Université de Strasbourg

École doctorale Sciences de la vie et de la santé | ED 414 Université de Strasbourg

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR-3212

Thèse soutenue par :

Volodya HOVHANNISYAN

Le 28 mars 2024

Implication des microglies et des astrocytes dans le métabolisme central de la morphine

Pour obtenir le grade de :

Docteur de l'Université de Strasbourg

Spécialité Neurosciences

M. GOUMON Yannick	CR HDR, Université de Strasbourg	Directeur de thèse
Mme DECOSTERD Isabelle	PR, Université de Lausanne	Rapportrice
Mme HIRBEC Hélène	DR, Université de Montpellier	Rapportrice
Mme BEFORT Katia	CR HDR, Université de Strasbourg	Examinatrice
Mme BEN HAIM Lucile	CR, Université Paris-Saclay	Invitée

Remerciements

Mes premiers mots iront à Yannick, Jannick, Jannickator alias Jannickatorus. Merci de m'avoir accordé ta confiance dès mon stage de M2 (coupé en plein Covid d'ailleurs, on s'en souvient…) et depuis le début de ma thèse. Tu m'as laissé le champ libre pour plonger dans un océan d'inconnu avec ce projet et tu m'as fait confiance du début jusqu'à la fin alors que je pilotais le projet à ma guise en fonction de ce qui m'intéressait le plus. Si j'ai décidé aujourd'hui de continuer dans cette voie c'est en très grande partie grâce à toi. J'ai appris énormément à tes côtés, que ce soit sur le plan scientifique ou le management du projet. Ta porte a toujours été grande ouverte quand j'en ai eu besoin, nos discussions dans ce bureau me manqueront beaucoup. Merci aussi de m'avoir donné autant de bonnes adresses de resto et de bar ! Ça doit être ça de vivre sur plus de 3 siècles j'imagine !!!!!!! Enfin bref, pour rien au monde j'échangerai cette aventure pour une autre, merci encore pour tout !

Virginie, tu as été un élément clef dans la réussite de ma thèse, que ce soit sur le plan professionnel ou personnel. Ton expertise incroyable en biochimie notamment avec le spectro de masse nous a sauvé la mise plus d'une fois. C'est également grâce à tes remarques et ta vision objective des manips que j'ai appris à mieux travailler à la paillasse mais aussi dans la réflexion et l'approche des manips de manière générale. On a aussi beaucoup discuté, de tout et de n'importe quoi, et je sais que ces discussions manqueront beaucoup après mon départ…

Flo, c'est avec toi que j'ai commencé cette aventure au labo au début de mon M2. Tu m'as pris sous ton aile et tu m'as formé à tout un tas de manips. Si j'ai décidé de continuer en thèse dans cette équipe c'était en bonne partie grâce à ta bonne humeur et ta pédagogie incroyable. Karim, espèce d'enfoiré de Karim, t'es arrivé au labo et t'as foutu la merde alors que t'avais même pas encore un pied complet dedans…. Nan je rigole ! Ça a été un plaisir de t'avoir connu quand j'ai encadré ton groupe avec Radmila en IDSN, on est très vite devenus amis et tu as décidé de venir faire ton stage de M2 puis ta thèse dans notre équipe. Je te fais entièrement confiance pour la suite du projet, je sais qu'il est entre de bonnes mains.

Merci à Alex pour m'avoir emmené à la Sfn à Washington pour participer au meilleur congrès de ma vie en plus de débloquer des skills en sudoku que je soupçonnais même pas ! En plus de ça, merci pour toutes les discussions et les conseils que tu as pu me donner pour le projet.

Merci ma CST, Domi, Katia et encore une fois Alex. Beaucoup de personnes voient la CST comme un fardeau et stressent énormément à l'approche des réunions. C'était absolument pas mon

cas. Ces réunions ont été des plus fructueuses et si mon projet aussi bien avancé c'est notamment grâce aux discussions que j'ai pu avoir et à vos remarques terriblement pertinentes.

Perrine, merci beaucoup pour ta formation pour la SNI. Cette formation était incroyable et je la recommanderai à tout le monde ! Merci à Mélanie d'avoir testé mes animaux en von Frey et désolé pour ton dos à cause des souris shootés à la morphine… oupsi

Merci à toutes ces personnes indispensables sans qui le labo serait en ruines tous les jours. Je parle bien évidemment du personnel de l'animalerie Sophie, Dom et Christian que j'ai beaucoup sollicité tout au long de ma thèse. Merci à Denis, tu m'as sauvé quand mon ordi est mort en pleine rédaction et tu m'as fait voir la lumière dans l'obscurité !

Merci au starling pour tous les burgers qui m'ont donné de la force pendant cette thèse ainsi qu'au chariot pour toutes les soirées alcoolisées qu'on a pu vivre pendant toutes ces années !

Pendant cette thèse, j'ai été incroyablement bien entouré par mes amis du labo ou en dehors du labo. J'ai tellement eu de la chance à ce niveau-là que je peux pas tous vous citer, donc je vais citer personne ! Merci à tout le monde d'avoir fait de ces trois années et demie une aventure incroyable, pas sûr que j'aurai pu réussir autant sans votre présence…

Et enfin merci à toute ma famille, celle qui est proche de moi tous les jours et celle qui est loin mais présente dans mes pensées à chaque instant. Vous m'avez toujours soutenu depuis le début de mes études et j'espère pouvoir vous rendre cette confiance que vous m'avez accordée depuis toutes ces années.

À la mémoire de mon grand-père . . .

Table des matières

Abbréviations **3**

Introduction **9**

Partie 1 : Cellules Gliales 11

A) Généralités et historique 11

B) Microglies 11

C) Astrocytes 20

Partie 2 : Douleur 30

A) Généralités 30

B) Détection des informations nociceptives 30

C) La douleur neuropathique 37

D) Caractéristiques moléculaires et cellulaires de la douleur neuropathique 43

Partie 3 : Morphine 54

A) Découverte et historique de la caractérisation 54

B) Effets analgésiques de la morphine 54

C) Métabolisme 62

D) La morphine-3-glucuronide 69

Partie 4 : Aryl Hydrocarbon Receptor 71

A) Généralités 71

B) Rôle dans le SNC 77

Objectifs de thèse **84**

Matériel – Méthodes **85**

1) Animaux 86

2) Méthodes *in vitro* 86

A) Culture cellulaire primaire de cellules gliales mixtes 86

B) Principe du MACS 87

C) Culture primaires d'astrocytes 91

D) Immunomarquages 91

E) Ré-analyse des données de séquençage d'ARNm 93

F) Métabolisme *in vitro* de la morphine 93

G) Dosages de cytokines pro-inflammatoires par ELISA 96

3) Méthodes *in vivo* 96

A) Induction de la douleur neuropathique – Spared Nerve Injury 96
B) Traitement au SR1 97
C) Impact du SR1 sur l'effet analgésique de la morphine *in vivo* 97
D) Impact du SR1 sur le métabolisme de la morphine *in vivo* 98

4) Dosage par LC-MS/MS 101

A) Principe général 101
B) Quantification absolue par dilution isotopique 105
C) Analyse des milieux de culture : métabolisme *in vitro* 105
D) Analyse des échantillons des expériences *in vivo* 106

5) Analyses statistiques 107

A) Expériences *in vitro* 107
B) Expériences *in vivo* 108

Résultats 111

Discussion 135

Perspectives 147

Annexes 153

Publication 1 : Revue sur la M3G 154

Publication 2: Différences de sexe de l'effet anti-nociceptif et du métabolisme de la morphine 171

Publication 3: Différences de sexe de l'effet anti-nociceptif et du métabolisme de la codéine 191

Publication 4: Compétition métabolique entre le tamoxifène et la morphine 227

Publication 5: Article en préparation 238

Annexe 6: Actions pédagogiques 241

Annexe 7: Organisation symposium 243

Annexe 8: Communications orales 244

Références Bibliographiques 246

Abbréviations

^{1}H: Hydrogène

^{2}H: Deutéium

5-HIAA: Acide 5-hydroxyindolacétique

AAV: Virus adéno-associé

AC: Adénylate cyclase

ACC: Cortex cingulaire antérieur

ACN: Acétonitrile

AF: Acide formique

AhR: Aryl hydrocarbon receptor

AhRr: répresseur de l'AhR

AIP1: AHR-interacting protein

Aldh1l1: Aldehyde dehydrogenase 1 family member l1

ALS: Sclérose latérale amyotrophique

AMP: Adenosine monophosphate

AMPA: α-amino-3-hydroxy-5- méthyl-4-isoxazole propionate

AMPc: Cyclic adenosine monophosphate

ANOVA: Analyse de la variance

AP-1: Activator protein-1

Arg1: Arginase 1

Arnt: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator

ART: Aligned-rank transform

ATP: Adenosine triphosphate

AVC: Accident vasculaire cérébral

BHE: Barrière hémato-encéphalique

BrdU: Bromodésoxyuridine

BSA: Albumine de sérum bovin

C1q: Composant du complement 1q

C3: Composant du complement 3

CAMK: Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase

CD11b: Intégrine Alpha M ou ITGAM

CD: Cluster of differentiation

CCI: Chronic constriction injury

CCL2: Chemokine (C-C motif) ligand 2

Chi3l3: Chitinase 3-like 3

CMH2: Major histocompatibility complex 2

CBP: CREB binding protein

CSF1: Colony stimulating factor 1

CSFR1: Colony stimulating factor 1 receptor

CX3CL1: Chemokine C-X3-C motif ligand 1

CX3CR1: CX3C motif chemokine receptor 1

CYP: Cytochrome p450

DAMGO: [D-Ala^2, N-MePhe^4, Gly-ol]-enkephalin

DAMPs: Motifs moléculaires associés aux dégâts - Damage Associated Molecular Pattern

DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole

Dnmt: ADN méthyltransférase

DRG: Ganglions rachidiens dorsaux

DOR: Récepteur opioïde delta

EC50: Concentration efficace médiane

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

EPSC: Courants post-synaptiques excitateurs

EPSP: Potentiels post-synaptiques excitateurs

ER: Réticulum endoplasmique

FBS: Sérum de veau fœtal

FICZ: 6-Formylindolo(3,2-b)carbazole

GABA: Acide γ-aminobutyrique

GAD67: isoforme de 67kDa de la glutamate décarboxylase

GDP: Guanidine diphosphate

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

GFP: Protéine fluorescente verte

G_i: G inhibitrice

Glu: Glutamine

G_s: G stimulatrice

GTP: Guanidine triphosphate

HBSS: Solution saline équilibrée de Hank

HEPES: Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HCN: protéines-canaux activés par l'hyperpolarisation et modulés par les nucléotides cycliques

Hsp90: Heat shock protein 90

IASP: Association Internationale pour l'Etude de la Douleur

Iba1: Ionized calcium Binding Adaptor molecule 1

IFNγ: Interféron γ

IL: Interleukin

i.p.: Intrapéritonéale

IP3: Inositol 1,4,5-trisphosphate

IRF: Interferon regulatory factor

JNK: Kinase N-terminal c-Jun

Ki-67: Antigen kiel 67

Kir4.1: Inward-rectifier potassium channel 4.1

KOR: Récepteur opioïde kappa

LC-MS/MS: Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

LPS: Lipopolysaccharide

LSC: Lumbar spinal cord – moelle épinière lombaire

LTD: Dépression à long-terme

m/z: rapport masse/charge

M3G: Morphine-3-glucuronide

M6G: Morphine-6-glucuronide

MACS: Magnetic activated cell sorting

MBP: Myelin basic protein

ME: Moelle épinière

MOR: Récepteur opioïde mu

MRP: Multidrug resistance-associated protein

nAb: Anticorps neutralisant

Nfe2l2 ou Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

NF-κB: Nuclear factor-kappa B

NK: Natural Killer

NMDA: N-méthyl-D-aspartate

OATP2B1: Organic anion transporting polypeptide 2B1

OCT: Organic cation transporter

Olig1: Oligodendrocyte transcription factor 1

Orai1: Calcium release-activated calcium channel protein 1

P/S: Pénicilline/streptomycine

PA: Potentiel d'action

PAG: Substance grise périaqueducale

PAMPs: Motifs moléculaires associés aux pathogènes - Pathogen-associated molecular pattern

PAS: Per-Arnt-Sim

PBS: Phosphate buffered saline

PDGFRα: Platelet-derived growth factor receptor A

PDL: Poly-D-Lysine

PGE2: Prostaglandine E2

PKC: Protein kinase C

PU.1: Spleen focus-forming virus proviral integration site 1

PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis

Q1/Q2/Q3: Quadrupôle 1/2/3 du spéctromètre de masse

RCPG: Récepteurs couplés à une protéines G

REL: Réticulum endoplasmique lisse

RISC: Reduced instruction set computer

RNAseq: RNA sequencing

ROS: Dérivés réactifs de l'oxygène

RVM: Partie rostroventromédiane du bulbe rachidien

S100β: S100 calcium-binding protein β

sc-RNAseq: single-cell RNA sequencing

shRNA: Petit ARN en épingle à cheveux

siRNA: Petit ARN interférant

sn-RNAseq: single-nuclei RNA sequencing

SNC: Système nerveux central

SNI: Spared nerve injury

Sox9: SRY-box transcription factor 9

SPE: Extraction sur phase solide

SR1: Stemregenin-1

TCDD: 2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxine

TGF: Transforming growth factor

TIC: TNFα, IL1α et C1q

TLR: Toll-Like Receptor

Tmem: Transmembrane Protein

TNFα: Tumor necrosis factor α

TREM2: Triggering receptor expressed on myeloid cells 2

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end labeling

UDP: Uridine-5’-diphosphate

UDPGA: UDP-acide glucuronique

UGT: Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferases

Ugtrel: UDP-galactose-transporter-related protein

VEGF: Vascular endothelial growth factor B

XRE: Xenobiotic response element

Introduction

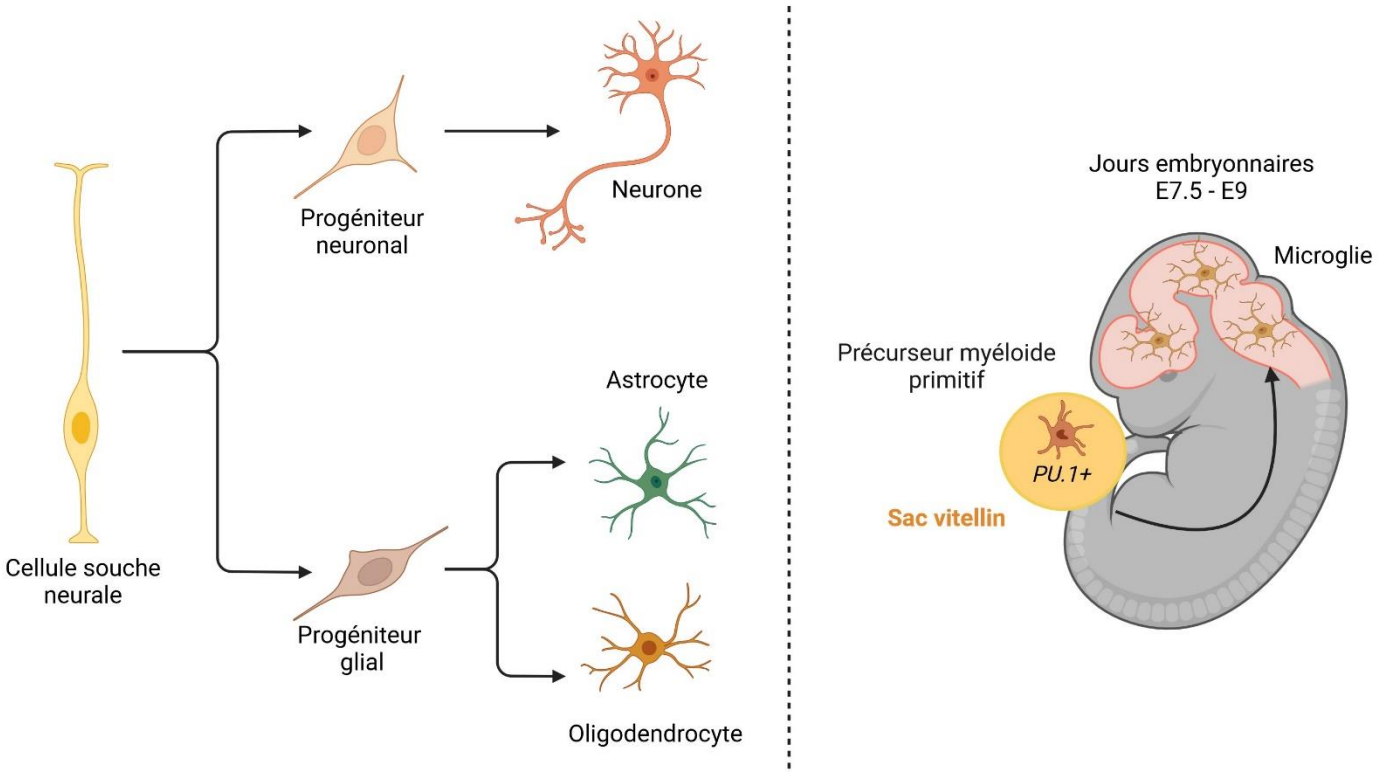


Figure 1: Origines embryonnaires des neurones, astrocytes et microglies.

Les neurones, les astrocytes ainsi que les oligodendrocytes dérivent des cellules souches neurales alors que les microglies dérivent des précurseurs myéloïdes primitifs du sac vitellin. Ainsi, lors du développement (E7.5-E9), ces cellules souches hématopoïétiques positives pour PU.1 migrent vers le CNS et se différencient en microglies fonctionnelles.

Partie 1 : Cellules Gliales

A) Généralités et historique

Bien que les neurones aient monopolisé la recherche dans le domaine des neurosciences pendant plus d'un siècle, ceux-ci ne représentent qu'une minorité des cellules du système nerveux central (SNC) (Herculano-Houzel, 2009; Keller et al., 2018). En effet, les cellules gliales ont été décrites comme étant les plus nombreuses (en dehors du cervelet). Ces dernières ont été décrites pour la première fois au milieu des années 1800 par un groupe de scientifiques incluant Rudolf Virchow, Theodor Schwann and Robert Remak (Ndubaku and de Bellard, 2008). Après leur découverte, Virchow proposa en 1856 de nommer ces cellules « nervenkitt » (autrement dit « neuro-glue ») dans son livre *Cellular Pathology*. Cependant, cette découverte est contestée par Henrich Muller qui a réalisé les premiers dessins et descriptions de cellules gliales l'année même de la publication du livre de Virchow. Plus tard, Camillo Golgi décrivit les astrocytes dans un ouvrage publié en 1871 (Bentivoglio et al., 2019) et Michael von Lenhossek introduisit en 1893 le terme d'astrocyte pour décrire ces cellules en forme d'étoile (Verkhratsky et al., 2021). Malgré tout, les outils existants à cette époque ne permettaient pas de marquer et d'étudier correctement les autres cellules gliales. Ce n'est qu'au début des années 1900 que Pío del Río Hortega publia sa technique de coloration au carbonate d'argent qui fut la clef méthodologique permettant d'identifier deux autres types de cellules distinctes des astrocytes : les microglies et les oligodendrocytes. Mes études portant principalement sur les microglies et astrocytes, seuls ces deux types de cellules gliales seront décrites en détail dans ce manuscrit.

B) Microglies

a) Origine développementale

Contrairement aux neurones, aux astrocytes et aux oligodendrocytes, des expériences visant à déterminer l'origine embryonnaire des microglies ont démontré que ces cellules ne dérivent pas du feuillet neurectodermique (Ginhoux et al., 2010; Kierdorf et al., 2013). En effet, ces cellules dérivent des précurseurs myéloïdes primitifs positifs pour le facteur de transcription PU.1 (*spleen focus-forming virus proviral integration site 1* **; Figure 1)**. Ces cellules apparaissent dans le sac vitellin au jour embryonnaire E7.25 et migrent dans le SNC à

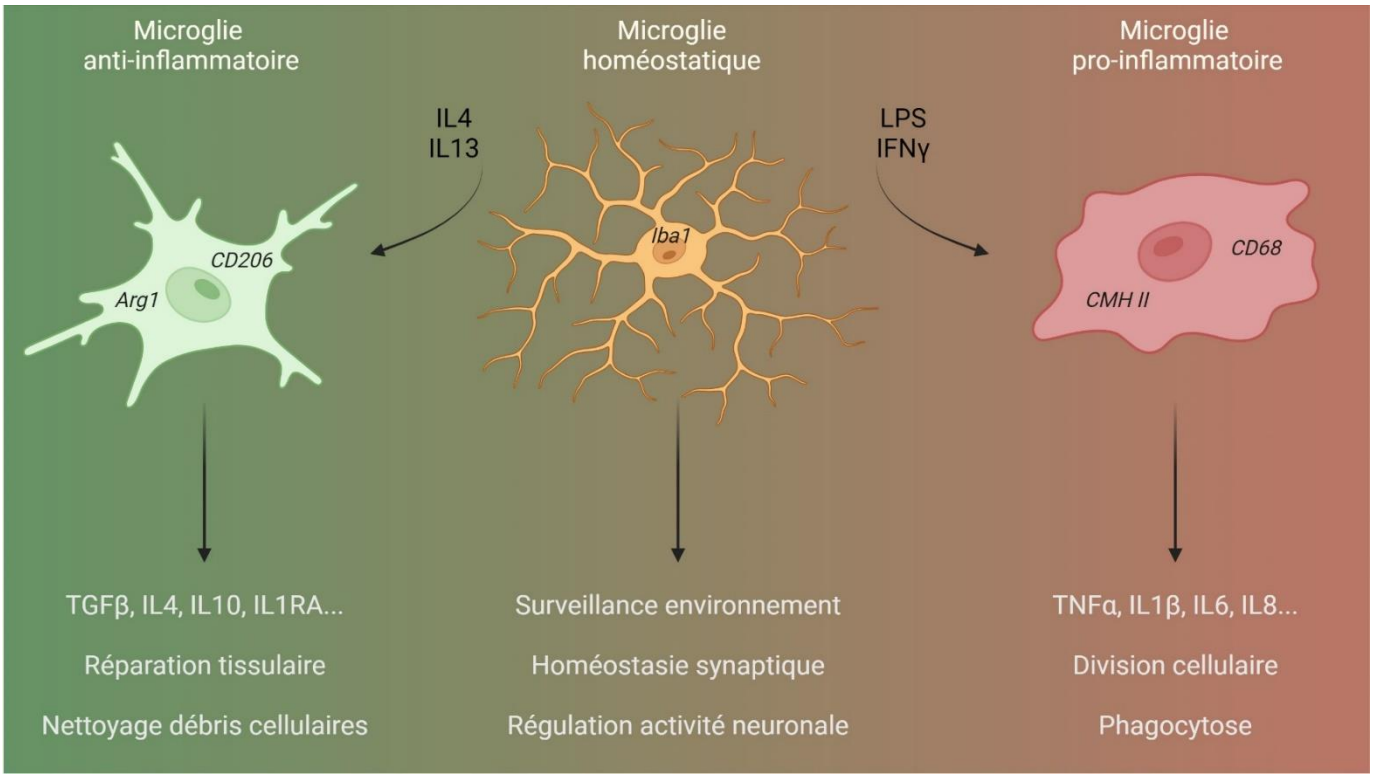


Figure 2: Différences entre microglies homéostatiques et microglies activées.

A l'état basal, les microglies sont des cellules essentielles dans la surveillance du parenchyme cérébral. Lorsque ces cellules sont activées par des signaux pro- ou anti-inflammatoires, elles adaptent leur morphologie et leurs fonctions biologiques afin de revenir à un état homéostatique.

E9.5 *via* la circulation sanguine juste avant la mise en place de la barrière hémato-encéphalique (BHE) à E15. Le nombre de cellules migrant vers le SNC est faible. Cependant, contrairement aux neurones, les microglies ne sont pas des cellules post-mitotiques et peuvent se diviser et vont coloniser le SNC et se renouveler pendant toute la vie. Les microglies ne représentent que 10% de la population cellulaire totale du SNC, bien que ce chiffre varie en fonction des structures et des stimuli environnants (Lawson et al., 1990; Soulet and Rivest, 2008). Différents facteurs solubles incluant le TGF-β2 *(Transforming growth factor-beta 2)* ou l'IL34 *(Interleukin 34)* ont été décrits comme étant essentiels pour le développement de la microglie (Bohlen et al., 2017). L'identification de ces facteurs a permis par la suite de mettre au point des protocoles de cultures primaires permettant de caractériser les rôles physiopathologiques de ces cellules (Bohlen et al., 2017). Ainsi, il est possible de cultiver des microglies primaires en utilisant du milieu conditionné astrocytaire, c'est-à-dire du milieu dans lequel ont été cultivés des astrocytes, ou en supplémentant du milieu de culture avec du TGF-β2, de l'IL34 et du cholestérol.

b) Marqueurs des microglies

Les microglies sont souvent été catégorisées en 3 phénotypes : homéostatique (M0), pro-inflammatoire (M1) et anti-inflammatoire (M2 ; **Figure 2**). Beaucoup de personnes parlent de microglies quiescentes par abus de langage lorsqu'on parle de microglies non stimulées. Néanmoins, la quiescence se rapporte par définition à un état inactif qui ne caractérise absolument par les microglies non stimulées. Les différents phénotypes microgliaux sont caractérisés par des marqueurs protéiques dont l'expression varie en fonction du phénotype (Schwabenland et al., 2021). Des marqueurs « classiques » de microglies existent comme Iba1 *(Ionized calcium Binding Adaptor molecule 1)* ou Tmem119 *(Transmembrane Protein 119)*. Cependant, ces marqueurs ne sont pas spécifiques aux microglies car ils sont également exprimés les macrophages (Vankriekelsvenne et al., 2022). Il existe d'autres marqueurs tels que le CD68 *(Cluster of Differentiation 68)* ou le CMH2 *(Major Histocompatibility Complex 2)* caractéristiques des microglies pro-inflammatoires de phénotype M1, tandis que l'Arg1 *(Arginase 1)* ou le CD206 caractérisent plutôt un phénotype M2 anti-inflammatoire. Ainsi, ces marqueurs protéiques donnent de bons indices sur le phénotype des microglies.

c) Rôles physiologiques

Comme mentionné précédemment, les microglies dérivent des précurseurs myéloïdes primitifs présents dans le sac vitellin. Ces précurseurs ont été décrits comme générant différents types de cellules immunitaires incluant les macrophages. De ce fait, les microglies sont souvent comparées aux macrophages dans la mesure où les fonctions biologiques de ces cellules sont proches. Ainsi, le rôle primaire attribué aux microglies est la protection du CNS. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que le milieu et les signaux extracellulaires auxquels sont soumis les microglies sont très différents de ceux auxquels sont soumis les macrophages. Ainsi, bien que les fonctions de base de ces cellules semblent être très similaires (phagocytose, présentation d'antigène, régulation de l'inflammation…), ces deux types de cellules immunitaires possèdent certaines caractéristiques distinctes. Dans mon manuscrit de thèse, j'ai choisi de ne pas les détailler les fonctions de base et plutôt de souligner les fonctions non conventionnelles des microglies qui permettent de les différencier des macrophages.

i. Remodelage neuronal et synaptique

Dans un contexte physiologique, la microglie présente un phénotype de repos caractérisé morphologiquement des prolongements qui lui permettent de surveiller en permanence son environnement (Vidal-Itriago et al., 2022). Tout comme les macrophages, ces cellules sont capables de phagocyter, une faculté qu'elles utilisent afin de permettre le bon développement et le maintien de l'homéostasie neuronale (Sun et al., 2023). En effet, il a été démontré que la majorité des neuroblastes générés durant le développement subissent une apoptose et que la microglie phagocyte ces cellules (Sierra et al., 2010). De plus, la microglie affecte activement le matériel synaptique et joue un rôle majeur dans l'élagage synaptique au cours du développement. Le système du complément semble essentiel à ces mécanismes (Zabel and Kirsch, 2013). En effet, les éléments synaptiques « marquées » avec les composants du complément 1q et 3 (C1q et C3) permettent à la microglie non seulement de les reconnaître, mais aussi de les remodeler (Stevens et al., 2007). Il est intéressant de noter que l'élimination des synapses est dépendante de l'activité neuronale et du "marquage" réalisé par le système du complément, permettant la spécificité de l'élimination par la microglie. Contrairement à ce qu'on pensait, le remodelage synaptique n'est pas réalisé par phagocytose mais par trogocytose. C'est un processus dans lequel une cellule acquiert rapidement une fraction provenant d'une autre cellule non apoptotique (Weinhard et al., 2018). D'autres

signaux activateurs ou inhibiteurs permettent de guider les microglies dans ce processus. En effet, le CX3CL1 *(chemokine C-X3-C motif ligand 1)*, la phosphatidylsérine ou TREM2 *(Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2*) induisent également un remodelage synaptique, tandis que des facteurs tels que CD200 ou CD47 inhibent celui-ci (Lyons et al., 2017; Lehrman et al., 2018). Cette capacité de remodelage synaptique place la microglie parmi les acteurs clefs du maintien de l'homéostasie de l'activité neuronale.

ii. Homéostasie de l'activité neuronale

Les prolongements microgliaux sont des structures extrêmement dynamiques, surveillant constamment leur microenvironnement (Davalos et al., 2005; Hanisch and Kettenmann, 2007). Des études *in vivo* ayant génétiquement marqué les microglies ont démontré que ce mécanisme, en condition non pathologique, est presque exclusivement réalisée grâce à leurs prolongements longs, fins et très ramifiés (Nimmerjahn et al., 2005). Ces prolongements s'étendent et se rétractent à une vitesse moyenne de 2,5 µm/min et couvrent un territoire de 60 µm dans le cortex. Les prolongements les plus épais et proches du soma sont quant à eux moins mobiles. Enfin, leurs somas sont presque immobiles et ne se déplaçant que de quelques µm/h.

En s'aidant de leur prolongements, les microglies sont capables de moduler l'activité neuronale en régulant la formation et la survie des synapses (Badimon et al., 2020; Saw et al., 2020; Sun et al., 2020). Par exemple, une activité neuronale accrue induit une augmentation des niveaux d'ATP *(Adenosine triphosphate)* extracellulaire qui est détecté par les microglies *via* leurs récepteurs purinergiques (Calovi et al., 2019). Les microglies vont ensuite dégrader l'ATP en AMP *(Adenosine monophosphate)* puis en adénosine *via* des ectonucléotidases (CD39 et CD73 ; (Illes et al., 2020). L'adénosine va pouvoir se lier aux récepteurs A1 couplés à une protéine G inhibitrice (G_i) qui sont exprimés par les neurones. De cette manière, la microglie inhibe l'activité neuronale en créant une boucle de rétrocontrôle négative (Badimon et al., 2020). Les microglies sont également impliquées dans des phénomènes de plasticité synaptiques à long-terme. A titre d'exemple, les interactions entre les neurones et la microglie *via* le système CX3CL1-CX3CR1 *(CX3C motif chemokine receptor 1)* influencent la maturation des synapses excitatrices CA3→CA1 de l'hippocampe (Zhuo et al., 2011; Basilico et al., 2019). Ainsi, une délétion de CX3CR1 perturbe les propriétés électrophysiologiques des synapses et augmente le nombre de synapses silencieuses (Basilico et al., 2019). Une autre étude a

également exploré le rôle de la microglie dans les courants post-synaptiques de champs au sein du striatum (Kim et al., 2020). Cette étude a été réalisée chez des animaux sauvages contrôles ou traités avec de la minocycline qui est un inhibiteur de l'activation microgliale (Kobayashi et al., 2013). Ainsi, les animaux traités à la minocycline montrent une altération de l'induction de dépression à long-terme (LTD) suite à un protocole de stimulation de theta-burst (Kim et al., 2020). Néanmoins, il est important de prendre en compte les différents effets de la minocycline sur les autres types cellulaires comme les astrocytes, les oligodendrocytes ou encore les neurones (Domercq and Matute, 2004; Yune et al., 2007; Bernardino et al., 2009; Schmitz et al., 2012).

d) De l'activation…

Contrairement aux microglies homéostatiques, les microglies activées possèdent une forme amiboïde, c'est-à-dire avec un corps cellulaire rond sans prolongements (Giulian and Baker, 1986). Ce changement de morphologie semble lié à des changements des niveaux d'AMP cycliques (AMPc) intracellulaires qui peuvent être modulés *via* l'activation de récepteurs couplés à une protéines G (RCPG) inhibitrice (G_i) ou G stimulatrice (G_s) (Bernier et al., 2019). Ainsi, l'activation des récepteurs couplés à une protéine G_i entraîne une augmentation de la taille des grands prolongements. A contrario, l'augmentation d'AMPc induite par l'activation des récepteurs couplés à une protéine G_s diminue la taille de ces derniers.

Les microglies ont été largement étudiées dans de nombreux contextes neuroinflammatoires (Muzio et al., 2021; Woodburn et al., 2021; Shao et al., 2022). De manière générale, ces cellules sont dotées d'une grande variété de récepteurs leur permettant de répondre à de nombreux stimuli (Pocock and Kettenmann, 2007; Madry and Attwell, 2015; Liu et al., 2016). Ainsi, les microglies peuvent détecter les perturbations de l'homéostasie du parenchyme cérébral de plusieurs manières. La première manière est la détection d'éléments qui ne sont pas habituellement présents dans le milieu (structures microbiennes/virales ou composants intracellulaires à des concentrations élevées). L'autre manière est la détection de certains composés comme les protéines du système de complément ou les agrégats de protéines. Par exemple, cette détection se fait *via* des systèmes spécifiques mettant en jeu des récepteurs reconnaissant les motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs) ou des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs). Par exemple, différents récepteurs tels

que les Toll-Like Receptors (TLR) détectent et différencient les structures virales, bactériennes et fongiques (Kumar, 2019). Notamment, le TLR4 qui détecte les lipopolysaccharides (LPS) bactériens. Suite à l'activation de ces récepteurs, des cascades intracellulaires se mettent en place afin d'initier une réaction face à la perturbation homéostatique détectée (Lu et al., 2008; Li et al., 2021).

e) …à la réaction

La réactivité microgliale a été caractérisée sous 2 formes, soit sous un état pro-inflammatoire (M1) induit par des stimuli tels que le LPS ou l'interféron γ (IFNγ), soit sous un état anti-inflammatoire (M2) induit par l'interleukine (IL) 4 ou l'IL13 (Nakagawa and Chiba, 2014; Salvi et al., 2017). Concernant les microglies de phénotype M1, la plupart des études ayant examiné le nombre de microglies dans le SNC ont observé que ces cellules entrent en phase de prolifération cellulaire (Huck et al., 2021). Ces résultats ont été obtenus à l'aide de marquage Ki-67 *(Antigen Kiel 67)* ou à l'aide d'approche utilisant le BrdU *(bromodésoxyuridine)*. De plus, de nombreuses études ont montré l'augmentation de l'activité phagocytaire de ces cellules à l'aide de marquage CD68 qui est un marqueur de l'activité lysosomale (Bodea et al., 2014). L'état M1 est souvent associé à une neurotoxicité provenant de la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires incluant les cytokines classiques (*e.g.*, TNFα, *Tumor Necrosis Factor α* ; IL1β, IL6) mais également des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et le monoxyde d'azote (NO) (Iizumi et al., 2016; Simpson and Oliver, 2020). Il en résulte une augmentation de l'apoptose des cellules avoisinantes, une hyperexcitabilité neuronale ou encore une rupture de la BHE qui permet l'infiltration de cellules immunitaires périphériques (da Fonseca et al., 2014).

A contrario, l'état M2 est associé aux microglies ayant des propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices caractérisées par une capacité de réparation et de nettoyage des débris cellulaires pour *in fine* restaurer l'homéostasie (Chen and Trapp, 2016). Le phénotype M2 se caractérise par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL10 ou le TGFβ, ainsi que de facteurs neurotrophiques favorisant la survie neuronale. De plus, une augmentation des niveaux d'ARNm de l'Arg1 et de la chitinases-like protein 1 Chi3l3 *(Chitinase 3-like 3)* a été décrite dans les microglies en état M2 (Cherry et al., 2014). L'Arg1 métabolise l'arginine en urée et en ornithine qui sont ensuite métabolisées en hydroxyproline

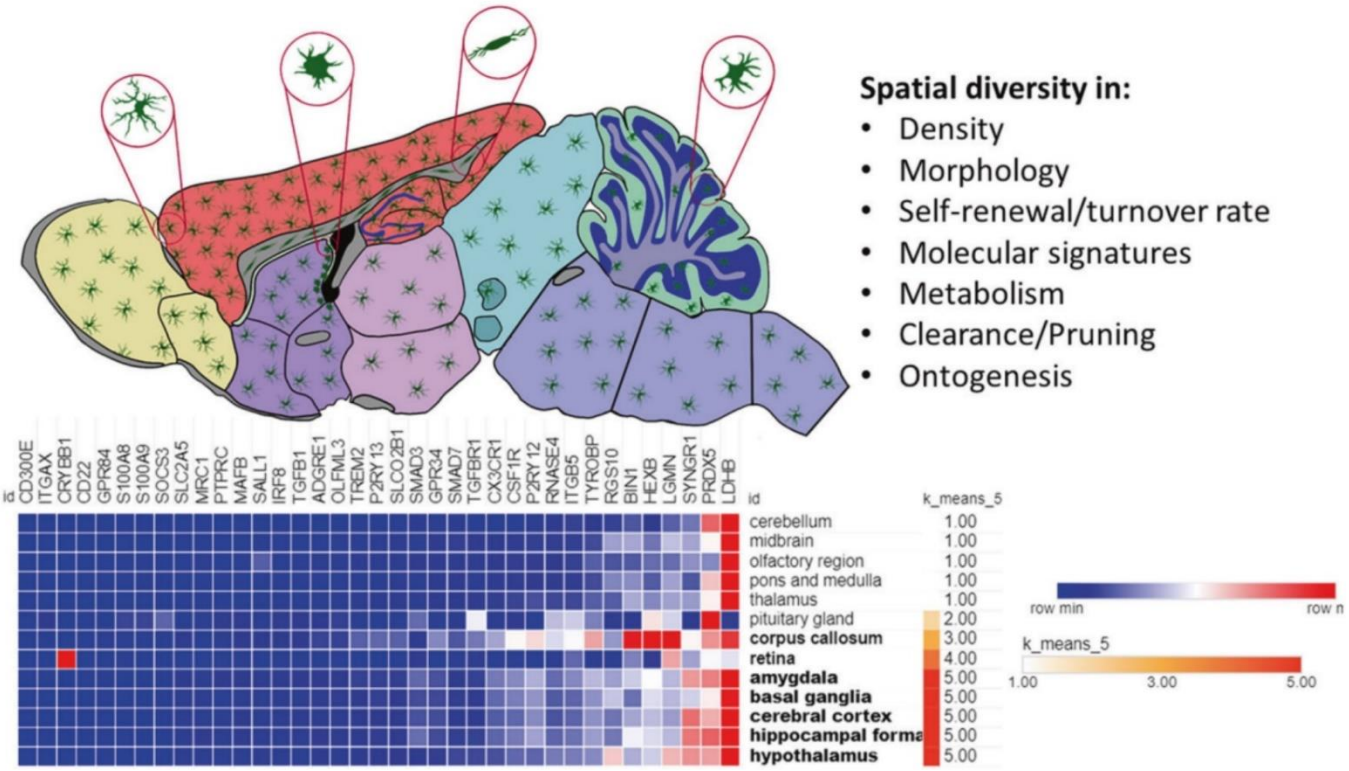


Figure 3: Hétérogénéité de la microglie en fonction des structures cérébrales

Les microglies diffèrent dans leur nombre, leur morphologie, leur signature moléculaire, ainsi que leurs fonctions biologiques dans les différentes zones du cerveau de la souris. Les gènes du « microgliome » ont été sélectionnés sur la base de plusieurs études transcriptomiques (voir Tan et al., 2020) et des données RNAseq issues de 13 régions cérébrales chez la souris. Une heat-map d'expression a été dessinée dans Morpheus (Broad Institute). Les régions cérébrales ont été regroupées selon la méthode K-moyennes des niveaux d'expression (score de regroupement à 5, méthode de Pearson) (Tan et al., 2020).

et en proline (Morris, 2009). Ces composés produits contribuent à la réparation tissulaire. Par exemple, l'hydroxyproline et la proline sont des sources importantes de la synthèse de collagène ou, plus généralement, de la synthèse des protéines de matrice extracellulaire. Les protéines de matrice extracellulaire aident à renforcer et réparer le tissus des sites lésés (Albina et al., 1990; Durante et al., 2000). Quant à Chi3l3, cette protéine sécrétée se lie aux saccharides et au sulfate d'héparine présents sur les surfaces cellulaires et aide ainsi à protéger la matrice extracellulaire au niveau des sites de lésion (Noh et al., 2018).

Cependant, cette nomenclature M1/M2 apparait à mes yeux extrêmement réductrice. En effet, de nombreux articles décrivent des états cellulaires intermédiaires. De mon point de vu, cette vision simpliste des états des microglies a diminué considérablement l'importance donnée à ces cellules et a freiné les approches théoriques et pratiques pour leur étude.

f) Hétérogénéité microgliale

L'émergence récente des techniques de RNAseq (RNA sequencing) sur cellule unique (single cell-RNAseq, sc-RNAseq) et du noyau unique (single nuclei-RNAseq, sn-RNAseq) a permis de démontrer une hétérogénéité des microglies au niveau physiologique et pathologique (Tan et al., 2020; Paolicelli et al., 2022) **(Figure 3)**. Tout d'abord, des études ont pointé du doigt une hétérogénéité au niveau spatial de ces cellules dans le SNC (Silvin and Ginhoux, 2018; Tan et al., 2020). Ainsi, une première étude de Grabert et collaborateurs a montré une hétérogénéité transcriptionnelle des microglies en fonction de leur localisation dans le cerveau (Grabert et al., 2016). En effet, des différences transcriptionnelles au niveau du métabolisme énergétique et de la réponse et la régulation immunitaire ont été observés entre les microglies provenant du cervelet, du striatum, du cortex et de l'hippocampe. Ces différences spatiales ont conduit les chercheurs à étudier les différences inter-structurales des fonctions basiques des microglies. Ainsi, il a été montré que le renouvellement de la microglie était différent en fonction des régions cérébrales (Tay et al., 2017). Il a pu être estimé que la population microgliale corticale était la plus lente à se renouveler complètement (tous les 41 mois), suivie par la population hippocampique (tous les 15 mois) et du bulbe olfactif (tous les 8 mois) (Tay et al., 2017). De plus, il a été démontré qu'il existe des différences sexuelles au niveau transcriptionnel entre les microglies issues de cortex et de l'hippocampe (Guneykaya et al., 2018). Par exemple, certains gènes surexprimés chez les mâles appartenaient à l'ontologie des gènes « activité des facteurs de transcription » ainsi que « déméthylation et

désacétylation des histones » dans les microglies corticales. Néanmoins, aucune étude fonctionnelle/comportementale n'a pour l'instant étudié ces différences.

Ces paragraphes ne sont qu'un rapide résumé de l'hétérogénéité microgliale existant à l'état homéostatique. Cependant, la majorité des études se focalise sur la nomenclature M1/M2 pour les microglies activées. Néanmoins, peut-on uniquement cantonner l'activation uniquement qu'à deux état distincts (Ransohoff, 2016) ? Il est connu que seules certaines sous-populations de microglies répondent à des stimuli spécifiques (Seifert et al., 2011). En effet, la majorité des microglies détectent le TNFα *via* l'expression de ses récepteurs. Or, seul un sous-ensemble de microglie présent dans le cortex, le cervelet et la moelle épinière (ME) est capable de produire du TNFα en réponse (Clausen et al., 2008; Lambertsen et al., 2009; Scheffel et al., 2012). De plus, il a été démontré que la réponse microgliale à l'IFNγ varie selon les régions cérébrales et que cette réponse est dépendent de facteurs neurochimiques locaux telles que le neuropeptide substance P (SP) ou encore le glutamate (McCluskey and Lampson, 2001). Par ailleurs, en dehors d'un contexte d'homéostasie, de telles hétérogénéités phénotypiques ont aussi été observées dans la maladie d'Alzheimer (Keren-Shaul et al., 2017), le vieillissement (Allen et al., 2023) ou encore la douleur chronique (Tansley et al., 2022a). Cependant, les microglies ne sont pas les seules cellules à avoir attiré l'œil des chercheurs dans ces différentes pathologies. En effet, l'implication d'autres cellules gliales comme les astrocytes a également été étudiée dans ces contextes.

C) Astrocytes

a) Marqueurs et morphologie

Chez les mammifères, les astrocytes représentent le type cellulaire le plus abondant du cerveau avec, selon les articles, entre environ 20 à 40 % du nombre total des cellules (Herculano-Houzel, 2014). La GFAP *(Glial fibrillary acidic protein)*, principal filament intermédiaire composant le cytosquelette des astrocytes, est le marqueur le plus couramment utilisé pour détecter ces cellules. Néanmoins, la GFAP n'a été localisée que dans environ 15 % du volume total des astrocytes, et plus de 40 % des astrocytes se sont révélés négatifs pour la GFAP dans l'hippocampe de rats adultes (Walz and Lang, 1998). Un autre marqueur astrocytaire couramment utilisé est le peptide S100β (S100 calcium-binding protein β) qui est abondant dans le cytoplasme et le noyau des astrocytes (Donato et al., 2009). Cependant, la S100β est également exprimée par une sous-population d'oligodendrocytes matures, dans les

cellules épithéliales du plexus choroïde et par certains neurones (Rickmann and Wolff, 1995; Vives et al., 2003; Deloulme et al., 2004). Récemment, Aldh1l1 *(Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1)* et le facteur de transcription Sox9 (*SRY-box transcription factor* 9) ont été proposés comme étant de nouveaux marqueurs spécifiques des astrocytes (Cahoy et al., 2008; Sun et al., 2017b).

D'un point de vue morphologique, les astrocytes diffèrent en fonction de leur localisation dans le SNC, avec des différences importantes notamment dans la substance grise ou la substance blanche (Matyash and Kettenmann, 2010; Kohler et al., 2021). En effet, on retrouve des astrocytes protoplasmiques localisés dans la substance grise et des astrocytes fibreux localisés dans la substance blanche (Oberheim et al., 2012). Les astrocytes protoplasmiques sont caractérisés par un corps cellulaire rond et des prolongements très ramifiés (Bushong et al., 2004). Ces derniers sont en contact étroit avec les compartiments pré- et postsynaptiques et participent activement au développement et à la fonction synaptique (Witcher et al., 2007; Witcher et al., 2010). D'un autre côté, les astrocytes fibreux possèdent un corps cellulaire plus allongé et de longs prolongements fins mais moins ramifiés. Contrairement aux astrocytes protoplasmiques, ils sont en contact avec les nœuds de Ranviers (Butt et al., 1994). Au fur et à mesure du temps, il est apparu que les astrocytes sont des cellules essentielles à l'homéostasie du SNC (Hart and Karimi-Abdolrezaee, 2021).

b) Rôles physiologiques

i. Barrière hémato-encéphalique

La BHE est une barrière physique qui empêche l'entrée de certaines molécules dans le parenchyme cérébral en fonction de leur polarité et de leur taille (Kadry et al., 2020). Les principaux constituants cellulaires de la BHE sont les cellules endothéliales qui forment des jonctions serrées entourées d'une lame basale, les péricytes périvasculaires et l'extrémité de pieds astrocytaires (Daneman and Prat, 2015). Ce sont les astrocytes qui établissent le lien entre le flux sanguin endothélial et les neurones, jouant ainsi un rôle de régulateurs majeurs

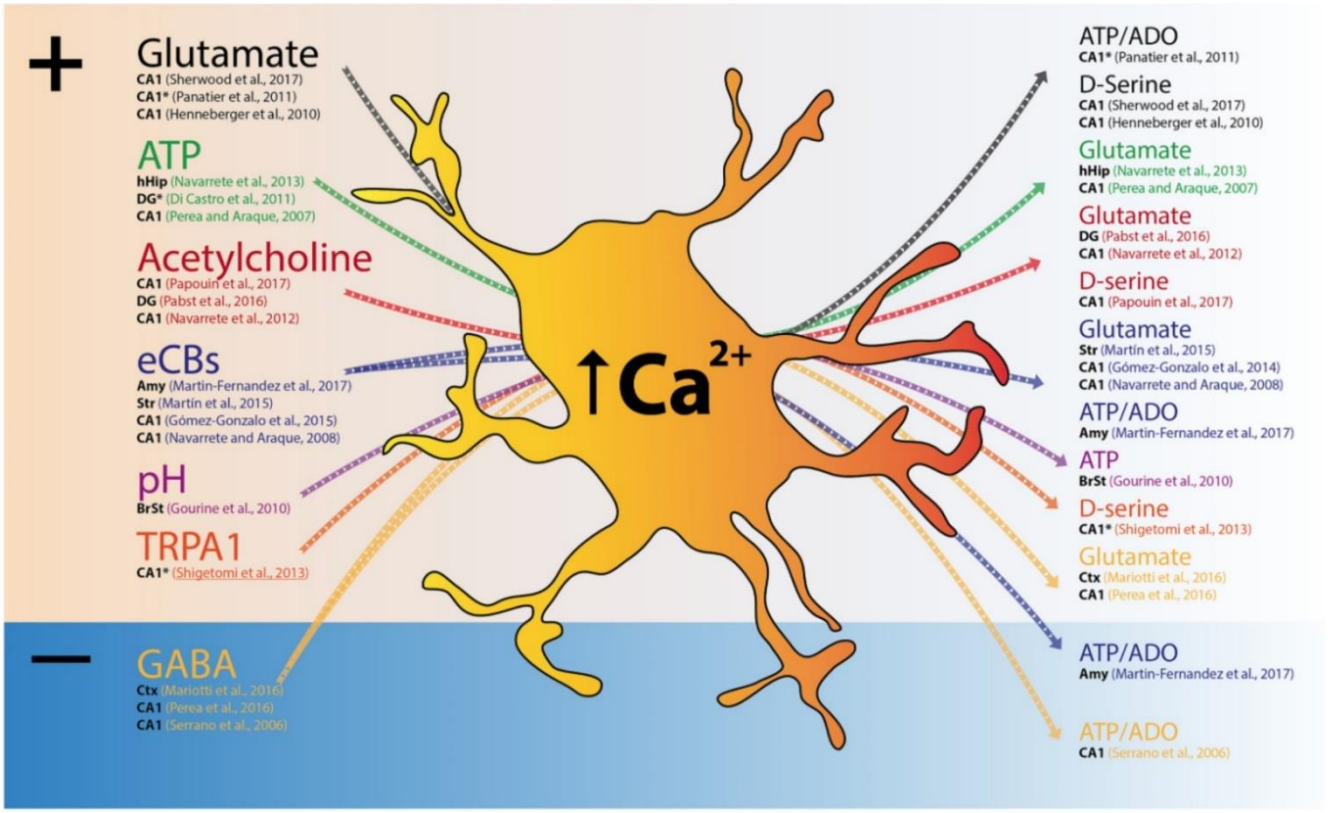


Figure 4: Diversité des signaux captés par les astrocytes et les réponses associées.

Les signaux excitateurs et/ou inhibiteurs déclenchent des élévations de Ca^{2+} dans les astrocytes (à droite) et conduisent à la libération de gliotransmetteurs (à gauche). Les signaux excitateurs (+) et inhibiteurs (-) provoquent des élévations globales ou focales de Ca^{2+} dans les astrocytes et précèdent la libération de gliotransmetteurs susceptibles d'exercer une excitation ou une inhibition des synapses voisines (à droite). Pour chaque référence, la région étudiée est indiquée en noir (Amy, Amygdale ; BrSt, tronc cérébral ; CA1, CA1 de l'hippocampe ; Ctx, cortex ; DG, gyrus denté ; hHip, hippocampe humain ; Str, Striatum). ∗ Indique les études qui décrivent les conséquences fonctionnelles des réponses focales au Ca^{2+}, plutôt que les réponses globales au Ca^{2+} (Guerra-Gomes et al., 2017).

dans la formation et le maintien de la BHE (Alvarez et al., 2013). En effet, les astrocytes sécrètent des facteurs solubles qui permettent la formation de jonctions serrées entre les cellules endothéliales (Prat et al., 2001).

ii. Homéostasie potassique

Dans le cerveau, le K^+ extracellulaire est maintenu à une concentration proche de 3 mM, bien que des variations locales de K^+ extracellulaire se produisent suite à des changements dans l'activité neuronale (Prince et al., 1973; Sykova et al., 1974). Les mécanismes de régulation des concentrations de K^+ extracellulaires peuvent être classés en deux grandes catégories : l'absorption du K^+ et le tamponnage spatial du K^+ (Amedee et al., 1997; Somjen, 2002; Kofuji and Newman, 2004). Dans le cas de l'absorption du K^+, les ions en excès sont temporairement séquestrés dans les astrocytes *via* une entrée d'ions utilisant des transporteurs ou des canaux potassiques (Wang et al., 2020). Contrairement à l'absorption, le tamponnage spatial du K^+ est le mécanisme le plus étudié dans le cerveau (Chen and Nicholson, 2000). Il est maintenant connu que les astrocytes dispersent les augmentations locales de K^+ extracellulaire en transférant les ions K^+ des sites où les concentrations sont élevées vers ceux où ils sont plus faibles, comme les micro-capillaires sanguins. Plus particulièrement, les astrocytes régulent l'homéostasie du K^+ par l'intermédiaire des canaux Kir4.1 *(Inward-rectifier potassium channel 4.1)* dans les synapses, ce qui maintient une excitabilité neuronale normale (Hibino et al., 2010; Ohno et al., 2018).

iii. Gliotransmission

Les astrocytes ne sont pas des cellules excitables, c'est-à-dire qu'elles sont incapables de générer des potentiels d'action (PA) du fait d'une trop faible densité de canaux sodiques voltages-dépendants (Sontheimer et al., 1996). Néanmoins, ces cellules possèdent leur propre forme d'excitabilité basée sur les variations intracellulaires des concentrations de Ca^{2+} (Goenaga et al., 2023). En effet, les astrocytes sont entre autre connus pour exprimer des récepteurs pour une pléthore de neuromodulateurs tels que le glutamate, l'acide γ-aminobutyrique (GABA), les endocannabinoïdes, la dopamine, la sérotonine, l'ATP/adénosine, l'acétylcholine ou encore les opioïdes (Khakh and Sofroniew, 2015) **(Figure 4)**. Parmi les récepteurs de ces neurotransmetteurs, beaucoup sont des RCPG qui, lorsqu'ils sont activés, entraînent des élévations du Ca^{2+} intracellulaire. Les récepteurs couplés à une protéine G_q activent la phospholipase C qui génère du diacylglycérol et de l'inositol 1,4,5-trisphosphate

(IP3) (Sandal et al., 2013). Ce dernier induit la libération de Ca^{2+} à partir du réticulum endoplasmique *via* l'activation des récepteurs à l'IP3 (Barbara, 2002). Il a été démontré que les récepteurs à l'IP3 de type 2 sont les principaux responsables pour la mobilisation du Ca^{2+} induite par les RCPG dans les astrocytes (Srinivasan et al., 2015). De manière plus générale, il a été montré que, contrairement aux neurones, la quasi-totalité des RCPG induisent une élévation de Ca^{2+} dans les astrocytes (Durkee et al., 2019). Ainsi, ce mécanisme permet à ces cellules de libérer de manière Ca^{2+}-dépendante des molécules telles que le glutamate, la D-sérine/Glycine ou encore l'ATP (Harada et al., 2015; de Ceglia et al., 2023). De plus, d'autres récepteurs ou canaux ioniques incluant le TLR4, Piezo1 ou encore Orai1 *(Calcium release-activated calcium channel protein 1)* ont été décrits comme pouvant moduler les oscillations calciques astrocytaires dans des conditions neuroinflammatoires dans lesquels ces cellules deviennent réactives (Velasco-Estevez et al., 2020; Birla et al., 2022; Novakovic et al., 2023).

c) Astrocytes réactifs

i. Généralités

Les astrocytes qualifiés de « réactifs » ont été observés dans différents contextes pathologiques (Wilhelmsson et al., 2006; Sofroniew, 2009; Escartin et al., 2021). La question de savoir si les astrocytes réactifs sont nocifs ou bénéfiques a longtemps été débattue et les deux types d'observations ont été faites (Jiwaji and Hardingham, 2022). Par exemple, les astrocytes réactifs peuvent inhiber la régénération des axones après une lésion du SNC (McKeon et al., 1991; Bradbury et al., 2002; Fitch and Silver, 2008; Alilain et al., 2011) et produire des cytokines pro-inflammatoires qui aggravent les lésions de la ME (Brambilla et al., 2005; Brambilla et al., 2009). À l'inverse, des travaux d'ablation des astrocytes réactifs ont démontré que ces cellules sont essentielles pour résister aux lésions et améliorer la récupération après un traumatisme du SNC comme une ischémie ou une encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004; Voskuhl et al., 2009). L'ensemble de ces résultats démontre que les astrocytes réactifs peuvent jouer un rôle bénéfique ou délétère en fonction de la nature de la lésion ou de la maladie. Ce point soulève la question de l'existence potentielle d'une multitude de sous-types d'astrocytes réactifs.

ii. Etudes transcriptionnelles

Une étude pionnière du groupe de Ben Barres a révélé les profils transcriptomiques d'astrocytes dans deux modèles pathologiques chez la souris : l'accident vasculaire cérébral

(AVC) ischémique et la neuroinflammation (Zamanian et al., 2012). L'AVC ischémique a été induit par l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne pendant 1h, suivie d'une reperfusion, tandis que la neuroinflammation a été induite par une injection de LPS (5mg/kg) par voie intrapéritonéale (i.p.). Une réactivité astrocytaire a été observée dans le cortex, le corps calleux ou encore l'hippocampe, dépendamment du modèle. Cependant, le profil transcriptomique des astrocytes réactifs s'est avéré être fortement dépendant du type de modèle. De plus, bien qu'il existe des inductions communes de certains gènes dans les deux modèles, près de 50 % de l'expression génétique modifiée est spécifique d'un modèle. Ainsi, il semblerait que les astrocytes réactifs retrouvés après une ischémie présentent un phénotype allant dans le sens d'un rôle neuroprotecteur. A l'opposé, les astrocytes réactifs induits par l'injection de LPS présentent un phénotype suggérant une neurotoxicité. Ces résultats démontrent que, malgré des traits communs, la réactivité astrocytaire est hétérogène et peut être modifiée pour répondre spécifiquement à un type d'agression donné.

L'hétérogénéité des astrocytes réactifs a été démontrée en utilisant des approches transcriptomiques et protéomiques (Labib et al., 2022; Hasel et al., 2023). Dans le cas des astrocytes réactifs induits par une ischémie, une approche de sc-RNAseq sur 54794 astrocytes, a montré qu'il existe au moins trois groupes distincts d'astrocytes réactifs (Ma et al., 2022). De la même manière, un article sur le site bioRxiv du groupe de Shane Liddelow montre qu'il existe au moins 14 groupes d'astrocytes différents à l'aide d'analyse transcriptomique spatiale ainsi que du sn-RNAseq sur 138 000 astrocytes du cerveau antérieur (Kim et al., 2023). En ce qui concerne les astrocytes réactifs induits par une injection de LPS, ce même groupe a également démontré, par une approche de sc-RNAseq sur 80000 astrocytes corticaux, qu'il existe au moins 10 clusters d'astrocytes réactifs neurotoxiques (Hasel et al., 2021).

iii. Astrocytes réactifs induits par une neuroinflammation

La science ne se résume pas qu'à des articles publiés dans des journaux à haut facteur d'impact, c'est l'effort de toute la communauté scientifique qui, mit bout à bout, est selon moi le plus important. Néanmoins, si je devais choisir un article scientifique qui m'a aidé plus que d'autres durant ma thèse, je choisirai celui-ci sans hésiter: *Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia* (Liddelow et al., 2017). Cet article, publié par le groupe de Ben Barres, a été sans exagération l'élément clef dans les réflexions, ainsi que les approches expérimentales que j'ai pu avoir lors de l'étude des cellules gliales. Dans cet article, cité plus

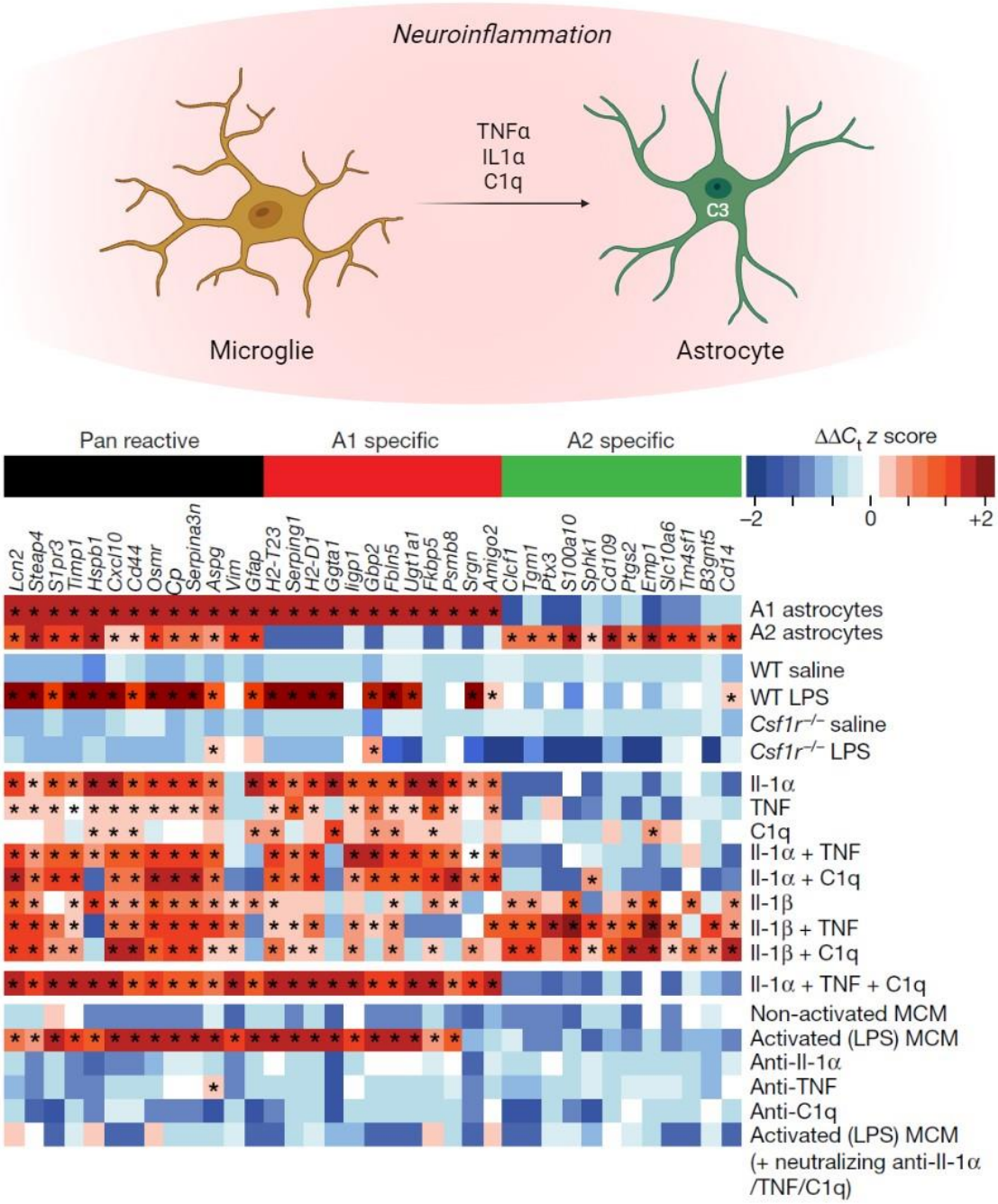


Figure 5: Différences transcriptomiques des astrocytes stimulés avec différents composés.

