyl-4-(5-hydroxyspiro[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl)benzamide
 ATV : aire tegmentale ventrale
 CaMKII : protéine kinases Ca²⁺/calmoduline-dépendante II
 CaV2.2 : canaux calciques voltage dépendants de type N
 CB1 : récepteur cannabinoïde de type 1
 CCR5 : récepteurs des chimiokines 5
 CXCR4 : récepteurs des chimiokines 4
 CYM51010 : 1-4-(Acetylamino)phenylmethyl-4-(2-phenylethyl)-4-2 Piperidinecarboxylic acid ethyl ester
 DAMGO : [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin; DAPTA, D-Alapeptide T-amide
 DPDPE : D-Pen²,5-Enkephalin
 ERK1/2 : kinases régulées par les signaux extracellulaires 1/2
 FDA : agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux

Hu210 : (6aR-trans-3-(1, 1-Dimethylheptyl)-6a,7,10,10atetrahydro-1-hydroxy-6,6-dimethyl-6H-dibenzob,dpyran-9-methanol
 IASP : Association internationale pour l'étude de la douleur
 ICI-199441, 2-(3,4-Dichlorophenyl)-N-methyl-N-[(1S)-1-phenyl-2-(1-pyrrolidinyl)ethyl]acetamide hydrochloride
 MAPK : protéines kinases associées à des signaux mitogènes
 MP135 : 4-(N-benzylpropionamido)-N-(3-fluorophenethyl)-1-phenethylpiperidine-4-carboxamide
 NOP : récepteur à la nociceptine/orphanineFQ
 nor-BNI : norbinaltorphimine
 PAG : substance grise périaqueducule
 PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique
 RCPG : récepteur couplé aux protéines G
 RVM : bulbe rachidien rostral ventromédial
 SNC80 : (+)-4-[(α R)- α -((2S,5R)-4-Allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,Ndiethylbenzamide
 sst4 : récepteurs à la somatostatine 4
 TIPP Ψ : (2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(3S)-2-[(2S)-2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoyl]-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-3-yl]methylamino]-3-phenylpropanoyl]amino]-3-phenylpropanoic acid
 δ : récepteur opioïde delta
 κ : récepteur opioïde kappa
 μ : récepteur opioïde mu

base d'opiacés faibles (e.g. Tramadol) ou forts (e.g. oxycodone, morphine) sont alors envisagés [3]. Cependant, les opiacés produisent des effets indésirables, résultant d'une utilisation aiguë (e.g. dépression respiratoire, nausées, vertiges, sédation, constipation) et à long terme (tolérance, hyperalgésie et dépendance). En Amérique du nord, et dans une moindre mesure en Europe, le besoin croissant de traiter la douleur chronique a accru la prescription d'opiacés, entraînant une hausse spectaculaire de leur mésusage, de leur abus et de la mortalité par overdose [3,4]. Cette crise des opiacés a suscité de nombreux efforts pour concevoir des stratégies innovantes permettant de soulager efficacement la douleur tout en garantissant un usage sûr.

Les opiacés agissent sur les récepteurs opioïdes mu (μ), delta (δ) et kappa (κ), 3 récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de type inhibitrices. Le récepteur μ est largement distribué dans tout le système nerveux et est la cible moléculaire principale des opiacés de prescription, responsables à la fois de leurs effets analgésiques et de leurs effets indésirables [5]. Le récepteur δ quant à lui est largement distribué dans des structures supraspinales clés des circuits de la douleur telles que la substance grise périaqueducule (PAG), le bulbe rachidien rostral ventromédial (RVM), le cortex somatosensoriel et l'amygdale basolatérale. Au niveau de la moelle épinière, il est présent dans toutes les couches chez le rongeur mais, chez l'humain, il est strictement localisé dans les couches superficielles I et II recevant principalement les afférences nociceptives. Enfin, dans les ganglions

spinaux, le récepteur δ est localisé principalement dans les grands neurones myélinisés non nociceptifs (fibres A β), mais aussi dans des neurones nociceptifs de moyen diamètre (fibres A δ) et dans les nocicepteurs peptidergiques ou non, de petit diamètre (fibres C) [6]. Cette distribution anatomique en fait une cible potentielle pour le traitement de la douleur. Les agonistes des récepteurs δ sont également dépourvus de la plupart des effets indésirables associés aux récepteurs μ tels que dépression respiratoire, constipation, sédation ou effets récompensants, mais leur administration répétée s'accompagne de tolérance analgésique et, pour certains, entraîne des convulsions. De surcroît, ils ont des effets anxiolytiques et antidépresseurs, ce qui suggère qu'ils pourraient également exercer un effet bénéfique sur l'anxiété et la dépression, deux comorbidités fréquentes de la douleur chronique [7,8]. Cependant, en condition normale, ces agonistes ont une faible puissance analgésique. Le récepteur δ ayant une localisation majoritairement intracellulaire, son faible niveau d'expression à la membrane plasmique des neurones du système nerveux central et périphérique pourrait en être responsable [7]. Toutefois, en conditions pathologiques, l'expression des récepteurs δ à la membrane plasmique est augmentée, notamment dans des modèles animaux de douleurs chroniques inflammatoires ou neuropathiques [6,9]. Dans ces conditions, mais aussi en cas d'auras migraineuses, les agonistes du récepteur δ induisent une analgésie robuste. À ce jour, seules deux molécules ciblant le récepteur delta δ (ADL5859 et ADL5747) ont fait l'objet d'études

cliniques dans le traitement des douleurs nociceptives et neuropathiques, cependant elles se sont révélées inefficaces pour soulager la douleur lors d'essais cliniques de phase II, ce qui a mis un frein à leur développement thérapeutique [8]. Cet échec reflète la difficulté de la recherche translationnelle. En effet, les différences inter-espèces de métabolisme, de pharmacocinétique et de pharmacodynamique des médicaments ne sont pas négligeables et, par conséquent, les modèles de rongeurs souffrent souvent d'un faible pouvoir de prédiction concernant leur efficacité clinique.

Dans un contexte où il est nécessaire de concevoir des analgésiques opiacés efficaces et dépourvus d'effets secondaires, mais aussi de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent l'activité des récepteurs opioïdes, les conséquences fonctionnelles induites par l'association physique des récepteurs δ avec d'autres RCPGs ont attiré l'attention. Nous discuterons ici des conséquences de ce processus d'hétéromérisation en tissu natif au niveau moléculaire, cellulaire et comportemental avec un focus particulier sur son rôle dans les douleurs aiguës et chroniques.

Les hétéromères du récepteur δ *in vivo*

Les hétéromères sont des complexes macromoléculaires formés par l'association d'au moins deux récepteurs fonctionnels. Ils ont des propriétés de liaison du ligand, de signalisation et/ou de trafic intracellulaire qui sont différentes de celles des récepteurs individuels.

L'étude des hétéromères, notamment la mise en évidence de la proximité physique entre les récepteurs mais aussi l'analyse de leurs propriétés fonctionnelles, repose sur l'utilisation de divers outils et méthodes (Fig. 1) [10]. Les techniques les plus fréquemment utilisées pour mettre en évidence la proximité physique (Fig. 1A) sont la co-immunoprécipitation, le test de liaison de proximité, et l'utilisation d'anticorps sélectifs des hétéromères. Concernant l'étude des propriétés fonctionnelles, celle-ci se heurte à la difficulté majeure de distinguer les effets des hétéromères de ceux des récepteurs parents. Plusieurs stratégies ont été mises en œuvre pour y faire face. Des outils pharmacologiques ont été développés sous forme de petites molécules ou de ligands bivalents (Fig 1B). Ces derniers sont constitués de deux ligands, chacun sélectif pour un des récepteurs, reliés entre eux par une chaîne carbonée de longueur définie. La longueur de cet espaceur correspond à la distance entre les sites orthostériques de deux RCPGs en contact direct. Toutefois, la sélectivité de ces ligands reste le plus souvent limitée. Une autre stratégie consiste à perturber les hétéromères (Fig. 1C), ainsi des peptides interférents ont été mis au point pour empêcher le contact physique et donc la formation d'hétéromères. Ils constituent aussi une manière de démontrer la proximité physique des récepteurs. L'utilisation d'anticorps sélectifs des hétéromères permet quant à elle

d'empêcher la signalisation liée aux hétéromères. Par ailleurs, l'utilisation de souris n'exprimant pas l'un ou l'autre récepteur permet de distinguer les propriétés résultant de leur co-expression de celles associées aux récepteurs seuls mais ne permet pas de discerner les propriétés liées aux hétéromères de celles dues à des interactions fonctionnelles intervenant au niveau cellulaire ou au niveau des circuits neuronaux.

Ces techniques ont permis de révéler l'existence d'hétéromères impliquant le récepteur δ dans le système nerveux central et périphérique (Fig. 2) et d'explorer leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, les hétéromères μ - δ , δ - κ et δ -récepteur cannabinoïde de type 1 (CB1) participent à la réduction du signal nociceptif dans les états douloureux. Le récepteur δ peut également former des hétéromères avec le récepteur à la nociceptine/orphanineFQ (NOP), les récepteurs des chimiokines 4 (CXCR4) et 5 (CCR5) ou les récepteurs 4 à la somatostatine (sst4), mais leur implication dans la douleur chronique reste à explorer. Par ailleurs, d'autres hétéromères ont été décrits dans des cellules co-transfectées mais ne seront pas considérés ici car, à notre connaissance, aucune information n'est disponible concernant leur proximité physique *in vivo*, condition requise à l'hétéromérisation [10].

Hétéromères des récepteurs opioïdes impliqués dans la douleur

Hétéromères μ - δ

La proximité physique μ - δ a été mise en évidence dans les ganglions spinaux, la moelle épinière, l'hippocampe et le noyau accumbens (Fig. 2). Cependant, la cartographie cérébrale des récepteurs à l'aide de souris exprimant les récepteurs δ et μ respectivement en fusion avec les protéines fluorescentes GFP et mCherry a révélé une co-expression neuronale dans des structures essentielles à la perception et au traitement des stimuli aversifs, suggérant ainsi que l'hétéromérisation μ - δ pourrait être plus largement distribuée. Il est à noter que l'administration répétée de morphine augmente la co-expression neuronale des récepteurs μ et δ ainsi que leur hétéromérisation dans ces mêmes circuits [10]. Cette augmentation coïncide avec une expression accrue du récepteur δ au niveau de la membrane plasmique [6]. Ainsi la densité d'hétéromères μ - δ pourrait également être affectée dans les états douloureux chroniques où la présence de récepteurs δ à la surface est également accrue.

Chez les rongeurs, les hétéromères μ - δ contribuent à la nociception thermique et mécanique. En effet, l'amélioration de l'analgésie thermique induite par une dose suboptimale de morphine en présence de l'antagoniste δ TIPP ψ suggère une modulation allostérique positive de la liaison des ligands et de la signalisation du récepteur μ [11]. L'injection intrathécale d'un peptide interférent correspondant à l'extrémité C-terminale de δ , rétablit l'hypersensibilité à la douleur chez

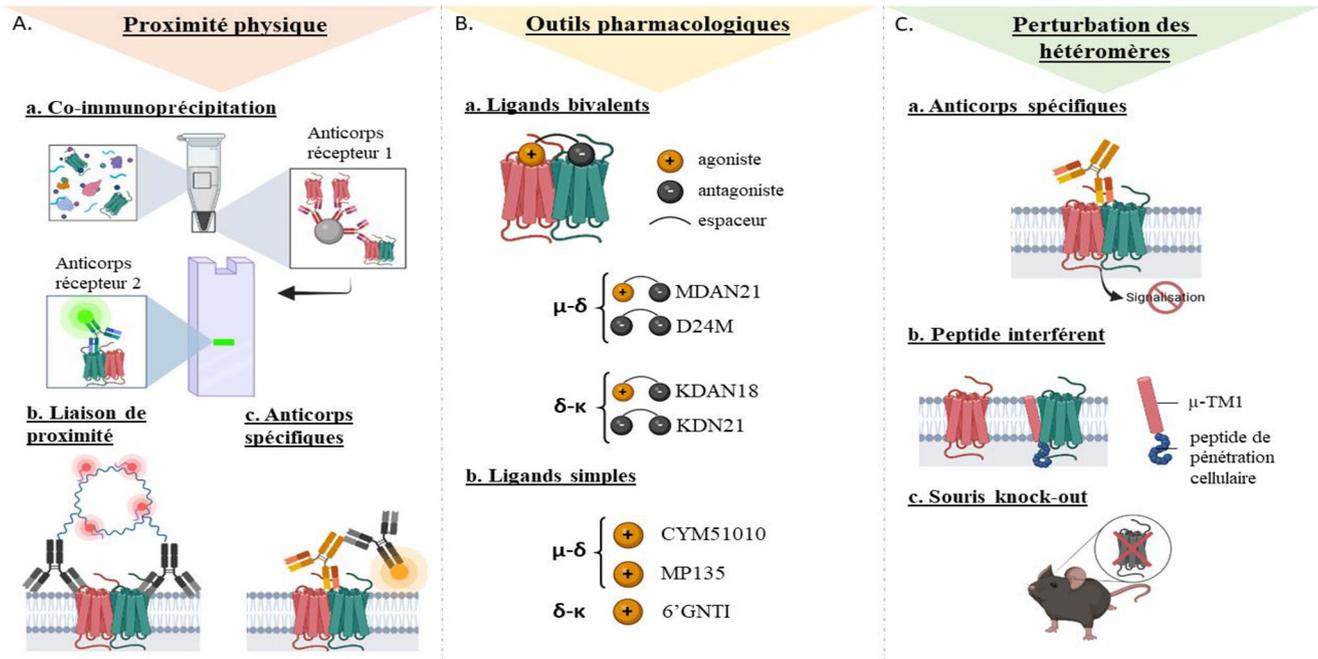


Fig. 1 Techniques et outils essentiels à l'étude des hétéromères. Des techniques permettent de démontrer la proximité physique (A). La co-immunoprécipitation (a) consiste à précipiter le complexe protéique d'intérêt grâce à un anticorps spécifique d'un des récepteurs, puis de les révéler par la technique du Western blot grâce à un anticorps spécifique de l'autre récepteur. Dans la technique de la liaison de proximité (b), des anticorps spécifiques de chaque récepteur sont fusionnés à de petites séquences d'ADN complémentaires qui, si elles sont suffisamment proches (<40nm), vont se circulariser. L'ajout d'une enzyme de réplication va permettre l'amplification de cette séquence qui sera ensuite reconnue par des sondes fluorescentes. Des anticorps monoclonaux spécifiques des hétéromères (c) permettent leur détection directe par immunofluorescence. Une manière d'étudier les propriétés spécifiques des hétéromères consiste en l'usage d'outils pharmacologiques (B) tels que les ligands bivalents (a) qui sont constitués de deux ligands, chacun sélectif pour un des récepteurs, reliés entre eux par une chaîne carbonée de longueur définie nommée espaceur. Des ligands simples (b), sous la forme de petites molécules sélectives des hétéromères ont aussi été développés. La dissociation physique ou le blocage des hétéromères (C) permet de distinguer les propriétés liées aux hétéromères des propriétés liées au récepteurs parents. Des anticorps spécifiques (a) des hétéromères permettent de bloquer la signalisation induite par ceux-ci. Des peptides interférents (b) composés d'un peptide de pénétration cellulaire fusionné à un segment du récepteur participant à l'interface de contact, permettent la dissociation physique des hétéromères. Des souris knock-out (c) permettent de discerner les propriétés liées à la co-expression des récepteurs des propriétés induites par les récepteurs seuls. Figure créée avec Biorender.com

des souris en rémission dans des modèles de douleur neuropathique chimio-induite par le cisplatine et de douleur inflammatoire post-chirurgicale [12]. Cela suggère que, chez la souris, les hétéromères μ - δ participent à la sensibilisation latente à la douleur. Par ailleurs, des interactions fonctionnelles entre les récepteurs μ et δ ont aussi été mises en évidence dans la RVM et dans le système nerveux entérique. En effet, la co-administration de l'agoniste μ DAMGO et de l'agoniste δ deltorphine II dans la RVM de rats naïfs entraîne une augmentation synergique des seuils nociceptifs mécaniques [13]. Il convient de noter que des interactions fonctionnelles entre μ et δ interviennent également dans le système nerveux entérique où la proximité physique des récepteurs μ et δ a été établie [14]. Ces effets pourraient résulter de l'activation de l'hétéromère μ - δ , bien que des interactions au niveau cellulaire ou au niveau des circuits ne puissent être exclues.

L'étude de l'implication des hétéromères dans les états douloureux, qu'ils soient aigus ou chroniques, a largement bénéficié du développement de ligands les ciblant, petites molécules ou ligands bivalents. Parmi les petites molécules, le CYM51010 induit une analgésie thermique efficace chez la souris avec une dépendance physique et une tolérance plus faibles par rapport à la morphine [15]. Dans le modèle de ligature du nerf spinal, le CYM51010 soulage l'allodynie mécanique et thermique même chez des rats et des souris traités de façon chronique avec de la morphine [16]. Le CYM51010 [15] tout comme l'eluxadoline, présente une signalisation réduite en présence d'anticorps sélectifs μ - δ [14-16] et une efficacité moindre chez les souris déficientes pour le récepteur δ ou μ [14,16] suggérant que ces composés se lient aux hétéromères μ - δ . Cependant, le CYM51010 et l'eluxadoline peuvent tous deux activer les récepteurs δ [17]

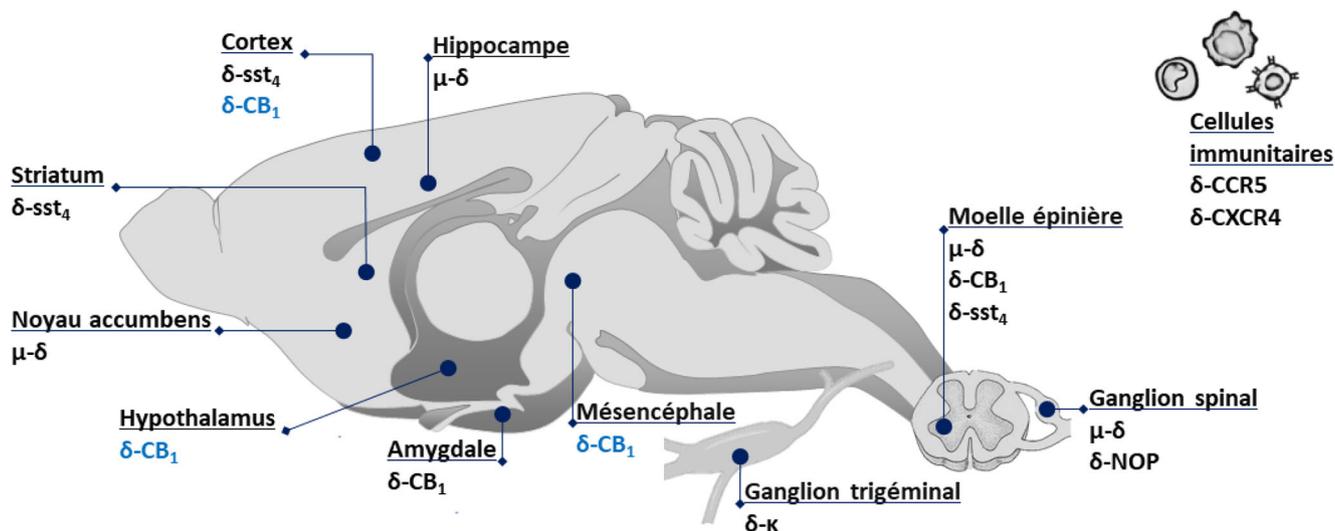


Fig. 2 Distribution des hétéromères impliquant le récepteur δ chez les rongeurs. La proximité physique entre les récepteurs a été établie dans le système nerveux et le système immunitaire en condition basale (noir) ou en condition de douleur chronique (bleu)

ou μ [14,15] exprimés seuls et l'effet analgésique du CYM51010 résulte partiellement de l'activation de récepteurs μ non associés [15]. Il est à noter que l'eluxadoline a été récemment approuvée par l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) pour le traitement du syndrome du côlon irritable (FDA n°206940) mais a ensuite été retirée du marché en raison de fréquentes pancréatites aiguës. Une étude récente décrit le MP135, un dérivé de l'agoniste μ carfentanyl, qui présente une plus grande sélectivité pour les hétéromères μ - δ et produit une antinociception thermique aiguë efficace chez l'animal naïf. Toutefois, il conserve les effets indésirables de la molécule dont il est dérivé puisqu'il possède des propriétés récompensantes et induit de la dépression respiratoire [18]. Le développement de petites molécules sélectives des hétéromères μ - δ reste donc un défi majeur.

Du côté des ligands bivalents, les ligands MDAN19 et 21 sont composés d'oxymorphone, agoniste μ , et de naltrindole, antagoniste δ , reliés entre eux par une chaîne de 19 et 21 carbones respectivement. L'administration intra-cérébro-ventriculaire aiguë ou chronique de MDAN19 ou de MDAN21 présente une puissance antinociceptive thermique accrue par rapport à la morphine, sans développement de tolérance ni de dépendance physique chez la souris [19]. Par ailleurs, l'administration intraveineuse de MDAN19 ou 21 n'induit pas de préférence de place conditionnée ni de rétablissement d'un comportement de recherche de drogue chez des souris abstinentes traitées à la morphine, ce qui suggère l'absence de propriétés récompensantes [20]. Ceci est vraisemblablement dû à l'incapacité de ces composés à passer la barrière hématoencéphalique et donc à induire des effets centraux. Il est cependant à noter que l'injection intra-

musculaire de MDAN21 entraîne une antinociception thermique variable chez le macaque rhésus [21] ce qui remet en question son intérêt thérapeutique.

Plus récemment, le D24M, un ligand bivalent reliant l'antagoniste δ Tyr-Tic-OH à l'antagoniste μ de faible affinité H-Tyr-Pro-Phe-D1Nal-NH₂, a été proposé comme un antagoniste sélectif des hétéromères μ - δ [22]. *In vivo*, ce composé bloque de manière dose-dépendante l'analgésie thermique induite par le CYM51010 ou la deltorphine II qui ciblent tous deux les hétéromères μ - δ endogènes [15–17,22,23]. Le D24M augmente l'antinociception induite par l'oxymorphone, décrite par les auteurs comme un agoniste des hétéromères μ - δ , chez des souris naïves mais aussi dans un modèle de douleur neuropathique induite par la chimiothérapie et dans un modèle de douleur inflammatoire post-chirurgicale. L'absence d'effet d'antagonistes sélectifs de μ ou de δ dans ces mêmes conditions suggère une implication des hétéromères μ - δ . Par ailleurs cet effet semble impliquer les protéines-kinases Ca²⁺/calmoduline-dépendante (CaMKII) et Src [24]. L'administration intra-cérébro-ventriculaire de D24M, suite à l'administration aiguë et chronique de morphine, réduit également les symptômes d'un sevrage précipité par la naloxone [22].

Les propriétés fonctionnelles des hétéromères μ - δ (Fig. 3) ont principalement été étudiées dans des cellules co-transfectées. Toutefois, de plus en plus de données indiquent que l'hétéromérisation μ - δ affecte les propriétés de liaison du ligand et modifie la signalisation et le trafic intracellulaire des récepteurs μ en environnement natif. Une coopérativité positive a été mise en évidence dans les neuroblastomes SKNSH, où la liaison d'un ligand à l'un des récepteurs augmente l'affinité des agonistes pour l'autre

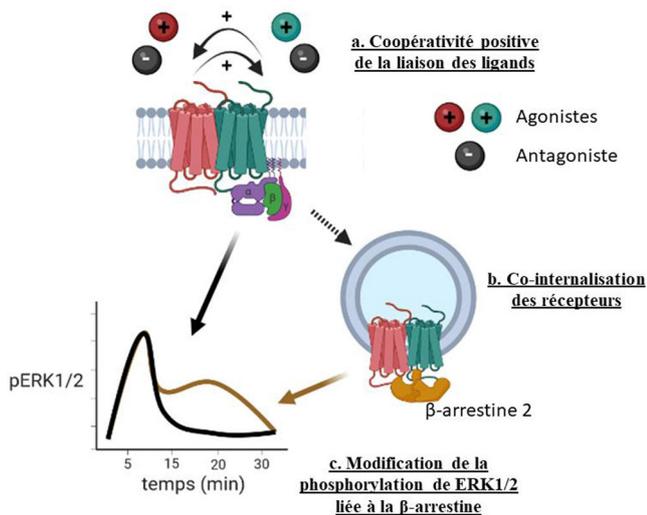


Fig. 3 Propriétés fonctionnelles des hétéromères μ - δ . La liaison d'un ligand, agoniste ou antagoniste, à un récepteur facilite la liaison de l'agoniste à l'autre récepteur ce qui traduit une coopérativité positive (a). Par ailleurs, l'activation des hétéromères μ - δ par un agoniste sélectif entraîne leur co-intériorisation dépendante de la β -arrestine 2 (b) et leur co-dégradation dans le compartiment lysosomal. Cette co-intériorisation s'accompagne d'une modification de la cinétique de phosphorylation de ERK1/2 (pERK1/2) (c) qui se prolonge dans le temps. Figure créée avec Biorender.com

(Fig. 3a) [11,25]. La coopérativité positive au sein de l'hétéromère μ - δ pourrait également expliquer l'hyperpolarisation neuronale accrue observée dans les neurones de l'aire tegmentale ventrale (ATV) suite à la co-application de ligands μ et δ [26]. Cette coopérativité positive conduit à une augmentation significative de la puissance et/ou de l'efficacité des agonistes μ en terme de signalisation des protéines G dans des préparations membranaires de moelle épinière [11], de phosphorylation des protéines kinases associées à des signaux mitogènes (MAPK) en cellules SKNSH [25] ou d'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants dans des neurones des ganglions rachidiens [27]. Ces effets disparaissent en l'absence du récepteur δ [11,27] ou en présence d'anticorps spécifiques des hétéromères μ - δ [28]. Par ailleurs, le trafic intracellulaire du récepteur μ après activation par un agoniste implique son recyclage rapide à la membrane plasmique [5]. Cependant dans les neurones primaires de l'hippocampe, l'administration de CYM51010 entraîne la co-dégradation des récepteurs μ et δ dans le compartiment lysosomal, suggérant que l'hétéromérisation μ - δ modifie le devenir intracellulaire du récepteur μ (Fig. 3b) [17]. De la même façon, l'administration de DAMGO ou de deltorphine II en culture d'hippocampe entraîne la co-dégradation lysosomale des récepteurs μ et δ indiquant que ces deux ligands peuvent activer les hétéro-

mères μ - δ [17]. En accord avec ces observations, l'administration de DAMGO ou de deltorphine II en neuroblastomes SKNSH s'accompagne d'une augmentation de la durée de la phosphorylation des kinases régulées par les signaux extracellulaires ERK1/2 (Fig. 3c). Celle-ci est absente dans des cellules prétraitées par un ARN interférent ciblant le récepteur μ ou en présence d'un antagoniste μ ou δ [29]. Le *knock-down* de la β -arrestine 2 abolit également cette prolongation de la phosphorylation ERK1/2 [29]. Le recrutement de la β -arrestine initiant l'intériorisation des récepteurs dans des vésicules de clathrine, ce changement du profil de phosphorylation est en accord avec une signalisation par les hétéromères μ - δ internalisés [30].

Hétéromères δ - κ

La proximité physique entre les récepteurs δ et κ a été établie dans les ganglions trigéminaux (Fig. 2) au niveau desquels les antagonistes κ seraient capables de moduler de façon allostérique l'activité du récepteur δ [31]. En revanche, les hétéromères δ - κ seraient peu abondants au niveau central et ne seraient présents, en condition basale, que dans trois structures cérébrales du circuit nociceptif, à savoir la PAG, l'amygdale et le thalamus [32]. Dans des cultures de ganglions trigéminaux de rat, certains antagonistes κ modulent l'activité de l'adénylate cyclase induite par des agonistes du récepteur δ [31], suggérant une modulation allostérique entre les deux récepteurs.

Chez le rat, l'antagoniste κ nor-BNI augmente l'effet analgésique d'une dose infraliminaire de l'agoniste δ DPDPE. L'administration d'anticorps spécifiques δ - κ potentialise encore davantage cet effet [31] mettant en évidence une contribution des hétéromères δ - κ . De même, l'antagoniste δ naltrindole accroît de manière allostérique la puissance analgésique d'une dose non efficace de l'agoniste κ ICI-199441 dans un modèle de douleur inflammatoire [33], indiquant une modulation allostérique positive.

Sur le même modèle que celui décrit pour les ligands bivalents ciblant les hétéromères μ - δ , des ligands bivalents ont également été générés pour cibler les hétéromères δ - κ . Le KDAN 18 relie l'antagoniste δ naltrindole et l'agoniste κ ICI-199441 par un espaceur de 18 carbones [34] tandis que le KDN 21 relie le naltrindole et l'antagoniste κ 5'-GNTI par un espaceur de 21 carbones [35]. Le KDAN18 présente des propriétés analgésiques thermiques tandis que l'administration intrathécale de KDN21 inhibe l'analgésie thermique induite par le DPDPE [35]. Des études, chez des souris n'exprimant pas les récepteurs delta ou kappa montrent que l'effet analgésique du KDAN18 nécessite la présence des deux récepteurs. De même, les propriétés antagonistes du KDN21 sont abolies chez les souris déficientes pour le récepteur κ [35], ce qui suggère que ces composés se lient, au moins en partie, aux hétéromères δ - κ .

Au niveau des petites molécules, l'administration intrathécale de 6'-GNTI [36] ou son administration locale intraplantaire dans un modèle de douleur inflammatoire [33] induit une antinociception thermique. Cet effet implique non seulement les récepteurs δ et κ comme le montre la diminution de l'effet antinociceptif chez des souris n'exprimant pas l'un ou l'autre des récepteurs [31,35,37] mais aussi les hétéromères δ - κ car l'utilisation d'un peptide interférent bloque l'analgésie induite par le 6'-GNTI [37]. Toutefois, lorsqu'il est administré par voie intra-cérébro-ventriculaire, aucune antinociception thermique n'est observée, ce qui pourrait s'expliquer par les faibles niveaux d'hétéromères δ - κ détectés dans le cerveau [32]. De surcroît, la *knockdown* des récepteurs δ ou κ bloque la signalisation du 6'-GNTI dans des cultures de ganglions trigéminaux de rat [37]. Collectivement, ces données sont en accord avec l'activation des hétéromères δ - κ par le 6'-GNTI mais la sélectivité de ce ligand pour les hétéromères semble partielle car c'est également un puissant agoniste κ [38].

Hétéromères δ -NOP

La proximité physique entre les récepteurs δ et NOP a été mise en évidence dans les ganglions spinaux de rats [39] (Fig. 2) au sein desquels les récepteurs NOP et δ sont tous deux largement distribués, notamment dans les nocicepteurs A δ et dans les neurones non peptidergiques non myélinisés [9,40]. Cette distribution reflète le rôle des deux récepteurs dans la perception des stimuli nociceptifs mécaniques et la douleur neuropathique. Par ailleurs, le récepteur NOP peut aussi s'associer aux canaux calciques voltage dépendants de type N (CaV2.2) induisant leur inhibition tonique, probablement en raison de l'activité constitutive du récepteur NOP. L'activation du récepteur NOP par son ligand endogène, la nociceptine/OFQ, entraîne également l'inhibition des canaux CaV2.2 ainsi que leur co-internalisation dans le compartiment lysosomal, contribuant ainsi à réduire l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule [39,41]. Ceci suggère que l'hétéromérisation peut être à l'origine d'interactions fonctionnelles plus larges que celles impliquant deux récepteurs en contact direct en générant des plateformes de signalisation au sein desquelles la proximité physique entre plusieurs types de récepteurs et de canaux ioniques pourrait constituer un élément essentiel de la régulation de l'activité neuronale.

Hétéromères des récepteurs opioïdes/non opioïdes impliqués dans la douleur

Des hétéromères impliquant les récepteurs opioïdes δ et les récepteurs CB1 ont été identifiés dans le système nerveux central et périphérique. Tout comme les récepteurs δ , les récepteurs CB1 sont impliqués de manière critique dans la

douleur. L'abondance des hétéromères δ -CB1 est accrue dans le cortex, l'hypothalamus et le mésencéphale de rats dans un modèle de neuropathie induite par ligature du nerf spinal [42] ou dans la moelle épinière de souris dans un modèle de neuropathie périphérique chimio-induite par le paclitaxel [43] (Fig. 2). Par ailleurs, une augmentation de l'abondance des hétéromères δ -CB1 dans la moelle épinière a aussi été décrite dans un modèle murin de neuropathie diabétique induite par la streptozotocine, chez des souris déficientes pour le récepteur μ ayant reçu un traitement chronique à l'hémopressine, décrite par les auteurs comme soulageant l'allodynie [44]. Une hétéromérisation accrue des hétéromères δ -CB1 a également été observée post-mortem dans la moelle épinière de patients souffrant de neuropathie périphérique chimio-induite par le paclitaxel [43].

Dans le cortex de souris naïves, la signalisation du récepteur CB1 est augmentée en l'absence de récepteur δ suggérant que ces derniers agissent comme des modulateurs allostériques négatifs de l'activité du récepteur CB1 [45]. Cependant la modulation allostérique semble différente en condition neuropathique. En effet, dans le cortex de rats ayant subi une ligature du nerf spinal, un prétraitement avec un agoniste ou un antagoniste du récepteur CB1 augmente la liaison et la signalisation de l'agoniste δ DPDPE. Cet effet est bloqué par des anticorps sélectifs de l'hétéromère δ -CB1, ce qui suggère une modulation allostérique positive du récepteur δ au sein de l'hétéromère δ -CB1 dans ces conditions [42]. Par ailleurs, dans un modèle murin de neuropathie périphérique induite par la chimiothérapie, une co-activation par le ligand CB1 Hu210 et le ligand δ SNC80 réduit l'allodynie mécanique de manière synergique. Cette augmentation des seuils nociceptifs mécaniques est également abolie en présence d'anticorps spécifiques des hétéromères δ -CB1, suggérant l'implication de ces derniers dans l'effet anti-allodynique observé [43]. En revanche, dans un modèle murin de neuropathie induite par le diabète, l'utilisation d'agoniste CB1 n'affecte pas la signalisation du récepteur δ dans la moelle épinière [44]. Toutefois, dans ce modèle, la présence d'hétéromères δ -CB1 a été mise en évidence uniquement chez des souris n'exprimant pas le récepteur μ et pourrait résulter d'un phénomène de compensation lié à l'absence de ce récepteur. Ainsi, l'absence d'effet synergique pourrait révéler une expression faible, voire inexistante, des hétéromères δ -CB1 dans la moelle épinière de souris sauvage souffrant de neuropathie diabétique induite par la streptozotocine [44].

Enfin une hétéromérisation entre récepteurs δ et à la somatostatine sst4 a été décrite dans le striatum, le cortex et la moelle épinière de rat [46] (Fig. 2). Ces hétéromères méritent une étude plus approfondie car les récepteurs sst4 ont eux aussi un rôle établi dans la douleur chronique [47].

Hétéromères opioïdes / non opioïdes impliqués dans l'immunité

Des hétéromères impliquant les récepteurs δ et les récepteurs aux chimiokines CXCR4 et CCR5 ont été identifiés dans des cellules immunitaires. Plus particulièrement, les hétéromères δ -CXCR4 sont présents chez l'humain dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) et les monocytes [48] (Fig. 2), mais aussi chez la souris dans le tissu cérébral et dans des cultures primaires de glie [49]. L'existence d'hétéromères δ -CCR5 a, quant à elle, été suggérée dans des PBMC de souris mais aussi dans une lignée de cellules immunitaires humaines composées de lymphoblastes B et T [50].

Au niveau fonctionnel, l'agoniste des récepteurs CXCR4, le CXCL12 augmente la migration des cellules, leur adhésion mais aussi l'inhibition de l'AMPC induite par les protéines Gi/o. Cependant la co-application de DPDPE diminue l'effet du CXCL12 [48] suggérant une modulation allostérique négative entre les récepteurs. Bien que leur rôle dans la douleur chronique n'ait pas été examiné, ces hétéromères pourraient toutefois jouer un rôle dans l'inflammation, le recrutement des cellules immunitaires sur les sites de lésion et la sensibilisation à la douleur.

Éléments à prendre en compte lors de l'étude des hétéromères impliquant le récepteur δ

L'étude des hétéromères impliquant les récepteurs δ *in vivo* reste extrêmement difficile en raison de leur distribution discrète dans le système nerveux et de leur co-existence avec les récepteurs parents individuels. De plus, une expression accrue et une distribution plus large ont été rapportées pour plusieurs hétéromères dans des conditions pathologiques. Ceci suggère que cet aspect est essentiel lors de l'exploration du rôle fonctionnel des hétéromères et de leur pertinence thérapeutique mais reste encore peu pris en considération dans les études actuelles.

La quantité limitée de données recueillies jusqu'à présent pour confirmer l'impact fonctionnel des hétéromères *in vivo* met en lumière le manque d'outils sélectifs permettant d'identifier leurs propriétés et de les différencier des interactions entre récepteurs qui ont lieu au niveau des cascades de signalisation ou des circuits neuronaux. Ainsi, des ligands hautement sélectifs et présentant une bonne biodisponibilité sont nécessaires pour explorer et exploiter leur potentiel en tant que cibles médicamenteuses pour des stratégies thérapeutiques améliorées en clinique. En effet, bien que les ligands bivalents combinant un agoniste et un antagoniste, tels que MDAN (μ - δ) ou KDAN (δ -k), induisent des réponses antinociceptives, les mécanismes moléculaires restent inconnus. Ces ligands fournissent-ils une réponse mixte correspondant à l'effet de chaque ligand séparément ou génèrent-ils une signa-

lisation différente ? L'utilisation de ligands bivalents reliant deux antagonistes, comme le D24M, devrait offrir une interprétation moins ambiguë. Par ailleurs, les ligands bivalents ont une capacité limitée à traverser la barrière hémato-encéphalique. Ceci explique probablement l'absence d'effets récompensant lorsqu'ils sont administrés par voie systémique, ce qui peut être considéré comme un avantage par rapport aux petites molécules opiacées. Cependant, le ciblage restreint des hétéromères périphériques peut s'avérer insuffisant pour obtenir une réponse antinociceptive maximale. En outre, une biodisponibilité réduite au niveau central empêche la modulation des mécanismes sensoriels impliqués dans les aspects émotionnels et cognitifs, ce qui limite leur potentiel en clinique. Les petites molécules opiacées ciblant les hétéromères conservent quant à elles une affinité et une activité, au moins partielle, pour les récepteurs non hétéromérisés. L'optimisation de leur sélectivité représente par conséquent un défi pharmacologique majeur.

Conclusion

In vivo, le rôle des hétéromères impliquant les récepteurs δ reste à ce jour mal compris. Les principales limitations proviennent du peu d'outils disponibles pour établir la proximité physique (absence d'anticorps, distribution neuroanatomique discrète) et de la présence de récepteurs parents fonctionnels. Les résultats de plusieurs approches (knock-out conditionnel, pharmacologie, peptide interférent), chacune ayant ses propres limites, doivent être confrontés. Malgré ces limitations, un nombre croissant d'observations vient étayer l'existence de propriétés fonctionnelles spécifiques. De plus, la régulation dynamique de leur expression dans des conditions physiopathologiques telles que l'augmentation durable des hétéromères μ - δ suite à l'administration chronique de morphine ou dans des conditions de douleur chronique suggère que leurs rôles restent largement inexplorés. Tout ceci les désigne comme des cibles thérapeutiques prometteuses générant moins d'effets indésirables. Il est donc urgent de développer des composés sélectifs pour explorer et exploiter les propriétés thérapeutiques des hétéromères opioïdes, en particulier pour pallier le manque de stratégies efficaces pour traiter divers états douloureux chroniques.