Trois sous-groupes d'astrocytes ont été caractérisés lors d'une neuroinflammation : les astrocytes A1 neurotoxiques (induits par une injection de LPS), A2 neuroprotecteurs (induits par un AVC ischémique) et les astrocytes Pan-réactifs, qui sont présents dans les deux modèles de neuroinflammation et qui ont des gènes communs aux astrocytes A1 et A2. Plus particulièrement, lorsque les microglies sont activées, celles-ci vont sécréter des facteurs tels que le TNFα, l'IL1α et le C1q. Ainsi, ces facteurs vont induire une réactivité astrocytaire A1 et l'expression de certains gènes. Un des marqueurs d'astrocytes réactifs neurotoxiques est la protéine du complément C3 (Liddelow et al., 2017).

de 5494 fois en date du 26/11/2023 à 15h16), les auteurs démontrent que les astrocytes réactifs neurotoxiques sont induits suite à une activation microgliale lors d'une neuroinflammation induite par le LPS.

Plus particulièrement, la neurotoxicité astrocytaire serait induite par un cocktail de facteurs pro-inflammatoires, constitué de TNFα, d'IL1α ainsi que de C1q, libéré par les microglies activées par le LPS **(Figure 5)**. Un marqueur d'astrocyte réactif a par ailleurs été mis en évidence dans cette étude : la protéine du complément C3, qui pourrait caractériser les astrocytes réactifs neurotoxiques. Les astrocytes $C3^+$ sont capables d'induire une mort neuronale et oligodendrocytaire *via* la libération de facteurs solubles qui sont libérés dans le milieu des cellules en culture primaire. Seules les microglies semblent être insensibles face à ces signaux apoptotiques. Le dernier trésor scientifique laissé par Ben Barres (1957-2017) a révélé que cette mort cellulaire n'est pas induite par des signaux protéiques classiques, mais par des lipides saturés (Guttenplan et al., 2021) **(Figure 6)**. Plus précisément, une augmentation des niveaux de phosphatidylcholines à très longue chaîne d'acyle d'acide gras dans les membranes cellulaires des astrocytes réactifs, ainsi que des acides gras libres saturés à longue chaîne libérés par ces cellules a pu être observée *via* des analyses lipidomiques. Ainsi, une apoptose dépendante de PUMA *(p53 upregulated modulator of apoptosis)* a été observée lorsque des neurones ou des oligodendrocytes sont traités avec ces différents facteurs lipidiques en culture primaire. Depuis, il a été démontré que l'expression de la protéine Tmem164, une acyltransférase à l'origine du métabolisme de certains acides gras saturés (Reed et al., 2023), est diminuée dans les astrocytes réactifs dans des contextes de maladies neurodégénératives (Zhang et al., 2023). La surexpression de cette protéine par une approche virale permet alors de réduire la libération d'acides gras saturés par les astrocytes réactifs et d'éviter la mort neuronale dans des modèles animaux des maladies de Parkinson et d'Alzheimer.

iv. Astrocytes réactifs dans les contextes pathologiques

De manière générale, la neuroinflammation est un processus observé dans une grande variété de contextes pathologiques (DiSabato et al., 2016; Cavaliere et al., 2019; Kwon and Koh, 2020; Vergne-Salle and Bertin, 2021). Pour cette raison, les astrocytes réactifs induits par une injection *in vivo* de LPS dans l'étude pionnière de Zamanian ont suscité l'intérêt de beaucoup de gliobiologistes (Zamanian et al., 2012). Ces astrocytes réactifs $C3^+$ ont été

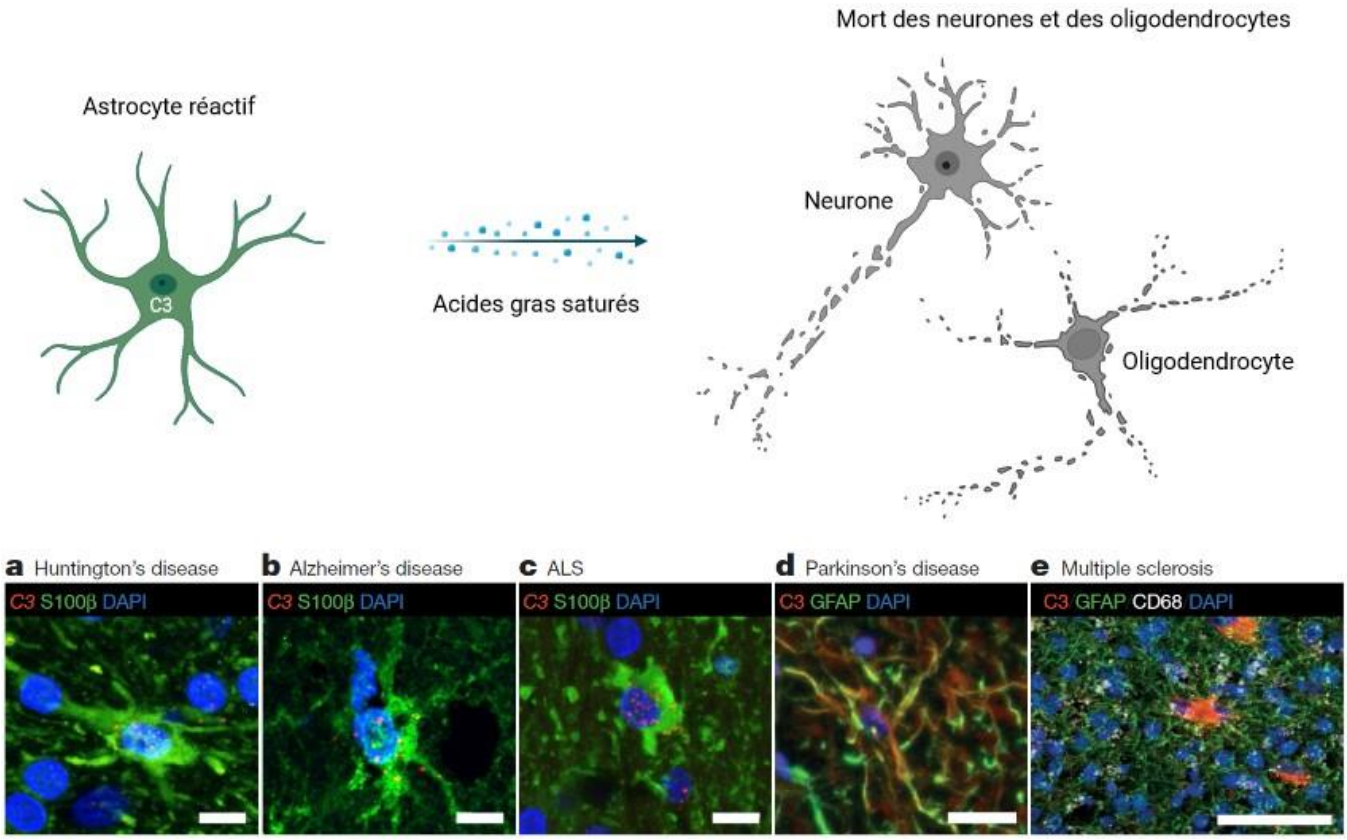


Figure 6: Les astrocytes réactifs neurotoxiques A1 induisent une mort des neurones et des oligodendrocytes.

Les astrocytes réactifs libèrent des acides gras saturés qui entrainent les cellules captant ces substances vers une voie pro-apoptotique (Guttenplan et al., 2021). Les astrocytes réactifs positifs à la C3 ont été retrouvés dans des tissus post-mortem de patients atteints de la maladie de Huntington, d'Alzheimer, de sclérose latérale amyotrophique (ALS), de Parkinson et de sclérose en plaques (Liddelow et al., 2017).

observés dans différents contextes pathologiques comme sur des tissus humains post-mortem issus de patients Alzheimer, Parkinson ou encore Huntington, suggérant que ces dégénérescences pourraient être induites par ces cellules (Liddelow et al., 2017; Yun et al., 2018; Guttenplan et al., 2020). Ainsi, ces données suggèrent que les astrocytes pourraient représenter des cibles thérapeutiques potentielles dans ces pathologies (Liddelow and Barres, 2017). Depuis, ces astrocytes réactifs ont non seulement été étudiés dans les maladies neurodégénératives citées ci-dessus, mais également dans une pléthore de contextes pathologiques incluant la dépression, l'anxiété, le stress ou encore le vieillissement (Clarke et al., 2018; Zhang et al., 2020; Fang et al., 2022; Cong et al., 2023). Un constat indéniable est que l'inhibition des astrocytes réactifs dans ces différents contextes semble atténuer ces pathologies. Néanmoins, les stratégies d'inhibition utilisées (modèles génétiques, fluorocitrate, infections virales…) sont difficilement transposables à l'être humain et de nouvelles alternatives doivent être trouvées.

En plus de ces pathologies, une étude récente a montré la présence d'astrocytes réactifs $C3^+$ dans un contexte de douleur chronique (Mou et al., 2022). Dans cette étude, les auteurs ont montré la présence de ces cellules au sein de la corne dorsale de la ME, une structure clef dans l'intégration, la modulation ainsi que le relai des informations nociceptives qui parviennent jusqu'aux centres supra-spinaux pour donner naissance à la douleur.

Conclusion sur les cellules gliales

Les cellules gliales, notamment les microglies et les astrocytes, sont essentielles au bon fonctionnement du SNC. Néanmoins, dans certains contextes (maladies neurodégénératifs, douleurs chroniques…) ces cellules deviennent réactives et communiquent ensemble. Ainsi, certains facteurs pro-inflammatoires comme le TNFα, l'IL1α et le C1q sécrétés par les microglies peuvent induire un phénotype neurotoxique chez les astrocytes réactifs. Le rôle de ces astrocytes n'a pas été bien caractérisé pour le moment. Cependant, un article récent a montré que ces astrocytes réactifs neurotoxiques peuvent sécréter des acides gras saturés entrainant la mort des neurones et des oligodendrocytes.

Partie 2 : Douleur

A) Généralités

D'après l'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur (IASP), la douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ou ressemblant à une telle lésion (Raja et al., 2020). Traditionnellement, on distingue deux composantes à la douleur : sensori-discriminative et affective (Price, 2000; Auvray et al., 2010). La composante sensori-discriminative va coder de manière fidèle la nature, la localisation, la durée ainsi que l'intensité du stimulus. La composante affective quant à elle va permettre d'associer cet événement à une émotion qui est généralement de valence négative. De manière générale, la douleur est une expérience personnelle. En effet, un même stimulus douloureux peut être interprété différemment par différents individus étant donné que la sensibilité de chacun peut être modulée par des facteurs tels que le sexe (Bartley and Fillingim, 2013), l'âge (Shackleton et al., 2023), l'ethnicité (Campbell and Edwards, 2012), l'historique de vie ainsi que les croyances culturelles (Peacock and Patel, 2008). Dans un contexte physiologique, la douleur correspond à l'intégration et l'interprétation consciente et subjective des informations nociceptives qui proviennent de stimuli pouvant potentiellement porter préjudice à l'intégrité de l'organisme. La nociception comprend les processus de détection, de transduction, d'encodage et de transmission du message nociceptif (Loeser and Treede, 2008). Ce message est détecté au site d'origine, transmis vers la ME, puis aux structures cérébrales supra-spinales où ces informations seront interprétées ou non comme de la douleur (Yam et al., 2018).

B) Détection des informations nociceptives

a) Les nocicepteurs

L'organisme détecte les informations sensorielles *via* des fibres sensorielles dont les corps cellulaires se trouvent dans les ganglions rachidiens dorsaux (DRG) (Julius and Basbaum, 2001). Il existe trois types de fibres sensorielles impliqués dans la détection de stimuli nociceptifs : Aβ, Aδ et C, qui se distinguent par leur vitesse de conduction qui est directement dépendant de leur diamètre et de leur degré de myélinisation (McGlone et al., 2007). Ainsi, les fibres Aβ sont des fibres de grand diamètre (6-12µm) myélinisées et présentant une vitesse

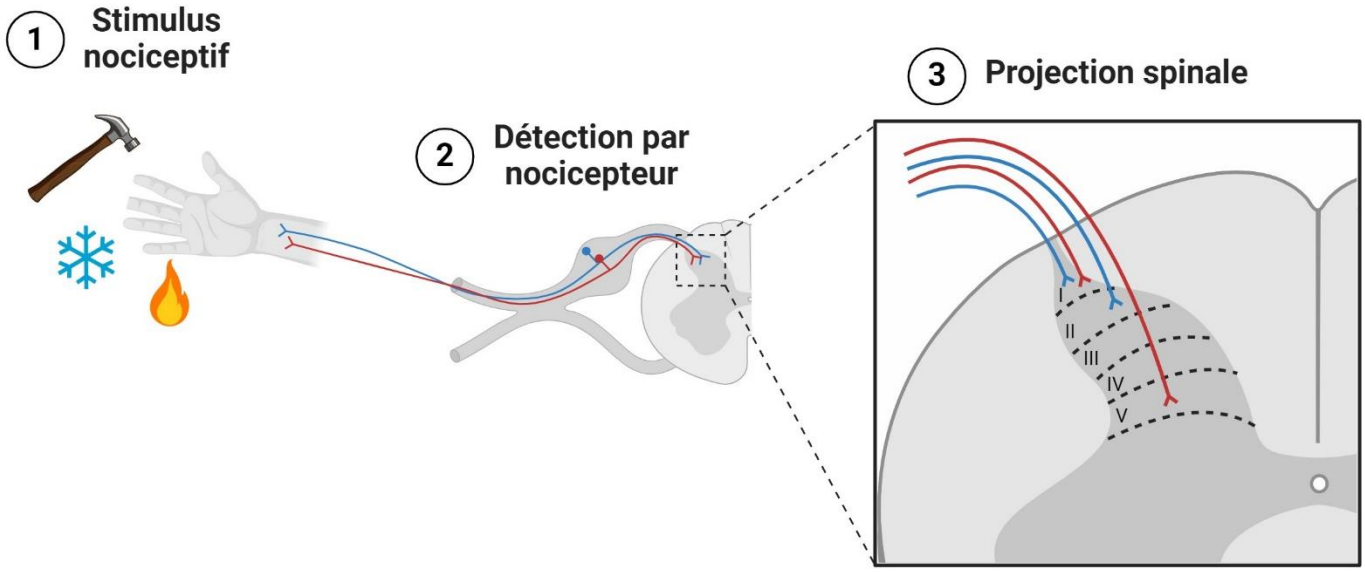


Figure 7: Détection et transmission du message nociceptif vers la ME.

L'information d'un stimulus nociceptif, qui peut potentiellement porter atteinte à l'intégrité de l'organisme, est détectée en périphérie *via* les fibres nociceptives. Les corps cellulaires des fibres nociceptives se trouvent dans les ganglions rachidiens dorsaux (DRG). Ainsi, une fois l'information détectée en périphérie, celle-ci est acheminée vers le CNS, plus particulièrement la ME. Au sein de la ME, en fonction des informations nociceptives portées par les fibres sensorielles, un relai va avoir lieu *via* des synapses avec des neurones de second ordre localisés dans la corne dorsale de la ME. Plus précisément, les **fibres C** projettent vers les laminae I et II tandis que les **fibres Aδ** projettent plutôt vers les laminae I et V.

de conduction des PA élevée (de 30 à 100 m/s). Les fibres Aδ, qui ont un diamètre d'environ 1-5µm, sont finement myélinisées et présentent une vitesse de conduction intermédiaire de 12-30m/s. Enfin, les fibres C ont un petit diamètre (0.2-0.5µm), ne sont pas myélinisées et transmettent les informations avec une vitesse de conduction lente d'environ 0.5-2m/s. Parmi ces 3 types de fibres, les fibres Aδ et C ont été décrites comme permettent de détecter les informations nociceptives, c'est pour cette raison qu'elles sont appelées « nocicepteurs ». Néanmoins, une étude récente a permis de mettre en évidence un rôle des fibres Aβ dans les comportements de type douloureux chez le rat par activation optogénétique (Tashima et al., 2018). Ainsi, le signal nociceptif est initialement produit par le biais de l'activation des nocicepteurs périphériques qui peuvent être activés par différents modalités (thermique, chimique, mécanique) (Dubin and Patapoutian, 2010). Ces nocicepteurs sont des neurones pseudo-unipolaires dont les projections innervent d'une part la périphérie *via* des terminaisons libres et d'autre part les laminae I, II et V de la corne dorsale de la ME (Basbaum et al., 2009) **(Figure 7)**. L'anatomie particulière de ces cellules permet de détecter les informations nociceptives périphériques et de les acheminer jusqu'à la ME.

b) La moelle épinière

Une fois les informations nociceptives détectées en périphérie par les nocicepteurs, elles sont acheminées *via* les DRG et sont transmises aux neurones de 2nd ordre qui se trouvent dans les laminae I, II et V de la ME (Basbaum et al., 2009). Les fibres sensorielles sont exclusivement glutamatergiques, ce qui signifie qu'un message nociceptif est automatiquement associé à une hyperexcitabilité globale dans le réseau neuronal spinal (Kumamoto et al., 2014). Une première étape de modulation du message nociceptif a ainsi lieu dans la ME, notamment *via* le système d'interneurones qui représente la majorité des neurones de la corne dorsale de la ME (Stachowski and Dougherty, 2021). Ensuite, le message nociceptif est acheminé au niveau des structures supra-spinales *via* des neurones de projections glutamatergiques qui sont majoritairement localisés dans la lamina I (Todd et al., 2002; Allard, 2019; Wercberger and Basbaum, 2019).

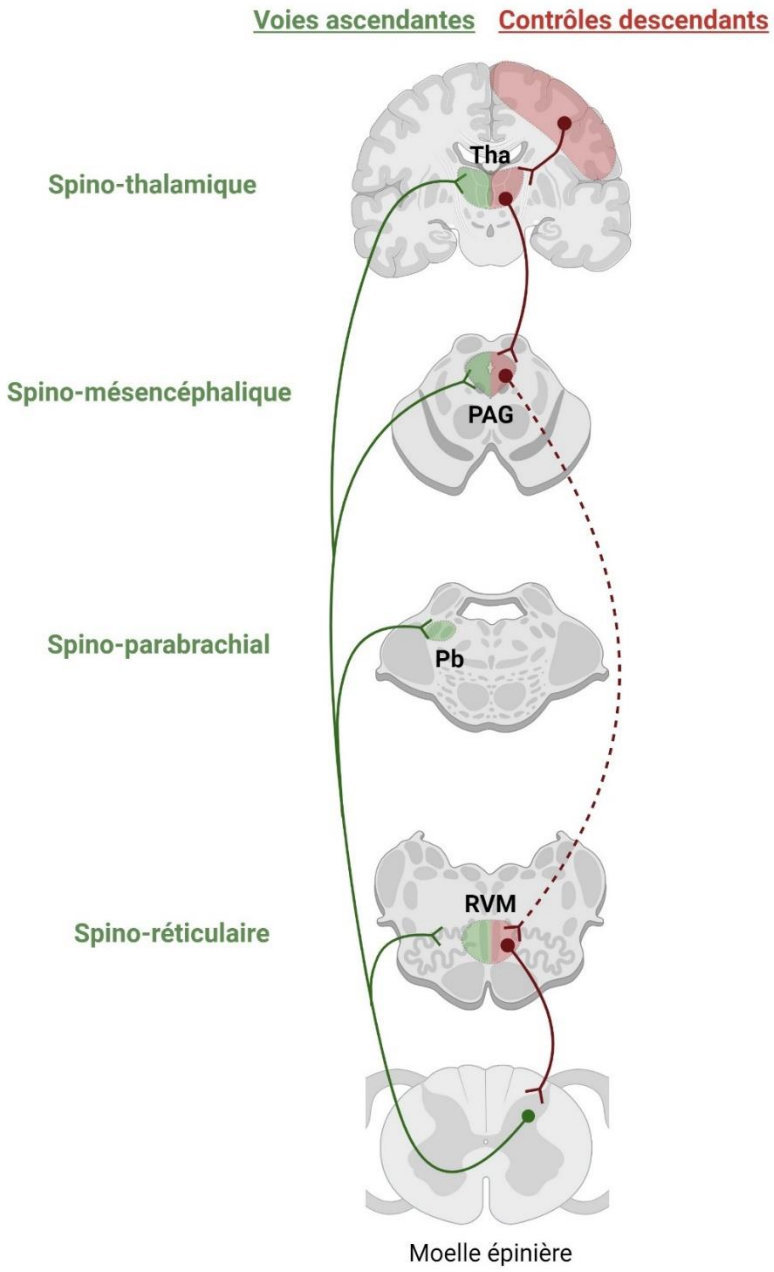


Figure 8: Voies de transmission supra-spinale des informations nociceptives et modulation par les contrôles descendants.

Une fois que l'information nociceptive arrive dans la ME, celle-ci est transmise vers les centres supra-spinaux afin d'être modulée, intégrée et perçue comme de la douleur. **Différentes voies ascendantes** prenant naissance au niveau de la ME. En retour, l'organisme est capable de moduler ces informations nociceptives au sein de la ME *via* des **contrôles descendants** de la douleur. Ces contrôles descendants permettent d'inhiber ou de faciliter la transmission du message nociceptif au sein de la ME ce qui peut alors induire respectivement une anti-nociception ou des comportements douloureux. **Tha**: Thalamus, **PAG**: substance grise périaqueducale, **Pb**: noyau parabrachial, **RVM**: Partie rostroventromédiane du bulbe rachidien

c) Faisceaux ascendants

Afin de relayer l'information dans les structures supra-spinales, les axones des neurones de projection vont, pour la plupart, réaliser une décussation du côté controlatéral de la ME avant de projeter directement sur le thalamus, c'est la voie spino-thalamique (Willis et al., 1979; Willis and Westlund, 1997) **(Figure 8)**. Cette dernière est la voie majoritaire qui va potentiellement donner naissance à une douleur (Khalid and Tubbs, 2017). Il existe également une voie alternative permettant l'arrivée des informations jusqu'au thalamus, avec un relai dans la formation réticulée : c'est la voie spino-réticulo-thalamique (Carstens et al., 1990). Cette dernière répond davantage aux stimuli des structures somatiques et viscérales profondes (Willis and Westlund, 1997). Enfin, le faisceau spino-mésencéphalique permet de relayer les informations nociceptives jusqu'à la substance grise périaqueducale (PAG) et au noyau parabrachial (Wiberg et al., 1987; Blomqvist et al., 1989). Finalement, différentes structures supra-spinales sont responsables des différents aspects liés à la douleur (Martucci and Mackey, 2018). D'une part, les aspects sensori-discriminatifs sont traités dans le cortex somatosensoriel primaire et secondaire, le thalamus et le cervelet tandis que les aspects émotionnels sont traités au niveau du thalamus, du cortex (préfrontal, cingulaire antérieur [ACC], insulaire) ou encore l'amygdale, le noyau parabrachial et la PAG (Price, 2000). Les dernières structures citées, avec la PAG comme chef d'orchestre, jouent un rôle crucial dans la modulation de l'intégration des messages nociceptifs au niveau de la ME *via* les contrôles descendants de la douleur (Millan, 2002).

d) Contrôles descendants de la douleur

La régulation du réseau neuronal de la ME est primordiale pour la réponse face à des stimuli nociceptifs. Pour cela, il existe des projections en provenance des structures supra-spinales permettant de contrôler l'activité de ce réseau. C'est ce que l'on appelle les contrôles descendants de la douleur (Millan, 2002). Les structures supra-spinales des contrôles descendants sont généralement les mêmes, qu'ils soient inhibiteurs ou facilitateurs. Néanmoins, les cibles de ces projections sont généralement différentes, avec respectivement une activation des interneurones inhibiteurs (contrôles descendants inhibiteurs) et une activation des interneurones excitateurs (contrôles descendants facilitateurs). Ainsi, les contrôles descendants inhibiteurs permettent de diminuer globalement l'activité du réseau sein de la corne dorsale de la ME, un phénomène associé à une analgésie (Ossipov et al., 2010).

Ces projections peuvent provenir de plusieurs structures supra-spinales telles que la partie rostroventromédiane du bulbe rachidien (RVM), le noyau du raphé ou encore le locus coeruleus. Les contrôles facilitateurs permettent, quant à eux, d'augmenter l'activité des interneurones excitateurs de la corne dorsale de la ME, il en résulte ainsi une hyperexcitabilité neuronale et donc une douleur (Wei et al., 2010; Ossipov et al., 2014).

Bien que les structures impliquées dans les contrôles descendants inhibiteurs et facilitateurs soient similaires, il a été démontré que les cellules impliquées dans ces phénomènes peuvent être elles différentes. Par exemple, les cellules « ON » de la RVM, qui montrent une augmentation de leur activité avant un réflexe de retrait d'un membre, témoignant d'une douleur, seraient impliquées dans les contrôles descendants facilitateurs (Fields et al., 1995; Fields, 2004). Par opposition, les cellules « OFF » qui montrent une diminution de leur activité avant un réflexe de retrait, témoignant d'une analgésie, seraient impliquées dans les contrôles descendants inhibiteurs (Fields et al., 1995). Plus récemment, il a été montré qu'il existe une projection directe depuis l'ACC vers la ME (Chen et al., 2018). En effet, en utilisant une approche d'optogénétique, les auteurs ont montré que l'activation sélective des neurones de projection ACC→ME provoquait des comportements de type douloureux chez les animaux, alors que l'inhibition de cette voie induisait des effets analgésiques. Ces données montrent que la stimulation de l'ACC facilite la transmission excitatrice au niveau spinal, un phénomène qui peut contribuer à la mise en place de la douleur chronique.

La douleur aigüe est décrite comme un système d'alerte qui favorise de la survie d'un organisme dans un environnement donné, cette douleur, dans le cas d'une stimulation aigüe s'arrête après la fin du stimulus. Néanmoins, il est possible que la douleur perdure dans le temps. D'après l'IASP, on parle alors de douleur chronique si la durée de la douleur est supérieure à 3 mois (Treede et al., 2019). Il existe différents types de douleurs chroniques incluant les douleurs cancéreuses, nociplastiques (fibromyalgie) ou encore inflammatoires (arthrites). Cependant, je ne décrirai que la douleur neuropathique dans ce manuscrit car elle correspond au modèle de douleur que j'ai utilisé lors de mes études.

C) La douleur neuropathique

a) Définition – Prévalence – Symptômes

La douleur neuropathique est définie comme une douleur qui résulte directement d'une lésion ou d'une maladie affectant le système somatosensoriel (Trouvin and Perrot, 2019). D'après une étude épidémiologiques réalisée sur 23712 personnes en 2008, la prévalence de la douleur chronique dans la population Française générale est de 31,7% (Bouhassira et al., 2008). Parmi les personnes souffrant de douleurs chroniques, 1631 personnes ont été diagnostiquées comme ayant une origine de type neuropathique (6,9%). Ces chiffres ont été récemment confirmées par une autre étude (douleur chronique : 32,7% et douleur neuropathique 5,55%) (Chenaf et al., 2018).

Les douleurs neuropathiques peuvent être classifiées en des atteintes périphériques (névralgie du trijumeau, lésion de nerfs, polyneuropathie, radiculopathie…) ou centrale (lésion de la ME, du cerveau, AVC, sclérose en plaques…) (Scholz et al., 2019). Les manifestations cliniques des douleurs neuropathiques peuvent être de diverses formes, caractérisées par la combinaison de symptômes positifs (en plus) et négatifs (en moins) par rapport à une situation normale (Finnerup et al., 2021). Parmi les symptômes positifs, on trouve les sensations de brûlure, de tiraillement, de picotement, de fourmillement, d'engourdissement ou de démangeaisons. Les patients décrivent également des symptômes désagréables (dysesthésies), ou non (paresthésies) (Di Stefano et al., 2020). 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 and Treede, 2008). L'hyperalgésie, quant à elle, est définie comme une augmentation de la douleur ressentie face à un stimulus douloureux à la base (Loeser and Treede, 2008). En ce qui concerne les symptômes négatifs, ces derniers 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.

Néanmoins, les mécanismes sous-jacents de la mise en place et du maintien de la douleur neuropathique restent à élucider, d'autant plus qu'il existe plusieurs types de douleurs neuropathiques, avec des origines différentes. Ainsi, l'utilisation de modèles animaux précliniques reste impérative pour clarifier les mécanismes mis en jeu.

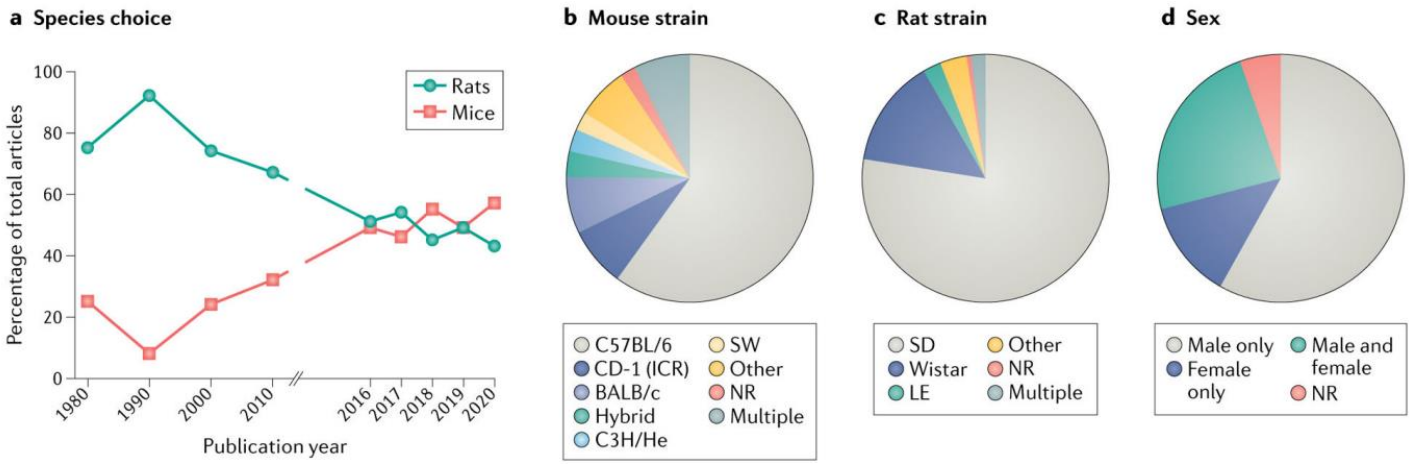


Figure 9: Organismes modèles et sexe en tant que variable biologique dans l'étude de la douleur.

Les rongeurs sont les organismes modèles de référence dans la recherche fondamentale sur la douleur, avec notamment la souris C57BL/6 et le rat Sprague Dawley (SD). Bien qu'il soit évident que la douleur n'est pas une expérience vécue et traitée de la même manière pour tout le monde, il est important de constater que la majorité des études sont encore réalisées chez animaux mâles (Sadler et al., 2022).

b) Modèles animaux

Un modèle animal est par définition une modélisation simplifiée présentant des similitudes à un processus normal ou pathologique qu'on ne peut pas étudier directement chez l'Etre Humain, mais que l'on peut étudier dans des conditions contrôlées en laboratoire. Ainsi, un modèle idéal reflète les caractéristiques moléculaires, cellulaires et comportementales de la pathologie humaine étudiée. Il existe trois critères de validité d'un modèle animal : l'isomorphie, l'homologie et la prédictivité (Belzung and Lemoine, 2011).

- ***Isomorphie*** *- les symptômes du modèle animal sont identiques aux symptômes retrouvés dans la pathologie chez l'Homme.*
- ***Homologie*** *- les causes ou les origines de la pathologie du modèle animal sont identiques à celles retrouvées chez l'Homme.*
- ***Prédictivité*** *- la réponse aux traitement de la pathologie modélisée dans le modèle animal est similaire à celle de la pathologie humaine.*

La majorité des études précliniques modélisant la douleur a été réalisée sur des rongeurs. De plus, l'analyse des articles publiés dans la revue Pain entre 2016 et 2020 montre, la prévalence des souris et des rats utilisés dans les études précliniques sur la douleur a été relativement similaire avec chaque espèce utilisée dans environ 50% des études (Sadler et al., 2022) **(Figure 9)**.

Cependant, un point extrêmement important est la considération du sexe comme étant une réelle variable biologique dans l'étude de la douleur chronique. En effet, bien que la plupart des patients souffrant de douleurs chroniques soient des femmes, les rongeurs mâles constituent l'organisme modèle de la recherche préclinique depuis plus d'un siècle, ce qui se traduit par une compréhension incomplète de l'étiologie, de la symptomatologie et du traitement de cette pathologie (Mogil, 2020; Shansky and Murphy, 2021).

i. Modèles diabétiques

La cause la plus courante de neuropathie périphérique en France est le diabète, qu'il soit de type 1 ou 2 (Bouhassira et al., 2013). Un défaut du transport de la leptine vers son site d'action au niveau du SNC est caractérisée dans ces pathologies, aboutissant à l'augmentant de ses concentrations périphériques (Duquenne et al., 2021). Un modèle animal de déficience pour la leptine (*ob/ob*) a été utilisé pour confirmer le rôle de cette hormone dans la mise en

place de la neuropathie diabétique (Maeda et al., 2009; Feldman et al., 2017). En effet, lors d'une lésion nerveuse périphérique, il a été montré que la leptine dérivée des adipocytes facilite le développement de l'allodynie mécanique chez des souris sauvages, tandis que les souris *ob/ob* ne présentent pas cet effet. L'action de cette hormone passerait par l'activation de son récepteur qui est exprimé par les macrophages qui en retour libéreraient des facteurs inflammatoires pro-nociceptifs (Maeda et al., 2009).

ii. Le nerf sciatique et les modèles associés

Un type de douleur neuropathique classique est la sciatique. La sciatique est une douleur du membre inférieur situé sur le trajet du nerf sciatique qui est généralement due à une compression de celui-ci. Le nerf sciatique est un nerf mixte, véhiculant à la fois des informations motrices et sensorielles, dont les racines prennent naissance dans les régions lombaires L4-L5 et sacrées S1-S2-S3 de la ME chez l'Homme. Chez les rongeurs, ce nerf innerve surtout les partie lombaires L4-L5-L6, même si des différences d'innervations ont été notées entre différentes souches de souris, de même qu'entre les souris et les rats (Rigaud et al., 2008). Malgré ces différences, le nerf sciatique reste le plus gros nerf existant, rendant les interventions chirurgicales plus simples. De plus, bien que ce nerf soit unifasciculaire, celui-ci montre une trifurcation au niveau du genou de l'animal. Ainsi, on y distingue une séparation en 3 embranchements: le nerf commun péronéal, le nerf tibial et le nerf sural (Duraku et al., 2012). Ces embranchements permettent d'innerver différentes parties des pattes arrières des animaux, permettant, lorsqu'on lèse deux des trois branches terminales, de mimer les symptômes d'une dénervation partielle du membre postérieur. Finalement, le fait que ce nerf innerve les pattes arrières des animaux permet de réaliser des tests nociceptifs afin de mesurer la sensibilité mécanique ou thermique des animaux lésés à l'aide de tests nociceptifs (Barrot, 2012). Pour toutes ces raisons, les études sur les douleurs neuropathiques se sont largement orientées vers l'utilisation de modèles murins touchant le nerf sciatique par compression ou par lésion (Journee et al., 2023).

Modèle de constriction chronique du nerf sciatique (Chronic Constriction Injury – CCI)

L'un des modèles couramment utilisé est le CCI qui a été décrit pour la première fois chez le rat par Bennett et Xie en 1987 (Bennett and Xie, 1988). Ce modèle consiste à réaliser 4 ligatures lâches séparées de 1mm autour de la branche principale du nerf sciatique, juste avant la trifurcation. Plus tard, le modèle a également été adapté à la souris, avec notamment

une caractérisation poussée du nombre de ligatures utilisées (Gopalsamy et al., 2019). Ainsi, ce modèle permet de mimer les symptômes d'une compression nerveuse retrouvée en cliniques lors de sciatiques (Koes et al., 2007). Des comportements de type douloureux apparaissent dès la première semaine post-opératoire, avec la mise en place d'une allodynie mécanique et d'une hyperalgésie thermique au chaud et au froid. Ces comportements disparaissent deux mois après l'intervention chirurgicale. Cependant, ce modèle a été remis en question à plusieurs reprises car le nombre et surtout la force des ligatures réalisées peuvent impacter différemment la stimulation du nerf, engendrant ainsi une variabilité comportementale et des résultats expérimentaux contradictoires.

Modèle du manchon du nerf sciatique (Cuff)

De façon historique, le modèle du Cuff a été développé pour parer la variabilité qui a pu être observée dans le modèle du CCI. Comme ce dernier, le Cuff a tout d'abord été décrit chez le rat (Mosconi and Kruger, 1996; Pitcher et al., 1999) puis adapté à la souris (Benbouzid et al., 2008; Yalcin et al., 2014). Ce modèle consiste à placer un manchon en polyéthylène autour de la branche principale du nerf sciatique rendant en théorie la chirurgie plus reproductible et diminuant ainsi la variabilité interindividuelle. L'induction de la neuropathie permet l'apparition d'une allodynie mécanique qui perdure 3 mois ainsi qu'une hyperalgésie thermique au chaud durant les 3 premières semaines. De plus, ce modèle permet l'étude des comorbidités de type anxio-dépressives directement liées à la douleur neuropathique. En effet, les comportements de type anxieux et dépressifs apparaissent respectivement après 4 semaines et 6 semaines et perdurent jusqu'à 14 et 16 semaines post-chirurgie. Une voie importante reliant l'amygdale basolatérale à l'ACC a ainsi été mise en évidence comme contribuant à l'apparition des comportements de type dépressif liés à la douleur chronique (Becker et al., 2023).

Le modèle du Cuff est censé représenter une bonne alternative au CCI, néanmoins plusieurs inconvénients sont également à noter dans ce modèle. En effet, la pose du manchon peut être une source de variabilité étant donné que le même problème de constriction du nerf peut être rencontré. De plus, il peut arriver que le manchon se déplace et libère le nerf, abolissant ainsi la compression du nerf sciatique. Finalement, la caractérisation de ce modèle a majoritairement été réalisée chez animaux mâles. En effet, seul un article

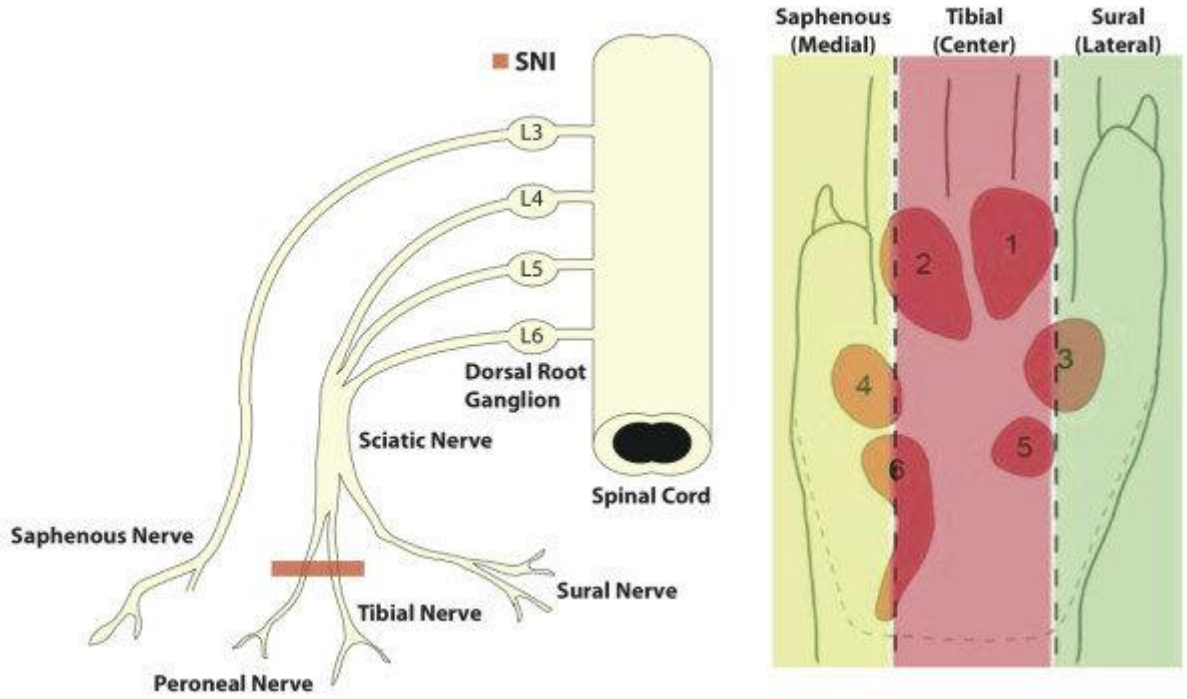


Figure 10: Modèle de la lésion nerveuse épargnée (SNI) et innervation nerveuse de la patte arrière.

La lésion nerveuse épargne (Spared Nerve Injury – SNI) est un modèle de douleur neuropathique qui consiste à ligaturer et sectionner deux des trois branches du nerf sciatique, qui prend naissance dans les étages spinaux lombaires 4-5-6. Ainsi, les branches tibial et commun péronéal sont ligaturées puis sectionnées tandis que la branche surale de ce nerf est épargnée. Une hypersensibilité mécanique se met en place suite à cette chirurgie, qui peut notamment être mesurée par le test des filaments de von Frey sur la patte arrière des animaux. Néanmoins, une attention particulière doit être accordée à l'emplacement de la patte arrière qui va être testée, étant donné que la branche surale n'innerve que la partie latérale extérieure des pattes (Duraku et al., 2012).

a été publié avec ce modèle en utilisant des souris femelles à l'heure actuelle (Sheehan et al., 2021).

Modèle de lésion nerveuse épargnée (Spared Nerve Injury - SNI)

La procédure expérimentale mise en place chez le rat par Decosterd et Woolf en 2000 implique la ligature et la section de deux des trois branches du nerf sciatique (commun péronéal et tibial), en laissant le nerf sural intact (Decosterd and Woolf, 2000) **(Figure 10)**. Le modèle a été adapté trois années plus tard à la souris par Shields et collaborateurs (Shields et al., 2003). Le SNI est un modèle très robuste dans la mesure où tous les animaux développent des comportements de type douloureux. Plus précisément, une allodynie mécanique et thermique au froid ainsi qu'une hyperalgésie thermique au chaud apparaissent 24h suivant l'intervention chirurgicale. Dans l'article princeps, les auteurs ont décrit un maintien de ces comportements douloureux jusqu'à 6 mois post-chirurgie (Decosterd and Woolf, 2000). Néanmoins, les tests nociceptifs n'avaient pas été réalisés après cette période. Plus récemment, une étude longitudinale a démontré que l'allodynie mécanique et thermique au froid induite par une SNI perdurent respectivement 18 et 12 mois chez des souris mâles tandis qu'elles perdurent toutes deux 24 mois chez les souris femelles (Millecamps et al., 2023). Cette même étude a par ailleurs montré une corrélation entre l'augmentation des comportements de type douloureux et la diminution de la durée de vie uniquement chez les souris mâles. Néanmoins, ce modèle n'est pas représentatif de ce qu'il se passe en clinique (hormis lors d'accident ayant provoqué une section des nerfs correspondant au modèle SNI). Ce dernier permet surtout, de mon point vu, d'étudier avec robustesse des mécanismes communs qui peuvent être retrouvés dans plusieurs modèles animaux de douleurs neuropathiques touchant le nerf sciatique.

D) Caractéristiques moléculaires et cellulaires de la douleur neuropathique

a) Inflammation périphérique

Mastocytes

Les mastocytes sont des cellules immunitaires principalement étudiées pour leur implication dans les réactions allergiques (Gilfillan et al., 2011). De nombreux articles décrivent une inflammation périphérique suite à une lésion du nerf sciatique (Moalem and Tracey, 2006; Toyoshima and Okayama, 2022). La littérature montre que les mastocytes

résidents autours du nerf sont à l'origine de cette inflammation périphérique suite à la lésion (Kaur et al., 2017). Des travaux publiés en 2003 par Zuo et collaborateurs ont mis en évidence une dégranulation locale des mastocytes après une lésion du nerf sciatique (Zuo et al., 2003). La dégranulation induit la libération de nombreux composés pro-inflammatoires (Kempuraj et al., 2019). L'histamine, la bradykinine ainsi que la prostaglandine E2 (PGE2), qui sont des composés majeurs libéré par les mastocytes lors d'une dégranulation, sont des acteurs clefs dans la mise en place des comportements de type douloureux en agissant notamment sur les fibres Aδ et C (Baron et al., 2001; Koda and Mizumura, 2002; Bandell et al., 2004). De plus, l'inhibition de la dégranulation des mastocytes par le cromoglycate de sodium supprime la mise en place de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie thermique. Finalement, ce processus permet de recruter d'autres types de cellules immunitaires incluant les neurotrophiles et les macrophages au site de la lésion (Zuo et al., 2003).

Neutrophiles

Les neutrophiles polymorphonucléaires (ou granulocytes neutrophiles) font partie de l'immunité innée (Kobayashi et al., 2005). Ces cellules sont les premières qui s'infiltrent sur les sites de lésion nerveuse avec un pic d'infiltration à 24h post-lésion (Clatworthy et al., 1995; Perkins and Tracey, 2000). Ces cellules sont capables de phagocyter et de secréter des cytokines et chémokines pro-inflammatoires qui peuvent induire une hyperalgésie thermique (Levine et al., 1984; Levine et al., 1985; Levine et al., 1990; White et al., 1990). Il faut noter que l'action des neutrophiles semble être à son maximum dans les phases précoces de la lésion. En effet, une déplétion de ces cellules à 8 jours post-lésion nerveuse ne modifie pas les comportements de type douloureux dans un modèle de douleur neuropathique (Zuo et al., 2003). Il semblerait ainsi que le rôle des neutrophiles polymorphonucléaires soit principalement de sécréter des facteurs solubles chémoattractants qui vont recruter d'autres types cellulaires incluant les macrophages et les lymphocytes au site de lésion (Scapini et al., 2000; Moalem et al., 2004).

Macrophages

Les macrophages sont également des cellules importantes de l'immunité innée qui jouent un rôle critique dans l'élimination des tissus lésés et mourant au cours de cette dégénérescence (Bruck, 1997). Une caractéristique précoce importante liée aux lésions de

nerfs périphériques est la dégénérescence Wallérienne, c'est-à-dire la dégénérescence de la partie distale de l'axone séparée du corps cellulaire à cause de la lésion. Cette dégénérescence induit le recrutement rapide de macrophages 1 à 3 jours suivant la lésion (Bendszus and Stoll, 2003; Mueller et al., 2003). Des études de déplétion de macrophages à l'aide de liposomes de clodronate de sodium a montré une corrélation entre l'atténuation de l'hyperalgésie thermique induite par une lésion nerveuse et la diminution du nombre de macrophages au niveau de la lésion nerveuse (Liu et al., 2000). Les macrophages sont également capables de communiquer avec les nocicepteurs *via* la sécrétion de facteurs tels que le TNFα, IL1β, IL6 ou encore l'IL8 (Jin and Gereau, 2006; Binshtok et al., 2008; Malsch et al., 2014). Finalement, il a été montré que ces facteurs solubles libérés par les macrophages peuvent recruter d'autres cellules immunitaires comme les lymphocytes aux sites de lésion (Mehta et al., 2018).

Lymphocytes

Les lymphocytes sont classés en deux sous-populations : les lymphocytes B, responsables de la réponse humorale (production d'anticorps faisant partie de l'immunité adaptative) et les lymphocytes T qui sont responsables de la réponse cellulaire cytotoxique (faisant partie de l'immunité innée) (LeBien and Tedder, 2008; Kumar et al., 2018). L'implication des lymphocytes T dans la mise en place de la neuropathie a été initialement proposée par une étude de Cui et collaborateurs en 2000 (Cui et al., 2000). Dans cette étude, les auteurs ont identifié la présence de lymphocytes T et de lymphocytes NK *(Natural Killer)* au niveau du site de lésion du nerf sciatique. Par la suite, il a été démontré que l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique au chaud sont abolis lorsque des rats sont rendus athymiques, c'est-à-dire dépourvu de lymphocytes T matures (Moalem et al., 2004). Par ailleurs, il a été mis en évidence une rupture de la BHE et de la barrière hémato-chordeuse dans les modèles de lésion nerveuses périphériques (Beggs et al., 2010; Echeverry et al., 2011; Cahill et al., 2014). La rupture de ces barrières, qui isolent le SNC de la périphérie, pourrait être à l'origine de l'infiltration des lymphocytes T dans le SNC (Cao and DeLeo, 2008; Costigan et al., 2009; Du et al., 2018; Gilabert et al., 2023). Cependant, ces données restent débattues à l'heure actuelle (Gattlen et al., 2016).

L'ensemble des mécanismes moléculaires et cellulaires décrits ci-dessus a été proposé comme pouvant induire une augmentation des niveaux de Ca^{2+} intracellulaires des nocicepteurs pouvant induire *in fine* leur sensibilisation (Julius and Basbaum, 2001).

b) Sensibilisation périphérique des fibres nociceptives

Les fibres sensorielles sont les premières à véhiculer l'information nociceptive dans le SNC. La modulation de leur activité électrophysiologique est donc cruciale dans les comportements de type douloureux. L'ensemble des phénomènes inflammatoires périphériques décrit précédemment induit une sensibilisation des nocicepteurs qui est définie comme une réduction du seuil et une augmentation de l'amplitude de la réponse suite à une stimulation nociceptive (Bessou and Perl, 1969; Ren and Dubner, 2010). Cette sensibilisation des nocicepteurs semble importante dans la mise en place de l'hyperalgésie primaire et la douleur inflammatoire (Hsieh et al., 2015). Celle-ci se caractérise majoritairement par une hypersensibilité dans la zone de lésion. Néanmoins, on observe une hypersensibilité dans des zones non lésées dans la douleur neuropathique, correspondant à une hyperalgésie secondaire (Hsieh et al., 2015). Cette dernière est liée à des phénomènes de sensibilisation centrale dus notamment au dérèglement de l'homéostasie neuronale du réseau nociceptif spinal (Campbell and Meyer, 2006).

c) Sensibilisation centrale de la moelle épinière

La corne dorsale de la ME est le premier relais de la transmission de l'information nociceptive dans le SNC avec le glutamate comme principal neurotransmetteur qui est libéré par les fibres afférentes. Les effets du glutamate passent principalement *via* une liaison sur des récepteurs canaux postsynaptiques incluant les récepteurs AMPA *(α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate)* et kainate, avec une contribution moindre des récepteurs NMDA *(N-méthyl-D-aspartate)* (Traynelis et al., 2010). Les récepteurs NMDA servent de détecteur de coïncidence et sont importants pour la plasticité synaptique des synapses centrales (Lau and Zukin, 2007). Par conséquent, ces récepteurs jouent un rôle essentiel dans la plasticité synaptique des neurones de la corne dorsale de la ME, comme la potentialisation à long terme (LTP) (Xing et al., 2007; Li et al., 2019b). Il a été démontré que lorsque les fibres C sont activées de manière accrue, celles-ci induisent une sensibilisation centrale *via* les récepteurs NMDA (Woolf and Thompson, 1991). Tout d'abord, une dépolarisation neuronale produite par l'accumulation de potentiels post-synaptiques excitateurs (EPSP) évoqués par les nocicepteurs permet de lever le bloc Mg^{2+} des récepteurs NMDA, permettant ainsi une activation de ces récepteurs (Mayer et al., 1984). Ensuite, l'activation de ces récepteurs permet un influx de Ca^{2+} qui permet d'activer à son tour des canaux calciques voltage-

dépendants ou des protéines kinases intracellulaires (Coderre and Melzack, 1992; Wei et al., 2006; Pezet et al., 2008; Latremoliere and Woolf, 2009). Ces deux phénomènes vont participer à augmentation de l'excitabilité neuronale et à une facilitation de la transmission des informations nociceptives. De la même manière, une dépression à long-terme (LTD) des synapses inhibitrices a été démontrée dans le réseau spinal. Ce phénomène de LTD résulte en une désinhibition des neurones glutamatergiques et participe également à l'hyperactivation du réseau nociceptif spinal (Woolf and Salter, 2000; Ji et al., 2003; Zhuo et al., 2011).

d) Balance excitation/inhibition et mort neuronale

Une augmentation de la libération spontanée de glutamate a été démontrée dans la lamina II de la ME *via* des enregistrements de courants post-synaptiques excitateurs miniatures (mEPSC) chez des rats SNI 7 jours après la chirurgie (Inquimbert et al., 2012). En effet, les résultats de l'étude indiquent une augmentation de la fréquence des mEPSCs en condition SNI, indiquant ainsi une augmentation de l'activité pré-synaptique (donc des nocicepteurs). Les auteurs ont démontré que cette hyperexcitabilité était liée à l'activation des récepteurs métabotropes du glutamate mGluR5. L'activation pré-synaptique de ces récepteurs induit une augmentation de la libération du glutamate par les fibres nociceptives ainsi que par les interneurones excitateurs de la ME (Xie et al., 2017). Une autre hypothèse quant à cette hyperactivité du réseau spinal repose sur la mort des interneurones GABAergiques inhibiteurs de la ME par apoptose. En effet, lorsque l'activité de la caspase-3 est inhibée après l'induction d'une SNI, cela empêche non seulement la perte d'interneurones GABAergiques mais aussi la réduction des courants inhibiteurs dans la ME (Scholz et al., 2005). D'autres résultats du même groupe montrent que cette apoptose implique les récepteurs NMDA des interneurones GABAergiques (Inquimbert et al., 2018). Néanmoins, le groupe d'Andrew Todd a également essayé de déterminer si une telle mort neuronale existait au sein de la ME en réalisant des marquages TUNEL *(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end labeling)* dans les modèles CCI et SNI mais n'ont pas réussi à démontrer un tel phénomène d'apoptose (Polgar et al., 2003; Polgar et al., 2004; Polgar et al., 2005). Cependant, dans ces trois études, les auteurs ont utilisé des coupes de 60µm tandis que les études du groupe de Scholz ont utilisé des coupes plus fines (10µm), ce qui pourrait expliquer de telles différences. Finalement, récemment l'équipe de Yves De Koninck, dans le modèle de Cuff chez la souris, a montré que la balance excitation/inhibition penchait

fortement vers l'excitation du fait d'une plus grande dégradation des synapses GABAergiques par les microglies (Yousefpour et al., 2023).

e) Atteintes supra-spinales

Dans les modèles de douleurs neuropathiques lésant le nerf sciatique, certaines structures supra-spinales présentent des modifications physiologiques (Fiore and Austin, 2016; Dubovy et al., 2018). En effet, l'activité des neurones de certaines structures du tronc cérébral comme la PAG, la RVM ou le noyau parabrachial est altérée (Morgado et al., 2010; Leong et al., 2011; Du et al., 2013; Uddin et al., 2018; Su et al., 2023). Il a été montré qu'il existe une augmentation de l'expression du marqueur c-fos (marqueur d'activité neuronale) dans la PAG dans un modèle de neuropathie diabétique (Morgado et al., 2010). De plus, une augmentation de la fréquence des PA et des EPSC spontanés des neurones de la partie ventrolatérale de cette structure a été observée dans le modèle CCI (Du et al., 2013). Un tel phénomène résulterait d'une augmentation de l'expression des protéines-canaux activés par l'hyperpolarisation et modulées par les nucléotides cycliques (HCN1 et HCN2). En ce qui concerne la RVM, une étude utilisant le modèle de ligature a montré une apoptose des cellules OFF, penchant ainsi vers une facilitation des messages nociceptifs (Leong et al., 2011). Finalement, des travaux utilisant le modèle CCI ont rapporté que les neurones du noyau parabrachial possédaient une activité électrique amplifiée en réponse à des stimuli nociceptifs (Uddin et al., 2018).

En plus des atteintes neuronales décrites précédemment, certaines structures supra-spinales présentent des caractéristiques neuroinflammatoires en conditions neuropathiques (Fiore and Austin, 2016). En effet, trois semaines après un CCI, la PAG ainsi que la RVM présentent une augmentation des marqueurs de réactivité microgliale (Iba1) et astrocytaire (GFAP) (Dubovy et al., 2018). De façon intéressante ces marqueurs de réactivité apparaissent de manière bilatérale, indépendamment du côté de la patte lésée. Une augmentation des taux de CCL2 *(Chemokine (C-C motif) ligand 2)* astrocytaire, un facteur soluble pouvant induire une hypersensibilité mécanique, a également été observé dans la PAG (Gao et al., 2009; Jung et al., 2009; Gao and Ji, 2010).

f) Inflammation centrale

Bien qu'une augmentation de l'activation des cellules immunitaires et des niveaux des cytokines pro-inflammatoires apparaisse en périphérie, il existe des phénomènes similaires au

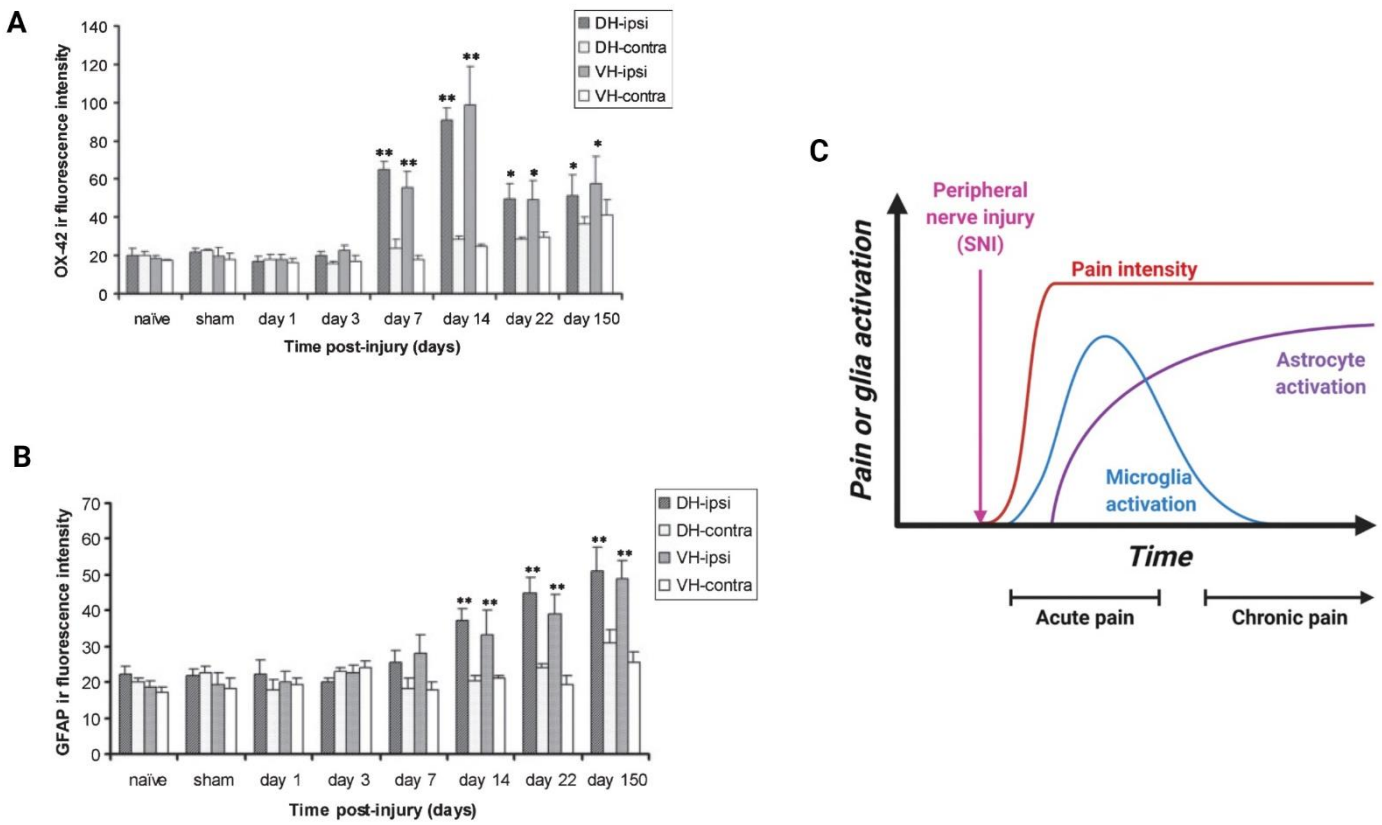


Figure 11: Profil d'expression des marqueurs de réactivité microgliale et astrocytaire dans la corne dorsale de la ME.

Le profil d'expression de **(A)** OX-42 (Cd11b) et de la **(B)** GFAP a été évalué dans la corne dorsale de la ME chez des rats dans un modèle de douleur neuropathique induite par la ligature du nerf sciatique. Suite à la chirurgie, il existe une rapide augmentation de la fluorescence pour OX-42 à partir de J7 du côté ipsilatéral à la chirurgie, ce qui est un signe de réactivité microgliale. Le pic de l'intensité de fluorescence de cette protéine est observé à J14 après la chirurgie. En ce qui concerne les astrocytes, l'intensité de de fluorescence de la GFAP augmente à J14 post-chirurgie et continue de croitre jusqu'à J150 (Zhang et De Koninck, 2006). Ainsi, il se pourrait que la réactivité microgliale soit responsable de l'induction de la douleur, tandis que les astrocytes contribueraient au maintien de cette dernière (Donnelly et al., 2020).

sein du SNC. Ainsi, il a été noté une augmentation des quantités de certaines cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL1β, IL1α, IL6, IL8, IL10, IL18), ainsi que des protéines du complément (C1q, C3, C4, C5) au niveau de la ME ou du cerveau (PAG, Amygdale, cortex préfrontal…) dans plusieurs modèles de douleur neuropathique (Griffin et al., 2007; Fiore and Austin, 2016). Les principaux acteurs cellulaires au centre de cette neuroinflammation apparaissent comme étant les microglies et les astrocytes (Ji et al., 2014; Salter and Stevens, 2017; Inoue and Tsuda, 2018; Li et al., 2019a; Cheng et al., 2022; Lu and Gao, 2023).

Microglies

Une augmentation du nombre de cellules non-neuronales, plus tard décrites comme des microglies, a été observée dans les années 70 du côté ipsilatéral dans la corne dorsale de la ME suite à des lésions nerveuses du nerf sciatique (Gilmore, 1975; Gilmore and Skinner, 1979). Par la suite, une corrélation entre l'activation microgliale et les comportements de types douloureux a été mise en évidence (Raghavendra et al., 2003). Les changements physiopathologiques liés aux microglies ont de ce fait été largement étudiés dans les modèles de lésion du nerf sciatique (Beggs and Salter, 2007; Miyamoto et al., 2017; Xu et al., 2017). Il en résulte la prolifération de ces cellules non seulement dans la région lombaire de la ME, mais également dans des structures supra-spinales telles que l'ACC ou le cortex frontal. De manière intéressante, il semble que l'activation des microglies spinales requiert une augmentation de l'activité des fibres Aδ et C (Hathway et al., 2009; Xie et al., 2009). De plus, l'activation directe des microglies de la corne dorsale de la ME par optogénétique chez la souris induit leur prolifération, la libération de cytokines pro-inflammatoires et l'apparition de comportements de type douloureux de longue durée (1 semaine) (Yi et al., 2021). De très nombreux mécanismes ont été montrés comme impliquant les microglies dans la douleur neuropathique incluant la libération de cytokines pro-inflammatoires ou la dégradation de la matrice extracellulaire autour des neurones de projection spino-parabrachiaux de la lamina I de la ME (Tansley et al., 2022b). Néanmoins, le pic d'activation microgliale est à son maximum les deux premières semaines dans la SNI, tandis que la douleur persiste plus d'un an après la chirurgie (Kobiela Ketz et al., 2017; Millecamps et al., 2023). Il semblerait donc suite à la lésion d'un nerf périphérique, les microglies induisent l'état douloureux tandis que les d'autres types cellulaires, tels que les astrocytes, prennent le relais pour maintenir cet état douloureux au cours du temps **(Figure 11)** (Donnelly et al., 2020).