Remerciements Ce travail a été financé par le CNRS et l'Université de Strasbourg. M. Gaborit est une étudiante en thèse affiliée à l'École Universitaire de Recherche Interdisciplinaire sur la Douleur : EURIDOL (école d'excellence, PIA, ANR-17-EURE-0022) et bénéficie d'une bourse doctorale de la Fondation de l'Université de Strasbourg

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

Références

- Raja SN, Carr DB, Cohen M, et al (2020) The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* 161:1976–82
- Treede RD, Rief W, Barke A, et al (2019) Chronic pain as a symptom or a disease: The IASP classification of chronic pain for the international classification of diseases (ICD-11). *Pain* 160:19–27
- Kremer M, Salvat E, Muller A, et al (2016) Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. *Neuroscience* 338:183–206
- Busserolles J, Lolignier S, Kerckhove N, et al (2020) Replacement of current opioid drugs focusing on MOR-related strategies. *Pharmacol Ther* 210:107519
- Stein C (2016) Opioid Receptors. *Annu Rev Med* 67:433–51
- Quirion B, Bergeron F, Blais V, Gendron L (2020) The Delta-Opioid Receptor; a Target for the Treatment of Pain. *Front Mol Neurosci* 13:52
- Berthiaume S, Abdallah K, Blais V, Gendron L (2020) Alleviating pain with delta opioid receptor agonists: evidence from experimental models. *J Neural Transm* 127:661–72
- Vicente-Sanchez A, Segura L, Pradhan AA, et al (2016) The delta opioid receptor tool box. *Neuroscience* 338:145–59
- Ceredig RA, Pierre F, Doridot S, et al (2018) Peripheral delta opioid receptors mediate duloxetine antiallodynic effect in a mouse model of neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 48:2231–46
- Gaborit M, Massotte D (2021) Therapeutic potential of opioid receptor heteromers in chronic pain and associated comorbidities. *Br J Pharmacol*. doi: 10.1111/bph.15772 [Online ahead of print]
- Gomes I, Gupta A, Filipovska J, et al (2004) A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5135–39
- Inyang KE, George SR, Laumet G (2021) The μ - δ opioid heteromer masks latent pain sensitization in neuropathic and inflammatory pain in male and female mice. *Brain Res* 1756:147298
- Sykes KT, White SR, Hurley RW, et al (2007) Mechanisms responsible for the enhanced antinociceptive effects of μ -opioid receptor agonists in the rostral ventromedial medulla of male rats with persistent inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther* 322:813–21
- Fujita W, Gomes I, Dove LS, et al (2014) Molecular characterization of eluxadolone as a potential ligand targeting mu-delta opioid receptor heteromers. *Biochem Pharmacol* 92:448–56
- Gomes I, Fujita W, Gupta A, et al (2013) Identification of a mu-delta opioid receptor heteromer-biased agonist with antinociceptive activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:12072–7
- Tiwari V, He SQ, Huang Q, et al (2020) Activation of μ - δ opioid receptor heteromers inhibits neuropathic pain behavior in rodents. *Pain* 161:842–55
- Faouzi A, Uprety R, Gomes I, et al (2020) Synthesis and pharmacology of a novel mu-delta opioid receptor Heteromer-selective agonist based on the Carfentanyl template. *J Med Chem* 63:13618–37
- Derouiche L, Pierre F, Doridot S, et al (2020) Heteromerization of endogenous mu and Delta opioid receptors induces ligand-selective co-targeting to lysosomes. *Molecules* 25:4493–506
- Daniels DJ, Lenard NR, Etienne CL, et al (2005) Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19208–13
- Aceto MD, Harris LS, Negus SS, et al (2012) MDAN-21: A bivalent opioid ligand containing mu-agonist and delta-antagonist pharmacophores and its effects in rhesus monkeys. *Int J Med Chem* 2012:327257
- Lenard NR, Daniels DJ, Portoghese PS, Roerig SC (2007) Absence of conditioned place preference or reinstatement with bivalent ligands containing mu-opioid receptor agonist and delta-opioid receptor antagonist pharmacophores. *Eur J Pharmacol* 566:75–82
- Olson KM, Keresztes A, Tashiro JK, et al (2018) Synthesis and evaluation of a novel bivalent selective antagonist for the Mu-Delta opioid receptor heterodimer that reduces Morphine withdrawal in mice. *J Med Chem* 61:6075–86
- Morgan MM, Peecher DL, Streicher JM (2021) Use of home cage wheel running to assess the behavioural effects of administering a mu/delta opioid receptor heterodimer antagonist for spontaneous morphine withdrawal in the rat. *Behav Brain Res* 397:112953
- Keresztes A, Olson K, Nguyen P, et al (2022) Antagonism of the mu-delta opioid receptor heterodimer enhances opioid antinociception by activating Src and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II signaling. *Pain* 163:146–58
- Gomes I, Jordan BA, Gupta A, et al (2000) Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* 20:1–5
- Margolis EB, Fujita W, Devi LA, Fields HL (2017) Two delta opioid receptor subtypes are functional in single ventral tegmental area neurons, and can interact with the mu opioid receptor. *Neuropharmacology* 123:420–32
- Walwyn W, John S, Maga M, et al (2009) Delta receptors are required for full inhibitory coupling of mu-receptors to voltage-dependent Ca^{2+} channels in dorsal root ganglion neurons. *Mol Pharmacol* 76:134–43
- Gupta A, Mulder J, Gomes I, et al (2010) Increased abundance of opioid receptor heteromers after chronic morphine administration. *Sci Signal* 3:ra54
- Rozenfeld R, Devi LA (2007) Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: Beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *The FASEB J* 21:2455–65
- Eichel K, von Zastrow M (2018) Subcellular organization of GPCR signaling. *Trends Pharmacol Sci* 39:200–8
- Berg KA, Rowan MP, Gupta A, et al (2012) Allosteric interactions between delta and kappa opioid receptors in peripheral sensory neurons. *Mol Pharmacol* 81:264–272.
- Yoo JH, Bailey A, Borsodi A, et al (2014) Knockout subtraction autoradiography: a novel ex vivo method to detect heteromers finds sparse KOP receptor/DOP receptor heterodimerization in the brain. *Eur J Pharmacol* 731:1–7
- Jacobs BA, Pando MM, Jennings EM, et al (2019) Signaling characteristics and functional regulation of delta opioid-kappa opioid receptor (DOP-KOP) heteromers in peripheral sensory neurons. *Neuropharmacology* 151:208–18
- Daniels DJ, Kulkarni A, Xie Z, et al (2005) A bivalent ligand (KDAN-18) containing delta-antagonist and kappa-agonist pharmacophores bridges delta2 and kappa1 opioid receptor phenotypes. *J Med Chem* 48:1713–6
- Ansonoff MA, Portoghese PS, Pintar JE (2010) Consequences of opioid receptor mutation on actions of univalent and bivalent kappa and delta ligands. *Psychopharmacology* 210:161–8
- Waldhoer M, Fong J, Jones RM, et al (2005) A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9050–5
- Jacobs BA, Pando MM, Jennings E, et al (2018) Allosterism within delta opioid-kappa opioid receptor Heteromers in peripheral sensory neurons: Regulation of kappa opioid agonist efficacy. *Mol Pharmacol* 93:376–86

38. Rives ML, Rossillo M, Liu-Chen LY, Javitch JA (2012) 6'-Guanidinonaltrindole (6'-GNTI) is a G protein-biased kappa-opioid receptor agonist that inhibits arrestin recruitment. *J Biol Chem* 287:27050–4
39. Evans RM, You H, Hameed S, et al (2010) Heterodimerization of ORL1 and opioid receptors and its consequences for N-type calcium channel regulation. *J Biol Chem* 285:1032–40
40. Ozawa A, Brunori G, Mercatelli D, et al (2015) Knock-In Mice with NOP-eGFP Receptors Identify Receptor Cellular and Regional Localization. *J Neurosci* 35:11682–93
41. Altier C, Khosravani H, Evans RM, et al (2006) ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. *Nat Neurosci* 9:31–40
42. Bushlin I, Gupta A, Stockton SD Jr, et al (2012) Dimerization with cannabinoid receptors allosterically modulates delta opioid receptor activity during neuropathic pain. *PLoS One* 7:e49789
43. Sierra S, Gupta A, Gomes I, et al (2019) Targeting cannabinoid 1 and Delta opioid receptor Heteromers alleviates chemotherapy-induced neuropathic pain. *ACS Pharmacol Transl Sci* 2:219–29
44. Toniolo EF, Gupta A, Franciosi AC, et al (2022) Interactions between cannabinoid and opioid receptors in a mouse model of diabetic neuropathy. *Pain* 163:1414–23
45. Rozenfeld R, Bushlin I, Gomes I, et al (2012) Receptor heteromerization expands the repertoire of cannabinoid signaling in rodent neurons. *PLoS One* 7:e29239
46. Somvanshi RK, Kumar U (2014) Delta-opioid receptor and somatostatin receptor-4 heterodimerization: Possible implications in modulation of pain associated signaling. *PLoS One* 9:e85193
47. Kántás B, Börzsei R, Szőke É, et al (2019) Novel drug-like somatostatin receptor 4 agonists are potential analgesics for neuropathic pain. *Int J Mol Sci* 20:6245–61
48. Pello OM, Martínez-Muñoz L, Parrillas V, et al (2008) Ligand stabilization of CXCR4/delta-opioid receptor heterodimers reveals a mechanism for immune response regulation. *Eur J Immunol* 38:537–49
49. Burbassi S, Sengupta R, Meucci O (2010) Alterations of CXCR4 function in mu-opioid receptor-deficient glia. *Eur J Neurosci* 32:1278–88
50. Suzuki S, Chuang LF, Yau P, Doi RH, Chuang RY (2002) Interactions of opioid and chemokine receptors: Oligomerization of mu, kappa, and delta with CCR5 on immune cells. *Exp Cell Res* 280:192–200

REVUE 2

THEMED ISSUE REVIEW

Therapeutic potential of opioid receptor heteromers in chronic pain and associated comorbidities

Marion Gaborit | Dominique Massotte 

Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg, France

Correspondence

Dominique Massotte, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg, France.
Email: d.massotte@unistra.fr

Funding information

Centre National de la Recherche Scientifique; EURIDOL Graduate school of Pain, Grant/Award Number: school of excellence, PIA, ANR-17-EURE-0022; Université de Strasbourg

Chronic pain affects 20% to 45% of the global population and is often associated with the development of anxio-depressive disorders. Treatment of this debilitating condition remains particularly challenging with opioids prescribed to alleviate moderate to severe pain. However, despite strong antinociceptive properties, numerous adverse effects limit opioid use in the clinic. Moreover, opioid misuse and abuse have become a major health concern worldwide. This prompted efforts to design original strategies that would efficiently and safely relieve pain. Targeting of opioid receptor heteromers is one of these. This review summarizes our current knowledge on the role of heteromers involving opioid receptors in the context of chronic pain and anxio-depressive comorbidities. It also examines how heteromerization in native tissue affects ligand binding, receptor signaling and trafficking properties. Finally, the therapeutic potential of ligands designed to specifically target opioid receptor heteromers is considered.

LINKED ARTICLES: This article is part of a themed issue on Advances in Opioid Pharmacology at the Time of the Opioid Epidemic. To view the other articles in this section visit <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.v180.7/issuetoc>

KEYWORDS

drug discovery/target validation, GPCR, heteromers, ligands, neuropharmacology, opioids, pain

1 | INTRODUCTION

According to the International Association for the Study of Pain (IASP), pain is an unpleasant sensory and emotional experience

associated with actual or potential tissue damage (Raja et al., 2020). This complex phenomenon involves sensory, emotional and cognitive dimensions that can be influenced by factors such as emotional state, attention, culture or personal experience. In physiological conditions,

Abbreviations: 5'-GNTI, 5'-guanidinonaltrindole; 6'-GNTI, 6'-guanidinonaltrindole; Acb, nucleus accumbens; BLA, basolateral amygdala; Co-IP, co-immunoprecipitation; CPP, conditioned place preference; CREB, cAMP response element-binding protein; CTOP, D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂; CYM51010, 1-4-(acetylamino)phenylmethyl-4-(2-phenylethyl)-4-piperidinecarboxylic acid ethyl ester; DAMGO, [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly⁻]-enkephalin; DAPTA, D-Ala-peptide T-amide; DPDPPE, D-Pen^{2,5}-enkephalin; DRG, dorsal root ganglia; ER, endoplasmic reticulum; FCS, fluorescence correlation spectroscopy; HU210, (6aR-trans-3-(1, 1-dimethylheptyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-hydroxy-6,6-dimethyl-6H-dibenzob, dpyran-9-methanol; i.p.l., intraplantar; IASP, international association for the study of pain; Iba1, allograft inflammatory factor 1; ICI-199441, 2-(3,4-dichlorophenyl)-N-methyl-N-[(1S)-1-phenyl-2-(1-pyrrolidinyl)ethyl]acetamide hydrochloride; ISH, in situ hybridization; JWH-018, (1-pentyl-3-[1-naphthoyl]indole); LC, locus coeruleus; M40, 1R,2S)-2-[[N-[(benzyloxy)carbonyl]-3-cyclohexyl-L-alanyl]amino]-1-hydroxy-3-[(3S)-2-oxopyrrolidin-3-yl]propane-1-sulfonic acid; MCL101, (-)-3-hydroxy-N-cyclobutylmethylmorphinan S(+)-mandelate; NMR, nuclear magnetic resonance; NNNTA, N-naphthoyl-β-naltrexamine; nor-BNI, norbinaltorphimine; PAG, periaqueductal grey; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PD-PALM, photoactivatable dyes photo-activated localization microscopy; PF-514273, 2-(2-chlorophenyl)-3-(4-chlorophenyl)-7-(2,2-difluoropropyl)-6,7-dihydro-2H-pyrazolo[3,4-f][1,4]oxazepin-8(5H)-one; PFC, prefrontal cortex; PLA, proximity ligation assay; RVM, rostral ventromedial medulla; SC, spinal cord; SNC80, (+)-4-[(αR)-α-[(2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl]-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide; Sol, nucleus of the solitary tract; SRI22141, 5'-(4-chlorophenyl)-6,7-didehydro-4,5α-epoxy-3-hydroxy-17-methyl-14-(3-phenylpropoxy)pyrido[2',3':6,7]morphinan; STED, stimulated emission depletion; TAK-220, 1-acetyl-N-[3-[4-[[4-(aminocarbonyl)phenyl]methyl]-1-piperidinyl]propyl]-N-(3-chloro-4-methylphenyl)-4-piperidinecarboxamide; TAT, transactivating transcriptional activator; TIPPψ, (2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(3S)-2-[[[(2S)-2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoyl]-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-3-yl]methylamino]-3-phenylpropanoyl]amino]-3-phenylpropanoic acid; TG, trigeminal ganglia; TM, transmembrane domain; UFP512, (3S)-3-[[[(3S)-2-[[[(2S)-2-amino-3-(4-hydroxy-2,6-dimethylphenyl)propanoyl]-3,4-dihydro-1H-isoquinoline-3-carbonyl]amino]-3-(1H-benzimidazol-2-yl)propanoic acid; VTA, ventral tegmental area.

pain serves a protective role but becomes pathological when persisting or recurring for more than 3 months (Treede et al., 2019). Chronic pain is thus a debilitating condition interfering with daily life (Breivik et al., 2013) and often coincides with the development of major depressive disorder with a comorbid prevalence around 50% (see Bair et al., 2003). Because it affects between 20 to 45% of the global population (Breivik et al., 2013), treating chronic pain is of primary importance. Treatments commonly prescribed to treat acute pain are often minimally effective. Tricyclic antidepressants, such as **amitriptyline** or selective 5-HT-noradrenaline reuptake inhibitors, such as **duloxetine** and **venlafaxine**, and also antiepileptics such as the gabapentinoids (**pregabalin** or **gabapentin**) are recommended as first-line treatments. Second- and third-line treatments include weak (**tramadol**) and strong (**oxycodone** and **morphine**) opioids (see Kremer et al., 2016). However, opioid treatments frequently produce unwanted side effects, resulting from both acute (respiratory depression, nausea, dizziness, sedation, and constipation) and long-term (tolerance, hyperalgesia, and dependence) use. In the USA and Canada, the growing need to treat chronic pain has increased prescription opioid use, leading to a dramatic rise in misuse, abuse, and drug overdose mortality (see Busserolles et al., 2020; Kremer et al., 2016). This so-called opioid crisis (or epidemic) has prompted numerous efforts to design innovative strategies that would combine efficient pain relief with safe usage.

Studies using mice deficient in the **μ opioid receptor** revealed that this receptor is the primary molecular target of opioids, mediating both analgesic and unwanted side effects (Matthes et al., 1996). This GPCR not only activates G protein dependent signalling cascades, but also those dependent on β -arrestin. In β -arrestin 2 knockout animals, morphine-induced analgesia was enhanced with a diminution of tolerance, constipation and respiratory depression (Bohn et al., 2000; Raehal et al., 2005) raising hopes that biased agonists favouring G-protein signalling would improve morphine analgesia while decreasing unwanted effects. However, this strategy proved deceptive and the concept of G protein-biased strategy and its therapeutic relevance are currently debated. Indeed, constipation and respiratory depression were observed in genetically modified mice with impaired activation of the β -arrestin pathway indicating that these opioid adverse effects depend on activation of G protein dependent signalling cascades (Kliwer et al., 2019). For example, **oliceridine** (TRV-130), recently approved by the FDA (N° 210,730) for severe acute pain in medical environments, shows analgesic potency similar to morphine but retains most of the adverse effects (Altarifi et al., 2017). Recent studies have shown that G protein biased agonists such as oliceridine behave as partial agonists at μ receptors suggesting that the biased activation of G protein signalling reflects the low intrinsic efficacy of these ligands (see Gillis et al., 2020; Singleton et al., 2021).

In response to the urgent need for alternative therapeutic strategies, several lines of research have been explored, including selective activation of peripheral receptors or receptor splice variants, single molecules targeting multiple **opioid receptors**, or strengthening of endogenous opioid peptide action (see Gunther et al., 2018; Machelska & Celik, 2018). In addition, opioid receptor heteromers have also gained attention. These macromolecular complexes are

formed by association of at least two functional receptors with ligand binding, receptor signalling and/or trafficking properties different from those of the individual components. Accordingly, disruption of the close physical proximity between receptors in native tissue drastically alters the specific properties of heteromers (Massotte, 2015). Here, we review current knowledge on the contribution of opioid receptor heteromers to chronic pain states and associated comorbidities, morphine analgesia and side effects. We conclude by examining the therapeutic potential of these compounds.

2 | IN VIVO HETEROMERIZATION

Physical proximity has been demonstrated for a limited number of receptor pairs in the spinal cord, dorsal root ganglia (DRG) and supraspinal structures but also in immune or cancer cells using co-immunoprecipitation, disruption of physical interaction using TAT fused peptides, proximity ligation assay and/or antibodies selective for receptor heteromers (Table 1 and Figure 1). In addition, physical association of the μ and **vasopressin 1B (V_{1B})** receptors is supported by a loss of functional outcome in mice expressing a C-terminal truncated form of the V_{1B} receptor (Koshimizu et al., 2018). Also, physical proximity of the μ and **cannabinoid CB_1** receptors was detected by electron microscopy in striatal synapses (Rodriguez et al., 2001). These two receptor pairs will therefore be discussed here. Other receptor pairs have been reported in co-transfected cells but will not be considered here as, to the best of our knowledge, no information is available regarding in vivo physical proximity (see Ugur et al., 2018).

The heteromerization process remains largely unknown in native environments but involves constitutive association taking place in the endoplasmic reticulum (ER) in co-transfected cells (Décaillot et al., 2008; Fujita et al., 2019; Hasbi et al., 2007; Xie et al., 2009). Biochemical studies based on the use of interfering peptides or mutant receptors pointed to a contact interface involving the μ receptor transmembrane domain (TM) TM1 in heteromers between μ and **δ opioid** receptors (He et al., 2011) or TM5 in **μ -galanin 1 (GAL_1)** heteromeric receptors (Moreno et al., 2017). In addition, the C-terminal tail appeared critical in the heteromerization process of μ - δ (Fan et al., 2005; Kabli et al., 2013; Law et al., 2005; O'Dowd et al., 2012; Walwyn et al., 2009) or **μ -nociceptin (NOP)** receptors (Wang et al., 2005) and the third intracellular loop of the μ or δ receptors in μ - δ heteromerization (Law et al., 2005). Physical association with ion channels has also been identified between μ or **dopamine D_1** receptors and the **GluN1** subunit of the NMDA receptors or between NOP receptors and N-type calcium channels (**$Ca_v2.2$**), pointing to more complex functional interactions (see Section 6) (Table 1).

3 | HETEROMERS AND CHRONIC PAIN

Only four heteromers have been clearly identified as participating in the reduction of the nociceptive signal in chronic pain conditions (Figure 2). Three heteromer receptors (**δ - κ opioid**, **δ - CB_1** , **μ - δ**) involve

TABLE 1 Summary of in vivo distribution, functional and behavioural properties of opioid receptor heteromers

Receptor pair	In vivo physical proximity			Specific properties of native heteromers		
	Tissue	Technique	References	Tissue	Ligand binding, receptor signalling and trafficking	Functional outcome
μ - δ	Mouse Acb, hippocampus, SC, DRG	Co-IP, disruptive peptide	(Ebs et al., 2015; Kabil et al., 2013; Xie et al., 2009)	SKNSH, SC, VTA	Co-activation with an agonist, inverse agonist or antagonist for the other receptor induced bidirectional positive allosteric modulation	Increased analgesia
μ - α_2A	Rat sol: increased in hypertensive rats	Co-IP, PLA	(Sun et al., 2015, 2019)	SC or DRG primary cultures	Negative allosteric modulation. Receptor co-internalization.	Hypertension
μ -AT ₁	Rat sol: increased in hypertensive rats	PLA	(Sun et al., 2019)	SKNSH	Increased β -arrestin signalling	Decreased pain hypersensitivity neuropathic pain remission
μ -CB ₁	Rat striatum	Co-localization by electron microscopy	(Rodriguez et al., 2001)	SKNSH, striatum, Acb	Bidirectional negative allosteric modulation	Neurotogenesis, sciatic nerve regeneration
μ -CCK ₂	Rat SC	Disruptive peptide	(Yang et al., 2018)	SC	Negative allosteric modulation	Increased morphine analgesia

TABLE 1 (Continued)

Receptor pair	In vivo physical proximity			Specific properties of native heteromers		
	Tissue	Technique	References	Tissue	Ligand binding, receptor signalling and trafficking	Functional outcome
μ -CCR5	Human lymphocytes	Co-IP	(Suzuki et al., 2002)	PAG, PMBC	Bidirectional allosteric modulation	Decreased nociception HIV infection
μ -D ₁	Mouse striatum	Co-IP	(Tao et al., 2017)	Striatum	Negative allosteric modulation	Opioid locomotor sensitization
μ -GAL ₁	Rat VTA	Disruptive peptide	(Moreno et al., 2017)	VTA	Co-activation induced bidirectional negative allosteric modulation, unidirectional negative allosteric modulation on Gal1 signalling	Opioid drug reward release
μ -K	Rat SC proestrus females	Co-IP	(Chakrabarti et al., 2010)		Co-activation morphine/dyn1:17 induced synergy	Increased morphine analgesia in females
μ -NMDA	Mouse PAG, cortex, striatum, SC	Co-IP	(Rodriguez-Munoz et al., 2012)	PAG	Unidirectional positive allosteric modulation on mu receptor and unidirectional negative allosteric modulation on NMDA CAMKII pathway	Decreased morphine analgesia, increased morphine tolerance
μ -NOP	Rat DRG	Co-IP	(Evans et al., 2010)			
μ -SST ₂	Human pancreatic cancer cells	Co-IP, FCS	(Jorand et al., 2016; Kharnate et al., 2013)	Pancreatic cancer cells	Co-activation increased β -arrestin signalling, decreased epithelial to mesenchymal transition	Increased cancer metastasis
μ -V _{1b}	Mouse RVM	ISH, truncated V _{1b} receptor	(Koshimizu et al., 2018)	RVM	Increased β -arrestin signalling	Increased morphine tolerance
μ 1D-BB ₂	Mouse SC, disruptive peptide	Co-IP	(Liu, Liu, et al., 2014)	SC, DRG	Positive allosteric modulation on BB ₂ signalling	Morphine induced analgesia
δ -CB ₁	Mouse BLA, mouse and human SC, increased by neuropathic pain in some brain areas	PLA, selective antibody, co-IP	(Bushlin et al., 2012; Sierra et al., 2019) (Degrandmaison et al., 2020)	Cortex	Positive allosteric modulation of CB ₁ ligands (agonist or antagonist) on δ receptor G α signalling	Anti-allodynic effects
δ -CCRS	Human lymphocytes	Co-IP	(Suzuki et al., 2002)	Cortex	Negative allosteric modulation	

TABLE 1 (Continued)

Receptor pair	In vivo physical proximity			Specific properties of native heteromers		
	Tissue	Technique	References	Tissue	Ligand binding, receptor signalling and trafficking	Functional outcome
δ -CXCR4	Human PBMC, mouse brain tissue	Co-IP	(Burbassi et al., 2010; Pello et al., 2008)			
δ - κ	Rat TG	Co-IP, disruptive peptide	(Berg et al., 2012) (Jacobs et al., 2018)	TG primary cultures		Inflammatory nociceptive anti-all
δ -NOP	Rat DRG	Co-IP	(Evans et al., 2010)			
δ -SST ₄	Rat striatum, SC, cortex	FRET, co-IP	(Somvanshi & Kumar, 2014)			
κ -CCR5	Human lymphocytes	Co-IP	(Suzuki et al., 2002)			
κ -NOP	Rat DRG	Co-IP	(Evans et al., 2010)			
κ -NTS ₁	Rat striatum	Co-IP, PLA	(Liu et al., 2016)			
NOP-Cav 2.2 channels	Rat DRG, brain	Co-IP	(Altier et al., 2006)	DRG primary cultures	Nociceptin induced co-internalization	

Abbreviations: Acb, nucleus accumbens; BLA, basolateral amygdala; Co-IP, co-immunoprecipitation; δ , δ opioid; DRG, dorsal root ganglia; FCS, fluorescence correlation spectroscopy; ISH, in situ hybridization; κ , κ opioid; μ , μ opioid; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NOP, nociceptin; NTS, neurotensin; PAG, periaqueductal gray; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PLA, proximity ligation assay; RVM, rostral ventromedial medulla; SC, spinal cord; Sol, nucleus of the solitary tract; SST, somatostatin; TG, trigeminal ganglion.

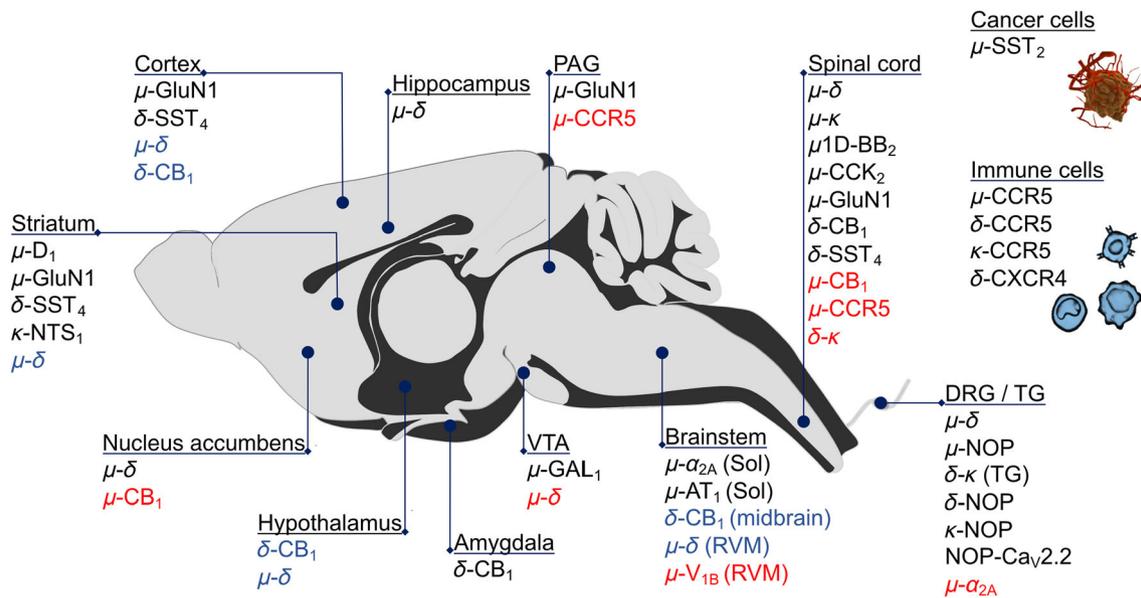


FIGURE 1 Distribution of opioid receptor heteromers in rodents. Close physical proximity between receptors was established in basal (black) or in pathological (chronic pain or chronic morphine) (blue) conditions. Other receptor pairs have been postulated for which information about the physical proximity in the region is still missing (red). DRG, dorsal root ganglia; PAG, periaqueductal gray; RVM, rostral ventromedial medulla; Sol, nucleus of the tractus solitarius; TG, trigeminal ganglia; VTA, ventral tegmental area

the δ receptor whose expression is increased in neuropathic or inflammatory conditions and whose selective targeting alleviates mechanical allodynia (Gendron et al., 2015; Nadal et al., 2013). The fourth heteromer involves association of the μ and the chemokine receptor CCR5.

3.1 | μ - δ heteromers

Close physical proximity of μ - δ receptors has been shown in the DRG (Xie et al., 2009), spinal cord (Gomes et al., 2004; He et al., 2011), hippocampus (Erbs et al., 2015) and nucleus accumbens (Acb) (Kabli et al., 2013). However, brain mapping of the receptors using fluorescent knock-in mice also revealed co-expression in discrete neuronal populations located in subcortical networks essential for the perception and processing of aversive stimuli (Erbs et al., 2015), suggesting that μ - δ heteromerization could be more widely distributed. The effects of such heteromerization on ligand binding, receptor signalling, and trafficking has been mostly studied in co-transfected cells (see Fujita, Gomes, & Devi, 2014). However, increasing evidence indicates that μ - δ heteromerization indeed affects ligand binding properties and modifies μ receptor signalling and trafficking in native environments. Positive cooperativity reflecting bidirectional positive allosteric modulation was reported in SKNSH neuroblastoma cells where occupation of the binding site of either receptor by an agonist, an antagonist or an inverse agonist increased the affinity of the other receptor for agonists (Gomes et al., 2000, 2004, 2011). This suggests that the interface between the interacting receptors is dynamic as reported for the neurotensin 1 (NTS1) receptor (Dijkman et al., 2018) and that ligand binding would stabilize the receptor conformation and possibly favour

receptor association as observed for class C metabotropic receptors (Moller et al., 2018). In mouse membrane preparations, this positive cooperativity led to a significant increase in the potency and efficacy of μ receptor agonists in terms of G protein signalling (Gomes et al., 2004), MAPK phosphorylation (Gomes et al., 2000) or inhibition of voltage dependent calcium channels (Walwyn et al., 2009). These effects were lost in membranes from mice lacking the δ receptor (Gomes et al., 2004; Walwyn et al., 2009) or in the presence of antibodies specific for μ - δ heteromers (Gupta et al., 2010). Bidirectional positive allosteric modulation in μ - δ heteromers could also underlie the increased neuronal hyperpolarization observed in neurons of the ventral tegmental area (VTA) following co-application of an antagonist of one receptor and an agonist for the other (Margolis et al., 2017).

Ligand-selective co-internalization and co-targeting, to the lysosomal compartment, of μ and δ receptors were observed in primary hippocampal neurons, suggesting that μ - δ heteromerization modifies the intracellular fate of μ receptors (Derouiche et al., 2020). However, phosphorylation by second messenger recruited kinases cannot be entirely excluded. In SKNSH neuroblastoma cells, treatment with DAMGO or deltorphin II led to sustained phosphorylation of ERK1/2 that was absent in cells pretreated with a siRNA for μ receptors or with a μ or a δ receptor antagonist (Rozenfeld & Devi, 2007). Knock-down of β -arrestin 2 also abolished sustained ERK1/2 phosphorylation (Rozenfeld & Devi, 2007). Because β -arrestin recruitment initiates receptor internalization in clathrin coated pits, sustained ERK phosphorylation may reflect signalling by co-internalized receptors, in agreement with recent advances in the subcellular organization of GPCR activity (Eichel & von Zastrow, 2018).

At the behavioural level, μ - δ heteromers may contribute to both thermal and mechanical nociception. In keeping with this, i.e.

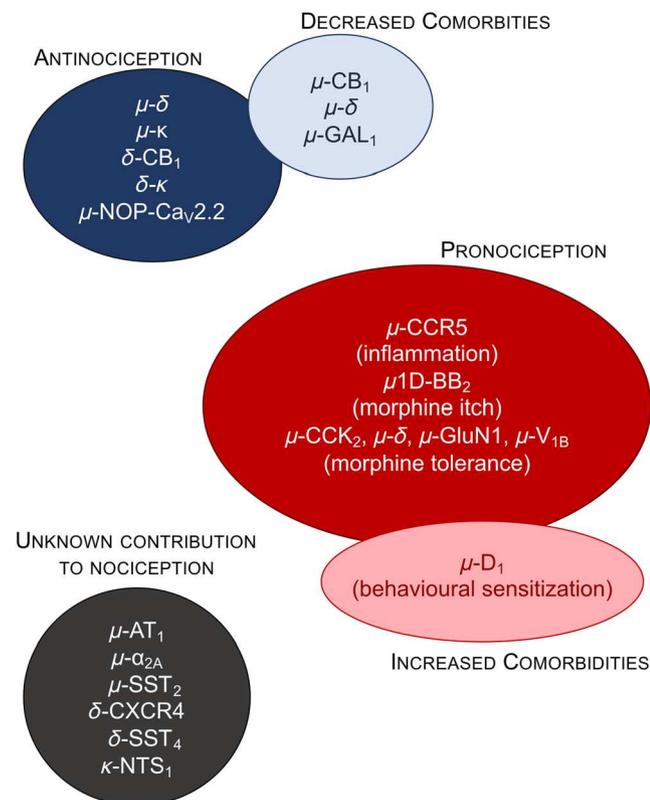


FIGURE 2 Opioid receptor heteromers modulate chronic pain and associated comorbidities. Activation of some opioid receptor heteromers is associated with antinociceptive properties and potential improvement of anxio-depressive comorbidities (receptor pairs on blue background) whereas, for others, activation results in increased pain perception and side effects (receptor pairs on red background). Additional opioid receptor heteromers have been identified in structures relevant to nociception and/or involve receptors with known contribution in pain perception but their contribution has not yet been clearly identified (receptor pairs on grey background)

administration of **DPDPE**, deltorphin II or DAMGO induced thermal antinociception and reduced mechanical sensitivity in wild type mice but not in mice deficient for the μ receptor (van Rijn et al., 2012). Moreover, the enhanced thermal analgesia induced by a submaximal dose of the μ receptor agonist morphine in the presence of the δ receptor antagonist **TIPPY** is in line with the positive allosteric modulation in ligand binding and receptor signalling (Gomes et al., 2004). Co-administration of equal amounts of the μ receptor agonist DAMGO and the δ receptor agonist deltorphin II in the rostral ventromedial medulla (RVM) of naive rats resulted in a synergistic increase in paw withdrawal latencies (Sykes et al., 2007). This effect may result from μ - δ heteromer activation, although interactions taking place at the cellular or circuit levels cannot be excluded. In animals chronically treated with morphine, co-administration of DAMGO and deltorphin II directly into the RVM synergistically increased the GABAergic inhibitory control via a PLA₂ dependent mechanism that may, or not, involve activation of μ - δ heteromers (Zhang & Pan, 2010). A recent study also showed increased pain hypersensitivity in a cisplatin-induced neuropathic pain model and in a post-surgical inflammatory

pain model following i.t. injections of a disrupting peptide corresponding to the C-terminus of δ receptors, indicating that μ - δ heteromers may control latent pain sensitization (Inyang et al., 2021). An antinociceptive role of μ - δ heteromers is also supported by data collected using ligands designed to selectively target μ - δ heteromers (see Section 7). Of note, functional interactions between μ and δ receptors also take place in the enteric nervous system and may include a μ - δ contribution, as the two receptors are co-localized in a subset of neurons (DiCello et al., 2020) and can be detected in close physical proximity (Fujita, Gomes, Dove, et al., 2014).

3.2 | δ -CB₁ heteromers

As with the δ opioid receptors, CB₁ receptors are also critically involved in pain, anxiety and depression (reviewed in Nadal et al., 2013; Yin et al., 2019). The abundance of δ -CB₁ heteromeric receptors is increased in the cortex, hypothalamus and midbrain of neuropathic rats following spinal nerve ligation (Bushlin et al., 2012) or in the spinal cord of mice in a model of chemotherapy-induced peripheral neuropathy (Sierra et al., 2019). Increased δ -CB₁ heteromerization was also observed in postmortem spinal cords of patients suffering from chemotherapy-induced peripheral neuropathy (Sierra et al., 2019).

In cortical membranes from naïve mice deficient for the δ receptor, basal and agonist induced G protein signalling of the CB₁ receptor increased, suggesting that δ receptors act as negative allosteric modulators of CB₁ receptor activity (Rozenfeld et al., 2012). Reciprocally, activation of the CB₁ receptors allosterically inhibited ligand binding to δ receptors (Kathmann et al., 2006; Vaysse et al., 1987). However, in cortical membranes from neuropathic rats, DPDPE binding and signalling were increased by a non-signalling dose of the CB₁ receptor agonist **Hu-210** or by the CB₁ receptor antagonist **PF-514273**. The effect was blocked by δ -CB₁ heteromer selective antibodies, suggesting positive allosteric modulation of the δ receptor in δ -CB₁ heteromers, under these conditions (Bushlin et al., 2012). In a mouse model of chemotherapy-induced peripheral neuropathy, a combination of non-effective doses of agonists for the CB₁ (Hu210) and δ (**SNC80**) receptors, reduced mechanical allodynia. The increase in mechanical thresholds was counteracted by the use of δ -CB₁ selective antibodies, supporting the involvement of δ -CB₁ heteromers in this anti-allodynic effect (Sierra et al., 2019).

3.3 | δ - κ heteromers

The physical proximity of δ and κ receptors was established in trigeminal ganglia (Berg et al., 2012) whereas knockout subtraction autoradiography suggested that δ - κ receptor heteromerization in the brain is restricted to the periaqueductal gray (PAG), amygdala, and thalamus; all three are part of the nociceptive circuit (Yoo et al., 2014). In cultures from rat trigeminal ganglia, κ receptor antagonists differentially regulated δ receptor-dependent **adenylate cyclase** activity (Berg et al., 2012), suggesting allosteric modulation between the two

receptors. At the behavioural level, the κ receptor antagonist **nor-BNI** potentiated the analgesic effect of a non-effective dose of DPDPE. This effect was enhanced in the presence of δ - κ specific antibodies (Berg et al., 2012), pointing to a contribution of δ - κ heteromers. Similarly, the δ receptor antagonist **naltrindole**, allosterically increased the analgesic potency of a non-effective dose of the κ receptor agonist **ICI-199441** in a model of inflammatory pain (Jacobs et al., 2019), indicating bidirectional positive allosteric modulation.

3.4 | μ -CCR5 heteromers

Close physical proximity between μ receptors and the chemokine receptor, CCR5, was first established by co-immunoprecipitation in human lymphocytes (Suzuki et al., 2002). Neuronal co-expression of μ receptors and CCR5 was then detected in the PAG (Heinisch et al., 2011), a key region with both inhibitory and facilitatory functions in the descending modulation of pain. Furthermore, increased μ receptor expression was observed in neurons from the PAG of mice, deficient for CCR5 (Lee et al., 2013), suggesting that physical interaction could also take place in the brain and contribute to pain processing. In both neuronal and immune cells, activation by either the chemokine CCL5 or a μ receptor agonist, induced phosphorylation and desensitization of the other receptor (Szabo et al., 2002) (Grimm et al., 1998). These observations are consistent with a bidirectional allosteric modulation leading to functional pro-nociceptive μ -CCR5 heteromers, but heterologous desensitization involving the recruitment of **PKC ζ** by second messengers has also been demonstrated (Song et al., 2011). At the behavioural level, acute analgesia induced by the μ receptor agonist DAMGO in the rat PAG was decreased in the presence of **CCL5** (Szabo et al., 2002). In addition, chemically induced visceral and inflammatory pain were decreased in mice lacking CCR5 or following injection of the CCR5 antagonist **DAPTA** (Lee et al., 2013), both consistent with μ -CCR5 heteromerization and/or heterologous desensitization. However, i.t. injections of the bivalent ligand MCC22 linking a μ receptor agonist and a CCR5 antagonist in models of inflammatory pain increased analgesia suggesting the presence of μ -CCR5 heteromers in the spinal cord (see below Section 7).

3.5 | Other heteromers of potential relevance to chronic pain

In female rats during proestrus, spinal morphine antinociception necessitated co-activation of μ and κ receptors for maximal efficiency and was strongly reduced by i.t. administration of the κ receptor antagonist nor-BNI or anti-dynorphin antibodies, suggesting that co-activation of the two receptors was required in these animals for morphine to reach its maximal effect (Chakrabarti et al., 2010; Liu et al., 2007). These observations were paralleled with an oestrogen-dependent increase of μ - κ heteromers in proestrus female rats compared to males or diestrus females (Chakrabarti et al., 2010; Liu, Chakrabarti, et al., 2011) pointing to the contribution of μ - κ receptor

heteromers to sex-based differences in the acute antinociceptive response to morphine. However, whether μ - κ heteromers play a role in chronic pain conditions or influence the development of morphine tolerance remains to be investigated.