Astrocytes

Une étude longitudinale utilisant un modèle CCI a montré que l'immunomarquage GFAP des astrocytes dans les cornes dorsales et ventrales de la ME est plus importante à partir de 14 jours post-chirurgie et reste à son pic jusqu'à 5 mois (Zhang and De Koninck, 2006). Une autre étude a également montré que le marquage GFAP dans la corne dorsale de la ME reste prononcé jusqu'à 9 mois post-chirurgie (Gwak et al., 2012). L'ensemble de ces études histologiques suggèrent que, d'un point de vu temporel, les astrocytes jouent probablement un rôle important dans le maintien de la douleur au cours du temps. L'équipe de Ru-Rong Ji a été l'une des première à identifier un lien direct entre les astrocytes et la douleur neuropathique (Zhuang et al., 2006). Dans leur étude, les auteurs ont montré que l'activation de la kinase N-Terminale c-Jun (JNK) dans les astrocytes de la ME contribue de façon importante à la persistance de l'allodynie mécanique dans un modèle de ligature du nerf sciatique (Zhuang et al., 2006). De plus, l'allodynie mécanique est abolie par la déplétion des astrocytes suite à l'injection d'une toxine ciblant ces cellules (L-α-aminoadipate). Plus récemment, Nam et collaborateurs ont montré que l'activation directe des astrocytes de la corne dorsale de la ME par optogénétique induit une hypersensibilité mécanique (Nam et al., 2016). En effet, les astrocytes stimulés secrètent de l'ATP qui induit la désinhibition des neurones de projection de la Lamina I dont l'activité accrue a déjà été reliée à des comportements de type douloureux (Tansley et al., 2022b).

Bien que les études fondamentales et précliniques aient mis en lumière de nombreux mécanismes moléculaires, cellulaires et anatomiques impliqués dans la douleur neuropathique, il existe aujourd'hui peu de solutions permettant de la soulager. Les traitements de première intention reposent principalement sur l'utilisation d'agents pharmacologiques. Nous retrouvons ainsi en tête de liste les antidépresseurs, les anticonvulsivants, ainsi que les opiacées, incluant la morphine, pour soulager les douleurs modérées à sévère. Selon l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, la morphine est l'opiacé fort le plus utilisé en Europe, suivie de près par l'oxycodone. En effet, elle représente 50% de la consommation d'opiacé en milieu hospitalier en 2017 (ANSM, 2019).

Conclusion sur la douleur

La douleur aigue est un mécanisme d'alerte nécessaire pour la survie d'un organisme, qui est censée disparaitre après la stimulation douloureuse. Dans certains cas, la douleur persiste au cours du temps, on parle alors de douleur chronique lorsque la durée dépasse les 3 mois. La douleur chronique peut être subdivisée en plusieurs catégories, dont fait partie la douleur neuropathique. La douleur neuropathique résulte directement d'une lésion ou d'une maladie affectant le système somatosensoriel.

Afin de révéler les mécanismes sous-jacents à l'origine des douleurs neuropathiques, les chercheurs travaillent avec des modèles animaux qui touchent pour la plupart le nerf sciatique. Ainsi, différents articles scientifiques ont mis en lumière un rôle crucial de la neuroinflammation médiée par les microglies et les astrocytes au sein de la ME ou encore dans des structures supra-spinales.

Partie 3 : Morphine

A) Découverte et historique de la caractérisation

Les préparations à base de pavot à opium sont utilisées depuis plusieurs millénaires pour soulager la douleur. Mais ce n'est qu'en 1804 que Friedrich Wilhelm Sertürner isola l'une des molécules analgésiques contenues dans l'opium (Sertürner, 1806). La purification a été réalisée *via* une précipitation à l'ammoniac et la morphine a été solubilisée dans de l'eau acidifiée, car c'est une base faible. Par la suite, Sertürner a administré la substance isolée à des souris, des rats, des chats, des chiens ainsi qu'à lui-même pour tester les effets de cette substance. Du fait de ses effets sédatifs, ce composé fut nommé morphium (morphine) en référence à Morphée, le dieu des rêves de la Grèce antique. En 1819, l'apothicaire allemand C.F. Wilhelm Meissner identifia le « type » de la substance isolée par Sertürner et la nomma « alcaloïde », terme qui caractérise les molécules basiques d'origine végétale (Meissner, 1819). Plus tard, Auguste Laurent réussit à former des sels de morphine en séchant la préparation et caractérisa la formule chimique brute de cette molécule : $C_{17}H_{19}NO_3$ (Levitt, 2021). Encore aujourd'hui, la morphine reste la molécule analgésique de référence pour soulager la douleur sévère en milieu clinique malgré ses nombreux effets secondaires.

B) Effets analgésiques de la morphine

a) Système opioïde

Les effets analgésiques de la morphine reposent sur son interaction avec le système opioïdergique endogène qui est composé de peptides opioïdes activant des récepteurs opioïdes. Il existe trois famille de peptides opioïdes : les endorphines, les enképhalines ainsi que les dynorphines. Ces peptides dérivent respectivement de la prépro-opiomélanocortine, prépro-enképhaline et de la prépro-dynorphine, bien que la Leu-enképhaline peut également être synthétisée à partir de la prépro-dynorphine (Corder et al., 2018). Les peptides opioïdes contiennent un motif commun Tyr-Gly-Gly-Phe amino-terminal et lient les récepteurs opioïdes mu (MOR), delta (DOR) et kappa (KOR) (Abrimian et al., 2021). Les récepteurs opioïdes sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G_i de classe A (Al-Hasani and Bruchas, 2011). Ces trois récepteurs opioïdes possèdent une homologie de 60% au niveau de leur séquence en acide aminés, allant jusqu'à 90% d'homologie pour les séquences des boucles intracellulaires tandis que les séquences des parties N-terminales, des boucles

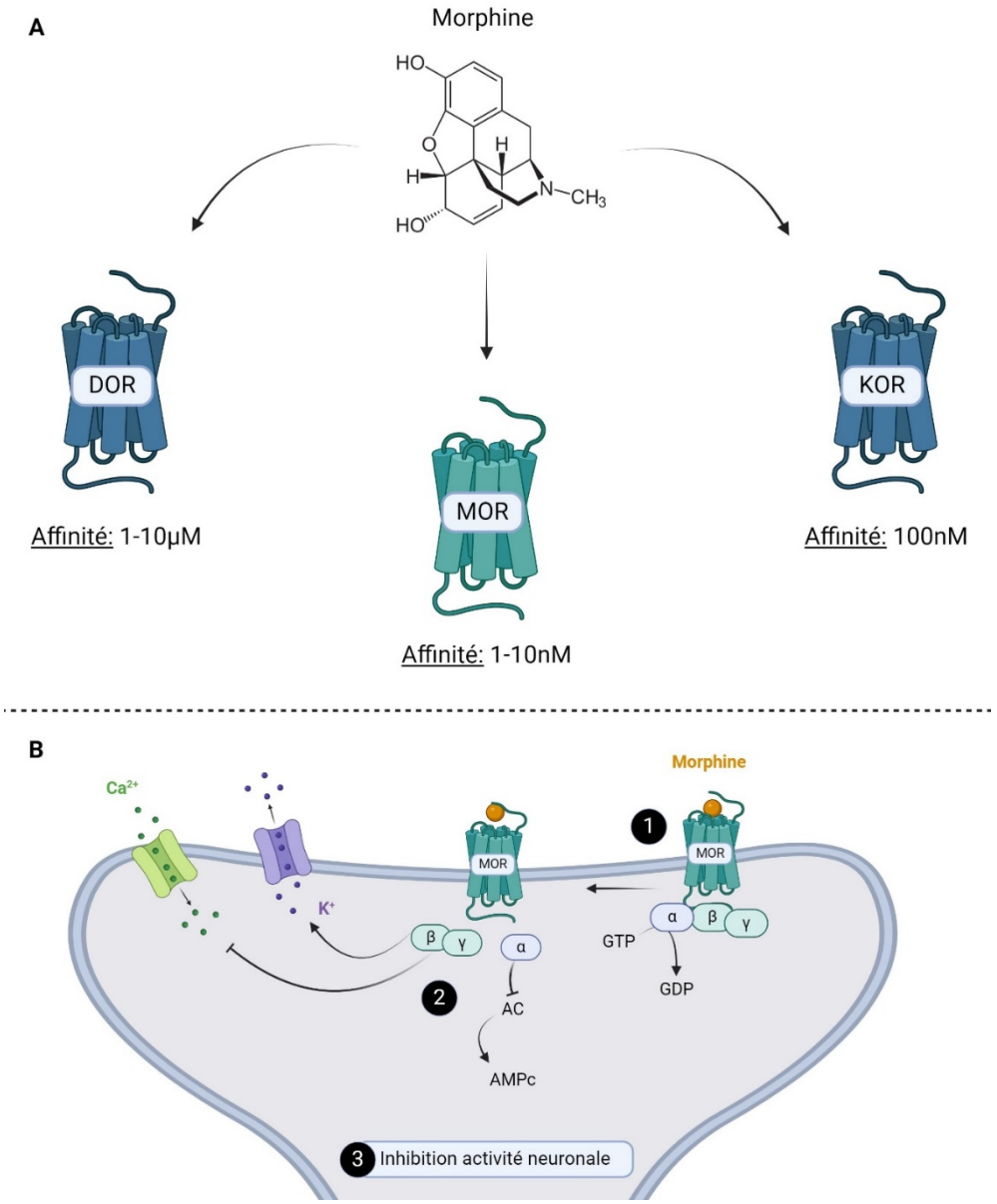


Figure 12: Les récepteurs de la morphine et les voies intracellulaires associées suite à une activation.

(A) Les effets de la morphine proviennent de sa liaison aux récepteurs opioïdes Mu (MOR), Delta (DOR) et Kappa (KOR). Néanmoins, l'affinité la plus élevée de cette molécule est décrite pour le MOR sur des homogénats de cerveaux (Chen et al., 1991 ; Ben Haddou et al., 2014) ou en culture cellulaire (Miyazaki et al., 2017). **(B)** Suite à l'activation du MOR par la morphine, un changement de conformation du récepteur va permettre la dissociation des sous-unités α et βγ de la protéine G_i. Ces dernières vont respectivement inhiber l'adénylate cyclase (AC) et induire des courants potassiques sortant ainsi qu'une inhibition des courants calciques entrant. L'ensemble de ces mécanismes induit *in fine* une hyperpolarisation neuronale.

extracellulaires et C-terminales diffèrent le plus (20-30% d'homologie) (Pasternak and Pan, 2013). En ce qui concerne la morphine, elle se lie et active majoritairement le MOR du fait de sa forte affinité (1-10 nM selon les études) et minoritairement aux autres récepteurs opioïdes (DOR : 4300nM et KOR : 118nM) (Chen et al., 1991; Ben Haddou et al., 2014; Miyazaki et al., 2017) **(Figure 12)**. Suite à la liaison de la morphine au MOR, un changement de conformation du récepteur permet l'échange d'une guanidine diphosphate (GDP) pour une guanidine triphosphate (GTP). Ensuite, la dissociation des sous-unités G_{α} et $G_{\beta\gamma}$ induit différentes voies de signalisations (Al-Hasani and Bruchas, 2011; Corder et al., 2018). Ainsi, la sous-unité G_{α} va inhiber la voie de l'adénylate cyclase (AC), diminuant alors les niveaux d'AMPc intracellulaires. De son côté, la sous unité $G_{\beta\gamma}$ va d'une part inhiber des canaux calciques voltage-dépendants pré-synaptiques (diminuant la libération vésiculaire de neurotransmetteurs), mais également activer des canaux potassiques rectifiant entrant au niveau post-synaptique induisant alors un efflux de potassium et aboutissant à une hyperpolarisation neuronale.

b) Bases cellulaires de l'effet analgésique de la morphine

L'effet analgésique de la morphine dépend du MOR dans la mesure où des souris déficientes pour ce récepteur ne montrent aucune analgésie morphinique (Matthes et al., 1996). Le MOR est largement exprimé dans l'organisme, que ce soit au niveau périphérique ou central (Stein et al., 1995; Rachinger-Adam et al., 2011; Erbs et al., 2015; Farmer et al., 2019; Kibaly et al., 2019). En effet, ces récepteurs sont exprimés au niveau des terminaisons libres des nocicepteurs, ainsi qu'au niveau du SNC, notamment dans des structures clefs des contrôles descendants de la douleur telles que la PAG et la RVM. En plus des neurones, les microglies et les astrocytes expriment également le MOR bien que leur rôle ne soit pour le moment pas bien caractérisé. Finalement, l'expression de ce récepteur a également été décrite au sein de la ME (Kline and Wiley, 2008).

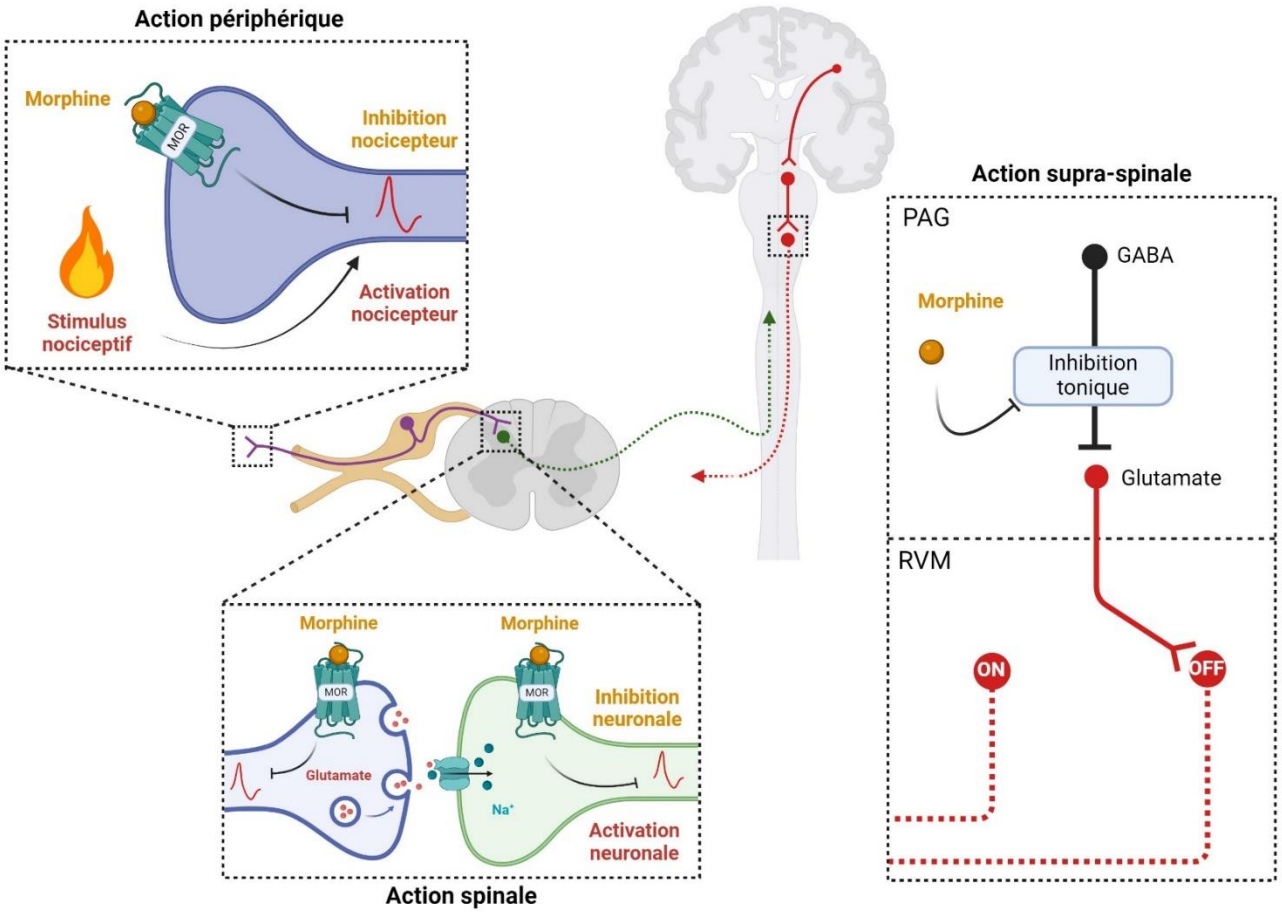


Figure 13: Sites d'actions de la morphine permettant une analgésie.

Afin d'induire une analgésie, la morphine agit à plusieurs niveaux du système nerveux. En effet, les MORs sont exprimés sur terminaisons périphériques des neurones sensoriels qui détectent les informations nociceptives. Une fois activés par un stimulus nociceptif, un potentiel d'action est généré dans ces neurones et la morphine. En se liant au MOR, la morphine est capable d'inhiber cette activation. La morphine peut également agir au niveau du site de transmission de l'information nociceptive au sein de la corne dorsale de la ME en agissant sur les MORs exprimés au niveau pré-synaptique par les terminaisons des fibres nociceptives et au niveau post-synaptique dans les neurones de 2nd ordre. Finalement, la morphine peut agir sur des structures supra-spinales telles que la PAG ou la RVM qui appartiennent aux contrôles descendants de la douleur. Globalement, la morphine favorise l'activité des cellules OFF de la RVM qui sont responsables d'une analgésie lors qu'elles sont activées.

L'ensemble de ces données suggère que l'effet analgésique de la morphine dépend de son action périphérique et centrale **(Figure 13)**.

i. Effet périphériques

La morphine peut directement agir sur les fibres afférentes primaires au niveau de la ME. Néanmoins, il a également été montré que les terminaisons périphériques des fibres sensorielles, ainsi que leurs corps cellulaires dans les DRG, expriment le MOR (Stander et al., 2002; Stein and Lang, 2009; Moy et al., 2020). Ainsi, une injection locale de morphine dans la patte d'animaux ayant une hypersensibilité thermique produit un effet antinociceptif (Ferreira and Nakamura, 1979). Ce résultat a été confirmé en utilisant du Lopéramide, un agoniste des MORs qui ne traverse pas la BHE et dont l'action est restreinte à la périphérie (DeHaven-Hudkins et al., 1999). Cependant, ces résultats sont remis en cause dans la littérature dans la mesure où la délétion conditionnelle du MOR dans les nocicepteurs ne change pas l'effet analgésique de la morphine (Weibel et al., 2013; Corder et al., 2017). Une autre hypothèse de l'effet analgésique périphérique de la morphine est une action sur les cellules immunitaires (Eisenstein, 2019). En effet, une augmentation des cellules immunitaires positives pour le MOR a été observée au niveau des sites d'inflammation périphériques (Stein et al., 1996; Likar et al., 2004). Ces cellules pourraient alors être à l'origine de l'effet analgésique local de la morphine dans la mesure où certaines cellules immunitaires synthétisent les opioïdes endogènes en conditions inflammatoires ou lorsqu'elles sont stimulées avec des opioïdes exogènes (Celik et al., 2016).

ii. Effet dans la ME

Au niveau de la moelle épinière, la morphine est capable d'inhiber directement l'activation des neurones de la corne dorsale qui répondent à une stimulation nociceptive (Aimone and Yaksh, 1989). De plus, la morphine peut réguler de manière présynaptique la libération de Substance P par les fibres afférentes primaires (Aimone and Yaksh, 1989). En plus des fibres afférentes, il a été montré que l'activation du MOR par le DAMGO *([D-Ala2, N-MePhe4, Gly-ol]-enkephalin)*, un agoniste synthétique, diminue l'activité des interneurones excitateurs de la corne dorsale de la ME (Kohno et al., 1999). En effet, une diminution des EPSCs, ainsi que des EPSPs spontanés, a été observée suite à une stimulation électrique des racines dorsales, qui permet de mimer une stimulation nociceptive. La morphine inhibe également l'activation des neurones de projection spinoparabrachial lors d'une stimulation

nociceptive (Jasmin et al., 1994). Les auteurs ont d'abord réalisé un marquage rétrograde avec du fluorogold dans le noyau parabrachial. Les animaux ont ensuite été injecté soit avec une solution saline, soit avec de la morphine à 5 ou 30mg/kg par voie sous-cutanée. Puis, une injection de formaline induisant une douleur inflammatoire est réalisée dans la patte. Suite à cela, l'expression de c-Fos des neurones dans la lamina I de la ME indique que les neurones spinoparabrachiaux expriment moins c-Fos chez les animaux injectés à la morphine par rapport à ceux traités avec la solution saline. Finalement, l'injection de dermorphine-saporine, qui induit sélectivement la mort des neurones exprimant le MOR, diminue l'effet anti-nociceptif de la morphine suite à son injection périphérique ou intrathécale (Kline and Wiley, 2008).

iii. Effets supra-spinaux

La morphine agit également dans le SNC pour induire son effet analgésique, notamment au sein de la PAG. En effet, une micro-injection de morphine dans cette structure induit une forte analgésie (Yaksh et al., 1976; Moreau and Fields, 1986). En condition physiologique, il existe des interneurones inhibiteurs GABAergiques qui expriment le MOR et qui inhibent de manière tonique les neurones de projection PAG→RVM (Depaulis et al., 1987; Osborne et al., 1996). En présence de morphine, une désinhibition de ces neurones de projection se met en place *via* une inhibition des interneurones GABAergiques (Bobeck et al., 2014). Il en résulte alors une diminution des niveaux de GABA extracellulaires et une augmentation de l'activité des neurones de projection (Stiller et al., 1996). Des études récentes soutiennent l'hypothèse selon laquelle la projection PAG→RVM est un contributeur principal de l'analgésie induite par les opioïdes (Samineni et al., 2017). En utilisant une approche chémogénétique, les auteurs ont démontré que l'inhibition des neurones GABAergiques ou l'activation des neurones glutamatergiques dans le PAG induit une antinociception chez la souris. Cependant, il existe des résultats conflictuels quant à la nature des projections de la PAG vers les cellules ON et OFF de la RVM. Des études menées sur des souris exprimant la GAD67-GFP *(glutamate décarboxylase 67 couplée à la protéine fluorescente verte)*, un marqueur des neurones GABAergiques, montrent que les neurones de projection de la PAG (marqués de façon rétrograde) ne colocalisent pas avec la GAD67, ce qui suggère que la projection issue de la PAG est glutamatergique (Park et al., 2010). En revanche, des résultats chez le rat démontrent que les neurones de projections sont des neurones

GABAergiques et glutamatergiques (Morgan et al., 2008). Cette étude suggère que les neurones de projection GABAergiques projettent vers les cellules ON de la RVM, alors que les neurones de projection glutamatergiques projettent plutôt sur les cellule OFF (Morgan et al., 2008). Malgré tout, les études soutiennent de manière générale une inhibition opioïdergique de la libération de GABA par les interneurones dans la PAG, désinhibant ainsi les projections de glutamatergiques vers les cellules OFF de la RVM. Étant donné que les cellules OFF de la RVM sont GABAergiques, elles inhibent à leur tour les informations nociceptives dans la corne dorsale de la ME *via* des projections directes dans cette structure (Moreau and Fields, 1986; Fields et al., 1995; Fields, 2004; Morgan et al., 2008).

c) Effets dans la douleur neuropathique

Une récente méta-analyse a été réalisée sur cinq études cliniques randomisées, en double aveugle et avec des périodes de traitement de morphine de quatre à sept semaines (Cooper et al., 2017). Cette étude conclut qu'il n'y avait pas suffisamment de preuves pour soutenir l'idée que la morphine soit efficace dans le traitement de la douleur neuropathique. De plus, des effets indésirables ont été rapportés plus fréquemment avec la morphine comparée au placebo. L'effet analgésique de la morphine dans les modèles animaux de douleurs neuropathiques ont, quant à eux, largement été étudiés. Une majorité d'articles montre que l'effet analgésique de cette molécule sont diminués dans ces modèles (Lee et al., 1995; Ossipov et al., 1995b; Ossipov et al., 1995a; Erichsen and Blackburn-Munro, 2002; Rashid et al., 2004; Hashemzaei et al., 2017). Une hypothèse pouvant expliquer ce phénomène est la diminution de l'expression du MOR (Li et al., 2023). En effet, dans un modèle de ligature du nerf sciatique, il a été démontré qu'il existe une diminution des quantités de l'ARNm du MOR dans les DRG 7j après la chirurgie (Lee et al., 2011). Ces résultats ont été confirmés dans ce même modèle ainsi que dans les modèles de SNI et de CCI (Zhang et al., 1998; Kohno et al., 2005; Obara et al., 2010). Des résultats similaires ont été observés également dans la ME et certaines structures supra-spinales (Porreca et al., 1998; Kohno et al., 2005; Rojewska et al., 2018; Thompson et al., 2018; Costa et al., 2019). Une hypothèse concernant la diminution de l'expression ce récepteur est l'augmentation des enzymes de méthylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN est une modification épigénétique initiée par des enzymes appelées Dnmt *(DNA Methyltransferases)* qui inhibent la transcription des gènes (Moore et al., 2013). Ainsi, il existe une augmentation de l'expression des Dnmt et de la méthylation des gènes

codant pour l'expression du MOR dans les modèles de douleur neuropathique, ce qui pourrait expliquer pourquoi ce récepteur est moins exprimé lors de lésions nerveuses (Zhou et al., 2014; Zhang et al., 2016; Sun et al., 2017a).

De mon point de vue, il est impossible d'expliquer pourquoi la morphine a des effets réduits durant une neuropathie en ne se concentrant uniquement sur un mécanisme alors que les effets de cette molécule dépendent de nombreux facteurs. Le dernier paragraphe que vous venez de lire, a été rédigé avec un point de vue totalement pharmacodynamique. Néanmoins, la pharmacocinétique, qui regroupe plusieurs processus biochimiques comme le métabolisme, est également une composante extrêmement importante à prendre en compte lorsqu'on étudie les effets d'une molécule (Staahl et al., 2008; Rizk et al., 2017; Palmer et al., 2022).

C) Métabolisme

Une fois administrée, la morphine va subir plusieurs processus biochimiques qui vont permettre à l'organisme de l'éliminer. C'est ce qu'on appelle l'ADME ou Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion (Doogue and Polasek, 2013). Notre équipe s'intéresse plus particulièrement au métabolisme, c'est-à-dire au mécanisme qui va permettre la dégradation ainsi que l'inactivation de la morphine. Celle-ci est majoritairement métabolisée dans le foie, ainsi que dans d'autres organes incluant les reins, les intestins ou encore le SNC (Andersen et al., 2003; De Gregori et al., 2012; Laux-Biehlmann et al., 2013; Gabel et al., 2022).

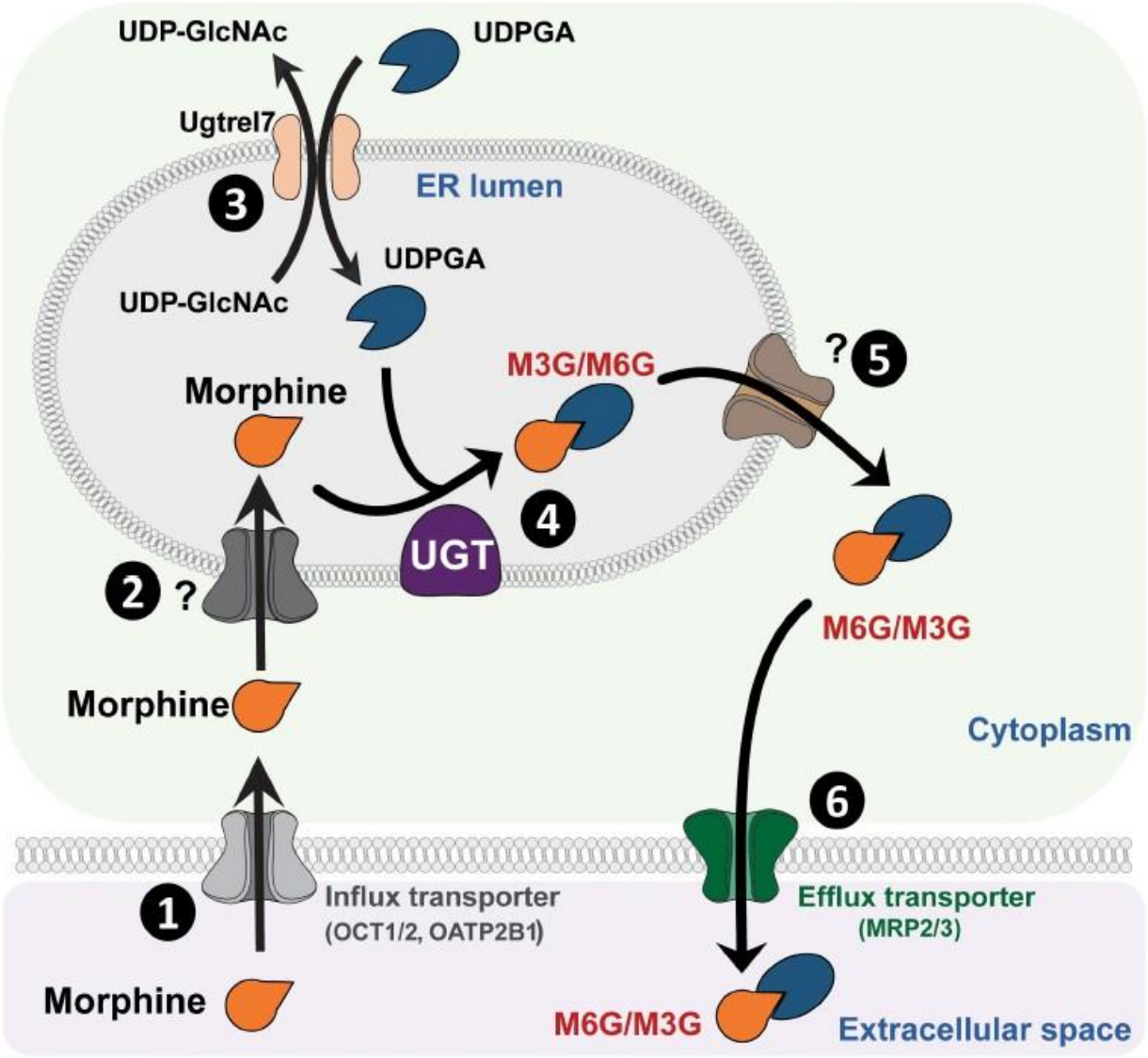


Figure 14: Métabolisme de la morphine.

Après administration de morphine, celle-ci est éliminée par l'organisme pour maintenir son intégrité. Cette élimination met en jeu un processus biochimique appelé métabolisme. Pour ce faire, la morphine est transportée dans les cellules puis dans le lumen du réticulum endoplasmique *(ER)* pour y être glucuronidée par des enzymes appelées UGTs. Le groupement glucuronide provient d'une molécule de UDP-Acide Glucuronique *(UDPGA)*. Chez l'être humain, la morphine peut être glucuronidée en position 3 ou 6 générant ainsi de la morphine-3-glucuronide *(M3G)* ou de la morphine-6-glucuronide (M6G). Une fois les métabolites formés, ces derniers sont transportés hors de la cellule, puis ils rejoignent la circulation sanguine afin d'atteindre par les reins pour être éliminés dans les urines (Gabel et al., 2022).

Une fois présente dans les organes cités ci-dessus, la morphine entre dans les cellules capables de la métaboliser *via* des transporteurs d'influx appelés OCT (*Organic cation transporter)* 1 et 2*,* ainsi que potentiellement l'OATP2B1 *(Organic anion transporting polypeptide 2B1 ;* (Tzvetkov et al., 2013; Yang et al., 2016; Meyer et al., 2019; Imaoka et al., 2021) **(Figure 14)**. Puis, la morphine traverse la membrane du réticulum endoplasmique lisse *(REL)* afin d'atteindre son lumen pour y être métabolisée par des enzymes appelées UGTs *(Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferases (UGTs ;* (Meech et al., 2019).

a) Les UGTs : enzymes de métabolisme de la morphine

Les UGTs sont des glycoprotéines transmembranaires composées d'environ 550 acides aminés (environ 55 kDa) situées dans le REL. Plus précisément, la majeure partie de ces enzymes se trouve dans le lumen du REL et seulement 20 acides aminés de la protéine se trouvent dans le cytosol, avec un motif di-lysine (KK) responsable de leur rétention à la membrane du REL (Jackson et al., 1990). La partie luminale amino-terminale de la protéine porte le domaine de liaison aux substrats (*e.g.,* la morphine), tandis que la partie carboxy-terminale lie le co-substrat UDPGA *(UDP-acide glucuronide)* qui est le donneur du groupement glucuronide (Meech et al., 2019). La glucuronidation nécessite que la morphine et l'UDPGA soient tous les deux transportés à l'intérieur du REL. Bien que le transport de l'UDPGA repose sur plusieurs transporteurs tels que l'UGTrel7 ou UGTrel1 (*UDP-galactose-transporter-related protein* 7 ou 1), le transporteur de la morphine vers le REL n'est pas identifié à ce jour (Muraoka et al., 2001; Rowland et al., 2015; Ondo et al., 2020).

Les UGTs sont une superfamille d'enzymes qui est divisée en deux groupes : UGT1A et UGT2B (Meech et al., 2019). Cette nomenclature vient du faire qu'il existe un gène unique codant pour les UGT1A, alors que plusieurs gènes codent pour les UGT2B (Mackenzie et al., 2005; Girard et al., 2007; Bellemare et al., 2010; Rouleau et al., 2013; Rouleau et al., 2014). Le gène codant pour les UGT1A se trouve sur le chromosome 2 et comporte 5 exons. L'exon 1 subit un épissage alternatif, tandis que les exons 2 à 5 restent communs à tous les UGT1A. L'épissage alternatif de l'exon 1 génère 9 variants (UGT1A1, 1A3 à 1A10). Parmi l'ensemble des UGTs, seules les UGT1A1, 1A3, 1A6, 1A8, 2B1, 2B7 et 2B36 sont impliquées dans la glucuronidation de la morphine (Riedy et al., 2000).

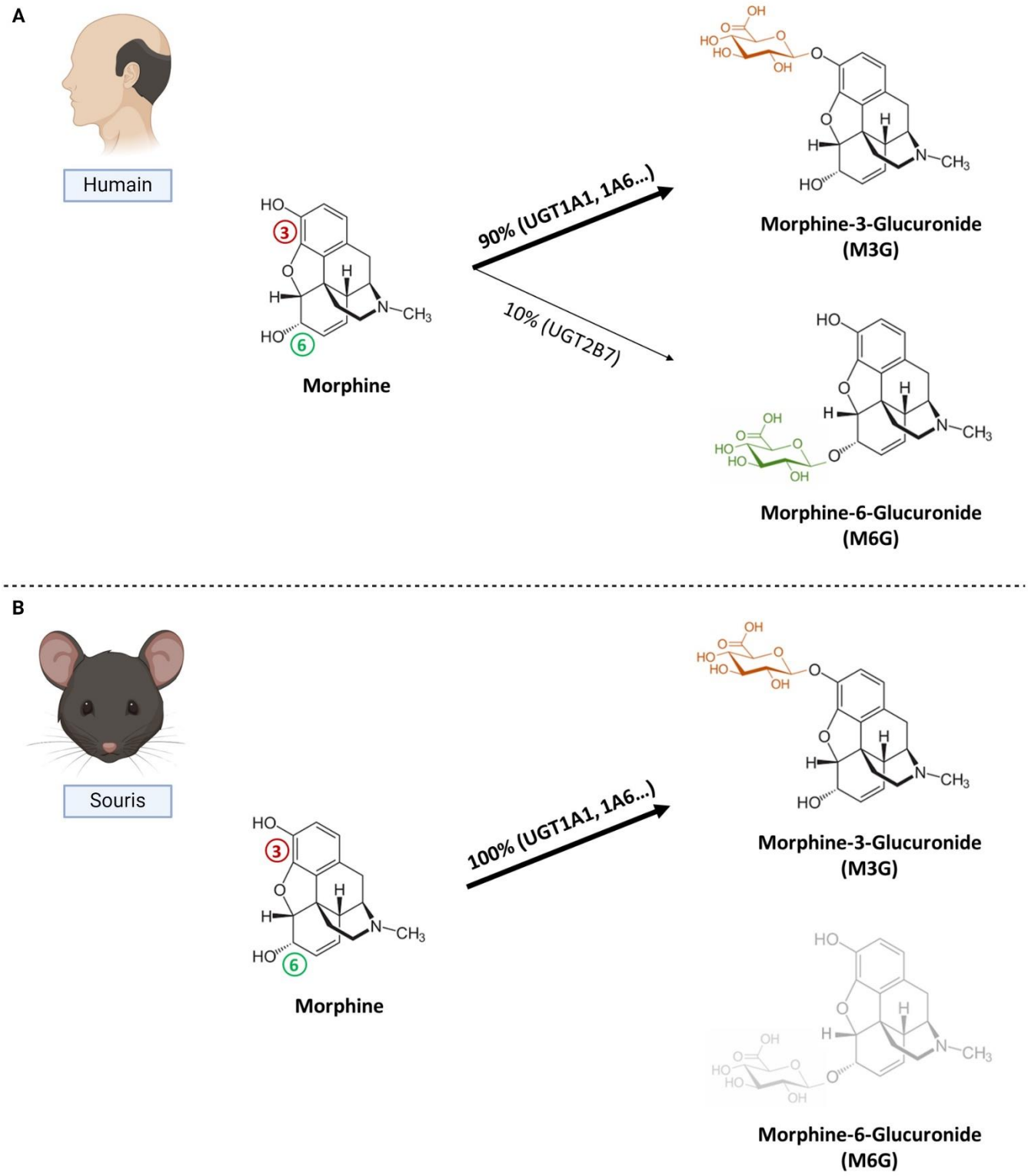


Figure 15: Métabolisme de la morphine chez l'Etre Humain et la souris.

Bien que le métabolisme de la morphine suit un mécanisme commun chez l'Etre Humain et les souris, il existe des différences métaboliques. **(A)** En effet, la morphine est métabolisée en M3G (90%) et en M6G (10%) chez les Etres Humains **(B)** alors qu'on ne retrouve que la M3G chez la souris. Ces différences s'expliquent notamment par l'absence de l'UGT2B7 chez la souris.

b) La glucuronidation de la morphine

La glucuronidation, une voie métabolique de phase II bien décrite, est un processus biochimique permettant de conjuguer un groupement glucuronide sur un substrat (Yang et al., 2017). Cette réaction enzymatique est retrouvée, non seulement chez les animaux, mais également dans les plantes (Nagashima et al., 2000; Sawada et al., 2005). Le but final de cette réaction enzymatique est d'inactiver des molécules et d'augmenter leur hydrophilicité afin de faciliter leur élimination par l'organisme. Chez les animaux, cette élimination se fait majoritairement par les urines, bien que des études aient montré qu'une élimination biliaire peut également avoir lieu. De manière intéressante, cette réaction enzymatique ne concerne pas uniquement les composés exogènes, mais aussi des molécules endogènes incluant la bilirubine, des hormones stéroïdiennes ou encore des neurotransmetteurs (dopamine, sérotonine…) (Krishnaswamy et al., 2003; Itaaho et al., 2009). Par ailleurs, l'importance physiologique de ce processus a été mis en évidence par une mutation induisant une déficience génétique de l'UGT1A1 qui conduit au syndrome de Gilbert qui est caractérisée par une hyperbilirubinémie (Debinski et al., 1996).

Dans le cas de la morphine, la glucuronidation a lieu en position carbone-3 ou carbone-6 générant ainsi deux métabolites principaux que sont la M3G (*Morphine-3-glucuronide* ≈90% de la morphine conjuguée) et la M6G (*Morphine-6-glucuronide* ≈10% de la morphine conjuguée ; **Figure 15**). Il existe également d'autres métabolites minoritaires (<5%) incluant la normorphine, la morphine-6-sulfate ou encore la morphine-3,6-diglucuronide (Laux-Biehlmann et al., 2013). La morphine est également éliminée sous forme intacte directement *via* les urines (≈10%) du fait de son hydrophillicité élevée (Yeh, 1975).

Finalement, une fois la morphine transformée en M3G ou en M6G, ces métabolites sont transférés dans le cytosol depuis le REL *via* des transporteurs d'efflux inconnus à ce jour. Puis, un transport hors la cellule se fait *via* les MRP2 et MRP3 *(Multidrug resistance-associated proteins ;*(Zelcer et al., 2005; Lloret-Linares et al., 2016). Ce métabolisme se fait majoritairement dans les hépatocytes dans lesquels les MRP2 et MRP3 sont exprimés dans le pôle basolatéral de ces cellules, proche des cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins. Ainsi, la M3G et la M6G sont libérées dans la circulation sanguine *via* les cellules endothéliales (Xie et al., 2000). De la circulation sanguine, ces métabolites atteignent ensuite les reins pour y être excrétés dans l'urine. Néanmoins, une glucuronidation extra-hépatique,

en particulier dans le SNC a également été décrite (Raoof et al., 1996; Liu et al., 2019; Gabel et al., 2023).

c) Glucuronidation dans le cerveau

Le cerveau fait partie des organes décrit comme pouvant glucuronider certains composés exogènes. Benzi et collaborateurs ont été parmi les premiers à décrire un tel phénomène en 1967 (Benzi et al., 1967). En effet, des cerveaux de chiens et de babouins ont été utilisés durant ces expériences afin d'évaluer le métabolisme de certains composés comme l'oxazepam. Ainsi, une glucuronidation de ce composé a été observée dans les deux espèces étudiées, ouvrant la voie à l'étude du métabolisme central d'autres molécules dont le site d'action principal se trouve être dans le SNC. Plus tard, la glucuronidation de la morphine en M3G a été montrée dans le cortex, la PAG, le cervelet et la moelle allongée sur des tissus post-mortem de patients cancéreux (Wahlstrom et al., 1988). De plus, King et collaborateurs ont décrit en 1999 l'expression de l'UGT1A6 et de l'UGT2B7 dans le cervelet humain ainsi qu'une glucuronidation générant de la M3G sur des microsomes cérébraux (fraction de REL purifiée contenant entre autre les UGTs) (King et al., 1999). Par la suite, l'expression des UGTs a été démontrée à plusieurs reprises dans des cerveaux de souris, rats et humains avec des études fonctionnelles démontrant pour certaines un métabolisme de la morphine en M3G (Suleman et al., 1998; Buckley and Klaassen, 2007; Sakakibara et al., 2016b).

La présence et l'activité des UGTs au sein du SNC n'étant plus à prouver, la prochaine étape a été de caractériser les cellules exprimant ces enzymes et étant à l'origine de cette réaction enzymatique. La présence de ces enzymes a été d'abord montrée sur des fractions de neurones et d'astrocytes purifiées par Suleman et collaborateurs en 1998 (Suleman et al., 1998). L'expression des UGTs et plus particulièrement de l'UGT1A6, a été confirmée plus tard dans les neurones, notamment dans les cellules de Purkinje du cervelet, ainsi que les neurones pyramidaux de l'hippocampe, *via* une approche d'hybridation *in situ* (Brands et al., 2000). En ce qui concerne les astrocytes, l'expression de l'UGT1A6 et une glucuronidation de certains composés a été montrée à plusieurs reprise sur des cultures de cellules purifiées par le groupe d'Alain Minn (Heurtaux et al., 2004; Heurtaux et al., 2006; Gradinaru et al., 2012). A *contrario*, seule une étude sur des cultures purifiées de microglies a montré une expression de l'UGT1A6 et une potentielle glucuronidation de la morphine dans ces cellules (Togna et al., 2013). Par ailleurs, aucune étude n'a montré l'expression des UGTs dans les oligodendrocytes. Ainsi, les

cellules gliales comme les astrocytes et les microglies semblent être des candidats intéressants pour l'étude du métabolisme de la morphine dans le SNC.

D) La morphine-3-glucuronide

Nous avons récemment publié une revue concernant les potentielles cibles moléculaires et cellulaires ainsi que les effets comportementaux de la M3G (Gabel et al., 2022) **(Annexe 1)**. En résumé, la M3G induit des comportements de type douloureux lorsqu'elle est injectée aux rongeurs par voie intrapéritonéale ou intrathécale (Lewis et al., 2010; Roeckel et al., 2017). Néanmoins, les acteurs moléculaire et cellulaires de ce phénomène ne sont pas clairement identifiés pour le moment. En effet, il existe un vif débat autour du récepteur qui serait à l'origine des effets de ce métabolite. Etant donné que sa structure est très proche de celle de la morphine, plusieurs groupes ont logiquement émis l'hypothèse d'une interaction avec le MOR. Cependant, l'affinité de la M3G pour ce récepteur est très faible (autour de 4µM) (Roeckel et al., 2017). D'autres groupes ont émis l'hypothèse d'une action sur le TLR4, étant donné que des expériences *in sillico* ont montré que la M3G, de la même manière que le LPS, pourrait se lier ce récepteur (Hutchinson et al., 2010; Lewis et al., 2010). Les mêmes auteurs de cette découverte ont néanmoins publié un article récemment montrant que la liaison de la M3G sur des préparations membranaires de souris sauvages ou déficientes pour le TLR2 et le TLR4 est sensiblement similaire, montrant indirectement qu'il n'existe finalement aucune affinité de la M3G pour ces deux récepteurs (Thomas et al., 2022). En résumé, aucune étude convaincante n'a été publiée concernant le récepteur sur lequel pourrait se lier la M3G et induire ses effets proalgiques.

Bien que le récepteur de la M3G soit toujours débattu, ses effets électrophysiologiques ont quant à eux bien été décrits dans certaines structures du SNC. Ainsi, des expériences de patch-clamp dans la ME ont montré que des doses élevées de M3G (1 à 100 µM) peuvent réduire l'amplitude des courants post-synaptiques inhibiteurs et que cet effet n'impliquait pas le MOR (Moran and Smith, 2002). Ces résultats témoignent d'une augmentation de l'activité neuronale au sein de la ME qui peut être corrélé à des comportement de type douloureux. Plus tard, il a été montré que la M3G avait un effet similaire sur des cultures de neurones hippocampiques et que cet effet mettait indirectement en jeu une activation des récepteurs NMDA (Hemstapat et al., 2003). De plus, il a été montré que la M3G peut induire une augmentation des niveaux de Ca^{2+} intracellulaires, ainsi que de la fréquence de PA sur des

cultures de neurones sensoriels issus de DRGs (Due et al., 2012; Due et al., 2014; Allette et al., 2017). En résumé, la M3G semble augmenter l'activité neuronale dans des structures clefs tels que les DRGs ou encore la ME pouvant ainsi générer des comportements de type douloureux. Il apparait alors que la balance métabolique entre la morphine et la M3G est cruciale dans les effets analgésiques de la morphine. Cette balance dépend directement des enzymes du métabolisme (les UGTs) dont l'expression a été montrée comme pouvant être directement modulée par certains facteurs de transcriptions clefs tels que l'Aryl Hydrocarbon Receptor *(AhR)* (Meech et al., 2019).

Conclusion sur la morphine

La morphine est une molécule extraite du pavot à opium. Celle-ci est utilisée comme traitement pharmacologique de référence pour soulager la douleur en milieu hospitalier. L'effet analgésique de la morphine repose sur son interaction avec son récepteur MOR dont l'activation permet d'inhiber l'activité des neurones. Néanmoins, l'effet analgésique de la morphine a été décrit comme étant diminué lors de douleurs neuropathique.

L'analgésie de la morphine est également liée au métabolisme (dégradation) de cette molécule. Lorsque la morphine est administrée dans l'organisme, ce dernier inactive cette molécule *via* des enzymes de métabolisme appelées UGTs. Ces enzymes conjuguent un groupement glucuronide (sucre) qui rend la molécule plus hydrophile, ce qui facilite son passage dans les reins et son élimination par l'urine.

Au sein du SNC, les UGTs sont surtout exprimées par les microglies et les astrocytes. De plus, il a été montré que des conditions neuroinflammatoires induisent une augmentation de l'expression des UGTs, notamment dans les astrocytes.

Partie 4 : Aryl Hydrocarbon Receptor

A) Généralités

L'AhR est une protéine appartenant à la famille PAS *(Per-Arnt-Sim)* qui se caractérise par la présence d'un domaine en hélice-boucle-hélice (Nebert, 2017). L'AhR se trouve dans un complexe cytoplasmique composé d'un dimère de Hsp90 *(Heat shock protein 90)*, d'une protéine de type immunophiline appelée AIP1 (*AHR-interracting protein*), de la phosphoprotéine p23 et la protéine tyrosine kinase non réceptrice également connue sous le nom de Src (Beischlag et al., 2008). Différents agonistes endogènes et exogènes ont été caractérisés pour ce facteur de transcription. En général, les métabolites du tryptophane sont capables de lier l'AhR et de l'activer (Heath-Pagliuso et al., 1998). Parmi ces métabolites, nous retrouvons la kynurénine, l'acide kynurénique ou encore le FICZ *(6-Formylindolo(3,2-b)carbazole)*. De plus, l'AhR est également activé par des dioxines, une famille de molécules organochlorées hétérocycliques et aromatiques ayant deux atomes d'oxygène dans un cycle aromatique (White and Birnbaum, 2009). Parmi ces dioxines, le TCDD *(2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxine)* a été décrit comme pouvant activer l'AhR avec une affinité de l'ordre du picomolaire (Giani Tagliabue et al., 2019). Plus récemment, il a été suggéré que la dopamine ou encore la mélatonine pouvaient également activer l'AhR avec des affinités de l'ordre du µM (Park et al., 2020; Slominski et al., 2023). Suite à son activation, le complexe se dissocie et l'AhR est transloqué dans le noyau de la cellule où il va pouvoir se lier à son translocateur nucléaire appelé Arnt *(Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator ;*(Haidar et al., 2021). Le complexe AhR-Arnt peut aller ensuite se fixer sur des séquences d'ADN et induire leur transcription. C'est pour cette raison que l'AhR est considéré comme un facteur de transcription. Le complexe AhR-Arnt va se lier aux séquences d'ADN appelées XRE *(Xenobiotic response element)* qui sont caractérisées par un motif 5'-TNGCGTG-3' (Reyes et al., 1992; Shen and Whitlock, 1992). L'AhR va reconnaitre et se fixer à la séquence 5'-TNGC-3' tandis que l'Arnt va reconnaitre et se fixer sur la séquence 5'-GTG-3'.

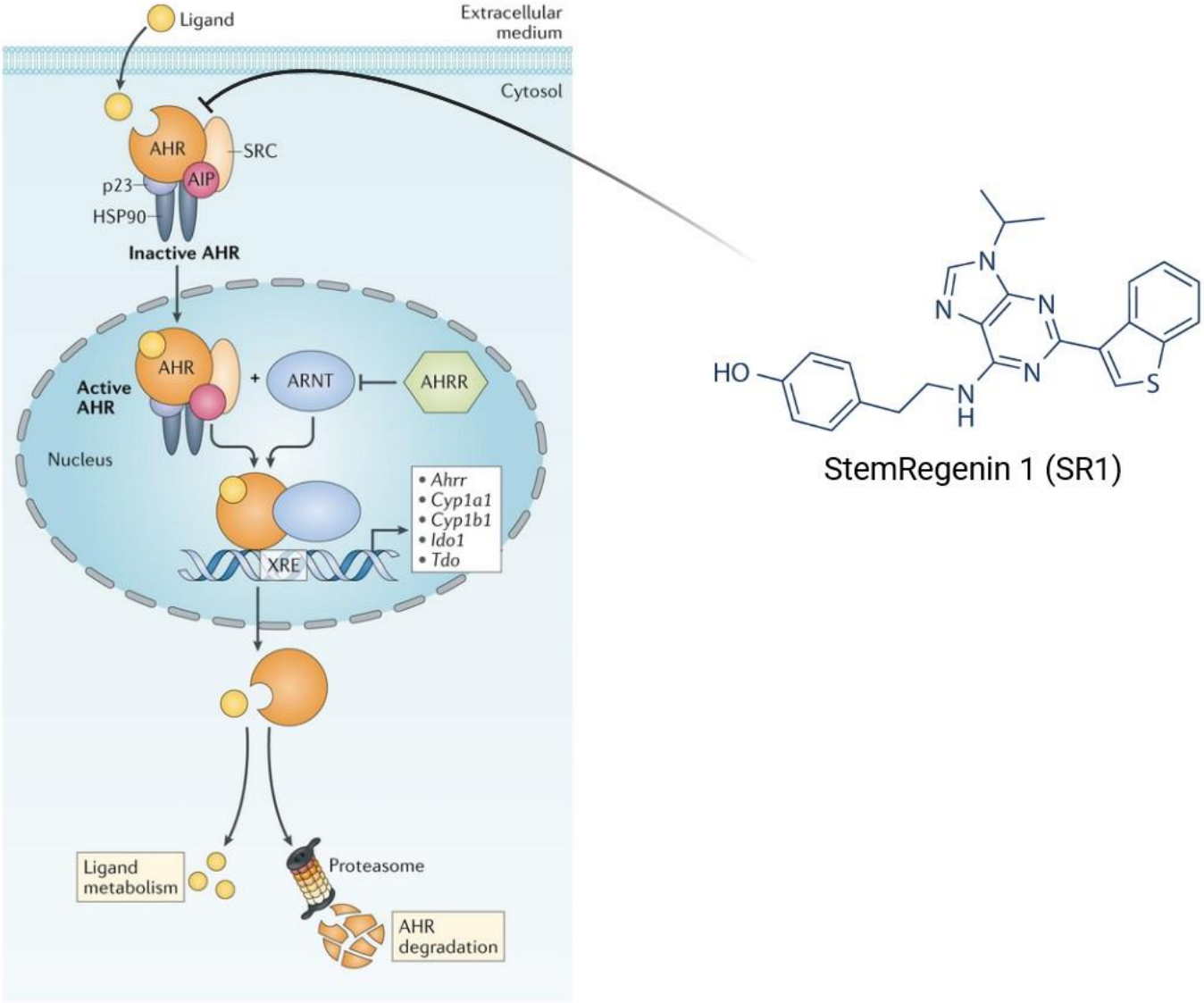


Figure 16: Voie d'activation canonique de l'AhR.

A l'état inactif, l'AhR se trouve dans le cytoplasme sous forme de complexe avec des protéines incluant l'Hsp90, l'AIP1, la SRC, ainsi que P23. Après activation de l'AhR par un ligand, le complexe est transloqué dans le noyau et l'AhR peut s'associer à l'Arnt l'expression de certaines enzymes tels que les CYPs ou les UGTs. Finalement, une fois que l'AhR a induit ses effets, ce dernier va retourner dans le cytoplasme de la cellule où il sera dégradé par le protéasome. Il existe également des molécules tels que la StemRegenin 1 (SR1) qui inhibent l'activation de l'AhR (Rothhammer and Quintana, 2019).

De cette manière, l'AhR a été montré comme induisant la transcription d'enzymes de métabolisme tels que les CYP *(Cytochromes p450)* 1A1, 1B1, ou encore son propre répresseur (AhRr) afin de créer une boucle d'autorégulation négative (Buckley and Klaassen, 2009; Bock and Bock-Hennig, 2010) **(Figure 16)**. Cette voie est décrite comme étant la voie canonique de l'activité de l'AhR. Néanmoins, il existe une voie alternative non-canonique (Grishanova and Perepechaeva, 2022; Grishanova et al., 2023) qui résulte d'une dimérisation avec d'autres partenaires, tels que la NF-κB *(Nuclear factor-kappa B)*, la protéine du rétinoblastome ou les récepteurs nucléaires (par exemple, le récepteur des œstrogènes α). Le dimère qui en résulte se lie aux séquences génomiques XRE et induit la transcription des gènes cibles de l'AhR.

Il existe plusieurs inhibiteurs mis sur le marché et utilisés afin de contrecarrer les effets de l'AhR. Parmi ces inhibiteurs, on retrouve notamment le SR1 *(Stemregenin-1)*, qui est actuellement en Phase II d'une étude clinique avec une utilisation *ex vivo* (Boitano et al., 2010; Wagner et al., 2016). Dans cette étude, les auteurs traitent des cellules souches hématopoïétiques provenant de patients *ex vivo* avec le SR1 afin d'inhiber leur différenciation et favoriser leur prolifération pour augmenter leur nombre. Suite à cela, ces cellules souche sont réinjectées chez les patients. Cependant, le mécanisme d'action concernant l'inhibition de l'AhR par le SR1 n'est pas encore bien caractérisé pour le moment.

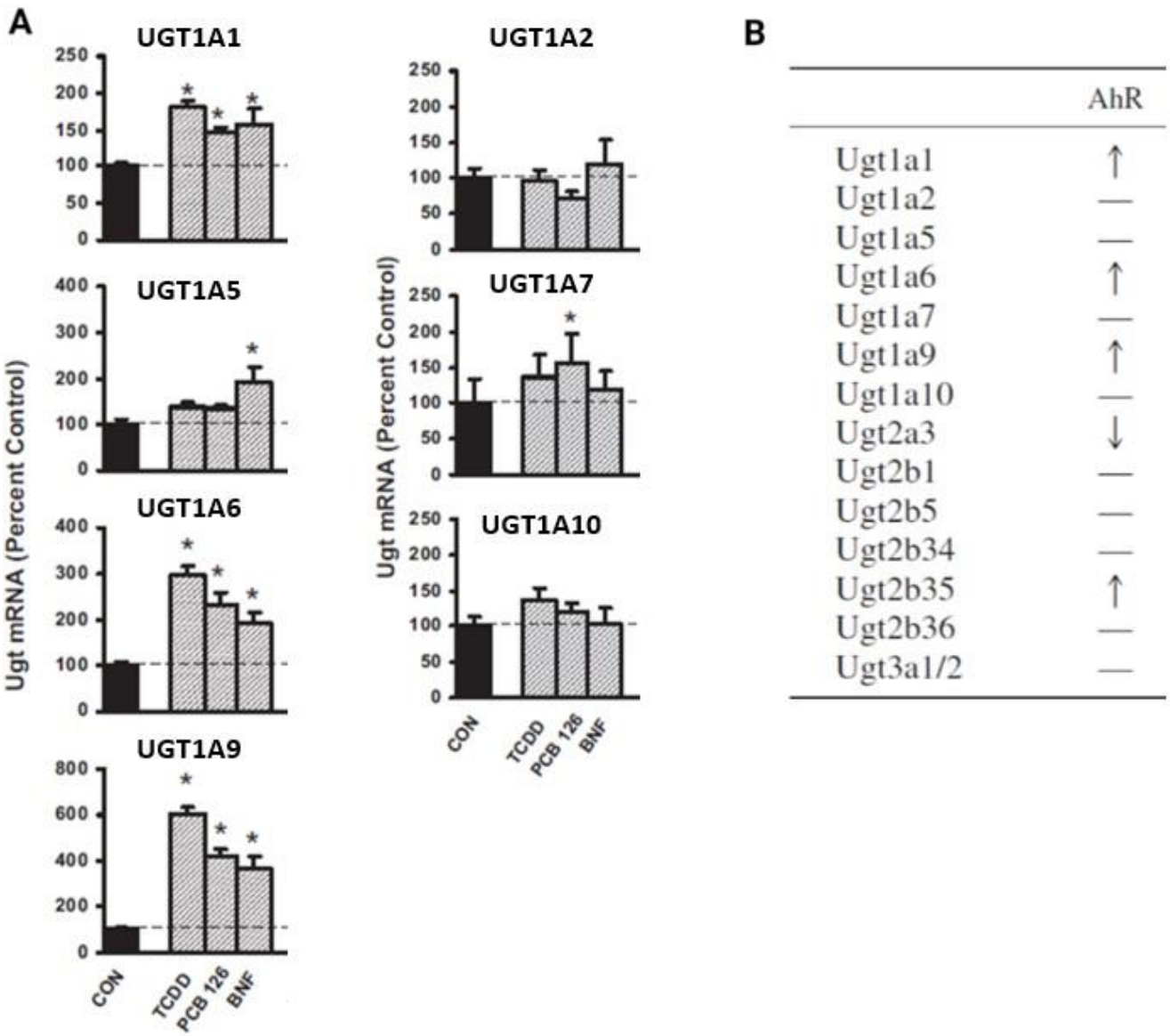


Figure 17: Induction de l'expression des UGTs par des ligands AhR *in vivo*.

(A) Des souris C57BL/6 âgées de 8 semaines ont été injectées avec différents agonistes AhR (TCDD : 34µg/kg ; Polychlorinated biphenyl 126 *[PCB126]*: 300µg/kg et β-naphthoflavone *[BNF]* : 200mg/kg). Les injections ont eu lieu 4 jours consécutifs et le foie des souris a été prélevé pour réaliser un test d'amplification de fragments d'ADN (Branched DNA Signal Amplification). **(B)** Il apparait une augmentation de l'expression de certaines isoformes des UGTs telles que l'UGT1A1, 1A6, 1A9 et 2B35 (Buckley and Klaassen, 2009).

Finalement, il a également été démontré que l'activation d'AhR peut induire l'expression d'autres enzymes de métabolismes, comme les UGTs, qui sont responsables du métabolisme de la morphine en M3G **(Figure 17)**.

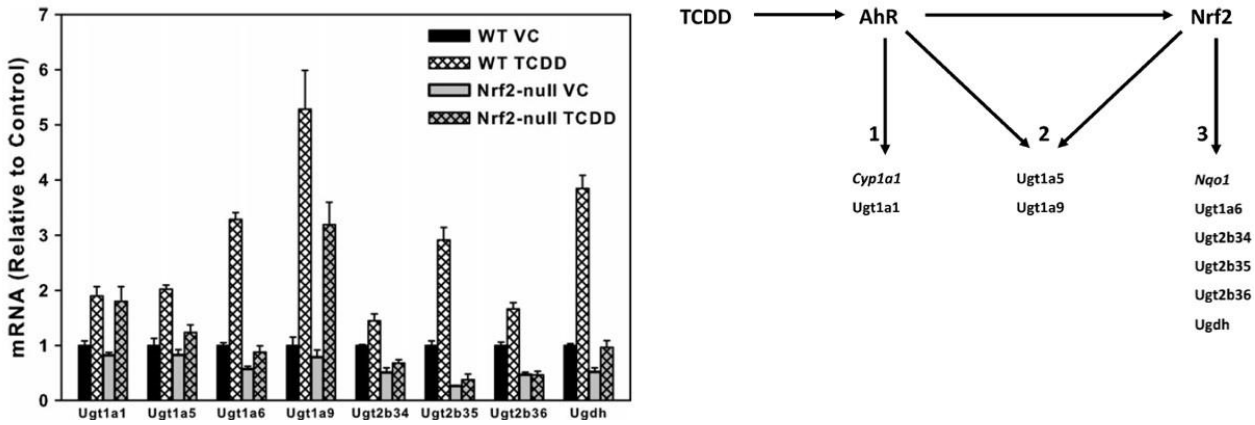


Figure 18: Induction des UGTs par l'AhR *via* le Nrf2.

L'AhR est capable d'induire l'expression des UGTs. Néanmoins, il semblerait que cet effet soit indirect pour certaines isoformes de ces enzymes. Des souris C57BL/6 sauvages (WT) ou déficientes pour le Nfe2l2 appelé aussi Nrf2 *(Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)* ont été injectées soit avec une solution véhicule (VC) soit avec du TCDD (30µg/kg), un agoniste de l'AhR. Le foie des souris a été collecté 24h après injection afin de réaliser une quantification de l'ARNm de certaines enzymes par un test d'amplification de fragments d'ADN (Branched DNA Signal Amplification). Il apparait que seule l'expression de l'isoforme 1A1 des UGTs soit directement induite par une activation de l'AhR. L'expression de toutes autres les isoformes testées est induite majoritairement par le Nrf2, dont l'expression peut elle-même être induite directement par l'AhR (Yeager et al., 2009).

Néanmoins, il semblerait que cet effet sur les UGTs, en tout cas certaines des isoformes soit indirect. En effet, l'expression d'un autre facteur de transcription nommé *Nfe2l2* ou Nrf2 *(Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 ; Nrf2 sera utilisé tout au long de ce manuscrit)* a également été montré comme étant induite par une activation de l'AhR (Miao et al., 2005). Les auteurs de cet article montrent qu'il existe des séquences XRE dans le promoteur de Nrf2 et qu'un traitement au TCDD induit l'expression de ce facteur de transcription. Par la suite, le groupe de Klaassen a montré que l'augmentation de l'expression de certaines UGTs observée auparavant après une activation d'AhR (notamment l'UGT1A6) dépendait en grande partie de Nrf2 (Yeager et al., 2009) **(Figure 18)**. En temps normal, le Nrf2 est activé par des signaux de type stress oxydatif qui augmentent alors l'expression des enzymes de détoxifications des ROS, ainsi que des enzymes telles les UGTs (Ngo and Duennwald, 2022). Il a été montré que des cultures primaires d'astrocytes soumises à des conditions de stress oxydatifs ont une activité de glucuronidation plus importante qu'en condition contrôle suggérant une augmentation de l'expression de l'UGT1A6 *via* Nrf2 (Gradinaru et al., 2012).

B) Rôle dans le SNC

Il a été montré chez les rongeurs, notamment chez la souris C57Bl/6N, que l'AhR est exprimé dans le neuroépithélium et le cœur durant le développement (Abbott et al., 1995). L'expression de ce facteur de transcription décroit ensuite dans ces tissus, tandis qu'elle augmente considérablement dans des tissus tels que le foie. Certains de ces résultats ont été retrouvés chez l'humain, montrant que l'AhR est exprimé dans de nombreux organes lors du développement (*e.g*., cerveau, cœur, poumon, foie, rein ;(Jiang et al., 2010). Les auteurs de cette étude ont également montré que l'AhR est également exprimé au niveau du placenta. Une autre étude utilisant une approche de Northern blot sur huit tissus humains différents a montré que l'ARNm de l'AhR était présent dans tous les tissus examinés (Dolwick et al., 1993). Chez l'adulte, les niveaux d'expression les plus élevés d'AhR ont été observés dans le placenta et les poumons, et les niveaux les plus faibles dans les reins, le cerveau et les muscles squelettiques. Des partenaires nécessaires au bon fonctionnement de l'AhR comme l'Arnt, ainsi que l'AhRr, ont également été retrouvés dans ces mêmes tissus (Jain et al., 1998; Sojka et al., 2000; Bernshausen et al., 2006). Ces données suggèrent ainsi un rôle important de l'AhR lors du développement.

a) Action sur les neurones

Une première étude transcriptomique a révélé un rôle clef de ce facteur de transcription dans le développement des neurones GABAergiques du télencéphale ventral à E13.5 et ce, 48h après une exposition à 5µg/kg de TCDD (Gohlke et al., 2009). Les résultats de cette étude suggèrent que l'exposition au TCDD, qui active l'AhR, altère le développement des neurones GABAergiques en induisant la voie Notch connue pour inhiber la différenciation neuronale (Borghese et al., 2010; Peng et al., 2019). L'implication directe de l'AhR dans l'activité neuronale a été démontrée pour la première fois en incubant du TCDD avec des neurones hippocampiques en culture (Hanneman et al., 1996). Dans cet article, les auteurs décrivent une élévation des concentrations de Ca^{2+} intracellulaires qui pourrait dépendre de la PKCα *(Protein Kinase C α)*. Par ailleurs, il a été montrée que cette augmentation de Ca^{2+} intracellulaire pourrait être liée au récepteurs NMDA dans les cellules en grains du cervelet (Kim and Yang, 2005). D'autres études ont indiqué que l'activation de l'AhR permet de recruter la CAMK *(Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase)* de type IV, permettant à son tour de recruter la CBP *(CREB-binding protein)* afin d'induire la synthèse de la sous-unité NR2A des récepteurs NMDA (Lin et al., 2008; Lin et al., 2009). Plus récemment, une étude a caractérisé l'expression de l'ARNm de l'AhR dans le cortex, l'hippocampe, le cervelet et le bulbe olfactif de souris C57BL/6J en utilisant l'hybridation *in situ* (Kimura et al., 2021). Le même groupe a également décrit l'expression de l'AhR dans les neurones noradrénergiques du locus coeruleus (Kimura et al., 2021). De plus, il a été montré qu'une injection unique de TCDD (20µg/kg) induit la translocation nucléaire de ce facteur de transcription dans ces mêmes neurones. Une augmentation de l'expression des gènes cibles a également pu être observée (CYP1A1, 1B1). Pour conclure, il semblerait que l'AhR est non-seulement capable de réguler l'activité neuronale, mais également d'influencer les enzymes de synthèse de certains neurotransmetteurs. En effet, il a été montré qu'une exposition au TCDD diminue les niveaux de GAD67 (Hays et al., 2002) et augmente les niveaux de la tyrosine hydroxylase dans des culture cellulaire de neurones (Unkila et al., 1993; Akahoshi et al., 2009). Ces observations s'accompagnent d'une modification des niveaux de L-Dopa, dopamine, sérotonine ou encore de 5-HIAA *(Acide 5-hydroxyindolacétique)*.

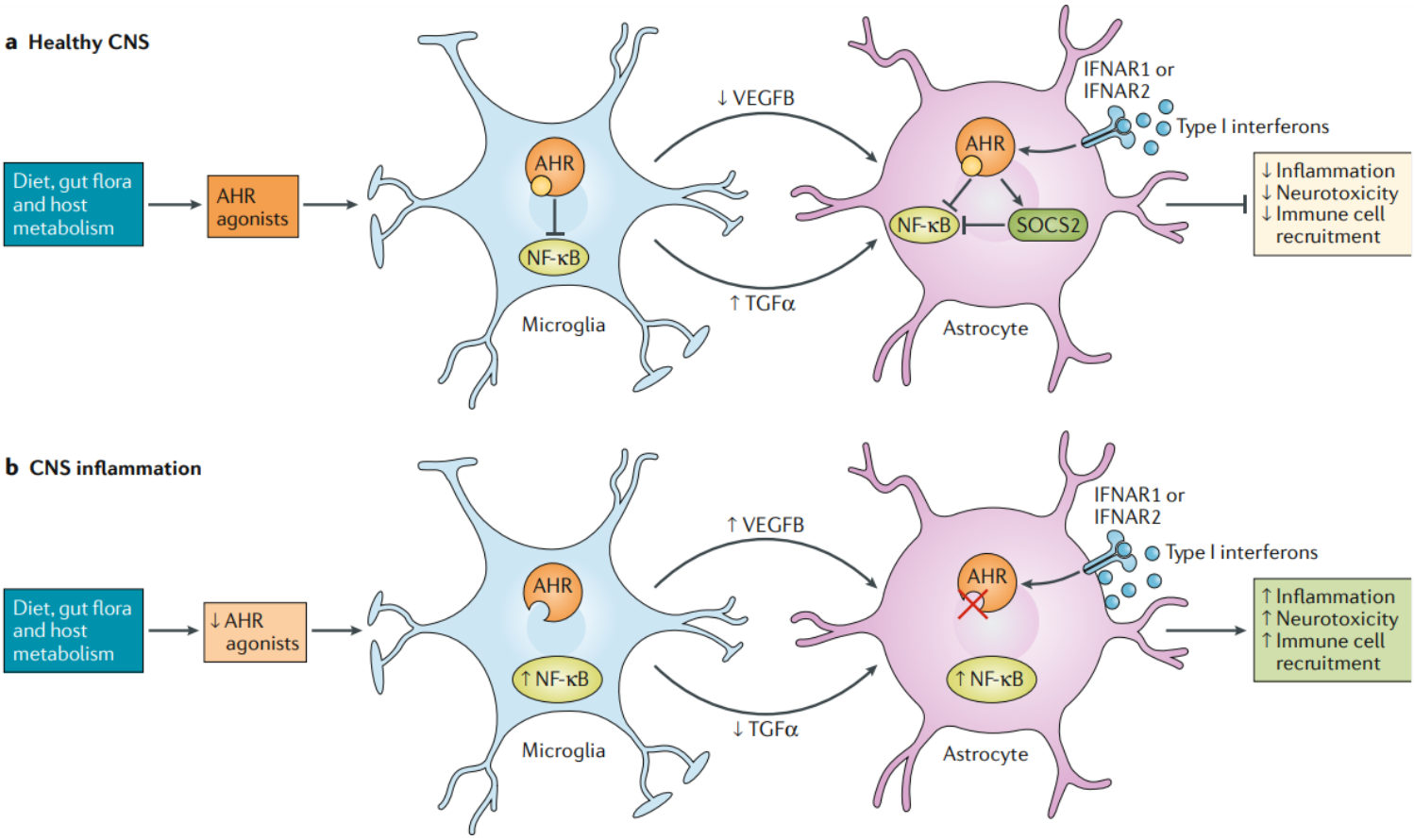


Figure 19: Effet des agonistes AhR sur les microglies et les astrocytes.

Les agonistes de l'AhR issus de l'alimentation, de la flore intestinale et du métabolisme de l'hôte traversent la BHE pour activer l'AhR du SNC. Dans les astrocytes et la microglie, l'activation de l'AhR inhibe la signalisation pro-inflammatoire dépendant du NF-κB interférant avec les programmes transcriptionnels associés au recrutement des monocytes *via* la production de chimiokines, l'activation des cellules myéloïdes du SNC et la neurotoxicité directe (Rothhammer and Quintana, 2019). **IFNAR :** récepteur de l'interféron de type I ; **SOCS2** : suppresseur de la signalisation des cytokines 2 ; **TGFα** : facteur de croissance transformant-α ; **VEGFB :** facteur de croissance de l'endothélium vasculaire B.

b) Action sur les glies

Les microglies et les astrocytes ont également été décrits comme exprimant l'AhR (Filbrandt et al., 2004; Tanaka et al., 2021). L'hypothèse de l'équipe de Franciso Quintana était que l'AhR gliale limite l'inflammation au sein du SNC (Rothhammer et al., 2016; Rothhammer et al., 2018; Rothhammer and Quintana, 2019). Plus précisément, dans une série d'articles publiée par cette équipe, les auteurs montrent que l'AhR microglial et astrocytaire permet de réduire l'inflammation centrale observée dans un modèle murin de sclérose en plaques *via* la production de TGFα qui inhibe une voie pro-inflammatoire dépendante de VEGF-B (*Vascular endothelial growth factor B* ; (Rothhammer et al., 2016; Rothhammer et al., 2018) **(Figure 19)**. De façon intéressante, il a également été démontré qu'une diminution des concentrations d'agonistes AhR plasmatiques est corrélé avec l'avancée de la sclérose en plaque chez des patients humains (Tsaktanis et al., 2021). Le ratio TGF-α/VEGF-B sérique est alors modifié en fonction du sous-type et de la gravité de la maladie. Ainsi, ce ratio pourrait potentiellement représenter un nouveau marqueur pathologique et servir de nouvelle ligne directrice pour les stratégies immunomodulatrices visant à augmenter le taux de TGF-α et à diminuer celui du VEGF-B dans les cas de sclérose en plaques (Cirac et al., 2021). En résumé, si l'AhR est moins activé dans le SNC, cela est corrélé à une augmentation de l'inflammation qui pourrait induire une sclérose en plaques. Cependant, une équipe a également étudié les effets d'une exposition à la dioxine sur la myélinisation du SNC pendant la gestation (Fernandez et al., 2010). L'administration d'une unique dose de TCDD (0,7 µg/kg) à des rates au jour 18 de gestation provoque chez les jeunes rats (P2/3, P14, P30 et P135) une modification de l'expression de différents marqueurs oligodendrocytaires en fonction de l'âge des ratons. En effet, une augmentation de l'expression d'Olig1 (*Oligodendrocyte transcription factor 1* ; marqueur des cellules précurseurs indifférenciées de P14 à P135), une augmentation de PDGFRα (*Platelet-derived growth factor receptor A* ; marqueur des oligodendrocytes en prolifération entre P2/3 et P14) et ainsi qu'une diminution de la MBP (*Myelin basic protein* ; marqueur des oligodendrocytes matures à P135) a été observée. En outre, l'exposition au TCDD induirait un retard de différenciation et de maturation des oligodendrocytes. De plus, une observation assez similaire a été réalisée sur le système nerveux périphérique (Grehl et al., 1993). En effet, une injection unique de TCDD (8,8µg/kg) chez des rates gestantes provoque une diminution de la vitesse de conduction des fibres motrices et sensorielles, témoignant ainsi d'une atteinte potentielle des cellules de Schwann. D'autres travaux ont

également été réalisés sur effets de l'AhR sur les astrocytes. Une première étude a caractérisé une modification de l'homéostasie calcique dans des cultures primaires d'astrocytes de rat (Legare et al., 1997). Cependant, l'évolution temporelle rapide du Ca^{2+} observée dans cette étude suggère que la réponse du TCDD ne passe pas par une action nucléaire de l'AhR. D'autre part, il a été montré que l'exposition au TCDD d'astrocytes en culture augmente leur mobilité, un processus qui peut dépendre d'une signalisation calcique (Chen et al., 2019). Une étude récente a montré que l'activation de l'AhR astrocytaire induit une augmentation de l'activité neuronale dans un contexte de maladie rénale chronique (Huang et al., 2023). Finalement, il s'est avéré que l'activation de l'AhR astrocytaire avec du TCDD induit la mort neuronale par apoptose (Wan et al., 2015). En effet, lorsque des cellules PC12 (neuroblastome) sont incubées dans un milieu conditionné provenant d'astrocytes stimulés au TCDD, ces dernières meurent *via* l'action du TNFα libéré par les astrocytes.

c) Lien entre AhR et la douleur

Un premier article publié en 2001 a montré que l'inhibition d'AhR dans un modèle de douleur inflammatoire induit par la carrageenan soulage les comportements de type douloureux (Gentilli et al., 2001). Néanmoins, les données de cet article sont à discuter de mon point de vue à cause de l'utilisation du resveratrol comme inhibiteur. En effet, on sait maintenant que cette molécule a énormément de cibles qui sont considérées comme acteurs clefs dans la mise en place de la douleur neuropathique (Tao et al., 2016; Xu et al., 2018; Dong et al., 2022). Cependant, un article récent utilisant des souris déficientes pour l'AhR a montré que les comportements de type douloureux étaient augmentés chez ces souris par rapport à des souris sauvages dans un modèle neuropathique CCI (Sheu et al., 2022). Ces résultats corrèlent avec une augmentation des niveaux de TNFα spinal et supra-spinal (cortical et hippocampique), en plus de réduire le nombre de terminaisons sensorielles dans la peau de la patte lésée. Finalement, une étude récente a étudié le rôle de l'AhR dans les migraines chroniques induites par injection de nytroglycérine chez des rats (Yang et al., 2023). Dans cette étude, les auteurs montrent que l'expression de l'AhR est diminuée dans le noyau spinal du trijumeau. De plus, l'activation de l'AhR attenue les comportements douloureux de type migraineux chez les rats. A l'inverse, l'inhibition de l'activité de ce facteur de transcription exacerbe les comportements de type migraineux chez les animaux. Les auteurs expliquent ainsi ce phénomène par l'action potentielle de la voie de signalisation de l'AhR qui rétablirait

l'équilibre des facteurs de transcription liés aux cellules Treg/Th17 ainsi que les facteurs pro-inflammatoires secrétées par ces cellules. En résumé, les études liant l'AhR à des comportements de type douloureux chez les animaux sont rares et discordants dans la littérature. En effet, les 2 articles récents utilisant le modèle de CCI et de migraine chronique montrent des résultats opposés quant à l'effet de l'AhR et sa délétion/inhibition dans les effets douloureux.

Conclusion sur l'Aryl Hydrcarbon Receptor

L'AhR est un facteur de transcription qui régule l'expression de certains gènes. Après activation, l'AhR est transloqué dans le noyau et se lie à des séquences d'ADN pour induire l'expression de gènes comme les UGTs, enzymes de métabolisme de la morphine.

Tout comme les UGTs, l'AhR est également exprimé par les microglies et les astrocytes dans le SNC. Plusieurs études suggèrent que des conditions neuroinflammatoires induisent une augmentation de son expression/activation dans ces cellules.

Plusieurs inhibiteurs de ce facteur de transcription ont été développé pour inhiber l'activation de l'AhR. Parmi ces inhibiteurs, le SR1, qui est actuellement en Phase II d'une étude clinique, représente un bon candidat pour inhiber l'activité de l'AhR.

Objectifs de thèse

La littérature montre que l'effet analgésique de la morphine est diminué lors de douleurs neuropathiques. **Mon hypothèse de travail est que cette diminution est reliée à une augmentation du métabolisme de cette molécule dans le SNC.** En effet, dans un article récent publié par notre équipe, nous avons montré qu'un tel mécanisme existe dans le cerveau et plus particulièrement dans des structures importantes pour l'effet analgésique de la morphine (PAG, ME etc…). Une augmentation du métabolisme est synonyme d'une plus forte dégradation et donc d'une réduction des niveaux de morphine et d'une augmentation des niveaux de la M3G, son métabolite principal décrit comme proalgique (génère de la douleur).

Jusqu'au commencement de ma thèse, aucune étude ne s'était intéressée au rôle du métabolisme de la morphine dans le SNC dans son effet analgésique. D'après les données de la littérature, les cellules gliales, notamment les microglies et les astrocytes sont de bons candidats pour étudier ce mécanisme. En effet, ces cellules sont décrites pour exprimer les enzymes de métabolisme de la morphine, les UGTs. **De plus, des données publiées dans la littérature montrent que les astrocytes réactifs montrent des niveaux d'UGTs qui sont plus élevés comparés à des astrocytes contrôles.** En se basant sur l'ensemble de ces données, ma thèse avait pour but de :

1) Caractériser le métabolisme central de la morphine dans les microglies et les astrocytes *in vitro.*

2) Etudier l'effet d'une neuroinflammation sur le métabolisme central de la morphine dans les microglies et les astrocytes *in vitro*.

3) Augmenter l'effet analgésique de la morphine dans un modèle de douleurs neuropathiques (SNI) *in vivo*.

Matériel – Méthodes

1) Animaux

Ce projet a été construit autour d'un axe *in vitro* (cultures cellulaires gliales primaires) et d'un axe *in vivo* (étude de la neuropathie), dans lesquels des animaux ont été utilisés. Les animaux possédaient un fond génétique C57Bl6/J et étaient âgés de 0 à 5 jours pour la partie *in vitro* (Chronobiotron, INCI, France) et de 10 semaines pour la partie *in vivo* (Charles River, L'Arbresle, France). Pour la partie *in vivo*, les animaux ont été hébergés à 5 par cages avec un cycle lumière/obscurité de 12h/12h ainsi qu'un accès à de l'eau et de la nourriture *ad libitum*. Etant donné l'importance du sexe, qui est considéré comme une variable biologique, nous avons décidé de réaliser toutes nos expériences *in vivo* chez des souris mâles et femelles. En ce qui concerne la partie *in vitro*, nous avons également utilisé des animaux des deux sexes mais les résultats ont été regroupés. Toutes les procédures réalisées étaient en accord avec les directives Européennes (2010/63/EU) et ont été approuvées par un comité d'éthique régional (CREMEAS) et par le Ministère de l'Agriculture (Licence No : APAFIS #37356-2022051311406728 v4 délivré au Dr. Goumon). De plus, la retranscription des résultats qui concernent les expériences animales est en accord avec les directives ARRIVES.

2) Méthodes *in vitro*

A) Culture cellulaire primaire de cellules gliales mixtes

Après décapitation des nouveau-nés, le cerveau est mis en évidence et prélevé délicatement à l'aide d'une spatule. Celui-ci est placé dans 10mL d'une solution saline équilibrée de Hank (HBSS, contenant 6g/L de glucose, 10mM de HEPES *(Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique)* et 1% de de pénicilline (50U/mL) / streptomycine (50µg/mL) (P/S) durant 10 secondes pour éliminer le sang résiduel. Une fois lavé, le cerveau est placé dans 10mL d'éthanol à 70% pendant 10 secondes afin de tuer les cellules constituant les méninges dans le but d'éviter toute contamination par des fibroblastes et cellules endothéliales. Le cerveau est ensuite placé sous loupe binoculaire dans du HBSS et est isolé du cervelet et des bulbes olfactifs à l'aide de pinces et d'un scalpel. Les méninges sont ensuite délicatement retirées tout autour du cerveau et ce dernier est ensuite coupé en petits morceaux de 2 à 3mm.

Le tissu est ensuite dissocié d'abord chimiquement, puis mécaniquement. La dissociation chimique est réalisée en incubant 1.5mL de trypsine (25mg/mL) dans un volume

final de 30mL de HBSS pendant 15min à 37°C en agitant délicatement toutes les 5 min. Après 15min d'incubation, 1.2mL d'inhibiteur de trypsine (1mg/mL) et 750µL de DNASE I (10mg/mL) ont été ajoutés pour respectivement mettre fin à la dissociation chimique et digérer l'ADN pouvant provenir de cellules mortes, considéré comme signal apoptotique par les cellules vivantes. Les tubes sont ensuite centrifugés à 500 g pendant 5 min. Le surnageant a été aspiré puis le culot a été repris dans 5 mL de milieu de culture DMEM/F12 contenant 10% de sérum de veau fœtal (FBS), 1% de P/S et 1% de glutamine (Glu ; 2mM). Le tissu est finalement dissocié mécaniquement à l'aide d'une pipette P1000 en faisant une dizaine de va-et-vient. Le tube est laissé à reposer pendant 2min afin de laisser le culot constituant le tissu non dissocié se former. Les cellules dissociées se retrouvent alors dans le surnageant et sont récupérées avec une P1000 dans un nouveau tube. Le processus est répété une deuxième fois afin de récupérer un maximum de cellules. Les cellules récupérées sont ensuite centrifugées à 500g pendant 5min, le surnageant est aspiré et le culot est resuspendu dans 10mL de milieu de culture. Un comptage cellulaire est ensuite réalisé en mélangeant 30µL de cellules à 30µL d'une solution de bleu de trypan à 0.4% (m/v). Le bleu de trypan est un colorant d'exclusion permettant de marquer les cellules mortes en bleu car elles sont incapables d'exclure le colorant hors de la cellule du fait d'un déficit d'ATP. Le comptage est effectué sur 10µL du mélange sur une cellule de Neubauer. Une fois le comptage réalisé, un total de 1.500.000 de cellules sont ensemencées dans des Flasks T-25 traitées au préalable avec 3mL de Poly-D-Lysine (PDL ; 10µg/mL diluée dans de l'eau stérile) pendant 2 heures puis lavées 3 fois avec de l'eau stérile et enfin séchées sous la hotte. Les cellules sont incubées avec 8mL de milieu de culture et placées dans un incubateur à 37 °C dans une atmosphère contenant 5% de CO_2. Le milieu a été changé le jour suivant la mise en culture puis 7 jours plus tard. Une fois les cellules arrivées à confluence, c'est-à-dire au bout d'une semaine et demie après la mise en culture, avec également une importante présence microgliale, celles-ci ont été utilisées pour les différentes expériences de métabolisme sur cultures mixtes ou purifiées (voir ci-dessous), d'immunomarquage ou de quantification par ELISA *(Enzyme-linked immunosorbent assay)*.

B) Principe du MACS

La purification des microglies a été réalisée par MACS *(Magnetic activated cell sorting)*. Le principe de cette technique repose sur l'expression de marqueurs extracellulaires spécifiquement exprimés par différents types cellulaires. Ainsi, il est possible de cibler ces

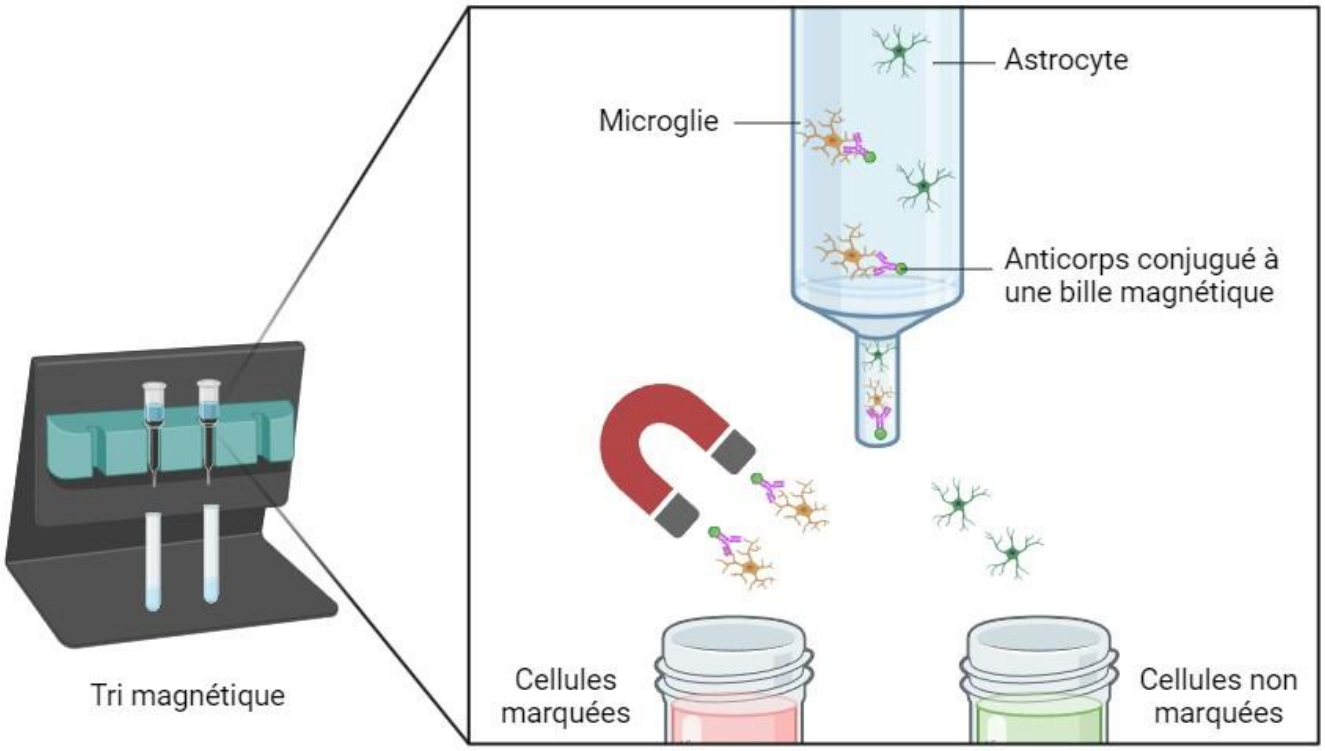


Figure 20 : Principe de la purification de microglies par tri magnétique (MACS).

Les cellules mixtes en suspension sont incubées avec des anticorps reconnaissant le CD11b couplés à une bille magnétique. Seules les microglies sont marquées avec ces anticorps. Ensuite, les cellules sont chargées sur une colonne montée sur un aimant. L'aimant va permettre de retenir spécifiquement les cellules liées aux anticorps couplés aux billes magnétiques (microglies) tandis que les cellules non marquées (astrocytes) ne sont pas retenues par le champ magnétique et sont entrainées dans le volume de lavage.

marqueurs à l'aide d'anticorps qui sont couplés à des billes magnétiques **(Figure 20)**. Une fois la suspension cellulaire marquée avec ces anticorps, celle-ci est chargée dans une colonne placée dans un aimant. Les cellules marquées par les particules magnétiques sont retenues sur la colonne tandis que les cellules non marquées sont éluées dans un premier tube (fraction négative). La colonne est alors sortie de l'aimant pour éluer les cellules marquées dans un deuxième tube (fraction positive). Le marqueur des microglies utilisé était l'Intégrine Alpha M (ITGAM ou CD11b ; Miltenyi Biotec).

i. Tri cellulaire des microglies

Lors d'une culture gliale mixte, les premières cellules à se développer sont les astrocytes. Celles-ci forment une couche unicellulaire qui produit un substrat favorable pour la croissance et le développement des microglies. Ainsi, plusieurs facteurs astrocytaires ont été identifiés comme étant essentiels pour les microglies : CSF1 *(Colony stimulating factor 1)*, TGFβ2 et cholestérol (Bohlen et al., 2017). De ce fait, il est nécessaire d'attendre au moins 2 semaines pour pouvoir avoir assez de microglies afin d'en purifier un maximum. Les microglies purifiées sont cultivées avec du milieu conditionné par les cellules gliales mixtes permettant d'avoir l'ensemble des facteurs permettant leur survie. Ces milieux conditionnés sont directement issus des flasks T-25 utilisés pour la purification des microglies et sont filtrés avec des filtres 0.22µm afin d'éliminer toutes cellules flottantes.

Une fois ce stade atteint, les cellules ont été détachées des Flasks T-25 avec 7mL d'une solution de 0.25% trypsin-EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid* ; 5min à 37°C). Au bout des 5min, la réaction a été arrêtée en ajoutant 7mL de milieu de culture contenant 10% de FBS et les cellules ont été transférées dans des tubes falcon 15mL pour être centrifugées à 500g pendant 5min. Le surnageant a ensuite été aspiré et les culots de cellules ont été repris dans 80µL d'une solution de tampon phosphate salin (PBS) contenant 0,5% d'albumine de sérum bovin (BSA) et 20µL d'une solution d'anticorps anti-CD11b couplés à des billes magnétiques. Le PBS-BSA permet d'offrir un milieu isotonique aux cellules afin d'assurer leur survie, tout en bloquant les sites aspécifiques pendant le temps d'incubation avec les anticorps. Les cellules sont laissées 15min au contact des cellules à 4°C puis elles sont lavées en ajoutant 3mL de PBS-BSA. Ensuite, les cellules sont centrifugées (5min à 500g) et resuspendues dans 1mL de PBS-BSA avant d'être chargées sur les colonnes. Après chargement des cellules, les colonnes sont lavées à 3 reprises avec 500µL de PBS-BSA puis les cellules sont éluées hors de l'aimant

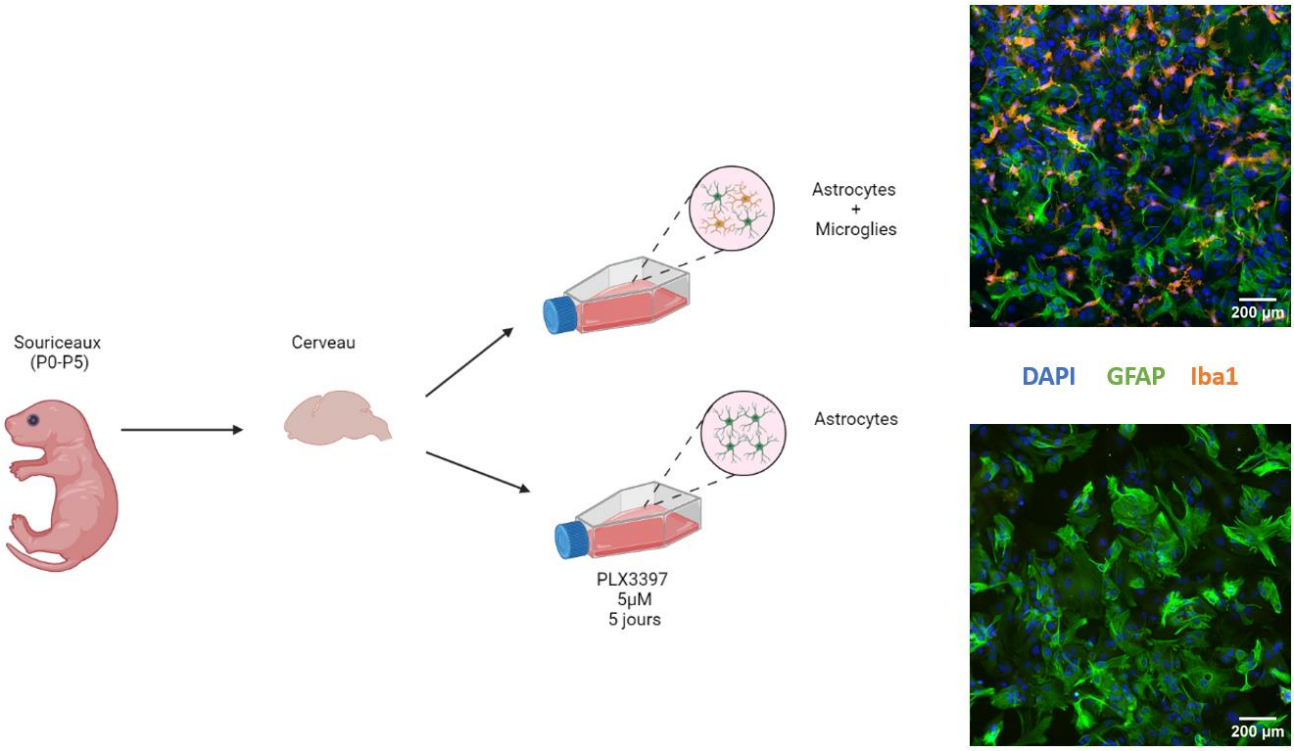


Figure 21 : Protocoles de cultures cellules gliales mixtes et d'astrocytes purifiés.

Pour obtenir des astrocytes purifiés, les cultures de cellules gliales mixtes sont traitées avec 5µM de PLX3397 durant 5 jours. La pureté des cultures a été validée par une immunocytochimie permettant de détecter la présence de microglies (Iba1) et d'astrocytes (GFAP). Les noyaux ont été marqués au DAPI.

Espèce hôte	Antigène	Conjugué	Dilution	Détection	Référence
Souris	GFAP	-	1/5000	Primaire	Dako (Z0334)
Lapin	GFAP	-	1/5000	Primaire	Invitrogen (GA5)
Chèvre	Iba1	-	1/1000	Primaire	Abcam (ab5076)
Lapin	Iba1	-	1/500	Primaire	Wako (019-19741)
Lapin	UGT1A	-	1/500	Primaire	Genetex (GTX114131)
Âne	Lapin	Cy5	1/1000	Secondaire	Jackson IR (711-175-152)
Âne	Chèvre	Alexa 488	1/1000	Secondaire	Invitrogen (A11055)
Ane	Chèvre	Cy3	1/1000	Secondaire	Jackson IR (705-165-147)
Âne	Souris	Alexa 488	1/1000	Secondaire	Invitrogen (A21202)

Tableau 1: Tableau récapitulatif des anticorps utilisés.

avec 1mL de PBS-BSA. Finalement, les cellules sont centrifugées (5 min à 500 g) puis reprises dans 1 mL de milieu de culture conditionné et un comptage cellulaire est effectué sur 30 µL. Suite au comptage, un total de 50000 cellules est ensemencé par puit dans des plaques 96 puits dans un volume final de 200 µL de milieu de culture conditionné.

C) Culture primaires d'astrocytes

Le protocole de culture primaire d'astrocytes utilisé ressemblait sensiblement au protocole pour obtenir des cellules gliales mixtes, avec quelques modifications. Une fois les cellules mises en culture, celles-ci étaient directement incubées avec 5µM de PLX3397 (abmole) dans un volume total de 8mL. Le PLX3397 est un inhibiteur du récepteur CSF1R *(Colony stimulating factor 1 receptor)*, responsable du bon développement et de l'homéostasie microgliale. L'inhibition de ce récepteur permet d'éliminer spécifiquement les microglies dans les cultures gliales **(Figure 21)**. Vingt-quatre heures après incubation de PLX3397, le milieu est changé pour être de nouveau incubé avec 5µM de PLX3397 dans un volume de 10mL pendant 4 jours supplémentaires. Cinq jours après mise en culture, les Flasks T-25 sont lavées 3 fois avec 10mL de PBS et les cellules sont finalement incubées avec du milieu de culture DMEM/F12 (10% FBS, 1% P/S, 1% Glutamine). Ainsi, les cultures sont laissées au moins 1 semaine en présence de ce milieu frais pour permettre le bon développement des astrocytes pour ensuite utiliser ces cellules dans les différentes expériences.

D) Immunomarquages

Des marquages sur cellules ont été effectués pour vérifier la composition cellulaire des cultures gliales mixtes, l'expression des UGTs par les microglies et les astrocytes et enfin pour vérifier la pureté des microglies et des astrocytes. Les marquages ont été soit réalisés sur des lamelles en verres stérilisées suite à une exposition de 20min à des rayonnements ultraviolets puis traitées au préalable avec de la PDL soit dans des plaques 96 puits également traitées à la PDL. Dans tous les cas, les cellules sont d'abord fixées avec 4% de paraformaldéhyde (m/v) durant 20min, puis lavées 3 fois avec du PBS contenant 0.1% de Tween 20 (PBS-T ; v/v), ce qui permet de perméabiliser les membranes des cellules. Ensuite, les cellules sont incubées 45min avec une solution de BSA 5% (m/v) afin de réduire le marquage aspécifique par les anticorps. Une fois cette étape réalisée, les cellules sont incubées avec les anticorps primaires durantune nuit à 4°C sous une agitation de 200rpm **(Tableau 1)**. Puis, trois lavages de 5min au PBS-T

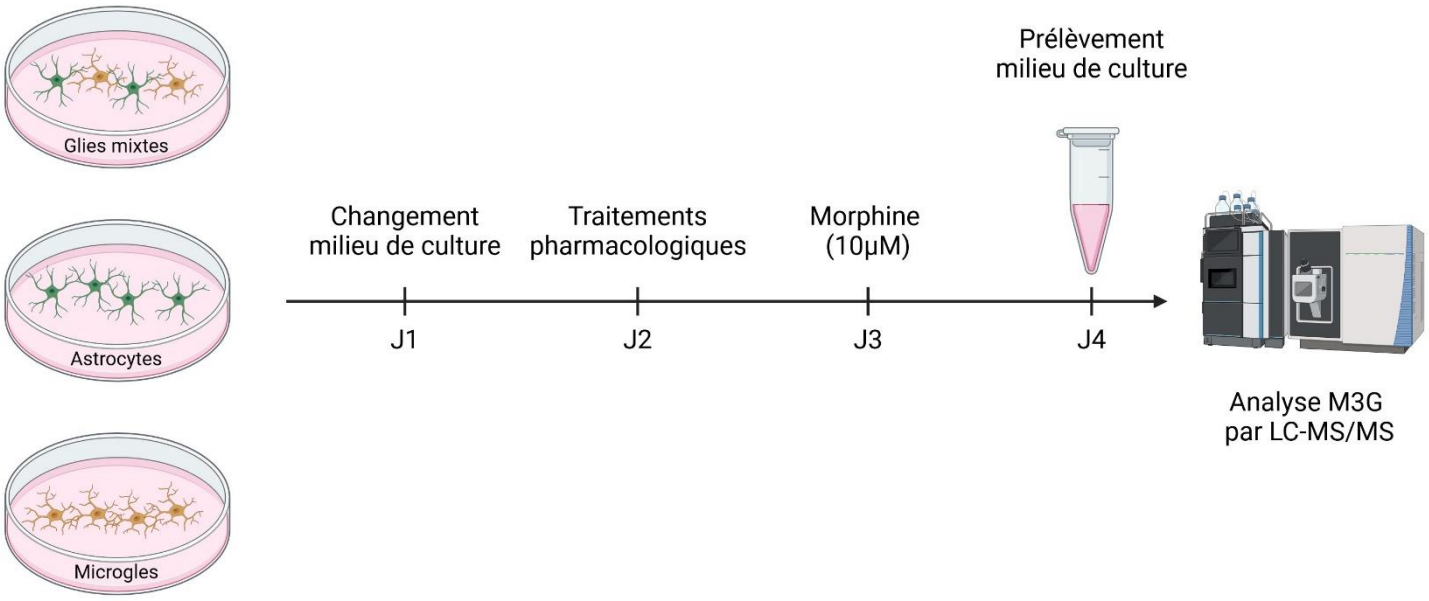


Figure 22 : Protocole d'étude du métabolisme de la morphine par les cellules gliales *in vitro*.

Après ensemencement des cellules, le milieu de culture est changé à J1 afin de les laisser récupérer. A J2, les cellules sont stimulées durant 24h avec différents agents pharmacologiques qui ont permis de voir l'implication de différentes voies intracellulaires dans le métabolisme de la morphine. A J3, les milieux de culture sont remplacés par un milieu contenant 10µM morphine (durant 24h). Finalement, à J4, les milieux de culture des cellules sont récupérés et un dosage par LC-MS/MS a été réaliser afin de déterminer les niveaux de M3G.

sont successivement réalisés le jour suivant. Une solution contenant les anticorps secondaires couplés à un fluorochrome est ensuite incubée pendant 2h à température ambiante dans le noir et sous une agitation de 200rpm. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois au PBS-T puis incubées 1min avec une solution de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI ; 2µg/mL) pour marquer les noyaux. Après 3 derniers lavages, les lamelles en verre sont séchées puis montées sur une lame avec 5µL d'un milieu de montage (ProLong™ Gold Antifade Mountant). Pour les marquages dans les plaques 96 puits, les puits sont tout simplement remplis avec 200µL de PBS jusqu'à l'acquisition des images au microscope à épi fluorescence inversé. Un microscope ZEISS Axio Imager 2 piloté par le logiciel ZenBlue a été utilisé pour les prises d'images des lames, tandis qu'un microscope Zeiss Observer 7 également piloté par un logiciel ZenBlue a été utilisé pour les prises d'images des plaques 96 puits.

E) Ré-analyse des données de séquençage d'ARNm

Afin d'étudier le profil transcriptomique des microglies et des astrocytes, j'ai réanalysé des données de RNAseq venant d'une banque de données de l'équipe de Ben Barres (Guttenplan et al., 2020). Dans cette étude, les auteurs ont purifié des microglies par MACS, qu'ils ont stimulées ou non avec du LPS (50ng/ml) pendant 24h avant de séquencer leur ARNm (Bohlen et al., 2019). En ce qui concerne les astrocytes, les auteurs ont purifié ces cellules avec la technique de l'immunopanning, qui consiste à immunoprécipiter des cellules à l'aide d'anticorps dans une boite de pétri (Foo et al., 2011). Une fois purifiées, les astrocytes ont été stimulés avec de l'IL1α (3ng/mL), du TNFα (30ng/mL) et du C1q (400ng/mL) pendant 24h. Ensuite, les ARNm des cellules ont été séquencés en utilisant une plateforme Illumina HiSeq 4000 avec 3 réplicats biologiques pour chaque expérience. Les données brutes, dont l'analyse statistique a déjà été réalisée, ont été récupérées sous forme d'un fichier Excel au Gene Expression Omnibus sous le numéro d'accession GSE143598.

F) Métabolisme *in vitro* de la morphine

Le métabolisme de la morphine a été évalué à l'aide d'un protocole de 4 jours après ensemencement de 30000 cellules (astrocytes ou cellules mixtes) ou 50000 cellules (microglies) en plaque 96 puits à J0 **(Figure 22)**. Le jour suivant l'encensement (J1), le milieu a été remplacé par 200µL de milieu frais pour permettre aux cellules de récupérer du protocole du J1 et ce, pendant 24h avant le début des traitements.

Composé	Cible	Concentration	Durée traitement
Morphine	-	10 µM	24h
LPS	Agoniste TLR2/TLR4	0.1 µg/mL	24h
LPS-EK	Agoniste TLR4	0.1 µg/mL	24h
TNFα	-	30 ng/mL	24h
IL1α	-	4 ng/mL	24h
C1q	-	300 ng/mL	24h
nAb TNFα	TNFα soluble	25 µg/mL	24h
nAb IL1α	IL1α soluble	200 µg/mL	24h
Lutéoline	Inhibiteur NFκB	50 µM	Prétraitement 1h
BX795	Inhibiteur TBK1 et IKKε	500 nM	Prétraitement 6h
SR11302	Inhibiteur AP1	10 µM	Prétraitement 1h
ML385	Inhibiteur Nrf2	10 ou 40 µM	Prétraitement 3h
SR1	Inhibiteur AhR	2.5 ou 10 µM	Prétraitement 3h
TCDD	Agoniste AhR	10 nM	24h
PHP.eB-shRNA-scrambled	-	5×10^{10} GC/mL	Prétraitement 5j
PHP.eB-shRNA-UGT1A6a	ARNm UGT1A6a	5×10^{10} GC/mL	Prétraitement 5j
Glutamate	-	100 nM	24h
GABA	-	100 nM	24h
Acétylcholine	-	100 nM	24h
Noradrénaline	-	100 nM	24h
Dopamine	-	100 nM	24h
Sérotonine	-	100 nM	24h
β-endorphine	-	100 nM	24h
Endomorphine-1	-	100 nM	24h
Endomorphine-2	-	100 nM	24h
Leu-Enképhaline	-	100 nM	24h
Met-Enképhaline	-	100 nM	24h
Dynorphine	-	100 nM	24h
Ocytocine	-	100 nM	24h
Vasopressine	-	100 nM	24h
VIP	-	100 nM	24h
Histamine	-	100 nM	24h
Adénosine	-	100 nM	24h
PGE2	-	100 nM	24h
Testostérone	-	100 nM	24h
Estradiol	-	100 nM	24h
Progestérone	-	100 nM	24h
Alloprégnanolone	-	100 nM	24h
Corticostérone	-	100 nM	24h
Acide rétinoïque	-	100 nM	24h

Tableau 2: Tableau récapitulatif des composés pharmacologiques utilisés lors des expériences de cultures.

Le jour suivant l'encensement (J1), le milieu a été remplacé par 200µL de milieu frais pour permettre aux cellules de récupérer du protocole du J1 et ce, pendant 24h avant le début des traitements. A J2, les cellules sont traitées avec différents composés pharmacologiques **(Tableau 2)** alors que d'autres cellules ont vu leur milieu de culture simplement remplacé (condition contrôle ; CT). Après 24h de traitement (J3), les milieux de culture ont été récupérés pour réaliser des dosages ELISA et les cellules sont incubées avec 10µM de morphine pour 24h. Finalement, les milieux de culture ont été récupérés dans des plaques à puits profonds et ronds de 1mL qui ont été stockés à -20°C jusqu'au traitement pour analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Les résultats ont été normalisés en fonction du nombre de cellules ensemencées le premier jour de l'expérience.

Pour l'ensemble des expériences in vitro, au moins 4 cultures primaires ont été utilisées pour évaluer les effets observés (réplicat biologique N = 4). Chaque culture primaire a été, la plupart du temps, réalisée en duplicata (réplicat technique n = 8).

i. Neutralisation de TNFα et d'IL1α dans les milieux conditionnés microgliaux

Afin d'étudier le rôle exact du TNFα et d'IL1α libérés par les microglies suite à une stimulation de LPS, nous avons réalisé une neutralisation de ces cytokines avec des anticorps neutralisants (nAb). Pour cela, les microglies ont été purifiées par MACS puis ont été stimulées avec du LPS pendant 24h puis les milieux de culture ont été prélevés et incubés avec les nAb. La neutralisation s'est faite pendant 24h à 37°C en incubant les milieux avec 25µg/mL de nAb@TNFα et 200µg/mL de nAb@IL1α. Après neutralisation, les milieux de culture ont été appliqués sur des astrocytes pendant 24h pour voir l'effet de la neutralisation de ces cytokines seules ou en combinaison sur le métabolisme de la morphine.

ii. Stratégie de knock-down de l'UGT1A6a

Le rôle des UGTs dans le métabolisme de la morphine, notamment l'UGT1A6a retrouvée dans la base de données RNAseq utilisée, a été évalué avec une approche de knock-down. Cette approche consistait à incuber des virus encapsidés avec un plasmide codant soit pour un petit ARN en épingle à cheveux (shRNA) dirigé contre l'UTG1A6a soit un shRNA contrôle (scrambled). Une fois le matériel génomique intégré par les cellules, celles-ci transcrivent le shRNA à partir du plasmide puis le shRNA est transformé en petit ARN interférant (siRNA) par le complèxe Dicer/RISC *(Reduced instruction set computer)*. Le siRNA

va ensuite pouvoir se fixer sur l'ARNm de l'UGT1A6a, qui représente son brin complémentaire. Finalement, cet ARN double-brin, reconnu comme signal de danger au sein du cytoplasme des cellules, va être dégradé par RISC afin de réprimer sa traduction. Nous avons utilisé des virus adeno-associés (AAV), plus particulièrement le sérotype AAV-PhP.eB, qui a été récemment caractérisé comme pouvant infecter de façon importante les cellules gliales (Chan et al., 2017).

Le protocole utilisé consistait à incuber $5x10^{10}$ GC/mL de particules virales sur 30000 cellules (mixtes ou astrocytes purifiés) durant 5 jours consécutifs en amont d'une stimulation au TIC, avant d'étudier le métabolisme de la morphine.

G) Dosages de cytokines pro-inflammatoires par ELISA

Afin de vérifier l'inflammation induite par le LPS et la potentielle communication paracrine entre les différents types cellulaires, nous avons dosé la libération de certaines cytokines pro-inflammatoires dans le surnageant des milieux de culture après 24h de stimulation au LPS. Deux types d'ELISA ont été utilisés dans le cadre de ces dosages : plaques prétraitées avec les anticorps de capture (anticorps monoclonaux anti-IL1α ; R&D Systems Biotechne) et plaques non prétraitées avec les anticorps de capture (TNFα ; Invitrogen™ ELISA Ready-SET-Go! ™) selon les protocoles fournis par les fabricants. Les dosages ont été réalisés sur 50µL de milieu de culture et les résultats ont été exprimés en pg/mL de milieu de culture.

3) Méthodes *in vivo*

A) Induction de la douleur neuropathique – Spared Nerve Injury

Afin d'étudier le rôle du métabolisme de la morphine et de l'AhR dans les effets anti-allodyniques de la morphine dans un modèle de douleur neuropathique, nous avons utilisé le modèle de lésion nerveuse épargnée (Spared Nerve Injury ; SNI) (Decosterd and Woolf, 2000). Nous avons choisi d'utiliser ce modèle car la mise en place de l'allodynie mécanique est rapide (<24h) et robuste (100% des animaux sont devenus allodyniques lors de nos expériences de comportement).

Une anesthésie générale est induite avec de l'isoflurane (induction 5% ; maintien 3%) puis les animaux sont placés sur tapis chauffant à 37°C. Un gel oculaire (Ocrygel) est utilisé afin d'éviter tout desséchement, puis la patte gauche est rasée et nettoyée avec de l'éthanol et de la vétédine 3 fois puis laissée sécher quelques minutes. La chirurgie a été entamée après

vérification de l'absence des réflexes des pattes arrière des animaux. Après avoir localisé les deux extrémités du fémur, une incision de 1 cm de la peau est réalisée dans l'axe dorso-ventral à droite du fémur. Les muscles sont ensuite écartelés afin d'exposer le nerf sciatique et la trifurcation des branches terminales (*i.e.,* branche commune péronéale, tibiale et surale). Sous une loupe binoculaire, les branches péronéale et tibiale sont ligaturées (silk 5.0 ; observation d'un tremblement de la patte lors de la ligature), puis sectionnées de manière distale à la ligature à l'aide de micro-ciseaux. La branche surale est quant à elle laissée intacte afin de permettre la mesure de l'allodynie mécanique sur la patte ipsilatérale. Une suture superficielle a ensuite été réalisée au niveau des tissus conjonctifs et des muscles puis la plaie est refermée à l'aide d'une suture à double-nœud de la peau. Une fois refermée, de la vétédine est appliquée sur la peau pour éviter toute infection. Enfin, la souris est pesée puis placée dans une nouvelle cage à 50cm d'une lampe rouge chauffante. Le réveil s'est fait généralement dans les 2min suivant la chirurgie. Un groupe « pseudo-opéré » (Sham) a également été mis réalisé au sein duquel les animaux ont subi la même opération mais sans lésion du nerf sciatique.

B) Traitement au SR1

Suite à la chirurgie, les animaux ont été injectés durant 7 jours consécutifs avec 120µg/kg de SR1 solubilisé dans 10% de Kolliphor (concentration de DMSO finale à 0.16%) par voie intrapéritonéale (i.p) afin d'inhiber l'activité de l'AhR. Au septième jour, une heure et demie après injection de SR1, les animaux ont été injectés avec 3mg/kg de morphine diluée dans une solution saline (NaCl 0.9% ; 3 mole de HCl pour 1 mole de morphine). Afin de tester l'efficacité de l'inhibition de l'AhR sur l'effet anti-allodynique de la morphine, des animaux ont été également injectés avec la solution véhicule (10% de Kolliphor ; 0.16% DMSO).

C) Impact du SR1 sur l'effet analgésique de la morphine *in vivo*

L'allodynie mécanique a été mesurée en utilisant le test des filaments de von Frey. Celui-ci consiste à appliquer des filaments calibrés (0.04 à 4g) sur la plante des pattes arrière des animaux. L'application des filaments a été réalisée au niveau de l'innervation du nerf sural.

Trois vagues de vingt animaux ont été utilisées pour les expériences de comportement *in vivo*. Les animaux étaient âgés de 7 semaines lors de leur arrivée au sein du laboratoire. Après une semaine d'acclimatation dans l'animalerie, des lignes de bases de tests de von Frey

ont été effectuées pendant deux semaines afin de déterminer le seuil mécanique basal du retrait des pattes avant la chirurgie. Les tests ont été réalisés le matin, au moins 2h après la phase d'obscurité. Les animaux ont été placés dans la salle d'expérimentation 1h avant d'effectuer les tests. Les souris ont été placées individuellement dans des boites en plexiglas (7cm x 9cm x 7cm) sur un tamis à mailles métallique surélevé et le test a été réalisé. Les chirurgies ont été réalisées à 10 semaines et un test est effectué à J+3 pour vérifier la mise en place de l'allodynie mécanique. De plus, un test est réalisé également à J+7 avant injection de morphine (3mg/kg) pour déterminer l'effet de l'injection i.p de StemRegenin-1 (SR1) sur les lignes de base des animaux. Après injection de morphine, les animaux ont été testés par Mélanie Kremer en aveugle, toutes les 30min durant 2h pour voir l'effet analgésique de cette molécule.

D) Impact du SR1 sur le métabolisme de la morphine *in vivo*

Le même protocole de traitement pharmacologique avec le SR1 a été utilisé afin d'étudier les effets de la SNI ainsi que du SR1 sur le métabolisme de la morphine. Au 7ème jour, 20min après injection i.p. de 3mg/kg de morphine, un mélange de kétamine (300 mg/kg)/xylazine (Paxman ; 20 mg/kg) a été injecté par voie i.p. afin d'anesthésier les animaux. Cinq minutes après anesthésie, 5µL de sang ont été prélevés après incision à la base de la queue des animaux à l'aide de capillaires calibrés de 5µL et transférés dans un tube de 1.5mL contenant 5µL d'héparine pour éviter toute coagulation. Après vérification des réflexes de l'animal, celui-ci reçoit de la lidocaïne (10mg/kg) par voie sous-cutanée au niveau des sites d'incision avant de réaliser une perfusion intracardiaque avec 25mL de PBS afin d'exsanguiner l'organisme. Ceci permet d'éviter toute contamination sanguine des cerveaux et ME par le sang pour les dosages de morphine et de M3G par LC-MS/MS. Une fois la perfusion terminée, le cerveau et la ME lombaire de chaque animal ont été prélevés et immédiatement congelés sur carboglace avant d'être stockés à -80°C jusqu'analyse par LC-MS/MS.

Temps (min)	0	2.5	3.5	4.5	5	8
Phase B	0	0	98%	98%	0	0

Tableau 3: Conditions de la chromatographie liquide.

Une fois que l'échantillon est injecté sur la colonne dans une phase mobile aqueuse A, un gradient de la phase mobile B organique (acétonitrile) est appliqué et permet l'élution progressive des molécules en fonction de leur hydrophobicité. Après l'élution des molécules, la phase mobile A permet de rééquilibrer la colonne pour l'analyse de l'échantillon suivant.

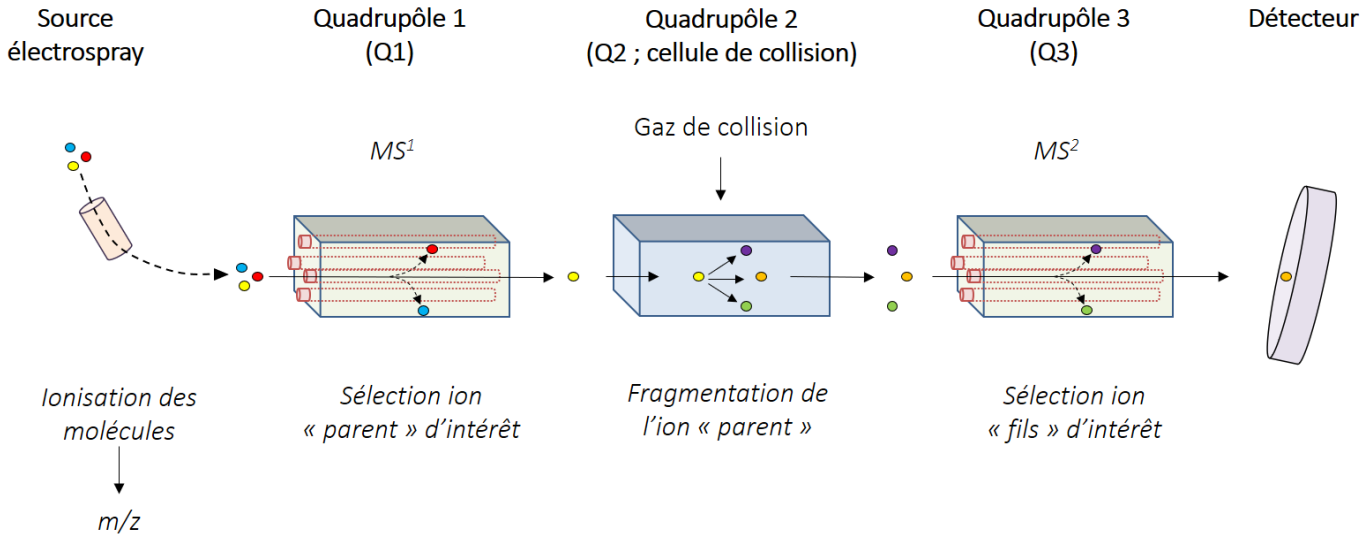


Figure 23: Principe général de la spectrométrie de masse triple quadrupôle.

Après ionisation des molécules dans la source électrospray (pour leur conférer un rapport masse/charge ou m/z), ces dernières sont transférées vers l'analyseur triple quadrupôle (Q1-Q2-Q3). Une sélection de l'ion parent est faite dans le Q1 en fonction du rapport m/z. Celle-ci est ensuite fragmentée dans le Q2 grâce à un gaz de collision qui permet de générer des ions fils qui seront sélectionnés dans le Q3 en fonction du rapport m/z. Ces ions fils, qui correspondent à l'empreinte moléculaire des ions parents, sont finalement quantifiés à l'aide d'un détecteur.

4) Dosage par LC-MS/MS

A) Principe général

La LC-MS/MS est la combinaison de deux appareils qui permettent ***(a)*** de séparer un mélange complexe *via* la chromatographie liquide (LC) puis ***(b)*** d'identifier et de quantifier des molécules par la spéctrométrie de masse (MS) en utilisant ***(c)*** la méthode de dilution isotopique à partir ***(d)*** de paramètres précis définis.

La chromatographie : La chromatographie liquide à haute performance (HPLC ; Ultimate 3000, Dionex) permet de séparer les molécules en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Dans notre cas, l'appareil est équipé d'une colonne en phase inverse dont la phase stationnaire est constituée de particules de silices greffées par des chaines carbonées C18 (Zorbax SB-C18; 1 x 150mm; 3.5µm; Agilent). Une telle colonne permet de séparer les composés sur la base de leur caractère hydrophobe et permet ainsi d'attribuer un temps de rétention précis à chaque molécule. Les échantillons sont entrainés sur la colonne par une phase mobile liquide A aqueuse (98.9% H_2O / 1% Acétonitrile (ACN) / 0.1% acide formique (AF)). L'élution des molécules se fait à l'aide d'un gradient croissant d'une phase mobile liquide B (99.9% ACN / 0.1% AF) à un débit de 90µL/min **(Tableau 3)**. Ainsi, plus une molécule est hydrophobe, plus elle est retenue par la colonne et plus le pourcentage d'ACN nécessaire pour l'éluer devra être important.

Cette chromatographie permet de séparer les différents composés présents dans l'échantillon avant leur injection dans le spectromètre de masse, évitant une entrée massive et simultanée de composés dans le spectromètre de masse.

(b) **La spectrométrie de masse :** Un spectromètre de masse permet d'identifier et de quantifier des molécules (TSQ-Endura, Thermo Electron). Cet appareil est composé de trois parties : (1) la source, (2) l'analyseur et (3) le détecteur **(Figure 23)**.

1) La source est dans notre cas est un électrospray. Elle permet d'ioniser les molécules présentes dans l'échantillon. Ceci leur confère un rapport de masse/charge (m/z) en Da, z étant le nombre de charges. Après nébulisation du solvant, les ions sont transférés dans l'analyseur.

2) L'analyseur permet de sélectionner et fragmenter les molécules en fonction de leur rapport m/z. Dans notre cas, l'analyseur est un triple quadripôle. Un quadripôle est constitué de quatre électrodes cylindriques positionnées en cercle, dans lesquelles une différence de potentiel est appliquée pour créer un champ électrique qui sélectionne les molécules d'une seule valeur m/z donnée. Le premier quadripôle (Q1) permet de sélectionner les ions parents (*i.e.,* la masse des molécules à détecter et à quantifier) qui traversent sélectivement ce quadripôle. Les ions sélectionnés entrent dans un deuxième quadripôle (Q2 ; servant de cellule de collision) où ils se fragmentent après être entrés en collision avec des molécules d'argon. Cette fragmentation génère des ions fils correspondant à la signature moléculaire de l'ion parent. Certains de ces ions fils sont ensuite spécifiquement sélectionnés dans le troisième quadripôle (Q3), dont le fonctionnement est identique au Q1, afin de quantifier l'ion parent d'intérêt. La quantification des ions fils (et donc des ions parents) est réalisée par un détecteur.

3) Le détecteur, dans notre cas un électro-multiplicateur, permet de générer des électrons au contact des ions, ces électrons sont ensuite multipliés pour amplifier le signal permettant de quantifier l'ion parent recherché.

Ion Parent	m/z ion parent	Ions fils correspondent (m/z)
Morphine	285.98	**201.11** ; 165.36 ; 181.06
D3-morphine	288.88	**201.06** ; 153.13 ; 165.04
M3G	462.19	**286.11**
D3-M3G	465.19	**289.17**

Tableau 4: Caractéristiques des molécules analysées en LC-MS/MS.

Lors d'une analyse, la fragmentation d'un ion « parent » possédant un rapport masse/charge spécifique génère 3 ions « fils » majoritaires. L'ion fils possédant la plus forte intensité est utilisé pour quantifier l'ion « parent » alors que les deux autres fragments permettent son identification.