Physical proximity has also been identified in pain related areas for six additional receptor pairs (Figure 1), which represent an additional pool of potential targets. Thus, δ -**somatostatin SST₄** receptor heteromers were observed in the striatum, cortex and spinal cord (Somvanshi & Kumar, 2014) and κ -NTS₁ heteromers were detected in primary striatal neurons (Liu et al., 2016). These heteromers deserve further investigation because δ and SST₄ receptors have established roles in chronic pain (Kantas et al., 2019; Nadal et al., 2013) and activation of κ or NTS₁ (Brouillette et al., 2020) receptors in the spinal cord improves the nociceptive threshold in chronic pain conditions. Heteromers formed by μ and SST₂ receptors were identified in human pancreatic and breast cancerous cells (Jorand et al., 2016; Kharmate et al., 2013) and could also play a role in migraine, as both receptors are critically involved in this chronic condition of trigeminal pain (Lambert & Zagami, 2018; Menon et al., 2012). Hypertension is a frequent comorbidity of chronic pain (Sacco et al., 2013) and hypertensive conditions increase expression of μ - **α _{2A} adrenoceptor** and **μ -AT₁ receptor** heteromers (Sun et al., 2015, 2019) in the nucleus of the tractus solitarius (Sol). This region is an important relay in the transmission of somatic and visceral nociceptive information (see Berthoud & Neuhuber, 2000) indicating their relevance in the context of chronic pain. However, the functional consequences of μ - α _{2A} adrenoceptor heteromerization are difficult to anticipate because they seem to differ across regions. Bidirectional allosteric desensitization was reported in the spinal cord (Jordan et al., 2003) and in primary DRG cultures (Tan et al., 2009) but unidirectional allosteric activation of the μ receptor was described in neurons from the locus coeruleus (LC) (Illes & Norenberg, 1990). Finally, heteromers involving δ receptors and **CXCR4** were identified in primary monocytes and brain tissue and could therefore play a role in inflammation and pain sensitization (Burbassi et al., 2010; Pello et al., 2008).

4 | HETEROMERS AND ANXIO-DEPRESSION

Chronic pain is associated with a high prevalence of anxiodepressive symptoms. The μ receptor is critically involved in the rewarding properties of natural stimuli and anhedonia is a hallmark of depression (Bair et al., 2003). Therefore, the role of μ receptor heteromers in the emotional processing of pain has been investigated in the Acb and VTA, two key regions of the reward system where μ receptors are highly expressed (Figure 2). In the rat VTA, bidirectional negative allosteric modulation took place upon co-administration of the μ receptor agonist **endomorphin 1** and galanin. It reduced ERK1/2, **Akt** and cAMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation and was abolished in the presence of a disrupting peptide corresponding to the TM5 region of μ receptors, supporting the existence of functional μ -GAL₁ heteromers (Moreno et al., 2017). In addition, a

unilateral negative allosteric modulation of the GAL₁ receptor by the opioid antagonist **CTOP** was also abolished in the presence of the TM5 peptide whereas the galanin antagonist **M40** did not affect endomorphin 1 activity (Moreno et al., 2017). Reduced ERK1/2 phosphorylation was associated with a decrease in dopamine release in the VTA (Moreno et al., 2017) suggesting that activation of μ -GAL₁ heteromers would be associated with less reinforcing properties than activation of μ receptors. Activation of μ -GAL₁ heteromers might therefore contribute to the anhedonic state.

Functional interactions between the μ and cannabinoid CB₁ receptors in the Acb are known to modulate social play (Manduca et al., 2016). Bidirectional negative allosteric modulation that reduced the generation of field-EPSPs was observed in Acb slices from rodents (Manduca et al., 2016). In SKNSH neuroblastoma cells and rat striatal membranes, co-activation of the two receptors decreased G protein signalling (Rios et al., 2006; Vaysse et al., 1987). These data suggest that μ -CB₁ heteromers could form in the Acb and contribute to the hedonic process. However heterologous desensitization and signalling crosstalk between the two receptors cannot be ruled out.

Because activation of δ receptors has anxiolytic properties (Filliol et al., 2000), the role of μ - δ heteromers in anxiety and depression was also investigated. The use of a disrupting peptide corresponding to the C-terminus of the δ receptor or pretreatment with the μ antagonist CTOP or the δ antagonist naltrindole reversed the anxiolytic and antidepressive properties resulting from the microinjection in the rat Acb of **UFP-512**, a ligand proposed to be selective for μ - δ heteromers (Kabli et al., 2013). These observations are consistent with a possible involvement of μ - δ heteromers in anxi-depressive behaviours. However, UFP-512 efficiently activates δ receptors (Aguila et al., 2007; Vergura et al., 2008), suggesting possible alternative explanations.

5 | HETEROMERS AND CHRONIC MORPHINE

Morphine analgesia is dependent on μ 1, the most abundant splice variant of μ receptors. Similarly, the side effects of morphine seem to involve heteromers of the μ 1 variant with the exception of morphine-induced itching (Figure 2). The latter is mediated by the μ 1D variant heteromerized with the **bombesin BB₂** (also called gastrin-releasing peptide receptor [GRPR]) receptor in the spinal cord (Liu, Liu, et al., 2011) through a mechanism involving allosteric activation of the BB₂ receptor (Liu, Liu, et al., 2011).

Inhibition or lack of functional δ receptors reduces the development of morphine tolerance (see Gendron et al., 2015). Moreover, chronic morphine administration enhances expression of δ receptors at the plasma membrane in a μ receptor-dependent manner (Erbs et al., 2016; Gendron et al., 2015) possibly through increased expression of the receptor transporter protein (RTP) 4 chaperone (Fujita et al., 2019). This was associated with long-lasting increase in neuronal colocalization of μ and δ receptors (Pierre et al., 2019) as well as μ - δ heteromerization (Gupta et al., 2010) in neuronal circuits that tightly connect autonomous/visceral functions with emotional/aversive processing. This indicates

dynamic regulation of μ - δ expression. In the presence of a peptide corresponding to the second intracellular loop of the δ receptor (Xie et al., 2009) or to the TM1 region of μ receptors (He et al., 2011) that both disrupt μ - δ physical contact, morphine analgesia was increased, and morphine tolerance decreased, demonstrating the involvement of μ - δ heteromers. Activation of μ - δ receptor heteromers therefore appears to generate opposite effects. In animals chronically treated with morphine, they reduce morphine potency by mechanisms that remain to be determined whereas, in chronic pain conditions, activation of these heteromers exerts antinociceptive effects (see Section 3).

Heteromerization of the μ and V_{1B} receptors in the RVM could also contribute to the development of morphine tolerance and physical dependence (Koshimizu et al., 2018). Indeed, these side effects were decreased in mice deficient for the V_{1B} receptor or upon injection of a V_{1B} antagonist in the RVM, suggesting functional μ -V_{1B} interactions in this region (Koshimizu et al., 2018). Accordingly, morphine tolerance was reduced in mutant mice expressing a dimerization-defective V_{1B} receptor lacking C-terminal amino acids (Koshimizu et al., 2018).

Finally, activation of μ -**cholecystokinin CCK₂** receptor heteromers antagonizes morphine effects. Indeed, negative allosteric modulation of the μ receptor, in μ -CCK₂ heteromers, was observed in co-transfected cells and disruption of the physical proximity of μ and CCK₂ receptors in the spinal cord by i.t. injection of the TM3 region of μ receptors prevented antagonism of morphine analgesia by **CCK-8** (Yang et al., 2018), consistent with a μ -CCK₂ heteromer contribution to the pro-nociceptive action of the cholecystokinin system.

6 | HETEROMERS INVOLVING ION CHANNELS

Physical association is not restricted to interactions between GPCRs but can also involve ion channels. This observation points to the need to adapt our current view to encompass more complex interactions taking place upon association of more than two proteins. Hetero-complexes involving the μ and **dopamine D₁** receptors together with the GluN1 subunit of the NMDA channels (μ -D₁-GluN1) represent a first example. In co-transfected cells, both μ -D₁ and D₁-GluN1 heteromers form in the ER through contacts involving their C-termini (Juhász et al., 2008; Pei et al., 2004). D₁-GluN1 heteromerization enhanced D₁ signalling in the hippocampus (Pei et al., 2004) whereas negative allosteric modulation of the μ receptor activity by D1 antagonists in μ -D₁ heteromers, located in the Acb, decreased locomotor sensitization to morphine (Tao et al., 2017). Physical proximity between μ receptors and GluN1 was identified in the mouse PAG where μ -GluN1 activation by NMDA negatively regulated μ receptor activity by promoting dissociation of the heteromer and subsequent μ receptor phosphorylation and desensitization (Rodríguez-Munoz et al., 2012). In addition, μ -GluN1 interaction was disrupted by morphine resulting in the development of tolerance (Rodríguez-Munoz et al., 2012). Considering the broad distribution of μ and D₁ receptors and GluN1 subunits, the μ -D₁-GluN1 complexes are likely to form in

the nervous system and contribute to the modulation of nociception, as well as anxio-depressive symptoms.

Heterocomplexes involving μ and NOP receptors as well as voltage gated N-type calcium channels (μ -NOP- $\text{Ca}_v2.2$) have also been identified in DRGs where NOP- $\text{Ca}_v2.2$ association resulted in a tonic inhibition of the channels, most likely due to the constitutive activity of the NOP receptor. The agonist **nociceptin** also caused G protein dependent inhibition of $\text{Ca}_v2.2$ channels and promoted receptor-channel co-internalization to the lysosomal compartment, both mechanisms contributing to reduce Ca^{2+} entry (Altier et al., 2006; Evans et al., 2010). Physical proximity also exists between NOP and μ receptors in the DRGs (Evans et al., 2010) where activation of μ receptors led to co-internalization of $\text{Ca}_v2.2$ channels and NOP receptors (Evans et al., 2010). The broad overlap in μ and NOP expression (Ozawa et al., 2015) and wide distribution of $\text{Ca}_v2.2$ channels (see Kamp et al., 2012) in the nervous system suggest that such complexes likely form at the supraspinal level and contribute to the nociceptive response.

These examples suggest that the heteromerization process may initiate broader functional interactions than currently envisaged, by generating signalling platforms in which physical proximity between two or more receptor types and ion channels may constitute dynamic hot spots regulating neuronal activity.

7 | LIGANDS TARGETING OPIOID RECEPTOR HETEROMERS

Exploiting the therapeutic potential of heteromers depends on the availability of selective ligands, whose design represents a major challenge (Table 2, Figure 3). Bivalent ligands consist of two ligands, each selective for one receptor type and linked together by a spacer of defined length. MDAN (μ - δ agonist antagonist) ligands bridging the μ receptor agonist **oxymorphone** to the δ receptor antagonist naltrindole were the first to be designed. Acute and chronic i.c.v. administration of MDAN19 or MDAN21 showed increased thermal antinociceptive potency compared to morphine with no development of tolerance and low withdrawal in mice (Daniels, Lenard, et al., 2005). However, i.m. injection of MDAN21 led to variable thermal antinociception in rhesus monkeys (Aceto et al., 2012). MDAN19 or MDAN21, given i.v., failed to induce conditioned place preference and reinstatement in morphine-treated mice suggesting no rewarding properties (Lenard et al., 2007). The selectivity of these ligands, however, remains controversial because naltrindole only shows moderate selectivity with a 10–100-fold higher affinity for δ , compared to μ receptors (Corbett et al., 1993; Toll et al., 1998). Therefore, binding of the MDAN compounds to two physically close μ receptors exerting antagonistic effects could not be ruled out (Harvey et al., 2012). More recently, D24M, a bivalent ligand linking the δ receptor antagonist Tyr-Tic-OH to the low affinity μ receptor antagonist (H-Tyr-Pro-Phe-D1Nal-NH₂) with a 24-atom linker, showed about 100-fold increase in μ - δ selectivity, compared with δ alone and had virtually no affinity for the μ receptor in co-transfected cells (Olson et al., 2018). In vivo, this compound dose-dependently blocked the thermal analgesia induced by

CYM51010 or deltorphin II that both target endogenous μ - δ heteromers (Derouiche et al., 2020; Gomes et al., 2013; Morgan et al., 2021; Olson et al., 2018; Tiwari et al., 2020). D24M also reduced **naloxone** induced withdrawal symptoms associated with acute and chronic morphine administration (Olson et al., 2018).

Two series of bivalent ligands were also generated to target δ - κ heteromers by bridging the δ antagonist naltrindole with the κ agonist **ICI-199441** in the KDAN (κ - δ agonist antagonist) series (Daniels, Kulkarni, et al., 2005) or with the κ antagonist 5'-guanidinonaltrindole (**5'-GNTI**) in the KDN series (Bhushan et al., 2004). KDAN18 exhibited thermal analgesic properties whereas KDN21 i.t. administration partly blocked DPDPE-induced thermal analgesia (Ansonoff et al., 2010). KDAN18 potency was reduced in δ knockout mice and abolished in κ or δ/κ knockout animals and KDN21 antagonistic properties were abolished in κ knockout mice (Ansonoff et al., 2010) suggesting that these compounds bind, at least in part, to δ - κ heteromers.

Bivalent ligands targeting μ and κ receptors that explored both the length of the spacer and the conformation of the ligand moieties were also generated. (–) (–) MCL 144 and (+) (–) MCL193 were synthesized by linking 2 molecules of MCL-101, an analogue of the agonist cyclorphan, with a linker corresponding to a 10 carbon chain ester. (–) (–) MCL 144 contained two active levorotary enantiomers whereas (+) (–) MCL193 combined one active (–) and one inactive (+) pharmacophores. Injection (i.c.v.) of either compound increased the threshold of thermal antinociception that was antagonized by a μ or κ but not a δ receptor antagonist (Mathews et al., 2008). Accordingly, these ligands did not affect morphine antinociception. However, selective binding to heteromers remains to be established.

Bivalent ligands were also developed to target receptors outside the opioid family by bridging the μ receptor with a cannabinoid or a chemokine receptor. The μ agonist α -oxymorphone tethered to the CB₁ receptor antagonist **rimonabant** by a 20-atom spacer induced potent thermal analgesia and weak tolerance after 24 h when administered i.c.v. or i.t. (Le Naour et al., 2013). Compound 19 linking the non-selective cannabinoid agonist **JWH-018** with the μ agonist **oxycodone** induced mechanical anti-allodynia when injected i.t. in a chronic osteoarthritis pain model in rats (Dvoracsko et al., 2019). However, in both cases, selective targeting of μ -CB₁ receptor heteromers remains to be established.

When injected i.t., MCC22, a bivalent ligand bridging the μ receptor agonist **oxymorphone** with the chemokine CCR5 antagonist **TAK-220** using a 22-atom linker, strikingly increased thermal antinociceptive potency in models of inflammatory pain with no tolerance measured after 24 h (Akgun et al., 2015). Similarly, MCC22 (i.p. or i.t.) reduced mechanical hypersensitivity without pharmacological tolerance in a model of spontaneous inflammatory arthritis (Dutta et al., 2018) or in a model of chemotherapy induced peripheral neuropathy (Cataldo et al., 2019). MCC22 systemic administration (i.p.) did not appear to have rewarding properties as it failed to induce conditioned place preference (Cataldo et al., 2019). Expression of μ -CCR5 heteromers in Iba1 positive cells of the spinal cord, and strong reduction of the antinociceptive effect in the presence of the inhibitor of microglial activation minocycline or of an antagonist

TABLE 2 Ligands targeting opioid receptor heteromers: Behavioural effects

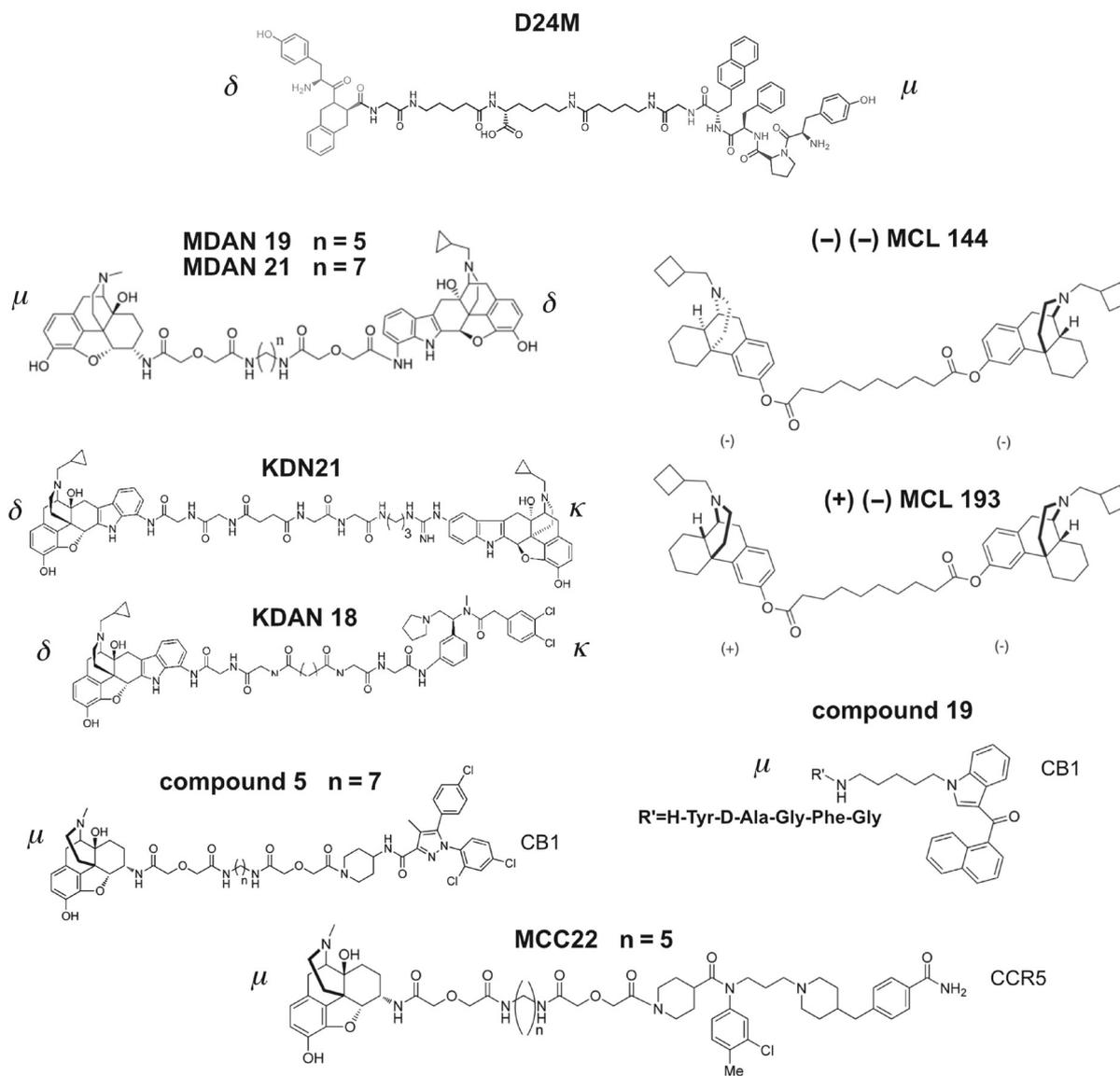
Name	Target 1	Target 2	Linker length	Analgesia (chronic pain model)	Side effects	References
Bivalent ligands						
MDAN	μ agonist oxymorphone	δ antagonist naltrindole	19–21	Increased thermal potency No tolerance	Decreased withdrawal No reward	(Aceto et al., 2012; Daniels, Lenard, et al., 2005; Lenard et al., 2007)
D24M	μ antagonist H-Tyr-pro-Phe-D1Nal-NH2	δ antagonist Tyr-tic-OH	24	Decreased thermal analgesia	Decreased morphine withdrawal	(Morgan et al., 2021; Olson et al., 2018)
KDAN	κ agonist ICI-199, 441	δ antagonist naltrindole	18	Thermal		(Ansonoff et al., 2010; Daniels, Kulkarni, et al., 2005)
KDN	κ antagonist 5'-GNTI	δ antagonist naltrindole	21	Thermal		(Ansonoff et al., 2010; Bhushan et al., 2004)
MCL144 MCL193	MCL-101 μ	MCL-101 κ	10	Thermal		(Mathews et al., 2008)
Compound 5	μ agonist α -oxymorphamine	CB ₁ receptor antagonist rimonabant	20	Thermal Decreased tolerance		(Le Naour et al., 2013)
Compound 19	μ agonist oxycodone	Non-selective cannabinoid agonist JWH-018	4 amino acids	Mechanical (osteoarthritis)		(Dvoracko et al., 2019)
MCC22	μ agonist oxymorphone	Chemokine CCR5 antagonist TAK-220	22	Increased thermal, mechanical (spontaneous inflammatory arthritis, chemotherapy induced peripheral neuropathy)	No tolerance No reward	(Akgun et al., 2015; Cataldo et al., 2019; Dutta et al., 2018)
Small molecules						
CYM51010	μ	δ	na	Thermal, mechanical (sciatic nerve ligation) Reduced tolerance	Reduced withdrawal	(Gomes et al., 2013; Tiwari et al., 2020)
Eluxadoline	μ	δ	na	Improved GI transit (irritable bowel syndrome)		(Fujita et al., 2014; Wade et al., 2012)
MP135	μ	δ	na	Thermal	Reward (CPP) Respiratory depression	(Faouzi et al., 2020)
NNTA	μ	κ	na	Thermal No tolerance	No withdrawal No reward	(Yekkirala et al., 2011)
6'GNTI	δ	κ	na	Thermal (PGE ₂ , bradykinin, carrageenan)		(Ansonoff et al., 2010; Jacobs et al., 2018, 2019) (Waldhoer et al., 2005)

Abbreviations: CPP, conditioned place preference; δ , δ opioid; κ , κ opioid; μ , μ opioid; na, non-applicable.

of the complement system both support MCC22 binding to μ -CCR5 heteromers expressed in glial cells (Akgun et al., 2015, 2019; Cataldo et al., 2019). Interestingly, the higher potency of i.t injection in inflammatory conditions compared to naïve mice may indicate higher levels of μ -CCR5 heteromers in the spinal cord, although this remains to be established.

Although bivalent ligands combining an agonist for one receptor with an antagonist of the other such as MDAN (μ - δ), KDAN (μ - κ) or MCC22 (μ -CCR5) induce antinociceptive responses, the molecular mechanisms remain elusive. Whether these ligands provide a mixed response corresponding to the effect of each ligand separately, that is, activation of one receptor and inactivation of the other, or generate a

Bivalent molecules



Small molecules

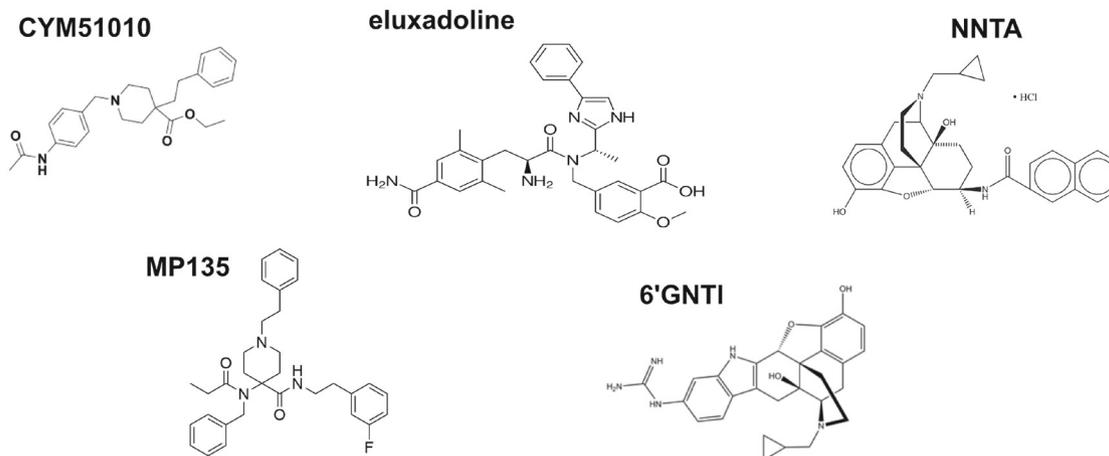


FIGURE 3 Chemical structures of ligands targeting opioid receptor heteromers. For bivalent ligands, the number of elementary units (n) defining the length of the linker and the receptor targeted by each moiety are indicated

different signalling output remains to be established. Moreover, occupancy of one receptor by an agonist or an antagonist results in positive (μ - δ , μ - κ) or negative (μ -CCR5) allosteric modulation of the other (see above) introducing additional levels of complexity. Instead, bivalent ligands bridging two antagonists, such as D24M, should offer less ambiguous interpretations and may be useful in reducing heteromer-dependent adverse effects. Bivalent ligands share a limited capacity to cross the blood brain barrier. This probably explains the absence of rewarding effects when administered systemically, which can be viewed as an advantage over small opioid molecules. However, restricted targeting to peripheral receptor pairs may not provide maximal anti-nociception and limited central bioavailability hampers modulation of central sensory mechanisms involved in emotional and cognitive aspects, thereby limiting their potential in the clinic.

In contrast, small molecules efficiently cross the blood brain barrier. Among them, bifunctional or mixed ligands were designed that simultaneously target two receptors (see Gunther et al., 2018). **Cebranopadol** for example is a mixed non selective opioid/NOP ligand in Phase III clinical trials for the treatment of severe chronic pain (see Kiguchi et al., 2020). It combines potent analgesia with reduced abuse liability and respiratory depression. **SRI22141** is a dual agonist of μ and δ receptors. It shows efficient analgesic properties with reduced tolerance and dependence in two models of neuropathic pain (Lei et al., 2020). Although of therapeutic interest, these ligands can bind to individual receptors as well as receptors engaged in heteromer formation. Attempts were thus made to develop small molecules that would selectively target heteromers. CYM51010 (Gomes et al., 2013), and **eluxadoline**, recently approved by the FDA for the treatment of the irritable bowel syndrome (FDA N°206,940) showed reduced signalling in the presence of μ - δ selective antibodies (Fujita, Gomes, Dove, et al., 2014; Gomes et al., 2013; Tiwari et al., 2020; Wade et al., 2012) and lower efficacy in δ receptor knockout mice (Fujita, Gomes, Dove, et al., 2014; Tiwari et al., 2020) suggesting that these compounds bind to μ - δ heteromers. However, both CYM51010 and eluxadoline can activate the δ (Derouiche et al., 2020; Fujita, Gomes, Dove, et al., 2014) or μ (Gomes et al., 2013; Tiwari et al., 2020) receptors expressed alone. Nonetheless, CYM51010 induced efficient thermal analgesia with lower physical dependence and tolerance compared to morphine (Gomes et al., 2013). In the spinal nerve ligation model, CYM51010 relieved mechanical and thermal allodynia even in animals chronically treated with morphine (Tiwari et al., 2020). Very recently, MP135, a derivative of the μ agonist **carfentanil** showed higher selectivity for μ - δ heteromers and produced efficient acute thermal antinociception. Unfortunately, MP135 retained the side effects of the parent molecule as it exhibited rewarding properties and induced respiratory depression (Faouzi et al., 2020).

N-naphthoyl- β -naltrexamine (NNTA) produced strong thermal antinociception devoid of tolerance, physical dependence, or reinforcing properties upon i.t. injection that was abolished in μ receptor-deficient mice (Yekkirala et al., 2011). Aversion was observed with doses 10 times higher than the antinociceptive

ED₅₀ consistent with the reported dysphoric effects of mixed κ agonist- μ antagonist ligands. However, NNTA's strong μ receptor antagonism suggests limited selectivity towards μ - κ receptor heteromers.

Administration (i.t.) of 6-guanidinonaltrindole (**6'GNTI**) (Waldhoer et al., 2005) or its local (i.pl.) administration in a model of inflammatory pain (Jacobs et al., 2019) induced thermal antinociception. This effect was reduced by pretreatment with a δ receptor antagonist or in mice deficient for the δ or κ receptor (Berg et al., 2012; Jacobs et al., 2018) and was abolished in double knockout animals (Ansonoff et al., 2010) or in the presence of a peptide corresponding to the TM1 of δ receptors (Jacobs et al., 2018). In addition, knocking down δ or κ receptors blocked **6'GNTI** signalling in cultures from rat trigeminal ganglia (Jacobs et al., 2018) where δ and κ receptors were co-immunoprecipitated (Berg et al., 2012). When administered i.c.v., no thermal antinociception was observed, consistent with the reported low levels of δ - κ heteromers in the brain (Yoo et al., 2014). Collectively, these data support **6'GNTI** activation of δ - κ heteromers but the selectivity towards δ - κ heteromers appears only partial as this ligand is also a potent κ receptor agonist (Rives et al., 2012; Schmid et al., 2013) and can activate μ - κ heteromers, although to a lesser extent (Waldhoer et al., 2005).

To date, low MW compounds targeting heteromers retain affinity and activity for the receptor monomers, at least to some extent. Improving their selectivity constitutes a major pharmacological challenge to overcome.

8 | PERSPECTIVES

More than 20 years after the first report in co-transfected cells (Jordan & Devi, 1999), studying opioid receptor heteromers in vivo remains extremely challenging due to discrete distribution in the nervous system, low expression levels and co-existence with individual parent receptors, not to mention splice variants. In addition, physical association may also be dynamically regulated resulting in transient physical association. The limited amount of data collected so far to support the functional effects of heteromers in vivo highlights the lack of selective tools to identify their properties and distinguish them from receptor crosstalk taking place at the level of signalling cascades or neural circuits.

Deciphering heteromer signalling and trafficking in native environments, however, is increasingly recognized as essential for improving our understanding of the molecular mechanisms governing their pathophysiological contribution. Indeed, information collected in co-transfected cells should be considered with caution because of the high receptor expression levels often achieved but also due to the difference in cellular contents. Specific antibodies or nanobodies, selective ligands, whether agonists or antagonists, are needed to probe receptor induced conformational changes and/or manipulate heteromer activity in native cellular environments (Che et al., 2020; Livingston et al., 2018). Crystal or NMR based 3D structure

determination (Garcia-Recio et al., 2020) and in silico approaches (see Barreto et al., 2020) may also provide useful clues about contact interface and help in designing ligands. The reported allosteric modulation taking place within heteromers suggests that this interface is dynamic and sensitive to small conformational changes (Dijkman et al., 2018; Manglik et al., 2012), which may include a yet unrecognized contribution of the lipid environment in shaping receptor conformation (Provasi et al., 2015; Zheng et al., 2012).

Better understanding of the dynamics of receptor association at the plasma membrane, but also during export and internalization, requires further technological developments. This could be achieved by combining recent approaches to tag receptors and improved imaging techniques. For example, selective tagging using ligand directed fluorescent labelling of endogenous receptors (Arttamangkul et al., 2019), IR fluorescent conjugated ligands (Ast et al., 2020) and nanobodies (Gormal et al., 2020; Moller et al., 2020; Sungkaworn et al., 2017), or (infra)red fluorescent receptor fusion proteins (Prangma et al., 2020) represent new options. The latter could be used to visualize receptor close proximity by single molecule (dual-colour photoactivatable dyes and localization microscopy (PD-PALM) (Jonas et al., 2015), super-resolution (STED) (Mitronova et al., 2017)) and/or dynamic (fluorescence intensity fluctuation spectrometry; Stoneman et al., 2019) imaging.

The increased expression and broader distribution reported for several heteromers in pathological conditions suggest that this aspect is essential when exploring the functional role of heteromers and their therapeutic relevance. Genetically modified animals such as inducible conditional knock-in or knockout promoting or ablating expression of one receptor in a subset of cells expressing the other receptor would enable spatio-temporal control of their co-occurrence. This would make it possible to interrogate the contribution of heteromer formations in selected cell populations and/or neuronal circuits at various time points to better grasp their role in pathological states.

Heteromers should also be envisaged in the larger context of signalosomes as allosteric modulation of the receptor activity is likely to modify or engage novel interactions with intracellular partners. To date, only canonical signalling pathways have been explored, and only to a limited extent. Changes in μ receptor trafficking, for example, suggest modifications in interactions with scaffold proteins (Civciristov et al., 2019). Identifying the interactome associated with heteromers by a proteomic approach would allow exploration of novel intracellular cascades. In addition, heteromerization may also reflect larger signalling platforms in which several receptor types and ion channels are present in physical proximity to dynamically regulate the cellular activity.

In conclusion, our understanding of endogenous opioid receptor-based heteromers is still poor. Further technological developments will be instrumental for in-depth assessment of their functional role in vivo. In addition, highly selective ligands with good bioavailability are urgently needed to explore and exploit their potential as drug targets for improved therapeutic strategies in the clinic.

8.1 | NOMENCLATURE OF TARGETS AND LIGANDS

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (<http://www.guidetopharmacology.org>), and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2020/21 (Alexander, Christopoulos, et al., 2021; Alexander, Fabbro, et al., 2021; Alexander, Mathie, et al., 2021).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the CNRS and the University of Strasbourg. M. Gaborit is a PhD student of the EURIDOL Graduate School of Pain (school of excellence, PIA, ANR-17-EURE-0022) and is the recipient of a doctoral fellowship of the Foundation of the University of Strasbourg.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data sharing is not applicable to this article because no new data were created or analysed in this study.

ORCID

Dominique Massotte  <https://orcid.org/0000-0002-8758-1009>

REFERENCES

- Aceto, M. D., Harris, L. S., Negus, S. S., Banks, M. L., Hughes, L. D., Akgun, E., & Portoghese, P. S. (2012). MDAN-21: A bivalent opioid ligand containing mu-agonist and delta-antagonist pharmacophores and its effects in rhesus monkeys. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 327257. <https://doi.org/10.1155/2012/327257>
- Aguila, B., Coulbault, L., Boulouard, M., Leveille, F., Davis, A., Toth, G., Borsodi, A., Balboni, G., Salvadori, S., Jauzac, P., & Allouche, S. (2007). In vitro and in vivo pharmacological profile of UFP-512, a novel selective delta-opioid receptor agonist; correlations between desensitization and tolerance. *British Journal of Pharmacology*, 152, 1312–1324. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707497>
- Akgun, E., Javed, M. I., Lunzer, M. M., Powers, M. D., Sham, Y. Y., Watanabe, Y., & Portoghese, P. S. (2015). Inhibition of inflammatory and neuropathic pain by targeting a mu opioid receptor/chemokine receptor5 heteromer (MOR-CCR5). *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 8647–8657. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01245>
- Akgun, E., Lunzer, M. M., & Portoghese, P. S. (2019). Combined glia inhibition and opioid receptor agonism afford highly potent analgesics without tolerance. *ACS Chemical Neuroscience*, 10, 2004–2011. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00498>
- Alexander, S. P., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Southan, C., Davies, J. A., Abbracchio, M. P., Alexander, W., Al-hosaini, K., Bäck, M., Barnes, N. M., Bathgate, R., ... Ye, R. D. (2021). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2021/22: G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology*, 178(S1), S27–S156. <https://doi.org/10.1111/bph.15538>
- Alexander, S. P., Fabbro, D., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Southan, C., Davies, J. A., Boison, D., Burns, K. E., Dessauer, C.,

- Gertsch, J., Helsby, N. A., Izzo, A. A., Koesling, D., ... Wong, S. S. (2021). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2021/22: Enzymes. *British Journal of Pharmacology*, 178(S1), S313–S411. <https://doi.org/10.1111/bph.15542>
- Alexander, S. P., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Striessnig, J., Kelly, E., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Southan, C., Davies, J. A., Aldrich, R. W., Attali, B., Baggetta, A. M., Becirovic, E., Biel, M., Bill, R. M., Catterall, W. A., ... Zhu, M. (2021). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2021/22: Ion channels. *British Journal of Pharmacology*, 178(S1), S157–S245. <https://doi.org/10.1111/bph.15539>
- Altarifi, A. A., David, B., Muchhala, K. H., Blough, B. E., Akbarali, H., & Negus, S. S. (2017). Effects of acute and repeated treatment with the biased mu opioid receptor agonist TRV130 (oliceridine) on measures of antinociception, gastrointestinal function, and abuse liability in rodents. *Journal of Psychopharmacology*, 31, 730–739. <https://doi.org/10.1177/0269881116689257>
- Altier, C., Khosravani, H., Evans, R. M., Hameed, S., Peloquin, J. B., Vartian, B. A., Chen, L., Beedle, A. M., Ferguson, S. S. G., Mezghrani, A., Dubel, S. J., Bourinet, E., McRory, J. E., & Zamponi, G. W. (2006). ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. *Nature Neuroscience*, 9, 31–40. <https://doi.org/10.1038/nn1605>
- Ansonoff, M. A., Portoghese, P. S., & Pintar, J. E. (2010). Consequences of opioid receptor mutation on actions of univalent and bivalent kappa and delta ligands. *Psychopharmacology*, 210, 161–168. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1826-7>
- Arttamangkul, S., Plazek, A., Platt, E. J., Jin, H., Murray, T. F., Birdsong, W. T., Rice, K. C., Farrens, D. L., & Williams, J. T. (2019). Visualizing endogenous opioid receptors in living neurons using ligand-directed chemistry. *eLife*, 8, e49319. <https://doi.org/10.7554/eLife.49319>
- Ast, J., Arvaniti, A., Fine, N. H. F., Nasteska, D., Ashford, F. B., Stamatakis, Z., Koszegi, Z., Bacon, A., Jones, B. J., Lucey, M. A., Sasaki, S., Brierley, D. I., Hastoy, B., Tomas, A., D'Agostino, G., Reimann, F., Lynn, F. C., Reissaus, C. A., Linnemann, A. K., ... Hodson, D. J. (2020). Super-resolution microscopy compatible fluorescent probes reveal endogenous glucagon-like peptide-1 receptor distribution and dynamics. *Nature Communications*, 11, 467–484. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14309-w>
- Bair, M. J., Robinson, R. L., Katon, W., & Kroenke, K. (2003). Depression and pain comorbidity: A literature review. *Archives of Internal Medicine*, 163, 2433–2445. <https://doi.org/10.1001/archinte.163.20.2433>
- Barreto, C. A. V., Baptista, S. J., Preto, A. J., Matos-Filipe, P., Mourao, J., Melo, R., & Moreira, I. (2020). Prediction and targeting of GPCR oligomer interfaces. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 169, 105–149. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.11.007>
- Berg, K. A., Rowan, M. P., Gupta, A., Sanchez, T. A., Silva, M., Gomes, I., McGuire, B. A., Portoghese, P. S., Hargreaves, K. M., Devi, L. A., & Clarke, W. P. (2012). Allosteric interactions between delta and kappa opioid receptors in peripheral sensory neurons. *Molecular Pharmacology*, 81, 264–272. <https://doi.org/10.1124/mol.111.072702>
- Berthoud, H. R., & Neuhuber, W. L. (2000). Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Autonomic Neuroscience*, 85, 1–17. [https://doi.org/10.1016/S1566-0702\(00\)00215-0](https://doi.org/10.1016/S1566-0702(00)00215-0)
- Bhushan, R. G., Sharma, S. K., Xie, Z., Daniels, D. J., & Portoghese, P. S. (2004). A bivalent ligand (KDN-21) reveals spinal delta and kappa opioid receptors are organized as heterodimers that give rise to delta (1) and kappa(2) phenotypes. Selective targeting of delta-kappa heterodimers. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47, 2969–2972. <https://doi.org/10.1021/jm0342358>
- Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R., Lin, F. T., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (2000). Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature*, 408, 720–723. <https://doi.org/10.1038/35047086>
- Breivik, H., Eisenberg, E., & O'Brien, T. (2013). The individual and societal burden of chronic pain in Europe: The case for strategic prioritisation and action to improve knowledge and availability of appropriate care. *BMC Public Health*, 13, 1229–1241. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-1229>
- Brouillette, R. L., Besserer-Offroy, E., Mona, C. E., Chartier, M., Lavenus, S., Soubrie, M., Belleville, K., Longpré, J.-M., Marsault, É., Grandbois, M., & Sarret, P. (2020). Cell-penetrating peptiducins targeting the neurotensin receptor type 1 relieve pain. *Pharmacological Research*, 155, 104750. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104750>
- Burbassi, S., Sengupta, R., & Meucci, O. (2010). Alterations of CXCR4 function in mu-opioid receptor-deficient glia. *The European Journal of Neuroscience*, 32, 1278–1288. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07402>
- Bushlin, I., Gupta, A., Stockton, S. D. Jr., Miller, L. K., & Devi, L. A. (2012). Dimerization with cannabinoid receptors allosterically modulates delta opioid receptor activity during neuropathic pain. *PLoS ONE*, 7, e49789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049789>
- Busserolles, J., Lollignier, S., Kerckhove, N., Bertin, C., Authier, N., & Eschalié, A. (2020). Replacement of current opioid drugs focusing on MOR-related strategies. *Pharmacology & Therapeutics*, 210, 107519. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107519>
- Cataldo, G., Erb, S. J., Lunzer, M. M., Luong, N., Akgun, E., Portoghese, P. S., Olson, J. K., & Simone, D. A. (2019). The bivalent ligand MCC22 potently attenuates hyperalgesia in a mouse model of cisplatin-evoked neuropathic pain without tolerance or reward. *Neuropharmacology*, 158, 107598. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.04.004>
- Chakrabarti, S., Liu, N. J., & Gintzler, A. R. (2010). Formation of mu-/ κ -opioid receptor heterodimer is sex-dependent and mediates female-specific opioid analgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 20115–20119. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009923107>
- Che, T., English, J., Krumm, B. E., Kim, K., Pardon, E., Olsen, R. H. J., Wang, S., Zhang, S., Diberto, J. F., Sciaky, N., Carroll, F. I., Steyaert, J., Wacker, D., & Roth, B. L. (2020). Nanobody-enabled monitoring of kappa opioid receptor states. *Nature Communications*, 11, 1145–1156. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14889-7>
- Civciristov, S., Huang, C., Liu, B., Marquez, E. A., Gondin, A. B., Schittenthal, R. B., Ellisdon, A. M., Canals, M., & Halls, M. L. (2019). Ligand-dependent spatiotemporal signaling profiles of the mu-opioid receptor are controlled by distinct protein-interaction networks. *The Journal of Biological Chemistry*, 294, 16198–16213. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008685>
- Corbett, A. D., Paterson, S. J., & Kosterlitz, H. W. (1993). Selectivity of ligands for opioid receptors. In A. Hertz (Ed.), *Opioids I* (pp. 645–680). Springer Verlag.
- Daniels, D. J., Kulkarni, A., Xie, Z., Bhushan, R. G., & Portoghese, P. S. (2005). A bivalent ligand (KDAN-18) containing delta-antagonist and kappa-agonist pharmacophores bridges delta2 and kappa1 opioid receptor phenotypes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 1713–1716. <https://doi.org/10.1021/jm034234f>
- Daniels, D. J., Lenard, N. R., Etienne, C. L., Law, P. Y., Roerig, S. C., & Portoghese, P. S. (2005). Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 19208–19213. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506627102>
- Décaillot, F. M., Rozenfeld, R., Gupta, A., & Devi, L. A. (2008). Cell surface targeting of mu-delta opioid receptor heterodimers by RTP4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 16045–16050. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804106105>
- Degrandmaison, J., Abdallah, K., Blais, V., Génier, S., Lalumière, M.-P., Bergeron, F., Cahill, C. M., Boulter, J., Lavoie, C., Parent, J.-L., &

- Gendron, L. (2020). In vivo mapping of a GPCR interactome using knockin mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117, 13105–13116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917906117>
- Derouiche, L., Pierre, F., Doridot, S., Ory, S., & Massotte, D. (2020). Heteromerization of endogenous mu and Delta opioid receptors induces ligand-selective co-targeting to lysosomes. *Molecules*, 25, 4493–4506. <https://doi.org/10.3390/molecules25194493>
- DiCello, J. J., Carbone, S. E., Saito, A., Rajasekhar, P., Ceredig, R. A., Pham, V., Valant, C., Christopoulos, A., Veldhuis, N. A., Canals, M., Massotte, D., & Poole, D. P. (2020). Mu and Delta opioid receptors are Coexpressed and functionally interact in the enteric nervous system of the mouse colon. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 9, 465–483. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.11.006>
- Dijkman, P. M., Castell, O. K., Goddard, A. D., Munoz-Garcia, J. C., de Graaf, C., Wallace, M. I., & Watts, A. (2018). Dynamic tuneable G protein-coupled receptor monomer-dimer populations. *Nature Communications*, 9, 1710–1723. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03727-6>
- Dutta, R., Lunzer, M. M., Auger, J. L., Akgun, E., Portoghese, P. S., & Binstadt, B. A. (2018). A bivalent compound targeting CCR5 and the mu opioid receptor treats inflammatory arthritis pain in mice without inducing pharmacologic tolerance. *Arthritis Research & Therapy*, 20, 154–163. <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1661-5>
- Dvoracko, S., Keresztes, A., Mollica, A., Stefanucci, A., Macedonio, G., Pieretti, S., Zádor, F., Walter, F. R., Deli, M. A., Kékesi, G., Bánki, L., Tuboly, G., Horváth, G., & Tömböly, C. (2019). Preparation of bivalent agonists for targeting the mu opioid and cannabinoid receptors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 571–588. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.037>
- Eichel, K., & von Zastrow, M. (2018). Subcellular organization of GPCR signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.11.009>
- Erbs, E., Faget, L., Ceredig, R. A., Matifas, A., Vonesch, J. L., Kieffer, B. L., & Massotte, D. (2016). Impact of chronic morphine on delta opioid receptor-expressing neurons in the mouse hippocampus. *Neuroscience*, 313, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.022>
- Erbs, E., Faget, L., Scherrer, G., Matifas, A., Filliol, D., Vonesch, J. L., Koch, M., Kessler, P., Hentsch, D., Birling, M.-C., Koutsourakis, M., Vasseur, L., Veinante, P., Kieffer, B. L., & Massotte, D. (2015). A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Structure & Function*, 220, 677–702. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0717-9>
- Evans, R. M., You, H., Hameed, S., Altier, C., Mezghrani, A., Bourinet, E., & Zamponi, G. W. (2010). Heterodimerization of ORL1 and opioid receptors and its consequences for N-type calcium channel regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 1032–1040. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.040634>
- Fan, T., Varghese, G., Nguyen, T., Tse, R., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2005). A role for the distal carboxyl tails in generating the novel pharmacology and G protein activation profile of mu and delta opioid receptor hetero-oligomers. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 38478–38488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505644200>
- Faouzi, A., Uprety, R., Gomes, I., Massaly, N., Keresztes, A. I., Le Rouzic, V., Gupta, A., Zhang, T., Yoon, H. J., Ansonoff, M., Allaoa, A., Pan, Y. X., Pintar, J., Morón, J. A., Streicher, J. M., Devi, L. A., & Majumdar, S. (2020). Synthesis and pharmacology of a novel mu-delta opioid receptor Heteromer-selective agonist based on the Carfentanyl template. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(22), 13618–13637. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00901>
- Filliol, D., Ghozland, S., Chluba, J., Martin, M., Matthes, H. W., Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Dierich, A., LeMeur, M., Valverde, O., Maldonado, R., & Kieffer, B. L. (2000). Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nature Genetics*, 25, 195–200. <https://doi.org/10.1038/76061>
- Fujita, W., Gomes, I., & Devi, L. A. (2014). Revolution in GPCR signaling: Opioid receptor heteromers as novel therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*, 171, 4155–4176. <https://doi.org/10.1111/bph.12798>
- Fujita, W., Gomes, I., Dove, L. S., Prohaska, D., McIntyre, G., & Devi, L. A. (2014). Molecular characterization of eluxadoline as a potential ligand targeting mu-delta opioid receptor heteromers. *Biochemical Pharmacology*, 92, 448–456. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.09.015>
- Fujita, W., Yokote, M., Gomes, I., Gupta, A., Ueda, H., & Devi, L. A. (2019). Regulation of an opioid receptor chaperone protein, RTP4, by Morphine. *Molecular Pharmacology*, 95, 11–19. <https://doi.org/10.1124/mol.118.112987>
- Garcia-Recio, A., Navarro, G., Franco, R., Olivella, M., Guixa-Gonzalez, R., & Cordomi, A. (2020). DIMERBOW: Exploring possible GPCR dimer interfaces. *Bioinformatics*, 36, 3271–3272. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa117>
- Gendron, L., Mittal, N., Beaudry, H., & Walwyn, W. (2015). Recent advances on the delta opioid receptor: From trafficking to function. *British Journal of Pharmacology*, 172, 403–419. <https://doi.org/10.1111/bph.12706>
- Gillis, A., Kliewer, A., Kelly, E., Henderson, G., Christie, M. J., Schulz, S., & Canals, M. (2020). Critical assessment of G protein-biased Agonism at the mu-opioid receptor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41, 947–959. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.09.009>
- Gomes, I., Fujita, W., Gupta, A., Saldanha, S. A., Negri, A., Pinello, C. E., Eberhart, C., Roberts, E., Filizola, M., Hodder, P., & Devi, L. A. (2013). Identification of a mu-delta opioid receptor heteromer-biased agonist with antinociceptive activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 12072–12077. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222044110>
- Gomes, I., Gupta, A., Filipovska, J., Szeto, H. H., Pintar, J. E., & Devi, L. A. (2004). A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 5135–5139. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307601101>
- Gomes, I., Ijzerman, A. P., Ye, K., Maillet, E. L., & Devi, L. A. (2011). G protein-coupled receptor heteromerization: A role in allosteric modulation of ligand binding. *Molecular Pharmacology*, 79, 1044–1052. <https://doi.org/10.1124/mol.110.070847>
- Gomes, I., Jordan, B. A., Gupta, A., Trapaidze, N., Nagy, V., & Devi, L. A. (2000). Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *Journal of Neuroscience*, 20, 1–5. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-22-j0007.2000>
- Gormal, R. S., Padmanabhan, P., Kasula, R., Bademosi, A. T., Coakley, S., Giacomotto, J., Blum, A., Joensuu, M., Wallis, T. P., Lo, H. P., Budnar, S., Rae, J., Ferguson, C., Bastiani, M., Thomas, W. G., Pardon, E., Steyaert, J., Yap, A. S., Goodhill, G. J., ... Meunier, F. A. (2020). Modular transient nanoclustering of activated beta2-adrenergic receptors revealed by single-molecule tracking of conformation-specific nanobodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117, 30476–30487. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007443117>
- Grimm, M. C., Ben-Baruch, A., Taub, D. D., Howard, O. M., Resau, J. H., Wang, J. M., Ali, H., Richardson, R., Snyderman, R., & Oppenheim, J. J. (1998). Opiates transdeactivate chemokine receptors: Delta and mu opiate receptor-mediated heterologous desensitization. *The Journal of Experimental Medicine*, 188, 317–325. <https://doi.org/10.1084/jem.188.2.317>
- Gunther, T., Dasgupta, P., Mann, A., Miess, E., Kliewer, A., Fritzwanker, S., Steinborn, R., & Schulz, S. (2018). Targeting multiple opioid receptors - improved analgesics with reduced side effects? *British Journal of Pharmacology*, 175, 2857–2868. <https://doi.org/10.1111/bph.13809>

- Gupta, A., Mulder, J., Gomes, I., Rozenfeld, R., Bushlin, I., Ong, E., Lim, M., Maillet, E., Junek, M., Cahill, C. M., Harkany, T., & Devi, L. A. (2010). Increased abundance of opioid receptor heteromers after chronic morphine administration. *Science Signaling*, 3, ra54. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000807>
- Harvey, J. H., Long, D. H., England, P. M., & Whistler, J. L. (2012). Tuned-affinity bivalent ligands for the characterization of opioid receptor heteromers. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 3, 640–644. <https://doi.org/10.1021/ml300083p>
- Hasbi, A., Nguyen, T., Fan, T., Cheng, R., Rashid, A., Alijaniam, M., Rasenick, M. M., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2007). Trafficking of preassembled opioid mu-delta heterooligomer-Gz signaling complexes to the plasma membrane: Coregulation by agonists. *Biochemistry*, 46, 12997–13009. <https://doi.org/10.1021/bi701436w>
- He, S. Q., Zhang, Z. N., Guan, J. S., Liu, H. R., Zhao, B., Wang, H. B., Li, Q., Yang, H., Luo, J., Li, Z. Y., Wang, Q., Lu, Y. J., Bao, L., & Zhang, X. (2011). Facilitation of mu-opioid receptor activity by preventing delta-opioid receptor-mediated codegradation. *Neuron*, 69, 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.001>
- Heinisch, S., Palma, J., & Kirby, L. G. (2011). Interactions between chemokine and mu-opioid receptors: Anatomical findings and electrophysiological studies in the rat periaqueductal grey. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25, 360–372. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.020>
- Illes, P., & Norenberg, W. (1990). Blockade of alpha 2-adrenoceptors increases opioid mu-receptor-mediated inhibition of the firing rate of rat locus coeruleus neurones. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 342, 490–496. <https://doi.org/10.1007/BF00169034>
- Inyang, K. E., George, S. R., & Laumet, G. (2021). The micro-delta opioid heteromer masks latent pain sensitization in neuropathic and inflammatory pain in male and female mice. *Brain Research*, 1756, 147298. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147298>
- Jacobs, B. A., Pando, M. M., Jennings, E., Chavera, T. A., Clarke, W. P., & Berg, K. A. (2018). Allosterism within delta opioid-kappa opioid receptor Heteromers in peripheral sensory neurons: Regulation of kappa opioid agonist efficacy. *Molecular Pharmacology*, 93, 376–386. <https://doi.org/10.1124/mol.117.109975>
- Jacobs, B. A., Pando, M. M., Jennings, E. M., Jamshidi, R. J., Zamora, J. C., Chavera, T. S., Clarke, W. P., & Berg, K. A. (2019). Signaling characteristics and functional regulation of delta opioid-kappa opioid receptor (DOP-KOP) heteromers in peripheral sensory neurons. *Neuropharmacology*, 151, 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.02.019>
- Jonas, K. C., Fanelli, F., Huhtaniemi, I. T., & Hanyaloglu, A. C. (2015). Single molecule analysis of functionally asymmetric G protein-coupled receptor (GPCR) oligomers reveals diverse spatial and structural assemblies. *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 3875–3892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.622498>
- Jorand, R., Biswas, S., Wakefield, D. L., Tobin, S. J., Golfetto, O., Hilton, K., Ko, M., Ramos, J. W., Small, A. R., Chu, P., Singh, G., & Jovanovic-Talman, T. (2016). Molecular signatures of mu opioid receptor and somatostatin receptor 2 in pancreatic cancer. *Molecular Biology of the Cell*, 27, 3659–3672. <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-06-0427>
- Jordan, B. A., & Devi, L. A. (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, 399, 697–700. <https://doi.org/10.1038/21441>
- Jordan, B. A., Gomes, I., Rios, C., Filipovska, J., & Devi, L. A. (2003). Functional interactions between mu opioid and alpha 2A-adrenergic receptors. *Molecular Pharmacology*, 64, 1317–1324. <https://doi.org/10.1124/mol.64.6.1317>
- Juhasz, J. R., Hasbi, A., Rashid, A. J., So, C. H., George, S. R., & O'Dowd, B. F. (2008). Mu-opioid receptor heterooligomer formation with the dopamine D1 receptor as directly visualized in living cells. *European Journal of Pharmacology*, 581, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.060>
- Kabli, N., Nguyen, T., Balboni, G., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2013). Antidepressant-like and anxiolytic-like effects following activation of the mu-delta opioid receptor heteromer in the nucleus accumbens. *Molecular Psychiatry*, 19, 968–994. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.115>
- Kamp, M. A., Hanggi, D., Steiger, H. J., & Schneider, T. (2012). Diversity of presynaptic calcium channels displaying different synaptic properties. *Reviews in the Neurosciences*, 23, 179–190. <https://doi.org/10.1515/review-2011-0070>
- Kantas, B., Borzsei, R., Szoke, E., Banhegyi, P., Horvath, A., Hunyady, A., Borbély, É., Hetényi, C., Pintér, E., & Helyes, Z. (2019). Novel drug-like somatostatin receptor 4 agonists are potential analgesics for neuropathic pain. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 6245–6261. <https://doi.org/10.3390/ijms20246245>
- Kathmann, M., Flau, K., Redmer, A., Trankle, C., & Schlicker, E. (2006). Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 372, 354–361. <https://doi.org/10.1007/s00210-006-0033-x>
- Kharmate, G., Rajput, P. S., Lin, Y. C., & Kumar, U. (2013). Inhibition of tumor promoting signals by activation of SSTR2 and opioid receptors in human breast cancer cells. *Cancer Cell International*, 13, 93–105. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-93>
- Kiguchi, N., Ding, H., Kishioka, S., & Ko, M. C. (2020). Nociceptin/Orphanin FQ peptide receptor-related ligands as novel analgesics. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 20, 2878–2888. <https://doi.org/10.2174/156802662066200508082615>
- Kliwer, A., Schmiedel, F., Sianati, S., Bailey, A., Bateman, J. T., Levitt, E. S., Williams, J. T., Christie, M. J., & Schulz, S. (2019). Phosphorylation-deficient G-protein-biased mu-opioid receptors improve analgesia and diminish tolerance but worsen opioid side effects. *Nature Communications*, 10, 367–377. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08162-1>
- Koshimizu, T. A., Honda, K., Nagaoka-Uozumi, S., Ichimura, A., Kimura, I., Nakaya, M., Sakai, N., Shibata, K., Ushijima, K., Fujimura, A., Hirasawa, A., Kurose, H., Tsujimoto, G., Tanoue, A., & Takano, Y. (2018). Complex formation between the vasopressin 1b receptor, beta-arrestin-2, and the mu-opioid receptor underlies morphine tolerance. *Nature Neuroscience*, 21, 820–833. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0144-y>
- Kremer, M., Salvat, E., Muller, A., Yalcin, I., & Barrot, M. (2016). Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. *Neuroscience*, 338, 183–206. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.057>
- Lambert, G. A., & Zagami, A. S. (2018). Does somatostatin have a role to play in migraine headache? *Neuropeptides*, 69, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2018.04.006>
- Law, P. Y., Erickson-Herbrandson, L. J., Zha, Q. Q., Solberg, J., Chu, J., Sarre, A., & Loh, H. H. (2005). Heterodimerization of mu- and delta-opioid receptors occurs at the cell surface only and requires receptor-G protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 11152–11164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500171200>
- Le Naour, M., Akgun, E., Yekkirala, A., Lunzer, M. M., Powers, M. D., Kalyuzhny, A. E., & Portoghesse, P. S. (2013). Bivalent ligands that target mu opioid (MOP) and cannabinoid1 (CB1) receptors are potent analgesics devoid of tolerance. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 5505–5513. <https://doi.org/10.1021/jm4005219>
- Lee, Y. K., Choi, D. Y., Jung, Y. Y., Yun, Y. W., Lee, B. J., Han, S. B., & Hong, J. T. (2013). Decreased pain responses of C-C chemokine receptor 5 knockout mice to chemical or inflammatory stimuli. *Neuropharmacology*, 67, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.10.030>
- Lei, W., Vekariya, R. H., Ananthan, S., & Streicher, J. M. (2020). A novel Mu-Delta opioid agonist demonstrates enhanced efficacy with reduced tolerance and dependence in mouse neuropathic pain models. *The Journal of Pain*, 21, 146–160. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2019.05.017>

- Lenard, N. R., Daniels, D. J., Portoghese, P. S., & Roerig, S. C. (2007). Absence of conditioned place preference or reinstatement with bivalent ligands containing mu-opioid receptor agonist and delta-opioid receptor antagonist pharmacophores. *European Journal of Pharmacology*, 566, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.02.040>
- Liu, H., Tian, Y., Ji, B., Lu, H., Xin, Q., Jiang, Y., Ding, L., Zhang, J., Chen, J., & Bai, B. (2016). Heterodimerization of the kappa opioid receptor and neurotensin receptor 1 contributes to a novel beta-arrestin-2-biased pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863, 2719–2738. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.07.009>
- Liu, N. J., Chakrabarti, S., Schnell, S., Wessendorf, M., & Gintzler, A. R. (2011). Spinal synthesis of estrogen and concomitant signaling by membrane estrogen receptors regulate spinal kappa- and mu-opioid receptor heterodimerization and female-specific spinal morphine antinociception. *The Journal of Neuroscience*, 31, 11836–11845. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1901-11.2011>
- Liu, N. J., von Gyzicki, H., & Gintzler, A. R. (2007). Sexually dimorphic recruitment of spinal opioid analgesic pathways by the spinal application of morphine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322, 654–660. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.123620>
- Liu, X. Y., Liu, Z. C., Sun, Y. G., Ross, M., Kim, S., Tsai, F. F., Li, Q.-F., Jeffry, J., Kim, J.-Y., Loh, H. H., & Chen, Z.-F. (2011). Unidirectional cross-activation of GRPR by MOR1D uncouples itch and analgesia induced by opioids. *Cell*, 147, 447–458. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.043>
- Livingston, K. E., Mahoney, J. P., Manglik, A., Sunahara, R. K., & Traynor, J. R. (2018). Measuring ligand efficacy at the mu-opioid receptor using a conformational biosensor. *eLife*, 7, e32499. <https://doi.org/10.7554/eLife.32499>
- Machelska, H., & Celik, M. O. (2018). Advances in achieving opioid analgesia without side effects. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1388. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01388>
- Manduca, A., Lassalle, O., Sepers, M., Campolongo, P., Cuomo, V., Marsicano, G., Kieffer, B., Vanderschuren, L. J., Trezza, V., & Manzoni, O. J. (2016). Interacting cannabinoid and opioid receptors in the nucleus Accumbens Core control adolescent social play. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10, 211. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00211>
- Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Mathiesen, J. M., Sunahara, R. K., Pardo, L., Weis, W. I., Kobilka, B. K., & Granier, S. (2012). Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, 485, 321–326. <https://doi.org/10.1038/nature10954>
- Margolis, E. B., Fujita, W., Devi, L. A., & Fields, H. L. (2017). Two delta opioid receptor subtypes are functional in single ventral tegmental area neurons, and can interact with the mu opioid receptor. *Neuropharmacology*, 123, 420–432. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.06.019>
- Massotte, D. (2015). In vivo opioid receptor heteromerization: Where do we stand? *British Journal of Pharmacology*, 172, 420–434. <https://doi.org/10.1111/bph.12702>
- Mathews, J. L., Fulton, B. S., Negus, S. S., Neumeier, J. L., & Bidlack, J. M. (2008). In vivo characterization of (–)(–)MCL-144 and (+)(–)MCL-193: Isomeric, bivalent ligands with mu/kappa agonist properties. *Neurochemical Research*, 33, 2142–2150. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9752-3>
- Matthes, H. W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dollé, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B. P., & Kieffer, B. L. (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature*, 383, 819–823. <https://doi.org/10.1038/383819a0>
- Menon, S., Lea, R. A., Roy, B., Hanna, M., Wee, S., Haupt, L. M., & Griffiths, L. R. (2012). The human mu-opioid receptor gene polymorphism (A118G) is associated with head pain severity in a clinical cohort of female migraine with aura patients. *The Journal of Headache and Pain*, 13, 513–519. <https://doi.org/10.1007/s10194-012-0468-z>
- Mitronova, G. Y., Lukinavicius, G., Butkevich, A. N., Kohl, T., Belov, V. N., Lehnart, S. E., & Hell, S. W. (2017). High-affinity functional fluorescent ligands for human beta-adrenoceptors. *Scientific Reports*, 7, 12319–12333. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12468-3>
- Moller, J., Isbilir, A., Sungkaworn, T., Osberg, B., Karathanasis, C., Sunkara, V., Grushevskiy, E. O., Bock, A., Annibale, P., Heilemann, M., Schütte, C., & Lohse, M. J. (2020). Single-molecule analysis reveals agonist-specific dimer formation of micro-opioid receptors. *Nature Chemical Biology*, 16, 946–954. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0566-1>
- Moller, T. C., Hottin, J., Clerte, C., Zwier, J. M., Durroux, T., Rondard, P., Prézeau, L., Royer, C. A., Pin, J.-P., Margeat, E., & Kniazeff, J. (2018). Oligomerization of a G protein-coupled receptor in neurons controlled by its structural dynamics. *Scientific Reports*, 8, 10414–10428. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28682-6>
- Moreno, E., Quiroz, C., Rea, W., Cai, N. S., Mallol, J., Cortes, A., Lluís, C., Canela, E. I., Casadó, V., & Ferré, S. (2017). Functional mu-opioid-Galanin receptor Heteromers in the ventral tegmental area. *The Journal of Neuroscience*, 37, 1176–1186. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2442-16.2016>
- Morgan, M. M., Peecher, D. L., & Streicher, J. M. (2021). Use of home cage wheel running to assess the behavioural effects of administering a mu/delta opioid receptor heterodimer antagonist for spontaneous morphine withdrawal in the rat. *Behavioural Brain Research*, 397, 112953. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112953>
- Nadal, X., La Porta, C., Andreea Bura, S., & Maldonado, R. (2013). Involvement of the opioid and cannabinoid systems in pain control: New insights from knockout studies. *European Journal of Pharmacology*, 716, 142–157. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.01.077>
- O'Dowd, B. F., Ji, X., O'Dowd, P. B., Nguyen, T., & George, S. R. (2012). Disruption of the mu-delta opioid receptor heteromer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 422, 556–560. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.023>
- Olson, K. M., Keresztes, A., Tashiro, J. K., Daconta, L. V., Hruby, V. J., & Streicher, J. M. (2018). Synthesis and evaluation of a novel bivalent selective antagonist for the Mu-Delta opioid receptor heterodimer that reduces Morphine withdrawal in mice. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61, 6075–6086. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00403>
- Ozawa, A., Brunori, G., Mercatelli, D., Wu, J., Cippitelli, A., Zou, B., Xie, X. S., Williams, M., Zaveri, N. T., Low, S., Scherrer, G., Kieffer, B. L., & Toll, L. (2015). Knock-in mice with NOP-eGFP receptors identify receptor cellular and regional localization. *The Journal of Neuroscience*, 35, 11682–11693. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5122-14.2015>
- Pei, L., Lee, F. J., Moszczynska, A., Vukusic, B., & Liu, F. (2004). Regulation of dopamine D1 receptor function by physical interaction with the NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience*, 24, 1149–1158. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3922-03.2004>
- Pello, O. M., Martinez-Munoz, L., Parrillas, V., Serrano, A., Rodriguez-Frade, J. M., Toro, M. J., Lucas, P., Monterrubio, M., Martínez-A, C., & Mellado, M. (2008). Ligand stabilization of CXCR4/delta-opioid receptor heterodimers reveals a mechanism for immune response regulation. *European Journal of Immunology*, 38, 537–549. <https://doi.org/10.1002/eji.200737630>
- Pierre, F., Ugur, M., Faivre, F., Doridot, S., Veinante, P., & Massotte, D. (2019). Morphine-dependent and abstinent mice are characterized by a broader distribution of the neurons co-expressing mu and delta opioid receptors. *Neuropharmacology*, 152, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.03.009>
- Prangmsa, J. C., Molenaar, R., van Weeren, L., Bindels, D. S., Haarbosch, L., Stouthamer, J., Gadella, T. W. J. Jr., Subramaniam, V., Vos, W. L., & Blum, C. (2020). Quantitative determination of dark

- chromophore population explains the apparent Low quantum yield of red fluorescent proteins. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 124, 1383–1391. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b10396>
- Provasi, D., Boz, M. B., Johnston, J. M., & Filizola, M. (2015). Preferred supramolecular organization and dimer interfaces of opioid receptors from simulated self-association. *PLoS Computational Biology*, 11, e1004148. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004148>
- Raehal, K. M., Walker, J. K., & Bohn, L. M. (2005). Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314, 1195–1201. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.087254>
- Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X. J., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R., Ushida, T., & Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: Concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161, 1976–1982. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>
- Rios, C., Gomes, I., & Devi, L. A. (2006). Mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: Reciprocal inhibition of receptor signaling and neurogenesis. *British Journal of Pharmacology*, 148, 387–395. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706757>
- Rives, M. L., Rossillo, M., Liu-Chen, L. Y., & Javitch, J. A. (2012). 6'-Guanidinonaltrindole (6'-GNTI) is a G protein-biased kappa-opioid receptor agonist that inhibits arrestin recruitment. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 27050–27054. <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.387332>
- Rodríguez, J. J., Mackie, K., & Pickel, V. M. (2001). Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat caudate putamen nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 21, 823–833. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-03-00823.2001>
- Rodríguez-Munoz, M., Sanchez-Blazquez, P., Vicente-Sanchez, A., Berrocoso, E., & Garzon, J. (2012). The mu-opioid receptor and the NMDA receptor associate in PAG neurons: Implications in pain control. *Neuropsychopharmacology*, 37, 338–349. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.155>
- Rozenfeld, R., Bushlin, I., Gomes, I., Tzavaras, N., Gupta, A., Neves, S., Battini, L., Gusella, G. L., Lachmann, A., Ma'ayan, A., Blitzer, R. D., & Devi, L. A. (2012). Receptor heteromerization expands the repertoire of cannabinoid signaling in rodent neurons. *PLoS ONE*, 7, e29239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029239>
- Rozenfeld, R., & Devi, L. A. (2007). Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: Beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *The FASEB Journal*, 21, 2455–2465. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7793com>
- Sacco, M., Meschi, M., Regolisti, G., Detrenis, S., Bianchi, L., Bertorelli, M., Pioli, S., Magnano, A., Spagnoli, F., Giuri, P. G., Fiaccadori, E., & Caiazza, A. (2013). The relationship between blood pressure and pain. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)*, 15, 600–605. <https://doi.org/10.1111/jch.12145>
- Schmid, C. L., Streicher, J. M., Groer, C. E., Munro, T. A., Zhou, L., & Bohn, L. M. (2013). Functional selectivity of 6'-guanidinonaltrindole (6'-GNTI) at kappa-opioid receptors in striatal neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 22387–22398. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.476234>
- Sierra, S., Gupta, A., Gomes, I., Fowkes, M., Ram, A., Bobeck, E. N., & Devi, L. A. (2019). Targeting cannabinoid 1 and Delta opioid receptor Heteromers alleviates chemotherapy-induced neuropathic pain. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 2, 219–229. <https://doi.org/10.1021/acspsci.9b00008>
- Singleton, S., Baptista-Hon, D. T., Edelsten, E., McCaughey, K. S., Camplisson, E., & Hales, T. G. (2021). TRV130 partial agonism and capacity to induce anti-nociceptive tolerance revealed through reducing available mu-opioid receptor number. *British Journal of Pharmacology*, 178, 1855–1868. <https://doi.org/10.1111/bph.15409>
- Somvanshi, R. K., & Kumar, U. (2014). Delta-opioid receptor and somatostatin receptor-4 heterodimerization: Possible implications in modulation of pain associated signaling. *PLoS ONE*, 9, e85193. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085193>
- Song, C., Rahim, R. T., Davey, P. C., Bednar, F., Bardi, G., Zhang, L., Zhang, N., Oppenheim, J. J., & Rogers, T. J. (2011). Protein kinase Czeta mediates micro-opioid receptor-induced cross-desensitization of chemokine receptor CCR5. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 20354–20365. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.177303>
- Stoneman, M. R., Biener, G., Ward, R. J., Pediani, J. D., Badu, D., Eis, A., Popa, I., Milligan, G., & Raicu, V. (2019). A general method to quantify ligand-driven oligomerization from fluorescence-based images. *Nature Methods*, 16, 493–496. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0408-9>
- Sun, G. C., Ho, W. Y., Chen, B. R., Cheng, P. W., Cheng, W. H., Hsu, M. C., Yeh, T. C., Hsiao, M., Lu, P. J., & Tseng, C. J. (2015). GPCR dimerization in brainstem nuclei contributes to the development of hypertension. *British Journal of Pharmacology*, 172, 2507–2518. <https://doi.org/10.1111/bph.13074>
- Sun, G. C., Wong, T. Y., Chen, H. H., Ho, C. Y., Yeh, T. C., Ho, W. Y., Tseng, C. J., & Cheng, P. W. (2019). Angiotensin II inhibits DDAH1-nNOS signaling via AT1R and muOR dimerization to modulate blood pressure control in the central nervous system. *Clinical Science (London, England)*, 133, 2401–2413. <https://doi.org/10.1042/CS20191005>
- Sungkaworn, T., Jobin, M. L., Burnecki, K., Weron, A., Lohse, M. J., & Calebiro, D. (2017). Single-molecule imaging reveals receptor-G protein interactions at cell surface hot spots. *Nature*, 550, 543–547. <https://doi.org/10.1038/nature24264>
- Suzuki, S., Chuang, L. F., Yau, P., Doi, R. H., & Chuang, R. Y. (2002). Interactions of opioid and chemokine receptors: Oligomerization of mu, kappa, and delta with CCR5 on immune cells. *Experimental Cell Research*, 280, 192–200. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5638>
- Sykes, K. T., White, S. R., Hurley, R. W., Mizoguchi, H., Tseng, L. F., & Hammond, D. L. (2007). Mechanisms responsible for the enhanced antinociceptive effects of micro-opioid receptor agonists in the rostral ventromedial medulla of male rats with persistent inflammatory pain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322, 813–821. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.121954>
- Szabo, I., Chen, X. H., Xin, L., Adler, M. W., Howard, O. M., Oppenheim, J. J., & Rogers, T. J. (2002). Heterologous desensitization of opioid receptors by chemokines inhibits chemotaxis and enhances the perception of pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 10276–10281. <https://doi.org/10.1073/pnas.102327699>
- Tan, M., Walwyn, W. M., Evans, C. J., & Xie, C. W. (2009). p38 MAPK and beta-arrestin 2 mediate functional interactions between endogenous micro-opioid and alpha2A-adrenergic receptors in neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 6270–6281. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806742200>
- Tao, Y. M., Yu, C., Wang, W. S., Hou, Y. Y., Xu, X. J., Chi, Z. Q., Ding, Y. Q., Wang, Y. J., & Liu, J. G. (2017). Heteromers of mu opioid and dopamine D1 receptors modulate opioid-induced locomotor sensitization in a dopamine-independent manner. *British Journal of Pharmacology*, 174, 2842–2861. <https://doi.org/10.1111/bph.13908>
- Tiwari, V., He, S. Q., Huang, Q., Liang, L., Yang, F., Chen, Z., Tiwari, V., Fujita, W., Devi, L. A., Dong, X., Guan, Y., & Raja, S. N. (2020). Activation of micro-delta opioid receptor heteromers inhibits neuropathic pain behavior in rodents. *Pain*, 161, 842–855. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001768>
- Toll, L., Berzetei-Gurske, I. P., Polgar, W. E., Brandt, S. R., Adapa, I. D., Rodriguez, L., Schwartz, R. W., Haggart, D., O'Brien, A., White, A., Kennedy, J. M., Craymer, K., Farrington, L., & Auh, J. S. (1998). Standard binding and functional assays related to medications development division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications. *NIDA Research Monograph*, 178, 440–466.

- Treede, R. D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M. I., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N. B., First, M. B., Giamberardino, M. A., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S., ... Wang, S. J. (2019). Chronic pain as a symptom or a disease: The IASP classification of chronic pain for the international classification of diseases (ICD-11). *Pain*, 160, 19–27. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001384>
- Ugur, M., Derouiche, L., & Massotte, D. (2018). Heteromerization modulates mu opioid receptor functional properties in vivo. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1240. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01240>
- van Rijn, R. M., Brissett, D. I., & Whistler, J. L. (2012). Emergence of functional spinal delta opioid receptors after chronic ethanol exposure. *Biological Psychiatry*, 71, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.07.015>
- Vaysse, P. J., Gardner, E. L., & Zukin, R. S. (1987). Modulation of rat brain opioid receptors by cannabinoids. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 241, 534–539.
- Vergura, R., Balboni, G., Spagnolo, B., Gavioli, E., Lambert, D. G., McDonald, J., Trapella, C., Lazarus, L. H., Regoli, D., Guerrini, R., & Salvadori, S. (2008). Anxiolytic- and antidepressant-like activities of H-Dmt-tic-NH-CH (CH₂-COOH)-bid (UFP-512), a novel selective delta opioid receptor agonist. *Peptides*, 29, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.10.012>
- Wade, P. R., Palmer, J. M., McKenney, S., Kenigs, V., Chevalier, K., Moore, B. A., Mabus, J. R., Saunders, P. R., Wallace, N. H., Schneider, C. R., Kimball, E. S., Breslin, H. J., He, W., & Hornby, P. J. (2012). Modulation of gastrointestinal function by MuDelta, a mixed micro opioid receptor agonist/micro opioid receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*, 167, 1111–1125. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02068.x>
- Waldhoer, M., Fong, J., Jones, R. M., Lunzer, M. M., Sharma, S. K., Kostenis, E., Portoghese, P. S., & Whistler, J. L. (2005). A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 9050–9055. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501112102>
- Walwyn, W., John, S., Maga, M., Evans, C. J., & Hales, T. G. (2009). Delta receptors are required for full inhibitory coupling of mu-receptors to voltage-dependent ca(2+) channels in dorsal root ganglion neurons. *Molecular Pharmacology*, 76, 134–143. <https://doi.org/10.1124/mol.109.055913>
- Wang, H. L., Hsu, C. Y., Huang, P. C., Kuo, Y. L., Li, A. H., Yeh, T. H., Tso, A. S., & Chen, Y. L. (2005). Heterodimerization of opioid receptor-like 1 and mu-opioid receptors impairs the potency of micro receptor agonist. *Journal of Neurochemistry*, 92, 1285–1294. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02921.x>
- Xie, W. Y., He, Y., Yang, Y. R., Li, Y. F., Kang, K., Xing, B. M., & Wang, Y. (2009). Disruption of Cdk5-associated phosphorylation of residue threonine-161 of the delta-opioid receptor: Impaired receptor function and attenuated morphine antinociceptive tolerance. *The Journal of Neuroscience*, 29, 3551–3564. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0415-09.2009>
- Yang, Y., Li, Q., He, Q. H., Han, J. S., Su, L., & Wan, Y. (2018). Heteromerization of mu-opioid receptor and cholecystokinin B receptor through the third transmembrane domain of the mu-opioid receptor contributes to the anti-opioid effects of cholecystokinin octapeptide. *Experimental & Molecular Medicine*, 50, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0090-5>
- Yekkirala, A. S., Lunzer, M. M., McCurdy, C. R., Powers, M. D., Kalyuzhny, A. E., Roerig, S. C., & Portoghese, P. S. (2011). N-naphthoyl-beta-naltrexamine (NNTA), a highly selective and potent activator of mu/kappa-opioid heteromers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 5098–5103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016277108>
- Yin, A. Q., Wang, F., & Zhang, X. (2019). Integrating endocannabinoid signaling in the regulation of anxiety and depression. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40, 336–341. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0051-5>
- Yoo, J. H., Bailey, A., Borsodi, A., Toth, G., Matifas, A., Kieffer, B. L., & Kitchen, I. (2014). Knockout subtraction autoradiography: A novel ex vivo method to detect heteromers finds sparse KOP receptor/DOP receptor heterodimerization in the brain. *European Journal of Pharmacology*, 731, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.03.007>
- Zhang, Z., & Pan, Z. Z. (2010). Synaptic mechanism for functional synergism between delta- and mu-opioid receptors. *The Journal of Neuroscience*, 30, 4735–4745. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5968-09.2010>
- Zheng, H., Zou, H., Liu, X., Chu, J., Zhou, Y., Loh, H. H., & Law, P. Y. (2012). Cholesterol level influences opioid signaling in cell models and analgesia in mice and humans. *Journal of Lipid Research*, 53, 1153–1162. <https://doi.org/10.1194/jlr.M024455>

How to cite this article: Gaborit, M., & Massotte, D. (2023).

Therapeutic potential of opioid receptor heteromers in chronic pain and associated comorbidities. *British Journal of Pharmacology*, 180(7), 994–1013. <https://doi.org/10.1111/bph.15772>

ARTICLE

Article

Neurotoxic Potential of Deoxynivalenol in Murine Brain Cell Lines and Primary Hippocampal Cultures

Christiane Kruse Fæste ^{1,*}, Anita Solhaug ¹, Marion Gaborit ², Florian Pierre ^{2,†} and Dominique Massotte ^{2,*}¹ Toxinology Research Group, Norwegian Veterinary Institute, 1433 Ås, Norway; anita.solhaug@vetinst.no² Centre de la Recherche Nationale Scientifique, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, University of Strasbourg, 67000 Strasbourg, France; gaborit@inci-cnrs.unistra.fr (M.G.); f.pierre@ibmc-cnrs.unistra.fr (F.P.)

* Correspondence: christiane.faste@vetinst.no (C.K.F.); d.massotte@unistra.fr (D.M.); Tel.: +47-47-753-488 (C.K.F.); +33-388-456-652 (D.M.)

† Present Address: Florian Pierre, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 67084 Strasbourg, France.

Abstract: Chronic exposure to the mycotoxin deoxynivalenol (DON) from grain-based food and feed affects human and animal health. Known consequences include entereopathogenic and immunotoxic defects; however, the neurotoxic potential of DON has only come into focus more recently due to the observation of behavioural disorders in exposed farm animals. DON can cross the blood-brain barrier and interfere with the homeostasis/functioning of the nervous system, but the underlying mechanisms of action remain elusive. Here, we have investigated the impact of DON on mouse astrocyte and microglia cell lines, as well as on primary hippocampal cultures by analysing different toxicological endpoints. We found that DON has an impact on the viability of both glial cell types, as shown by a significant decrease of metabolic activity, and a notable cytotoxic effect, which was stronger in the microglia. In astrocytes, DON caused a G1 phase arrest in the cell cycle and a decrease of cyclic-adenosine monophosphate (cAMP) levels. The pro-inflammatory cytokine tumour necrosis factor (TNF)- α was secreted in the microglia in response to DON exposure. Furthermore, the intermediate filaments of the astrocytic cytoskeleton were disturbed in primary hippocampal cultures, and the dendrite lengths of neurons were shortened. The combined results indicated DON's considerable potential to interfere with the brain cell physiology, which helps explain the observed in vivo neurotoxicological effects.

Keywords: astrocytes; deoxynivalenol; microglia; mouse; mycotoxin; primary hippocampal cultures**Key Contribution:** Exposure to low levels of deoxynivalenol affects astrocytes; microglia and neuron physiology. Symptoms of neuroinflammation are observable already before apoptosis is initiated.