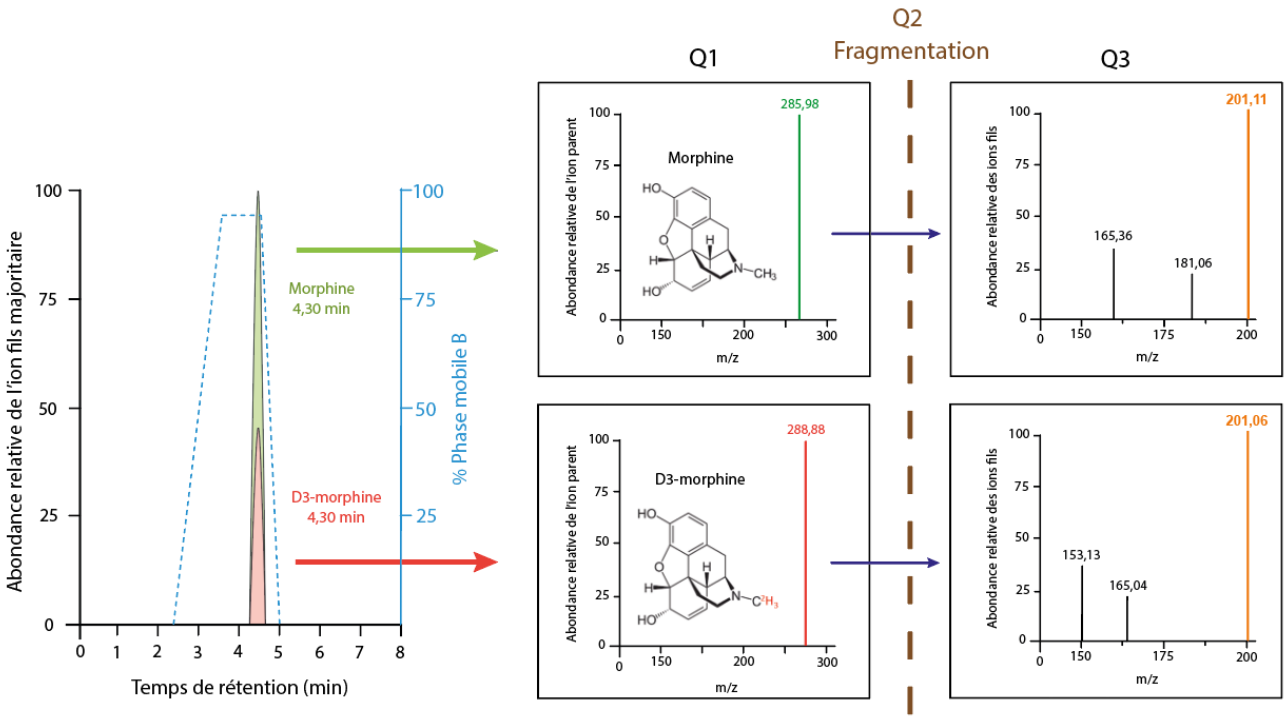


Figure 24: Principe général de la quantification par dilution isotopique.

La dilution isotopique repose sur l'utilisation d'une quantité connue d'une molécule cible deutérée (*i.e.,* dont des atomes d'^{1}H ont été remplacés par du ^{2}H de masse 2Da) qui se comporte de la même manière que la molécule d'intérêt lors de l'étape de chromatographie (*e.g.,* temps de rétention 4min30 pour la morphine et la D3-morphine), puis dans la MS par génération d'un ion fils majoritaire à **201.06 m/z** qui est utilisé pour quantifier la molécule d'intérêt.

B) Quantification absolue par dilution isotopique

Il existe différentes méthodes permettant de quantifier des molécules dans un échantillon complexe lors de l'utilisation de la LC-MS/MS. Dans mon cas, j'ai utilisé la méthode de la dilution isotopique qui permet une quantification absolue (ou exacte) de nos molécules cibles (morphine et M3G) (Liu et al., 1995; Van Eeckhaut et al., 2009). Cette méthode fait appel à des molécules deutérées dans lesquelles 3 atomes d'hydrogène ^{1}H (1Da) sont remplacés par 3 atomes de deuterium ^{2}H (2Da), leur procurant des masses supérieures de 3Da **(Tableau 4)**. Ces molécules se comportent exactement de la même manière lors de l'analyse LC-MS/MS, mais possèdent des masses légèrement plus élevées permettant de les différencier des molécules cibles **(Figure 24)**. De ce fait, l'ajout d'une quantité de standards internes défini permet d'établir un rapport d'intensité de signal entre la molécule non deutérée d'intérêt et son homologue deutéré présent à une quantité connue (ex : morphine/D3-morphine). Ceci permet de quantifier les molécules d'intérêt et de palier à une perte d'échantillon lors des différentes étapes de traitement.

Ainsi, une fois les échantillons de culture décongelés, j'ai ajouté 15µL d'une solution de standard interne contenant 18fmol de D3-Morphine ainsi que 103,2fmol de D3-M3G tandis que pour les échantillons de cerveaux, ME lombaire et de sang, j'ai ajouté 15µL d'une solution de standard interne contenant 1,575pmol de D3-Morphine ainsi que 0,645pmol de D3-M3G.

C) Analyse des milieux de culture : métabolisme *in vitro*

Une analyse par LC-MS/MS demande un traitement adapté au préalable permettant la décomplexification de l'échantillon. Afin de traiter les milieux de culture, j'ai pré-purifié les échantillons à l'aide d'une extraction sur phase solide (SPE). Le principe de la dilution isotopique a été utilisé pour permettre la quantification absolue de morphine et de M3G dans mes échantillons.

i. Extraction sur Phase Solide et analyse par LC-MS/MS

L'extraction en phase solide utilise la différence d'affinité entre un analyte (morphine et M3G) et les composés interférents, présents dans une matrice liquide, pour une phase solide (sorbant). Cette affinité permet d'éliminer une partie des molécules interférentes. Dans mon cas, la phase solide utilisée était une Cartouche SPE HyperSep™ Hypercarb™ (25mg)

remplie de particules sphériques de 30µm à 100% de carbone graphité poreux. Cette phase permet la rétention et la séparation des composés polaires.

Avant de commencer les SPE, 200µL de milieu de culture ont été acidifiés avec 585µL d'AF 1.37% et 15µL d'une solution de standard interne contenant les molécules deutérées. Cette étape a pour but d'atteindre une concentration finale de 1% AF dans un volume final de 800µL afin de permettre la rétention des analytes sur la phase solide d'une part et de réaliser notre dilution isotopique d'autre part. Les colonnes sont activées deux fois avec 1mL d'ACN 100 % avant d'être équilibrées 2 fois avec 1mL d'eau acidifiée (H_2O 99.9% / AF 0.1%). Les 800µL d'échantillons ont ensuite été chargés sur les colonnes et une fois tout la totalité du volume des échantillons étant passée sur la colonne, cette dernière a été séchée à haute pression pendant 1min. Un premier lavage avec 1mL d'eau acidifiée (H_2O 99.9% / AF 0.1%) a ensuite été réalisé suivi d'un deuxième lavage avec 1mL d'ACN 2 % (H_2O 97.9% / ACN 2% / AF 0.1%). Une élution a finalement été réalisée avec 1mL d'ACN 20 % (H_2O 79,9% / ACN 20% / AF 0,1%). Les éluats ont ensuite été directement centrifugés à 20000g durant 15min à 4°C afin d'éliminer le graphite carbone qui peut être présent. Puis, les surnageants ont été séchés par évaporation sous vide. Une fois secs, les échantillons ont été repris dans 15µL d'eau acidifiée (H_2O 99.9% / AF 0.1%) puis centrifugés à 20000g durant 15min à 4°C avant d'être déposés dans une plaque 96 puits pour analyse par LC-MS/MS.

D) Analyse des échantillons des expériences *in vivo*

i. Préparation et analyse des échantillons de cerveaux

Après décongélation des cerveaux, ces derniers ont été repris dans 1mL d'eau et ont été broyés durant 10sec puis soniqués à 100W 2 fois 5 secondes. Les échantillons ont été centrifugés 2 fois à 20000g pendant 30min à 4°C. Les surnageants ont été prélevés après la deuxième centrifugation et le dosage de morphine et de M3G a pu être réalisé par LC-MS/MS. Pour cela, 15µL d'une solution de standard interne ont été ajoutés à 100µL de surnageant, puis le tout a été précipité avec 400µL d'ACN 100% à 4°C. Après centrifugation (20000g ; 15min ; 4°C), les surnageants ont été récupérés et évaporés sous vide. Puis, les culots ont été repris dans 20µL d'eau acidifiée (H_2O 99.9% et AF 0.1%) et ont été vortéxés durant 10min avant d'être centrifugés une dernière fois à 20000g. Les 20µL sont finalement placés dans une plaque 96 pour analyser simultanément la morphine et la M3G par LC-MS/MS (injection de 5µL). La quantification de protéine présente dans l'échantillon a été réalisée par un dosage de

Bradford (Protein Assay, Bio-Rad), permettant de normaliser les quantités de morphine et de M3G par rapport à une quantité de protéine.

ii. Préparation et analyse des échantillons de moelle épinière lombaire

L'extraction des échantillons de ME est sensiblement similaire à celle des cerveaux. Après décongélation des ME lombaires, ces dernières ont été reprises dans 200µL d'eau puis soniquées à 100W 2 fois 5sec. Puis, les échantillons ont été centrifugés à 20000g pendant 30min à 4°C. Les surnageants ont été prélevés afin de doser simultanément la morphine et la M3G. Pour cela, 15µL d'une solution de standard interne ont été ajoutés à 100µL de surnageant, puis le tout a été précipité avec 400µL d'ACN 100% à 4°C. Après centrifugation (20000g ; 15min ; 4°C), les surnageants ont été récupérés et évaporés sous vide et les culots ont finalement été reprit dans 20µL d'eau acidifiée (H_2O 99.9% et AF 0.1%) puis ont été vortéxés durant 10min avant d'être centrifugés une dernière fois à 20000g puis placés dans une plaque 96 pour analyser simultanément la morphine et la M3G par LC-MS/MS (injection d'un volume de 5µL). La quantification de protéine présente dans l'échantillon a été réalisée par un dosage de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad), permettant de normaliser les quantités de morphine et de M3G par rapport à une quantité de protéine.

iii. Préparation et analyse des échantillons de sang

Une fois les échantillons sanguins décongelés, 15µL d'une solution de standard interne ont été ajoutés. Puis les échantillons ont été précipités avec 100µL d'une solution d'ACN 100% à 4°C. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 20000g durant 30min à 4°C. Après prélèvement, les surnageants ont été évaporés sous vide. Une fois évaporés, les surnageants ont été repris dans 20µL d'eau acidifiée (H_2O 99.9% ; AF 0.1%) puis de nouveau centrifugés à 20000g durant 15min à 4°C. Finalement, les surnageants ont été transférés dans des plaques 96 puits puis injectés en LC-MS/MS pour une analyse simultanée de morphine et de M3G (injection d'un volume de 5µL).

5) Analyses statistiques

A) Expériences *in vitro*

i. Métabolisme *in vitro* de la morphine

Dépendamment des expériences, les résultats ont été soit analysés avec une analyse de la variance (ANOVA) à un ou deux facteurs. Dans le cas d'une ANOVA à un facteur, le test

a été effectué seulement si la distribution des résidus suivait une loi normale et si l'homogénéité des variances a été vérifiée. Si les données ne suivaient pas une loi normale, alors elles ont été analysées à l'aide d'un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Si les données suivaient une loi normale mais qu'elles ne présentaient pas une homogénéité des variances, alors elles ont été analysées à l'aide d'un test ANOVA de Welch. Après le test effectué, lorsque le F était significatif (p-value < 0.05), alors un test de comparaison multiple de Tukey (si test d'ANOVA), de Dunn (si test de Kruskal-Wallis) ou de Tamhane-T2 (si test d'ANOVA de Welch) a été réalisé pour voir les différences entre les groupes.

Dans le cas de l'ANOVA à deux facteurs, ce test a également été réalisé si la distribution des résidus suivait une loi normale et si l'homogénéité des variances a été vérifiée. Dans le cas où l'une de ces deux assomptions n'a pas été respectée, nous avons utilisé une approche non-paramétrique appelée ART *(Aligned-Rank Transform)* ANOVA à deux facteurs (Wobbrock et al., 2011). Dans les deux cas, lorsque le F était significatif (p-value < 0.05), alors un test de comparaison multiple de Sidak a été réalisé pour voir les différences entre les groupes.

En ce qui concerne l'expérience de dose-réponse du LPS sur les cellules gliales mixtes, une régression non-linéaire a été réalisée pour déterminer la Concentration efficace médiane (EC50) du LPS.

ii. Dosage des cytokines par ELISA

Un test non-paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour les quantifications de TNFα et d'IL1α dans les milieux de culture.

B) Expériences *in vivo*

i. Impact du SR1 sur l'effet anti-allodynique de la morphine

Afin d'analyser les résultats de von Frey obtenus sur les animaux suite à la chirurgie, nous avons réalisé un test d'ANOVA à 2 facteurs à mesures répétées. Les deux facteurs utilisés étaient la chirurgie (Sham-SNI) et le traitement (Vehicule – SR1). Deux analyses séparées ont été réalisées pour chaque graphique, la première entre les seuils de bases et trois jours (D3) et la deuxième au septième jour après la chirurgie (D7), pour l'effet analgésique de la morphine.

ii. Impact du SR1 sur le métabolisme périphérique et central de la morphine

Les résultats de métabolisme *in vivo* ont été analysés avec une ANOVA à 2 facteurs (Chirurgie et Traitement).

Résultats

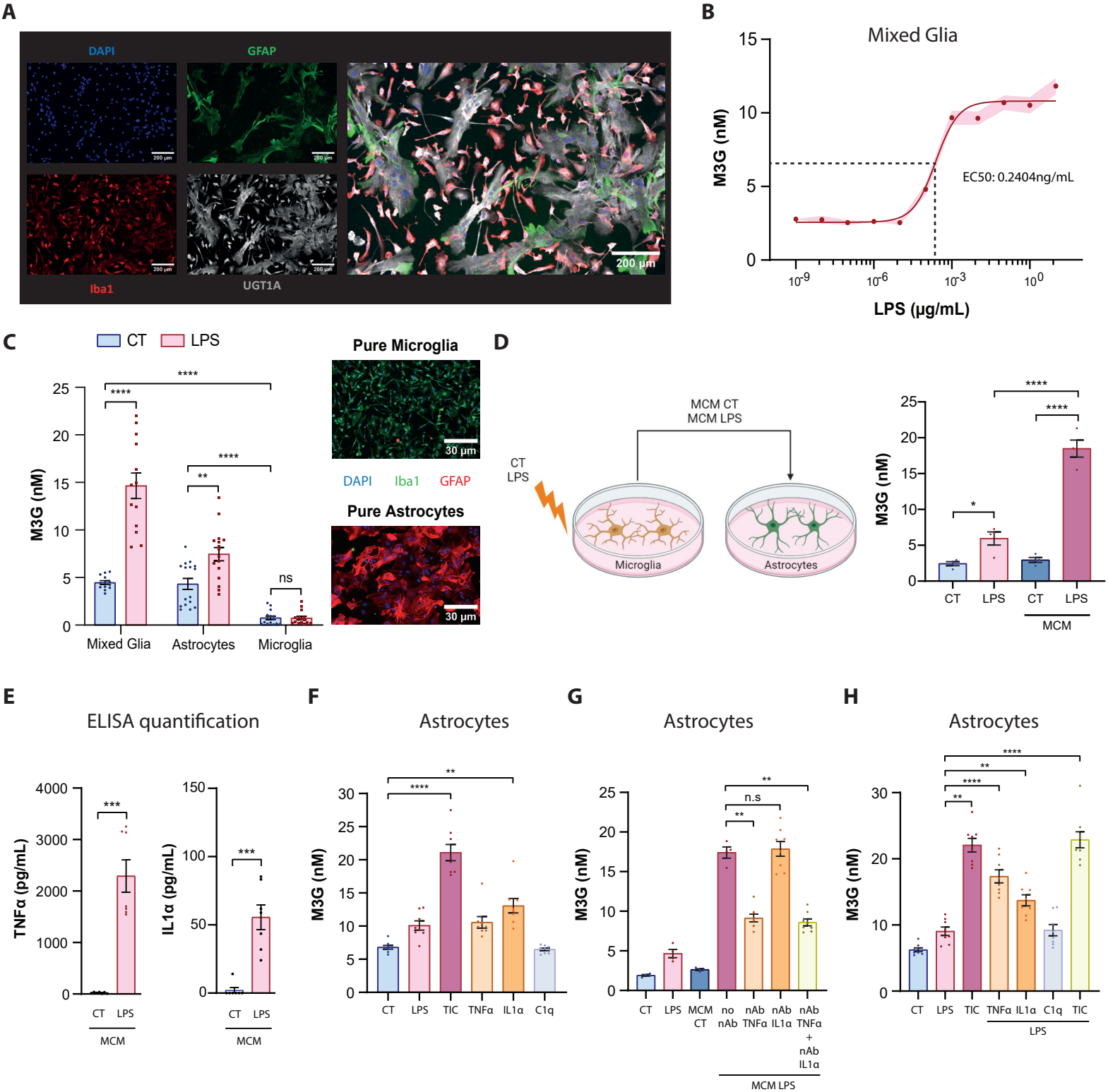

A
DAPI
GFAP
Iba1
UGT1A
200 µm
B
Mixed Glia
M3G (nM)
LPS (µg/mL)
EC50: 0.2404ng/mL
C
CT
LPS
M3G (nM)
Mixed Glia
Astrocytes
Microglia
ns
Pure Microglia
Pure Astrocytes
30 µm
DAPI
Iba1
GFAP
D
MCM CT
MCM LPS
CT
LPS
Microglia
Astrocytes
M3G (nM)
MCM
E
ELISA quantification
TNFα (pg/mL)
IL1α (pg/mL)
MCM
F
Astrocytes
M3G (nM)
CT
LPS
TIC
TNFα
IL1α
C1q
G
Astrocytes
M3G (nM)
MCM CT
no nAb
nAb TNFα
nAb IL1α
nAb TNFα + nAb IL1α
MCM LPS
n.s
H
Astrocytes
M3G (nM)
LPS

Figure 25 : Caractérisation du métabolisme central de la morphine *in vitro* en condition basale et neuroinflammatoire.

(A) Caractérisation immunocytochimique des cellules présentes dans la culture primaire gliale mixte. Les cellules sont positives soit pour Iba1 (rouge, microglies), soit pour GFAP (vert, astrocytes). L'ensemble des cellules de la culture sont positives pour l'UGT1A (blanc). Le marquage des noyaux au DAPI est visible en bleu. **(B)** Dose-réponse de l'effet du LPS sur le métabolisme de la morphine en M3G sur des cultures primaires de cellules gliales mixtes. Les données ont été analysées à l'aide d'une régression non linéaire afin de calculer une EC50. **(C)** Mise en évidence du métabolisme de la morphine par des cultures primaires de cellules gliales mixtes ainsi que par des cultures primaires d'astrocytes et de microglies purifiées en condition basale (CT) et neuroinflammatoire (LPS ; 0.1µg/mL). La pureté des cultures microgliale et astrocytaire a été validée par immunocytochimie (panneaux de droite). Test d'ART ANOVA à deux facteurs suivi d'un test de comparaison multiples de Tukey. Traitement : p-value < 0.0001, Type Cellulaire : p-value < 0.0001 et Interaction : p-value < 0.005. **(D)** Etude du métabolisme de la morphine par des cultures primaires d'astrocytes purifiés stimulées ou non avec du milieu conditionné de culture de microglies contrôle (MCM) ou stimulées au LPS (MCM LPS). Test ANOVA à deux facteurs suivi d'un test de comparaison multiples de Tukey. **(E)** Dosages par ELISA du TNFα et de l'IL1α dans du MCM CT et MCM LPS. Test de Mann-Whitney. **(F)** Métabolisme de la morphine par des cultures primaires d'astrocytes purifiés stimulées avec plusieurs facteurs pro-inflammatoires libérés par les microglies (TNFα 30ng/mL, IL1α 4ng/mL et/ou C1q 300ng/mL). Test ANOVA à un facteur suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn. **(G)** Métabolisme de la morphine par des cultures primaires d'astrocytes purifiés stimulées avec du MCM LPS dans lequel des nAb contre le TNFα ou l'IL1α ont été incubés. Test ANOVA de Welch à un facteur suivi d'un test de comparaisons multiples de Tamhane T2. **(H)** Métabolisme de la morphine par des cultures primaires d'astrocytes purifiés stimulées avec des facteurs pro-inflammatoires libérés par les microglies seules (TNFα, IL1α et/ou C1q) ou en combinaison avec du LPS (0.1µg/mL). Test ANOVA à un facteur suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey. *: p-value < 0.05; **: p-value < 0.001; ***: p-value < 0.0001; ****: p-value < 0.0001.

Caractérisation du métabolisme central de la morphine *in vitro*

Le premier objectif de ma thèse a été de caractériser le métabolisme central de la morphine par les cellules gliales en culture primaire. Pour cela, j'ai mis en place une technique de culture primaire d'astrocytes et de microglies issus de cerveaux de souriceaux âgés de 0 à 5 jours. La morphine étant métabolisée en M3G *via* les UGTs, j'ai tout d'abord réalisé un immunomarquage afin de détecter la présence de ces enzymes dans ces cellules gliales. Le marquage a révélé que l'ensemble des cellules $GFAP^+$ (astrocytes, en vert) et $Iba1^+$ (microglies, en rouge) expriment les membres de la famille UGT1A (blanc ; **Figure 25A**). L'expression des UGT1As par les astrocytes et les microglies *in vitro* suggère l'existence d'un métabolisme de la morphine en M3G par ces deux types cellulaires.

Les cellules gliales sont très sensibles aux variations environnementales, notamment celles qui induisent une neuroinflammation. Ainsi, le métabolisme de la morphine en M3G a été évalué en prétraitant des cultures primaires de cellules gliales mixtes avec des doses croissantes de LPS. Les dosages de la M3G par LC-MS/MS dans les milieux de culture des cellules m'ont permis de montrer que le métabolisme de la morphine augmentait avec des doses croissantes de LPS avec une EC50 calculée de 0.2404ng/mL **(Figure 25B)**. De plus, cet effet dépend du TLR4 car un agoniste spécifique de ce récepteur, le LPS-EK, possède un effet identique au LPS sur le métabolisme de la morphine **(Figure S1B)**. Afin de déterminer l'implication des microglies et des astrocytes dans ce mécanisme, j'ai réalisé des expériences similaires sur des cultures primaires d'astrocytes et de microglies purifiés et j'ai comparé les résultats au métabolisme obtenu sur des cultures de cellules gliales mixtes **(Figure 25C)**. Les cellules ont été cultivées soit en condition contrôle (CT) soit en étant prétraitées avec du LPS (100ng/mL; 24h de prétraitement). Après prétraitement, les milieux de culture ont été prélevés, puis les cellules ont été incubées avec 10µM de morphine pendant 24h. Après 24h d'incubation, les milieux de culture ont été récupérés et la M3G a été dosée par LC-MS/MS. Les résultats indiquent que les microglies et les astrocytes métabolisent la morphine en M3G en condition CT, bien que les astrocytes apparaissent comme les cellules métabolisant majoritairement la morphine **(Figure 25C)**. De plus, la stimulation au LPS n'a eu aucun effet sur la production de M3G par les microglies, tandis que les astrocytes stimulés au LPS produisent significativement plus de M3G en comparaison de la condition CT. De manière intéressante, les cellules mixtes produisent significativement plus de M3G à partir de la

morphine lorsqu'elles sont stimulées au LPS en comparaison des astrocytes purifiés. Ces données suggèrent l'existence d'une synergie entre les microglies et les astrocytes en co-culture. A la vue de ces données, mon hypothèse était que le LPS active les microglies ce qui induit la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires qui vont augmenter le métabolisme de la morphine par les astrocytes. Afin de tester cette hypothèse, j'ai purifié des microglies afin de générer des milieux conditionnés de microglies contrôles (MCM CT) ou stimulées au LPS (MCM LPS ; **Figure 25D)**. Ensuite, j'ai incubé ces milieux conditionnés avec des cultures primaires d'astrocytes pendant 24h. Puis, j'ai effectué une incubation avec la morphine pour évaluer l'impact des milieux conditionnés sur son métabolisme. Les résultats indiquent qu'il existe une production plus forte de M3G en condition MCM LPS comparé au LPS seul **(Figure 25D)**. Ces résultats suggèrent l'existence de facteurs solubles libérés par les microglies lorsque celles-ci sont stimulées avec du LPS. Ces facteurs seraient responsables de l'induction d'une plus forte production M3G par les astrocytes lorsqu'ils sont combinés au LPS. Or, la littérature décrit que le TNFα, l'IL1α ainsi que le C1q libérés par les microglies induisent une réactivité astrocytaire accompagnée d'une augmentation des niveaux d'ARNm des UGTs dans ces cellules (Liddelow et al., 2017). Les expériences de qPCR microfluidique provenant de l'article de Liddelow décrivent surtout un rôle du TNFα et de l'IL1α dans ce processus et moins du C1q. Afin de vérifier si ces deux premiers facteurs sont bien libérés par nos microglies, nous avons réalisé des dosages quantitatifs par ELISA de ces deux cytokines pro-inflammatoires dans des milieux de culture de microglies contrôles ou stimulées au LPS. Il apparait que la quantité de ces composés sécrétée par les microglies dans le milieu extracellulaire augmente suite à une stimulation au LPS **(Figure 25E)**. L'incubation de ces cytokines sur des cultures primaires d'astrocytes purifiés montre que seule l'IL1α induit une augmentation du métabolisme de la morphine **(Figure 25F)**. Néanmoins, c'est la combinaison de TNFα, IL1α et de C1q (TIC) qui augmente la production de M3G, avec des niveaux de M3G supérieurs à une stimulation au LPS. Or, l'ensemble de ces expériences ne montrent pas que c'est bien le TIC libéré par les microglies qui induit une augmentation du métabolisme de la morphine par les astrocytes. En effet, les résultats de la **Figure 25F** ont été obtenus suite à une incubation de ces cytokines avec des astrocytes purifiés et ce, avec des concentrations de cytokines utilisées dans la littérature. Afin de vérifier si le TNFα et/ou l'IL1α libérés par les microglies sont à l'origine de cet effet, j'ai incubé du MCM LPS avec des anticorps neutralisant (nAb) ces deux cytokines, séparément ou ensemble. Le C1q n'a pas été testé car il ne montrait aucun effet sur le

métabolisme de la morphine. Les résultats de neutralisation indiquent que l'effet du MCM LPS passe exclusivement par le TNFα car la neutralisation de l'IL1α n'est pas capable de diminuer l'effet du MCM LPS **(Figure 25G)**. Cela suggère que la co-incubation de TNF α avec du LPS doit induire un effet plus fort que le TNF α ou le LPS seul. Pour vérifier si cette hypothèse était bonne, j'ai co-incubé du LPS avec du TNFα, IL1α et C1q seuls ou en combinaison (TIC). Les résultats montrent effectivement que la co-incubation de LPS avec le TNF α et l'IL1 α induit un effet plus fort que le LPS seul **(Figure 25H)**. Néanmoins, l'effet le plus fort a été observé lorsque le LPS a été co-incubé avec le TIC.

Pour finir, j'ai approfondi l'étude du métabolisme de la morphine par les microglies en réalisant des expériences similaires sur ces cellules. Mes données indiquent que le rôle des microglies dans le métabolisme de la morphine est limité (*i.e.,* peu de métabolisme en comparaison des astrocytes), même lorsque ces cellules sont stimulées avec les facteurs solubles astrocytaires libérés en condition neuroinflammatoire **(Figure S1)**.

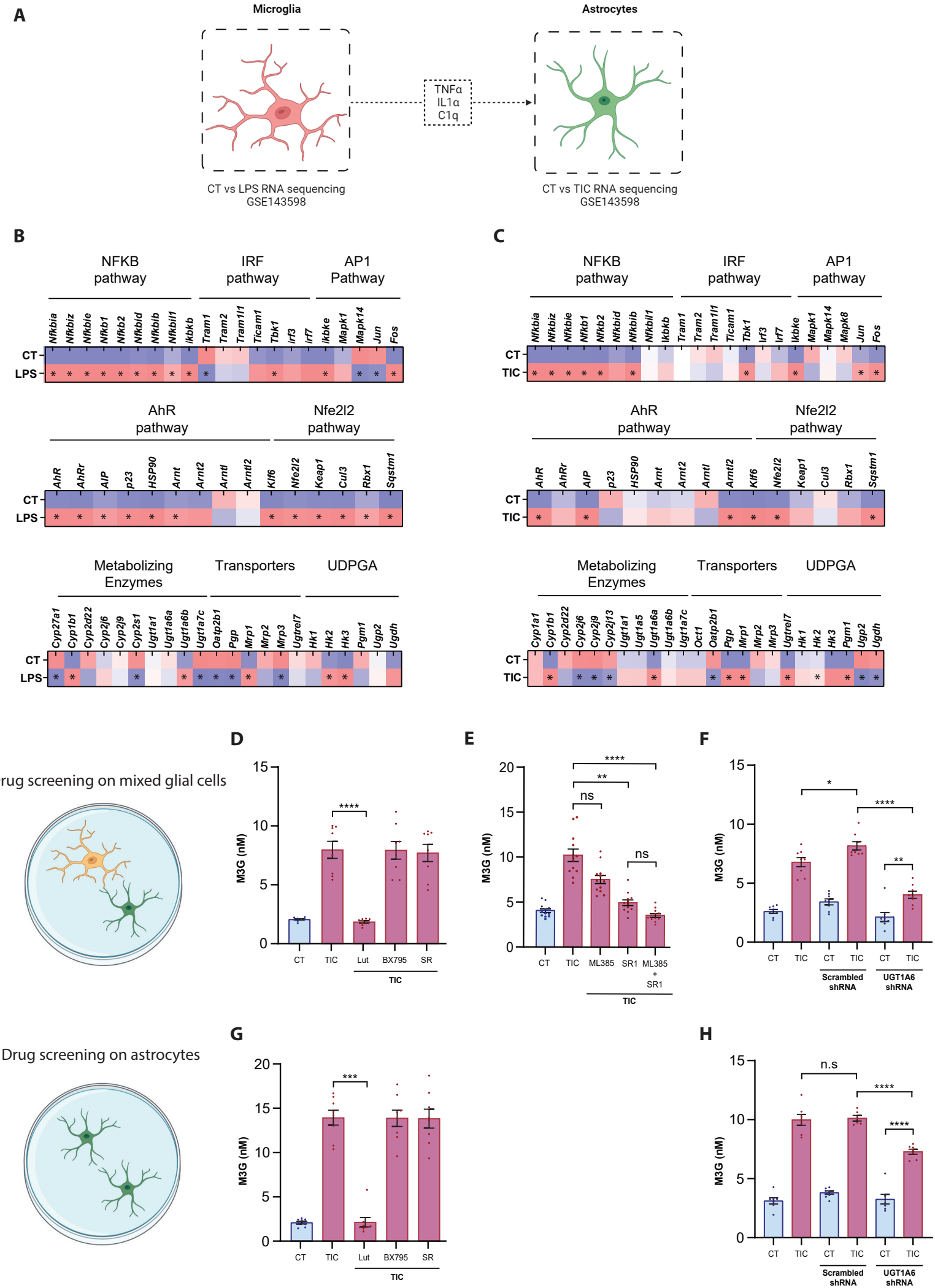

A
Microglia
Astrocytes
TNFα
IL1α
C1q
CT vs LPS RNA sequencing
GSE143598
CT vs TIC RNA sequencing
GSE143598
B
C
NFKB pathway
IRF pathway
AP1 Pathway
AP1 pathway
AhR pathway
Nfe2l2 pathway
Metabolizing Enzymes
Transporters
UDPGA
CT
LPS
TIC
Drug screening on mixed glial cells
Drug screening on astrocytes
D
E
F
G
H
M3G (nM)
CT
TIC
Lut
BX795
SR
ML385
SR1
ML385 + SR1
Scrambled shRNA
UGT1A6 shRNA
ns
n.s

Figure 26: Analyse transcriptomique des microglies et astrocytes en condition contrôle et neuroinflammatoire : mise en évidence des voies intracellulaires mises en jeu dans le métabolisme de la morphine.

(A) Ré-analyse de données de RNAseq des astrocytes et microglie en condition basale ou neuroinflammatoire (Guttenplan et al., 2020). **(B)** Voies intracellulaires mises en jeu dans le métabolisme de la morphine en condition contrôle et LPS dans les microglies. **(C)** Voies intracellulaires mises en jeu dans le métabolisme de la morphine en condition contrôle et TIC dans les astrocytes. Le z-score associé à chaque gène a été calculé. Les données brutes significativement différentes entre les deux conditions analysées sont indiquées. * : p-value < 0,05. Métabolisme de la morphine par des cellules gliales mixtes **(D)** ou d'astrocytes **(G)** traitées en condition neuroinflammatoire (*i.e.,* traitées au TIC) et en présence ou non des inhibiteurs des voies NF-κB (Lutéoline ; 50µM), IRF (*Interferon regulatory factor* ; BX795 ; 500nM) ou AP-1 (*Activator protein-1* ; SR11302 ; 10µM). Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn par rapport à la condition TIC. **(E)** Métabolisme de la morphine par des cellules gliales mixtes en condition neuroinflammatoire (*i.e.,* TIC) en présence ou non des inhibiteurs des voies intracellulaires AhR (SR1 ; 10µM) ou Nrf2/Nfe2l2 (ML385 ; 10µM). Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn. Métabolisme de la morphine par des cultures primaires de cellules gliales mixtes **(F)** ou d'astrocytes **(H)** en condition neuroinflammatoire (TIC) seules ou traitées avec des AAV-shRNA scrambled ou un shRNA ciblé contre l'UGT1A6. Test ANOVA à un facteur suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn. *: p-value < 0.05 ; **: p-value < 0.001 ; ***: p-value <0.0001 ; ****: p-value < 0.0001.

Profil transcriptomique des cellules gliales et voies intracellulaires mises en jeu dans le métabolisme de la morphine *in vitro*

Après avoir caractérisé le métabolisme central de la morphine au niveau cellulaire *in vitro*, mon but était de déterminer quelles variations transcriptionnelles s'opèrent au sein des microglies et des astrocytes en condition neuroinflammatoire et qui seraient liées à l'augmentation du métabolisme de la morphine **(Figure 26A)**. Afin de répondre à cette question, j'ai analysé des données transcriptomiques en accès libre (GSE143598) publiées par le laboratoire de Ben Barres (Guttenplan et al., 2020). Dans cette étude, les auteurs ont purifié des microglies et des astrocytes de souris qu'ils ont respectivement stimulés ou non avec du LPS ou la combinaison de facteurs pro-inflammatoires TIC *in vitro* durant 24h avant de réaliser un RNAseq. Dans les deux cas de stimulations, l'analyse de ces données a permis de mettre en évidence une augmentation des voies pro-inflammatoires associées à NFκB avec le LPS dans les microglies, ou le TIC dans les astrocytes **(Figure 26B et 2C)**. De plus, une augmentation des voies intracellulaires de l'AhR et du Nrf2/Nfe2l2, connues pour induire les UGTs, a également pu être observée lors du stimulus neuroinflammatoire. Finalement, l'analyse des enzymes de métabolisme de la morphine dans les astrocytes, le type cellulaire qui métabolise majoritairement la morphine, a révélé une augmentation significative de l'expression de l'UGT1A6a dans les astrocytes après une stimulation au TIC.

Afin de vérifier si ces voies étaient bien impliquées au niveau fonctionnel dans l'augmentation du métabolisme de la morphine, j'ai utilisé des inhibiteurs de ces différentes voies intracellulaires. Dans un premier temps, des cellules gliales mixtes ont été incubées avec le cocktail TIC et une augmentation significative du métabolisme de la morphine en M3G a été observée par LC-MS/MS **(Figure S2A)**. Par la suite, j'ai travaillé uniquement avec le TIC (plutôt que le LPS) avec les cellules gliales mixtes, que j'ai comparées aux astrocytes purifiés. De plus, la stimulation des cultures de cellules gliales mixtes avec différents neuromodulateurs n'a montré aucun effet, montrant l'importance de la neuroinflammation dans ce phénomène **(Figure S2I)**. L'inhibition des différentes voies décrites ci-dessus a d'abord été réalisée sur des cultures primaires de cellules gliales mixtes. L'analyse de la production de M3G à partir de la morphine a montré que l'inhibition de la voie NFκB par la lutéoline (50µM) permet d'inhiber totalement l'effet du TIC **(Figure 26D)**. Une observation similaire a été faite lorsque l'AhR a été inhibé avec le Stemregenin-1 (SR1; 10µM) **(Figure 26E).** Finalement, l'utilisation d'une

approche de knock-down de l'UGT1A6a (utilisant des AAV-shRNA@UGT1A6a) a permis de diminuer significativement le métabolisme de la morphine, prouvant l'implication majeure de cette isoforme des UGTs **(Figure 26F)**.

Des expériences identiques réalisées sur des cultures primaires d'astrocytes purifiés ont montré des résultats similaires à ceux obtenus avec les cellules gliales mixtes. En effet, l'inhibition de la NF-κB avec la lutéoline (50µM) a totalement diminué l'effet du TIC **(Figure 26G)** tandis qu'un knock-down de l'UGT1A6a (AAV-shRNA@UGT1A6) a également donné les mêmes résultats que sur les cultures mixtes, bien que l'effet semble moins fort **(Figure 26I)**. Néanmoins, l'inhibition de l'AhR sur des cultures primaires d'astrocytes a été réalisée en diminuant la concentration de SR1 (2.5µM) par rapport à la concentration utilisée sur les cultures mixtes (10µM), et aucun effet n'a pu être observé sur les astrocytes **(Figure S2K)**. De manière similaire, l'utilisation de cette même concentration de SR1 (2.5µM) n'a donné également aucun effet sur les cellules gliales mixtes **(Figure S2J)**. Finalement, l'activation de l'AhR avec du TCDD (*i.e.,* dioxine connue pour activer l'AhR) augmente significativement le métabolisme de la morphine par les astrocytes confirmant l'implication de l'AhR dans le métabolisme de la morphine **(Figure S2M)**.

En résumé, ces résultats suggèrent qu'une neuroinflammation induite par le TIC augmente l'expression et l'activité de la NFκB et de l'AhR astrocytaire. Ce dernier est capable d'augmenter l'expression de l'UGT1A6a et donc d'augmenter le métabolisme de la morphine en M3G.

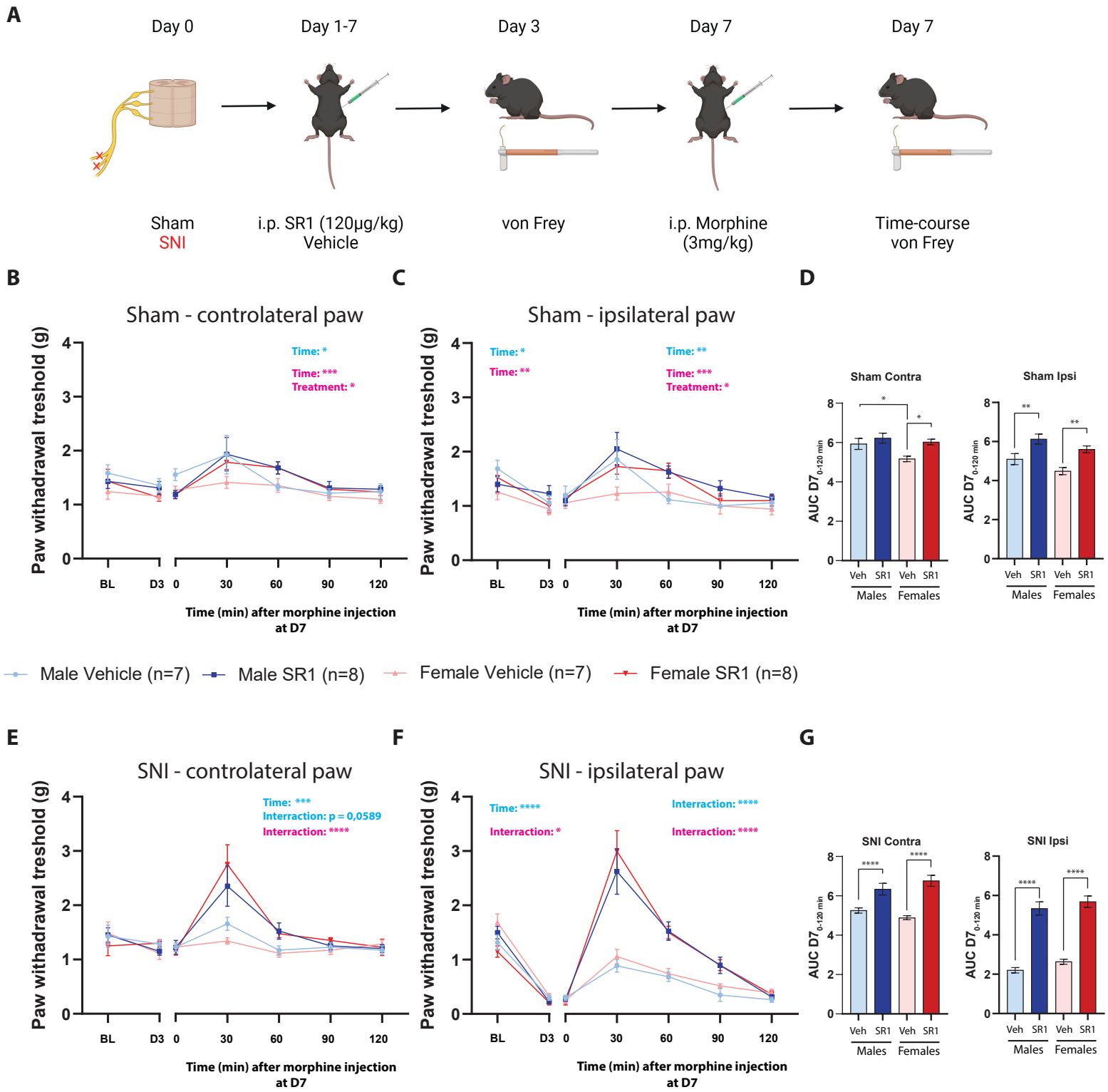

A
Day 0
Day 1-7
Day 3
Day 7
Day 7
Sham
SNI
i.p. SR1 (120µg/kg)
Vehicle
von Frey
i.p. Morphine
(3mg/kg)
Time-course
von Frey
B
Sham - controlateral paw
Paw withadrawal treshold (g)
Time: *
Time: ***
Treatment: *
BL
D3
0
30
60
90
120
Time (min) after morphine injection
at D7
C
Sham - ipsilateral paw
Time: *
Time: **
Time: **
Time: ***
Treatment: *
D
Sham Contra
Sham Ipsi
AUC D7 0-120 min
Veh
SR1
Males
Females
Male Vehicle (n=7)
Male SR1 (n=8)
Female Vehicle (n=7)
Female SR1 (n=8)
E
SNI - controlateral paw
Time: ***
Interaction: p = 0,0589
Interaction: ****
F
SNI - ipsilateral paw
Time: ****
Interaction: *
Interaction: ****
Interaction: ****
G
SNI Contra
SNI Ipsi

Figure 27: Etude *in vivo* de l'inhibition de l'AhR sur l'effet analgésique de la morphine.

(A) Protocole expérimental utilisé lors de l'étude. Mesure des seuils de sensibilité mécanique des animaux Sham du côté controlatéral **(B)** et ipsilatéral **(C)** avant et après injection de 3mg/kg de morphine. Mesure des seuils de sensibilité mécanique des animaux SNI du côté controlatéral **(E)** et ipsilatéral **(F)** avant et après injection de 3mg/kg de morphine. Test ANOVA à deux facteurs à mesures répétées suivi d'un test de comparaisons multiples de Sidak. Mesure de l'aire sous la courbe à D7 de l'effet analgésique de la morphine chez les animaux Sham **(D)** et SNI **(G)**. Test ANOVA à deux facteurs suivi d'un test de comparaisons multiples de Sidak. *: p-value < 0.05, **: p-value < 0.005, ***: p-value < 0.0005, ****: p-value < 0.0001. N=7 pour les animaux traités au Véhicule et n=8 pour les animaux traités au SR1.

Etude de l'effet de l'inhibition de l'AhR sur l'effet analgésique de la morphine *in vivo.*

L'effet analgésique de la morphine est décrit comme étant diminué lors d'une douleur neuropathique. La douleur neuropathique se caractérise par une neuroinflammation induite par les microglies et les astrocytes. Mon hypothèse qui pourrait expliquer cette perte de l'effet analgésique de la morphine est l'existence d'une augmentation du métabolisme de cette molécule en M3G dans le CNS. Ce métabolisme, au vu de mes résultats *in vitro*, serait dépendant d'une activation de l'AhR astrocytaire qui pourrait augmenter l'expression de l'UGT1A6a.

Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai utilisé le modèle SNI, qui est un modèle de douleur neuropathique bien caractérisé dans la littérature (Decosterd et Woolf, 2000). Des animaux pseudo-opérés « Sham » ont également été utilisés dans les expériences. La sensibilité mécanique basale des animaux a été vérifiée avant la chirurgie (BL), puis à trois jours après la chirurgie (D3) à l'aide du test des filaments de von Frey afin de comparer l'effet de la chirurgie et du traitement. En effet, suite à la chirurgie, les animaux ont reçu 120µg/kg de SR1 de façon journalière pendant une semaine avant d'être injectés avec de la morphine à 3mg/kg au septième jour (D7) après la chirurgie **(Figure 27A)**. Des animaux contrôles ayant été injectés avec une solution Véhicule ont également été utilisés pour contrôler l'effet des injections de SR1 sur la sensibilité mécanique. Finalement, des animaux mâles et femelles ont été utilisés dans les expériences, étant donné que la douleur chronique peut impacter aussi bien les hommes que les femmes.

Lors des analyses statistiques, j'ai volontairement décidé de ne mettre que les effets principaux testés lors de l'ANOVA afin de garder les graphiques lisibles.

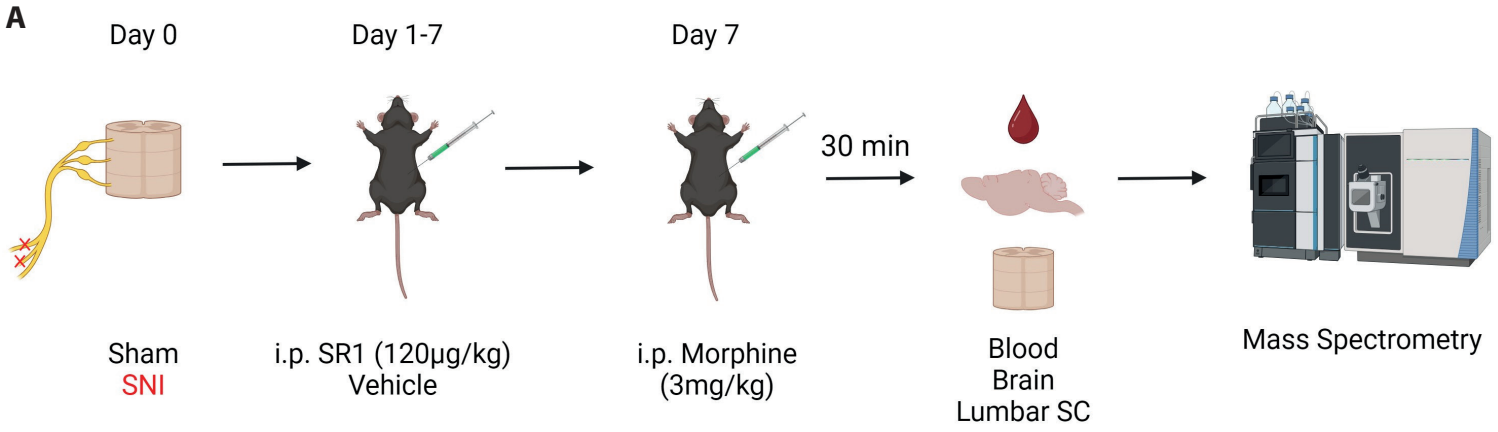
Dans un premier temps, aucune différence n'a été observée du côté controlatéral entre les seuils de sensibilité basale et les traitements Véhicule/SR1 chez les animaux Sham après 3 jours d'injection **(Figure 27B)**. Ces résultats indiquent que le SR1 ne possède pas d'effet sur les seuils de sensibilité mécanique. Du côté ipsilatéral, un effet temps est observé suite à la chirurgie avec une diminution des seuils de sensibilité mécanique à D3 comparé à la BL **(Figure 27C)**. Ce résultat est probablement lié à la phase inflammatoire aigue qui peut être induite par la chirurgie. Cependant, aucun effet traitement n'est observé, indiquant que le SR1 n'améliore pas le seuil nociceptif.

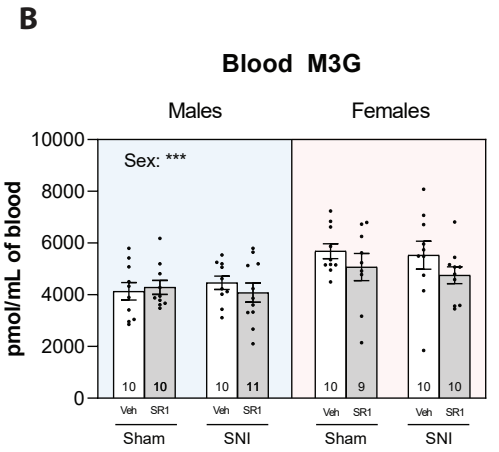
En ce qui concerne l'étude de l'effet analgésique de la morphine au jour 7 (D7), un effet temps est observé chez tous les animaux Sham **(Figure 27B et 27C)**. Néanmoins, il existe un effet traitement lié au SR1 seulement chez les femelles, du côté ipsilatéral **(Figure 27B et 27C)**. En effet, les souris femelles traitées au SR1 montrent des seuils de sensibilité mécanique plus élevés que les souris femelles traitées au Véhicule lorsqu'elles sont injectées avec 3mg/kg de morphine **(Figure 27B et 27C)**. Ce résultat est confirmé par l'analyse des aires sous la courbe durant la cinétique de l'effet analgésique de la morphine (AUC $D7_{0\text{-}120\ min}$; **Figure 27D**). Cependant cette analyse montre également que l'AUC est significativement plus élevée du côté ipsilatéral chez les souris mâles.

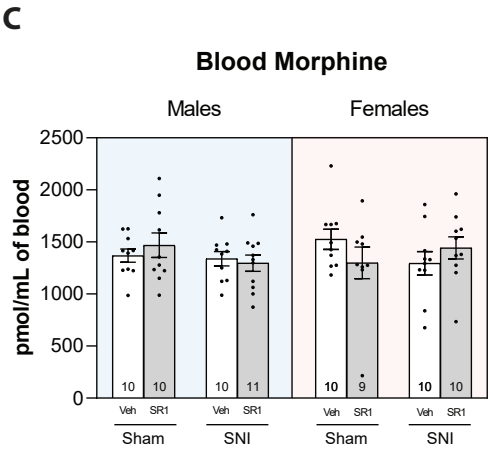
Au sujet des animaux SNI, les seuils de sensibilité basale restent inchangés du côté controlatéral après la chirurgie et le traitement au SR1 **(Figure 27E)**. Néanmoins, du côté ipsilatéral à la chirurgie, on observe une très nette diminution des seuils de sensibilité à D3 chez les mâles et les femelles. Cette observation est caractéristique d'une allodynie mécanique classiquement observée lors de douleurs neuropathiques **(Figure 27F)**. De plus, l'ANOVA montre une interaction chez les souris femelles, suggérant qu'il existe un effet de l'injection du SR1 du côté ipsilatéral à la chirurgie **(Figure 27F)**. Néanmoins, il semblerait que cet effet soi lié au fait que les seuils de base des souris femelles injectées au SR1 aient été plus faibles que celles injectées au Véhicule.

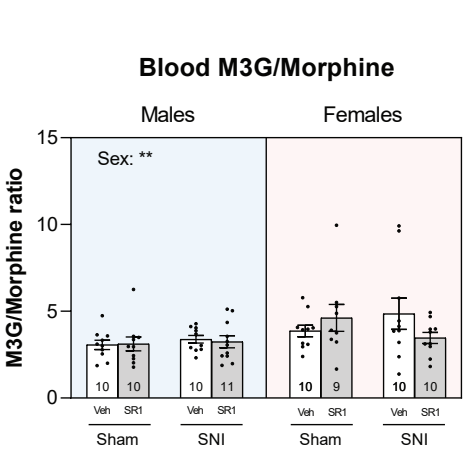
Concernant l'effet analgésique de la morphine à D7 chez les animaux SNI, cet effet est largement supérieur chez les animaux traités au SR1 comparé à ceux traités au Véhicule, que ce soit du côté controlatéral **(Figure 27E)** ou ipsilatéral **(Figure 27F)** à la chirurgie. Ces résultats sont également confirmés avec l'analyse de l'AUC de la cinétique de l'effet analgésique à D7 **(Figure 27G).**

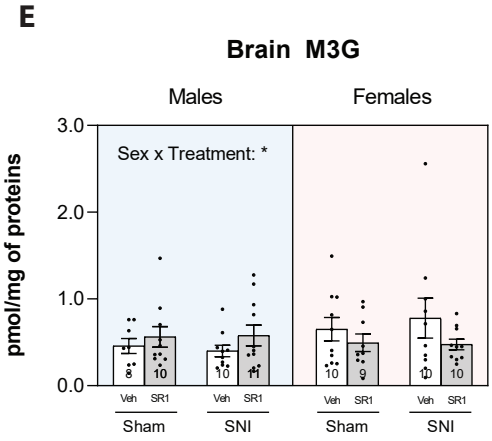
Ces résultats m'ont permis de tirer plusieurs conclusions. Premièrement, un traitement au SR1 ne modifie pas les seuils de sensibilité mécanique chez des animaux Sham ou neuropathiques en absence de morphine. Deuxièmement, un traitement chronique au SR1 durant 7 jours consécutifs améliore l'effet analgésique de la morphine chez des animaux Sham bien que cet effet soit nettement supérieur chez les animaux neuropathiques (SNI). De plus, seulement de rares différences de sexe ont été notées lors des expériences de comportement, qui semblent plus être liées au test nociceptif en lui-même qu'à un réel effet du SR1. Ceci signifie probablement que l'effet du SR1 n'est pas sexe-dépendant.

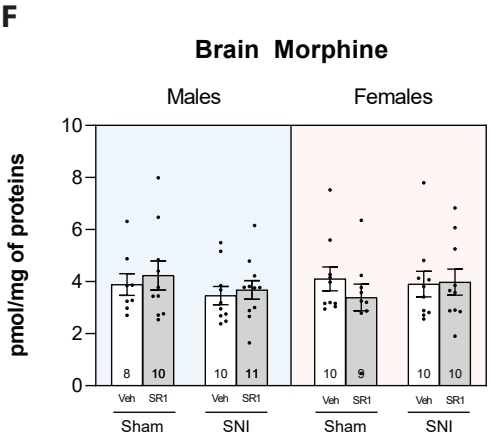

A
Day 0
Day 1-7
Day 7
30 min
Sham
SNI
i.p. SR1 (120µg/kg)
Vehicle
i.p. Morphine
(3mg/kg)
Blood
Brain
Lumbar SC
Mass Spectrometry

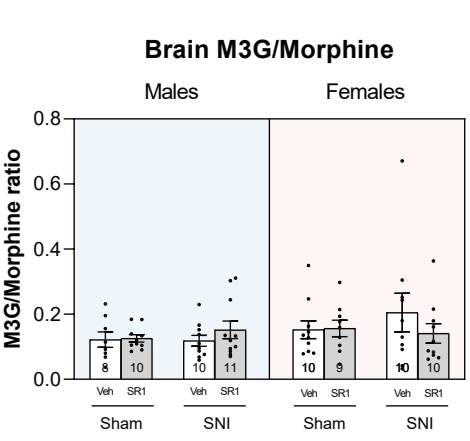

B
Blood M3G
Males
Females
Sex: ***
pmol/mL of blood
Sham
SNI

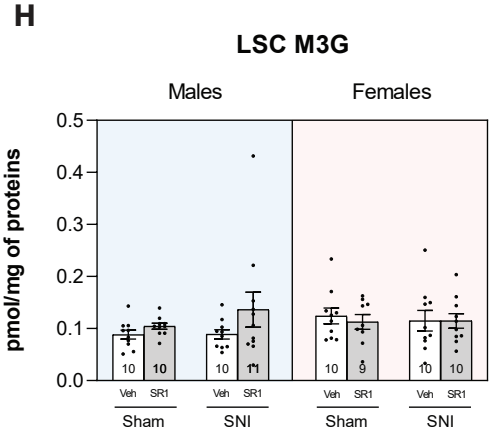

C
Blood Morphine
Males
Females
pmol/mL of blood
Sham
SNI

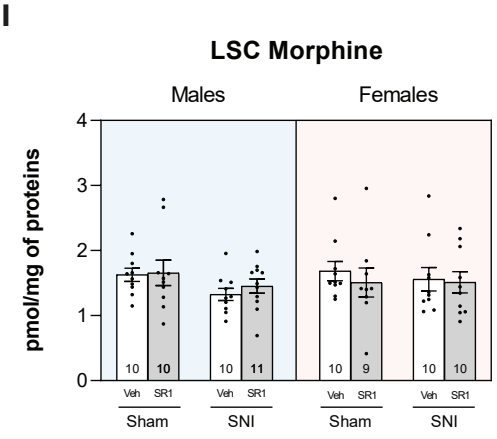

D
Blood M3G/Morphine
Males
Females
Sex: **
M3G/Morphine ratio
Sham
SNI


E
Brain M3G
Males
Females
Sex x Treatment: *
pmol/mg of proteins
Sham
SNI


F
Brain Morphine
Males
Females
pmol/mg of proteins
Sham
SNI


G
Brain M3G/Morphine
Males
Females
M3G/Morphine ratio
Sham
SNI


H
LSC M3G
Males
Females
pmol/mg of proteins
Sham
SNI


I
LSC Morphine
Males
Females
pmol/mg of proteins
Sham
SNI

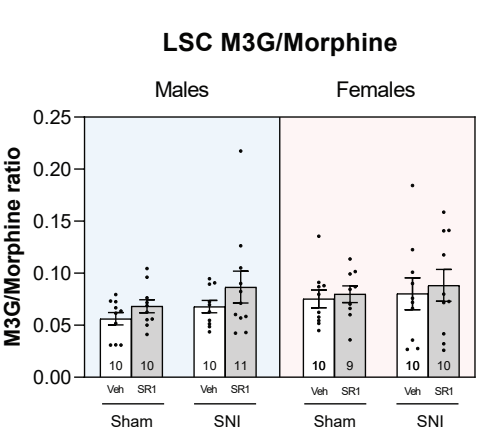

J
LSC M3G/Morphine
Males
Females
M3G/Morphine ratio
Sham
SNI

Figure 28: Etude l'inhibition de l'AhR sur le métabolisme périphérique et central de la morphine *in vivo*.

(A) Protocole expérimentale utilisé lors de cette étude. Mesure des quantités de M3G, de morphine et du ratio M3G/Morphine dans le sang *(Blood)* **(B, C, D)**, le cerveau *(Brain)* **(E, F, G)** ainsi que la moelle épinière lombaire *(Lumbar Spinal Cord (SC) – LSC)* **(H, I, J)**. Test d'ANOVA à deux facteurs ou ART ANOVA.. *: p-value < 0.05, **: p-value < 0.005, ***: p-value < 0.0005. Le nombre d'animaux utilisé lors des expériences est indiqué en bas de chaque barre dans les graphiques.

Etude de l'inhibition de l'AhR sur le métabolisme périphérique et central de la morphine *in vivo*

Les résultats de la **Figure 28** montrent qu'une injection de SR1, correspondant à un inhibiteur de l'AhR, améliore l'effet analgésique de la morphine chez des animaux souffrant de douleurs neuropathiques (SNI). Afin de vérifier si cet effet résulte de l'inhibition du métabolisme de la morphine en M3G *in vivo*, nous avons utilisé le même protocole expérimental que pour les expériences de comportement. Cependant, les souris ont été mises à mort 30 minutes après l'injection de morphine. Le but était de prélever le sang, le cerveau ainsi que la moelle épinière lombaire (Lumbar Spinal Cord - LSC) pour réaliser des dosages de morphine et de M3G par LC-MS/MS **(Figure 28A)**.

Les résultats des dosages sanguins ont montré qu'il n'y a aucun effet de la chirurgie et du traitement SR1 sur les quantités de M3G **(Figures 28B)** et de morphine **(Figures 28C)** circulantes, de même que sur les valeurs des ratios M3G/morphine **(Figures 28D).** Néanmoins, il semblerait qu'il y ait un effet sexe concernant les quantités de M3G dans le sang, avec des quantités plus élevées chez les souris femelles comparées aux mâles.

Concernant les dosages cérébraux réalisés sur des cerveaux entiers homogénéisés, il n'existe aucun effet de l'ANOVA pour la M3G **(Figure 28E)**, la morphine **(Figure 28F)** et les ratios M3G/Morphine **(Figure 28G)**.

Finalement, des analyses similaires ont été réalisées dans la LSC correspondant au site d'innervation du nerf sciatique lésé lors du SNI. Tout comme dans le cerveau, aucune différence dans les quantités de M3G **(Figures 28H)**, de morphine **(Figures 28I)** ou des ratios M3G/morphine n'a été observée **(Figures 29J)**.

En résumé, ces dosages nous indiquent qu'un traitement au SR1 ne modifie pas de manière globale (périphérie, cerveau entier et LSC) le métabolisme périphérique et central de la morphine.