Citation: Fæste, C.K.; Solhaug, A.; Gaborit, M.; Pierre, F.; Massotte, D. Neurotoxic Potential of Deoxynivalenol in Murine Brain Cell Lines and Primary Hippocampal Cultures. *Toxins* **2022**, *14*, 48. <https://doi.org/10.3390/toxins14010048>

Received: 18 December 2021

Accepted: 6 January 2022

Published: 10 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The mycotoxin deoxynivalenol (DON) (Figure 1) occurs with high a prevalence in grain-based products worldwide [1]. Consequently, the maximum allowed levels in food and feed have been implemented by national and international authorities, based on toxicity studies and risk assessments, as performed by the European Food Safety Authority (EFSA) [2–4]. Compliance with the regulations generally prevents incidences of acute DON intoxication, but low-level chronic exposure in humans and animals is still common. The monitoring of urinary biomarkers of DON allows evaluating the amounts of ingested DON [5]. Surveys performed in different countries have shown that the mean chronic dietary exposure, especially in children, often exceeds the established tolerable daily intake (TDI) of 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight (bw) for the sum of DON and its derivatives [6,7].

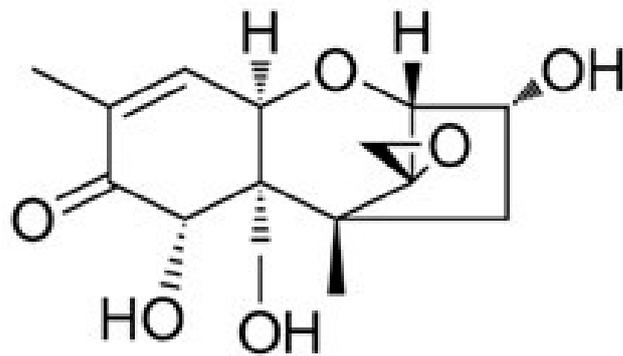


Figure 1. Molecular structure of deoxynivalenol (DON).

Several *in vivo* studies have shown that chronic low-level DON exposure can lead to enteropathogenic, immunotoxic, and neurotoxic effects, resulting in negative changes in gut health, immunological resilience, and behaviours [8–10]. DON-induced neurotoxicity has come into focus only recently, triggered by observed deviant behaviour traits, such as aggressiveness, anxiety, and increased locomotor activity in mice, rats, pigs, poultry, and mealworm beetle larvae after chronic exposure to feedborne DON at concentrations ranging from 0.1 to 25 mg/kg [10–14]. DON can cross the blood-brain barrier and directly modulate brain activity [15,16]. Known consequences of chronic low-dose DON exposure include the disturbance of catecholamine neurotransmitter levels such as dopamine, norepinephrine, and serotonin in the hypothalamus and cortex of different animal species [17–19]. Furthermore, pro-inflammatory cytokines (interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumour necrosis factor (TNF)- α), and the transcription factor c-Fos were increased in specific brain regions, including the *nucleus accumbens*, paraventricular nucleus of the thalamus, and dorsal *tenia tecta* after repeated exposure to low DON concentrations [9,10,12,20–23]. Feeding piglets with >1.3 mg DON/kg feed for 60 days disrupted the cerebral calcium homeostasis, increased lipid oxidation, and decreased the activities of the anti-oxidative enzymes glutathione peroxidase and superoxide dismutase [23]. In rats treated with >0.2 mg DON/kg bw for 42 days, a reduction of the gliocytes and neurons was observed in the myenteric plexus of the jejunum [24].

Several *in vitro* assays have been performed to determine the underlying molecular mode of actions for the detected physiological changes caused by DON. The mycotoxin is water-soluble and uncharged at physiological pH. However, studies in a cell line, derived from colon cells (Caco-2) have shown that DON can pass through cell membranes and reach the cytosol as a substrate of ATP-binding cassette transporters (ABC transporters) [25]. Intracellularly, one primary action of DON is inhibition of the protein synthesis by binding to the 60S ribosomal subunit and decreasing peptidyl transferase capacities, leading to activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and subsequent apoptosis [26]. When DON-triggered effects on transcription and translation reactions were investigated in mouse macrophages by phosphoproteomics, changes in the phosphorylation patterns of almost 200 proteins were observed, including those involved in proliferation, cell cycle, differentiation, and cytoskeleton organisation [27]. Apoptosis through the mitochondrial pathway was prompted by the activation of caspase-3 leading to DNA fragmentation in PC12 cells of rat adrenal medulla [28]. Furthermore, DON was found to cause oxidative stress and damage in chicken embryo fibroblast DF-1 cells [29].

The consequences of exposing macrophages to low DON levels have been investigated in several *in vitro* studies, showing an increased production and secretion of inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α , as well as changes in the surface expression of cell signalling and adhesion molecules as a main outcome [30–34]. Further reactions included the increase of hydrogen peroxide and nitric oxide (NO) levels in the presence of immunostimulants, e.g., lipopolysaccharide (LPS) or interferon [29,30,33,35]. *In vivo*, macrophage-driven inflammation has been identified as an early reaction of chronic low-

level DON exposure both in the gastrointestinal tract and brain of mice, rats, chicken, and pigs [9,12,18,20,36], demonstrating the predictive value of the cell toxicity studies [37].

Interestingly, most assays that elucidate consequences of DON exposure at the cellular level have been performed in intestinal, skin, kidney, or peripheral blood cells. Reports on effects in brain cells are scarce, although relevant DON concentrations can be measured in the brain already 5 min after oral uptake [36]. Furthermore, it has been shown that DON induced apoptosis in a hippocampal cell line from a pig, by triggering the inflammation-related MAPK signalling pathway [15]. Moreover, in rat primary cortical glial cells and immortalized human microglial C13N1 cells, low DON concentrations led to the production of reactive oxygen species from lipid oxidation and NO production [29,35]. Glial cells, including astrocytes and microglia, are essential for maintaining brain homeostasis and functionality as astrocytes provide nutrients and structural support, and microglia supply for the main immune defence in the central nervous system [38]. Disturbance of the physiological balance by DON could be one of the reasons behind the observed *in vivo* neurotoxicity [39].

In the present study, we have, therefore, focussed on investigating DON-induced effects on murine astrocytes and microglial cell lines, as well as on primary brain cells from young mice, while studying relevant endpoints of toxicity in several cytotoxic and functional tests.

2. Results and Discussion

2.1. Viability of Mouse Astrocytes and Microglia

The viability of both glial cell types in the presence of μ molar DON concentrations was assessed by measuring the metabolic activity using the Alamar blue assay and by determining the general cytotoxicity using the Celltox Green assay [40]. Results of the Alamar Blue assay reflect the general impact of a substance on the cells viability, independently of the actual mode of action, which e.g., could be connected to reduced cell proliferation, reduced metabolism, and/or increased cell death. On the other hand, the Celltox Green assay uses the influx of a non-toxic fluorescent dye into the cells with impaired membrane integrity as a measure for general cytotoxicity.

Both the murine astrocytes and microglia showed a significant decrease of metabolic activity already after exposure to 0.8 μ M (IC_{50} 5.8 μ M) and 1.6 μ M DON (IC_{50} 7.2 μ M) for 24 h, respectively (Figure 2a). The microglia were notably more sensitive in the cytotoxicity assay than the astrocytes, with significant differences to the untreated control at 3.1 μ M DON for microglia and at 6.3 μ M DON for astrocytes after exposure for 24 h (Figure 2b). A distinct dissimilarity between the nervous cell types was observable from the further progression of the concentration-cytotoxicity curve, leading to a wide sensitivity gap at 25 μ M.

Considering the results of the Alamar Blue and the Celltox Green tests together, it appeared that the viability decrease of the microglia resulted largely from DON-induced cytotoxicity at concentrations above 3.1 μ M, whereas the rather steep drop in viability observed for the lower DON levels was probably caused by reduced metabolic activity. In the astrocytes, the cytotoxic effects were much less pronounced, as similarly seen at higher DON concentrations, so that they alone are not sufficient to explain the detected viability loss.

A decrease of cell viability connected to a reduced metabolic activity from exposure to DON has previously been determined in human colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells at 10 μ M [41], in dog kidney (MDCKII) cells at 4 μ M [25], in pig pulmonary alveolar macrophages (PAM) at 1 μ M [30], in human (Jurkat T cells or acute monocyte leukaemia cells (THP-1)), and mouse (RAW 264.7) macrophages at 0.8 μ M [31,32,42]. The differences in the measured sensitivities may reflect that different tests, e.g., Alamar Blue or Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), were used to measure the effect of DON on the cell metabolic activity, but could also originate from an increased vulnerability in cells with high metabolic activity. The astrocytes have a considerable high metabolism, due to their

role in nutrient provision, and thus damage repair in the brain might significantly be affected by DON (Figure 2a), while the cells were more resistant to DON-initiated processes causing membrane damage (Figure 2b). As previously shown in human epithelium cells of the small intestine (HT-29-D4), DON can disturb the nutrient absorption by interacting with transmembrane transporters, such as the D-glucose/D-galactose sodium-dependent transporter (SGLT-1), D-fructose transporter (GLUT-5), or the D-glucose transporter 2 (GLUT-2) [43]. A similar interference could be supposed to impair transport mechanisms across the astrocyte cell membrane, namely via the D-glucose transporter GLUT-1 [44]. DON at concentrations of 1 μM or higher has been shown to prevent astrocytes from reabsorbing the neurotransmitter glutamate [35].

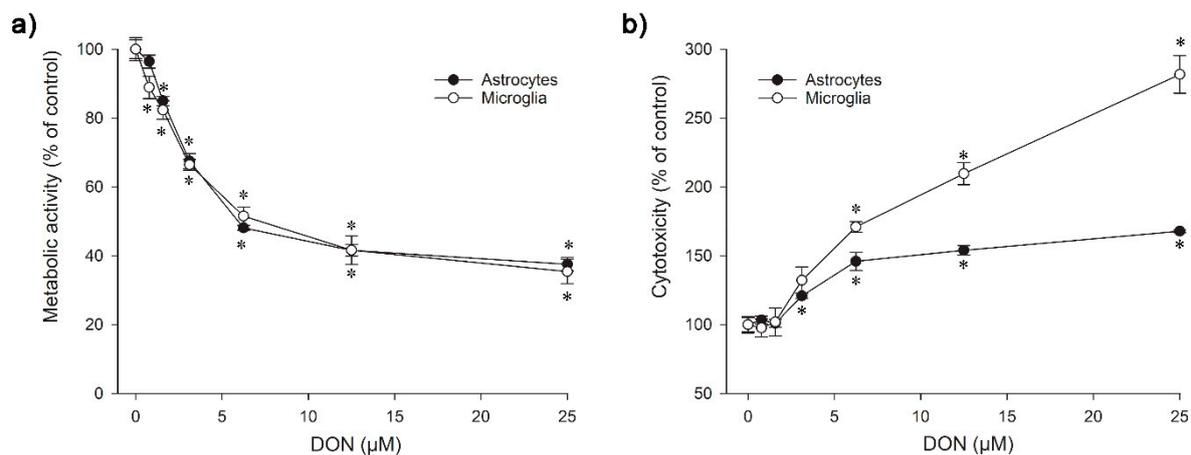


Figure 2. Effect of DON on the viability of astrocytes and microglia after 24 h of exposure; (a) Metabolic activity as measured in the Alamar Blue assay; (b) Cytotoxicity as determined in the Celltox Green assay. The data represent the mean \pm SEMs of four independent experiments performed in triplicates. Significant differences ($p < 0.05$) as compared to the control are indicated with asterisks (*).

Our results showing a disparity in DON sensitivity between murine astrocytes and microglia in the cytotoxicity assay agreed well with previous reports. When primary rat microglia and astrocytes were exposed to DON for 48 h, IC_{50} of 0.6 μM versus 31 μM were measured, and the exposure of immortalised human microglial (C13N) and astrocytic (STTG-1) cells led to IC_{50} 4.1 μM versus 50 μM [35]. A conclusive explanation for the increased DON sensitivity of the microglia has not been offered yet, but it could be connected to the toxin's ribotoxic activity, since the same was found for other agents with a congruous mode of action [33,35]. Glial reactivity is regarded as the key indicator for brain inflammation and as an early biomarker of neurotoxicity [45,46]. Tests involving other monocytes/macrophages demonstrated cytotoxicity at similar DON concentrations, resulting in significant effects at 2 μM in human monocyte leukaemia cells (THP-1), measured by the same Celltox Green assay as used in our study [31]. Alternative test methods for cytotoxicity led to the determination of IC_{20} at 0.4 μM DON in primary porcine macrophages [30] and a significance at 0.2 μM in mouse macrophages (RAW 264.7) [47]. A plausible explanation for the detected differences in DON-related cytotoxicity between astrocytes and microglia could be the much higher proliferation rate of the astrocytes, which makes them more robust due to higher turnover than the slow-proliferating microglia.

2.2. Cell Cycle Analysis in Astrocytes

Looking for possible causes for the somewhat low DON-induced cytotoxicity in the murine astrocytes, we next studied potential effects disturbing the normal sequence of the cell cycle. Healthy, dividing cells synthesise RNA and proteins during the post-mitotic G1 phase, duplicate the DNA in the S phase, increase the production of RNA and proteins in the G2 phase, and undergo mitosis in the M phase. To avoid the generation of cells

with damaged or abnormal DNA, the cell cycle progression in mammalian cells is under strict control by numerous factors, including mediator, effector, and regulator proteins, e.g., phosphokinases, transcription factors, and histones [48]. The arrest or delay of the cell cycle provides time for DNA repair or the initiation of apoptosis to prevent the proliferation of malign copies. Accurate transition from the G1 phase to the S phase is thus a crucial point in the cell cycle.

We observed a significant increase of cells in the G1 phase after 24 h exposure to 5 or 10 μM DON, accompanied by the respective decrease of cells in the S-phase (Figure 3a,b). The ratio of cells present in the G2/M phase was apparently not substantially changed. However, a general slow-down in proliferation was observed already at 1 μM DON (data not shown).

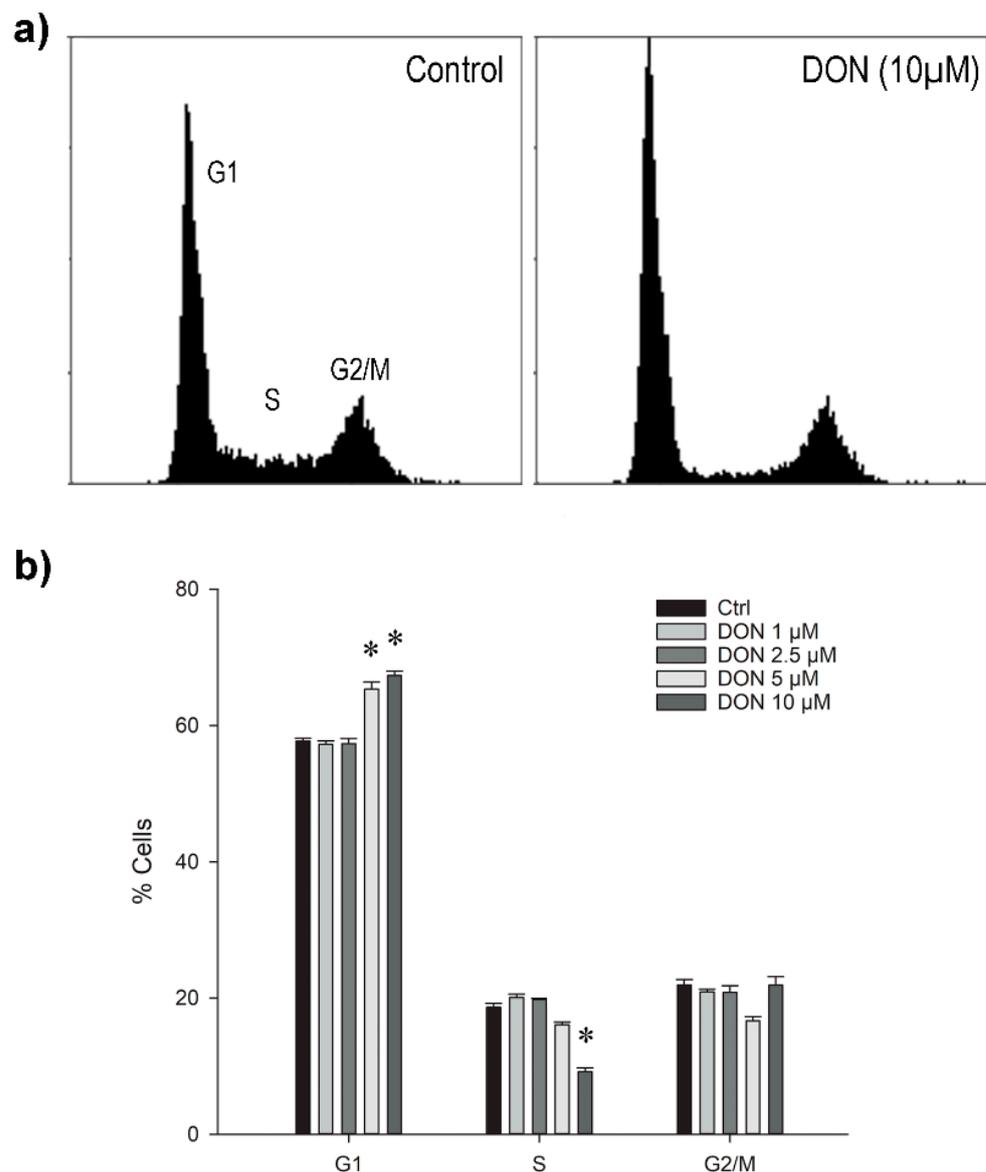


Figure 3. (a) Typical distribution of murine astrocytes after 24 h exposure to 0 or 10 μM DON in different phases of the cell cycle as measured by flow cytometry; (b) Ratios of the cell population in G1, S, and G2/M phases after exposure to different DON concentrations for 24 h. The data are representatives of two independent experiments and are expressed as mean \pm SD of four replicate incubations. Significant differences ($p < 0.05$) as compared to the control are indicated with asterisks (*).

The DON-induced G1 arrest detected in the astrocytes in this study pointed at a substantial disturbance of on-going cellular processes; however, the underlying mechanism is unclear. Considering the ribotoxic activity of DON, interference with protein translation, activation of the MAPK pathway, and the subsequent disruption of regulatory functions that initiate the transition to the S phase could have caused the observed effect. Comparable to our findings, G1 arrest by low-level DON exposure for 24 h as well as the initiation of apoptosis has previously been described in human monocytes (THP-1) [31], mouse macrophages (J774A.1) [49], rat intestinal epithelia (IE-6) [50], and primary pig endometrial cells [51]. For human hepatocarcinoma cells (HepG2) [52] and chicken embryo fibroblasts (DF-1) [29], a significant increase in G1 was determined after exposure to 0.6 μM and 1.7 μM DON, respectively, whereas levels above 1.2 μM and 3 μM , respectively, led to a significant rise in the G2/M cell population and decline of cells in the S-phase accompanied by substantial cell death.

A similar change was found in intestinal pig cells (IPEC-J2), where exposure to 6.8 μM DON for 24 h resulted in the increase and decrease of cell numbers in the G1 and S phase, which was reversed and complemented with an increase of G2/M cells after incubation for 48 h and 72 h [53]. In contrast, incubation of mouse macrophages (RAW264.7) with 1 to 4 μM DON for 12 h blocked the cell cycle immediately in the G2/M phase [32], which was also observed in human intestinal epithelia (HCT-116) after exposure to 0.8 to 3.4 μM for 48 h [54]. Considering the different reports, the detected changes appeared to be influenced by a combination of DON concentrations, exposure periods, and sensitivity of the respective cell lines. Since the orderly organisation of the cell cycle depends on multifactorial coordination, the identification of the decisive part would be challenging [48]. Nevertheless, a recent transcriptomic study of Caco-2 cells that had been exposed to 0.5 μM DON for 24 h revealed changes in the expression of cell cycle-related genes as one of the top five affected pathways, creating the basis for more in-depth target analyses [55].

2.3. Cytokine Secretion in Microglia

Based on the results of the cytotoxicity assay we investigated in a next step, whether DON-stimulated cytokine expression occurred in the murine astrocytes and microglia. While neither TNF- α nor IL-1 β secretion were detectable in astrocytes after 24 h incubation (data not shown), dose-dependent TNF- α secretion was measurable in the microglia at non-cytotoxic DON concentrations (Figure 4). Interestingly, IL-1 β secretion was not found, not even after pre-incubation with the immunostimulant LPS for 3 h (data not shown), which previously had led to increased synergistic release of IL-1 β and TNF- α at low DON concentrations in a human acute monocyte leukaemia cell line (THP-1) [56].

Transcriptomic analysis of primary porcine macrophages incubated with 0.5 μM DON showed that the expression of TNF- α mRNA peaked after 3 h, and TNF- α protein in the cell supernatant was elevated until 48 h [30]. Similarly, IL-1 β mRNA was highest after 3 h DON exposure, but IL-1 β protein declined rapidly and was at 24 h almost at the same level as at 0 h. The additional use of LPS made no difference, which was congruent with our results determined in the murine microglia. The regulation of cytokine profiles in the microglia could be a means of adjusting the progression of neuroinflammation. Moreover, it has been suggested that astrocytes might be able to attenuate microglia activation [45].

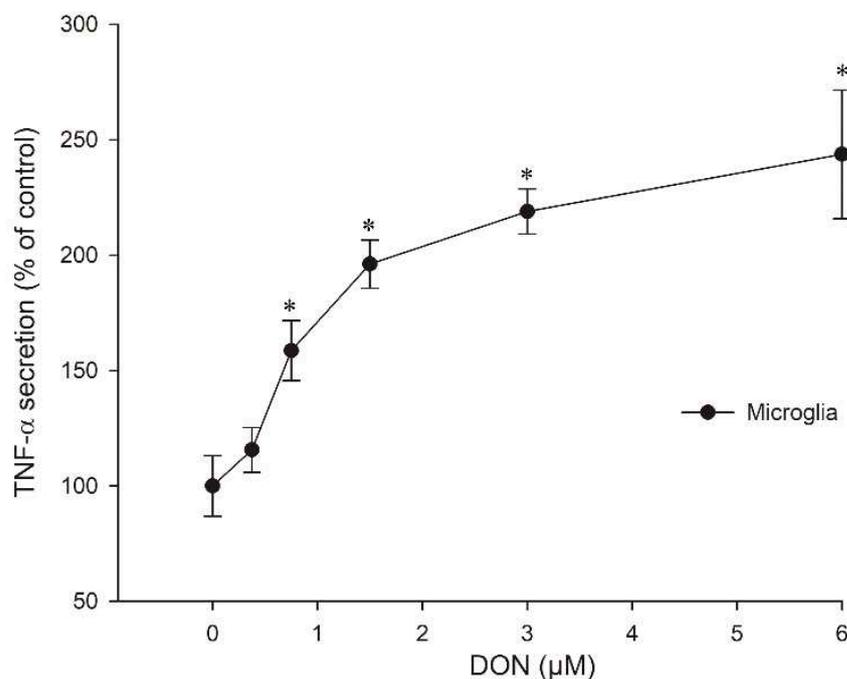


Figure 4. TNF- α secretion in microglial cells after 24 h exposure to different DON concentrations. The data represent the mean \pm SEM of four independent experiments and are normalised to the control at 100 %. Significant differences ($p < 0.05$) as compared to the control are indicated with asterisks (*).

2.4. cAMP Levels

Cyclic-adenosine monophosphate (cAMP) is part of intracellular signal transmission pathways, controlling the activity of protein kinase A as a co-factor and thus regulating the subsequent phosphorylation of multiple substrates that are relevant in stress response, cell proliferation, and development. Neurotoxic chemicals have been shown to affect cAMP levels in astrocytes *in vivo* [57] and to impair cAMP-dependent astrocytic differentiation *in vitro* [58]. Moreover, the stimulation of cAMP-prevented neuroinflammation in primary rat astrocytes by significantly reducing the LPS-inducible nitric oxide synthase (iNOS)/NO release [59].

In the present study, we have, therefore, investigated if exposure to DON could result in changes in the cAMP level in mouse glial cells. The assay revealed that the intracellular cAMP concentrations were affected in astrocytes already after incubation for 1 h (Figure 5), whereas no change was observable in the microglia after this time (data not shown). In contrast, 4 μ M of the positive control substance forskolin, an activator of adenylate cyclase, raised cAMP to about 23 nM in astrocytes and 2 nM in microglia already after 15 min (data not shown). The impact of DON on the astrocytes was dose-dependent, resulting in a slight increase to +1 nM at sub- μ molar level, but a substantial decrease at concentrations above 6 μ M, with -3 nM at 24 μ M DON.

To our knowledge, this is the first time that DON-induced changes in the cAMP level of astrocytes are reported. This mode of action might contribute to understand DON neurotoxicity since cAMP activation has an upstream position in pathways connected to stress alleviation or cell death [60]. Since we found that the cAMP levels were increased by exposure to 0.75 μ M DON and dropped below their physiological level at 6 μ M DON, it could be possible that the first mechanisms to repair the toxin-mediated stress had been initiated, while higher DON levels suppressed the generation of cAMP, switching the outcome to cell death.

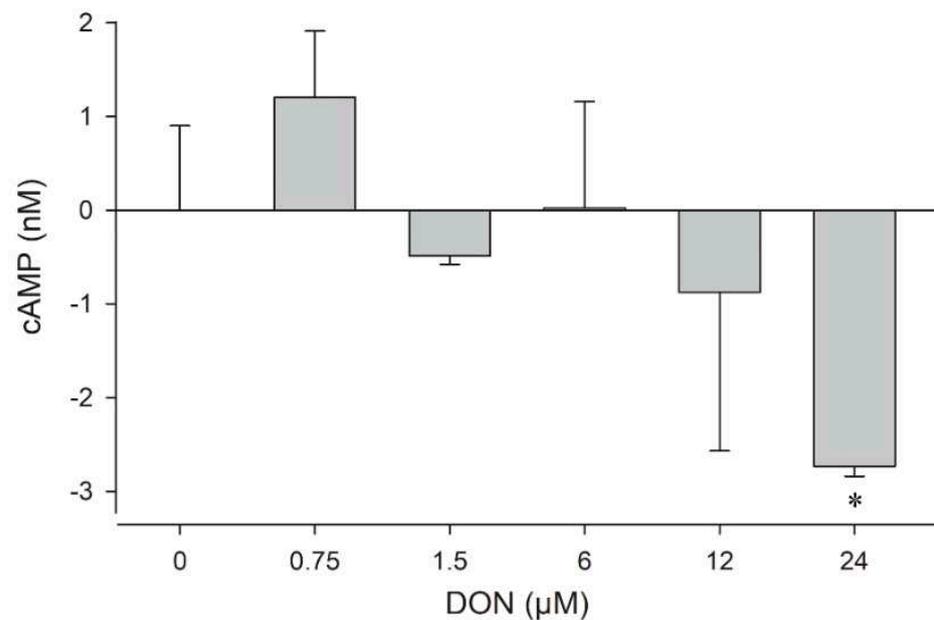


Figure 5. Dose-dependent changes in the cAMP level in murine astrocytes after incubation for 1 h. The data are representative of two independent experiments and are expressed as mean \pm SD of three parallel incubations. Significant differences ($p < 0.05$) determined by Student's t-test are indicated with asterisks (*).

2.5. DON Impact on Glial Cells in Primary Hippocampal Cultures

Cultured primary hippocampal cells, containing astrocytes, microglia, and neurons are a useful model to investigate neuronal vulnerability to toxicants [61]. After their preparation from mouse pup brains, we incubated the hippocampal cells for 15 days, allowing them to interconnect and to fully develop neuronal structures. Exposure to increasing DON levels had a concentration- and time-dependent effect on the astrocyte morphology that became visible by staining of the glial fibrillary acid proteins (GFAP) (Figure 6). Changes could be observed for 6 μ M DON after 24 h exposure but were already detectable after 8 h exposure at higher DON concentrations.

The intermediate filament (type III) GFAP is a fundamental component in the cytoskeleton of astrocytes, shaping cell architecture, providing mechanical strength, regulating filament assembly during mitosis, and helping to support adjacent neurons [62]. There is also evidence for a role in glutamate transporter trafficking and membrane anchoring in astrocytes. The protein is post-translationally modified by phosphorylation at numerous sites, which increases during mitosis. Any disturbance of this process might affect the cell cycle progression in astrocytes, comparably for example, to the changes found in our test using an astrocytes cell culture after 24 h exposure to 5 and 10 μ M DON (Figure 3). In these cultures, the reduction of the astrocytic metabolism was almost maximal for DON at 5 μ M (Figure 2a) and a negative impact on the astrocytic cAMP concentrations was detected at doses higher than 6 μ M (Figure 5).

Phosphorylating enzymes such as protein kinase A are often cAMP-dependent and hence influenced by intracellular cAMP-levels. The observed impact of DON at concentration higher than 5 to 6 μ M in the astrocytes may subsequently affect the GFAP distribution, which is congruent with the morphological changes induced in primary hippocampal cultures by the same DON concentration (Figure 6). Similarly, when primary rat hippocampal cultures were exposed to DON for 48 h and stained for GFAP in a previous study [35], morphological changes in astrocytes were observable above 10 μ M. Interestingly, changes in the morphology of gliocytes and myenteric neurons in the jejunum had been observed in vivo in rats fed with 0.75 mg/kg feed [24].

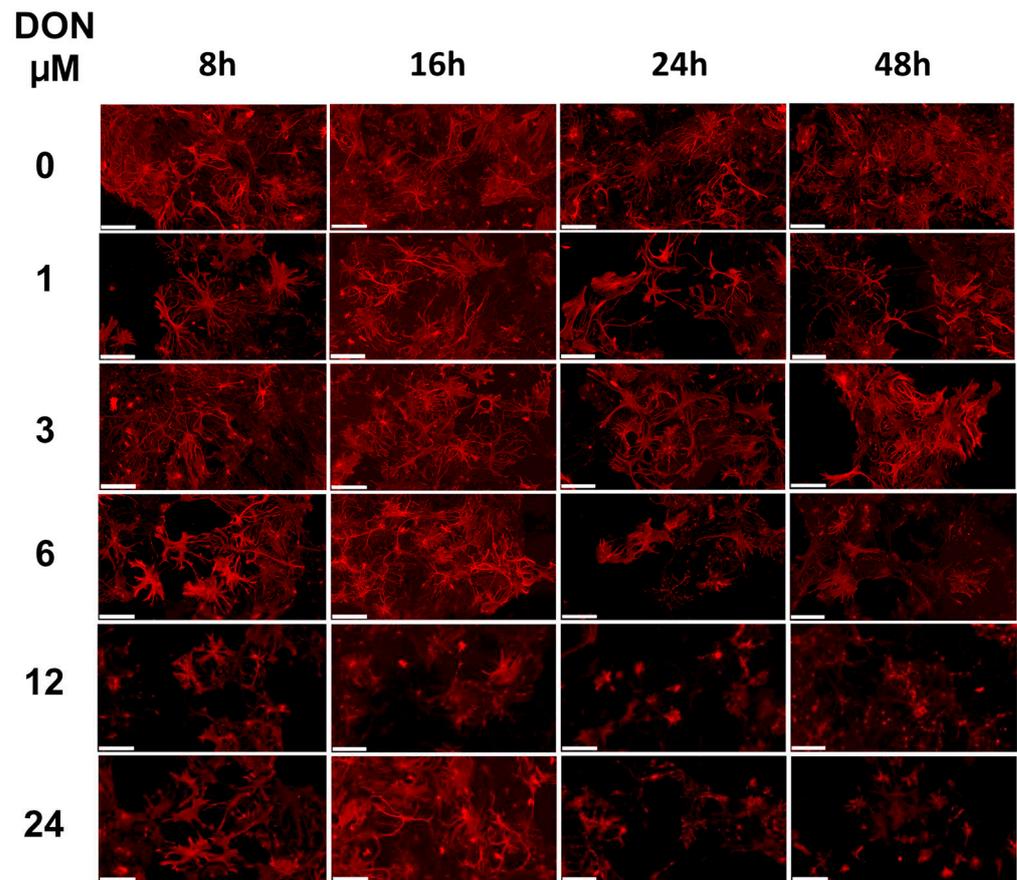


Figure 6. Impact of DON exposure on glial cells in primary hippocampal cultures. Three independent cultures were prepared and analysed for changes in the astrocyte morphology using GFAP staining. Representative images upon treatment with 0, 1, 3, 6, 12, or 24 μM DON for 8, 16, 24, or 48 h. Scale bars: 100 μm .

Altogether, our data illustrated the impact of μmolar DON concentrations on the physiology of astrocytes, both *in vitro* in a monoculture cell line and *ex vivo* in primary hippocampal co-cultures.

2.6. DON Impact on Neurons in Primary Hippocampal Cultures

Next, we examined changes in the neuron morphology in our mouse primary hippocampal cultures using fluorescence immunostaining of the microtubule-associated protein 2 (MAP2) (Figure 7). The integrity of the neuronal shape is of critical importance for nerve cell functionality, conditioning signal transmission, and synaptic connectivity [63]. Several pathologies, particularly neurodegenerative diseases, are characterised by neuronal loss and by a reduction of the dendritic arborisation [64,65].

The cytoskeleton is an important endogenous determinant of neuronal morphology. Involved in providing stability to the cytoarchitecture of neurons is MAP2, an abundantly occurring, high-molecular weight polypeptide. MAP2 is essential for tubulin polymerisation into microtubules and influences dendritic lengths. Thus, it is an established marker for the somato-dendritic compartment of nerve cells.

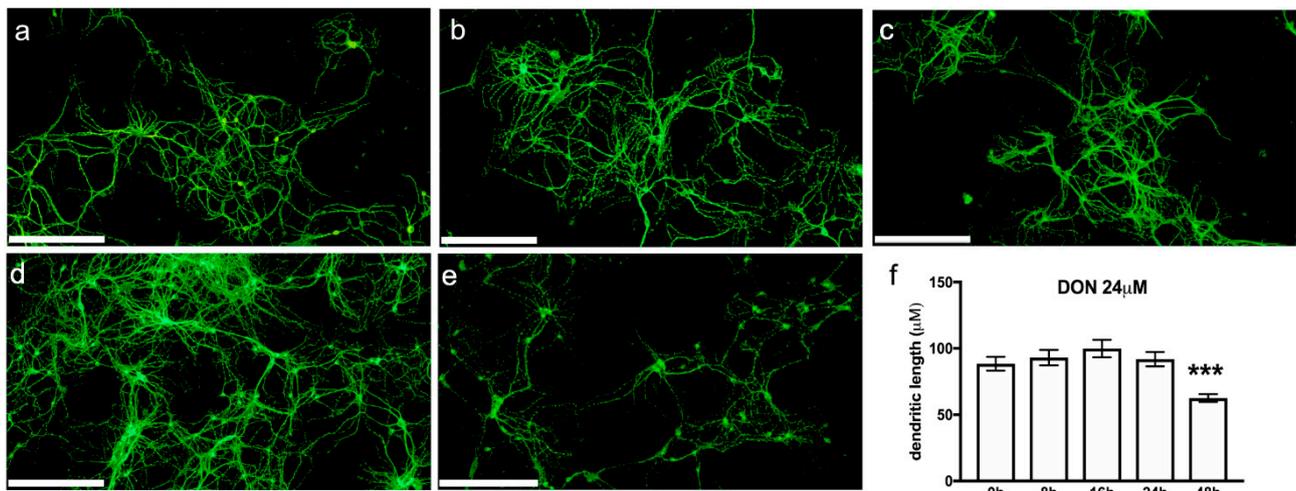


Figure 7. Representative images of murine primary hippocampal cultures: (a) untreated, (b) treated with 24 μM DON for 8 h, (c) 16 h, (d) 24 h, or (e) 48 h. Neurons were identified using MAP2 labelling. Scale bars: 250 μm . (f) Quantification of the dendritic lengths. Data are presented as mean \pm SEM, $n = 40\text{--}80$, *** significant difference ($p < 0.001$) as compared to the other time points.

We examined the impact of 0, 1, 3, 6, 12, or 24 μM DON exposure for 8, 16, 24 or 48 h on the neuronal shape (Figure 7a–e) and observed that the dendritic lengths were significantly shortened after 48 h exposure to 24 μM DON (Figure 7f). This result gives further evidence of DON’s neurotoxic potential. It confirms the impact of chronic low-dose DON exposure, which we previously had detected in neurons of DON-treated mice by using c-fos expression [10].

3. Conclusions

The mycotoxin DON has demonstrated a neurotoxic potential in different animal studies. In the present project, we have investigated the underlying mechanisms of action in mouse astrocytes, microglia, and primary hippocampal cultures. We determined that low μmolar DON concentrations reduced the viability of astrocytes, affected their cell cycle progression, and decreased cAMP levels. In microglia, DON induced cytotoxicity and led to an increased TNF- α secretion. DON exposure affected the morphology of primary neurons by reducing the dendritic arborisation. Taken together, these findings showed that DON interfered with the cellular metabolism/physiology of glial and neuronal cells, which could explain some of the observed neurotoxic in vivo effects.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals

Deoxynivalenol (DON) (D-0156) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). It was dissolved in water for use in the cell exposure studies. Dimethyl sulfoxide (DMSO) and forskolin were from Sigma-Aldrich. Alamar blue, propidium iodide, RNase A, and DRAQ5 were purchased from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM), phosphate buffered saline (PBS), trypsin-versene (EDTA) mixture, penicillin-streptomycin mixture, and foetal bovine serum EU standard (FBS) were from Lonza (Verviers, Belgium). The CellTox Green cytotoxicity assay and cAMP-Glo assay were bought from Promega (Madison, WI, USA). BD BioCoat Cellware poly-L-lysine 12 mm coverslips and the TNF- α ELISA were obtained from BD Biosciences (Bedford, MA, USA). The IL-1 β ELISA was from R & D Systems (Minneapolis, MN, USA).

4.2. Cell Culture Conditions

Murine C8-B4 microglia cells (ATCC CRL-2540; monocytes from cerebellum of C57BL/6 mice (*Mus musculus*) and C8-D1A astrocytes (ATCC CRL-2541; astrocyte type I clone

from C57BL/6 mouse cerebellum) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and grown in DMEM-supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. The microglia and astrocytes were cultured at 37 °C under 5% CO₂ in a humidified incubator (NuAire, Plymouth, MN, USA) and sub-cultivated by trypsinisation once/twice per week in a 1:5/1:10 split ratio, respectively. They were allowed to grow as monolayers in 75 cm² cell culture flasks with filter screwcaps (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) until 80–100% confluence was reached. The microglia and astrocytes were plated at 90,000/cm² and 45,000/cm², respectively, 24 h prior to the test, which resulted in approximately 90% confluence at the day of exposure as observed by light microscopy (Leica DMIL, Solms, Germany). The cell culture medium was refreshed before performing the exposure test.

4.3. Metabolic Activity

Metabolic activity of astrocytes and microglia was measured after exposure to 0.8, 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, and 25 µM DON for 24 h using the Alamar blue assay according to the manufacturer's protocol (ThermoFisher Scientific). The dark blue oxidised form of Alamar Blue (resazurin) is reduced to a highly fluorescent form (resorufin) by mitochondrial or cytoplasmic enzymes. The fluorescence (Ex: 555 nm, Em: 585 nm) was quantified using the Spectramax i3x plate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The measured fluorescence intensity is proportional to the number of viable cells and a measurement of the metabolic fitness of the cells [40].

4.4. Cytotoxicity

Cytotoxic effects of DON (0.8, 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, and 25 µM) in astrocytes and microglia were analysed after 24 h exposure with CellToxTM Green Dye (1:2000). The dye was added to the cells as described by the manufacturer, and fluorescence signals (Em: 485 nm/Em: 520 nm) were quantified with a Spectramax i3x plate reader using the well scan function by reading 32 different points/well in all wells. The cytotoxicity data were normalised by the total cell numbers, which were determined by staining with the nuclear stain DRAQ5 (1:500, 30 min) and counting with the Spectramax i3x plate reader equipped with a microscopic module (MiniMax300imaging cytometer, Molecular Devices), Ex: 625 nm, Em: 713 nm.

4.5. Expression of Cytokines

TNF-α secretion was measured in the supernatants of astrocytes and microglia exposed to 0.38, 0.75, 1.5, 3 and 6 µM DON for 24 h. After centrifugation (500× g, 10 min) to remove cell debris, TNF-α was quantified by enzyme-linked immunosorbent (ELISA) as instructed by the manufacturer using the Spectramax i3x plate reader. IL-1β levels in the cell supernatants were measured by ELISA following the manufacturer's guidelines. Additionally, IL-1β was measured in microglia cells that had been pre-incubated with 0.05 or 0.1 ng/mL LPS for 3 h and exposed to 0.75 or 1.5 µM DON for 24 h.

4.6. Cell Cycle Analysis

For cell cycle analysis, astrocytes and microglia were exposed to 1, 2.5, 5, and 10 µM DON for 24 h, washed with PBS and fixed with ice-cold 70% ethanol overnight at −20 °C. The cells were then washed with PBS, incubated with propidium iodide (10 µg/mL)/RNase A (100 µg/mL) in PBS for 30 min at 37 °C before analysis by flow cytometry (Accuri C6; BD Biosciences). Single cells were gated and a minimum of 10,000 cells acquired and analysed. Data acquired were analysed by Accuri CFlow Plus software (version 1.0.227.4; BD Biosciences).