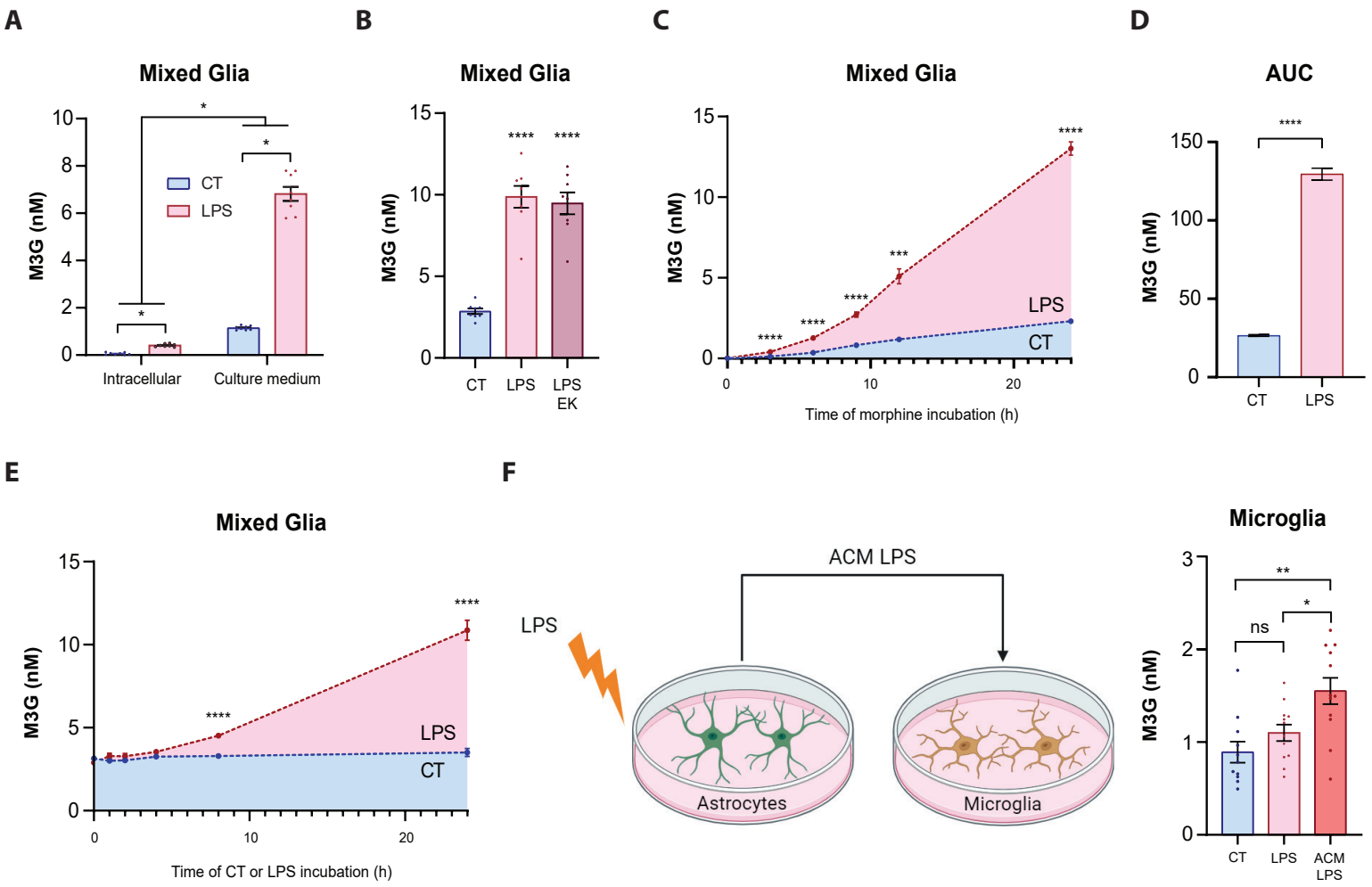

A
Mixed Glia
M3G (nM)
CT
LPS
Intracellular
Culture medium
B
Mixed Glia
M3G (nM)
CT
LPS
LPS EK
C
Mixed Glia
M3G (nM)
LPS
CT
Time of morphine incubation (h)
D
AUC
M3G (nM)
CT
LPS
E
Mixed Glia
M3G (nM)
LPS
CT
Time of CT or LPS incubation (h)
F
ACM LPS
LPS
Astrocytes
Microglia
Microglia
M3G (nM)
ns
CT
LPS
ACM LPS
G
ELISA quantification
TNFα (pg/mL)
IL1α (pg/mL)
CT LPS
ACM
H
Microglia
M3G (nM)
CT
LPS
TNFα
IL1α
TNFα + IL1α
I
Microglia
M3G (nM)
CT
LPS
No nAb
nAb TNFα
nAb IL1α
nAb TNFα + nAb IL1α
ACM LPS

Figure Supplémentaire 1:

(A) Dosages intra et extracellulaires (milieu de culture) de la M3G par LC-MS/MS à partir de cellules gliales mixtes incubées avec de la morphine en condition contrôle ou LPS. Test ART ANOVA à deux facteurs suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey. **(B)** Effet du LPS et du LPS-EK (agoniste spécifique du TLR4) sur l'augmentation du métabolisme de la morphine sur les cellules gliales mixtes. Test ANOVA de Welch suivi d'un test de comparaisons multiples de Tamhane T2 par rapport à la condition CT. **(C)** Cinétique du métabolisme de la morphine après 24h d'incubation CT (en bleu) ou LPS (en rouge) sur les cellules gliales mixtes. Des différences significatives entre les deux conditions sont observées dès 3h d'incubation avec de la morphine. Test ANOVA à deux facteurs à mesures répétées suivi d'un test de comparaison multiples de Sidak. **(D)** Analyse des aires sous les courbes CT et LPS. Test-t non apparié suivi d'une correction de Welch. **(E)** Effet d'une incubation CT (en bleu) ou LPS (en rouge) sur le métabolisme de la morphine par les cellules gliales mixtes au cours du temps. Un effet est observé à partir de 8h d'incubation avec le LPS. Test ANOVA à deux facteurs à mesures répétées suivi d'un test de comparaisons multiples de Sidak. **(F)** Effet du milieu conditionné astrocytaire stimulé au LPS (ACM LPS) sur le métabolisme de la morphine par les microglies purifiées. Test ANOVA à un facteur suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey. **(G)** Dosage par ELISA du TNFα et de l'IL1α dans des milieux culture d'astrocytes CT ou stimulés au LPS. Test de Mann-Whitney. **(H)** Métabolisme de la morphine par des cultures primaires de microglies purifiées stimulées avec plusieurs facteurs pro-inflammatoires libérés par les astrocytes (TNFα et/ou IL1α). Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn par rapport à la condition CT. **(I)** Métabolisme de la morphine par des cultures primaires de microglies purifiées et stimulées avec du ACM LPS dans lequel des nAb contre le TNFα ou l'IL1α ont été incubés. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn. *: p-value < 0.05, **: p-value < 0.005, ***: p-value < 0,0005 et *** : p-value < 0,0001.

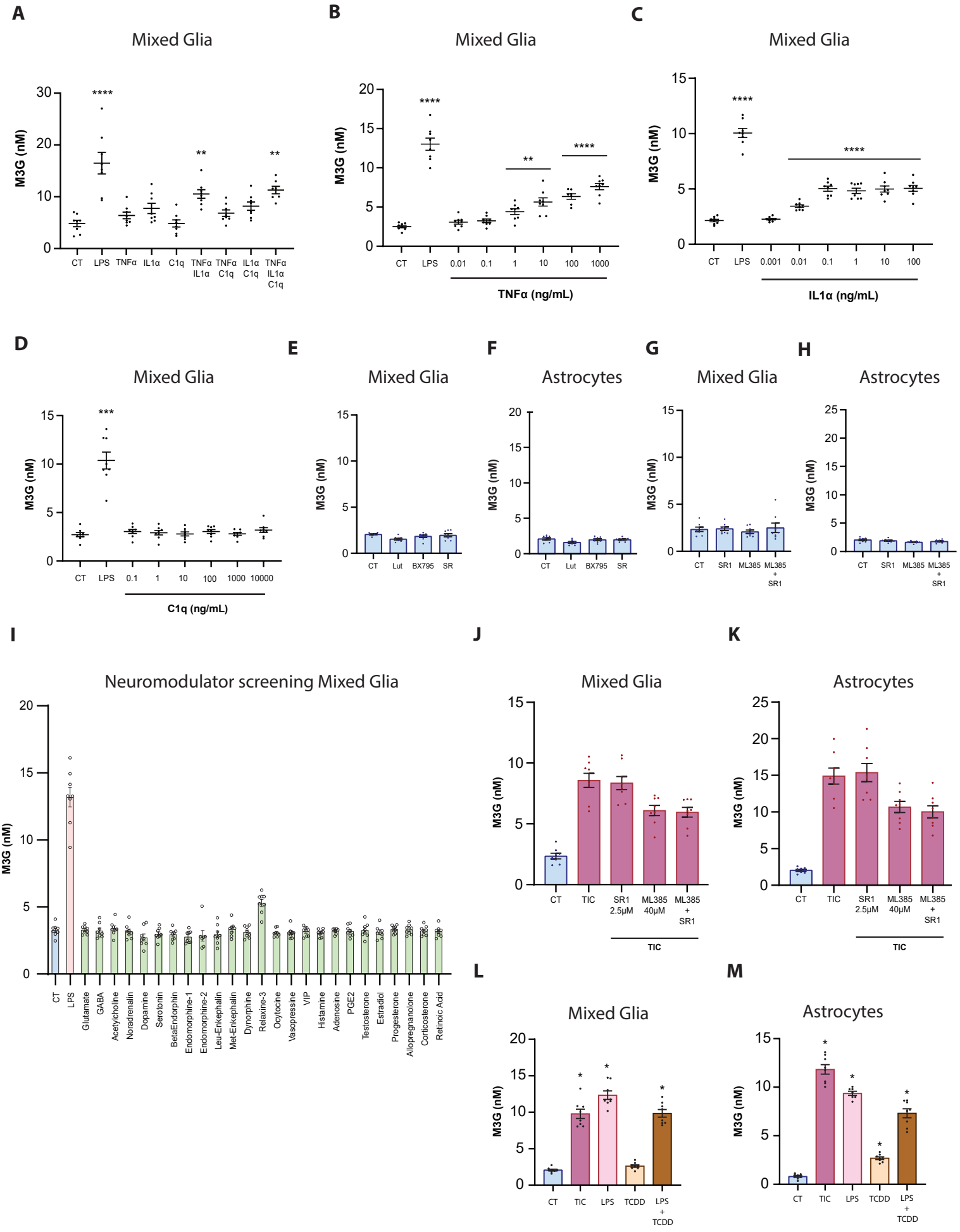

A
Mixed Glia
M3G (nM)
CT
LPS
TNFα
IL1α
C1q
TNFα IL1α
TNFα C1q
IL1α C1q
TNFα IL1α C1q
B
Mixed Glia
TNFα (ng/mL)
C
Mixed Glia
IL1α (ng/mL)
D
Mixed Glia
C1q (ng/mL)
E
Mixed Glia
Lut
BX795
SR
F
Astrocytes
G
Mixed Glia
SR1
ML385
ML385 + SR1
H
Astrocytes
I
Neuromodulator screening Mixed Glia
Glutamate
GABA
Acetylcholine
Noradrenalin
Dopamine
Serotonin
BetaEndorphin
Endomorphine-1
Endomorphine-2
Leu-Enkephalin
Met-Enkephalin
Dynorphine
Relaxine-3
Ocytocine
Vasopressine
VIP
Histamine
Adenosine
PGE2
Testosterone
Estradiol
Progesterone
Allopregnanolone
Corticosterone
Retinoic Acid
J
Mixed Glia
TIC
SR1 2.5μM
ML385 40μM
ML385 + SR1
K
Astrocytes
L
Mixed Glia
TCDD
LPS + TCDD
M
Astrocytes

Figure Supplémentaire 2:

(A) Effet du TNFα, de l'IL1α et du C1q seuls ou en combinaison sur le métabolisme de la morphine sur par les cellules gliales mixtes. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn par rapport à la condition CT. **(A)** Effet dose-réponse d'une incubation de **(B)** TNFα, **(C)** d'IL1α et de **(D)** C1q sur le métabolisme de la morphine par des cellules gliales mixtes. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn par rapport à la condition CT. Métabolisme de la morphine par **(E)** des cellules gliales mixtes ou **(F)** des astrocytes purifiés en présence ou non des inhibiteurs des voies NFκB (Lutéoline ; 50µM), IRF (BX795 ; 500nM) et AP-1 (SR11302 ; 10µM). Métabolisme de la morphine par **(G)** des cellules gliales mixtes ou **(H)** par les astrocytes purifiés et en présence ou non des inhibiteurs des voies AhR (SR1 ; 2.5µM) ou Nrf2/Nfe2l2 (ML385 ; 40µM). **(I)** Effet de différents neuromodulateurs sur le métabolisme de la morphine dans des cellules gliales mixtes. L'ensemble des neuromodulateurs ont été utilisés à une dose de 100 nM. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn par rapport à la condition CT. Métabolisme de la morphine par **(J)** des cellules gliales mixtes ou **(K)** par des astrocytes purifiés et en présence ou non des inhibiteurs des voies AhR (SR1 ; 2.5µM) ou Nrf2/Nfe2l2 (ML385 ; 40µM). Métabolisme de la morphine par **(L)** des cellules gliales mixtes ou **(M)** par des astrocytes purifiés et en présence ou non d'un agoniste AhR (TCDD ; 10nM). Test ANOVA à un facteur suivi d'un test de comparaisons multiples de Holm-Sidak. *: p-value < 0.05, **: p-value < 0.005, ***: p-value < 0,0005 et ****: p-value < 0,0001.

Discussion

Mise au point du protocole de culture primaires de cellules gliales

Afin d'étudier le rôle des cellules gliales dans le métabolisme de la morphine, j'ai choisi d'utiliser des cultures primaires d'astrocytes et de microglies à partir de souriceaux âgés de P0-P5. La majorité des cellules présentes dans nos conditions étaient des astrocytes et des microglies. En effet, la méthode de culture utilisée ne permet pas la survie des neurones et des progéniteurs d'oligodendrocytes. En effet, ces deux types cellulaires nécessitent des facteurs qui ne sont pas présents dans nos conditions pour se développer et se différencier en oligodendrocytes matures (Sahu et al., 2019; Weil et al., 2019). Néanmoins, un point qui s'est avéré critique lors de la mise en place de ces cultures était la contamination des cultures gliales par les fibroblastes issus des méninges qui entourent le cerveau. Afin d'éviter une telle contamination, il faut retirer l'ensemble de ces méninges. Pour cela, j'ai mis en place un protocole très rapide d'élimination de ces méninges en plongeant les cerveaux dans une solution d'éthanol 70% durant 10 secondes. Cette étape permet de tuer l'ensemble des cellules qui constituent les méninges d'une part et de faciliter leur retrait d'autre part.

Une des étapes de ma thèse a été de travailler spécifiquement avec des cultures primaires de microglies et d'astrocytes purifiés. Pour cela, j'ai utilisé un kit de purification MACS (magnetic activated cell sorting) basé sur l'utilisation d'anticorps couplés à des billes magnétiques qui reconnaissent spécifiquement des antigènes extracellulaires exprimés par certains types cellulaires. Dans le cas des microglies, j'ai utilisé des anticorps qui reconnaissent le CD11b permettant une purification reproductible et efficace de ces cellules. Concernant les astrocytes, j'ai utilisé des anticorps qui reconnaissent le transporteur de glutamate et d'aspartate (GLAST). Dans ce cas-là, les purifications étaient beaucoup moins reproductibles dans la mesure où des microglies étaient souvent présentes dans les cultures. Cela peut s'expliquer par le fait qu'elles fixaient, de façon aspécifique, ces anticorps probablement *via* les récepteurs qui reconnaissent le fragment cristallisable des anticorps (FcR) (Song et al., 2004). Pour pallier à ce problème de purification des astrocytes, j'ai mis en place un protocole qui permet d'éliminer de façon spécifique les microglies lors de la mise en place de la culture primaire (Van Zeller et al., 2022). Pour ce faire, j'ai utilisé un inhibiteur des récepteurs CSFR1, décrit comme étant crucial dans le développement et le maintien de l'homéostasie microgliale (Bohlen et al., 2019). Ainsi, j'ai pu éliminer de façon spécifique les microglies en utilisant du

PLX3397 (5µM) durant les 5 premiers jours de culture, ce qui m'a permis d'obtenir une culture primaire pure en astrocytes.

L'ensemble de ces mises en place techniques m'ont ainsi permis d'étudier de façon approfondie le métabolisme de la morphine, en réalisant notamment des dosages quantitatifs par LC-MS/MS.

Dosages par LC-MS/MS

Il existe plusieurs techniques pour quantifier de manière précise des molécules ou protéines. Néanmoins, dans le cas de petites molécules dont les structures chimiques sont très proches, telles que la morphine et la M3G, la LC-MS/MS, avec l'utilisation d'une chromatographie liquide et d'un spectromètre de masse triple quadrupôle (LC-MS/MS), reste la technique la plus sensible, la plus spécifique et la plus quantitative. En effet, la plupart des autres techniques de dosage de petites molécules autres que la LC-MS/MS reposent sur l'utilisation d'anticorps qui permettent de reconnaitre les cibles que l'on veut doser, avec des réactivités croisées potentielles avec des molécules structuralement proches. Ce problème est évidemment rencontré dans le cas de la morphine et la M3G, qui sont logiquement structuralement très proches. Pour pallier à ce problème, nous avons choisi d'utiliser la LC-MS/MS, qui se base sur les propriétés physico-chimiques des composés ciblés ainsi que leur masse molaire (en g/mol ou Da). En effet, la LC en amont de la MS permet de séparer les molécules, *via* un gradient d'acétonitrile par exemple, en fonction de leur hydrophobicité (l'élution se fait à un pourcentage de solvant organique connu) tandis que la MS permet de trouver de manière précise (à 0,1Da près dans notre cas) les molécules cibles (ions parents) afin de les fragmenter en ions fils. Les fragments générés servent ainsi de signature moléculaire spécifique à chaque molécule et permettent de quantifier de manière précise les molécules initiales fragmentées. En effet, il peut arriver que plusieurs molécules aient la même masse molaire que le composé que vous souhaitez quantifier mais le risque d'avoir des fragments générés de même masse est extrêmement faible.

L'autre avantage de la LC-MS/MS est la possibilité de réaliser des quantifications absolues par la méthode de dilution isotopique. En effet, cette méthode de quantification se base sur l'utilisation de molécules modifiées présentant des masses molaires légèrement plus

importantes. Par exemple, dans notre cas, nous avons utilisé des molécules dans lesquelles trois atomes d'hydrogène (^{1}H, masse = 1Da) sont remplacés par trois atomes de deutérium (^{2}H, masse = 2Da), ce qui confère à ces molécules « deutérées » une masse molaire supérieure de 3Da (D3-M3G : 464,46Da) par rapport à la molécule dosée (M3G : 461,46Da). Ces molécules deutérées se comportent exactement de la même manière que les molécules cibles en LC-MS/MS. Ainsi, en mettant des quantités connues de ces standards internes deutérés nous pouvons déterminer de manière extrêmement précise les quantités des molécules cibles dans les échantillons en éliminant l'effet matrice de l'échantillon (effet qui diminue le signal des composés recherchés) et l'utilisation de gammes étalon externes. Pour toutes ces raisons, la LC-MS/MS couplée à la dilution isotopique reste la technique de référence pour doser et quantifier de manière précise plusieurs molécules simultanément dans un même échantillon.

Modèle d'étude du métabolisme central des composés endogènes et exogènes par les cellules gliales

Les expériences que j'ai mises en place *in vitro* ouvrent la voie à un criblage de composés qui pourraient être métabolisés par les cellules gliales *in vitro*. Lors de mon doctorat, ces expériences ont été optimisées pour être réalisées en plaque 96 puits. Ainsi, un tel outil ouvre la porte à des expériences de métabolisme avec ces différents composés, en combinant plusieurs conditions expérimentales. Un point qui pourrait néanmoins être amélioré dans cet outil serait la mise en place des cultures primaires des autres cellules qui composent le CNS. En effet, pour avoir un aspect plus translationnel des mécanismes observés *in vivo,* il serait indispensable de caractériser le rôle des neurones, des oligodendrocytes ainsi que des cellules de la BHE. Pour pousser ce modèle encore plus loin, il serait intéressant de mettre au point une approche similaire ciblant des composés qui sont métabolisés avec des enzymes de métabolisme de phase I telles que les CYP450. En effet, de nombreuses molécules utilisées en clinique ont pour cible le CNS (John et al., 2011). Bien que la pharmacodynamique de ces composés soit généralement bien caractérisée, il est essentiel de prendre également en compte la pharmacocinétique de ces derniers. Ainsi, la mise en place d'un tel outil *in vitro* pourrait se révéler très important dans ce but et faciliterait cette caractérisation. Finalement, l'utilisation d'une telle approche pourrait également permettre la caractérisation et la décortication des mécanismes de dégradation de certains composés endogènes.

Métabolisme central *in vitro* de la morphine

L'expression des UGTs, qui sont les enzymes métabolisant la morphine, a été évaluée à l'aide d'une approche immunocytochimique dans mes cultures primaires de cellules gliales **(Figure 1A)**. Nous avons observé que l'ensemble des microglies et des astrocytes étaient immunoréactifs pour cette enzyme, ce qui est en cohérence avec les données de la littérature (Suleman et al., 1998; Heurtaux et al., 2004; Heurtaux et al., 2006; Gradinaru et al., 2012; Togna et al., 2013). Néanmoins, dans mon cas, j'ai utilisé un anticorps qui reconnait toutes les isoformes du sous-groupe 1A de la superfamille des UGTs, ce qui ne permet pas d'identifier précisément l'UGT impliquée dans le métabolisme de la morphine. Dans le cas présent, une approche par RT-qPCR aurait pu compléter mon étude afin de préciser quels membres des UGT1A sont présents dans les microglies et astrocytes.

Par la suite, mes résultats montrent qu'il existe un métabolisme basal de la morphine dans les microglies et les astrocytes et que la condition neuroinflammatoire induite par le LPS entraine une plus forte dégradation de cette molécule. Ces données montrent ainsi pour la première fois un tel mécanisme de dégradation de la morphine au niveau cellulaire dans le CNS pour les astrocytes. Des travaux similaires avaient toutefois caractérisés un tel processus pour d'autres molécules telles que le naphtol ou le 2-(3-benzoylphenyl)propionic acid (ketoprofène) (Heurtaux et al., 2004; Heurtaux et al., 2006; Gradinaru et al., 2012). En ce qui concerne les microglies, des travaux similaires avec la morphine avaient été publiées par Togna et collaborateurs en 2013. Dans cette étude, les auteurs ont purifié des microglies issues de ratons et ont évalué le métabolisme de la morphine en condition basale (Togna et al., 2013). (*Pour l'anecdote, c'est sur cette publication que je m'étais basée pour réaliser toutes les premières expériences de ma thèse.)* Néanmoins, plusieurs résultats sont à débattre dans cette étude, à commencer par le fait que les auteurs montrent des quantités de morphine et de M3G générées par les microglies de manière endogène. Bien que la théorie de la morphine endogène existe dans la littérature (Muller et al., 2008; Glattard et al., 2010; Charron et al., 2011; Laux et al., 2011; Laux-Biehlmann et al., 2012; Laux et al., 2012; Laux-Biehlmann et al., 2014), les quantités observées dans cet article sont équivalentes à des concentrations retrouvées lors de traitement avec de fortes concentrations de morphine exogène en culture (*i.e.*, autour du µM). La morphine endogène étant trouvée à l'état de trace, il est impossible que les concentrations de morphine et de M3G endogènes trouvées soient aussi importantes.

De plus, les auteurs ne montrent aucune caractérisation immunocytochimique de leur culture. Il se pourrait donc que leur culture de microglies soit sujette à une contamination par des astrocytes, d'où le métabolisme excessif de la morphine observé lorsque les cellules sont incubées avec cette morphine.

Autres types cellulaires centraux impliqués dans le métabolisme de la morphine

Mes études *in vitro* se sont volontairement restreintes à l'étude du métabolisme de la morphine par les microglies et les astrocytes. Néanmoins, il n'est pas à exclure que d'autres types cellulaires soient également impliqués dans ce processus. En effet, il a été décrit dans la littérature que les neurones expriment également les UGTs (Suleman et al., 1998). Il serait ainsi judicieux d'étudier ce mécanisme en travaillant avec des cultures primaires de neurones. Cependant, il est difficile d'obtenir des cultures purifiées de neurones étant donné que la survie et le développement de ces cellules dépendent de facteurs solubles libérés par les astrocytes ou encore les fibroblastes (Gordon et al., 2013; Sahu et al., 2019). Pour pallier à ce problème, il serait possible de travailler avec des cellules souches embryonnaires que l'on peut différencier en neurones matures (Vieira et al., 2018; Bai et al., 2023). Une autre possibilité serait de travailler avec des lignées cellulaires, comme par exemple le SH-SY5Y, une lignée de neuroblastomes humains (Lopez-Suarez et al., 2022). Néanmoins, ces résultats seraient à prendre avec plus de pincettes étant donné que nous avons déjà comparé des résultats de cultures de lignées de microglies (BV2) (Blasi et al., 1990) et astrocytes (U373) (Motaln et al., 2015) avec nos cultures primaires et nous avons observé de grandes différences dans le métabolisme de la morphine. La même chose peut également être discutée pour les OPC/oligodendrocytes ainsi que les cellules de la BHE.

Effet des facteurs sécrétés par les microglies sur le métabolisme de la morphine par les astrocytes

Après avoir observé que l'effet du LPS sur le métabolisme de la morphine était amplifié dans les cultures gliales mixtes par rapport aux cultures d'astrocytes purifiés **(Figure 1C)**, l'hypothèse que j'ai émise était l'existence d'une synergie entre les microglies et les astrocytes. Notamment, mon schéma hypothétique reposait sur une activation des microglies

par le LPS, qui libéraient des facteurs pro-inflammatoires qui, à leur tour, augmentaient le métabolisme de la morphine en M3G par les astrocytes. Ainsi, à l'aide d'articles publiés dans la littérature, j'ai pu réduire ces facteurs pro-inflammatoires au nombre 3 : le TNFα, l'IL1α et le C1q. Après avoir incubé ces facteurs seuls ou en combinaison avec des astrocytes purifiés, j'ai montré pour la première fois que le métabolisme de la morphine en M3G était augmenté. De façon intéressante, il semblerait que la combinaison des 3 facteurs pro-inflammatoires, décrits pour induire une réactivité astrocytaire (Liddelow et al., 2017), soit suffisante pour induire un tel effet. Un point à discuter est la concentration de ces facteurs utilisés tout au long des expériences (TNFα 30ng/mL ; IL1α 4 ng/ml). Il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences en se basant sur les résultats obtenus par ELISA dans les milieux conditionnés des microglies stimulées au LPS et utiliser des concentrations de ces cytokines proches de ce que libèrent les microglies.

Analyse transcriptomique et fonctionnelle des microglies et astrocytes en condition contrôle et neuroinflammatoire

Par la suite, mon but était de caractériser les voies intracellulaires mises en jeu lors d'une neuroinflammation, qui pourraient moduler le métabolisme de la morphine. Pour ce faire, j'ai utilisé une base de données RNAseq issue de l'étude de Guttenplan et coll. en 2020 (Guttenplan et al., 2020). Dans cette étude, les auteurs ont réalisé du RNAseq sur des microglies et astrocytes mis en culture en condition contrôle, ou stimulés soit au LPS (microglies), soit au TIC (astrocytes). L'analyse transcriptomique couplée à des expériences de métabolisme fonctionnel basées sur l'utilisation d'inhibiteurs m'ont permis d'identifier un rôle majeur des voies associées à la NFκB et l'AhR dans l'augmentation du métabolisme de la morphine en condition neuroinflammatoire. Ces deux protéines sont des facteurs de transcription, qui, lorsqu'ils sont activés sont transloqués au niveau du noyau afin de se fixer sur des séquences d'ADN et induire l'expression de gènes. Il est possible que ces deux facteurs de transcription agissent seuls mais également en complexe sous forme d'hétérodimères. Dans notre cas, nous n'avons pas déterminé quel scénario était réellement mis en jeu. En effet, nous pourrions tout d'abord avoir une activation de la NFκB qui pourrait recruter l'AhR afin que ce dernier puisse aller induire l'expression des UGTs. L'autre hypothèse serait une association de ces deux facteurs de transcription qui pourraient aller se fixer ensemble sur les

séquences d'ADN codant pour les UGTs et induire ainsi leur transcription. En ce qui concerne ces UGTs, l'analyse transcriptomique des astrocytes stimulés au TIC a permis de mettre en évidence l'augmentation de l'expression de l'UGT1A6a. Nous avons alors utilisé une approche de knock-down afin de confirmer si cette isoforme était bien impliquée dans l'augmentation du métabolisme de la morphine en condition neuroinflammatoire. Cette approche de knock-down s'est basée sur l'utilisation de virus encapsidés avec des shRNA dirigés contre les UGT1A6a. Nous avons pré-incubé nos cellules avec ces virus durant 5j avant de les stimuler au TIC en amont d'une incubation à la morphine. Ainsi, cette expérience m'a permis de mettre en lumière un rôle de l'UGT1A6a dans ce processus. Cependant, il est possible que le shRNA ait pu avoir comme cible l'ARNm des autres isoformes des UGTs au sein des cellules. Pour cette raison, il est essentiel de valider par la suite ces résultats à l'aide d'une analyse par qPCR des différentes isoformes des UGTs lors d'un traitement viral pour induire un knock-down de l'UGT1A6a.

L'association entre des données transcriptomiques provenant d'un autre laboratoire à nos expériences fonctionnelles du métabolisme de la morphine, montre qu'il est possible de combiner les deux approches pour l'étude de ce mécanisme par les cellules gliales. Néanmoins, bien que ces bases de données RNAseq m'aient beaucoup aidé dans l'avancée de ce projet, il aurait été judicieux de valider l'ensemble de marqueurs soit par du RNAseq soit par qPCR. De plus, une approche complémentaire au niveau protéique aurait pu être réalisée par une approche de spectrométrie de masse.

Pour conclure, l'ensemble de ces expériences m'a permis de montrer pour la première fois que les gliales métabolisent la morphine en M3G. De plus, mes résultats montrent que ce métabolisme est très sensible à des variations environnementales, telles qu'une neuroinflammation. En effet, une neuroinflammation induite par le LPS peut activer les microglies qui peuvent libérer des facteurs pro-inflammatoires (TNFα, IL1α et C1q) et stimuler ainsi une augmentation du métabolisme de la morphine par les astrocytes.

Etude de l'inhibition de l'AhR sur l'effet analgésique de la morphine *in vivo*

Comme expliqué précédemment, l'effet analgésique de la morphine est drastiquement réduit lors de douleurs neuropahiques (Lee et al., 1995; Ossipov et al., 1995b;

Ossipov et al., 1995a; Erichsen and Blackburn-Munro, 2002; Rashid et al., 2004; Hashemzaei et al., 2017). Sur la base de mes données *in vitro*, mon hypothèse était qu'une neuroinflammation induisait une augmentation du métabolisme de la morphine, diminuant ainsi ses effets. Ainsi, le but de cette partie *in vivo* était de travailler avec des animaux neuropathiques et d'inhiber le métabolisme central de la morphine afin d'observer si son effet analgésique était augmenté en condition neuropathique. Pour ce faire, j'ai utilisé le modèle de douleur neuropathique SNI (Decosterd and Woolf, 2000). Ce modèle est très robuste dans la mesure où l'ensemble des animaux testés développent une allodynie mécanique lors des expériences de von Frey.

Sur la base de nos résultats obtenus *in vitro*, nous avons choisi d'inhiber l'AhR en utilisant la même molécule qu'*in vitro*, le SR1. De façon intéressante, un article a déjà été publié dans la littérature en utilisant la même stratégie que la nôtre, mais en utilisant de la lutéoline (Hashemzaei et al., 2017). Pour information, la lutéoline a été utilisée dans nos expériences *in vitro* pour inhiber efficacement NFκB et inhiber le métabolisme de la morphine induite par le TIC **(Figure 2D)**. Ainsi, les auteurs ont observé une amélioration de l'effet analgésique de la morphine dans un modèle de ligature du nerf sciatique. Pour l'étude du rôle de l'AhR dans ce mécanisme nous avons ainsi opté pour une injection i.p. chronique de SR1 sur sept jours consécutifs à une dose de 120µg/kg, qui est décrite comme étant non toxique pour la souris (Hwang et al., 2023). Nos résultats ont montré qu'il n'existe aucun effet de l'injection du SR1 seule sur la sensibilité mécanique chez les animaux Sham et SNI trois et sept jours après injection de cette molécule. De manière surprenante, une nette amélioration de l'effet analgésique de la morphine a été observée chez les animaux SNI, avec un pic de l'effet plus élevé à 30 minutes après l'injection comparé aux animaux injectés avec le Véhicule.

Plusieurs autres informations ont également pu être tirées de ces expériences de comportement. Premièrement, un meilleur effet de la morphine est également observé du côté controlatéral chez les animaux SNI traités au SR1 comparé à ceux traités avec le Véhicule. Ce résultat suggère que l'inhibition du SR1 sur l'AhR implique probablement une action supra-spinale. En effet, de nombreux articles ont montré que suite à une SNI, la neuroinflammation au niveau de la ME est surtout localisée du côté ipsilatéral à la chirurgie (Suter et al., 2007). Or, si le SR1 n'agissait qu'au niveau de la ME, nous n'aurions eu un effet que du côté ipsilatéral. De plus, il a été montré que la neuroinflammation supra-spinale suite à une SNI n'était pas

latéralisée dans des structures telles que la PAG ((Fiore and Austin, 2016; Gui et al., 2016; Dubovy et al., 2018)). Pour toutes ces raisons, il est probable que l'effet du SR1 soit principalement supra-spinal. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des injections de SR1 intrathécales ou intracérébroventriculaires, voir intra-structurales afin de déterminer si des différences de l'effet analgésique de la morphine sont observées en fonction des régions ciblées. Ensuite, en plus des animaux SNI, nous avons observé un effet analgésique de la morphine légèrement meilleur chez les animaux Sham prétraités au SR1 en amont d'une injection à la morphine. De mon point de vue, ce résultat souligne le fait que l'expression basale des UGTs n'est que très peu sous le contrôle de l'activité de l'AhR, sous-entendant qu'une neuroinflammation est nécessaire pour induire ce facteur de transcription qui induira à son tour l'expression des UGTs. Finalement, nous n'avons vu aucune différence de sexe liée au traitement de SR1 chez les animaux, suggérant que l'activité de l'AhR en tant que facteur de transcription n'est pas modulée par ce facteur biologique.

Comme évoqué précédemment, nous avons décidé de réaliser des injections chroniques suite à l'induction de la douleur neuropathique, avec une unique dose de SR1 choisie (120 µg/kg). Plusieurs points peuvent être sujets à discussion dans ce protocole. Le premier est le nombre d'injections nécessaires pour observer un effet du traitement. En effet, il serait intéressant de raffiner le protocole afin de voir le nombre d'injections nécessaires pour observer une amélioration de l'effet analgésique de la morphine. De plus, nous avons choisi d'utiliser volontairement une dose faible de morphine (3mg/kg), qui est très peu analgésique (Gabel et al., 2023). Ce choix s'est basé sur des raisons pratiques liées au test de von Frey durant lequel les animaux injectés à la morphine parcourent de grandes distances en tournant en rond dans la boite en plexiglas, ce qui rend difficile la mesure des seuils mécaniques. Pour voir à quel point le prétraitement du SR1 influence l'effet analgésique de la morphine, il serait intéressant de réaliser des doses-réponses de la morphine pour tirer une valeur d'ED50 et la comparer entre les animaux injectés avec une solution de SR1 et Véhicule.

Etude de l'inhibition de l'AhR sur le métabolisme périphérique et central de la morphine *in vivo*

Afin de vérifier si l'injection de SR1 réduit le métabolisme périphérique et/ou central de la morphine, nous avons décidé de réaliser des dosages par LC-MS/MS de la morphine et la M3G en utilisant le même protocole expérimental. Globalement, nos résultats montrent qu'il n'existe aucun effet de la chirurgie ni du traitement sur le métabolisme de la morphine. La seule différence retrouvée dans ces expériences a été un plus grand métabolisme chez les souris femelles comparées aux souris mâles, en périphérie (bien qu'il n'y a pas eu d'analyse statistique sur ces résultats). Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature (South et al., 2009; Gabel et al., 2023).

Ainsi, plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence d'effets significatifs, que ce soit lié à la chirurgie ou au prétraitement. Le premier, le plus logique de mon point de vue, est que la neuroinflammation induite par une SNI ne touche absolument pas l'ensemble du cerveau ou de la ME lombaire. En effet, la neuroinflammation induite par cette chirurgie a été montrée comme étant restreinte seulement dans la partie ipsilatérale dorsale de la ME ou dans des structures supra-spinales intimement liées à la douleur (Suter et al., 2007; Fiore and Austin, 2016). Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des dosages par ELISA de TNFα et d'IL1α dans les mêmes tissus utilisés pour les dosages de morphine et de M3G. Ces dosages par ELISA nous renseigneront sur l'état neuroinflammatoire dans ces tissus. Si aucune augmentation de ces cytokines n'est observée dans les échantillons, il est alors logique que nous n'ayons pas observé de modulation du métabolisme de la morphine par LC-MS/MS. Ces résultats suggéreraient alors que les dosages sur des tissus entiers a probablement écrasé les différences en termes de quantité de morphine ou de M3G dans les différents groupes. Pour pallier à ce problème, il serait judicieux de réaliser les mêmes dosages par LC-MS/MS sur des structures microdisséquées, telle que la PAG, l'amygdale ou le thalamus qui appartiennent aux voies de la douleur. En effet, ces structures peuvent localement présenter une neuroinflammation suite à la SNI et sont également bien caractérisées dans l'effet analgésique de la morphine. Une modulation potentielle du métabolisme de cette molécule est alors envisageable suite à la chirurgie et au traitement dans ces structures.

La deuxième hypothèse pouvant expliquer l'absence d'une diminution du métabolisme de la morphine peut simplement être un off-target du SR1. En effet, cette molécule, bien

qu'elle ait été caractérisée en tant qu'inhibiteur d'AhR, pourrait avoir d'autres cibles qui, d'une manière ou d'une autre, pourraient augmenter l'effet analgésique de la morphine sans intervenir dans son métabolisme. Pour répondre définitivement à cette interrogation, il serait intéressant de travailler avec des modèles génétiques, dans lequel l'expression de l'AhR est invalidée. Ces expériences sont déjà en cours dans notre laboratoire. Notamment, nous avons récemment acquis des modèles de souris $AhR^{-/-}$ sur lesquels des expériences *in vitro* et *in vivo* sont prévues. Cependant, cette souche de souris présente beaucoup de déficiences phénotypiques (Wright, 1996; Fernandez-Salguero et al., 1997). Pour contrecarrer ces déficiences, nous avons entrepris la génération d'une nouvelle souche de souris dans laquelle l'expression de l'AhR peut être invalidée de façon conditionnelle et inductible. En effet, nous croisons actuellement des souris GLAST-Cre^{ERT2} avec des souris $AhR^{fl/fl}$ afin de pouvoir induire un knock-out de l'AhR spécifiquement dans les astrocytes *via* l'induction de la Cre-recombinase suite une injection de tamoxifène (Metzger and Chambon, 2001). Ceci permet donc, en théorie, de diminuer l'expression de l'AhR spécifiquement dans ce type cellulaire, que nous avons montré comme étant essentiel dans le métabolisme de la morphine. Ainsi, l'utilisation de ces deux souches de souris nous permettra de déterminer si le SR1 a eu un effet sur d'autres cibles que l'AhR.

Perspectives

Perspectives du projet de thèse

Plusieurs expériences doivent être réalisées afin de finaliser mon projet de thèse à court, moyen et long terme. **A cours terme** tout d'abord, il est essentiel de réaliser les expériences d'inhibition de l'AhR sur les astrocytes purifiés en utilisant les mêmes concentrations que sur les cultures mixtes (10µM au lieu de 2.5µM). Egalement, il est essentiel de valider un quelconque effet du traitement au SR1 sur le métabolisme de la morphine *in vivo*. Comme évoqué lors de la discussion des résultats, il est impératif de reproduire ces mêmes expériences en réalisant des dosages de morphine et M3G sur des structures micro-disséquées telles que la PAG ou l'amygdale. En complément, une approche de RNAscope dans ces structures est nécessaire afin de valider les variations des taux d'ARNm de l'UGT1A6a dans les différents types cellulaires, notamment les astrocytes, dans les différents groupes expérimentaux. De plus, un dosage par ELISA de TNFα et d'IL1α dans ces structures pourra nous renseigner sur l'état neuroinflammatoire. Finalement, une approche par immunohistochimie ou Western Blot devrait également être utilisée afin de caractériser l'expression de la C3 dans les astrocytes, pour voir s'il existe une réactivité telle que celle caractérisée par le groupe de Ben Barres.

A moyen terme, il serait intéressant de réaliser des tranches de ces mêmes structures micro-disséquées afin de réaliser des dosages avec de l'imagerie couplée à un spectromètre de masse. En effet, cette approche, complémentaire à celle évoquée précédemment, nous permettra d'avoir une meilleure résolution spatiale dans l'étude du métabolisme de la morphine. De plus, il est maintenant possible de coupler cette approche à de l'immunohistochimie afin de corréler les résultats avec certains types cellulaires. Ainsi, on s'attendrait par exemple à avoir une détection de M3G dans les cellules GFAP positives dans ces expériences.

A long terme, il serait intéressant de raffiner le protocole de traitement du SR1 en terme de durée et de dose utilisée. Différentes voies d'administration peuvent également être utilisées pour délimiter les régions d'action du SR1. De plus, l'utilisation de vecteurs viraux couplés à des souris transgéniques peut pousser l'étude encore plus loin. En effet, l'injection stéréotaxique d'un vecteur viral exprimant la Cre-recombinase sous le promoteur de la GFAP chez des souris $AhR^{fl/fl}$ peut nous permettre d'investiguer précisément le rôle de l'AhR astocytaire. Les structures seraient choisies en fonction des résultats des dosages par LC-

MS/MS sur les structures micro-disséquées que nous aurions ciblées auparavant, ou alors celles que nous aurions trouvées suite à un screening de cerveaux entiers à l'aide de l'imagerie couplée à la spectrométrie de masse. L'utilisation de modèles génétiques peut également nous aider à savoir si le SR1 a d'autres cibles que l'AhR, en utilisant par exemple cette molécule chez des animaux $AhR^{-/-}$.

Rôle des UGT1A6a astrocytaires dans la douleur neuropathique

Il est important de se poser les bonnes questions lorsqu'on dirige un projet. La question que je me suis personnellement le plus posé durant ma thèse est **« Quel est le substrat endogène des UGT1A6a dont l'expression est tellement augmentée dans les astrocytes réactifs ? »** et par conséquent **« Quel est le rôle de l'augmentation de l'expression des UGT1A6a astrocytaires dans la douleur neuropathique ? ».** Il n'existe pas énormément de réponses connues à cette question, néanmoins, la littérature décrit la sérotonine (5-HT) comme pouvant être glucuronidée par cette isoforme des UGTs (Krishnaswamy et al., 2004; Uchihashi et al., 2013; Sakakibara et al., 2016a; Carmean et al., 2019). De façon intéressante, la 5-HT est une des cibles des traitements thérapeutiques contre la dépression. En effet, la fluoxetine (Prozac), un inhibiteur de la recapture de la 5-HT, est largement utilisée dans cette maladie afin d'augmenter les concentrations extracellulaires de cette molécule (Sommi et al., 1987). De plus, la fluoxetine a été montrée comme pouvant inhiber les astrocytes réactifs dans un modèle de stress chronique, ce qui permet d'inhiber les symptômes de types dépressifs chez les animaux (Fang et al., 2022).

De manière générale, la douleur neuropathique est connue pour générer des comorbidités de type anxio-dépressifs (Gallagher and Verma, 1999; Blier and Abbott, 2001; Becker et al., 2020). De plus, les inhibiteurs spécifiques de recapture de 5-HT tels que la fluoxetine, sont efficaces contre les douleurs chroniques (Hamdy et al., 2018; Shyu et al., 2021). Une combinaison avec des inhibiteurs de recapture de la noradrénaline est également efficace, comme c'est le cas pour la duloxetine (Cymbalta) (Iyengar et al., 2004; Marks et al., 2009). Il est ainsi possible de se demander si les astrocytes réactifs observés dans la douleur neuropathique ne sont pas à l'origine d'une glucuronidation excessive de la 5-HT. Cette glucuronidation de 5-HT est synonyme d'une plus grande dégradation et d'une diminution

générale des niveaux de ce neurotransmetteur. Ainsi, inhiber la dégradation de cette molécule représente potentiellement une autre stratégie que l'inhibition de la recapture de cette dernière.

L'ensemble de ce projet se base sur une hypothèse ciblée autour de la 5-HT. Néanmoins, il est possible que nous ayons ici une autre cible insoupçonnée. Afin de vérifier cette hypothèse il est possible de réaliser une étude métabolomique par spectrométrie de masse afin de faire un screening de façon non-ciblée de l'ensemble des molécules qui sont glucuronidées (Dai et al., 2014). Cette étude pourrait être réalisée sur des animaux des deux sexes en condition Sham-SNI. Ainsi, le but de ce screening serait de réaliser une analyse différentielle entre les conditions Sham et SNI afin de voir si des molécules sont glucuronidées de façon plus importante chez les animaux souffrant de douleurs neuropathiques.

Rôle des UGT1A6a astrocytaires dans les maladies présentant des astrocytes réactifs

De mon point de vue, l'étude des UGTs astrocytaires, notamment celles exprimées par les astrocytes réactifs, peut être amenée à un tout autre niveau. En effet, il faut garder à l'esprit que les astrocytes réactifs accompagnés d'une une augmentation de l'UGT1A6a ont été caractérisés dans beaucoup de pathologies. Pour cette raison, la question que l'on est logiquement amenés à se poser est ***« Quel est le point commun qui relie ces maladies, qui peut expliquer une telle augmentation des UGTs astrocytaires ? »***. De la même manière que précédemment, il serait intéressant de réaliser une étude métabolomique sur des tissus provenant de souris/patients ayant développé ces pathologies. L'analyse aurait pour but de mettre en commun l'ensemble des molécules glucuronidées retrouvées de manière plus importante dans ces maladies par rapport à des sujets sains. Par la suite, une fois ces molécules caractérisées, des études allant du niveau moléculaire jusqu'au comportement peuvent être réalisées chez les animaux afin de voir le rôle de ces substrats endogènes.

Stratégie de surexpression de l'UGT1A6a dans les astrocytes chez des sujets sains

Lorsqu'on étudie le rôle d'un candidat protéique dans un processus biologique, l'approche la plus couramment utilisée consiste à invalider l'expression de cette dernière.

Dans notre cas, l'UGT1A6a est surexprimée dans différentes pathologies au sein des astrocytes réactifs. Afin d'étudier le rôle de cette enzyme, il serait de mon point de vue plus judicieux d'induire une surexpression de cette enzyme dans les astrocytes, chez des souris sauvages (Ulusoy et al., 2010). Une fois cela fait, il serait intéressant de caractériser phénotypiquement parlant ces souris en les soumettant à un large panel de tests comportementaux.

Néanmoins, il est tout à fait possible que cette approche ne génère aucune différence phénotypique chez les animaux. En effet, si on part du principe que l'augmentation de l'expression de ces enzymes est induite dans le but d'éliminer des molécules qui ont des effets nuisibles, l'induction seule de ces enzymes sans la présence de ces molécules pourrait être contreproductive.

Annexes

Publication 1 : Revue sur la M3G

Le travail bibliographique sur le métabolisme de la morphine et la M3G a conduit à une publication de revue en mai 2022 dans le journal *Frontiers in Molecular Neuroscience*.

frontiers | Frontiers in Molecular Neuroscience

REVIEW
published: 12 May 2022
doi: 10.3389/fnmol.2022.882443

Morphine-3-Glucuronide, Physiology and Behavior

*Florian Gabel[1], Volodya Hovhannisyan[1], Abdel-Karim Berkati[1] and Yannick Goumon[1,2]**

[1] CNRS UPR 3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique and University of Strasbourg, Strasbourg, France, [2] SMPMS, Mass Spectrometry Facilities of the CNRS UPR 3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France

Morphine remains the gold standard painkiller available to date to relieve severe pain. Morphine metabolism leads to the production of two predominant metabolites, morphine-3-glucuronide (M3G) and morphine-6-glucuronide (M6G). This metabolism involves uridine 5′-diphospho-glucuronosyltransferases (UGTs), which catalyze the addition of a glucuronide moiety onto the C3 or C6 position of morphine. Interestingly, M3G and M6G have been shown to be biologically active. On the one hand, M6G produces potent analgesia in rodents and humans. On the other hand, M3G provokes a state of strong excitation in rodents, characterized by thermal hyperalgesia and tactile allodynia. Its coadministration with morphine or M6G also reduces the resulting analgesia. Although these behavioral effects show quite consistency in rodents, M3G effects are much more debated in humans and the identity of the receptor(s) on which M3G acts remains unclear. Indeed, M3G has little affinity for mu opioid receptor (MOR) (on which morphine binds) and its effects are retained in the presence of naloxone or naltrexone, two non-selective MOR antagonists. Paradoxically, MOR seems to be essential to M3G effects. In contrast, several studies proposed that TLR4 could mediate M3G effects since this receptor also appears to be essential to M3G-induced hyperalgesia. This review summarizes M3G's behavioral effects and potential targets in the central nervous system, as well as the mechanisms by which it might oppose analgesia.

Keywords: morphine, metabolism, M3G, hyperalgesia, MOR – mu opioid receptor, TLR4 – toll-like receptor 4

OPEN ACCESS

Edited by:
Ana Reynders, UMR 7288 Institut de Biologie du Développement de Marseille (IBDM), France

Reviewed by:
Daniel Morgan, Marshall University, United States
Heather Knych, University of California, Davis, United States

***Correspondence:**
Yannick Goumon
ygoumon@unistra.fr

Specialty section:
This article was submitted to Pain Mechanisms and Modulators, a section of the journal Frontiers in Molecular Neuroscience

Received: *23 February 2022*
Accepted: *26 April 2022*
Published: *12 May 2022*

Citation:
Gabel F, Hovhannisyan V, Berkati A-K and Goumon Y (2022) Morphine-3-Glucuronide, Physiology and Behavior. Front. Mol. Neurosci. 15:882443. doi: 10.3389/fnmol.2022.882443

Abbreviations: ADME, absorption-distribution-metabolism-excretion; BBB, blood-brain barrier; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; DAMGO, [D-Ala2, *N*-MePhe4, Gly-ol]-enkephalin; DOR2, δ2-opioid receptors; ER, endoplasmic reticulum; ERK, extracellular signal-regulated kinases; GABA, γ-aminobutyric acid; i.c.v, intracerebroventricular; IL-1β, interleukine 1β; IL-6, interleukine 6; i.p., intraperitoneal; i.t., intrathechal; LPS, lipopolysaccharide; LPS-RS, LPS from *Rhodobacter sphaeroides*; M3G, morphine-3-glucuronide; M6G, morphine-6-glucuronide; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MD-2, myeloid differentiation factor 2; MOR, μ-opioid receptor; MRP, multidrug resistance-associated protein; NF-κB, nuclear factor κB; NMDA, ionotropic *N*-methyl-D-aspartate; OATP, organic anion transporter polypeptides; OCT, organic cation transporter; PAG, periaqueductal gray; P-gp, *P*-glycoprotein; RVM, rostral ventromedial medulla; s.c., subcutaneous; TLR4, toll-like receptor 4; TNFα, tumor necrosis factor α; UDPGA, uridine diphosphate glucuronic acid; UDP-GlcNac, UDP-*N*-acetylglucosamine; UGTrel7, UDP-galactose transporter-related protein 7; UGT, uridine 5′-diphospho-glucuronosyltransferases.

INTRODUCTION

Over the last decade, chronic pain has become one of the top health burdens threatening economic and healthcare systems (GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2017). Opiates, such as morphine and its derivatives, remain the most potent painkillers available at the hospital. However, their use and efficiency are limited by mild (i.e., nausea, constipation) to severe side effects, including analgesic tolerance, opioid use disorders and ultimately respiratory depression, which can lead to death (Trescot et al., 2008; Koller et al., 2019; Bachmutsky et al., 2020). Among side effects, analgesic tolerance corresponds to the decreased effect of opioid-induced analgesia following repeated administrations (Trescot et al., 2008; Weinsanto et al., 2018; Gabel et al., 2022). Consequently, dose escalation is required to relieve pain, although it might result in greater risks of severe side effects. In addition, opiate efficiency and side effects are influenced by numerous factors, including sex, age (van Crugten et al., 1997; Fullerton et al., 2021; Gabel et al., 2022), comorbidities (Gupta et al., 2018), additional drug treatments and pain types (Vellucci, 2012; Hopkins et al., 2019), resulting in complex patient care (Turk, 1996; Vellucci, 2012). In particular, morphine has been extensively used to decipher the mechanisms involved in opiate-induced analgesia, tolerance and opioid use disorders.

Morphine's effects are mediated mainly through the activation of mu opioid receptors (MORs) located in cerebral structures involved in the descending controls of pain, including the periaqueductal gray matter (PAG), the rostral ventromedial medulla (RVM) and the spinal cord. Upon activation, these receptors induce the hyperpolarization of MOR-expressing neurons, resulting in the inhibition of nociceptive signal transmission (for review, see Lau and Vaughan, 2014). From a pharmacokinetic point of view, after administration, morphine undergoes sequential pharmacological processes, consisting of absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME). Following intestinal absorption, morphine reaches the liver and enters the hepatocytes, wherein a major part of its metabolism occurs. Hence, morphine bioavailability is relatively low in humans (Hasselstrom and Sawe, 1993; Lotsch et al., 1999; Lloret-Linares et al., 2016), with only 25–35% of morphine reaching the circulation and even less being distributed within the central nervous system (CNS). Indeed, the blood-brain barrier (BBB) restrains CNS access to xenobiotics and, to a more general extent, hydrophilic compounds. The BBB is a selectively semipermeable barrier composed of adjacent endothelial cells, astrocyte end feet, and pericytes (Ballabh et al., 2004). Although morphine crosses endothelial cell membranes due to a certain degree of lipophilicity, its BBB permeability relies on the *P*-glycoprotein (*P*-gp) drug transporter, which drives morphine from endothelial cells back into the blood (Schaefer et al., 2017). Therefore, the effectiveness and duration of the analgesic effect of morphine are partially modulated by both morphine metabolism and the permeability of the BBB. Pharmacodynamic processes are also key elements affecting morphine's effects. However, they are beyond the scope of the present review and have already been discussed elsewhere (for review, see Al-Hasani and Bruchas, 2011; Williams et al., 2013).

MORPHINE METABOLISM

Glucuronidation of Morphine

Morphine metabolism involves mainly hepatic glucuronidation by uridine 5′-diphospho-glucuronosyltransferase (UGT) phase II enzymes. Glucuronidation occurs at the C3-OH and C6-OH positions, leading to two active metabolites: morphine-3-glucuronide (M3G) and morphine-6-glucuronide (M6G) (Lotsch, 2005). However, to a much lesser extent, other morphine metabolites (5%) can be found in the blood and urine and include normorphine or morphine sulfates (Yeh et al., 1977; Hand et al., 1987a; Cone et al., 2008; Laux-Biehlmann et al., 2013). In addition, 10% of morphine is excreted in its intact form due to its intrinsic hydrophilicity (Yeh, 1975). Pharmacokinetic studies of morphine in humans have shown blood terminal half-life average values of 2–3 h in healthy patients (Hasselstrom and Sawe, 1993). However, significant variations, ranging from less than 1 h up to 7 h (Webster et al., 1976; Sawe, 1986), have been reported based on the route of administration (e.g., more prolonged for oral *vs.* intravenous) and individual physiology (e.g., age, gender, comorbidities, cotreatments).

UDP-Glucuronosyltransferases

UGTs are transmembrane glycoproteins located in the smooth endoplasmic reticulum (ER; **Figure 1**). These proteins are composed of approximately 550 amino acids (around 49 kDa) and represent a superfamily of enzymes divided into two groups: UGT1A and UGT2B (for review, see Meech et al., 2019). Studies using human liver microsomes have established that several UGTs are involved in morphine glucuronidation, including UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6, UGT1A8, UGT2B1, and UGT2B7 (Stone et al., 2003; Nair et al., 2015). Among them, the UGT2B7 is considered as the main enzyme involved in morphine metabolism. These enzymes catalyze the conjugation of a nucleophilic aglycone moiety (acceptor substrate; i.e., morphine) to the glycosyl group of a nucleotide sugar (donor; i.e., uridine diphosphate glucuronic acid, UDPGA). The main transporters involved in morphine transport across cell membranes are organic cation transporter member 1 (OCT1; **Figure 1**; Tzvetkov et al., 2013; Meyer et al., 2019), OCT2 (Imaoka et al., 2021) and the organic anion transporter polypeptide 2B1 (OATP2B1) (Yang Z. Z. et al., 2016). UGTs are found in the ER lumen, and only 20 amino acids remain in the cytosolic side, with a di-lysine (KK) motif being responsible for their membrane retention (Jackson et al., 1990). The luminal amino-terminal part of the protein carries the substrate-binding domain, whereas the carboxy-terminal part binds the cosubstrate UDP-glucuronic acid (UDPGA). It requires that both morphine and UDPGA be transported inside the ER. While the transport of UDPGA relies on several ER transporters, such as UGTrel7 (UDP-galactose transporter-related protein 7) (Muraoka et al., 2001; Kobayashi et al., 2006; Rowland et al., 2015) or UGTrel1 (Ondo et al., 2020), there is currently no identified transporter for aglycones and

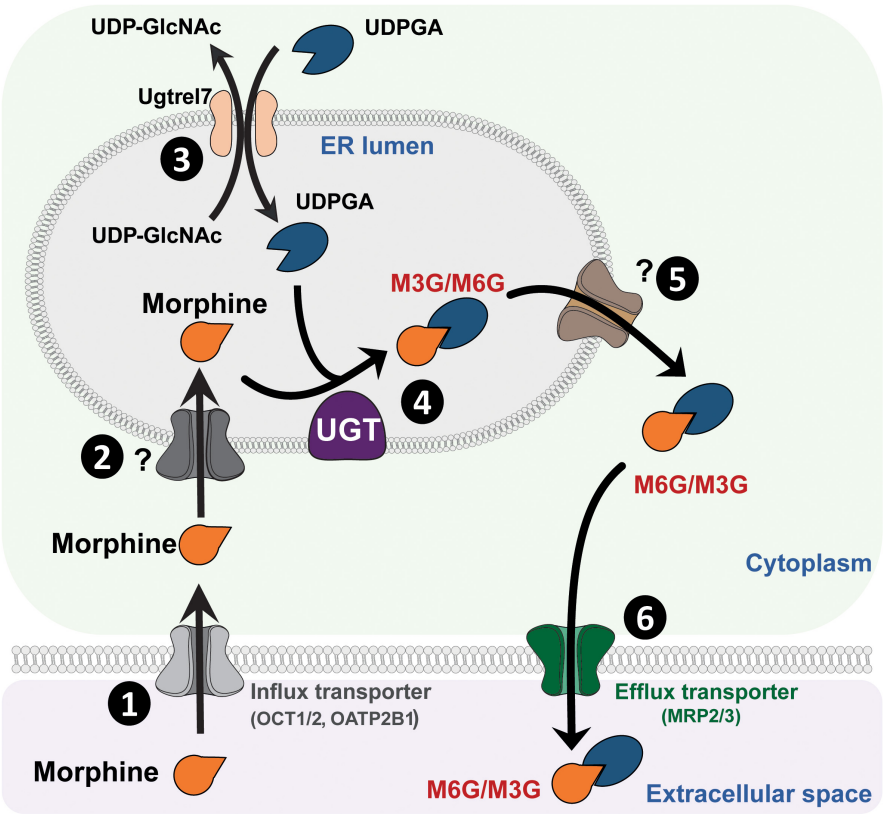


FIGURE 1 | Glucuronidation process of morphine. **(1)** Morphine is first transferred from the extracellular space into the cytoplasm through active transporters such as OCT1 or OATP2B1. **(2)** Then, morphine enters the lumen of the ER by way of an unknown transporter. **(3)** Concomitantly, UDPGA is transported across the ER membrane in exchange for UDP-GlcNac, due to UGTrel transporters, such as UGTrel7. **(4)** Inside the lumen, UGT catalyzes the addition of a glucuronide moiety belonging to UDPGA onto morphine to form M3G and M6G. **(5)** Metabolites are then transferred into the cytoplasm by unknown transporters. **(6)** Finally, they are released into the extracellular space through active transporters such as MRP2 or MRP3. It is worth noting that a significant proportion of morphine that enters the cytoplasm can be directly released into the extracellular space via P-gp. M3G, morphine-3-glucuronide; M6G, morphine-6-glucuronide; MRP, multidrug resistance-associated protein; OATP2B1, organic anion transporter polypeptides 2B1; OCT1, organic cation transporter 1; P-gp, P-glycoprotein; ER, endoplasmic reticulum; UDPGA, uridine diphosphate glucuronic acid; UDP-GlcNac, UDP-*N*-acetylglucosamine; UGT, UDP-glucuronosyltransferase.

conjugated compounds in general or for morphine in particular. Once morphine glucuronides are transported back into the cytosol, plasma membrane efflux multidrug resistance-associated protein 2 and 3 transporters (MRP2 and MRP3) (Zelcer et al., 2005; Lloret-Linares et al., 2016), located on the basolateral side of hepatocytes, allow for their release outside the cell. Then, M3G and M6G are likely to be taken up and released into the bloodstream by endothelial cells via a probenecid-sensitive transport system (Xie et al., 2000). From the bloodstream, they reach the kidneys to be excreted in urine.

UGTs have been widely conserved across evolution from bacteria to plants and mammals (King et al., 2000; Bock, 2016). However, notable differences exist in enzyme expression and morphine metabolism between species (Oda et al., 2015). For instance, major disparities in morphine metabolism have been reported between humans and rodents. In particular, morphine has a shorter terminal half-life in C57BL/6 mice than in humans (i.e., 30 min *vs.* few hours in humans) (Handal et al., 2002). In humans, M3G and M6G represent 90 and 10% of all glucuronidated metabolites, respectively (Hasselstrom and Sawe, 1993). Alternatively, mice exclusively convert morphine into M3G due to the lack of UGT2B7 expression. Indeed, UGT2B7 seems to be required for M6G production, as witnessed in several *in vitro* studies using human and rodent microsomes (Lotsch and Geisslinger, 2001; Stone et al., 2003; for review, see Court, 2005). One hypothesis could be that the piperidine ring bearing the tertiary amine N17 disturbs the interaction between other UGTs and the C6-OH position of morphine. Thus, it might significantly decrease the glucuronidation probability at this position. Nevertheless, a baculovirus-Sf9 cell system for expressing UGTs, established by Kurita et al. (2017), demonstrated that UGT2B36 is the main M3G-forming enzyme in male FVB mice. In addition, although UGT1A1 and UGT2B1 individually did not form M3G in one particular study, heterodimers of these isoforms produced high levels of M3G (Miyauchi et al., 2020). In summary, although a few reports have suggested that rodents which lack UGT2B7 (Shelby et al., 2003; Buckley and Klaassen, 2007) might produce low levels of M6G (Nagano et al., 2000; Togna et al., 2013; Yang et al., 2016a,b; Yang Z. Z. et al., 2016), the general consensus

is that they cannot synthesize such metabolites (Oguri et al., 1990; Kuo et al., 1991; Salem and Hope, 1997; Zelcer et al., 2005; Dahan and Lotsch, 2015; Allette et al., 2017; Gabel et al., 2022).

Since the beginning of the 1970s, the predominant metabolites of morphine, M3G and M6G, have been shown to be biologically active. On the one hand, M6G binds to MOR with high affinity and produces potent analgesia. On the other hand, M3G has been described as having pronociceptive properties that could counteract morphine and M6G analgesia. This review focuses on what is known about M3G behavioral effects, its potential targets in the CNS and the mechanisms underlying its properties. M6G effects are beyond the scope of this review and have already been discussed elsewhere (for review, see Lotsch and Geisslinger, 2001).

MORPHINE-3-GLUCURONIDE

Behavioral Observations

Rodents

The predominant morphine metabolite, M3G, is devoid of analgesic effects whether it is injected through the s.c. or i.c.v. routes or directly into the PAG (Shimomura et al., 1971; Pasternak et al., 1987). However, the first M3G administrations in rats have elicited neuroexcitatory effects that could oppose morphine and M6G antinociception (**Table 1**). For instance, i.t. or i.c.v. administration of M3G induces robust behavioral excitation in rodents characterized by spontaneous agitation, hyperalgesia and allodynia, epileptic episodes and death following high doses of M3G (Labella et al., 1979; Woolf, 1981; Yaksh et al., 1986; Yaksh and Harty, 1988; Bartlett et al., 1994a; Bian and Bhargava, 1996). Following these observations, M3G's pronociceptive effects were evaluated after direct injection or when coadministered with morphine or M6G. In rodents, i.p., s.c. and i.t. injections of M3G alone clearly induce thermal hyperalgesia and mechanical allodynia (Juni et al., 2006; Komatsu et al., 2009, 2016; Lewis et al., 2010; Due et al., 2012; Arout et al., 2014; Allette et al., 2017; Roeckel et al., 2017; Blomqvist et al., 2020). Additionally, morphine and M6G analgesic effects are markedly reduced by M3G (Smith et al., 1990; Qian-Ling et al., 1992; Ekblom et al., 1993; Faura et al., 1996, 1997; Gardmark et al., 1998). Hence, whether it is injected alone or with morphine or M6G, several studies have demonstrated that M3G has pronociceptive properties in rodents (**Table 1**).