4.7. Determination of cAMP Levels

Astrocytes and microglia were exposed to 0.75, 1.5, 6, 12 and 24 µM DON for 1 h, and intracellular cAMP concentrations were measured using the cAMP-Glo assay according to

the manufacturer's guidelines (Promega) using the Spectramax i3x plate reader. The cAMP agonist forskolin (4 μ M; 15 min exposure) was used as positive control.

4.8. Primary Hippocampal Cultures from Mouse Pups

Primary hippocampal cell cultures were prepared as previously described [66]. Briefly, P0-P3 mice pups from C57BL/6J:129SvPas (50:50) mice were decapitated. Hippocampi were dissected and digested with papain (20 U/mL, Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA). The cells were plated (8–10 \times 10⁴ cells/well) on poly-L-lysine-coated coverslips in 24-well plates. Cultures were maintained for 15 days in vitro (DIV) with half of the medium (Neurobasal A medium: 2 mM glutamax, 0.5 mM glutamine, penicillin/streptomycin, supplemented with 2% B27) (GIBCO, Loughborough, UK) changed every 5 to 7 days. The cells were incubated for 8 h, 16 h, 24 h, or 48 h with 0, 1, 3, 6, 12, or 24 μ M DON, washed in cold 0.1 M, pH 7.4 PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (32% diluted to 4% before use; ThermoFisher Scientific). The coverslips with fixated cells were washed three times with cold PBS and kept at 4 °C until processing.

4.9. Determination of Neural and Glial Markers by Immunofluorescence

Primary hippocampal cultures were incubated in PBST blocking solution (PBS with 0.2% Tween 20 and 5% normal goat serum; Sigma-Aldrich) for one hour at room temperature (RT) (20–22 °C), and then overnight at 4 °C in blocking solution with mouse anti-microtubule-associated protein 2 (MAP2, (1:1000; Sigma-Aldrich) and rabbit anti-gial fibrillate acid protein (GFAP, 1:5000; DakoCytomation, Glostrup, Denmark) primary antibodies. The cells were washed three times in PBST and incubated for 2 h at RT with goat anti-mouse antibodies coupled to AlexaFluor 647 (1:500; A21240, Molecular Probes; Eugene, OR, USA) and goat anti-rabbit antibodies coupled to AlexaFluor 594 (1:2000; A11012, Molecular Probes). After three washes in PBST and incubation in PBST for 2 h at RT, nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; ThermoFisher Scientific) (1 μ g/mL in PBS) for 5 min in the dark. After the removal of the staining solution, the cells were washed in PBS, mounted with ProLong™ Gold Antifade mounting medium (Molecular Probes) and kept at –20° protected from light until imaging. Images were acquired using the slide scanner NanoZoomer 2 HT with fluorescence module L11600-21 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan). Single RGB colour acquisition was made in the epifluorescence mode with the time delay integration 3-chip camera equipped with a filter-set optimised for DAPI, tetramethylrhodamine and cyanine-5 detection. The acquisition was performed using a dry 20x objective (NA: 0.75). The 40x resolution was achieved with a lens converter. The latter mode used the full capacity of the camera (resolution: 0.23 μ m/pixel).

4.10. Image Analysis

Dendritic lengths were measured on images of neurons labelled with MAP2 (randomly selected from three independent cultures) using the NeuronJ plugin from the Image J package Fiji (Available online: <https://imagej.net/software/fiji/> (accessed on 13 December 2021), which allows semiautomatic tracing and measurement of neurites [67].

4.11. Statistical Analysis

Data of the cellular assays were analysed by using Sigma Plot version 12.0 (Alfasoft AS, Lillestrøm, Norway). Statistical significance ($p < 0.05$) was assessed using 1-way-ANOVA, followed by the Holm-Sidak post-test. When data failed the equal variance test, ANOVA could not be used. Instead, the Student's t-test was performed for comparing the control group to the treated group. Standard error of the mean (SEM) was used for results of the cell line assays, where the mean of several independent experiments with three or more replicates were shown. Standard derivation (SD) was used when one representative experiment with three or more replicates was shown. Statistical analysis of dendritic lengths was performed with Graph-Pad Prism V7 (Available online: <https://www.graphpad.com/>

(accessed on 13 December 2021) using the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc comparison.

Author Contributions: Conceptualization, C.K.F. and D.M.; methodology, D.M. and A.S.; formal analysis, A.S., F.P., M.G. and D.M.; resources, C.K.F. and D.M.; data curation, A.S., C.K.F. and D.M.; writing—original draft preparation, C.K.F.; writing—review and editing, C.K.F., A.S. and D.M.; visualization, C.K.F., A.S. and D.M.; supervision, C.K.F. and D.M.; project administration, C.K.F. and D.M.; funding acquisition, C.K.F. and D.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded through the bilateral PHC AURORA-program by the Research Council of Norway (Grant Number NFR255406) and Campus France, and in addition the CNRS, the University of Strasbourg and the Norwegian Veterinary Institute.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data sets generated during the current study are available from the authors upon request.

Acknowledgments: The authors would like to thank Hege Divon at the Norwegian Veterinary Institute (NVI) for funding the consumables and chemical analyses used in the study through FUNtox, a strategic institute program on Fungi and Mycotoxins in a “One Health” perspective.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Mishra, S.; Srivastava, S.; Dewangan, J.; Divakar, A.; Kumar Rath, S. Global occurrence of deoxynivalenol in food commodities and exposure risk assessment in humans in the last decade: A survey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 1346–1374. [CrossRef]
- EU Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32006R1881> (accessed on 22 June 2021).
- EU Commission Recommendation of 17 August 2006 on the Presence of Deoxynivalenol, Zearalenone, Ochratoxin A, T-2 and HT-2 and Fumonisin in Products Intended for Animal Feeding. Available online: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1440504898051&uri=CELEX:32006H0576> (accessed on 22 June 2021).
- EFSA. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA J.* **2017**, *15*, 4718.
- Vidal, A.; Bouzaghane, N.; De Saeger, S.; De Boevre, M. Human mycotoxin biomonitoring: Conclusive remarks on direct or indirect assessment of urinary deoxynivalenol. *Toxins* **2020**, *12*, 139. [CrossRef]
- Deng, Y.; You, L.; Nepovimova, E.; Wang, X.; Musilek, K.; Wu, Q.; Wu, W.; Kuca, K. Biomarkers of deoxynivalenol (DON) and its modified form DON-3-glucoside (DON-3G) in humans. *Trends Food Sci. Tech.* **2021**, *110*, 551–558. [CrossRef]
- Sundheim, L.; Lillegaard, I.T.; Fæste, C.K.; Brantsæter, A.L.; Brodal, G.; Eriksen, G.S. Deoxynivalenol exposure in Norway, risk assessments for different human age groups. *Toxins* **2017**, *9*, 46. [CrossRef] [PubMed]
- Martins, C.; Torres, D.; Lopes, C.; Correia, D.; Goios, A.; Assunção, R.; Alvito, P.; Vidal, A.; De Boevre, M.; De Saeger, S.; et al. Deoxynivalenol exposure assessment through a modelling approach of food intake and biomonitoring data—A contribution to the risk assessment of an enteropathogenic mycotoxin. *Food Res. Int.* **2021**, *140*, 109863. [CrossRef] [PubMed]
- Tardivel, C.; Airault, C.; Djelloul, M.; Guillebaud, F.; Barbouche, R.; Troadec, J.D.; Gaigé, S.; Dallaporta, M. The foodborne mycotoxin deoxynivalenol induces low-grade inflammation in mice in the absence of observed-adverse effects. *Toxicol. Lett.* **2015**, *232*, 601–611. [CrossRef] [PubMed]
- Fæste, C.K.; Pierre, F.; Ivanova, L.; Sayyari, A.; Massotte, D. Behavioural and metabolomic changes from chronic dietary exposure to low-level deoxynivalenol reveal impact on mouse well-being. *Arch. Toxicol.* **2019**, *93*, 2087–2102. [CrossRef] [PubMed]
- Csikós, V.; Varró, P.; Bódi, V.; Oláh, S.; Világi, I.; Dobolyi, A. The mycotoxin deoxynivalenol activates GABAergic neurons in the reward system and inhibits feeding and maternal behaviours. *Arch. Toxicol.* **2020**, *94*, 3297–3313. [CrossRef] [PubMed]
- Nordgreen, J.; Edwards, S.A.; Boyle, L.A.; Bolhuis, J.E.; Veit, C.; Sayyari, A.; Marin, D.E.; Dimitrov, I.; Janczak, A.M.; Valros, A. A proposed role for pro-inflammatory cytokines in damaging behavior in pigs. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 646. [CrossRef] [PubMed]
- Yegani, M.; Chowdhury, S.R.; Oinas, N.; MacDonald, E.J.; Smith, T.K. Effects of feeding grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on brain regional neurochemistry of laying hens, turkey poults, and broiler breeder hens. *Poult. Sci.* **2006**, *85*, 2117–2123. [CrossRef]

14. Janković-Tomanić, M.; Petković, B.; Todorović, D.; Vranković, J.; Perić-Mataruga, V. Physiological and behavioral effects of the mycotoxin deoxynivalenol in *Tenebrio molitor* larvae. *J. Stored Prod. Res.* **2019**, *83*, 236–242. [[CrossRef](#)]
15. Behrens, M.; Hüwel, S.; Galla, H.J.; Humpf, H.U. Blood-brain barrier effects of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and moniliformin and their transfer to the brain. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Bonnet, M.S.; Roux, J.; Mounien, L.; Dallaporta, M.; Troadec, J.D. Advances in deoxynivalenol toxicity mechanisms: The brain as a target. *Toxins* **2012**, *4*, 1120–1138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Al-Hazmi, M.A.; Waggas, A.M. Neurophysiological and behavioral effects of mycotoxin deoxynivalenol and fumonisin. *Afri. Microbiol. Res.* **2013**, *7*, 1371–1377.
18. Fitzpatrick, D.W.; Boyd, K.E.; Wilson, L.M.; Wilson, J.R. Effect of the trichothecene deoxynivalenol on brain biogenic monoamines concentrations in rats and chickens. *J. Environ. Sci. Health B* **1988**, *23*, 159–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Prelusky, D.B.; Yeung, J.M.; Thompson, B.K.; Trenholm, H.I. Effect of deoxynivalenol on neurotransmitters in discrete regions of swine brain. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1992**, *22*, 36–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Girardet, C.; Bonnet, M.S.; Jdir, R.; Sadoud, M.; Thirion, S.; Tardivel, C.; Roux, J.; Lebrun, B.; Mounien, L.; Trouslard, J.; et al. Central inflammation and sickness-like behavior induced by the food contaminant deoxynivalenol: A PGE2-independent mechanism. *Toxicol. Sci.* **2011**, *124*, 179–191. [[CrossRef](#)]
21. Girardet, C.; Bonnet, M.S.; Jdir, R.; Sadoud, M.; Thirion, S.; Tardivel, C.; Roux, J.; Lebrun, B.; Wanaverbecq, N.; Mounien, L.; et al. The food-contaminant deoxynivalenol modifies eating by targeting anorexigenic neurocircuitry. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e26134. [[CrossRef](#)]
22. Gaigé, S.; Bonnet, M.S.; Tardivel, C.; Pinton, P.; Trouslard, J.; Jean, A.; Guzylack, L.; Troadec, J.D.; Dallaporta, M. c-Fos immunoreactivity in the pig brain following deoxynivalenol intoxication: Focus on NUCB2/nesfatin-1 expressing neurons. *Neuro Toxicol.* **2013**, *34*, 135–149. [[CrossRef](#)]
23. Wang, X.; Chen, X.; Cao, L.; Zhu, L.; Zhang, Y.; Chu, X.; Zhu, D.; Ur Rahman, S.; Peng, C.; Feng, S.; et al. Mechanism of deoxynivalenol-induced neurotoxicity in weaned piglets is linked to lipid peroxidation, dampened neurotransmitter levels, and interference with calcium signaling. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *194*, 110382. [[CrossRef](#)]
24. Rissato, D.F.; de Santi Rampazzo, A.P.; Borges, S.C.; Sousa, F.C.; Busso, C.; Buttow, N.C.; Natali, M.R.M. Chronic ingestion of deoxynivalenol-contaminated diet dose-dependently decreases the area of myenteric neurons and gliocytes of rats. *Neurogastroenterol. Motil.* **2020**, *32*, e13770. [[CrossRef](#)]
25. Ivanova, L.; Fæste, C.K.; Solhaug, A. Role of P-glycoprotein in deoxynivalenol-mediated in vitro toxicity. *Toxicol. Lett.* **2018**, *284*, 21–28. [[CrossRef](#)]
26. Pestka, J.J. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2007**, *137*, 283–298. [[CrossRef](#)]
27. Pan, X.; Whitten, D.A.; Wu, M.; Chan, C.; Wilkerson, C.G.; Pestka, J.J. Global protein phosphorylation dynamics during deoxynivalenol-induced ribotoxic stress response in the macrophage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, *268*, 201–211. [[CrossRef](#)]
28. Wang, X.; Xu, W.; Fan, M.; Meng, T.; Chen, X.; Jiang, Y.; Zhu, D.; Hu, W.; Gong, J.; Feng, S.; et al. Deoxynivalenol induces apoptosis in PC12 cells via the mitochondrial pathway. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, *43*, 193–202. [[CrossRef](#)]
29. Li, D.; Ye, Y.; Lin, S.; Deng, L.; Fan, X.; Zhang, Y.; Deng, X.; Li, Y.; Yan, H.; Ma, Y. Evaluation of deoxynivalenol-induced toxic effects on DF-1 cells in vitro: Cell-cycle arrest, oxidative stress, and apoptosis. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *37*, 141–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Döll, S.; Schrickx, J.A.; Dänicke, S.; Fink-Gremmels, J. Deoxynivalenol-induced cytotoxicity, cytokines and related genes in unstimulated or lipopolysaccharide stimulated primary porcine macrophages. *Toxicol. Lett.* **2009**, *184*, 97–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Solhaug, A.; Karlsen, L.M.; Holme, J.A.; Kristoffersen, A.B.; Eriksen, G.S. Immunomodulatory effects of individual and combined mycotoxins in the THP-1 cell line. *Toxicol. In Vitro* **2016**, *36*, 120–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Wang, X.; Liu, Q.; Ihsan, A.; Huang, L.; Dai, M.; Hao, H.; Cheng, G.; Liu, Z.; Wang, Y.; Yuan, Z. JAK/STAT pathway plays a critical role in the proinflammatory gene expression and apoptosis of RAW264.7 cells induced by trichothecenes as DON and T-2 toxin. *Toxicol. Sci.* **2012**, *127*, 412–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. He, K.; Zhou, H.R.; Pestka, J.J. Mechanisms for ribotoxin-induced ribosomal RNA cleavage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *265*, 10–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Waché, Y.J.; Hbabi-Haddioui, L.; Guzylack-Piriou, L.; Belkhef, H.; Roques, C.; Oswald, I.P. The mycotoxin deoxynivalenol inhibits the cell surface expression of activation markers in human macrophages. *Toxicology* **2009**, *262*, 239–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Razafimanjato, H.; Benzaria, A.; Taïeb, N.; Guo, X.J.; Vidal, N.; Di Scala, C.; Varini, K.; Maresca, M. The ribotoxin deoxynivalenol affects the viability and functions of glial cells. *Glia* **2011**, *59*, 1672–1683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Pestka, J.J.; Islam, Z.; Amuzie, C.J. Immunochemical assessment of deoxynivalenol tissue distribution following oral exposure in the mouse. *Toxicol. Lett.* **2008**, *178*, 83–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Maresca, M. From the gut to the brain: Journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *Toxins* **2013**, *5*, 784–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Liu, B.; Teschemacher, A.G.; Kasparov, S. Neuroprotective potential of astroglia. *J. Neurosci. Res.* **2017**, *95*, 2126–2139. [[CrossRef](#)]
39. Zhang, J.; You, L.; Wu, W.; Wang, X.; Chrienova, Z.; Nepovimova, E.; Wu, Q.; Kuca, K. The neurotoxicity of trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol (DON): Current status and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *145*, 111676. [[CrossRef](#)]

40. Rampersad, S.N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors* **2012**, *12*, 12347–12360. [[CrossRef](#)]
41. Kouadio, J.H.; Mobio, T.A.; Baudrimont, I.; Moukha, S.; Dano, S.D.; Creppy, E.E. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology* **2005**, *213*, 56–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Nasri, T.; Bosch, R.R.; Ten Voorde, S.; Fink-Gremmels, J. Differential induction of apoptosis by type A and B trichothecenes in Jurkat T-lymphocytes. *Toxicol. In Vitro* **2006**, *20*, 832–840. [[CrossRef](#)]
43. Maresca, M.; Mahfoud, R.; Garmy, N.; Fantini, J. The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 2723–2731. [[CrossRef](#)]
44. Simpson, I.A.; Carruthers, A.; Vannucci, S.J. Supply and demand in cerebral energy metabolism: The role of nutrient transporters. *J. Cerebr. Blood Flow Metabol.* **2007**, *27*, 1766–1791. [[CrossRef](#)]
45. Monnet-Tschudi, F.; Zurich, M.G.; Honegger, P. Neurotoxicant-induced inflammatory response in three-dimensional brain cell cultures. *Hum. Exp. Toxicol.* **2007**, *26*, 339–346. [[CrossRef](#)]
46. Kreutzberg, G.W. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* **1996**, *19*, 312–318. [[CrossRef](#)]
47. Ji, G.E.; Park, S.Y.; Wong, S.S.; Pestka, J.J. Modulation of nitric oxide, hydrogen peroxide and cytokine production in a clonal macrophage model by the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol). *Toxicology* **1998**, *125*, 203–214. [[PubMed](#)]
48. Lukas, J.; Lukas, C.; Bartek, J. Mammalian cell cycle checkpoints: Signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair* **2004**, *3*, 997–1007. [[CrossRef](#)]
49. Marzocco, S.; Russo, R.; Bianco, G.; Autore, G.; Severino, L. Pro-apoptotic effects of nivalenol and deoxynivalenol trichothecenes in J774A.1 murine macrophages. *Toxicol. Lett.* **2009**, *189*, 21–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Bianco, G.; Fontanella, B.; Severino, L.; Quaroni, A.; Autore, G.; Marzocco, S. Nivalenol and deoxynivalenol affect rat intestinal epithelial cells: A concentration related study. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52051. [[CrossRef](#)]
51. Tiemann, U.; Vieregutz, T.; Jonas, L.; Schneider, F. Influence of the mycotoxins α - and β -zearalenol and deoxynivalenol on the cell cycle of cultured porcine endometrial cells. *Reprod. Toxicol.* **2003**, *17*, 209–218. [[CrossRef](#)]
52. Juan-García, A.; Taroncher, M.; Font, G.; Ruiz, M.J. Micronucleus induction and cell cycle alterations produced by deoxynivalenol and its acetylated derivatives in individual and combined exposure on HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *118*, 719–725. [[CrossRef](#)]
53. Diesing, A.K.; Nossol, C.; Dänicke, S.; Walk, N.; Post, A.; Kahlert, S.; Rothkötter, H.-J.; Kluess, J. Vulnerability of polarised intestinal porcine epithelial cells to mycotoxin deoxynivalenol depends on the route of application. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e17472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Yang, H.; Chung, D.H.; Kim, Y.B.; Choi, Y.H.; Moon, Y. Ribotoxic mycotoxin deoxynivalenol induces G2/M cell cycle arrest via p21Cip/WAF1 mRNA stabilization in human epithelial cells. *Toxicology* **2008**, *243*, 145–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. He, Y.; Yin, X.; Dong, J.; Yang, Q.; Wu, Y.; Gong, Z. Transcriptome Analysis of Caco-2 Cells upon the exposure of mycotoxin deoxynivalenol and its acetylated derivatives. *Toxins* **2021**, *13*, 167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Stanic, A.; Uhlig, S.; Solhaug, A.; Rise, F.; Wilkins, A.L.; Miles, C.O. Nucleophilic addition of thiols to deoxynivalenol. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7556–7566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Slotkin, T.A.; Seidler, F.J. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo: Transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems. *Brain Res. Bull.* **2007**, *72*, 232–274. [[CrossRef](#)]
58. Adornetto, A.; Pagliara, V.; Di Renzo, G.; Arcone, R. Polychlorinated biphenyls impair dibutyryl cAMP-induced astrocytic differentiation in rat C6 glial cell line. *FEBS Open Biol.* **2013**, *3*, 459–466. [[CrossRef](#)]
59. Pahan, K.; Namboodiri, A.M.; Sheikh, F.G.; Smith, B.T.; Singh, I. Increasing cAMP attenuates induction of inducible nitric-oxide synthase in rat primary astrocytes. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 7786–7791. [[CrossRef](#)]
60. Karaçay, B.; Li, G.; Pantazis, N.J.; Bonthuis, D.J. Stimulation of the cAMP pathway protects cultured cerebellar granule neurons against alcohol-induced cell death by activating the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene. *Brain Res.* **2007**, *1143*, 34–45. [[CrossRef](#)]
61. Ray, J.; Peterson, D.A.; Schinstine, M.; Gage, F.H. Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3602–3606. [[CrossRef](#)]
62. McKeon, A.; Benarroch, E.E. Glial fibrillary acid protein: Functions and involvement in disease. *Neurology* **2018**, *90*, 925–930. [[CrossRef](#)]
63. Caceres, A.; Banker, G.; Steward, O.; Binder, L.; Payne, M. MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Dev. Brain Res.* **1984**, *13*, 314–318. [[CrossRef](#)]
64. Furlong, R.M.; O’Keeffe, G.W.; O’Neill, C.; Sullivan, A.M. Alterations in α -synuclein and PINK1 expression reduce neurite length and induce mitochondrial fission and Golgi fragmentation in midbrain neurons. *Neurosci. Lett.* **2020**, *720*, 134777. [[CrossRef](#)]
65. Burak, K.; Lamoureux, L.; Boese, A.; Majer, A.; Saba, R.; Niu, Y.; Frost, K.; Booth, S.A. MicroRNA-16 targets mRNA involved in neurite extension and branching in hippocampal neurons during presymptomatic prion disease. *Neurobiol. Dis.* **2018**, *112*, 1–13. [[CrossRef](#)]

66. Derouiche, L.; Ugur, M.; Pierre, F.; Mann, A.; Doridot, S.; Ory, S.; Schulz, S.; Massotte, D. Heteromerization of endogenous mu and delta opioid receptors tunes mu opioid receptor signaling and trafficking. *bioRxiv* **2018**, 455147. [[CrossRef](#)]
67. Pemberton, K.; Mersman, B.; Xu, F. Using ImageJ to assess neurite outgrowth in mammalian cell cultures: Research data quantification exercises in undergraduate neuroscience lab. *J. Undergrad. Neurosci. Educ.* **2018**, *16*, A186–A194. [[PubMed](#)]

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abela, A.R., Browne, C.J., Sargin, D., Prevot, T.D., Ji, X.D., Li, Z., Lambe, E.K. & Fletcher, P.J. 2020. Median raphe serotonin neurons promote anxiety-like behavior via inputs to the dorsal hippocampus. *Neuropharmacology*, **168**, 107985.
- Abramov, U., Puusaar, T., Raud, S., Kurrikoff, K. & Vasar, E. 2008. Behavioural differences between C57BL/6 and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment. *Neuroscience Letters*, **443**, 223–227.
- Abu-Sawwa, R., Scutt, B. & Park, Y. 2020. Emerging Use of Epidiolex (Cannabidiol) in Epilepsy. *The journal of pediatric pharmacology and therapeutics: JPPT: the official journal of PPAG*, **25**, 485–499.
- Aceto, M.D., Harris, L.S., Negus, S.S., Banks, M.L., Hughes, L.D., Akgün, E. & Portoghese, P.S. 2012. MDAN-21: A Bivalent Opioid Ligand Containing mu-Agonist and Delta-Antagonist Pharmacophores and Its Effects in Rhesus Monkeys. *International Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, 327257.
- Agarwal, N., Pacher, P., Tegeder, I., Amaya, F., Constantin, C.E., Brenner, G.J., Rubino, T., Michalski, C.W., Marsicano, G., Monory, K., Mackie, K., Marian, C., Batkai, S., Parolaro, D., Fischer, M.J., Reeh, P., Kunos, G., Kress, M., Lutz, B., Woolf, C.J. & Kuner, R. 2007. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nature Neuroscience*, **10**, 870–879.
- Aguiar, D.D., da Costa Oliveira, C., Fonseca, F.C.S., de Almeida, D.L., Campos Pereira, W.V., Guimarães, F.S., Perez, A.C., Duarte, I.D.G. & Romero, T.R.L. 2023. Peripherally injected cannabidiol reduces neuropathic pain in mice: Role of the 5-HT1A and TRPV1 receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **660**, 58–64.
- Aicher, S.A., Hermes, S.M., Whittier, K.L. & Hegarty, D.M. 2012. Descending projections from the rostral ventromedial medulla (RVM) to trigeminal and spinal dorsal horns are morphologically and neurochemically distinct. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **43**, 103–111.
- Al Amin, H.A., Atweh, S.F., Jabbur, S.J. & Saadé, N.E. 2004. Effects of ventral hippocampal lesion on thermal and mechanical nociception in neonates and adult rats. *The European Journal of Neuroscience*, **20**, 3027–3034.
- Al-Hasani, R. & Bruchas, M.R. 2011. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*, **115**, 1363–1381.
- Allwright, M., Karrasch, J.F., O'Brien, J.A., Guennewig, B. & Austin, P.J. 2023. Machine learning analysis of the UK Biobank reveals prognostic and diagnostic immune biomarkers for polyneuropathy and neuropathic pain in diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **201**, 110725.
- Amin, M.R. & Ali, D.W. 2019. Pharmacology of Medical Cannabis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1162**, 151–165.
- Araujo, P., Mazaró-Costa, R., Tufik, S. & Andersen, M.L. 2011. Impact of sex on hyperalgesia induced by sleep loss. *Hormones and Behavior*, **59**, 174–179.

- Arora, S., Venugopalan, A., Dharavath, R.N., Bishnoi, M., Kondepudi, K.K. & Chopra, K. 2021. Naringenin Ameliorates Chronic Sleep Deprivation-Induced Pain via Sirtuin1 Inhibition. *Neurochemical Research*, **46**, 1177–1187.
- Arvidsson, U., Dado, R.J., Riedl, M., Lee, J.H., Law, P.Y., Loh, H.H., Elde, R. & Wessendorf, M.W. 1995a. delta-Opioid receptor immunoreactivity: distribution in brainstem and spinal cord, and relationship to biogenic amines and enkephalin. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **15**, 1215–1235.
- Arvidsson, U., Riedl, M., Chakrabarti, S., Lee, J.H., Nakano, A.H., Dado, R.J., Loh, H.H., Law, P.Y., Wessendorf, M.W. & Elde, R. 1995b. Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **15**, 3328–3341.
- Attal, N., Lanteri-Minet, M., Laurent, B., Fermanian, J. & Bouhassira, D. 2011. The specific disease burden of neuropathic pain: results of a French nationwide survey. *Pain*, **152**, 2836–2843.
- Audet, N., Charfi, I., Mnie-Filali, O., Amraei, M., Chabot-Doré, A.-J., Millecamps, M., Stone, L.S. & Pineyro, G. 2012. Differential association of receptor-G $\beta\gamma$ complexes with β -arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of δ opioid receptor agonists. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **32**, 4827–4840.
- Bai, H., Chen, S., Yuan, T., Xu, D., Cui, S. & Li, X. 2021. Paeoniflorin ameliorates neuropathic pain-induced depression-like behaviors in mice by inhibiting hippocampal neuroinflammation activated via TLR4/NF- κ B pathway. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, **25**, 217–225.
- Bai, L., Wang, X., Li, Z., Kong, C., Zhao, Y., Qian, J.-L., Kan, Q., Zhang, W. & Xu, J.-T. 2016. Upregulation of Chemokine CXCL12 in the Dorsal Root Ganglia and Spinal Cord Contributes to the Development and Maintenance of Neuropathic Pain Following Spared Nerve Injury in Rats. *Neuroscience Bulletin*, **32**, 27–40.
- Bair, M.J., Robinson, R.L., Katon, W. & Kroenke, K. 2003. Depression and pain comorbidity: a literature review. *Archives of Internal Medicine*, **163**, 2433–2445.
- Bakas, T., van Nieuwenhuijzen, P.S., Devenish, S.O., McGregor, I.S., Arnold, J.C. & Chebib, M. 2017. The direct actions of cannabidiol and 2-arachidonoyl glycerol at GABAA receptors. *Pharmacological Research*, **119**, 358–370.
- Bardin, L., Malfetes, N., Newman-Tancredi, A. & Depoortère, R. 2009. Chronic restraint stress induces mechanical and cold allodynia, and enhances inflammatory pain in rat: Relevance to human stress-associated painful pathologies. *Behavioural Brain Research*, **205**, 360–366.
- Bardoni, R., Tawfik, V.L., Wang, D., François, A., Solorzano, C., Shuster, S.A., Choudhury, P., Betelli, C., Cassidy, C., Smith, K., de Nooij, J.C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B.L., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I., MacDermott, A.B. & Scherrer, G. 2014.

- Delta opioid receptors presynaptically regulate cutaneous mechanosensory neuron input to the spinal cord dorsal horn. *Neuron*, **81**, 1312–1327.
- Baron-Flores, V., Diaz-Ruiz, A., Manzanares, J., Rios, C., Burelo, M., Jardon-Guadarrama, G., Martínez-Cárdenas, M. de L.Á. & Mata-Bermudez, A. 2022. Cannabidiol attenuates hypersensitivity and oxidative stress after traumatic spinal cord injury in rats. *Neuroscience Letters*, **788**, 136855.
- Barthas, F., Sellmeijer, J., Hugel, S., Waltisperger, E., Barrot, M. & Yalcin, I. 2015. The anterior cingulate cortex is a critical hub for pain-induced depression. *Biological Psychiatry*, **77**, 236–245.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G. & Julius, D. 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, **139**, 267–284.
- Bell, A. 2018. The neurobiology of acute pain. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, **237**, 55–62.
- Bénard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenço, J., Bellocchio, L., Soria-Gómez, E., Matias, I., Delamarre, A., Metna-Laurent, M., Cannich, A., Hebert-Chatelain, E., Mulle, C., Ortega-Gutiérrez, S., Martín-Fontecha, M., Klugmann, M., Guggenhuber, S., Lutz, B., Gertsch, J., Chaouloff, F., López-Rodríguez, M.L., Grandes, P., Rossignol, R. & Marsicano, G. 2012. Mitochondrial CB₁ receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nature Neuroscience*, **15**, 558–564.
- Benbouzid, M., Choucair-Jaafar, N., Yalcin, I., Waltisperger, E., Muller, A., Freund-Mercier, M.J. & Barrot, M. 2008a. Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice. *European Journal of Pain (London, England)*, **12**, 1008–1017.
- Benbouzid, M., Gavériaux-Ruff, C., Yalcin, I., Waltisperger, E., Tessier, L.-H., Muller, A., Kieffer, B.L., Freund-Mercier, M.J. & Barrot, M. 2008b. Delta-opioid receptors are critical for tricyclic antidepressant treatment of neuropathic allodynia. *Biological Psychiatry*, **63**, 633–636.
- Bennett, G.J. & Xie, Y.-K. 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, **33**, 87–107.
- Berthiaume, S., Abdallah, K., Blais, V. & Gendron, L. 2020. Alleviating pain with delta opioid receptor agonists: evidence from experimental models. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, **127**, 661–672.
- Bigliardi, P.L., Tobin, D.J., Gaveriaux-Ruff, C. & Bigliardi-Qi, M. 2009. Opioids and the skin—where do we stand? *Experimental Dermatology*, **18**, 424–430.
- Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D.E., Brandi, I., Moriello, A.S., Davis, J.B., Mechoulam, R. & Di Marzo, V. 2001. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British Journal of Pharmacology*, **134**, 845–852.

- Bodden, C., von Kortzfleisch, V.T., Karwinkel, F., Kaiser, S., Sachser, N. & Richter, S.H. 2019. Heterogenising study samples across testing time improves reproducibility of behavioural data. *Scientific Reports*, **9**, 8247.
- Bodnar, R.J. 2022. Endogenous opiates and behavior: 2020. *Peptides*, **151**, 170752.
- Bohren, Y., Timbolschi, D.I., Muller, A., Barrot, M., Yalcin, I. & Salvat, E. 2022. Platelet-rich plasma and cytokines in neuropathic pain: A narrative review and a clinical perspective. *European Journal of Pain (London, England)*, **26**, 43–60.
- Bonini, S.A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M. & Mastinu, A. 2018. Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology*, **227**, 300–315.
- Borroto-Escuela, D.O., Ambrogini, P., Chruścicka, B., Lindskog, M., Crespo-Ramirez, M., Hernández-Mondragón, J.C., Perez de la Mora, M., Schellekens, H. & Fuxe, K. 2021. The Role of Central Serotonin Neurons and 5-HT Heteroreceptor Complexes in the Pathophysiology of Depression: A Historical Perspective and Future Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 1927.
- Borroto-Escuela, D.O., Brito, I., Romero-Fernandez, W., Di Palma, M., Oflijan, J., Skieterska, K., Duchou, J., Van Craenenbroeck, K., Suárez-Boomgaard, D., Rivera, A., Guidolin, D., Agnati, L.F. & Fuxe, K. 2014. The G Protein-Coupled Receptor Heterodimer Network (GPCR-HetNet) and Its Hub Components. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**, 8570–8590.
- Borsani, E., Albertini, R., Colleoni, M., Sacerdote, P., Trovato, A.E., Lonati, C., Labanca, M., Panerai, A.E., Rezzani, R. & Rodella, L.F. 2008. PPADS, a purinergic antagonist reduces Fos expression at spinal cord level in a mouse model of mononeuropathy. *Brain Research*, **1199**, 74–81.
- Bouchet, C.A. & Ingram, S.L. 2020. Cannabinoids in the descending pain modulatory circuit: Role in inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, **209**, 107495.
- Bouhassira, D. 2019. Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology. *Revue Neurologique*, **175**, 16–25.
- Bouhassira, D., Lantéri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B. & Touboul, C. 2008. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*, **136**, 380–387.
- Brachman, R.A., McGowan, J.C., Perusini, J.N., Lim, S.C., Pham, T.H., Faye, C., Gardier, A.M., Mendez-David, I., David, D.J., Hen, R. & Denny, C.A. 2016. Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-like Behavior. *Biological Psychiatry*, **79**, 776–786.
- Brailoiu, G.C., Oprea, T.I., Zhao, P., Abood, M.E. & Brailoiu, E. 2011. Intracellular cannabinoid type 1 (CB1) receptors are activated by anandamide. *The Journal of Biological Chemistry*, **286**, 29166–29174.

- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R. & Gallacher, D. 2006. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *European Journal of Pain (London, England)*, **10**, 287–333.
- Bridges, D., Rice, A.S.C., Egertová, M., Elphick, M.R., Winter, J. & Michael, G.J. 2003. Localisation of cannabinoid receptor 1 in rat dorsal root ganglion using in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Neuroscience*, **119**, 803–812.
- Broom, D.C., Jutkiewicz, E.M., Rice, K.C., Traynor, J.R. & Woods, J.H. 2002. Behavioral effects of delta-opioid receptor agonists: potential antidepressants? *Japanese Journal of Pharmacology*, **90**, 1–6.
- Brown, K.J., Laun, A.S. & Song, Z.-H. 2017. Cannabidiol, a novel inverse agonist for GPR12. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **493**, 451–454.
- Browne, C.A. & Lucki, I. 2019. Targeting opioid dysregulation in depression for the development of novel therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, **201**, 51–76.
- Bruschetta, G., Jin, S., Liu, Z.-W., Kim, J.D. & Diano, S. 2020. MC4R Signaling in Dorsal Raphe Nucleus Controls Feeding, Anxiety, and Depression. *Cell Reports*, **33**, 108267.
- Bryda, E.C. 2013. The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research. *Missouri Medicine*, **110**, 207–211.
- Burstein, O. & Doron, R. 2018. The Unpredictable Chronic Mild Stress Protocol for Inducing Anhedonia in Mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 58184.
- Bushlin, I., Gupta, A., Stockton, S.D., Miller, L.K. & Devi, L.A. 2012. Dimerization with cannabinoid receptors allosterically modulates delta opioid receptor activity during neuropathic pain. *PloS One*, **7**, e49789.
- Cahill, C.M., Morinville, A., Lee, M.C., Vincent, J.P., Collier, B. & Beaudet, A. 2001. Prolonged morphine treatment targets delta opioid receptors to neuronal plasma membranes and enhances delta-mediated antinociception. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **21**, 7598–7607.
- Cain, D.M., Khasabov, S.G. & Simone, D.A. 2001. Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. *Journal of Neurophysiology*, **85**, 1561–1574.
- Calapai, F., Cardia, L., Sorbara, E.E., Navarra, M., Gangemi, S., Calapai, G. & Mannucci, C. 2020. Cannabinoids, Blood-Brain Barrier, and Brain Disposition. *Pharmaceutics*, **12**, 265.
- Capano, A., Weaver, R. & Burkman, E. 2020. Evaluation of the effects of CBD hemp extract on opioid use and quality of life indicators in chronic pain patients: a prospective cohort study. *Postgraduate Medicine*, **132**, 56–61.
- de Carvalho, C.R. & Takahashi, R.N. 2017. Cannabidiol disrupts the reconsolidation of contextual drug-associated memories in Wistar rats. *Addiction Biology*, **22**, 742–751.

- Casey, S.L., Atwal, N. & Vaughan, C.W. 2017. Cannabis constituent synergy in a mouse neuropathic pain model. *Pain*, **158**, 2452–2460.
- Casey, S.L., Mitchell, V.A., Sokolaj, E.E., Winters, B.L. & Vaughan, C.W. 2022. Intrathecal Actions of the Cannabis Constituents $\Delta(9)$ -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol in a Mouse Neuropathic Pain Model. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 8649.
- Castanheira, L., Ferreira, M.F., Sebastião, A.M. & Telles-Correia, D. 2018. Anxiety Assessment in Pre-clinical Tests and in Clinical Trials: A Critical Review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **18**, 1656–1676.
- Castillo, P.E., Younts, T.J., Chávez, A.E. & Hashimoto-dani, Y. 2012. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, **76**, 70–81.
- Castillo-Arellano, J., Canseco-Alba, A., Cutler, S.J. & León, F. 2023. The Polypharmacological Effects of Cannabidiol. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **28**, 3271.
- Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I. & Julius, D. 2000. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science (New York, N.Y.)*, **288**, 306–313.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D. & Julius, D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**, 816–824.
- Ceredig, R.A., Pierre, F., Doridot, S., Alduntzin, U., Hener, P., Salvat, E., Yalcin, I., Gaveriaux-Ruff, C., Barrot, M. & Massotte, D. 2020. Peripheral Delta Opioid Receptors Mediate Formoterol Anti-allodynic Effect in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **12**, 324.
- Ceredig, R.A., Pierre, F., Doridot, S., Alduntzin, U., Salvat, E., Yalcin, I., Gaveriaux-Ruff, C., Barrot, M. & Massotte, D. 2018. Peripheral delta opioid receptors mediate duloxetine antiallodynic effect in a mouse model of neuropathic pain. *The European Journal of Neuroscience*, **48**, 2231–2246.
- de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Hervé, N., Pop, S., Provoost, T., Meas-Yedid, V., Pankajakshan, P., Lecomte, T., Le Montagner, Y., Lagache, T., Dufour, A. & Olivo-Marin, J.-C. 2012. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature Methods*, **9**, 690–696.
- Chayasirisobhon, S. 2020. Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. *The Permanente Journal*, **25**, 1–3.
- Chen, J., Han, J.-S., Zhao, Z.-Q., Wei, F., Hsieh, J.-C., Bao, L., Chen, A.C., Dai, Y., Fan, B.-F., Gu, J.-G., Hao, S.-L., Hu, S.-J., Ji, Y.-H., Li, Y.-J., Li, Y.-Q., Lin, Q., Liu, X.-G., Liu, Y.-Q., Lu, Y., Luo, F., Ma, C., Qiu, Y.-H., Rao, Z.-R., Shi, L., Shyu, B.-C., Song, X.-J., Tang, J.-S., Tao, Y.-X., Wan, Y., Wang, J.-S., Wang, K.-W., Wang, Y., Xu, G.-Y., Xu, T.-L., You, H.-J., Yu, L.-C., Yu, S.-Y., Zhang, D.-Y., Zhang, D.-R., Zhang, J.-M., Zhang, X., Zhang, Y.-Q. & Zhuo, M. 2013. Pain. In: *Neuroscience in the 21st*

- Century: From Basic to Clinical* (ed. Pfaff, D.W.), pp. 965–1023. Springer, New York, NY.
- Chen, T., Wang, J., Wang, Y.-Q. & Chu, Y.-X. 2022. Current Understanding of the Neural Circuitry in the Comorbidity of Chronic Pain and Anxiety. *Neural Plasticity*, **2022**, 4217593.
- Chen, C., Willhouse, A.H., Huang, P., Ko, N., Wang, Y., Xu, B., Huang, L.H.M., Kieffer, B., Barbe, M.F. & Liu-Chen, L.-Y. 2020. Characterization of a Knock-In Mouse Line Expressing a Fusion Protein of κ Opioid Receptor Conjugated with tdTomato: 3-Dimensional Brain Imaging via CLARITY. *eNeuro*, **7**, ENEURO.0028-20.2020.
- Chenaf, C., Delorme, J., Delage, N., Ardid, D., Eschalier, A. & Authier, N. 2018. Prevalence of chronic pain with or without neuropathic characteristics in France using the capture-recapture method: a population-based study. *Pain*, **159**, 2394–2402.
- Cheng, H.-Y.M., Pitcher, G.M., Laviolette, S.R., Whishaw, I.Q., Tong, K.I., Kockeritz, L.K., Wada, T., Joza, N.A., Crackower, M., Goncalves, J., Sarosi, I., Woodgett, J.R., Oliveira-dos-Santos, A.J., Ikura, M., van der Kooy, D., Salter, M.W. & Penninger, J.M. 2002. DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation. *Cell*, **108**, 31–43.
- Chrestia, J.F., Esandi, M. del C. & Bouzat, C. 2022. Cannabidiol as a modulator of $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **79**, 564.
- Christensson-Nylander, I., Herrera-Marschitz, M., Staines, W., Hökfelt, T., Terenius, L., Ungerstedt, U., Cuello, C., Oertel, W.H. & Goldstein, M. 1986. Striato-nigral dynorphin and substance P pathways in the rat. I. Biochemical and immunohistochemical studies. *Experimental Brain Research*, **64**, 169–192.
- Chu Sin Chung, P., Keyworth, H.L., Martin-Garcia, E., Charbogne, P., Darcq, E., Bailey, A., Filliol, D., Matifas, A., Scherrer, G., Ouagazzal, A.-M., Gaveriaux-Ruff, C., Befort, K., Maldonado, R., Kitchen, I. & Kieffer, B.L. 2015. A novel anxiogenic role for the delta opioid receptor expressed in GABAergic forebrain neurons. *Biological Psychiatry*, **77**, 404–415.
- Clark, A.K., Yip, P.K., Grist, J., Gentry, C., Staniland, A.A., Marchand, F., Dehvari, M., Wotherspoon, G., Winter, J., Ullah, J., Bevan, S. & Malcangio, M. 2007. Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 10655–10660.
- Clark, A.K., Yip, P.K. & Malcangio, M. 2009. The liberation of fractalkine in the dorsal horn requires microglial cathepsin S. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **29**, 6945–6954.
- Corder, G., Castro, D.C., Bruchas, M.R. & Scherrer, G. 2018. Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. *Annual Review of Neuroscience*, **41**, 453–473.
- Costa, B., Trovato, A.E., Comelli, F., Giagnoni, G. & Colleoni, M. 2007. The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, **556**, 75–83.