Interestingly, Smith and Smith (1995) observed that, when morphine is infused continuously in rats, the higher the plasmatic metabolic ratio M3G/morphine is, the lower the antinociception is, independently of the M3G or morphine plasmatic concentrations. Similar observations were made in the extracellular cortical fluid following s.c. administration of morphine (Barjavel et al., 1995). Consequently, M3G was proposed to counteract morphine-induced analgesia and to produce neuroexcitatory effects responsible for some morphine side effects (Gong et al., 1991; Smith and Smith, 1995; Faura et al., 1997; Roeckel et al., 2017; Blomqvist et al., 2020).

Although a considerable number of studies have indicated that M3G possesses pronociceptive properties, some studies did not observe pronociceptive effects following M3G administration or when it was coadministered with morphine or M6G (**Table 2**). For instance, Ouellet and Pollack (1997) observed that, when M3G was infused for 12 h in rats, there was no hyperalgesia or modulation of morphine analgesia (Suzuki et al., 1993). In another study, it was even noted that the i.v. coadministration of morphine and M3G improved morphine analgesia (Lipkowski et al., 1994).

Interestingly, in a MRP3$^{-/-}$ mouse model, the antinociception and hyperalgesia induced by an injection of morphine remained intact (Swartjes et al., 2012). In these mice, although morphine is still metabolized into M3G, M3G has been shown to remain trapped in hepatocytes due to the lack of the MRP3 efflux transporter. Therefore, plasma levels of M3G were extremely low in these transgenic animals compared to control animals (Zelcer et al., 2005; Swartjes et al., 2012). These data indicate that hyperalgesia may occur without significant contribution of hepatic M3G. However, it is worth noting that, although M3G is not found in the blood of these animals, morphine might be directly metabolized into M3G within the CNS and could still elicit its central effects (Gabel et al., 2022).

Humans

In humans, there have been few reports of the pronociceptive effects of M3G (**Table 1**). Smith and collaborators observed in 14 cancer patients improved pain relief, which was corroborated by a decrease in the M3G/(morphine + M6G) ratios. These results indirectly suggest a pronociceptive role of M3G by reducing morphine analgesia (Smith et al., 1999). In a pharmacokinetic-pharmacodynamic study involving 50 patients with moderate to severe pain, M3G effects seemed to oppose morphine analgesia (Mazoit et al., 2007). Several case reports have also suggested that M3G might play a role in morphine's side effects such as morphine-induced hyperalgesia and seizures following high dose of morphine. However, these observations have shown considerable heterogeneity and do not demonstrate a pronociceptive role of M3G in humans (Morley et al., 1992; Sjogren et al., 1993, 1998; Rozan et al., 1995; Hagen and Swanson, 1997; Kronenberg et al., 1998).

Contrastingly, several reports have not observed any correlation between analgesia and plasmatic concentrations of M3G or the metabolic M3G/(morphine + M6G) ratios (**Table 2**; Samuelsson et al., 1993; Goucke et al., 1994; Wolff et al., 1995; Andersen et al., 2002; Toce et al., 2019). In addition, there have been two studies, published by the same group, in which healthy volunteers were administered M3G to evaluate its effects in humans (Penson et al., 2000, 2001). The first study was a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in which M3G was infused in 10 healthy volunteers. Analgesia was assessed with numerical and visual analog scales in a submaximal ischemic pain model. No M3G-induced hyperalgesia or dysphoria was observed. In addition, the coadministration of M3G along with morphine or M6G did not affect analgesia (Penson et al., 2000). In the second study, which was blinded, but not controlled, three concentrations of M3G were used, but no effect was observed

TABLE 1 | M3G behavioral studies in *favor* of M3G pronociceptive effects.

References	Agonist	Administration type	Species	M3G effects
Labella et al., 1979	M3G	i.c.v infusion	SD male rats	Behavioral excitation
Yaksh et al., 1986	M3G	i.t. (3 μg)	Rats and cats	
Bartlett et al., 1994a	M3G	i.c.v. (2–8 μg)	SD male rats	
Bian and Bhargava, 1996	M3G	i.c.v. (3 and 10 μg)	SW male mice	
Komatsu et al., 2009	M3G	i.t. (3 nmol)	ddY male mice	
Komatsu et al., 2016	M3G	i.t. (2.5 nmol)	ddY male mice	
Woolf, 1981	M3G	i.t. (15 μg)	SD male rats	Thermal hyperalgesia and/or mechanical allodynia
Smith et al., 1990	M3G	i.c.v. (2.5 and 3 μg)/i.p. (10 mg/kg)	SD male rats	
Gong et al., 1991	M3G	i.c.v. (0.2 to 8–10 μg)	SD male rats	
Juni et al., 2006	M3G	s.c. infusion (5 mg/kg)	CD-1 male mice	
Lewis et al., 2010	M3G	i.t. (0.75 μg)	SD male Rats	
Due et al., 2012	M3G	i.p. (25 mg/kg)	SD female rats and C57BL/10ScNJ TLR4$^{-/-}$ male mice	
Arout et al., 2014	M3G	s.c. (5 mg/kg)	CD-1 male mice	
Allette et al., 2017	M3G	i.p. (concentration not stated)	C57BL/6J female mice	
Roeckel et al., 2017	M3G	i.p. (5 mg/kg)	Male and female 50% C57/BL6J:50% 129svPas mice	
Blomqvist et al., 2020	M3G	i.t. (5 μg)	SD male rats	
Smith et al., 1990	M3G + M/ M3G + M6G	i.c.v. (2.5 and 3 μg)/i.p. (10 mg/kg)	SD male rats	M3G-mediated decrease of morphine and/or M6G analgesia
Qian-Ling et al., 1992	M3G + M6G	i.c.v. (0.5 μg) i.t. (0.5 μg)	SD male rats	
Ekblom et al., 1993	M3G + M	i.v. (9.4 μmol/h/kg M3G, 35 μmol/h/kg M)	SD male rats	
Faura et al., 1996	M3G + M6G	s.c. (6 mg/kg M3G, 4 mg/kg M6G)	SW male mice	
Faura et al., 1997	M3G + M6G	s.c. (6 mg/kg M3G, 4 mg/kg M6G)	SW male mice	
Gardmark et al., 1998	M3G + M	M3G infusion overnight (9.4 or 37.6 μmol/h/kg) then morphine infusion	SD male rats	
Mazoit et al., 2007	M	i.v. (bolus 10 mg)	50 patients with pain	
Doyle and Murphy, 2018	M3G + M	Intra-vlPAG injection (0.075 μg/0.25μl/side) followed by s.c. M	SD male and female rats	
Smith and Smith, 1995	M	Continuous i.v. infusion (3 different dosing regimes)	SD male rats	M3G/Morphine ratio inversely correlated to morphine antinociception
Barjavel et al., 1995	M	s.c. (10 mg/kg)	SD male rats	
Smith et al., 1999	M	Oral or s.c. then i.c.v. postventriculostomy	14 patients	
Morley et al., 1992	M	i.t. + oral M then M6G (1 mg) i.t.	One 47 years old man	High levels of M3G in CSF corroborated with worsened pain
Sjogren et al., 1993	M	Continuous i.v. infusion (100 mg/h)	One 50 years old man	Myoclonic spasms

The indicated concentrations for studies in which several agonists were used correspond to M3G concentrations, unless otherwise stated. CSF, cerebrospinal fluid; ddY, Deutschland, Denken, and Yoken mice; FVB, friend leukemia virus B mice; M, morphine; M3G, morphine-3-glucuronide; M6G, morphine-6-glucuronide; MRP, multidrug resistance associated protein; PK-PD, pharmacokinetic-pharmacodynamic; SD, Sprague-Dawley; SW, Swiss-Webster; TLR4, Toll-like receptor 4; vl-PAG, ventrolateral periaqueductal gray.

TABLE 2 | M3G behavioral studies in opposition to M3G pronociceptive effects.

References	Agonist	Administration type	Species	M3G effects
Ekblom et al., 1993	M3G	i.v. bolus (86.7 μmol/kg)	SD male rats	No behavioral effect/hyperalgesia observed following M3G administration alone
Bian and Bhargava, 1996	M3G	i.p. (10–100 mg/kg) i.c.v. (0–2 μg)	SW male mice	
Faura et al., 1996	M3G	s.c. (6 mg/kg)	SW male mice	
Faura et al., 1997	M3G	s.c. (6 mg/kg)	SW male mice	
Salem and Hope, 1997	M3G	i.p. (2.5, 5, and 10 mg/kg)	Winstar female rats	
Ouellet and Pollack, 1997	M3G	M3G infusion (0.15 or 0.30 mg/hr)	SD male rats	
Penson et al., 2000	M3G	i.v. (30.6 mg/70 kg)	10 healthy volunteers	
Penson et al., 2001	M3G	i.v. (7.5, 15, and 30 mg/70 kg)	3 healthy volunteers/ dose	
Suzuki et al., 1993	M3G + M/M3G + M6G	i.t. (5 μg)	Wistar male rats	No modulation of morphine or M6G antinociception/side effects by M3G
Bian and Bhargava, 1996	M3G + M	i.p. (10–100 mg/kg) i.c.v. (0-2 μg)	SW male mice	
Ouellet and Pollack, 1997	M3G + M	M3G infusion (0.15 or 0.30 mg/hr) then i.v. M 2 mg/kg	SD male rats	
Penson et al., 2000	M3G + M/ M3G + M6G	i.v. (30.6 mg/70 kg)	10 healthy volunteers	
Zelcer et al., 2005	M	i.p. (15 mg/kg)	FVB MRP3$^{-/-}$ mice	
Swartjes et al., 2012	M + naltrexone	s.c. (15 mg/kg each)	FVB MRP3 $^{-/-}$ mice	
Samuelsson et al., 1993	M	Epidural	35 cancer patients	No correlation between analgesia and the plasma or CSF M3G/(morphine or M6G) ratio
Goucke et al., 1994	M	Oral or s.c.	11 cancer patients	
Wolff et al., 1995	M	Chronic oral (slow-release)	34 cancer patients	
Wolff et al., 1996	M	Chronic s.c.	21 cancer patients	
Andersen et al., 2002	M	Chronic oral	1 cancer patient	
Lipkowski et al., 1994	M3G + M	i.v. (M3G: 10 μmol/kg and M: 2.6 μmol/kg)	SD male rats	Improved analgesia and attenuation of antinociceptive tolerance
Toce et al., 2019	M	i.v. (2 mg)	One 12 years-old boy with acute pain	Low morphine metabolism associated with an increase of morphine side effects

The indicated concentrations for studies in which several agonists were used correspond to M3G concentrations, unless otherwise stated. CSF, cerebrospinal fluid; ddY, Deutschland, Denken, and Yoken mice; FVB, friend leukemia virus B mice; M, morphine; M3G, morphine-3-glucuronide; M6G, morphine-6-glucuronide; MRP, multidrug resistance associated protein; PK-PD, pharmacokinetic-pharmacodynamic; SD, Sprague-Dawley; SW, Swiss-Webster; TLR4, Toll-like receptor 4; vl-PAG, ventrolateral periaqueductal gray.

(Penson et al., 2001). These two studies are extremely valuable, although the number of subjects used was relatively small for obvious reasons.

Potential Origin of the Behavioral Effect

Considered together, the few studies in humans are matter of debate, whereas, in rodents, reports have shown much more consistency toward the pronociceptive effects of M3G, even though these effects are not always observed. The origin of the behavioral effect of M3G might rely on its glucuronide moiety. Indeed, M3G is not the only "3-glucuronide" metabolite displaying pronociceptive effects. Several studies published by Lewis et al. (2013, 2015) showed that estradiol-3-glucuronide, as well as ethyl-glucuronide, produces hyperalgesia after i.t. administration. Interestingly, glucuronic acid injected alone also triggered a similar effect, demonstrating the importance of the glucuronide moiety in the pronociceptive effects of these molecules (Lewis et al., 2013).

Supporting this idea, other 3-glucuronide metabolites of morphine-derived compounds, such as normorphine, noroxymorphone and hydromorphone, display pronociceptive properties (Yaksh and Harty, 1988; Smith et al., 1997; Wright et al., 2001). Consistently, Peckham and Traynor (2006) showed robust sex differences in analgesia only with morphine derivatives that are conjugated into a 3-glucuronide metabolite. Importantly, these observations were not related to binding affinity, ability to activate the MOR or lipophilicity. We also recently observed

that sex differences in morphine analgesia could have their origin in morphine metabolism. Indeed, morphine metabolism is higher in the female brain, resulting in higher levels of M3G in pain-related brain regions (Gabel et al., 2022).

Pharmacological Targets

Mu Opioid Receptor

The molecular mechanisms underlying the effects of M3G remain a matter of debate (**Table 3**). On the one hand, one study published observations in MOR$^{-/-}$ mice suggesting its requirement for M3G pronociceptive effects (Roeckel et al., 2017). In this valuable study, i.p. administration of M3G induces thermal hyperalgesia and tactile allodynia in WT but not MOR$^{-/-}$ animals. In addition, M3G binds MOR on brain membranes from WT mice, although with low affinity (∼1.4 μM), and induces a weak Gi-dependent activity but no β-arrestin2 recruitment (**Figure 2**). This activity is not observed neither in brain membranes from MOR$^{-/-}$ mice, nor in the presence of naloxone (Roeckel et al., 2017).

On the other hand, M3G showed only low (>μM) affinity for MOR in several binding studies employing radio-labeled molecules, such as [D-Ala2, *N*-MePhe4, Gly-ol]-enkephalin (DAMGO) or naloxone (Labella et al., 1979; Christensen and Jorgensen, 1987; Pasternak et al., 1987; Coimbra-Farges et al., 1990; Chen et al., 1991; Roeckel et al., 2017). It was even proposed that the apparent affinity of M3G for MORs results from residual morphine contamination in M3G stock solutions (Bartlett and Smith, 1995). In addition, several *in vivo* studies have demonstrated that M3G's pronociceptive effects persist in the presence of naloxone or naltrexone, two non-selective antagonists of MORs, whether they are injected systematically or directly into the CNS (Labella et al., 1979; Woolf, 1981; Yaksh et al., 1986; Yaksh and Harty, 1988; Halliday et al., 1999). Altogether, these pieces of evidence indicate that M3G might not bind to MOR, although one study suggested that this receptor appears to be mandatory for M3G effects.

TLR4

One interesting hypothesis suggests the existence of an alternative non-opioid receptor that could mediate M3G effects (**Table 3**). More precisely, *in silico* studies have indicated that M3G is able to bind the Toll-like receptor 4 (TLR4) and myeloid differentiation factor 2 (MD-2) complex through an interaction with the lipopolysaccharide (LPS) binding pocket of MD-2 (Hutchinson et al., 2010; Lewis et al., 2010; Grace et al., 2014) (for a review of opioid interactions with TLR4, see Gabr et al., 2021). TLR4 downstream signaling involves the activation of 3 parallel intracellular pathways: the NF-κB, the MAPK and the PI3K/AKT pathway. In agreement with the initial reports, it has been shown *in vitro* that the reporter cell line HEK-Blue^{TM} hTLR4 exhibits significant activation upon M3G stimulation, which is inhibited by LPS from *Rhodobacter sphaeroides* (LPS-RS), a selective TLR4 antagonist (Lewis et al., 2010; Xie et al., 2017). This reporter cell line expresses the human TLR4 and a reporter gene under the control of a promoter inducible by NF-κB and AP-1, two transcription factors involved in TLR4 signaling cascade and proinflammatory cytokines release. In addition, it has been shown that the PI3K/AKT pathway, the third TLR4 intra-cellular signaling pathway, is also activated following M3G stimulation (**Figure 2**; Hutchinson et al., 2010; Wang et al., 2021). In human cancer cell lines, the activation of the AKT pathway by M3G results in upregulation of programmed death ligand 1 (PD-L1), which promotes tumor growth (Wang et al., 2021). It is, however, worth noting that, although Wang et al. (2021) observed activation of the AKT and NF-κB pathways in the A549 cell line (a human lung cancer cell line), they did not observe activation of the MAPK pathway in their model.

In vivo, M3G-induced hyperalgesia following i.p. administration in rodents is abolished by administration of TLR4 antagonists, as well as in a TLR4$^{-/-}$ mouse model (**Figure 2**; Due et al., 2012; Allette et al., 2017). Consistently, M3G seems to display proinflammatory properties through upregulation of NF-κB and proinflammatory cytokines, including interleukin 1β (IL-1β), interleukin 6 (IL-6), and tumor necrosis factor α (TNFα), such that it was proposed to be involved in the modulation of morphine properties (**Figure 2**; Lewis et al., 2010; Grace et al., 2014; Doyle and Murphy, 2018; Iqbal et al., 2020; Wang et al., 2021). These interesting findings take into account that a considerable number of studies have described the immunomodulatory effects of morphine and M3G (Wybran et al., 1979; Shavit et al., 1986; Freier and Fuchs, 1994; Thomas et al., 1995; Wang et al., 2012; Eisenstein, 2019). Considered together, these data suggest that TLR4 could be responsible for the inflammation triggered by M3G, which would thwart morphine's analgesic effects.

Several studies have implicated TLR4 in dampening morphine antinociceptive effects or in some side effects, such as antinociceptive tolerance (Hutchinson et al., 2010; Liu et al., 2011; Wang et al., 2012, 2020, 2021; Eidson and Murphy, 2013; Bai et al., 2014; Grace et al., 2014; Eidson et al., 2017; Thomas et al., 2022). For instance, a recent study revealed that antinociceptive tolerance was prevented in TLR2 and TLR4 null mutants, but not in MyD88$^{-/-}$ animals (Thomas et al., 2022). Since several studies suggested that TLR4 could be the receptor mediating M3G effects, M3G has been proposed to play a role in morphine side effects, especially in antinociceptive tolerance (Juni et al., 2006; Blomqvist et al., 2020). However, one should note that two studies invalidate the implication of TLR4 in morphine's effects (Fukagawa et al., 2013; Mattioli et al., 2014). The TLR4 mutant mouse strain C3H/HeJ, which expresses a non-functional TLR4, a TLR4$^{-/-}$ mouse strain on a C57BL/6 background and the B10ScNJ mouse strain, which has a spontaneous mutation that completely removes the TLR4 coding sequence, were used. In the first study, after repeated injection of morphine, CD11b (a marker of microglial activation) mRNA expression was increased in the spinal cord of control mice. Minocycline, a microglial inhibitor, attenuated the development of morphine tolerance in these mice. Conversely, in the C3H/HeJ mutant mouse strain and in a TLR4$^{-/-}$ mouse strain, neither the increase of CD11b mRNA expression, nor the antinociceptive tolerance was affected by TLR4 invalidation (Fukagawa et al., 2013). In the second study, neither acute antinociceptive response to a single dose of morphine, nor the development of antinociceptive tolerance was affected by TLR4 invalidation in the C3H/HeJ and B10ScNJ

TABLE 3 | M3G pharmacological targets and effects.

References	Specie/Model	Experiment type	M3G effects
Pasternak et al., 1987	Bovine brain membranes	*In vitro*	M3G has a low affinity for MOR
Christensen and Jorgensen, 1987	Bovine brain membranes	*In vitro*	
Chen et al., 1991	Rat brain membranes	*In vitro*	
Bartlett and Smith, 1995	Sheep brain membranes	*In vitro*	
Roeckel et al., 2017	Mouse brain membranes	*In vitro*	
Labella et al., 1979	SD male rats	*In vivo*	M3G-induced hyperalgesia/allodynia is enhanced by naloxone/naltrexone treatment
Woolf, 1981	SD rats	*In vivo*	
Yaksh et al., 1986	Rats	*In vivo*	
Yaksh and Harty, 1988	Rats	*In vivo*	
Halliday et al., 1999	SD male rats	*In vivo*	
Roeckel et al., 2017	$MOR^{-/-}$ mice	*In vivo*	MOR is required for M3G-induced hyperalgesia following i.p. injection
Lewis et al., 2010	SD male rats	*In vivo, in vitro* and *in silico*	TLR4 is required for M3G-induced hyperalgesia. M3G activates TLR4 signaling. M3G induces the release of proinflammatory cytokines.
Due et al., 2012	$TLR4^{-/-}$ male mice and SD female rats	*In vivo* and *in vitro*	
Grace et al., 2014	SD and lewis male rats	*In vivo, in vitro* and *in silico*	
Xie et al., 2017	HEK cells	*In vitro*	
Allette et al., 2017	SD rats	*In vivo* and *in vitro*	
Doyle and Murphy, 2018	SD male and female rats	*In vivo*	
Iqbal et al., 2020	PC12 cells	*In vitro*	
Wang et al., 2021	C57BL/6 mice and human lung cancer cell lines	*In vivo* and *in vitro*	
Sullivan et al., 1989	SD male rats	*In vivo* electrophysiologi-cal recording	M3G does not affect basal or morphine-induced inhibition of C-fiber-evoked responses of convergent dorsal horn neurons, neither on membrane currents or action potential firing in locus coeruleus neurons
Hewett et al., 1993	SD male rats	*In vivo* electrophysiologi-cal recording	
Osborne et al., 2000	SD male rats	*In situ* electrophysiologi-cal recording	
Bartlett et al., 1994a	SD male rats	*In vivo*	M3G-induced behavioral excitation involves the indirect activation of NMDA receptors.
Hemstapat et al., 2003	Primary cultures of embryonic rat hippocampal neurones	*In vitro*	
Bartlett et al., 1994b	SD male rats	*In vitro*	M3G does not interact with opioid, $GABA_A$, AMPA, NMDA, kaïnate or glycinergic receptors, nor alters GABA or glutamate release from synaptosomes.
Bartlett and Smith, 1996	SD male rats	*In vitro*	
Moran and Smith, 2002	SD rats	*In vitro*	M3G reduces the amplitude of GABAerbic and glycinergic inhibitory post-synaptic currents in the rat substantia gelatinosa through a presynaptic mechanism
Komatsu et al., 2009	ddY male mice	*In vivo*	i.t. M3G-induced behavioral excitation involves the ERK-NO-cGMP-PKG pathway and is blocked by coadministration of naltriben, a selective δ_2-opioid receptor antagonist
Komatsu et al., 2016	ddY male mice	*In vivo*	

(Continued)

TABLE 3 | (Continued)

References	Specie	Experiment type	M3G effects
Due et al., 2014	SD male and female rats	*In vitro*	M3G-induced increase of sensory neurons excitability is blocked by carbamazepine, an inhibitor of several voltage-dependent sodium channels
Arout et al., 2014	CD-1 male mice	*In vivo*	i.p. injection of M3G induces c-Fos activation in the PAG
Juni et al., 2006	CD-1 male mice	*In vivo*	M3G induces hyperalgesia following chronic treatment with high doses but not low doses of morphine
Blomqvist et al., 2020	SD male rats	*In vivo*	Chronic i.t. injections of M3G causes antinociceptive cross-tolerance to morphine and increases substance P expression in the dorsal horn of the spinal cord
Igawa et al., 1993	SD female rats	*In vivo*	i.t. M3G injection has excitatory effects on micturition
Thomas et al., 1995	Female B6C3F1 mouse cells	*In vitro*	M3G modulates B cell proliferation
Hashiguchi et al., 1995	SD male rats	*In vivo*	M3G enhance the hyperglycemic effects of M6G

AMPA, α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate; CNS, central nervous system; ddY, Deutschland, Denken, and Yoken mice; DOR, δ-opioid receptor; DRG, dorsal root ganglion; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GABA, γ–aminobutyric acid; $GABA_A$, GABA receptor A; HEK, human embryonic kidney cells; KO, knock-out; KOR, κ-opioid receptor; LC, locus coeruleus; LPS, lipopolysaccharide; M3G, morphine-3-glucuronide; M6G, morphine-6-glucuronide; MD-2, myeloid differentiation factor 2; MOR, μ-opioid receptor; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NO-cGMP-PKG, nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate–protein kinase G signaling pathway; OIH, opioid-induced hyperalgesia; PAG, periaqueductal gray; PD-L1, programmed death-ligand 1; SD, Sprague-Dawley; TLR4, Toll-like receptor 4; vl-PAG, ventrolateral periaqueductal gray.

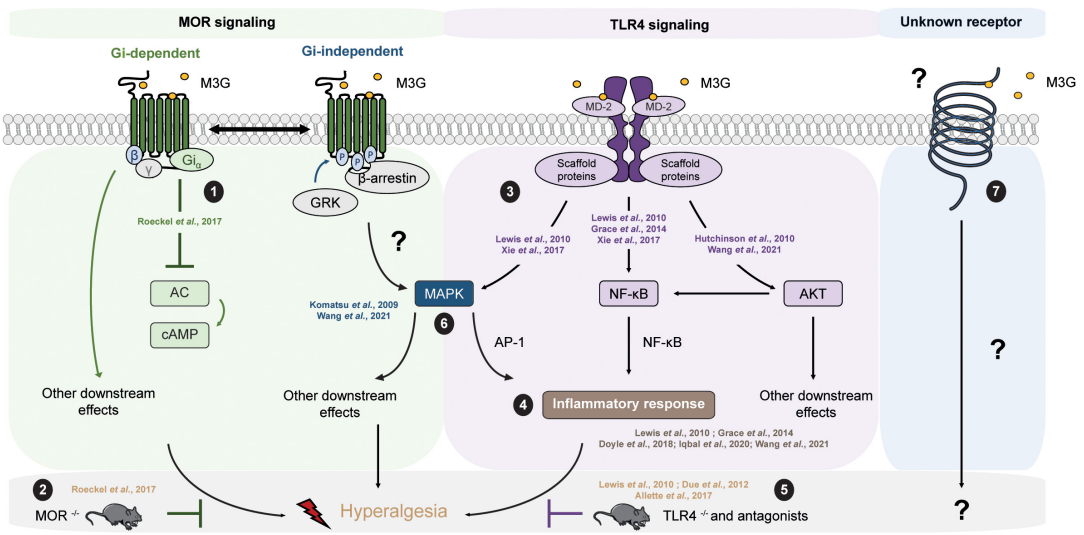


FIGURE 2 | M3G known and possible intracellular pathways resulting in hyperalgesia. M3G administration causes hyperalgesia in rodents. **(1)** M3G has low affinity for MOR and has been shown to induce a weak MOR Gi-dependent signaling, although it does not seem to stimulate β-arrestin recruitment. **(2)** In a $MOR^{-/-}$ mouse strain, M3G hyperalgesia is abolished. **(3)** M3G can bind MD-2 and has been shown to induce the activation of the MAPK, NF-κB and AKT pathways in TLR4 signaling studies. **(4)** M3G has been described to cause the release of proinflammatory cytokines known to be powerful modulators of nociception counteracting morphine-induced antinociception. **(5)** M3G-induced hyperalgesia is also abolished in a $TLR4^{-/-}$ mouse strain. **(6)** Interestingly, both MOR and TLR4 signaling involves the MAPK pathway. This pathway is involved in morphine-induced hyperalgesia as well as in proinflammatory cytokine release following TLR4 activation. Antagonism of the MAPK pathway components results in inhibition of M3G-induced hyperalgesia. MOR-TLR4 crosstalk might thus be involved in M3G-induced hyperalgesia. **(7)** An interesting alternative assumption suggests the existence of a yet unknown receptor that could mediated M3G effects.

mouse strains (Mattioli et al., 2014). These results suggest that, in these models, TLR4 is not involved in the modulation of the antinociceptive effect of morphine, in its side effects or in the microglial activation observed during morphine tolerance. This evidence is interesting and provides insight into the complexity of M3G physiology.

Mu Opioid Receptor – TLR4 Crosstalk

On the one hand, M3G-induced hyperalgesia is abolished in a $MOR^{-/-}$ mouse model (Roeckel et al., 2017). On the other hand, the same effect was observed in a $TLR4^{-/-}$ mouse model (Due et al., 2012). This piece of evidence raises the possibility that the hyperalgesia observed following

M3G administration might depend on the cross-talk between MORs and TLR4s within the CNS (**Figure 2**), for which both receptors are mandatory (for review, see Zhang et al., 2020). To support this idea, both receptors are expressed in microglia, astrocytes and even neurons under pathological conditions (Aicher et al., 2000; Lehnardt et al., 2003; Calvo-Rodriguez et al., 2017; Maduna et al., 2018; Zhang et al., 2018; Nam et al., 2019). Secondly, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is recruited following both MOR and TLR4 stimulation. This pathway seems to be involved in morphine-induced hyperalgesia, as well as in the inflammatory response following TLR4 activation (Zhang et al., 2020). Finally, different studies have reported that M3G effects were abolished in presence of MAPK pathway inhibitors (**Figure 2**; Komatsu et al., 2009; Wang et al., 2021). Taken together, the MAPK pathway represents an interesting target to assess to better understand M3G effects.

Several studies have also suggested that, although M3G alone does not induce hyperalgesia, its coadministration with morphine decreases analgesia (Ekblom et al., 1993; Faura et al., 1996, 1997). In these studies, relatively low concentrations of M3G were injected through the i.p. route, while most of the studies in which direct hyperalgesia was observed injected high concentrations of M3G directly into the CNS (**Table 1**). Hence, it could be possible that, following CNS administration, M3G reaches sufficient CNS concentrations to activate both MOR and TLR4 on its own and produce hyperalgesia, although it has a low apparent affinity for MOR. In contrast, after peripheral injection of low dose of M3G alone, M3G would not reach sufficient CNS concentrations for MOR activation even though TLR4 might be activated. The presence of morphine along with M3G would then allow MOR and TLR4 activation and thus hyperalgesia. Nonetheless, this hypothesis remains to be investigated. Interestingly, in humans, M3G plasmatic and cerebrospinal fluid (CSF) concentrations following morphine administration show significant variation according to administration types, doses and patients (Hand et al., 1987b; Osborne et al., 1990; Hasselstrom and Sawe, 1993; Goucke et al., 1994; Westerling et al., 1995; Wolff et al., 1995, 1996; Hoffman et al., 1997; Christrup et al., 1999; Smith et al., 1999; Sarton et al., 2000; Meineke et al., 2002). For instance, after i.v. injection of 5 mg of morphine in healthy volunteers, M3G maximal plasmatic concentration reaches approximatively 100 nM, whereas it reaches 2 μM after a 30 min infusion of 0.5 mg/kg of morphine in neurosurgical patients (Hasselstrom and Sawe, 1993; Meineke et al., 2002). In the CSF, M3G concentrations range approximatively from 4 nM in patients that were given 30 mg of morphine orally to 0.7 μM in patients receiving chronic oral morphine therapy (Hand et al., 1987b; Goucke et al., 1994; Wolff et al., 1995, 1996; Smith et al., 1999). Depending on dose and treatment duration, M3G might reach the required CNS concentrations to induce MOR and TLR4 activation.

It is also worth noting that, although numerous studies have proposed pieces of evidence that TLR4 is involved in M3G's effects, there is few data regarding the direct binding of M3G to TLR4. In a biophysical binding assay, M3G has been shown to bind the accessory protein MD-2 with a relatively low dissociation constant of approximatively 1.5 μM (Grace et al., 2014). However, there is no study in which radiolabeled molecules were used to investigate whether M3G can bind TLR4 or not. Therefore, one should consider an additional assumption that suggests the existence of an alternative receptor that could trigger a TLR4-dependent signaling pathway (**Figure 2**). In addition, to our knowledge, TLR4/MOR heteromers have not yet been described, although such association might participate in the complex response to M3G.

Modulation of Neuronal Activity

Since the early 1990s, several studies have investigated the effects of M3G on the modulation of neuronal activity (**Table 3**). Consistent with the TLR4 assumption, M3G increases the excitability of nociceptive dorsal root ganglion neurons in a similar manner as LPS, and this effect seems to rely on TLR4 (Due et al., 2012, 2014; Allette et al., 2017). The implication of NaV currents has subsequently been reported in this phenomenon using carbamazepine, a known inhibitor of several NaV channels (Due et al., 2012, 2014). Concomitantly, one study showed higher c-Fos levels within the PAG following s.c. co-administration of naltrexone and M3G, rather than naltrexone and morphine (Arout et al., 2014).

Ionotropic *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamatergic receptors also appear to be involved in M3G's effects. First, M3G did not induce any excitation when embryonic cultured hippocampal neurons were preincubated with 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, an NMDA receptor antagonist), showing the requirement of this receptor in the excitatory effects of M3G *in vitro*. This inhibition is not observed with naloxone and seems to rely on the indirect recruitment of NMDA receptors (Hemstapat et al., 2003). Moreover, behavioral excitation triggered by M3G administration was attenuated in rats pretreated with LY274614, another NMDA receptor antagonist, or when antagonists were coinjected with M3G (Bartlett et al., 1994a; Komatsu et al., 2009). Komatsu et al. (2009) have performed i.t. injections of M3G together with different antagonists, and they postulated that the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) follows the activation of the NO-cGMP-PKG pathway in response to NMDA receptor activation and that this mechanism could be responsible for an increase in neuronal excitability after M3G administration. Later, the same group showed that both nociceptive responses induced by M3G and ERK activation might be triggered via δ2-opioid receptors (DOR2) activated by Leu-enkephalin (Komatsu et al., 2016).

These data are, to a certain extent, consistent with M3G having no affinity for NMDA receptors and not being able to modulate glutamate release from whole-brain synaptosomes (Bartlett et al., 1994b; Bartlett and Smith, 1996). M3G fails to affect evoked excitatory postsynaptic currents obtained from patch-clamp recordings in neurons of the substantia gelatinosa, yet it decreases the amplitude of inhibitory postsynaptic currents in a dose-dependent manner. This effect is insensitive to naloxone and seems to stem from a presynaptic mechanism, resulting in the disinhibition of substantia gelatinosa neurons, although the identity of the recorded neurons remains unknown (Moran

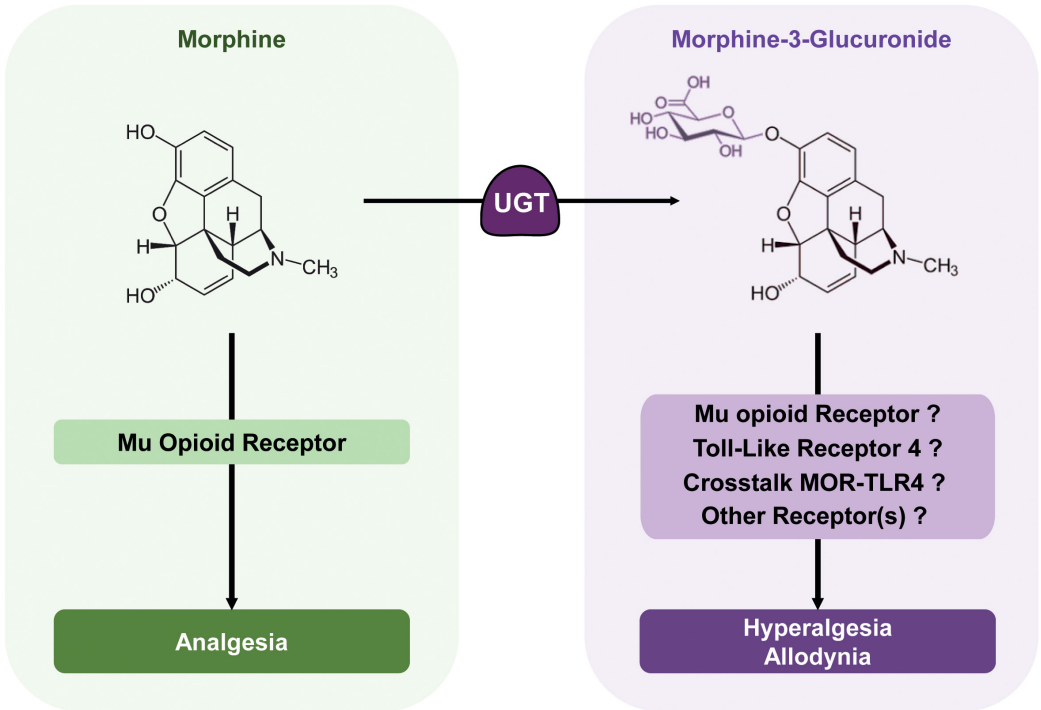


FIGURE 3 | Morphine metabolic balance participates to the modulation of morphine analgesia. Morphine acts mainly on MORs to produce potent analgesia. It is metabolized by UGTs into its predominant metabolite; M3G. In rodents, M3G has been described as inducing thermal hyperalgesia and tactile allodynia, which might oppose morphine analgesia, although in humans, the relevance of these effects remains a matter of debate. M3G has been proposed to bind to TLR4, and this receptor appears to be required for M3G-induced hyperalgesia. At the same time, one study has shown that MORs are also required for M3G effects, although M3G seems to have no or little affinity for these receptors. Considered together, the crosstalk between these receptors could be key to M3G effects, whereas another receptor could also be involved.

and Smith, 2002). This study seems to note that M3G could modulate the inhibitory systems in the spinal cord. However, it is worth noting that M3G fails to modulate γ-aminobutyric acid (GABA) release from whole-brain synaptosomes, although local suppression of GABA release, for instance, in the spinal cord, should not be excluded (Bartlett and Smith, 1996). Other reports have made this puzzling situation even more complex. Indeed, some *in vivo* pieces of evidence have suggested that M3G has no effect on the C-fiber-evoked responses of dorsal horn nociceptive neurons following i.t. pretreatment in anesthetized rats (Sullivan et al., 1989; Hewett et al., 1993; Osborne et al., 2000). Overwhelmingly, the current consensus is that M3G might modulate neuronal activity through a non-opioidergic pathway, but considerable efforts are still needed to clarify the exact underlying mechanism. Finally, M3G has also been shown to modulate several peripheral functions such as micturition and glycemia regulation following M6G administration (Igawa et al., 1993; Hashiguchi et al., 1995).

SUMMARY

With these outcomes considered together, M3G is able to induce both hyperalgesia and allodynia in rodents and could thus oppose morphine antinociception, although the relevance of its effects in humans is debated. M3G might act on TLR4 or both TLR4 and MOR, as well as on an additional receptor not yet characterized (**Figure 3**). Such a multimodal mechanism might explain the heterogeneity observed between studies and the difficulty of drawing conclusions regarding M3G neuronal effects.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FG, VH, and YG: writing – original draft. FG, VH, YG, and A-KB: writing – review and editing. YG: funding acquisition. FG and YG: supervision. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was funded by INSERM, CNRS, University of Strasbourg (Unistra) and French Ministère Délégué à la Recherche et à l'Enseignement Supérieur (Ph.D. fellowship to FG and VH). We thank the following research programs of excellence for their support: FHU Neurogenycs, French National Research Agency (ANR) through the Programme d'Investissement d'Avenir (FG, VH, and A-KB; contract ANR-17-EURE-0022, EURIDOL graduate school of pain).

REFERENCES

Aicher, S. A., Sharma, S., Cheng, P. Y., Liu-Chen, L. Y., and Pickel, V. M. (2000). Dual ultrastructural localization of mu-opiate receptors and substance p in the dorsal horn. *Synapse* 36, 12–20. doi: 10.1002/(SICI)1098-2396(200004)36:1<12::AID-SYN2>3.0.CO;2-E

Al-Hasani, R., and Bruchas, M. R. (2011). Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology* 115, 1363–1381. doi: 10.1097/ALN.0b013e318238bba6

Allette, Y. M., Kim, Y., Randolph, A. L., Smith, J. A., Ripsch, M. S., and White, F. A. (2017). Decoy peptide targeted to Toll-IL-1R domain inhibits LPS and TLR4-active metabolite morphine-3 glucuronide sensitization of sensory neurons. *Sci. Rep.* 7:3741. doi: 10.1038/s41598-017-03447-9

Andersen, G., Christrup, L. L., Sjogren, P., Hansen, S. H., and Jensen, N. H. (2002). Changing M3G/M6G ratios and pharmacodynamics in a cancer patient during long-term morphine treatment. *J. Pain Symptom Manag.* 23, 161–164. doi: 10.1016/s0885-3924(01)00398-0

Arout, C. A., Caldwell, M., McCloskey, D. P., and Kest, B. C. (2014). Fos activation in the periaqueductal gray following acute morphine-3beta-D-glucuronide or morphine administration. *Physiol. Behav.* 130, 28–33. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.02.056

Bachmutsky, I., Wei, X. P., Kish, E., and Yackle, K. (2020). Opioids depress breathing through two small brainstem sites. *Elife* 9:e52694. doi: 10.7554/eLife.52694

Bai, L., Zhai, C., Han, K., Li, Z., Qian, J., Jing, Y., et al. (2014). Toll-like receptor 4-mediated nuclear factor-kappaB activation in spinal cord contributes to chronic morphine-induced analgesic tolerance and hyperalgesia in rats. *Neurosci. Bull.* 30, 936–948. doi: 10.1007/s12264-014-1483-7

Ballabh, P., Braun, A., and Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 16, 1–13. doi: 10.1016/j.nbd.2003.12.016

Barjavel, M. J., Scherrmann, J. M., and Bhargava, H. N. (1995). Relationship between morphine analgesia and cortical extracellular fluid levels of morphine and its metabolites in the rat: a microdialysis study. *Br. J. Pharmacol.* 116, 3205–3210. doi: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb15125.x

Bartlett, S. E., and Smith, M. T. (1995). The apparent affinity of morphine-3-glucuronide at mu1-opioid receptors results from morphine contamination: demonstration using HPLC and radioligand binding. *Life Sci.* 57, 609–615. doi: 10.1016/0024-3205(95)00311-s

Bartlett, S. E., and Smith, M. T. (1996). Effects of morphine-3-glucuronide and morphine on the K+-evoked release of [3H]-glutamic acid and [14C]-gamma-aminobutyric acid from rat brain synaptosomes. *Life Sci.* 58, 447–454. doi: 10.1016/0024-3205(95)02310-0

Bartlett, S. E., Cramond, T., and Smith, M. T. (1994a). The excitatory effects of morphine-3-glucuronide are attenuated by LY274614, a competitive NMDA receptor antagonist, and by midazolam, an agonist at the benzodiazepine site on the GABAA receptor complex. *Life Sci.* 54, 687–694. doi: 10.1016/0024-3205(94)00552-4

Bartlett, S. E., Dodd, P. R., and Smith, M. T. (1994b). Pharmacology of morphine and morphine-3-glucuronide at opioid, excitatory amino acid. GABA and glycine binding sites. *Pharmacol. Toxicol.* 75, 73–81. doi: 10.1111/j.1600-0773.1994.tb00327.x

Bian, J. T., and Bhargava, H. N. (1996). Effects of morphine-3-glucuronide on the antinociceptive activity of peptide and nonpeptide opioid receptor agonists in mice. *Peptides* 17, 1415–1419. doi: 10.1016/s0196-9781(96)00215-x

Blomqvist, K. J., Viisanen, H., Ahlstrom, F. H. G., Jokinen, V., Sidorova, Y. A., Suleymanova, I., et al. (2020). Morphine-3-glucuronide causes antinociceptive cross-tolerance to morphine and increases spinal substance P expression. *Eur. J. Pharmacol.* 875:173021. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173021

Bock, K. W. (2016). The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: animal-plant arms-race and co-evolution. *Biochem. Pharmacol.* 99, 11–17. doi: 10.1016/j.bcp.2015.10.001

Buckley, D. B., and Klaassen, C. D. (2007). Tissue- and gender-specific mRNA expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in mice. *Drug Metab. Dispos.* 35, 121–127. doi: 10.1124/dmd.106.012070

Calvo-Rodriguez, M., de la Fuente, C., Garcia-Durillo, M., Garcia-Rodriguez, C., Villalobos, C., and Nunez, L. (2017). Aging and amyloid beta oligomers enhance TLR4 expression, LPS-induced Ca(2+) responses, and neuron cell death in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neuroinflammation* 14:24. doi: 10.1186/s12974-017-0802-0

Chen, Z. R., Irvine, R. J., Somogyi, A. A., and Bochner, F. (1991). Mu receptor binding of some commonly used opioids and their metabolites. *Life Sci.* 48, 2165–2171. doi: 10.1016/0024-3205(91)90150-a

Christensen, C. B., and Jorgensen, L. N. (1987). Morphine-6-glucuronide has high affinity for the opioid receptor. *Pharmacol. Toxicol.* 60, 75–76. doi: 10.1111/j.1600-0773.1987.tb01724.x

Christrup, L. L., Sjogren, P., Jensen, N. H., Banning, A. M., Elbaek, K., and Ersboll, A. K. (1999). Steady-state kinetics and dynamics of morphine in cancer patients: is sedation related to the absorption rate of morphine? *J. Pain Symptom Manag.* 18, 164–173. doi: 10.1016/s0885-3924(99)00068-8

Coimbra-Farges, R., Puget, A., Monsarrat, B., Moisand, C., and Meunier, J. C. (1990). Morphine metabolism in the naturally morphine-tolerant afghan pika: a preliminary study. *Life Sci.* 46, 663–669. doi: 10.1016/0024-3205(90)90135-e

Cone, E. J., Caplan, Y. H., Moser, F., Robert, T., and Black, D. (2008). Evidence that morphine is metabolized to hydromorphone but not to oxymorphone. *J. Anal. Toxicol.* 32, 319–323. doi: 10.1093/jat/32.4.319

Court, M. H. (2005). Isoform-selective probe substrates for in vitro studies of human UDP-glucuronosyltransferases. *Methods Enzymol.* 400, 104–116. doi: 10.1016/S0076-6879(05)00007-8

Dahan, A., and Lotsch, J. (2015). Morphine is not a prodrug. *Br. J. Anaesth.* 114, 1005–1006. doi: 10.1093/bja/aev125

Doyle, H. H., and Murphy, A. Z. (2018). Sex-dependent influences of morphine and its metabolites on pain sensitivity in the rat. *Physiol. Behav.* 187, 32–41. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.11.030

Due, M. R., Piekarz, A. D., Wilson, N., Feldman, P., Ripsch, M. S., Chavez, S., et al. (2012). Neuroexcitatory effects of morphine-3-glucuronide are dependent on Toll-like receptor 4 signaling. *J. Neuroinflammation* 9:200. doi: 10.1186/1742-2094-9-200

Due, M. R., Yang, X. F., Allette, Y. M., Randolph, A. L., Ripsch, M. S., Wilson, S. M., et al. (2014). Carbamazepine potentiates the effectiveness of morphine in a rodent model of neuropathic pain. *PLoS One* 9:e107399. doi: 10.1371/journal.pone.0107399

Eidson, L. N., and Murphy, A. Z. (2013). Blockade of Toll-like receptor 4 attenuates morphine tolerance and facilitates the pain relieving properties of morphine. *J. Neurosci.* 33, 15952–15963. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1609-13.2013

Eidson, L. N., Inoue, K., Young, L. J., Tansey, M. G., and Murphy, A. Z. (2017). Toll-like Receptor 4 Mediates Morphine-Induced Neuroinflammation and Tolerance via Soluble Tumor Necrosis Factor Signaling. *Neuropsychopharmacology* 42, 661–670. doi: 10.1038/npp.2016.131

Eisenstein, T. K. (2019). The role of opioid receptors in immune system function. *Front. Immunol.* 10:2904. doi: 10.3389/fimmu.2019.02904

Ekblom, M., Gardmark, M., and Hammarlund-Udenaes, M. (1993). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of morphine-3-glucuronide in rats and its influence on the antinociceptive effect of morphine. *Biopharm. Drug Dispos.* 14, 1–11. doi: 10.1002/bdd.2510140102

Faura, C. C., Olaso, J. M., Cabanes, C. G., and Horga, J. F. (1996). Lack of morphine-6-glucuronide antinociception after morphine treatment. Is morphine-3-glucuronide involved? *Pain* 65, 25–30. doi: 10.1016/0304-3959(95)00198-0

Faura, C. C., Olaso, M. J., and Horga, J. F. (1997). Morphine-3-glucuronide prevents tolerance to morphine-6-glucuronide in mice. *Eur. J. Pain* 1, 161–164. doi: 10.1016/s1090-3801(97)90074-4

Freier, D. O., and Fuchs, B. A. (1994). A mechanism of action for morphine-induced immunosuppression: corticosterone mediates morphine-induced suppression of natural killer cell activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 1127–1133.

Fukagawa, H., Koyama, T., Kakuyama, M., and Fukuda, K. (2013). Microglial activation involved in morphine tolerance is not mediated by toll-like receptor 4. *J. Anesth.* 27, 93–97. doi: 10.1007/s00540-012-1469-4

Fullerton, E. F., Rubaharan, M., Karom, M. C., Hanberry, R. I., and Murphy, A. Z. (2021). Advanced age attenuates the antihyperalgesic effect of morphine and decreases mu-opioid receptor expression and binding in the rat midbrain periaqueductal gray in male and female rats. *Neurobiol. Aging.* 98, 78–87. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2020.10.020

Gabel, F., Hovhannisyan, V., Andry, V., and Goumon, Y. (2022). Central metabolism as a potential origin of sex differences in morphine antinociception

but not in the induction of antinociceptive tolerance in mice. *Br. J. Pharmacol.* 1–19. doi: 10.1111/bph.15792

Gabr, M. M., Saeed, I., Miles, J. A., Ross, B. P., Shaw, P. N., Hollmann, M. W., et al. (2021). Interaction of Opioids with TLR4-Mechanisms and Ramifications. *Cancers* 13:5274. doi: 10.3390/cancers13215274

Gardmark, M., Karlsson, M. O., Jonsson, F., and Hammarlund-Udenaes, M. (1998). Morphine-3-glucuronide has a minor effect on morphine antinociception. Pharmacodynamic modeling. *J. Pharm. Sci.* 87, 813–820. doi: 10.1021/js980056f

GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2017). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390, 1211–1259. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32154-2

Gong, Q. L., Hedner, T., Hedner, J., Bjorkman, R., and Nordberg, G. (1991). Antinociceptive and ventilatory effects of the morphine metabolites: morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide. *Eur. J. Pharmacol.* 193, 47–56. doi: 10.1016/0014-2999(91)90199-z

Goucke, R. C., Hackett, P. L., and Ilett, K. F. (1994). Concentrations of morphine, morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide in serum and cerebrospinal fluid following morphine administration to patients with morphine-resistant pain. *Pain* 56, 145–149. doi: 10.1016/0304-3959(94)90088-4

Grace, P. M., Ramos, K. M., Rodgers, K. M., Wang, X., Hutchinson, M. R., Lewis, M. T., et al. (2014). Activation of adult rat CNS endothelial cells by opioid-induced toll-like receptor 4 (TLR4) signaling induces proinflammatory, biochemical, morphological, and behavioral sequelae. *Neuroscience* 280, 299–317. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.020

Gupta, K., Nagappa, M., Prasad, A., Abrahamyan, L., Wong, J., Weingarten, T. N., et al. (2018). Risk factors for opioid-induced respiratory depression in surgical patients: a systematic review and meta-analyses. *BMJ Open* 8:e024086. doi: 10.1136/bmjopen-2018-024086

Hagen, N., and Swanson, R. (1997). Strychnine-like multifocal myoclonus and seizures in extremely high-dose opioid administration: treatment strategies. *J. Pain Symptom Manag.* 14, 51–58. doi: 10.1016/S0885-3924(97)00001-8

Halliday, A. J., Bartlett, S. E., Colditz, P., and Smith, M. T. (1999). Brain region-specific studies of the excitatory behavioral effects of morphine-3-glucuronide. *Life Sci.* 65, 225–236. doi: 10.1016/s0024-3205(99)00239-8

Hand, C. W., Blunnie, W. P., Claffey, L. P., McShane, A. J., McQuay, H. J., and Moore, R. A. (1987a). Potential analgesic contribution from morphine-6-glucuronide in CSF. *Lancet* 2, 1207–1208. doi: 10.1016/s0140-6736(87)91341-9

Hand, C. W., Moore, R. A., McQuay, H. J., Allen, M. C., and Sear, J. W. (1987b). Analysis of morphine and its major metabolites by differential radioimmunoassay. *Ann. Clin. Biochem.* 24(Pt 2), 153–160. doi: 10.1177/000456328702400205

Handal, M., Grung, M., Skurtveit, S., Ripel, A., and Morland, J. (2002). Pharmacokinetic differences of morphine and morphine-glucuronides are reflected in locomotor activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 883–892. doi: 10.1016/s0091-3057(02)00925-5

Hashiguchi, Y., Molina, P. E., and Abumrad, N. N. (1995). Modulation of metabolic effects of morphine-6-glucuronide by morphine-3-glucuronide. *Brain Res. Bull.* 38, 325–329. doi: 10.1016/0361-9230(95)00104-m

Hasselstrom, J., and Sawe, J. (1993). Morphine pharmacokinetics and metabolism in humans. Enterohepatic cycling and relative contribution of metabolites to active opioid concentrations. *Clin. Pharmacokinet.* 24, 344–354. doi: 10.2165/00003088-199324040-00007

Hemstapat, K., Monteith, G. R., Smith, D., and Smith, M. T. (2003). Morphine-3-glucuronide's neuro-excitatory effects are mediated via indirect activation of N-methyl-D-aspartic acid receptors: mechanistic studies in embryonic cultured hippocampal neurones. *Anesth. Analg.* 97, 494–505. doi: 10.1213/01.ANE.0000059225.40049.99

Hewett, K., Dickenson, A. H., and McQuay, H. J. (1993). Lack of effect of morphine-3-glucuronide on the spinal antinociceptive actions of morphine in the rat: an electrophysiological study. *Pain* 53, 59–63. doi: 10.1016/0304-3959(93)90056-U

Hoffman, M., Xu, J. C., Smith, C., Fanelli, C., Pascal, V., Degaetano, C., et al. (1997). A pharmacodynamic study of morphine and its glucuronide metabolites after single morphine dosing in cancer patients with pain. *Cancer Invest.* 15, 542–547. doi: 10.3109/07357909709047595

Hopkins, R. E., Bui, T., Magliano, D., Arnold, C., and Dooley, M. (2019). Prescriber education interventions to optimize opioid prescribing in acute care: a systematic review. *Pain Physician* 22, E551–E562.

Hutchinson, M. R., Zhang, Y., Shridhar, M., Evans, J. H., Buchanan, M. M., Zhao, T. X., et al. (2010). Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain Behav. Immun.* 24, 83–95. doi: 10.1016/j.bbi.2009.08.004

Igawa, Y., Westerling, D., Mattiasson, A., and Andersson, K. E. (1993). Effects of morphine metabolites on micturition in normal, unanaesthetized rats. *Br. J. Pharmacol.* 110, 257–262. doi: 10.1111/j.1476-5381.1993.tb13802.x

Imaoka, T., Huang, W., Shum, S., Hailey, D. W., Chang, S. Y., Chapron, A., et al. (2021). Bridging the gap between in silico and in vivo by modeling opioid disposition in a kidney proximal tubule microphysiological system. *Sci. Rep.* 11:21356. doi: 10.1038/s41598-021-00338-y

Iqbal, S., Parker, L. M., Everest-Dass, A. V., Moh, E. S. X., Sayyadi, N., Hutchinson, M. R., et al. (2020). Lipopolysaccharide and Morphine-3-glucuronide-induced immune signalling increases the expression of polysialic acid in PC12 cells. *Mol. Neurobiol.* 57, 964–975. doi: 10.1007/s12035-019-01791-7

Jackson, M. R., Nilsson, T., and Peterson, P. A. (1990). Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 9, 3153–3162. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07513.x

Juni, A., Klein, G., and Kest, B. (2006). Morphine hyperalgesia in mice is unrelated to opioid activity, analgesia, or tolerance: evidence for multiple diverse hyperalgesic systems. *Brain Res.* 1070, 35–44. doi: 10.1016/j.brainres.2005.11.054

King, C. D., Rios, G. R., Green, M. D., and Tephly, T. R. (2000). UDP-glucuronosyltransferases. *Curr. Drug Metab.* 1, 143–161.

Kobayashi, T., Sleeman, J. E., Coughtrie, M. W., and Burchell, B. (2006). Molecular and functional characterization of microsomal UDP-glucuronic acid uptake by members of the nucleotide sugar transporter (NST) family. *Biochem J.* 400, 281–289. doi: 10.1042/BJ20060429

Koller, G., Schwarzer, A., Halfter, K., and Soyka, M. (2019). Pain management in opioid maintenance treatment. *Expert Opin. Pharmacother.* 20, 1993–2005. doi: 10.1080/14656566.2019.1652270

Komatsu, T., Katsuyama, S., Nagase, H., Mizoguchi, H., Sakurada, C., Tsuzuki, M., et al. (2016). Intrathecal morphine-3-glucuronide-induced nociceptive behavior via Delta-2 opioid receptors in the spinal cord. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 140, 68–74. doi: 10.1016/j.pbb.2015.10.010

Komatsu, T., Sakurada, S., Kohno, K., Shiohira, H., Katsuyama, S., Sakurada, C., et al. (2009). Spinal ERK activation via NO-cGMP pathway contributes to nociceptive behavior induced by morphine-3-glucuronide. *Biochem. Pharmacol.* 78, 1026–1034. doi: 10.1016/j.bcp.2009.06.106

Kronenberg, M. F., Laimer, I., Rifici, C., Saltuari, L., Bramanti, P., Moriggl, U., et al. (1998). Epileptic seizure associated with intracerebroventricular and intrathecal morphine bolus. *Pain* 75, 383–387. doi: 10.1016/s0304-3959(97)00173-5

Kuo, C. K., Hanioka, N., Hoshikawa, Y., Oguri, K., and Yoshimura, H. (1991). Species difference of site-selective glucuronidation of morphine. *J. Pharmacobiodyn.* 14, 187–193. doi: 10.1248/bpb1978.14.187

Kurita, A., Miyauchi, Y., Ikushiro, S., Mackenzie, P. I., Yamada, H., and Ishii, Y. (2017). Comprehensive characterization of mouse UDP-glucuronosyltransferase (ugt) belonging to the Ugt2b subfamily: identification of Ugt2b36 as the predominant isoform involved in morphine glucuronidation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 361, 199–208. doi: 10.1124/jpet.117.240382

Labella, F. S., Pinsky, C., and Havlicek, V. (1979). Morphine derivatives with diminished opiate receptor potency show enhanced central excitatory activity. *Brain Res.* 174, 263–271. doi: 10.1016/0006-8993(79)90849-7

Lau, B. K., and Vaughan, C. W. (2014). Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 29, 159–164. doi: 10.1016/j.conb.2014.07.010

Laux-Biehlmann, A., Mouheiche, J., Veriepe, J., and Goumon, Y. (2013). Endogenous morphine and its metabolites in mammals: history, synthesis, localization and perspectives. *Neuroscience* 233, 95–117. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.013

Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., Jensen, F. E., Ratan, R., Rosenberg, P. A., et al. (2003). Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8514–8519. doi: 10.1073/pnas.1432609100

Lewis, S. S., Hutchinson, M. R., Frick, M. M., Zhang, Y., Maier, S. F., Sammakia, T., et al. (2015). Select steroid hormone glucuronide metabolites can cause toll-like receptor 4 activation and enhanced pain. *Brain Behav. Immun.* 44, 128–136. doi: 10.1016/j.bbi.2014.09.004

Lewis, S. S., Hutchinson, M. R., Rezvani, N., Loram, L. C., Zhang, Y., Maier, S. F., et al. (2010). Evidence that intrathecal morphine-3-glucuronide may cause pain enhancement via toll-like receptor 4/MD-2 and interleukin-1beta. *Neuroscience* 165, 569–583. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.10.011

Lewis, S. S., Hutchinson, M. R., Zhang, Y., Hund, D. K., Maier, S. F., Rice, K. C., et al. (2013). Glucuronic acid and the ethanol metabolite ethyl-glucuronide cause toll-like receptor 4 activation and enhanced pain. *Brain Behav. Immun.* 30, 24–32. doi: 10.1016/j.bbi.2013.01.005

Lipkowski, A. W., Carr, D. B., Langlade, A., Osgood, P. F., and Szyfelbein, S. K. (1994). Morphine-3-glucuronide: silent regulator of morphine actions. *Life Sci.* 55, 149–154. doi: 10.1016/0024-3205(94)90106-6

Liu, L., Coller, J. K., Watkins, L. R., Somogyi, A. A., and Hutchinson, M. R. (2011). Naloxone-precipitated morphine withdrawal behavior and brain IL-1beta expression: comparison of different mouse strains. *Brain Behav. Immun.* 25, 1223–1232. doi: 10.1016/j.bbi.2011.03.016

Lloret-Linares, C., Miyauchi, E., Luo, H., Labat, L., Bouillot, J. L., Poitou, C., et al. (2016). Oral morphine pharmacokinetic in obesity: the role of P-Glycoprotein, MRP2, MRP3, UGT2B7, and CYP3A4 jejunal contents and obesity-associated biomarkers. *Mol. Pharm.* 13, 766–773. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00656

Lotsch, J. (2005). Opioid metabolites. *J. Pain Symptom Manag.* 29(5 Suppl.), S10–S24.

Lotsch, J., and Geisslinger, G. (2001). Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clin. Pharmacokinet.* 40, 485–499. doi: 10.2165/00003088-200140070-00001

Lotsch, J., Weiss, M., Ahne, G., Kobal, G., and Geisslinger, G. (1999). Pharmacokinetic modeling of M6G formation after oral administration of morphine in healthy volunteers. *Anesthesiology* 90, 1026–1038. doi: 10.1097/00000542-199904000-00016

Maduna, T., Audouard, E., Dembele, D., Mouzaoui, N., Reiss, D., Massotte, D., et al. (2018). Microglia express mu opioid receptor: insights from transcriptomics and fluorescent reporter mice. *Front .Psychiatry* 9:726. doi: 10.3389/fpsyt.2018.00726

Mattioli, T. A., Leduc-Pessah, H., Skelhorne-Gross, G., Nicol, C. J., Milne, B., Trang, T., et al. (2014). Toll-like receptor 4 mutant and null mice retain morphine-induced tolerance, hyperalgesia, and physical dependence. *PLoS One* 9:e97361. doi: 10.1371/journal.pone.0097361

Mazoit, J. X., Butscher, K., and Samii, K. (2007). Morphine in postoperative patients: pharmacokinetics and pharmacodynamics of metabolites. *Anesth. Analg.* 105, 70–78. doi: 10.1213/01.ane.0000265557.73688.32

Meech, R., Hu, D. G., McKinnon, R. A., Mubarokah, S. N., Haines, A. Z., Nair, P. C., et al. (2019). The UDP-Glycosyltransferase (UGT) superfamily: new members, new functions, and novel paradigms. *Physiol. Rev.* 99, 1153–1222. doi: 10.1152/physrev.00058.2017

Meineke, I., Freudenthaler, S., Hofmann, U., Schaeffeler, E., Mikus, G., Schwab, M., et al. (2002). Pharmacokinetic modelling of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in plasma and cerebrospinal fluid of neurosurgical patients after short-term infusion of morphine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 54, 592–603. doi: 10.1046/j.1365-2125.2002.t01-1-01689.x

Meyer, M. J., Neumann, V. E., Friesacher, H. R., Zdrazil, B., Brockmoller, J., and Tzvetkov, M. V. (2019). Opioids as substrates and inhibitors of the genetically highly variable organic cation transporter OCT1. *J. Med. Chem.* 62, 9890–9905. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01301

Miyauchi, Y., Kurita, A., Yamashita, R., Takamatsu, T., Ikushiro, S., Mackenzie, P. I., et al. (2020). Hetero-oligomer formation of mouse UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2b1 and 1a1 results in the gain of glucuronidation activity towards morphine, an activity which is absent in homo-oligomers of either UGT. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 525, 348–353. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.075

Moran, T. D., and Smith, P. A. (2002). Morphine-3beta-D-glucuronide suppresses inhibitory synaptic transmission in rat substantia gelatinosa. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 568–576. doi: 10.1124/jpet.102.035626

Morley, J. S., Miles, J. B., Wells, J. C., and Bowsher, D. (1992). Paradoxical pain. *Lancet* 340:1045.