- Cunningham, F., Allen, J.E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M.R., Armean, I.M., Austine-Orimoloye, O., Azov, A.G., Barnes, I., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bignell, A., Billis, K., Boddu, S., Brooks, L., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., Davidson, C., Dodiya, K., Donaldson, S., El Houdaigui, B., El Naboulsi, T., Fatima, R., Giron, C.G., Genez, T., Martinez, J.G., Guijarro-Clarke, C., Gymer, A., Hardy, M., Hollis, Z., Hourlier, T., Hunt, T., Juettemann, T., Kaikala, V., Kay, M., Lavidas, I., Le, T., Lemos, D., Marugán, J.C., Mohanan, S., Mushtaq, A., Naven, M., Ogeh, D.N., Parker, A., Parton, A., Perry, M., Piližota, I., Prosovetskaia, I., Sakthivel, M.P., Salam, A.I.A., Schmitt, B.M., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Pérez-Silva, J.G., Stark, W., Steed, E., Sutinen, K., Sukumaran, R., Sumathipala, D., Suner, M.-M., Szpak, M., Thormann, A., Tricomi, F.F., Urbina-Gómez, D., Veidenberg, A., Walsh, T.A., Walts, B., Willhoft, N., Winterbottom, A., Wass, E., Chakiachvili, M., Flint, B., Frankish, A., Giorgetti, S., Haggerty, L., Hunt, S.E., Iisley, G.R., Loveland, J.E., Martin, F.J., Moore, B., Mudge, J.M., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Tate, J., Thybert, D., Trevanion, S.J., Dyer, S., Harrison, P.W., Howe, K.L., Yates, A.D., Zerbino, D.R. & Flicek, P. 2022. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research*, **50**, D988–D995.
- Dahlhamer, J., Lucas, J., Zelaya, C., Nahin, R., Mackey, S., DeBar, L., Kerns, R., Von Korff, M., Porter, L. & Helmick, C. 2018. Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults - United States, 2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, **67**, 1001–1006.
- Dalanon, J., Chikahisa, S., Shiuchi, T., Shimizu, N., Chavan, P., Suzuki, Y., Okura, K., Séi, H. & Matsuka, Y. 2021. Pain sensitivity increases with sleep disturbance under predictable chronic mild stress in mice. *Scientific Reports*, **11**, 14231.
- Daniels, D.J., Lenard, N.R., Etienne, C.L., Law, P.-Y., Roerig, S.C. & Portoghese, P.S. 2005. Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 19208–19213.
- David, D.J., Samuels, B.A., Rainer, Q., Wang, J.-W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D.A., Guiard, B.P., Guilloux, J.-P., Artymyshyn, R.P., Gardier, A.M., Gerald, C., Antonijevic, I.A., Leonardo, E.D. & Hen, R. 2009. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*, **62**, 479–493.
- De Gregorio, D., McLaughlin, R.J., Posa, L., Ochoa-Sanchez, R., Enns, J., Lopez-Canul, M., Aboud, M., Maione, S., Comai, S. & Gobbi, G. 2019. Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain*, **160**, 136–150.
- De Petrocellis, L., Orlando, P., Moriello, A.S., Aviello, G., Stott, C., Izzo, A.A. & Di Marzo, V. 2012. Cannabinoid actions at TRPV channels: effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, **204**, 255–266.
- De Petrocellis, L., Vellani, V., Schiano-Moriello, A., Marini, P., Magherini, P.C., Orlando, P. & Di Marzo, V. 2008. Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **325**, 1007–1015.

- Deacon, R.M.J. 2006. Assessing nest building in mice. *Nature Protocols*, **1**, 1117–1119.
- Deacon, R. 2012. Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, e2607.
- Decosterd, I. & Woolf, C.J. 2000. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, **87**, 149–158.
- Derouiche, L., Ory, S. & Massotte, D. 2018. Double Fluorescent Knock-In Mice to Investigate Endogenous Mu-Delta Opioid Heteromer Subcellular Distribution | Springer Nature Experiments. In: *Receptor-Receptor Interactions in the Central Nervous System*. Fuxe, K., Borroto-Escuela, D. Humana Press, New York.
- Derouiche, L., Pierre, F., Doridot, S., Ory, S. & Massotte, D. 2020. Heteromerization of Endogenous Mu and Delta Opioid Receptors Induces Ligand-Selective Co-Targeting to Lysosomes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **25**, 4493.
- Deuis, J.R., Dvorakova, L.S. & Vetter, I. 2017. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **10**, 284.
- Dhaka, A., Murray, A.N., Mathur, J., Earley, T.J., Petrus, M.J. & Patapoutian, A. 2007. TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron*, **54**, 371–378.
- Djoughri, L. & Lawson, S.N. 2004. Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Research. Brain Research Reviews*, **46**, 131–145.
- van de Donk, T., Niesters, M., Kowal, M.A., Olofsen, E., Dahan, A. & van Velzen, M. 2019. An experimental randomized study on the analgesic effects of pharmaceutical-grade cannabis in chronic pain patients with fibromyalgia. *Pain*, **160**, 860–869.
- Donvito, G., Nass, S.R., Wilkerson, J.L., Curry, Z.A., Schurman, L.D., Kinsey, S.G. & Lichtman, A.H. 2018. The Endogenous Cannabinoid System: A Budding Source of Targets for Treating Inflammatory and Neuropathic Pain. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, **43**, 52–79.
- Dremencov, E., Grinchii, D., Romanova, Z., Chomanic, P., Lacinova, L. & Jezova, D. 2023. Effects of chronic delta-opioid receptor agonist on the excitability of hippocampal glutamate and brainstem monoamine neurons, anxiety, locomotion, and habituation in rats. *Pharmacological reports: PR*, **75**, 585–595.
- Dworkin, R.H., O'Connor, A.B., Kent, J., Mackey, S.C., Raja, S.N., Stacey, B.R., Levy, R.M., Backonja, M., Baron, R., Harke, H., Loeser, J.D., Treede, R.-D., Turk, D.C. & Wells, C.D. 2013. Interventional management of neuropathic pain: NeuPSIG recommendations. *Pain*, **154**, 2249–2261.
- Eisenach, J.C., Thomas, J.A., Rauck, R.L., Curry, R. & Li, X. 2004. Cystatin C in cerebrospinal fluid is not a diagnostic test for pain in humans. *Pain*, **107**, 207–212.
- El Kouhen, R., Burd, A.L., Erickson-Herbrandson, L.J., Chang, C.Y., Law, P.Y. & Loh, H.H. 2001. Phosphorylation of Ser363, Thr370, and Ser375 residues within the carboxyl tail

- differentially regulates mu-opioid receptor internalization. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 12774–12780.
- El-Alfy, A.T., Ivey, K., Robinson, K., Ahmed, S., Radwan, M., Slade, D., Khan, I., ElSohly, M. & Ross, S. 2010. Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, **95**, 434–442.
- Eldeiry, M., Yamanaka, K., Reece, T.B. & Aftab, M. 2017. Spinal Cord Neurons Isolation and Culture from Neonatal Mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 55856.
- Erbs, E., Faget, L., Scherrer, G., Kessler, P., Hentsch, D., Vonesch, J.-L., Matifas, A., Kieffer, B.L. & Massotte, D. 2012. Distribution of delta opioid receptor-expressing neurons in the mouse hippocampus. *Neuroscience*, **221**, 203–213.
- Erbs, E., Faget, L., Scherrer, G., Matifas, A., Filliol, D., Vonesch, J.-L., Koch, M., Kessler, P., Hentsch, D., Birling, M.-C., Koutsourakis, M., Vasseur, L., Veinante, P., Kieffer, B.L. & Massotte, D. 2015. A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Structure & Function*, **220**, 677–702.
- Esposito, G., Scuderi, C., Valenza, M., Togna, G.I., Latina, V., De Filippis, D., Cipriano, M., Carratù, M.R., Iuvone, T. & Steardo, L. 2011. Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. *PLoS One*, **6**, e28668.
- Faouzi, A., Uprety, R., Gomes, I., Massaly, N., Keresztes, A.I., Le Rouzic, V., Gupta, A., Zhang, T., Yoon, H.J., Ansonoff, M., Allaoa, A., Pan, Y.X., Pintar, J., Morón, J.A., Streicher, J.M., Devi, L.A. & Majumdar, S. 2020. Synthesis and Pharmacology of a Novel μ - δ Opioid Receptor Heteromer-Selective Agonist Based on the Carfentanyl Template. *Journal of Medicinal Chemistry*, **63**, 13618–13637.
- Fasick, V., Spengler, R.N., Samankan, S., Nader, N.D. & Ignatowski, T.A. 2015. The hippocampus and TNF: Common links between chronic pain and depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **53**, 139–159.
- Fayaz, A., Croft, P., Langford, R.M., Donaldson, L.J. & Jones, G.T. 2016. Prevalence of chronic pain in the UK: a systematic review and meta-analysis of population studies. *BMJ open*, **6**, e010364.
- Feng, Y., He, X., Yang, Y., Chao, D., Lazarus, L.H. & Xia, Y. 2012. Current research on opioid receptor function. *Current Drug Targets*, **13**, 230–246.
- Fields, H.L., Bry, J., Hentall, I. & Zorman, G. 1983. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **3**, 2545–2552.
- File, S.E. & Hyde, J.R. 1978. Can social interaction be used to measure anxiety? *British Journal of Pharmacology*, **62**, 19–24.
- File, S.E. & Seth, P. 2003. A review of 25 years of the social interaction test. *European Journal of Pharmacology*, **463**, 35–53.

- Filizola, M., Olmea, O. & Weinstein, H. 2002. Prediction of heterodimerization interfaces of G-protein coupled receptors with a new subtractive correlated mutation method. *Protein Engineering*, **15**, 881–885.
- Fillingim, R.B. 2017. Individual differences in pain: understanding the mosaic that makes pain personal. *Pain*, **158 Suppl 1**, S11–S18.
- Filliol, D., Ghazizadeh, S., Chluba, J., Martin, M., Matthes, H.W., Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Dierich, A., LeMeur, M., Valverde, O., Maldonado, R. & Kieffer, B.L. 2000. Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nature Genetics*, **25**, 195–200.
- Finnerup, N.B., Attal, N., Haroutounian, S., McNicol, E., Baron, R., Dworkin, R.H., Gilron, I., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T.S., Kamerman, P.R., Lund, K., Moore, A., Raja, S.N., Rice, A.S.C., Rowbotham, M., Sena, E., Siddall, P., Smith, B.H. & Wallace, M. 2015. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Neurology*, **14**, 162–173.
- Finnerup, N.B., Kuner, R. & Jensen, T.S. 2021. Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment. *Physiological Reviews*, **101**, 259–301.
- Flerlage, W.J., Langlois, L.D., Rusnak, M., Simmons, S.C., Gouty, S., Armstrong, R.C., Cox, B.M., Symes, A.J., Tsuda, M.C. & Nugent, F.S. 2023. Involvement of Lateral Habenula Dysfunction in Repetitive Mild Traumatic Brain Injury-Induced Motivational Deficits. *Journal of Neurotrauma*, **40**, 125–140.
- Forouzanfar, F., Sadeghnia, H.R., Hoseini, S.J., Ghorbani, A., Ghazavi, H., Ghasemi, F. & Hosseinzadeh, H. 2020. Fibroblast Growth Factor 1 Gene-Transfected Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Apoptosis And Inflammation In The Chronic Constriction Injury Model of Neuropathic Pain. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, **19**, 151–159.
- Foss, J.D., Farkas, D.J., Huynh, L.M., Kinney, W.A., Brenneman, D.E. & Ward, S.J. 2021. Behavioural and pharmacological effects of cannabidiol (CBD) and the cannabidiol analogue KLS-13019 in mouse models of pain and reinforcement. *British Journal of Pharmacology*, **178**, 3067–3078.
- François, A., Low, S.A., Sypek, E.I., Christensen, A.J., Sotoudeh, C., Beier, K.T., Ramakrishnan, C., Ritola, K.D., Sharif-Naeini, R., Deisseroth, K., Delp, S.L., Malenka, R.C., Luo, L., Hantman, A.W. & Scherrer, G. 2017. A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins. *Neuron*, **93**, 822-839.e6.
- Fullmer, J.M., Riedl, M.S., Higgins, L. & Elde, R. 2004. Identification of some lectin IB4 binding proteins in rat dorsal root ganglia. *Neuroreport*, **15**, 1705–1709.
- Fülöp, B., Hunyady, Á., Bencze, N., Kormos, V., Szentes, N., Dénes, Á., Lénárt, N., Borbély, É. & Helyes, Z. 2023. IL-1 Mediates Chronic Stress-Induced Hyperalgesia Accompanied by Microglia and Astroglia Morphological Changes in Pain-Related Brain Regions in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, 5479.

- Gaborit, M. & Massotte, D. 2022. Les hétéromères impliquant le récepteur opioïde δ : des cibles potentielles pour soulager la douleur chronique ? *Douleur et Analgésie*, **35**, 153–162.
- Gaborit, M. & Massotte, D. 2023. Therapeutic potential of opioid receptor heteromers in chronic pain and associated comorbidities. *British Journal of Pharmacology*, **180**, 994–1013.
- Gangadharan, V. & Kuner, R. 2013. Pain hypersensitivity mechanisms at a glance. *Disease Models & Mechanisms*, **6**, 889–895.
- García-Fernández, P., Üçeyler, N. & Sommer, C. 2021. From the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 to neuropathic pain: a potentially novel target. *Pain Reports*, **6**, e898.
- Gaskill, B.N., Gordon, C.J., Pajor, E.A., Lucas, J.R., Davis, J.K. & Garner, J.P. 2012. Heat or insulation: behavioral titration of mouse preference for warmth or access to a nest. *PLoS One*, **7**, e32799.
- Gaveriaux-Ruff, C., Nozaki, C., Nadal, X., Hever, X.C., Weibel, R., Matifas, A., Reiss, D., Filliol, D., Nassar, M.A., Wood, J.N., Maldonado, R. & Kieffer, B.L. 2011. Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia. *Pain*, **152**, 1238–1248.
- Gendron, L., Lucido, A.L., Mennicken, F., O'Donnell, D., Vincent, J.-P., Stroh, T. & Beaudet, A. 2006. Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic delta-opioid receptors in rat dorsal root ganglia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **26**, 953–962.
- Ghovanloo, M.-R., Shuart, N.G., Mezeyova, J., Dean, R.A., Ruben, P.C. & Goodchild, S.J. 2018. Inhibitory effects of cannabidiol on voltage-dependent sodium currents. *Journal of Biological Chemistry*, **293**, 16546–16558.
- Gomes, I., Fujita, W., Gupta, A., Saldanha, S.A., Negri, A., Pinello, C.E., Eberhart, C., Roberts, E., Filizola, M., Hodder, P. & Devi, L.A. 2013. Identification of a μ - δ opioid receptor heteromer-biased agonist with antinociceptive activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 12072–12077.
- Gomes, I., Gupta, A., Filipovska, J., Szeto, H.H., Pintar, J.E. & Devi, L.A. 2004. A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 5135–5139.
- Gomes, I., Jordan, B.A., Gupta, A., Trapaidze, N., Nagy, V. & Devi, L.A. 2000. Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **20**, RC110.
- Gonca, E. & Darici, F. 2015. The effect of cannabidiol on ischemia/reperfusion-induced ventricular arrhythmias: the role of adenosine A1 receptors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, **20**, 76–83.

- Grabon, W., Bodennec, J., Rheims, S., Belmeguenai, A. & Bezin, L. 2023. Update on the controversial identity of cells expressing *cnr2* gene in the nervous system. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, **29**, 760-770.
- Greenberg, G.D., Huang, L.C., Spence, S.E., Schlumbohm, J.P., Metten, P., Ozburn, A.R. & Crabbe, J.C. 2016. Nest building is a novel method for indexing severity of alcohol withdrawal in mice. *Behavioural Brain Research*, **302**, 182–190.
- Guida, F., De Gregorio, D., Palazzo, E., Ricciardi, F., Boccella, S., Belardo, C., Iannotta, M., Infantino, R., Formato, F., Marabese, I., Luongo, L., de Novellis, V. & Maione, S. 2020. Behavioral, Biochemical and Electrophysiological Changes in Spared Nerve Injury Model of Neuropathic Pain. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 3396.
- Gülck, T. & Møller, B.L. 2020. Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends in Plant Science*, **25**, 985–1004.
- Gunasekaran, N., Long, L.E., Dawson, B.L., Hansen, G.H., Richardson, D.P., Li, K.M., Arnold, J.C. & McGregor, I.S. 2009. Reintoxication: the release of fat-stored delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) into blood is enhanced by food deprivation or ACTH exposure. *British Journal of Pharmacology*, **158**, 1330–1337.
- Gupta, A., Mulder, J., Gomes, I., Rozenfeld, R., Bushlin, I., Ong, E., Lim, M., Maillet, E., Junek, M., Cahill, C.M., Harkany, T. & Devi, L.A. 2010. Increased abundance of opioid receptor heteromers after chronic morphine administration. *Science Signaling*, **3**, ra54.
- Gustorff, B., Dorner, T., Likar, R., Grisold, W., Lawrence, K., Schwarz, F. & Rieder, A. 2008. Prevalence of self-reported neuropathic pain and impact on quality of life: a prospective representative survey. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, **52**, 132–136.
- Han, J., Kesner, P., Metna-Laurent, M., Duan, T., Xu, L., Georges, F., Koehl, M., Abrous, D.N., Mendizabal-Zubiaga, J., Grandes, P., Liu, Q., Bai, G., Wang, W., Xiong, L., Ren, W., Marsicano, G. & Zhang, X. 2012. Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell*, **148**, 1039–1050.
- Hanani, M. & Spray, D.C. 2020. Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. *Nature Reviews. Neuroscience*, **21**, 485–498.
- Hanuš, L.O., Meyer, S.M., Muñoz, E., Taglialatela-Scafati, O. & Appendino, G. 2016. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural Product Reports*, **33**, 1357–1392.
- Harris, H.M., Sufka, K.J., Gul, W. & ElSohly, M.A. 2016. Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Cisplatin-Induced Neuropathy in Mice. *Planta Medica*, **82**, 1169–1172.
- Hayes, D.J. & Northoff, G. 2012. Common brain activations for painful and non-painful aversive stimuli. *BMC neuroscience*, **13**, 60.
- He, S.-Q., Zhang, Z.-N., Guan, J.-S., Liu, H.-R., Zhao, B., Wang, H.-B., Li, Q., Yang, H., Luo, J., Li, Z.-Y., Wang, Q., Lu, Y.-J., Bao, L. & Zhang, X. 2011. Facilitation of μ -opioid

- receptor activity by preventing δ -opioid receptor-mediated codegradation. *Neuron*, **69**, 120–131.
- Helmstetter, F.J. & Bellgowan, P.S. 1994. Hypoalgesia in response to sensitization during acute noise stress. *Behavioral Neuroscience*, **108**, 177–185.
- Hill, R.Z. & Bautista, D.M. 2020. Getting in Touch with Mechanical Pain Mechanisms. *Trends in Neurosciences*, **43**, 311–325.
- Hisaoka-Nakashima, K., Tomimura, Y., Yoshii, T., Ohata, K., Takada, N., Zhang, F.F., Nakamura, Y., Liu, K., Wake, H., Nishibori, M., Nakata, Y. & Morioka, N. 2019. High-mobility group box 1-mediated microglial activation induces anxiodepressive-like behaviors in mice with neuropathic pain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **92**, 347–362.
- Höflich, A., Michenthaler, P., Kasper, S. & Lanzenberger, R. 2019. Circuit Mechanisms of Reward, Anhedonia, and Depression. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, **22**, 105–118.
- Holdridge, S.V. & Cahill, C.M. 2007. Spinal administration of a delta opioid receptor agonist attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *European Journal of Pain (London, England)*, **11**, 685–693.
- Hosoi, M., Oka, T. & Hori, T. 1997. Prostaglandin E receptor EP3 subtype is involved in thermal hyperalgesia through its actions in the preoptic hypothalamus and the diagonal band of Broca in rats. *Pain*, **71**, 303–311.
- Howlett, A.C. & Abood, M.E. 2017. CB1 and CB2 Receptor Pharmacology. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, **80**, 169–206.
- Hubbard, W.B., Sim, M.M.S., Saatman, K.E., Sullivan, P.G. & Wood, J.P. 2022. Tissue factor release following traumatic brain injury drives thrombin generation. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, **6**, e12734.
- Humo, M., Lu, H. & Yalcin, I. 2019. The molecular neurobiology of chronic pain-induced depression. *Cell and Tissue Research*, **377**, 21–43.
- Hurd, Y.L., Spriggs, S., Alishayev, J., Winkel, G., Gurgov, K., Kudrich, C., Oprescu, A.M. & Salsitz, E. 2019. Cannabidiol for the Reduction of Cue-Induced Craving and Anxiety in Drug-Abstinent Individuals With Heroin Use Disorder: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. *The American Journal of Psychiatry*, **176**, 911–922.
- Hurd, Y.L., Yoon, M., Manini, A.F., Hernandez, S., Olmedo, R., Ostman, M. & Jutras-Aswad, D. 2015. Early Phase in the Development of Cannabidiol as a Treatment for Addiction: Opioid Relapse Takes Initial Center Stage. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, **12**, 807–815.
- Hurst, J.L. & West, R.S. 2010. Taming anxiety in laboratory mice. *Nature Methods*, **7**, 825–826.

- Iannotti, F.A., Hill, C.L., Leo, A., Alhusaini, A., Soubrane, C., Mazzarella, E., Russo, E., Whalley, B.J., Di Marzo, V. & Stephens, G.J. 2014. Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in vitro: potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. *ACS chemical neuroscience*, **5**, 1131–1141.
- Inyang, K.E., George, S.R. & Laumet, G. 2021. The μ - δ opioid heteromer masks latent pain sensitization in neuropathic and inflammatory pain in male and female mice. *Brain Research*, **1756**, 147298.
- Isingrini, E., Camus, V., Le Guisquet, A.-M., Pingaud, M., Devers, S. & Belzung, C. 2010. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. *PLoS One*, **5**, e10404.
- Jacobowitz, D.M. & O'Donohue, T.L. 1978. alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **75**, 6300–6304.
- Jacobs, B.A., Pando, M.M., Jennings, E., Chavera, T.A., Clarke, W.P. & Berg, K.A. 2018. Allosterism within δ Opioid- κ Opioid Receptor Heteromers in Peripheral Sensory Neurons: Regulation of κ Opioid Agonist Efficacy. *Molecular Pharmacology*, **93**, 376–386.
- Jaggi, A.S., Jain, V. & Singh, N. 2011. Animal models of neuropathic pain. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, **25**, 1–28.
- Jaggi, A.S. & Singh, N. 2011. Role of different brain areas in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *Brain Research*, **1381**, 187–201.
- Janevic, M.R., McLaughlin, S.J., Heapy, A.A., Thacker, C. & Piette, J.D. 2017. Racial and Socioeconomic Disparities in Disabling Chronic Pain: Findings From the Health and Retirement Study. *The Journal of Pain*, **18**, 1459–1467.
- Jesus, C.H.A., Ferreira, M.V., Gasparin, A.T., Rosa, E.S., Genaro, K., Crippa, J.A. de S., Chichorro, J.G. & Cunha, J.M. da. 2022. Cannabidiol enhances the antinociceptive effects of morphine and attenuates opioid-induced tolerance in the chronic constriction injury model. *Behavioural Brain Research*, **435**, 114076.
- Jesus, C.H.A., Redivo, D.D.B., Gasparin, A.T., Sotomaior, B.B., de Carvalho, M.C., Genaro, K., Zuardi, A.W., Hallak, J.E.C., Crippa, J.A., Zanoveli, J.M. & da Cunha, J.M. 2019. Cannabidiol attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats via serotonergic system activation through 5-HT_{1A} receptors. *Brain Research*, **1715**, 156–164.
- Jiang, B.-C., Liu, T. & Gao, Y.-J. 2020. Chemokines in chronic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacology & Therapeutics*, **212**, 107581.
- Jirkof, P. 2014. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, **234**, 139–146.
- Jones, K.A., Borowsky, B., Tamm, J.A., Craig, D.A., Durkin, M.M., Dai, M., Yao, W.J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L.Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J.A., Morse, K.,

- Laz, T., Smith, K.E., Nagarathnam, D., Noble, S.A., Branchek, T.A. & Gerald, C. 1998. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature*, **396**, 674–679.
- Jorand, R., Biswas, S., Wakefield, D.L., Tobin, S.J., Golfetto, O., Hilton, K., Ko, M., Ramos, J.W., Small, A.R., Chu, P., Singh, G. & Jovanovic-Talisman, T. 2016. Molecular signatures of mu opioid receptor and somatostatin receptor 2 in pancreatic cancer. *Molecular Biology of the Cell*, **27**, 3659–3672.
- Jordan, B.A. & Devi, L.A. 1999. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, **399**, 697–700.
- Julius, D. & Basbaum, A.I. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, **413**, 203–210.
- Kabli, N., Fan, T., O’Dowd, B.F. & George, S.R. 2014. μ - δ opioid receptor heteromer-specific signaling in the striatum and hippocampus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **450**, 906–911.
- Karimi-Haghighi, S., Mahmoudi, M., Sayehmiri, F., Mozafari, R. & Haghparast, A. 2023. Endocannabinoid system as a therapeutic target for psychostimulants relapse: A systematic review of preclinical studies. *European Journal of Pharmacology*, **951**, 175669.
- Kathmann, M., Flau, K., Redmer, A., Tränkle, C. & Schlicker, E. 2006. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*, **372**, 354–361.
- Kellenberger, S. & Schild, L. 2015. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCI. Structure, Function, and Pharmacology of Acid-Sensing Ion Channels and the Epithelial Na⁺ Channel (EH Ohlstein, Ed.). *Pharmacological Reviews*, **67**, 1–35.
- Keresztes, A., Olson, K., Nguyen, P., Lopez-Pier, M.A., Hecksel, R., Barker, N.K., Liu, Z., Hruby, V., Konhilas, J., Langlais, P.R. & Streicher, J.M. 2022. Antagonism of the mu-delta opioid receptor heterodimer enhances opioid antinociception by activating Src and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II signaling. *Pain*, **163**, 146–158.
- Khan, S. 2019. IGFBP-2 Signaling in the Brain: From Brain Development to Higher Order Brain Functions. *Frontiers in Endocrinology*, **10**, 822.
- Kitchen, I., Slowe, S.J., Matthes, H.W. & Kieffer, B. 1997. Quantitative autoradiographic mapping of mu-, delta- and kappa-opioid receptors in knockout mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Brain Research*, **778**, 73–88.
- Kivell, B.M., McDonald, F.J. & Miller, J.H. 2000. Serum-free culture of rat post-natal and fetal brainstem neurons. *Brain Research. Developmental Brain Research*, **120**, 199–210.
- Kivell, B.M., McDonald, F.J. & Miller, J.H. 2001. Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. *Brain Research. Brain Research Protocols*, **6**, 91–99.

- Kobayashi, M. & Nakaya, Y. 2020. Anatomical aspects of corticotrigeminal projections to the medullary dorsal horn. *Journal of Oral Science*, **62**, 144–146.
- Koshimizu, T.-A., Honda, K., Nagaoka-Uozumi, S., Ichimura, A., Kimura, I., Nakaya, M., Sakai, N., Shibata, K., Ushijima, K., Fujimura, A., Hirasawa, A., Kurose, H., Tsujimoto, G., Tanoue, A. & Takano, Y. 2018. Complex formation between the vasopressin 1b receptor, β -arrestin-2, and the μ -opioid receptor underlies morphine tolerance. *Nature Neuroscience*, **21**, 820–833.
- Kosterlitz, H.W. 1987. Endogenous opioids and their receptors. *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy*, **39**, 571–576.
- Kowalski, C.W., Ragozzino, F.J., Lindberg, J.E.M., Peterson, B., Lugo, J.M., McLaughlin, R.J. & Peters, J.H. 2020. Cannabidiol activation of vagal afferent neurons requires TRPA1. *Journal of Neurophysiology*, **124**, 1388–1398.
- Kremer, M., Becker, L.J., Barrot, M. & Yalcin, I. 2021. How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? *The European Journal of Neuroscience*, **53**, 236–270.
- Kremer, M., Megat, S., Bohren, Y., Wurtz, X., Nexon, L., Ceredig, R.A., Doridot, S., Massotte, D., Salvat, E., Yalcin, I. & Barrot, M. 2020. Delta opioid receptors are essential to the antiallodynic action of B2-mimetics in a model of neuropathic pain. *Molecular Pain*, **16**, 1744806920912931.
- Kumar Kalvala, A., Bagde, A., Arthur, P., Kumar Surapaneni, S., Ramesh, N., Nathani, A. & Singh, M. 2022. Role of Cannabidiol and Tetrahydrocannabivarin on Paclitaxel-induced neuropathic pain in rodents. *International Immunopharmacology*, **107**, 108693.
- Kwan, K.Y., Allchorne, A.J., Vollrath, M.A., Christensen, A.P., Zhang, D.-S., Woolf, C.J. & Corey, D.P. 2006. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron*, **50**, 277–289.
- Lai, J., Luo, M., Chen, Q. & Porreca, F. 2008. Pronociceptive actions of dynorphin via bradykinin receptors. *Neuroscience Letters*, **437**, 175–179.
- Laprairie, R.B., Bagher, A.M., Kelly, M.E.M. & Denovan-Wright, E.M. 2015. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *British Journal of Pharmacology*, **172**, 4790–4805.
- Latremoliere, A. & Woolf, C.J. 2009. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The Journal of Pain*, **10**, 895–926.
- Lawson, S.N. & Waddell, P.J. 1991. Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *The Journal of Physiology*, **435**, 41–63.
- Le Merrer, J., Becker, J.A.J., Befort, K. & Kieffer, B.L. 2009. Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiological Reviews*, **89**, 1379–1412.

- Le Merrer, J., Faget, L., Matifas, A. & Kieffer, B.L. 2012. Cues predicting drug or food reward restore morphine-induced place conditioning in mice lacking delta opioid receptors. *Psychopharmacology*, **223**, 99–106.
- Le Merrer, J., Plaza-Zabala, A., Del Boca, C., Matifas, A., Maldonado, R. & Kieffer, B.L. 2011. Deletion of the δ opioid receptor gene impairs place conditioning but preserves morphine reinforcement. *Biological Psychiatry*, **69**, 700–703.
- Lemberger, L., Silberstein, S.D., Axelrod, J. & Kopin, I.J. 1970. Marihuana: studies on the disposition and metabolism of delta-9-tetrahydrocannabinol in man. *Science (New York, N.Y.)*, **170**, 1320–1322.
- Lemel, L., Lane, J.R. & Canals, M. 2020. GRKs as Key Modulators of Opioid Receptor Function. *Cells*, **9**, 2400.
- Leo, S., Straetmans, R., D’Hooge, R. & Meert, T. 2008. Differences in nociceptive behavioral performance between C57BL/6J, 129S6/SvEv, B6 129 F1 and NMRI mice. *Behavioural Brain Research*, **190**, 233–242.
- Leterrier, C., Bonnard, D., Carrel, D., Rossier, J. & Lenkei, Z. 2004. Constitutive endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 36013–36021.
- Li, J.-G., Chen, C. & Liu-Chen, L.-Y. 2002. Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50/Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor (EBP50/NHERF) blocks U50,488H-induced down-regulation of the human kappa opioid receptor by enhancing its recycling rate. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 27545–27552.
- Linher-Melville, K., Zhu, Y.F., Sidhu, J., Parzei, N., Shahid, A., Seesankar, G., Ma, D., Wang, Z., Zacal, N., Sharma, M., Parihar, V., Zacharias, R. & Singh, G. 2020. Evaluation of the preclinical analgesic efficacy of naturally derived, orally administered oil forms of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), and their 1:1 combination. *PLoS One*, **15**, e0234176.
- Liu, X., Kai, M., Jin, L. & Wang, R. 2009. Computational study of the heterodimerization between mu and delta receptors. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **23**, 321–332.
- Liu, S., Kang, W.-J., Abrimian, A., Xu, J., Cartegni, L., Majumdar, S., Hesketh, P., Bekker, A. & Pan, Y.-X. 2021. Alternative Pre-mRNA Splicing of the Mu Opioid Receptor Gene, OPRM1: Insight into Complex Mu Opioid Actions. *Biomolecules*, **11**, 1525.
- Liu, X., Zeng, B. & Xu, J. 2005. Alteration of cystatin C in cerebrospinal fluid of patients with sciatica revealed by a proteomical approach. *Saudi Medical Journal*, **26**, 1699–1704.
- Loeser, J.D. & Treede, R.-D. 2008. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, **137**, 473–477.
- Lutz, P.-E. & Kieffer, B.L. 2013. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends in Neurosciences*, **36**, 195–206.

- Maldonado, R., Baños, J.E. & Cabañero, D. 2016. The endocannabinoid system and neuropathic pain. *Pain*, **157 Suppl 1**, S23–S32.
- Malvestio, R.B., Medeiros, P., Negrini-Ferrari, S.E., Oliveira-Silva, M., Medeiros, A.C., Padovan, C.M., Luongo, L., Maione, S., Coimbra, N.C. & de Freitas, R.L. 2021. Cannabidiol in the prelimbic cortex modulates the comorbid condition between the chronic neuropathic pain and depression-like behaviour in rats: The role of medial prefrontal cortex 5-HT1A and CB1 receptors. *Brain Research Bulletin*, **174**, 323–338.
- Manning, B.H., Martin, W.J. & Meng, I.D. 2003. The rodent amygdala contributes to the production of cannabinoid-induced antinociception. *Neuroscience*, **120**, 1157–1170.
- Margolis, E.B., Moulton, M.G., Lambeth, P.S. & O’Meara, M.J. 2023. The life and times of endogenous opioid peptides: Updated understanding of synthesis, spatiotemporal dynamics, and the clinical impact in alcohol use disorder. *Neuropharmacology*, **225**, 109376.
- Markos, J.R., Harris, H.M., Gul, W., ElSohly, M.A. & Sufka, K.J. 2018. Effects of Cannabidiol on Morphine Conditioned Place Preference in Mice. *Planta Medica*, **84**, 221–224.
- Marsh, B.C.L., Kerr, N.C., Isles, N., Denhardt, D.T. & Wynick, D. 2007. Osteopontin expression and function within the dorsal root ganglion. *Neuroreport*, **18**, 153–157.
- Martin, W.J., Coffin, P.O., Attias, E., Balinsky, M., Tsou, K. & Walker, J.M. 1999. Anatomical basis for cannabinoid-induced antinociception as revealed by intracerebral microinjections. *Brain Research*, **822**, 237–242.
- Martin, W.J., Patrick, S.L., Coffin, P.O., Tsou, K. & Walker, J.M. 1995. An examination of the central sites of action of cannabinoid-induced antinociception in the rat. *Life Sciences*, **56**, 2103–2109.
- Martin, W.J., Tsou, K. & Walker, J.M. 1998. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of the rat tail-flick reflex after microinjection into the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience Letters*, **242**, 33–36.
- Martínez-Navarro, M., Cabañero, D., Wawrzczak-Bargiela, A., Robe, A., Gavériaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., Przewlocki, R., Baños, J.E. & Maldonado, R. 2020. Mu and delta opioid receptors play opposite nociceptive and behavioural roles on nerve-injured mice. *British Journal of Pharmacology*, **177**, 1187–1205.
- Martínez-Pinilla, E., Varani, K., Reyes-Resina, I., Angelats, E., Vincenzi, F., Ferreiro-Vera, C., Oyarzabal, J., Canela, E.I., Lanciego, J.L., Nadal, X., Navarro, G., Borea, P.A. & Franco, R. 2017. Binding and Signaling Studies Disclose a Potential Allosteric Site for Cannabidiol in Cannabinoid CB2 Receptors. *Frontiers in Pharmacology*, **8**, 744.
- Martucci, C., Trovato, A.E., Costa, E., Borsani, e, Franchi, Magnaghi, V., Panerai, A.E., Rodella, L.F., Valsecchi, Sacerdote & Colleoni. 2008. The purinergic antagonist PPADS reduces pain related behaviours and interleukin-1 beta, interleukin-6, iNOS and nNOS overproduction in central and peripheral nervous system after peripheral neuropathy in mice. *Pain*, **137**, (At: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17900807/>. Accessed: 15/7/2023).

- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C. & Bonner, T.I. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, **346**, 561–564.
- McHugh, D., Hu, S.S.J., Rimmerman, N., Juknat, A., Vogel, Z., Walker, J.M. & Bradshaw, H.B. 2010. N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC neuroscience*, **11**, 44.
- McKenna, J.E. & Melzack, R. 1992. Analgesia produced by lidocaine microinjection into the dentate gyrus. *Pain*, **49**, 105–112.
- McMahon, S.B. & Koltzenburg, M. 2006. *Wall and Melzack's textbook of pain*. 5th ed. Elsevier/Churchill Livingstone, Philadelphia. (At: <http://www.clinicalkey.com.au/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C20090551100>. Accessed: 15/7/2023).
- McPartland, J.M., Duncan, M., Di Marzo, V. & Pertwee, R.G. 2015. Are cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *British Journal of Pharmacology*, **172**, 737–753.
- Meacham, K., Shepherd, A., Mohapatra, D.P. & Haroutounian, S. 2017. Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Current Pain and Headache Reports*, **21**, 28.
- Mechoulam, R. & Shvo, Y. 1963. Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron*, **19**, 2073–2078.
- de Melo Reis, R.A., Isaac, A.R., Freitas, H.R., de Almeida, M.M., Schuck, P.F., Ferreira, G.C., Andrade-da-Costa, B.L. da S. & Trevenzoli, I.H. 2021. Quality of Life and a Surveillant Endocannabinoid System. *Frontiers in Neuroscience*, **15**, 747229.
- Melzack, R. & Casey, L. 1968. Sensory, motivational, and central control determinants of pain : A new conceptual model. In: *The Skin Senses*, pp. 423–439. Dan R. Kenshalo. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, USA.
- Merskey, H. & Bogduk, N. 1994. *Classification of Chronic Pain : description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms*. 2nd ed. edition. IASP Press, Seattle.
- Meuth, S.G., Vila, C. & Dechant, K.L. 2015. Effect of Sativex on spasticity-associated symptoms in patients with multiple sclerosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*, **15**, 909–918.
- Mickle, A.D., Shepherd, A.J. & Mohapatra, D.P. 2015. Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, **131**, 73–118.
- Millan, M.J. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, **57**, 1–164.
- Millan, M.J. 2002. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, **66**, 355–474.

- Mills, S.E.E., Nicolson, K.P. & Smith, B.H. 2019. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. *British Journal of Anaesthesia*, **123**, e273–e283.
- Minami, M. & Satoh, M. 1995. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neuroscience Research*, **23**, 121–145.
- Mogil, J.S. 2017. Laboratory environmental factors and pain behavior: the relevance of unknown unknowns to reproducibility and translation. *Lab Animal*, **46**, 136–141.
- Mogil, J.S., Wilson, S.G., Bon, K., Lee, S.E., Chung, K., Raber, P., Pieper, J.O., Hain, H.S., Belknap, J.K., Hubert, L., Elmer, G.I., Chung, J.M. & Devor, M. 1999. Heritability of nociception II. “Types” of nociception revealed by genetic correlation analysis. *Pain*, **80**, 83–93.
- Moon, E.-J., Ko, I.-G., Kim, S.-E., Jin, J.-J., Hwang, L., Kim, C.-J., An, H., Lee, B.-J. & Yi, J.-W. 2018. Dexmedetomidine Ameliorates Sleep Deprivation-Induced Depressive Behaviors in Mice. *International Neurology Journal*, **22**, S139-146.
- Morgan, M.M., Peecher, D.L. & Streicher, J.M. 2021. Use of home cage wheel running to assess the behavioural effects of administering a mu/delta opioid receptor heterodimer antagonist for spontaneous morphine withdrawal in the rat. *Behavioural Brain Research*, **397**, 112953.
- 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**, 37–57.
- Mu, F.T., Callaghan, J.M., Steele-Mortimer, O., Stenmark, H., Parton, R.G., Campbell, P.L., McCluskey, J., Yeo, J.P., Tock, E.P. & Toh, B.H. 1995. EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine “fingers” and contains a calmodulin-binding IQ motif. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 13503–13511.
- Munro, S., Thomas, K.L. & Abu-Shaar, M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, **365**, 61–65.
- Murataeva, N., Straiker, A. & Mackie, K. 2014. Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *British Journal of Pharmacology*, **171**, 1379–1391.
- Mutlu, O., Gumuslu, E., Ulak, G., Celikyurt, I.K., Kokturk, S., Kır, H.M., Akar, F. & Erden, F. 2012. Effects of fluoxetine, tianeptine and olanzapine on unpredictable chronic mild stress-induced depression-like behavior in mice. *Life Sciences*, **91**, 1252–1262.
- Nadal, X., Baños, J.-E., Kieffer, B.L. & Maldonado, R. 2006. Neuropathic pain is enhanced in delta-opioid receptor knockout mice. *The European Journal of Neuroscience*, **23**, 830–834.
- Nadal, X., La Porta, C., Andreea Bura, S. & Maldonado, R. 2013. Involvement of the opioid and cannabinoid systems in pain control: new insights from knockout studies. *European Journal of Pharmacology*, **716**, 142–157.

- Nasrin, S., Watson, C.J.W., Perez-Paramo, Y.X. & Lazarus, P. 2021. Cannabinoid Metabolites as Inhibitors of Major Hepatic CYP450 Enzymes, with Implications for Cannabis-Drug Interactions. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, **49**, 1070–1080.
- Nestler, E.J. & Hyman, S.E. 2010. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, **13**, 1161–1169.
- Nguyen, P.T., Schmid, C.L., Raehal, K.M., Selley, D.E., Bohn, L.M. & Sim-Selley, L.J. 2012. β -arrestin2 regulates cannabinoid CB1 receptor signaling and adaptation in a central nervous system region-dependent manner. *Biological Psychiatry*, **71**, 714–724.
- Nilius, B. & Szallasi, A. 2014. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacological Reviews*, **66**, 676–814.
- Nirogi, R., Goura, V., Shanmuganathan, D., Jayarajan, P. & Abraham, R. 2012. Comparison of manual and automated filaments for evaluation of neuropathic pain behavior in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **66**, 8–13.
- Noh, C., Shin, H.J., Lee, S., Kim, S.I., Kim, Y.-H., Lee, W.H., Kim, D.W., Lee, S.Y. & Ko, Y.K. 2020. CX3CR1-Targeted PLGA Nanoparticles Reduce Microglia Activation and Pain Behavior in Rats with Spinal Nerve Ligation. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 3469.
- Notcutt, W., Price, M., Miller, R., Newport, S., Phillips, C., Simmons, S. & Sansom, C. 2004. Initial experiences with medicinal extracts of cannabis for chronic pain: results from 34 “N of 1” studies. *Anaesthesia*, **59**, 440–452.
- Obara, I., Parkitna, J.R., Korostynski, M., Makuch, W., Kaminska, D., Przewlocka, B. & Przewlocki, R. 2009. Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. *Pain*, **141**, 283–291.
- Obermann, M., Rodriguez-Raecke, R., Naegel, S., Holle, D., Mueller, D., Yoon, M.-S., Theysohn, N., Blex, S., Diener, H.-C. & Katsarava, Z. 2013. Gray matter volume reduction reflects chronic pain in trigeminal neuralgia. *NeuroImage*, **74**, 352–358.
- O’Dowd, B.F., Ji, X., O’Dowd, P.B., Nguyen, T. & George, S.R. 2012. Disruption of the mu-delta opioid receptor heteromer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **422**, 556–560.
- Olive, M.F., Anton, B., Micevych, P., Evans, C.J. & Maidment, N.T. 1997. Presynaptic versus postsynaptic localization of mu and delta opioid receptors in dorsal and ventral striatopallidal pathways. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **17**, 7471–7479.
- Olson, K.M., Keresztes, A., Tashiro, J.K., Daconta, L.V., Hruba, V.J. & Streicher, J.M. 2018. Synthesis and Evaluation of a Novel Bivalent Selective Antagonist for the Mu-Delta Opioid Receptor Heterodimer that Reduces Morphine Withdrawal in Mice. *Journal of Medicinal Chemistry*, **61**, 6075–6086.

- Orr, P.M., Shank, B.C. & Black, A.C. 2017. The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, **29**, 407–418.
- Otabi, H., Goto, T., Okayama, T., Kohari, D. & Toyoda, A. 2017. The acute social defeat stress and nest-building test paradigm: A potential new method to screen drugs for depressive-like symptoms. *Behavioural Processes*, **135**, 71–75.
- Palmer, C.B., Meyrath, M., Canals, M., Kostenis, E., Chevigné, A. & Szpakowska, M. 2022. Atypical opioid receptors: unconventional biology and therapeutic opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*, **233**, 108014.
- Pasternak, G.W. & Pan, Y.-X. 2013. Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacological Reviews*, **65**, 1257–1317.
- Paxinos, G. & Franklin, K.B.J. 2012. *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Science.
- Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S. & Patapoutian, A. 2002. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, **108**, 705–715.
- Peng, J., Fan, M., An, C., Ni, F., Huang, W. & Luo, J. 2022. A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **130**, 439–456.
- Pereira, M.G., Carvalho, C., Costa, E.C.V., Leite, Â. & Almeida, V. 2021. Quality of life in chronic pain patients: Illness- and wellness-focused coping as moderators. *PsyCh Journal*, **10**, 283–294.
- Perrine, S.A., Hoshaw, B.A. & Unterwald, E.M. 2006. Delta opioid receptor ligands modulate anxiety-like behaviors in the rat. *British Journal of Pharmacology*, **147**, 864–872.
- Pertwee, R.G., Howlett, A.C., Abood, M.E., Alexander, S.P.H., Di Marzo, V., Elphick, M.R., Greasley, P.J., Hansen, H.S., Kunos, G., Mackie, K., Mechoulam, R. & Ross, R.A. 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacological Reviews*, **62**, 588–631.
- Pettit, D.A., Harrison, M.P., Olson, J.M., Spencer, R.F. & Cabral, G.A. 1998. Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, **51**, 391–402.
- Piardi, L.N., Pagliusi, M., Bonet, I., Brandão, A.F., Magalhães, S.F., Zanelatto, F.B., Tambeli, C.H., Parada, C.A. & Sartori, C.R. 2020. Social stress as a trigger for depressive-like behavior and persistent hyperalgesia in mice: study of the comorbidity between depression and chronic pain. *Journal of Affective Disorders*, **274**, 759–767.
- Pin, J.-P., Neubig, R., Bouvier, M., Devi, L., Filizola, M., Javitch, J.A., Lohse, M.J., Milligan, G., Palczewski, K., Parmentier, M. & Spedding, M. 2007. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacological Reviews*, **59**, 5–13.

- Pitcher, J.A., Freedman, N.J. & Lefkowitz, R.J. 1998. G protein-coupled receptor kinases. *Annual Review of Biochemistry*, **67**, 653–692.
- Podvin, S., Yaksh, T. & Hook, V. 2016. The Emerging Role of Spinal Dynorphin in Chronic Pain: A Therapeutic Perspective. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **56**, 511–533.
- Porsolt, R.D., Bertin, A. & Jalfre, M. 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie*, **229**, 327–336.
- Pradhan, A.A.A., Becker, J.A.J., Scherrer, G., Tryoen-Toth, P., Filliol, D., Matifas, A., Massotte, D., Gavériaux-Ruff, C. & Kieffer, B.L. 2009. In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PloS One*, **4**, e5425.
- Premoli, M., Aria, F., Bonini, S.A., Maccarinelli, G., Gianoncelli, A., Pina, S.D., Tambaro, S., Memo, M. & Mastinu, A. 2019. Cannabidiol: Recent advances and new insights for neuropsychiatric disorders treatment. *Life Sciences*, **224**, 120–127.
- Qin, N., Neepser, M.P., Liu, Y., Hutchinson, T.L., Lubin, M.L. & Flores, C.M. 2008. TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 6231–6238.
- Quadir, S.G., Arleth, G.M., Jahad, J.V., Echeveste Sanchez, M., Effinger, D.P. & Herman, M.A. 2022. Sex differences in affective states and association with voluntary ethanol intake in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology*, **239**, 589–604.
- Quirion, B., Bergeron, F., Blais, V. & Gendron, L. 2020. The Delta-Opioid Receptor; a Target for the Treatment of Pain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **13**, 52.
- Rácz, I., Nent, E., Erxlebe, E. & Zimmer, A. 2015. CB1 receptors modulate affective behaviour induced by neuropathic pain. *Brain Research Bulletin*, **114**, 42–48.
- Radat, F., Margot-Duclot, A. & Attal, N. 2013. Psychiatric co-morbidities in patients with chronic peripheral neuropathic pain: a multicentre cohort study. *European Journal of Pain (London, England)*, **17**, 1547–1557.
- Raja, S.N., Carr, D.B., Cohen, M., Finnerup, N.B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F.J., Mogil, J.S., Ringkamp, M., Sluka, K.A., Song, X.-J., Stevens, B., Sullivan, M.D., Tutelman, P.R., Ushida, T. & Vader, K. 2020. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, **161**, 1976–1982.
- Reeves, K.C., Shah, N., Muñoz, B. & Atwood, B.K. 2022. Opioid Receptor-Mediated Regulation of Neurotransmission in the Brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **15**, 919773.
- Reisine, T., Law, S.F., Blake, A. & Tallent, M. 1996. Molecular mechanisms of opiate receptor coupling to G proteins and effector systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **780**, 168–175.

- Reiss, D., Maurin, H., Audouard, E., Martínez-Navarro, M., Xue, Y., Herault, Y., Maldonado, R., Cabañero, D. & Gaveriaux-Ruff, C. 2021. Delta Opioid Receptor in Astrocytes Contributes to Neuropathic Cold Pain and Analgesic Tolerance in Female Mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **15**, 745178.
- Ren, Y., Whittard, J., Higuera-Matas, A., Morris, C.V. & Hurd, Y.L. 2009. Cannabidiol, a nonpsychotropic component of cannabis, inhibits cue-induced heroin seeking and normalizes discrete mesolimbic neuronal disturbances. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **29**, 14764–14769.
- Rexed, B. 1952. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *The Journal of Comparative Neurology*, **96**, 414–495.
- Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M.L., Vitoretti, L.B., Mariano-Souza, D.P., Quinteiro-Filho, W.M., Akamine, A.T., Almeida, V.I., Quevedo, J., Dal-Pizzol, F., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., Crippa, J.A. & Palermo-Neto, J. 2012. Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. *European Journal of Pharmacology*, **678**, 78–85.
- Richetto, J., Polesel, M. & Weber-Stadlbauer, U. 2019. Effects of light and dark phase testing on the investigation of behavioural paradigms in mice: Relevance for behavioural neuroscience. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, **178**, 19–29.
- van Rijn, R.M., Brissett, D.I. & Whistler, J.L. 2010. Dual efficacy of delta opioid receptor-selective ligands for ethanol drinking and anxiety. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **335**, 133–139.
- Rimmerman, N., Ben-Hail, D., Porat, Z., Juknat, A., Kozela, E., Daniels, M.P., Connelly, P.S., Leishman, E., Bradshaw, H.B., Shoshan-Barmatz, V. & Vogel, Z. 2013. Direct modulation of the outer mitochondrial membrane channel, voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) by cannabidiol: a novel mechanism for cannabinoid-induced cell death. *Cell Death & Disease*, **4**, e949.
- Riquelme-Sandoval, A., de Sá-Ferreira, C.O., Miyakoshi, L.M. & Hedin-Pereira, C. 2020. New Insights Into Peptide Cannabinoids: Structure, Biosynthesis and Signaling. *Frontiers in Pharmacology*, **11**, 596572.
- al-Rodhan, N.R., Yaksh, T.L. & Kelly, P.J. 1992. Comparison of the neurochemistry of the endogenous opioid systems in two brainstem pain-processing centers. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, **59**, 15–19.
- Roedel, A., Storch, C., Holsboer, F. & Ohl, F. 2006. Effects of light or dark phase testing on behavioural and cognitive performance in DBA mice. *Laboratory Animals*, **40**, 371–381.
- Rossi, G.C., Pasternak, G.W. & Bodnar, R.J. 1994. Mu and delta opioid synergy between the periaqueductal gray and the rostro-ventral medulla. *Brain Research*, **665**, 85–93.
- Rozenfeld, R. 2011. Type I cannabinoid receptor trafficking: all roads lead to lysosome. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, **12**, 12–18.

- Rozenfeld, R., Bushlin, I., Gomes, I., Tzavaras, N., Gupta, A., Neves, S., Battini, L., Gusella, G.L., Lachmann, A., Ma'ayan, A., Blitzer, R.D. & Devi, L.A. 2012. Receptor heteromerization expands the repertoire of cannabinoid signaling in rodent neurons. *PloS One*, **7**, e29239.
- Rozenfeld, R. & Devi, L.A. 2007. Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **21**, 2455–2465.
- Ruscheweyh, R., Forsthuber, L., Schoffnegger, D. & Sandkühler, J. 2007. Modification of classical neurochemical markers in identified primary afferent neurons with Abeta-, Adelta-, and C-fibers after chronic constriction injury in mice. *The Journal of Comparative Neurology*, **502**, 325–336.
- Russo, E.B., Burnett, A., Hall, B. & Parker, K.K. 2005. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochemical Research*, **30**, 1037–1043.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.-O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T. & Greasley, P.J. 2007. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*, **152**, 1092–1101.
- Sacerdote, P., Franchi, S., Moretti, S., Castelli, M., Procacci, P., Magnaghi, V. & Panerai, A.E. 2013. Cytokine modulation is necessary for efficacious treatment of experimental neuropathic pain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, **8**, 202–211.
- Saitoh, A., Kimura, Y., Suzuki, T., Kawai, K., Nagase, H. & Kamei, J. 2004. Potential anxiolytic and antidepressant-like activities of SNC80, a selective delta-opioid agonist, in behavioral models in rodents. *Journal of Pharmacological Sciences*, **95**, 374–380.
- Sales, A.J., Crestani, C.C., Guimarães, F.S. & Joca, S.R.L. 2018. Antidepressant-like effect induced by Cannabidiol is dependent on brain serotonin levels. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **86**, 255–261.
- Sales, A.J., Fogaça, M.V., Sartim, A.G., Pereira, V.S., Wegener, G., Guimarães, F.S. & Joca, S.R.L. 2019. Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex. *Molecular Neurobiology*, **56**, 1070–1081.
- Sayers, K.W., Nguyen, P.T., Blair, R.E., Sim-Selley, L.J. & DeLorenzo, R.J. 2012. Statistical parametric mapping reveals regional alterations in cannabinoid CB1 receptor distribution and G-protein activation in the 3D reconstructed epileptic rat brain. *Epilepsia*, **53**, 897–907.
- Scheich, B., Vincze, P., Szőke, É., Borbély, É., Hunyady, Á., Szolcsányi, J., Dénes, Á., Környei, Z., Gaszner, B. & Helyes, Z. 2017. Chronic stress-induced mechanical hyperalgesia is controlled by capsaicin-sensitive neurones in the mouse. *European Journal of Pain (London, England)*, **21**, 1417–1431.

- Scherrer, G., Imamachi, N., Cao, Y.-Q., Contet, C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B.L. & Basbaum, A.I. 2009. Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell*, **137**, 1148–1159.
- Scherrer, G., Tryoen-Tóth, P., Filliol, D., Matifas, A., Laustriat, D., Cao, Y.Q., Basbaum, A.I., Dierich, A., Vonesh, J.-L., Gavériaux-Ruff, C. & Kieffer, B.L. 2006. Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 9691–9696.
- Schiller, P.W., Nguyen, T.M., Weltrowska, G., Wilkes, B.C., Marsden, B.J., Lemieux, C. & Chung, N.N. 1992. Differential stereochemical requirements of mu vs. delta opioid receptors for ligand binding and signal transduction: development of a class of potent and highly delta-selective peptide antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 11871–11875.
- Schlosburg, J.E., Blankman, J.L., Long, J.Z., Nomura, D.K., Pan, B., Kinsey, S.G., Nguyen, P.T., Ramesh, D., Booker, L., Burston, J.J., Thomas, E.A., Selley, D.E., Sim-Selley, L.J., Liu, Q., Lichtman, A.H. & Cravatt, B.F. 2010. Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nature Neuroscience*, **13**, 1113–1119.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, **9**, 671–675.
- Scholz, J., Finnerup, N.B., Attal, N., Aziz, Q., Baron, R., Bennett, M.I., Benoliel, R., Cohen, M., Cruccu, G., Davis, K.D., Evers, S., First, M., Giamberardino, M.A., Hansson, P., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Nurmikko, T., Perrot, S., Raja, S.N., Rice, A.S.C., Rowbotham, M.C., Schug, S., Simpson, D.M., Smith, B.H., Svensson, P., Vlaeyen, J.W.S., Wang, S.-J., Barke, A., Rief, W., Treede, R.-D., & Classification Committee of the Neuropathic Pain Special Interest Group (NeuPSIG). 2019. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *Pain*, **160**, 53–59.
- Seeman, P. 2016. Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D2High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose. *Translational Psychiatry*, **6**, e920.
- Sellmeijer, J., Mathis, V., Hugel, S., Li, X.-H., Song, Q., Chen, Q.-Y., Barthas, F., Lutz, P.-E., Karatas, M., Luthi, A., Veinante, P., Aertsen, A., Barrot, M., Zhuo, M. & Yalcin, I. 2018. Hyperactivity of Anterior Cingulate Cortex Areas 24a/24b Drives Chronic Pain-Induced Anxiodepressive-like Consequences. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **38**, 3102–3115.
- Sepulveda, D.E., Vrana, K.E., Graziane, N.M. & Raup-Konsavage, W.M. 2022. Combinations of Cannabidiol and Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Reducing Chemotherapeutic Induced Neuropathic Pain. *Biomedicines*, **10**, 2548.
- Shankar, N., Awasthy, N., Mago, H. & Tandon, O.P. 1999. Analgesic effect of environmental noise: a possible stress response in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, **43**, 337–346.

- Sheehan, G.D., Martin, M.K., Young, V.A., Powell, R. & Bhattacharjee, A. 2021. Thermal hyperalgesia and dynamic weight bearing share similar recovery dynamics in a sciatic nerve entrapment injury model. *Neurobiology of Pain (Cambridge, Mass.)*, **10**, 100079.
- Shekarabi, M., Robinson, J.A. & Burdo, T.H. 2021. Isolation and Culture of Dorsal Root Ganglia (DRG) from Rodents. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **2311**, 177–184.
- Sherrington, C.S. 1906. *The integrative action of the nervous system*. Oxford university press, London.
- Shields, S.D., Eckert, W.A. & Basbaum, A.I. 2003. Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. *The Journal of Pain*, **4**, 465–470.
- Sierra, S., Gupta, A., Gomes, I., Fowkes, M., Ram, A., Bobeck, E.N. & Devi, L.A. 2019. Targeting Cannabinoid 1 and Delta Opioid Receptor Heteromers Alleviates Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *ACS pharmacology & translational science*, **2**, 219–229.
- Silote, G.P., Gatto, M.C., Eskelund, A., Guimarães, F.S., Wegener, G. & Joca, S.R.L. 2021. Strain-, Sex-, and Time-Dependent Antidepressant-like Effects of Cannabidiol. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, **14**, 1269.
- Silote, G.P., Sartim, A., Sales, A., Eskelund, A., Guimarães, F.S., Wegener, G. & Joca, S. 2019. Emerging evidence for the antidepressant effect of cannabidiol and the underlying molecular mechanisms. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **98**, 104–116.
- Silva-Cardoso, G.K., Lazarini-Lopes, W., Hallak, J.E., Crippa, J.A., Zuardi, A.W., Garcia-Cairasco, N. & Leite-Panissi, C.R.A. 2021. Cannabidiol effectively reverses mechanical and thermal allodynia, hyperalgesia, and anxious behaviors in a neuropathic pain model: Possible role of CB1 and TRPV1 receptors. *Neuropharmacology*, **197**, 108712.
- Singh, K., García-Gomar, M.G., Cauzzo, S., Staab, J.P., Indovina, I. & Bianciardi, M. 2022. Structural connectivity of autonomic, pain, limbic, and sensory brainstem nuclei in living humans based on 7 Tesla and 3 Tesla MRI. *Human Brain Mapping*, **43**, 3086–3112.
- Smith, J.C. 2019. A Review of Strain and Sex Differences in Response to Pain and Analgesia in Mice. *Comparative Medicine*, **69**, 490–500.
- Snook, L.A., Milligan, G., Kieffer, B.L. & Massotte, D. 2008. Co-expression of mu and delta opioid receptors as receptor-G protein fusions enhances both mu and delta signalling via distinct mechanisms. *Journal of Neurochemistry*, **105**, 865–873.
- Sommer, C., Leinders, M. & Üçeyler, N. 2018. Inflammation in the pathophysiology of neuropathic pain. *Pain*, **159**, 595–602.
- Staniland, A.A., Clark, A.K., Wodarski, R., Sasso, O., Maione, F., D'Acquisto, F. & Malcangio, M. 2010. Reduced inflammatory and neuropathic pain and decreased spinal

- microglial response in fractalkine receptor (CX3CR1) knockout mice. *Journal of Neurochemistry*, **114**, 1143–1157.
- Steglitz, J., Buscemi, J. & Ferguson, M.J. 2012. The future of pain research, education, and treatment: a summary of the IOM report “Relieving pain in America: a blueprint for transforming prevention, care, education, and research.” *Translational Behavioral Medicine*, **2**, 6–8.
- Stenmark, H. & Olkkonen, V.M. 2001. The Rab GTPase family. *Genome Biology*, **2**, REVIEWS3007.
- Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O. & Zerial, M. 1995. Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell*, **83**, 423–432.
- Stevens, C.W. 2009. The evolution of vertebrate opioid receptors. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, **14**, 1247–1269.
- Suzuki, J., Prostko, S., Szpak, V., Chai, P.R., Spagnolo, P.A., Tenenbaum, R.E., Ahmed, S. & Weiss, R.D. 2023. Impact of cannabidiol on reward- and stress-related neurocognitive processes among individuals with opioid use disorder: A pilot, double-blind, placebo-controlled, randomized cross-over trial. *Frontiers in Psychiatry*, **14**, 1155984.
- Swanson, L.W. & Cowan, W.M. 1979. The connections of the septal region in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, **186**, 621–655.
- Sykes, K.T., White, S.R., Hurley, R.W., Mizoguchi, H., Tseng, L.F. & Hammond, D.L. 2007. Mechanisms responsible for the enhanced antinociceptive effects of micro-opioid receptor agonists in the rostral ventromedial medulla of male rats with persistent inflammatory pain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **322**, 813–821.
- Takemori, A.E. & Portoghese, P.S. 1984. Comparative antagonism by naltrexone and naloxone of mu, kappa, and delta agonists. *European Journal of Pharmacology*, **104**, 101–104.
- Takemura, M., Sugiyo, S., Moritani, M., Kobayashi, M. & Yonehara, N. 2006. Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system. *Archives of Histology and Cytology*, **69**, 79–100.
- Tanowitz, M. & von Zastrow, M. 2003. A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 45978–45986.
- Taveggia, C. & Feltri, M.L. 2022. Beyond Wrapping: Canonical and Noncanonical Functions of Schwann Cells. *Annual Review of Neuroscience*, **45**, 561–580.
- Thompson, G.L., Lane, J.R., Coudrat, T., Sexton, P.M., Christopoulos, A. & Canals, M. 2016. Systematic analysis of factors influencing observations of biased agonism at the mu-opioid receptor. *Biochemical Pharmacology*, **113**, 70–87.
- Tian, X., Kang, D.S. & Benovic, J.L. 2014. β -arrestins and G protein-coupled receptor trafficking. *Handbook of Experimental Pharmacology*, **219**, 173–186.

- Tiwari, V., He, S.-Q., Huang, Q., Liang, L., Yang, F., Chen, Z., Tiwari, V., Fujita, W., Devi, L.A., Dong, X., Guan, Y. & Raja, S.N. 2020. Activation of μ - δ opioid receptor heteromers inhibits neuropathic pain behavior in rodents. *Pain*, **161**, 842–855.
- Toniolo, E.F., Gupta, A., Franciosi, A.C., Gomes, I., Devi, L.A. & Dale, C.S. 2022. Interactions between cannabinoid and opioid receptors in a mouse model of diabetic neuropathy. *Pain*, **163**, 1414–1423.
- Toth, C.C., Jedrzejewski, N.M., Ellis, C.L. & Frey, W.H. 2010. Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain. *Molecular Pain*, **6**, 16.
- Treede, R.-D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M.I., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N.B., First, M.B., Giamberardino, M.A., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S., Smith, B.H., Svensson, P., Vlaeyen, J.W.S. & Wang, S.-J. 2019. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain*, **160**, 19–27.
- Treede, R.-D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M.I., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N.B., First, M.B., Giamberardino, M.A., Kaasa, S., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S., Smith, B.H., Svensson, P., Vlaeyen, J.W.S. & Wang, S.-J. 2015. A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain*, **156**, 1003–1007.
- Trouvin, A.-P. & Perrot, S. 2019. New concepts of pain. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*, **33**, 101415.
- Tsao, P.I. & von Zastrow, M. 2000. Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 11130–11140.
- Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M.C., Mackie, K. & Walker, J.M. 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, **83**, 393–411.
- Ujváry, I. & Hanuš, L. 2016. Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on Their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy. *Cannabis and Cannabinoid Research*, **1**, 90–101.
- Urits, I., Gress, K., Charipova, K., Habib, K., Lee, D., Lee, C., Jung, J.W., Kassem, H., Cornett, E., Paladini, A., Varrassi, G., Kaye, A.D. & Viswanath, O. 2020. Use of cannabidiol (CBD) for the treatment of chronic pain. *Best Practice & Research. Clinical Anaesthesiology*, **34**, 463–477.
- Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., Marnett, L.J., Di Marzo, V., Pittman, Q.J., Patel, K.D. & Sharkey, K.A. 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science (New York, N.Y.)*, **310**, 329–332.
- Varma, R.K., Kaushal, R., Junnarkar, A.Y., Thomas, G.P., Naidu, M.U., Singh, P.P., Tripathi, R.M. & Shridhar, D.R. 1985. Polysorbate 80: a pharmacological study. *Arzneimittel-Forschung*, **35**, 804–808.

- Vicente-Sanchez, A., Segura, L. & Pradhan, A.A. 2016. The delta opioid receptor tool box. *Neuroscience*, **338**, 145–159.
- Wade, D.T., Robson, P., House, H., Makela, P. & Aram, J. 2003. A preliminary controlled study to determine whether whole-plant cannabis extracts can improve intractable neurogenic symptoms. *Clinical Rehabilitation*, **17**, 21–29.
- Waite, P.M.E. 2004. CHAPTER 26 - Trigeminal Sensory System. In: *The Rat Nervous System (Third Edition)* (ed. Paxinos, G.), pp. 817–851. Academic Press, Burlington.
- Walsh, K.B., McKinney, A.E. & Holmes, A.E. 2021. Minor Cannabinoids: Biosynthesis, Molecular Pharmacology and Potential Therapeutic Uses. *Frontiers in Pharmacology*, **12**, 777804.
- Walwyn, W., John, S., Maga, M., Evans, C.J. & Hales, T.G. 2009. Delta receptors are required for full inhibitory coupling of mu-receptors to voltage-dependent Ca(2+) channels in dorsal root ganglion neurons. *Molecular Pharmacology*, **76**, 134–143.
- Wang, D., Tawfik, V.L., Corder, G., Low, S.A., François, A., Basbaum, A.I. & Scherrer, G. 2018. Functional Divergence of Delta and Mu Opioid Receptor Organization in CNS Pain Circuits. *Neuron*, **98**, 90-108.e5.
- Wang, Z.J. & Wang, L.X. 2006. Phosphorylation: a molecular switch in opioid tolerance. *Life Sciences*, **79**, 1681–1691.
- Wang, H.-B., Zhao, B., Zhong, Y.-Q., Li, K.-C., Li, Z.-Y., Wang, Q., Lu, Y.-J., Zhang, Z.-N., He, S.-Q., Zheng, H.-C., Wu, S.-X., Hökfelt, T.G.M., Bao, L. & Zhang, X. 2010. Coexpression of delta- and mu-opioid receptors in nociceptive sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 13117–13122.
- Ward, S.J., McAllister, S.D., Kawamura, R., Murase, R., Neelakantan, H. & Walker, E.A. 2014. Cannabidiol inhibits paclitaxel-induced neuropathic pain through 5-HT(1A) receptors without diminishing nervous system function or chemotherapy efficacy. *British Journal of Pharmacology*, **171**, 636–645.
- Ward, S.J., Ramirez, M.D., Neelakantan, H. & Walker, E.A. 2011. Cannabidiol prevents the development of cold and mechanical allodynia in paclitaxel-treated female C57Bl6 mice. *Anesthesia and Analgesia*, **113**, 947–950.
- Wei, X., Centeno, M.V., Ren, W., Borruto, A.M., Procissi, D., Xu, T., Jabakhanji, R., Mao, Z., Kim, H., Li, Y., Yang, Y., Gutruf, P., Rogers, J.A., Surmeier, D.J., Radulovic, J., Liu, X., Martina, M. & Apkarian, A.V. 2021. Activation of the dorsal, but not the ventral, hippocampus relieves neuropathic pain in rodents. *Pain*, **162**, 2865–2880.
- Whiting, P.F., Wolff, R.F., Deshpande, S., Di Nisio, M., Duffy, S., Hernandez, A.V., Keurentjes, J.C., Lang, S., Misso, K., Ryder, S., Schmidtkofer, S., Westwood, M. & Kleijnen, J. 2015. Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*, **313**, 2456–2473.
- Wittert, G., Hope, P. & Pyle, D. 1996. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **218**, 877–881.

- Wu, D.-F., Yang, L.-Q., Goschke, A., Stumm, R., Brandenburg, L.-O., Liang, Y.-J., Höllt, V. & Koch, T. 2008. Role of receptor internalization in the agonist-induced desensitization of cannabinoid type 1 receptors. *Journal of Neurochemistry*, **104**, 1132–1143.
- Xie, W.-Y., He, Y., Yang, Y.-R., Li, Y.-F., Kang, K., Xing, B.-M. & Wang, Y. 2009. Disruption of Cdk5-associated phosphorylation of residue threonine-161 of the delta-opioid receptor: impaired receptor function and attenuated morphine antinociceptive tolerance. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **29**, 3551–3564.
- Xiong, W., Cui, T., Cheng, K., Yang, F., Chen, S.-R., Willenbring, D., Guan, Y., Pan, H.-L., Ren, K., Xu, Y. & Zhang, L. 2012. Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting $\alpha 3$ glycine receptors. *The Journal of Experimental Medicine*, **209**, 1121–1134.
- Xiong, W., Koo, B.-N., Morton, R. & Zhang, L. 2011. Psychotropic and nonpsychotropic cannabis derivatives inhibit human 5-HT_{3A} receptors through a receptor desensitization-dependent mechanism. *Neuroscience*, **184**, 28–37.
- Xu, M., Petraschka, M., McLaughlin, J.P., Westenbroek, R.E., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Czyzyk, T.A., Pintar, J.E., Terman, G.W. & Chavkin, C. 2004. Neuropathic pain activates the endogenous kappa opioid system in mouse spinal cord and induces opioid receptor tolerance. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **24**, 4576–4584.
- Yalcin, I., Barthas, F. & Barrot, M. 2014. Emotional consequences of neuropathic pain: insight from preclinical studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **47**, 154–164.
- Yalcin, I., Bohren, Y., Waltisperger, E., Sage-Ciocca, D., Yin, J.C., Freund-Mercier, M.-J. & Barrot, M. 2011. A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. *Biological Psychiatry*, **70**, 946–953.
- Yang, Q.-Q., Li, H.-N., Zhang, S.-T., Yu, Y.-L., Wei, W., Zhang, X., Wang, J.-Y. & Zeng, X.-Y. 2020. Red nucleus IL-6 mediates the maintenance of neuropathic pain by inducing the productions of TNF- α and IL-1 β through the JAK2/STAT3 and ERK signaling pathways. *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, **40**, 347–357.
- Yang, H.Y., Wilkening, S. & Iadarola, M.J. 2001. Spinal cord genes enriched in rat dorsal horn and induced by noxious stimulation identified by subtraction cloning and differential hybridization. *Neuroscience*, **103**, 493–502.
- Yang, X., Yuan, C., Wang, H., Wang, Y., Liu, M., Li, Z. & Zhang, J. 2022. Changes in serum angiogenic factors among patients with acute pain and subacute pain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **15**, 960460.
- Yong, R.J., Mullins, P.M. & Bhattacharyya, N. 2022. Prevalence of chronic pain among adults in the United States. *Pain*, **163**, e328–e332.
- Yoshikawa, K., Williams, C. & Sabol, S.L. 1984. Rat brain preproenkephalin mRNA. cDNA cloning, primary structure, and distribution in the central nervous system. *The Journal of Biological Chemistry*, **259**, 14301–14308.

- Zanelati, T.V., Biojone, C., Moreira, F.A., Guimarães, F.S. & Joca, S.R.L. 2010. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT_{1A} receptors. *British Journal of Pharmacology*, **159**, 122–128.
- Zarpelon, A.C., Rodrigues, F.C., Lopes, A.H., Souza, G.R., Carvalho, T.T., Pinto, L.G., Xu, D., Ferreira, S.H., Alves-Filho, J.C., McInnes, I.B., Ryffel, B., Quesniaux, V.F.J., Reverchon, F., Mortaud, S., Menuet, A., Liew, F.Y., Cunha, F.Q., Cunha, T.M. & Verri, W.A. 2016. Spinal cord oligodendrocyte-derived alarmin IL-33 mediates neuropathic pain. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **30**, 54–65.
- von Zastrow, M. 2010. Regulation of opioid receptors by endocytic membrane traffic: mechanisms and translational implications. *Drug and Alcohol Dependence*, **108**, 166–171.
- Zhang, M., Wang, Y., Geng, J., Zhou, S. & Xiao, B. 2019. Mechanically Activated Piezo Channels Mediate Touch and Suppress Acute Mechanical Pain Response in Mice. *Cell Reports*, **26**, 1419-1431.e4.
- Zhang, J., Yamada, O., Kida, S., Matsushita, Y., Murase, S., Hattori, T., Kubohara, Y., Kikuchi, H. & Oshima, Y. 2016. Identification of brefelamide as a novel inhibitor of osteopontin that suppresses invasion of A549 lung cancer cells. *Oncology Reports*, **36**, 2357–2364.
- Zhang, Y., Zhao, S., Rodriguez, E., Takatoh, J., Han, B.-X., Zhou, X. & Wang, F. 2015. Identifying local and descending inputs for primary sensory neurons. *The Journal of Clinical Investigation*, **125**, 3782–3794.
- Zhao, W., Li, Q., Ma, Y., Wang, Z., Fan, B., Zhai, X., Hu, M., Wang, Q., Zhang, M., Zhang, C., Qin, Y., Sha, S., Gan, Z., Ye, F., Xia, Y., Zhang, G., Yang, L., Zou, S., Xu, Z., Xia, S., Yu, Y., Abdul, M., Yang, J.-X., Cao, J.-L., Zhou, F. & Zhang, H. 2021. Behaviors Related to Psychiatric Disorders and Pain Perception in C57BL/6J Mice During Different Phases of Estrous Cycle. *Frontiers in Neuroscience*, **15**, 650793.
- Zhou, W., Jin, Y., Meng, Q., Zhu, X., Bai, T., Tian, Y., Mao, Y., Wang, L., Xie, W., Zhong, H., Zhang, N., Luo, M.-H., Tao, W., Wang, H., Li, J., Li, J., Qiu, B.-S., Zhou, J.-N., Li, X., Xu, H., Wang, K., Zhang, X., Liu, Y., Richter-Levin, G., Xu, L. & Zhang, Z. 2019. A neural circuit for comorbid depressive symptoms in chronic pain. *Nature Neuroscience*, **22**, 1649–1658.
- Zhu, Y., Hsu, M.-S. & Pintar, J.E. 1998. Developmental Expression of the μ , κ , and δ Opioid Receptor mRNAs in Mouse. *The Journal of Neuroscience*, **18**, 2538–2549.
- Zhuang, Z.-Y., Kawasaki, Y., Tan, P.-H., Wen, Y.-R., Huang, J. & Ji, R.-R. 2007. Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. *Brain, Behavior, and Immunity*, **21**, 642–651.
- Zieglgänsberger, W., French, E.D., Siggins, G.R. & Bloom, F.E. 1979. Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons. *Science (New York, N.Y.)*, **205**, 415–417.

- Zimmer, A., Zimmer, A.M., Hohmann, A.G., Herkenham, M. & Bonner, T.I. 1999. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 5780–5785.
- Zou, S. & Kumar, U. 2018. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, 833.
- Zou, L., Peng, Q., Wang, P. & Zhou, B. 2017. Progress in Research and Application of HIV-1 TAT-Derived Cell-Penetrating Peptide. *The Journal of Membrane Biology*, **250**, 115–122.

Douleur neuropathique, récepteurs opioïdes et cannabidiol

Résumé

Ces travaux visent à évaluer le rôle potentiel des récepteurs opioïdes δ dans la douleur neuropathique et les comorbidités anxio-dépressives qui lui sont associées mais aussi le potentiel thérapeutique du cannabidiol dans ces conditions.

Nous avons évalué les effets comportementaux de la douleur neuropathique, et examiné l'efficacité thérapeutique du cannabidiol sur la sensibilité mécanique et les troubles émotionnels chez des souris sauvages et δ *knock-out* mâles et femelles. Nous avons cartographié les régions de co-expression neuronale des récepteurs δ et CB1 en condition normale et neuropathique, tout en étudiant l'hétéromérisation potentielle des récepteurs δ et CB1 en culture primaire.

Ces travaux nous ont permis décrire pour la première fois les conséquences émotionnelles d'une chirurgie cuff chez la femelle. Mais aussi de préciser les régions de colocalisation neuronale des récepteurs δ et CB1 en condition neuropathique afin d'ouvrir la voie pour l'étude des hétéromères δ -CB1.

Mots clés : Douleur neuropathique, récepteur opioïde δ , cannabidiol, anxiété, dépression, hétéromères δ -CB1

Résumé en anglais

This study aim to evaluate the potential role of δ opioid receptors in neuropathic pain and the associated comorbidities: anxiety and depression, as well as the therapeutic potential of CBD in these conditions.

We assessed the behavioural effects of neuropathic pain and examined the therapeutic efficacy of CBD on mechanical sensitivity and emotional symptoms in male and female wild type and δ knockout mice. We mapped the regions of neuronal co-expression of δ and CB1 receptors in the nervous system under normal and neuropathic conditions, while also investigating the potential heteromerisation of δ and CB1 receptors in primary hippocampal culture.

These findings allowed us to describe, for the first time, the emotional consequences of cuff surgery in females and to specify the regions of δ and CB1 receptor co-localization under neuropathic conditions, thus paving the way for the study of δ -CB1 heteromers.

Keywords: Neuropathic pain, δ opioid receptor, cannabidiol, anxiety, depression, δ -CB1 heteromers