Muraoka, M., Kawakita, M., and Ishida, N. (2001). Molecular characterization of human UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter, a novel nucleotide sugar transporter with dual substrate specificity. *FEBS Lett.* 495, 87–93. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02358-4

Nagano, E., Yamada, H., and Oguri, K. (2000). Characteristic glucuronidation pattern of physiologic concentration of morphine in rat brain. *Life Sci.* 67, 2453–2464. doi: 10.1016/s0024-3205(00)00825-0

Nair, P. C., Meech, R., Mackenzie, P. I., McKinnon, R. A., and Miners, J. O. (2015). Insights into the UDP-sugar selectivities of human UDP-glycosyltransferases (UGT): a molecular modeling perspective. *Drug Metab. Rev.* 47, 335–345.

Nam, M. H., Han, K. S., Lee, J., Won, W., Koh, W., Bae, J. Y., et al. (2019). Activation of astrocytic mu-opioid receptor causes conditioned place preference. *Cell Rep.* 28, 1154–1166. doi: 10.1016/j.celrep.2019.06.071

Oda, S., Fukami, T., Yokoi, T., and Nakajima, M. (2015). A comprehensive review of UDP-glucuronosyltransferase and esterases for drug development. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 30, 30–51. doi: 10.1016/j.dmpk.2014.12.001

Oguri, K., Hanioka, N., and Yoshimura, H. (1990). Species differences in metabolism of codeine: urinary excretion of codeine glucuronide, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in mice, rats, guinea pigs and rabbits. *Xenobiotica* 20, 683–688. doi: 10.3109/00498259009046884

Ondo, K., Arakawa, H., Nakano, M., Fukami, T., and Nakajima, M. (2020). SLC35B1 significantly contributes to the uptake of UDPGA into the endoplasmic reticulum for glucuronidation catalyzed by UDP-glucuronosyltransferases. *Biochem. Pharmacol.* 175:113916. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113916

Osborne, P. B., Chieng, B., and Christie, M. J. (2000). Morphine-6 beta-glucuronide has a higher efficacy than morphine as a mu-opioid receptor agonist in the rat locus coeruleus. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1422–1428. doi: 10.1038/sj.bjp.0703697

Osborne, R., Joel, S., Trew, D., and Slevin, M. (1990). Morphine and metabolite behavior after different routes of morphine administration: demonstration of the importance of the active metabolite morphine-6-glucuronide. *Clin. Pharmacol. Ther.* 47, 12–19. doi: 10.1038/clpt.1990.2

Ouellet, D. M., and Pollack, G. M. (1997). Effect of prior morphine-3-glucuronide exposure on morphine disposition and antinociception. *Biochem. Pharmacol.* 53, 1451–1457. doi: 10.1016/s0006-2952(97)00086-5

Pasternak, G. W., Bodnar, R. J., Clark, J. A., and Inturrisi, C. E. (1987). Morphine-6-glucuronide, a potent mu agonist. *Life Sci.* 41, 2845–2849. doi: 10.1016/0024-3205(87)90431-0

Peckham, E. M., and Traynor, J. R. (2006). Comparison of the antinociceptive response to morphine and morphine-like compounds in male and female Sprague-Dawley rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 1195–1201. doi: 10.1124/jpet.105.094276

Penson, R. T., Joel, S. P., Bakhshi, K., Clark, S. J., Langford, R. M., and Slevin, M. L. (2000). Randomized placebo-controlled trial of the activity of the morphine glucuronides. *Clin. Pharmacol. Ther.* 68, 667–676. doi: 10.1067/mcp.2000.111934

Penson, R. T., Joel, S. P., Clark, S., Gloyne, A., and Slevin, M. L. (2001). Limited phase I study of morphine-3-glucuronide. *J. Pharm. Sci.* 90, 1810–1816. doi: 10.1002/jps.1131

Qian-Ling, G., Hedner, J., Bjorkman, R., and Hedner, T. (1992). Morphine-3-glucuronide may functionally antagonize morphine-6-glucuronide induced antinociception and ventilatory depression in the rat. *Pain* 48, 249–255. doi: 10.1016/0304-3959(92)90065-J

Roeckel, L. A., Utard, V., Reiss, D., Mouheiche, J., Maurin, H., Robe, A., et al. (2017). Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. *Sci. Rep.* 7:10406. doi: 10.1038/s41598-017-11120-4

Rowland, A., Mackenzie, P. I., and Miners, J. O. (2015). Transporter-mediated uptake of UDP-glucuronic acid by human liver microsomes: assay conditions, kinetics, and inhibition. *Drug Metab. Dispos.* 43, 147–153. doi: 10.1124/dmd.114.060509

Rozan, J. P., Kahn, C. H., and Warfield, C. A. (1995). Epidural and intravenous opioid-induced neuroexcitation. *Anesthesiology* 83, 860–863. doi: 10.1097/00000542-199510000-00027

Salem, A., and Hope, W. (1997). Role of morphine glucuronide metabolites in morphine dependence in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57, 801–807. doi: 10.1016/s0091-3057(96)00471-6

Samuelsson, H., Hedner, T., Venn, R., and Michalkiewicz, A. (1993). CSF and plasma concentrations of morphine and morphine glucuronides in cancer patients receiving epidural morphine. *Pain* 52, 179–185. doi: 10.1016/0304-3959(93)90129-D

Sarton, E., Olofsen, E., Romberg, R., den Hartigh, J., Kest, B., Nieuwenhuijs, D., et al. (2000). Sex differences in morphine analgesia: an experimental study in healthy volunteers. *Anesthesiology* 93, 1245–1254. doi: 10.1097/00000542-200011000-00018

Sawe, J. (1986). High-dose morphine and methadone in cancer patients. Clinical pharmacokinetic considerations of oral treatment. *Clin. Pharmacokinet.* 11, 87–106. doi: 10.2165/00003088-198611020-00001

Schaefer, C. P., Tome, M. E., and Davis, T. P. (2017). The opioid epidemic: a central role for the blood brain barrier in opioid analgesia and abuse. *Fluids Barriers CNS* 14:32. doi: 10.1186/s12987-017-0080-3

Shavit, Y., Terman, G. W., Lewis, J. W., Zane, C. J., Gale, R. P., and Liebeskind, J. C. (1986). Effects of footshock stress and morphine on natural killer lymphocytes in rats: studies of tolerance and cross-tolerance. *Brain Res.* 372, 382–385. doi: 10.1016/0006-8993(86)91149-2

Shelby, M. K., Cherrington, N. J., Vansell, N. R., and Klaassen, C. D. (2003). Tissue mRNA expression of the rat UDP-glucuronosyltransferase gene family. *Drug Metab. Dispos.* 31, 326–333. doi: 10.1124/dmd.31.3.326

Shimomura, K., Kamata, O., Ueki, S., Ida, S., Oguri, K., Yoshimura, H., et al. (1971). Analgesic effect of morphine glucuronides. *Tohoku J. Exp. Med.* 105, 45–52. doi: 10.1620/tjem.105.45

Sjogren, P., Dragsted, L., and Christensen, C. B. (1993). Myoclonic spasms during treatment with high doses of intravenous morphine in renal failure. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 37, 780–782. doi: 10.1111/j.1399-6576.1993.tb03809.x

Sjogren, P., Thunedborg, L. P., Christrup, L., Hansen, S. H., and Franks, J. (1998). Is development of hyperalgesia, allodynia and myoclonus related to morphine metabolism during long-term administration? Six case histories. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 42, 1070–1075. doi: 10.1111/j.1399-6576.1998.tb05378.x

Smith, G. D., and Smith, M. T. (1995). Morphine-3-glucuronide: evidence to support its putative role in the development of tolerance to the antinociceptive effects of morphine in the rat. *Pain* 62, 51–60. doi: 10.1016/0304-3959(94)00228-7

Smith, G. D., Prankerd, R. J., and Smith, M. T. (1997). Biochemical synthesis, purification and preliminary pharmacological evaluation of normorphine-3-glucuronide. *Life Sci.* 61, 95–104. doi: 10.1016/s0024-3205(97)00364-0

Smith, M. T., Watt, J. A., and Cramond, T. (1990). Morphine-3-glucuronide–a potent antagonist of morphine analgesia. *Life Sci.* 47, 579–585. doi: 10.1016/0024-3205(90)90619-3

Smith, M. T., Wright, A. W., Williams, B. E., Stuart, G., and Cramond, T. (1999). Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine-6-glucuronide in patients before and after initiation of intracerebroventricular morphine for cancer pain management. *Anesth. Analg.* 88, 109–116.

Stone, A. N., Mackenzie, P. I., Galetin, A., Houston, J. B., and Miners, J. O. (2003). Isoform selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human udp-glucuronosyltransferases: evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7. *Drug Metab. Dispos.* 31, 1086–1089. doi: 10.1124/dmd.31.9.1086

Sullivan, A. F., McQuay, H. J., Bailey, D., and Dickenson, A. H. (1989). The spinal antinociceptive actions of morphine metabolites morphine-6-glucuronide and normorphine in the rat. *Brain Res.* 482, 219–224. doi: 10.1016/0006-8993(89)91184-0

Suzuki, N., Kalso, E., and Rosenberg, P. H. (1993). Intrathecal morphine-3-glucuronide does not antagonize spinal antinociception by morphine or morphine-6-glucuronide in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 249, 247–250. doi: 10.1016/0014-2999(93)90441-j

Swartjes, M., Mooren, R. A., Waxman, A. R., Arout, C., van de Wetering, K., den Hartigh, J., et al. (2012). Morphine induces hyperalgesia without involvement of mu-opioid receptor or morphine-3-glucuronide. *Mol. Med.* 18, 1320–1326. doi: 10.2119/molmed.2012.00244

Thomas, J. H. L., Lui, L., Abell, A., Tieu, W., Somogyi, A. A., Bajic, J. E., et al. (2022). Toll-like receptors change morphine-induced antinociception, tolerance and dependence: studies using male and female TLR and signalling gene KO mice. *Brain Behav. Immun.* 102, 71–85. doi: 10.1016/j.bbi.2022.02.001

Thomas, P. T., Bhargava, H. N., and House, R. V. (1995). Immunomodulatory effects of in vitro exposure to morphine and its metabolites. *Pharmacology* 50, 51–62. doi: 10.1159/000139266

Toce, M. S., Kim, H., Chung, S., and Krauss, B. S. (2019). Prolonged central apnoea after intravenous morphine administration in a 12-year-old male with a UGT1A1 loss-of-function polymorphism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 85, 258–262. doi: 10.1111/bcp.13779

Togna, A. R., Antonilli, L., Dovizio, M., Salemme, A., De Carolis, L., Togna, G. I., et al. (2013). In vitro morphine metabolism by rat microglia. *Neuropharmacology* 75, 391–398. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.08.019

Trescot, A. M., Helm, S., Hansen, H., Benyamin, R., Glaser, S. E., Adlaka, R., et al. (2008). Opioids in the management of chronic non-cancer pain: an update of American Society of the Interventional Pain Physicians' (ASIPP) Guidelines. *Pain Physician* 11(2 Suppl), S5–S62.

Turk, D. C. (1996). Clinicians' attitudes about prolonged use of opioids and the issue of patient heterogeneity. *J. Pain Symptom Manag.* 11, 218–230. doi: 10.1016/0885-3924(95)00188-3

Tzvetkov, M. V., dos Santos Pereira, J. N., Meineke, I., Saadatmand, A. R., Stingl, J. C., and Brockmoller, J. (2013). Morphine is a substrate of the organic cation transporter OCT1 and polymorphisms in OCT1 gene affect morphine pharmacokinetics after codeine administration. *Biochem. Pharmacol.* 86, 666–678. doi: 10.1016/j.bcp.2013.06.019

van Crugten, J. T., Somogyi, A. A., Nation, R. L., and Reynolds, G. (1997). Concentration-effect relationships of morphine and morphine-6 beta-glucuronide in the rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 24, 359–364. doi: 10.1111/j.1440-1681.1997.tb01202.x

Vellucci, R. (2012). Heterogeneity of chronic pain. *Clin. Drug. Investig.* 32(Suppl. 1), 3–10.

Wang, H., Zhang, Y., Ma, X., Wang, W., Xu, X., Huang, M., et al. (2020). Spinal TLR4/P2X7 receptor-dependent NLRP3 inflammasome activation contributes to the development of tolerance to morphine-induced antinociception. *J. Inflamm. Res.* 13, 571–582. doi: 10.2147/JIR.S266995

Wang, K., Wang, J., Liu, T., Yu, W., Dong, N., Zhang, C., et al. (2021). Morphine-3-glucuronide upregulates PD-L1 expression via TLR4 and promotes the immune escape of non-small cell lung cancer. *Cancer Biol. Med.* 18, 155–171. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0442

Wang, X., Loram, L. C., Ramos, K., de Jesus, A. J., Thomas, J., Cheng, K., et al. (2012). Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 6325–6330. doi: 10.1073/pnas.1200130109

Webster, G. W., Shuster, L., and Eleftheriou, B. E. (1976). Morphine analgesia in mice of different ages. *Exp. Aging Res.* 2, 221–233. doi: 10.1080/03610737608257178

Weinsanto, I., Laux-Biehlmann, A., Mouheiche, J., Maduna, T., Delalande, F., Chavant, V., et al. (2018). Stable isotope-labelled morphine to study in vivo central and peripheral morphine glucuronidation and brain transport in tolerant mice. *Br. J. Pharmacol.* 175, 3844–3856. doi: 10.1111/bph.14454

Westerling, D., Persson, C., and Hoglund, P. (1995). Plasma concentrations of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine-6-glucuronide after intravenous and oral administration to healthy volunteers: relationship to nonanalgesic actions. *Ther. Drug Monit.* 17, 287–301. doi: 10.1097/00007691-199506000-00013

Williams, J. T., Ingram, S. L., Henderson, G., Chavkin, C., von Zastrow, M., Schulz, S., et al. (2013). Regulation of mu-opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol. Rev.* 65, 223–254. doi: 10.1124/pr.112.005942

Wolff, T., Samuelsson, H., and Hedner, T. (1995). Morphine and morphine metabolite concentrations in cerebrospinal fluid and plasma in cancer pain patients after slow-release oral morphine administration. *Pain* 62, 147–154. doi: 10.1016/0304-3959(94)00268-J

Wolff, T., Samuelsson, H., and Hedner, T. (1996). Concentrations of morphine and morphine metabolites in CSF and plasma during continuous subcutaneous morphine administration in cancer pain patients. *Pain* 68, 209–216. doi: 10.1016/s0304-3959(96)03102-8

Woolf, C. J. (1981). Intrathecal high dose morphine produces hyperalgesia in the rat. *Brain Res.* 209, 491–495. doi: 10.1016/0006-8993(81)90176-1

Wright, A. W., Mather, L. E., and Smith, M. T. (2001). Hydromorphone-3-glucuronide: a more potent neuro-excitant than its structural analogue,

morphine-3-glucuronide. *Life Sci.* 69, 409–420. doi: 10.1016/s0024-3205(01)01133-x

Wybran, J., Appelboom, T., Famaey, J. P., and Govaerts, A. (1979). Suggestive evidence for receptors for morphine and methionine-enkephalin on normal human blood T lymphocytes. *J. Immunol.* 123, 1068–1070.

Xie, N., Gomes, F. P., Deora, V., Gregory, K., Vithanage, T., Nassar, Z. D., et al. (2017). Activation of mu-opioid receptor and Toll-like receptor 4 by plasma from morphine-treated mice. *Brain Behav. Immun.* 61, 244–258. doi: 10.1016/j.bbi.2016.12.002

Xie, R., Bouw, M. R., and Hammarlund-Udenaes, M. (2000). Modelling of the blood-brain barrier transport of morphine-3-glucuronide studied using microdialysis in the rat: involvement of probenecid-sensitive transport. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1784–1792. doi: 10.1038/sj.bjp.0703759

Yaksh, T. L., and Harty, G. J. (1988). Pharmacology of the allodynia in rats evoked by high dose intrathecal morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244, 501–507.

Yaksh, T. L., Harty, G. J., and Onofrio, B. M. (1986). High dose of spinal morphine produce a nonopiate receptor-mediated hyperesthesia: clinical and theoretic implications. *Anesthesiology* 64, 590–597. doi: 10.1097/00000542-198605000-00008

Yang, Z. Z., Li, L., Wang, L., Xu, M. C., An, S., Jiang, C., et al. (2016). SiRNA capsulated brain-targeted nanoparticles specifically knock down OATP2B1 in mice: a mechanism for acute morphine tolerance suppression. *Sci. Rep.* 6:33338. doi: 10.1038/srep33338

Yang, Z., Li, L., Hu, H., Xu, M., Gu, J., Wang, Z. J., et al. (2016a). Reverse of acute and chronic morphine tolerance by lithocholic acid via down-regulating UGT2B7. *Front. Pharmacol.* 7:404. doi: 10.3389/fphar.2016.00404

Yang, Z., Wang, L., Xu, M., Gu, J., Yu, L., and Zeng, S. (2016b). Simultaneous analysis of gemfibrozil, morphine, and its two active metabolites in different mouse brain structures using solid-phase extraction with ultra-high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry with a deuterated internal standard. *J. Sep. Sci.* 39, 2087–2096. doi: 10.1002/jssc.201600088

Yeh, S. Y. (1975). Urinary excretion of morphine and its metabolites in morphine-dependent subjects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 192, 201–210.

Yeh, S. Y., Gorodetzky, C. W., and Krebs, H. A. (1977). Isolation and identification of morphine 3- and 6-glucuronides, morphine 3,6-diglucuronide, morphine 3-ethereal sulfate, normorphine, and normorphine 6-glucuronide as morphine metabolites in humans. *J. Pharm. Sci.* 66, 1288–1293. doi: 10.1002/jps.2600660921

Zelcer, N., van de Wetering, K., Hillebrand, M., Sarton, E., Kuil, A., Wielinga, P. R., et al. (2005). Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 7274–7279. doi: 10.1073/pnas.0502530102

Zhang, P., Yang, M., Chen, C., Liu, L., Wei, X., and Zeng, S. (2020). Toll-Like receptor 4 (TLR4)/Opioid receptor pathway crosstalk and impact on opioid analgesia. Immune function, and gastrointestinal motility. *Front. Immunol.* 11:1455. doi: 10.3389/fimmu.2020.01455

Zhang, Z., Liu, Q., Liu, M., Wang, H., Dong, Y., Ji, T., et al. (2018). Upregulation of HMGB1-TLR4 inflammatory pathway in focal cortical dysplasia type II. *J. Neuroinflammation* 15:27. doi: 10.1186/s12974-018-1078-8

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Gabel, Hovhannisyan, Berkati and Goumon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Publication 2: Différences de sexe de l'effet anti-nociceptif et du métabolisme de la morphine

Dans cet article, nous avons démontré qu'un métabolisme central de la morphine était observé dans des structures associées aux effets analgésiques de la morphine (PAG, ME, Amygdale etc…). Cet article a été publié en janvier 2022 dans le journal *British Journal of Pharmacology*.

Received: 15 January 2021 | Revised: 7 December 2021 | Accepted: 28 December 2021

DOI: 10.1111/bph.15792

THEMED ISSUE ARTICLE

Central metabolism as a potential origin of sex differences in morphine antinociception but not induction of antinociceptive tolerance in mice

Florian Gabel[1] | Volodya Hovhannisyan[1] | Virginie Andry[1,2] | Yannick Goumon[1,2]

[1]CNRS UPR3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique and University of Strasbourg, Strasbourg, France

[2]SMPMS-INCI, Mass Spectrometry Facilities of the CNRS UPR3212, CNRS UPR3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique and University of Strasbourg, Strasbourg, France

Correspondence
Yannick Goumon, CNRS UPR3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives; 8 Allée du Général Rouvillois, F-67000 Strasbourg, France.
Email: ygoumon@unistra.fr

Funding information
Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); French National Research Agency, Grant/Award Number: ANR-17-EURE-0022; Université de Strasbourg; French Ministère Délégué à la Recherche et à l'Enseignement Supérieur, Grant/Award Number: PhD fellowship; University of Strasbourg

Background and Purpose: In rodents, morphine antinociception is influenced by sex. However, conflicting results have been reported regarding the interaction between sex and morphine antinociceptive tolerance. Morphine is metabolised in the liver and brain into morphine-3-glucuronide (M3G). Sex differences in morphine metabolism and differential metabolic adaptations during tolerance development might contribute to behavioural discrepancies. This article investigates the differences in peripheral and central morphine metabolism after acute and chronic morphine treatment in male and female mice.

Experimental Approach: Sex differences in morphine antinociception and tolerance were assessed using the tail-immersion test. After acute and chronic morphine treatment, morphine and M3G metabolic kinetics in the blood were evaluated using LC-MS/MS. They were also quantified in several CNS regions. Finally, the blood–brain barrier (BBB) permeability of M3G was assessed in male and female mice.

Key Results: This study demonstrated that female mice showed weaker morphine antinociception and faster induction of tolerance than males. Additionally, female mice showed higher levels of M3G in the blood and in several pain-related CNS regions than male mice, whereas lower levels of morphine were observed in these regions. M3G brain/blood ratios after injection of M3G indicated no sex differences in M3G BBB permeability, and these ratios were lower than those obtained after injection of morphine.

Conclusion: These differences are attributable mainly to morphine central metabolism, which differed between males and females in pain-related CNS regions, consistent with weaker morphine antinociceptive effects in females. However, the role of morphine metabolism in antinociceptive tolerance seemed limited.

KEYWORDS
antinociception, antinociceptive tolerance, M3G, metabolism, morphine, sex differences, UDP-glucuronosyltransferase

Abbreviations: AUMC, area under the moment curve; CID, collision gas; Cl/F, clearance over bioavailability; D3-M3G, M3G bearing three ^{2}H; D3-morphine, morphine bearing three ^{2}H; LC-MS/MS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; M3G, morphine-3-glucuronide; M6G, morphine-6-glucuronide; MPE, maximal possible effect; MRM, multiple reaction monitoring mode; MRP, multidrug resistance associated protein; MRT, mean residence time; NCA, non-compartmental analysis; OIH, opioid-induced hyperalgesia; V_{dss}/F, volume of distribution at steady-state over bioavailability.

© 2022 The British Pharmacological Society

1 | INTRODUCTION

Pain management has become one of the most prevalent human health issues, with an increasing societal cost. Among painkillers, **morphine** remains the gold standard to relieve severe pain despite its numerous side effects, including nausea, opioid-induced hyperalgesia (OIH), antinociceptive tolerance, addiction and respiratory depression (Trescot et al., 2008). Morphine antinociception and the development of its side effects are influenced by sex in mammals (Fullerton, Doyle & Murphy, 2018). In rodents, males show stronger antinociception than females with the same dose of morphine (Cicero et al., 2002; Craft, 2003; Kest et al., 1999), whereas human studies have yielded more conflicting results (Aubrun et al., 2005; Cepeda et al., 2003; Cepeda & Carr, 2003; Comer et al., 2010; Mogil, 2012; Sarton et al., 2000). Several mechanisms have been proposed to explain these sex differences in animal models (Fullerton et al., 2018), although human behavioural discrepancies might depend on other parameters, such as the social context, patient history and presence of comorbidities (Paller et al., 2009).

Morphine antinociception relies on morphine binding mainly to **μ opioid receptors** (MORs) located on neurons of the central nervous system (CNS), especially in regions related to pain such as the lumbar spinal cord (LSC), periaqueductal grey (PAG) and amygdala (Glaum et al., 1994; Jensen & Yaksh, 1986; McGaraughty & Heinricher, 2002). Upon activation, these Class A **GPCR**s induce a strong hyperpolarisation of MOR-expressing neurons and inhibit the transmission of nociceptive signals (Fields, 2004). Therefore, morphine levels in pain-related CNS regions, as well as MORs expression and functionality in these structures (e.g., morphine binding affinity or G-protein coupling efficiency), are key factors for morphine-induced antinociception.

Morphine metabolism involves mainly glucuronidation mediated by **UDP-glucuronosyltransferase**s (UGT family) expressed in the liver, intestines, kidneys and, to a significant extent, brain cells (Laux-Biehlmann et al., 2013). In humans, the conjugation of a glucuronide moiety by UGT2B7 on the 3-OH or 6-OH group of morphine produces two predominant metabolites: morphine-3-glucuronide (M3G, 60–70%) and morphine-6-glucuronide (M6G, 10%) (Laux-Biehlmann et al., 2013). In addition, UGT1A1, 1A3, 1A6, 1A8, 1A9 and 1A10 also account for M3G production (Stone et al., 2003). However, UGT2B7 is absent in mice; therefore, no M6G is produced, while most M3G production is maintained through the action of UGT2B36 (Kurita et al., 2017). M6G has been proposed to be an agonist at MORs, resulting in antinociception (Lotsch & Geisslinger, 2001). Conversely, M3G has been described to antagonise morphine effects. Indeed, studies have reported strong mechanical and thermal hyperalgesia following intraperitoneal, intrathecal or intracerebroventricular injections of M3G that could block morphine antinociception in rodents (Lewis et al., 2010; Smith et al., 1990). Subsequently, many studies have suggested a role of M3G in the development of morphine-induced OIH and antinociceptive tolerance (Blomqvist et al., 2020; Due et al., 2012; Smith & Smith, 1995).

What is already known

- Morphine antinociception and its side effects are influenced by sex.
- Morphine metabolism modulates the antinociceptive effect of morphine.

What this study adds

- Morphine metabolism takes place in several pain-related brain regions in vivo.
- Central metabolism of morphine is influenced by sex but remains unchanged during antinociceptive tolerance.

What is the clinical significance

- Sex differences in metabolism must be considered to design more effective analgesic treatments for women.
- Understanding sex differences in pain circuits might help to understand opiates side-effects.

Morphine antinociceptive tolerance corresponds to the loss of morphine efficacy over repeated administration and the need for higher doses to achieve sufficient antinociception (Weinsanto et al., 2018). Several pharmacodynamic mechanisms have been previously described to explain this phenomenon and include a loss of functional receptors, impaired MOR desensitisation, resensitisation or recycling and persistent PKC activity (Williams et al., 2013). Interestingly, M3G has been shown to elicit pain probably through binding to the **Toll-like receptor 4** (TLR4)/myeloid differentiation protein 2 complex (Due et al., 2012; Lewis et al., 2010), while implications of TLR4 activation in tolerance and OIH have been described (Bai et al., 2014; Eidson et al., 2017). However, conflicting results argue in opposite directions (Mattioli et al., 2014; Roeckel et al., 2017).

Taken together, numerous pieces of evidence suggest that morphine and M3G have opposing effects. Interestingly, in mice, sex differences in UGT expression have been reported in the liver and the brain (Buckley & Klaassen, 2007). For instance, UGT1A8 and UGT2B36 expression has been shown to be higher in the female brain. Therefore, the metabolic balance between morphine and M3G in the periphery and the CNS might be influenced by sex in acute and chronic conditions and could participate to the sex differences in morphine antinociception and tolerance. The present article investigates the differences in such metabolic balance in the periphery and the CNS of male and female mice following acute and chronic administration of morphine.

2 | METHODS

2.1 | Animals

Experiments were performed with 10-week-old male and female C57BL/6J mice (26 ± 4 g and 20 ± 4 g, respectively; JAX:006362; Charles River, L'Arbresle, France). Mice were group-housed at five per cage according to the sex with a 12-h light–dark cycle, at a temperature of 23°C ± 2°C and provided with food and water ad libitum. All procedures were performed following European directives (2010/63/EU) and were approved by the regional ethics committee and the French Ministry of Agriculture (licence No. APAFIS# 23671-2020010713353847v5 and APAFIS#16719-2018091211572566v8 to Y.G.). Animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Percie du Sert et al., 2020) and with the recommendations made by the *British Journal of Pharmacology* (Lilley et al., 2020).

2.2 | Experimental design

Considering the importance of sex as a biological variable, especially in pain studies (Mogil, 2020), all experiments were conducted according to a 2 × 2 factorial design to examine the effect of both sex and treatment, as well as their potential interaction. The number of mice used for each experiment was chosen to ensure sufficient statistical power (power of 80% and alpha of 0.05) (Charan & Kantharia, 2013). In addition, calculations also were based on a pilot study and differences already reported in the literature. All experiments were carried out in a randomised manner for each sex. The experimenter was blinded to the nature of the solutions (saline vs. morphine) used for the injections during the behavioural experiments. Due to the technical loss of several blood and lumbar spinal cord (LSC) samples from male mice, the experiment in which the CNS regions were collected was duplicated only with males, and all structures were extracted. The number of samples for each structure was therefore increased in the male groups (please see the sample numbers indicated in each figure).

2.3 | Behavioural assessment of morphine antinociceptive effect

The antinociceptive effect of morphine was measured with the tail immersion test. Mice were first habituated to their environmental conditions for a week without any experimental procedures. Then, they were gently handled and habituated to be restrained in a grid pocket for 2 days. Mice were tested every day by measuring the latency of the tail withdrawal when 2/3 of the tail was immersed in a constant-temperature water bath heated at 47°C. In the absence of response, the cut-off was set at 25 s to avoid tissue damage. The basal thermal nociceptive threshold was determined during 2 weeks of baseline and considered as steady following three consecutive days of stable measurement prior to the testing phase. Results are expressed as % maximal possible effect (%MPE) according to the following formula:

$$\%\text{MPE} = \frac{(\text{test latency}) - (\text{baseline latency})}{(\text{cut} - \text{off latency}) - (\text{baseline latency})} \times 100$$

2.4 | Morphine half-maximal effective dose determination

Morphine half-maximal effective dose (ED_{50}) was determined in males and females using five doses of morphine (1 $mg{\cdot}kg^{-1}$, 2.5 $mg{\cdot}kg^{-1}$, 5 $mg{\cdot}kg^{-1}$, 10 $mg{\cdot}kg^{-1}$ and 20 $mg{\cdot}kg^{-1}$). Mice were sorted by sex and randomly assigned to compose groups of 6 mice. On the day of the test, mice were weighed, tested for baseline and injected intraperitoneally (i.p.) with the right dose of morphine (w/v, Francopia, Paris, France; volume of 5 $\mu l{\cdot}g^{-1}$ of mouse) dissolved in NaCl 0.9%. After 30 min, mice were retested to measure morphine-induced antinociceptive effect. This time interval was selected as morphine antinociception is described to peak approximatively 30 min after the injection (Bryant et al., 2006; Cicero et al., 1996, 1997; Doyle & Murphy, 2018).

2.5 | Induction of morphine antinociceptive tolerance

To evoke morphine antinociceptive tolerance, mice were weighed and injected i.p. with either 10 $mg{\cdot}kg^{-1}$ of morphine (2 $mg{\cdot}ml^{-1}$; volume of 5 $\mu l{\cdot}g^{-1}$ of mouse; w/v, Francopia, Paris, France) dissolved in NaCl 0.9% or with an equal volume of saline solution every morning (light phase at 10 AM) for nine consecutive days. Mice were tested before and 30 min after each injection. On day 10, all mice received an injection of 10 $mg{\cdot}kg^{-1}$ of morphine before the final procedure.

2.6 | Blood collection

On day 10, the tail of the mice was anaesthetised locally with a topical application of lidocaine/prilocaine 5% (Zentiva, Paris, France). After 5 min, a small incision was performed at the end of the tail, and 5 µl of blood was collected using a heparinised calibrated capillary (Minicaps End-to-End 5 µl; Hischmann, Eberstadt Germany). Then, all mice were injected with morphine, and 5 µl of blood was collected every 10 min for 2 h and every 20 min for the last hour. After each collection, the blood was transferred from the capillary into a microtube containing 4 µl of heparin and frozen at −20°C for later analysis. Twelve mice per group were used for the morphine kinetic experiment.

2.7 | Brain regions and lumbar spinal cord sampling

In a separate group of mice, on day 10, mice were killed by cervical dislocation 30 min following the injection of morphine, and the blood

and the brain were collected. The blood was transferred to a micro-tube containing 4 µl of heparin and frozen at −20°C for later analysis. Then, the brain was placed on an ice-cold mouse brain matrix. Razor blades were used to cut the brain into 1-mm-thick slices. Punchers of 1-mm and 0.5-mm diameters were used to sample the PAG and amygdala, respectively. Olfactory bulbs (OB) were extracted using forceps. For the LSC, hydraulic extrusion was performed as previously described (Richner et al., 2017). Structures were directly transferred in micro-tubes and stored at −80°C. OB were collected because high levels of UGTs involved in morphine metabolism are present in the olfactory area (Heydel et al., 2010; Ouzzine et al., 2014). For each group, 20 males and 13 females were used (see Section 2.2).

2.8 | M3G blood–brain barrier permeability

To investigate whether differences in M3G blood–brain barrier (BBB) permeability exist between males and females, 15 male and 15 female mice were weighed, divided into three groups and injected i.p. with either 10 $mg{\cdot}kg^{-1}$, 20 $mg{\cdot}kg^{-1}$ or 40 $mg{\cdot}kg^{-1}$ of M3G (w/v, Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier; volume of 5 $\mu l{\cdot}g^{-1}$ of mouse). Mice were killed by cervical dislocation 30 min following the injection of M3G, and the blood, the brain regions of interest and the LSC were collected according to the protocol described above.

2.9 | Sample preparation

2.9.1 | Blood

On the day of the analysis, blood was thawed, and 10 µl of internal standard (IS; containing 12 pmol of D3-morphine and 10.5 pmol of D3-M3G; Sigma Aldrich) and 100 µl of ice-cold acetonitrile (ACN; Thermo Scientific, San Jose, USA) were added. The samples were vortexed and centrifuged at 20,000 *g* for 15 min at 4°C. The supernatants were collected, dried under vacuum and suspended in 800 µl of H_2O/0.1% formic acid (v/v; Sigma Aldrich) prior to solid-phase extraction (SPE). HyperSep PGC SPE-cartridges (1 cc, 25 mg, Thermo Electron, Villebon-Sur-Yvette, France) were used with a positive pressure manifold (Thermo Electron). Briefly, cartridges were activated with 1 ml of ACN followed by a step wash with 2 ml of H_2O/0.1% formic acid (v/v). Then, samples were loaded onto the cartridges, and cartridges were dried for a minute under high vacuum. They were subsequently washed with 1 ml of H_2O/0.1% formic acid (v/v) followed by 1 ml of 97.9% H_2O/2% ACN/0.1% formic acid (v/v). Elution was performed with 800 µl of 79.9% H_2O/20% ACN/0.1% formic acid (v/v), and eluates were centrifuged (20,000 *g*, 4°C for 5 min). Supernatants were dried under vacuum and resuspended in 50 µl of H_2O/0.1% formic acid (v/v) prior to LC-MS/MS analysis.

2.9.2 | Brain regions and lumbar spinal cord

Samples were sonicated (2 × 5 s, 100 W) in 200 µl of H_2O containing 10 µl of IS (40 pmol of D3-morphine and 60 pmol of D3-M3G). After centrifugation (10 min at 10,000 *g* and 4°C), 10 µl of the supernatants were precipitated with 100 µl of ice-cold ACN for 30 min. Supernatants were dried under vacuum after another centrifugation (15 min at 20,000 *g* and 4°C) and resuspended in 20 µl of H_2O/0.1% formic acid (v/v) prior to LC-MS/MS analysis.

2.10 | LC-MS/MS instrumentation and analytical conditions

Analyses were performed with a Dionex Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Electron) coupled with a triple quadrupole Endura mass spectrometer (Thermo Electron). Xcalibur v4.0 software (RRID:SCR_014593) was used to control the system (Thermo Electron). Samples were loaded onto a ZORBAX SB-C18 column (150 × 1 mm, 3.5 µm, flow of 90 $\mu l{\cdot}min^{-1}$; Agilent, Les Ulis, France) heated at 40°C. LC and MS conditions used are detailed in Table S1.

Identification of the compounds was based on precursor ions, selective fragment ions and retention times obtained for the heavy counterpart present in the IS. Selection of the monitored transitions and optimisation of collision energy and RF Lens parameters were determined manually (for details, see Table S1). Qualification and quantification were performed using the multiple reaction monitoring mode (MRM) according to the isotopic dilution method (Ho et al., 1990).

2.10.1 | Data and statistical analysis

Design and analysis were done in accordance with the recommendations of the *British Journal of Pharmacology* on experimental design and analysis (Curtis et al., 2018).

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 Software (RRID:SCR_002798) only for experiments where group size was at least $n = 5$ and composed of independent values. To compare the groups, two-way ANOVA was applied and followed by Tukey's multiple comparisons test only if F was significant and there was no variance homogeneity. Normality and variance homogeneity were checked with the D'Agostino and Pearson omnibus normality test and the Levene's test, respectively. If assumptions were violated, a non-parametric approach, the aligned-rank transform (ART) ANOVA, was used (Wobbrock et al., 2011). Outliers were included in data analysis and presentation unless a very low amount of morphine in the blood was observed during the whole kinetic suggesting bad injection and when an abnormally high amount of morphine and M3G were found in the CNS regions indicating contamination during sample preparation. Results are presented as mean values ± standard error of the mean (SEM). A P value < 0.05 was considered statistically significant.

2.10.2 | Behavioural experiments

Non-linear regression with a four-parameter logistic equation was used to define the ED_{50} of morphine and the 95% confidence intervals (95% CI) in both males and females. The two fits were compared using a nested-model comparison with the extra sum-of-squares *F* test. The same analysis was applied to the data of each mouse of the tolerance experiment to extract the following parameters: the average day at which half of the MPE is left and the Hill slope coefficient. Then, the mean of each parameter was compared using an unpaired *t* test with Welch's correction.

2.10.3 | Non-compartmental analysis

Pharmacokinetic parameters for morphine and M3G were determined through a non-compartmental analysis (NCA) performed with PKsolver described by Zhang et al. (2010). The λ_z acceptance criteria were set as followed: *R* adjusted > 0.80, includes ≥ 3 time points, $AUC_{tlast\text{-}inf} \leq 20\%\ AUC_{0\text{-}inf}$. The linear up log down trapezoidal rule was used to determine the AUC of morphine and M3G after extrapolation to infinity.

2.10.4 | Brain/blood ratios

For the comparison between the M3G brain/blood ratio obtained following injection of morphine and M3G, linear regressions were applied and analysed through a nested-model comparison with the extra sum-of-squares *F* test.

2.11 | Materials

C57BL/6J mice were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). Morphine was purchased from Francopia (CAT# 355; Paris, France). Formic acid (CAT# A117-50), M3G (CAT# M-017), D3-morphine (CAT# M-003) and D3-M3G (CAT# M-031) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Lidocaine/prilocaine 5% was purchase from Zentiva (Paris, France). Minicaps heparinised calibrated capillaries were purchased from Hischmann (CAT# 9000205; Eberstadt Germany). HyperSep PGC SPE-cartridges (CAT# 60106-304) and acetonitrile (A955-212) were purchased from Thermo Electron (Villebon-Sur-Yvette, France). ZORBAX SB-C18 column was from Agilent (CAT# 863600-902; Les Ulis, France).

2.12 | Nomenclature of targets and ligands

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in http://www.guidetopharmacology.org, and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2021/22 (Alexander et al., 2021).

3 | RESULTS

3.1 | Morphine antinociceptive effect and tolerance in males and females

Morphine antinociception and side effects such as antinociceptive tolerance are influenced by sex (Fullerton et al., 2018). To investigate such sex differences, the tail-immersion test was used to assess the antinociceptive effect of morphine and the development of morphine antinociceptive tolerance in male and female C57BL/6J mice. Statistical details are presented in Table S2.

As shown in Figure 1a, systemic injection of morphine produced dose-dependent antinociceptive effects in both male and female mice. However, as witnessed by the morphine ED_{50}, females required significantly higher amounts of morphine to reach 50% of the MPE than males, suggesting sex differences in the antinociceptive effect of morphine (Figure 1a). Interestingly, there were no sex differences in the baseline nociceptive thresholds of the mice.

The protocol for tolerance is provided in Figure 1b. Morphine MPE decreased with subsequent injections in both male and female mice (Figure 1c). However, females became tolerant to morphine antinociceptive effects significantly earlier than males, as witnessed by the day at which only half of the MPE remained (Figure 1c). Interestingly, no significant difference was observed in the Hill slope coefficient between males and females, suggesting that the rate of the tolerance development process was identical in males and females (Figure 1c). Nevertheless, it should be noted that males reached the upper cut-off of the tail-immersion test on the first 3 days of the treatment, and therefore, sex differences in the Hill slope coefficient might have been masked.

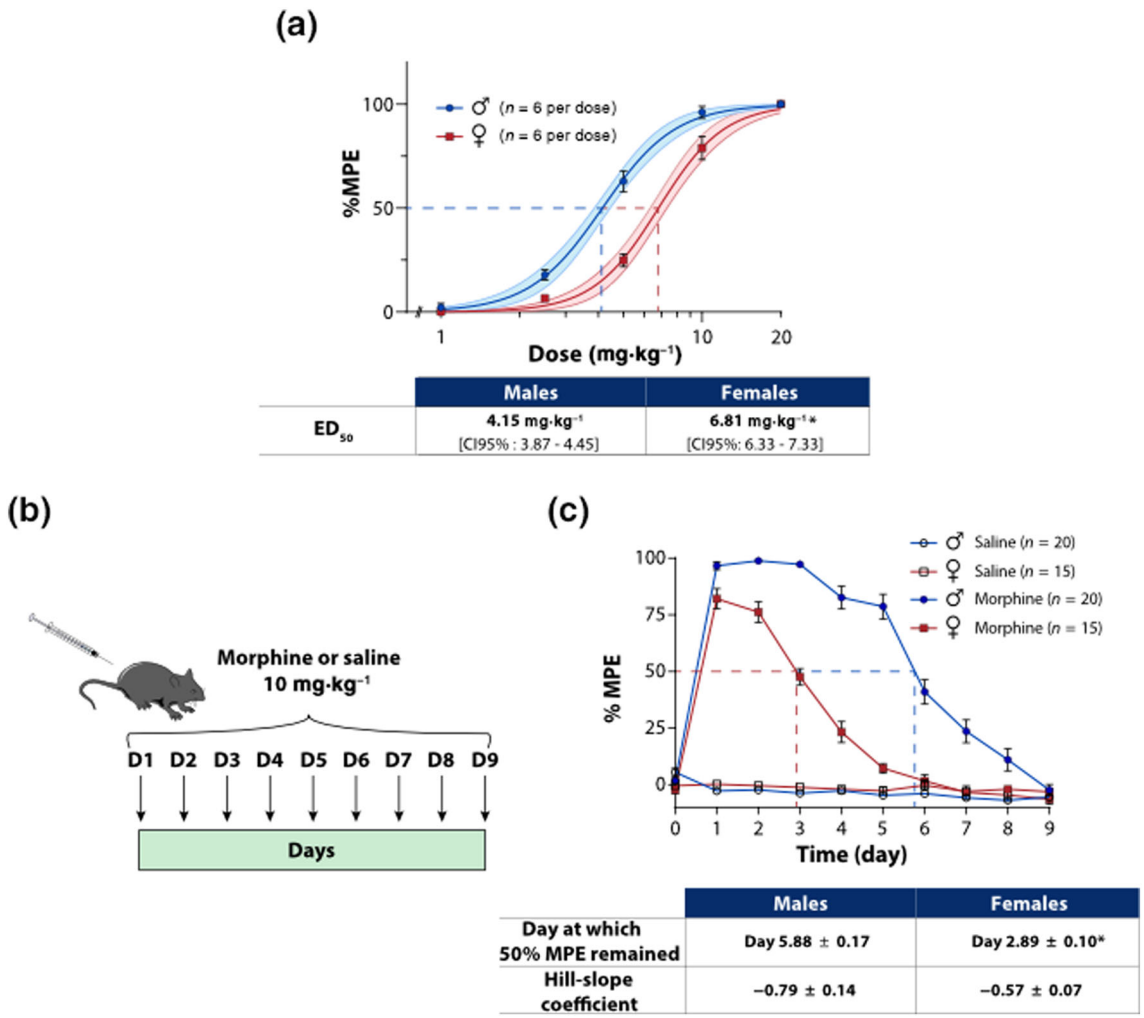
Taken together, these results show sex differences in morphine antinociception and in the induction of antinociceptive tolerance.

3.2 | Peripheral morphine metabolism

Peripheral morphine metabolism contributes to the modulation of morphine and M3G concentrations in the blood. As morphine and M3G are believed to mediate opposite effects, variations in morphine metabolic balance might contribute to differences in morphine antinociception. Therefore, we next investigated whether peripheral morphine metabolism differed between males and females following acute and chronic administration of morphine (see protocol described in Figure 2a). Statistical details are presented in Table S3.

To assess sex differences in morphine metabolism, morphine and M3G kinetics and their metabolic ratios over time are depicted in Figure 2b–d, respectively, for control mice. Data obtained for tolerant mice are presented in Figure 2e–g, respectively. The associated results obtained from the NCA are represented in Table 1 and as histograms in Figure S1.

The statistical analysis revealed an interaction between sex and chronic morphine treatment on the morphine area under the curve



	Males	Females
ED_{50}	4.15 mg·kg⁻¹ [CI95% : 3.87 - 4.45]	6.81 mg·kg⁻¹* [CI95%: 6.33 - 7.33]

	Males	Females
Day at which 50% MPE remained	Day 5.88 ± 0.17	Day 2.89 ± 0.10*
Hill-slope coefficient	−0.79 ± 0.14	−0.57 ± 0.07

FIGURE 1 Antinociceptive effect of morphine and development of morphine antinociceptive tolerance in male and female mice. (a) Dose–response curves for morphine antinociceptive effect in male and female mice. Antinociception is expressed as % of %MPE. 95% CI are represented as shaded area in blue for males and in red for females. Each group received one dose of morphine (1 mg·kg^{-1}, 2,5 mg·kg^{-1}, 5 mg·kg^{-1}, 10 mg·kg^{-1} or 20 mg·kg^{-1}). $n = 6$ for all conditions except $n = 5$ for the injection of 20 mg·kg^{-1} in males. (b) Protocol of induction of the antinociceptive tolerance to morphine. (c) Development of morphine antinociceptive tolerance throughout the chronic treatment (i.p. 10 mg·kg^{-1}, from day 1 to 9). Antinociception is expressed as %MPE observed 30 min after morphine or saline injection for 9 successive days. Data are expressed as mean ± SEM; *n*-numbers are indicated in the figure. ED_{50} were extracted from each fitting, and fits were compared with the extra sum-of-the-square *F* test. Unpaired *t* test with Welch's correction was used to compare the values for the day at which half of the MPE remains and the hill-slope coefficient values. *, $P < 0.05$. Males are represented as blue circle dots and females as red square dots

(AUC; Figure 2h). Indeed, female control mice showed a higher morphine AUC than female tolerant mice, although this effect was absent in males (see Table 1, post hoc analysis). No interaction was noticed on the M3G AUC, but it was significantly lower in male mice than in female mice (Figure 2i). No effect of the treatment was observed. Consequently, (i) females showed significantly higher metabolic M3G/morphine AUC ratios than males, and (ii) tolerant mice also showed a significantly higher metabolic ratio than control mice (Figure 2j).

Furthermore, an interaction between sex and chronic treatment was also observed for the morphine maximal concentration reached over the time course, the morphine area under the first moment curve (AUMC) and morphine clearance (Table 1). In addition, a trend was observed in the M3G maximal concentration reached over the time course, but it did not reach statistical significance. These interactions were mainly driven by the differences between the control and tolerant female mice, which were not present in male mice (see Table 1, post hoc analysis). Nevertheless, there was no interaction with the M3G parameters or the metabolic ratios (Figure 2j). This result suggests that peripheral morphine metabolism did not seem to be differentially involved during the induction of antinociceptive tolerance in male and female mice. These interactions are more likely related to changes in morphine absorption and/or clearance.

Interestingly, males displayed significantly higher morphine mean residence time (MRT) and morphine half-life than females, whereas a higher maximal concentration of M3G reached over the time course was observed in females, suggesting slower morphine metabolism in males (Table 1). There was no impact of sex on any of the other parameters.

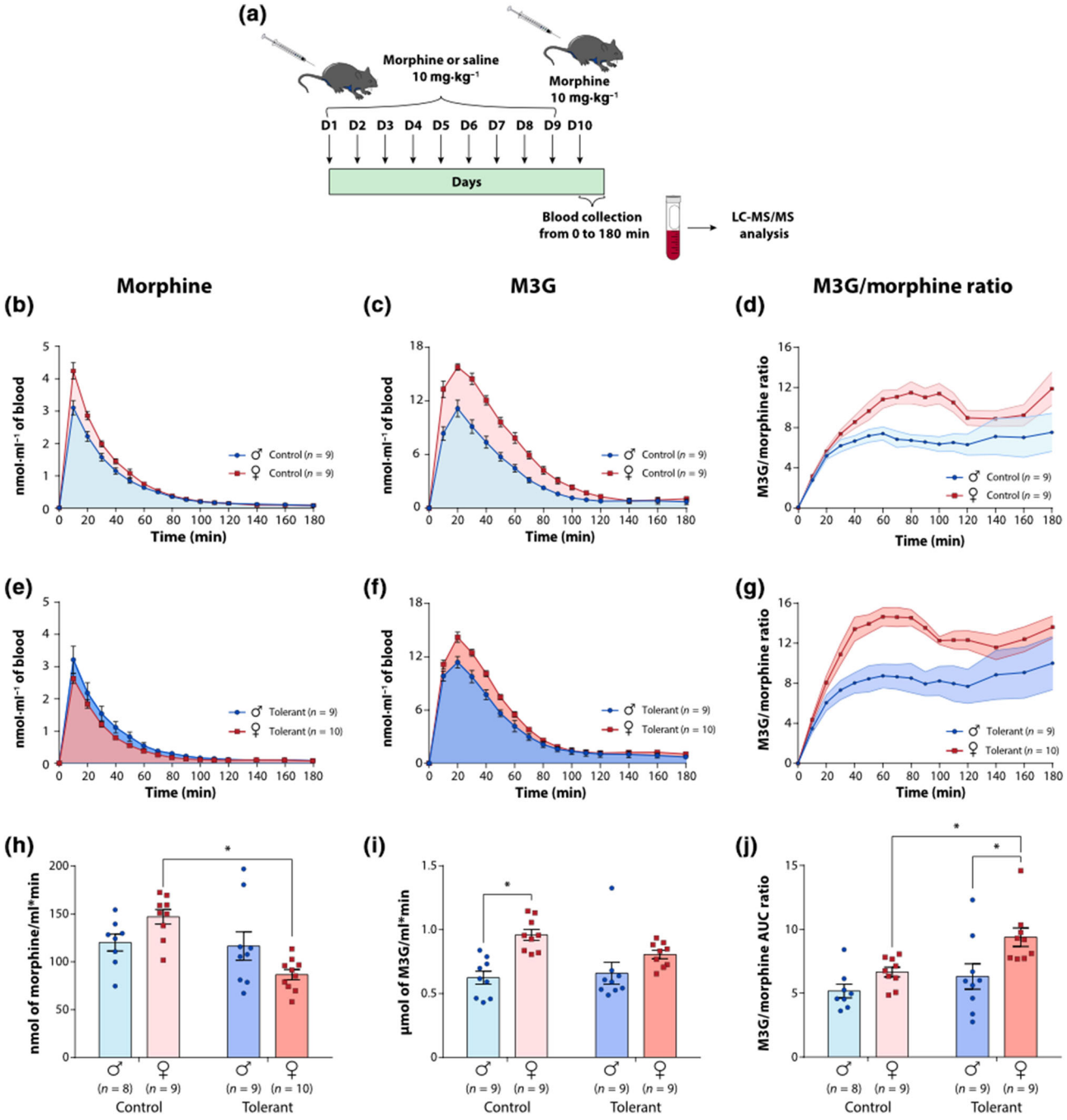


FIGURE 2 Morphine and M3G kinetics in the blood. (a) Protocol of induction of morphine antinociceptive tolerance across days 1 to 10 (D1–D10, 10 mg·kg^{-1} morphine or saline i.p.). At day 10, blood was collected at the tail vein at different time points during 180 min. (b) Blood levels of morphine in control male and female mice after a single injection of morphine at day 10. (c) Blood levels of M3G in control mice. (d) M3G/morphine metabolic ratios in the blood of control mice. (e) Blood levels of morphine in male and female tolerant mice after injection of morphine at day 10. (f) Blood levels of M3G in tolerant mice. (g) M3G/morphine metabolic ratios in the blood of tolerant mice. (h) Overall quantities (area under the curve; AUC) of morphine expressed in nmol·min·ml^{-1}. (i) AUC expressed in µmol·min·ml^{-1} of M3G; (j) ratio M3G/morphine of the corresponding AUC. Data are expressed as means ± SEM; *n* are indicated in the figure. Two-way ANOVA was applied and followed by Tukey's multiple comparisons test only if *F* was significant and there was no variance homogeneity. Tukey's multiple comparisons results are reported as *, $P < 0.05$. Males are represented as blue circle dots and females as red square dots

Finally, significantly higher morphine clearance and volume of distribution were observed in tolerant mice compared to control mice, suggesting that chronic morphine treatment might induce adaptations in metabolism and/or transporter expression (Table 1). There was no effect of treatment on any M3G parameters.

Taken together, our results indicated that (i) female mice displayed much higher peripheral morphine metabolism and had significantly higher levels of M3G than males, and (ii) the peripheral metabolism of morphine was increased during the development of antinociceptive tolerance to morphine in mice.

TABLE 1 Pharmacokinetic parameters obtained from the NCA for morphine and M3G in the blood of male and female control and tolerant mice following an injection of 10 mg·kg^{-1} of morphine at day 10

	Morphine			
	CT males	**CT females**	**Tolerant males**	**Tolerant females**
C_{max} (nmol·ml^{-1})[b, c]	2.93 ± 0.28 ($n = 9$)	4.24 ± 0.25[d] ($n = 9$)	3.22 ± 0.42 ($n = 9$)	2.63 ± 0.16[f] ($n = 10$)
$AUC_{0\text{-}inf}$ (nmol·min·ml^{-1})[b, c]	120.12 ± 8.7 ($n = 8$)	146.99 ± 7.7 ($n = 9$)	116.41 ± 14.9 ($n = 9$)	86.66 ± 52.7[f] ($n = 10$)
$AUMC_{0\text{-}inf}$ c (µmol·min^2·ml^{-1})[b, c, a]	5.76 ± 0.37 ($n = 8$)	6.14 ± 0.36 ($n = 9$)	5.80 ± 0.57 ($n = 9$)	3.37 ± 0.24[e, f] ($n = 10$)
MRT (min)[a]	49.10 ± 3.46 ($n = 8$)	41.72 ± 1.09 ($n = 9$)	52.21 ± 4.63 ($n = 9$)	39.06 ± 2.12[e] ($n = 10$)
$T_{1/2}$ (min)[a]	34.03 ± 2.40 ($n = 8$)	28.91 ± 0.75 ($n = 9$)	36.19 ± 3.21 ($n = 9$)	27.07 ± 1.47[e] ($n = 10$)
Cl/F (L·h^{-1}·kg^{-1})[b, c]	18.31 ± 1.62 ($n = 8$)	14.68 ± 0.91 ($n = 9$)	20.25 ± 2.27 ($n = 9$)	25.16 ± 1.67[f] ($n = 10$)
Vdss/F (L·kg^{-1})[b]	15.51 ± 2.61 ($n = 8$)	10.18 ± 0.61 ($n = 9$)	18.16 ± 2.74 ($n = 9$)	16.44 ± 1.46 ($n = 10$)
	M3G			
	CT males	**CT females**	**Tolerant males**	**Tolerant females**
C_{max} (nmol·ml^{-1})[a]	11.38 ± 0.85 ($n = 9$)	16.35 ± 0.39[d] ($n = 9$)	11.52 ± 0.72 ($n = 9$)	14.21 ± 0.57[e] ($n = 10$)
$AUC_{0\text{-}inf}$ (nmol·min·ml^{-1})[a]	624.4 ± 50.3 ($n = 9$)	959.7 ± 42.9[d] ($n = 9$)	659.1 ± 85.8 ($n = 9$)	805.8 ± 32.2 ($n = 9$)
AUMC0-inf (µmol·min^2·ml^{-1})	33.62 ± 4.1 ($n = 9$)	47.22 ± 3.2 ($n = 9$)	39.14 ± 12.0 ($n = 9$)	44.90 ± 5.4 ($n = 9$)
MRT (min)	53.12 ± 3.6 ($n = 9$)	48.85 ± 1.4 ($n = 9$)	53.22 ± 6.3 ($n = 9$)	54.88 ± 4.8 ($n = 9$)

Note: Data are expressed as mean ± SEM; *n* are indicated in the table. Two-way ANOVA was applied and followed by Tukey's multiple comparisons test only if *F* was significant and there was no variance homogeneity. Morphine volume of distribution at steady state was analysed with the non-parametric approach ART ANOVA.

[a]Sex, $P < 0.05$.

[b]Treatment, $P < 0.05$.

[c]Interaction, $P < 0.05$.

[d]Control males versus control females, $P < 0.05$.

[e]Tolerant males versus tolerant females.

[f]Control females versus tolerant females, $P < 0.05$.

3.3 | Quantification of morphine and M3G in CNS regions

Morphine antinociception relies mainly on morphine effects in pain-related CNS regions. Additionally, M3G may act in these regions to oppose morphine effects. Consequently, their balance in pain-related CNS regions might modulate morphine antinociception. Thus, we investigated whether sex and chronic morphine treatment, leading to antinociceptive tolerance, influences morphine and M3G levels and their metabolic ratio in the amygdala, PAG and LSC. The OB was also investigated because high levels of UGTs involved in morphine metabolism have been reported in the olfactory area (Heydel et al., 2010; Ouzzine et al., 2014).

Morphine and M3G levels were quantified by LC-MS/MS in the amygdala, PAG, LSC and OB of male and female mice following acute and chronic morphine treatment (see protocol Figure 3a). The values obtained with morphine and M3G are reported in Table 2 and illustrated as histograms in Figure S2. Statistical details are presented in Table S4.

3.3.1 | Amygdala

The analysis revealed that significantly lower levels of morphine and higher levels of M3G were present in the amygdala of female mice compared to male mice (Table 2). Therefore, the metabolic ratio between M3G and morphine was significantly lower in male mice than in female mice in this structure (Figure 3b). In addition, tolerant mice showed lower levels of morphine and M3G in the amygdala than control mice (Table 2). No differences were observed in the metabolic ratio between control and tolerant mice (Figure 3b).

3.3.2 | PAG

Significantly lower levels of morphine were observed in the PAG of female mice than in the PAG of male mice, whereas no sex differences were observed in M3G levels (Table 2). Interestingly, the metabolic ratio between M3G and morphine was significantly lower in male mice than in female mice in the PAG (Figure 3c). In addition, no significant difference was observed in the morphine and M3G levels (Table 2) or in the M3G/morphine metabolic ratio (Figure 3c) between control and tolerant mice.

3.3.3 | LSC

Morphine and M3G concentrations were higher in the female LSC than in the male LSC (Table 2). However, no sex difference was

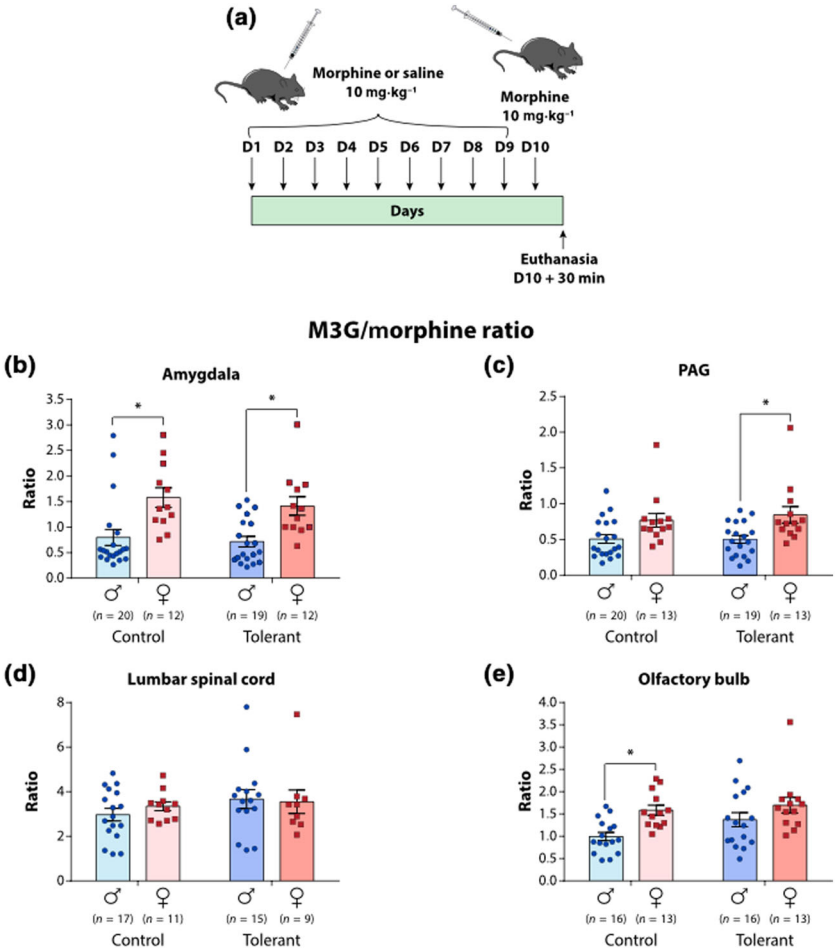


FIGURE 3 Levels of morphine and M3G in the different brain areas and LSC of male and female control and tolerant mice. (a) Protocol of induction of morphine antinociceptive tolerance across days 1 to 10 (D1–D10, 10 mg·kg^{-1} of morphine or saline i.p.). At day 10, brain areas and lumbar spinal cord were collected 30 min after the injection of morphine and, morphine and M3G were quantified by LC-MS/MS. M3G/morphine ratios found in (b) the amygdala, (c) PAG, (d) LSC and (e) OB. Data are expressed as means ± SEM; *n* are indicated in the figure. Two-way ANOVA was applied and followed by Tukey's multiple comparisons test only if *F* was significant and there was no variance homogeneity. The M3G/morphine ratio in the amygdala was analysed with the non-parametric approach ART ANOVA. Tukey's multiple comparisons results are reported as *, $P < 0.05$. Males are represented as blue circle dots and females as red square dots

TABLE 2 Levels of morphine and M3G found in the amygdala, the PAG, the LSC and the OB of male and female control and tolerant mice 30 min after an injection of 10 mg·kg^{-1} of morphine at day 10

	Morphine (pmol·mg^{-1} of protein)			
	Males CT	**Females CT**	**Males tolerant**	**Females tolerant**
Amygdala[a, b]	9.70 ± 1.01 ($n = 20$)	7.94 ± 0.41 ($n = 12$)	7.65 ± 0.63 ($n = 19$)	5.10 ± 0.51 ($n = 12$)
PAG[a]	10.26 ± 0.75 ($n = 20$)	6.76 ± 0.54[c] ($n = 13$)	9.43 ± 0.68 ($n = 20$)	5.28 ± 0.80[d] ($n = 13$)
LSC[a]	12.68 ± 1.31 ($n = 17$)	18.20 ± 1.17 ($n = 11$)	11.51 ± 1.54 ($n = 15$)	16.71 ± 4.06 ($n = 9$)
OB[a, b]	13.12 ± 2.28 ($n = 16$)	8.26 ± 0.37 ($n = 13$)	8.55 ± 0.50 ($n = 16$)	6.48 ± 1.04[d,e] ($n = 13$)
	M3G (pmol·mg^{-1} of protein)			
	Males CT	**Females CT**	**Males tolerant**	**Females tolerant**
Amygdala[a, b]	6.56 ± 0.94 ($n = 20$)	12.23 ± 1.41[c] ($n = 12$)	4.88 ± 0.62 ($n = 19$)	7.41 ± 1.37[e] ($n = 12$)
PAG	4.89 ± 0.65 ($n = 20$)	5.29 ± 0.84 ($n = 13$)	4.34 ± 0.48 ($n = 19$)	4.64 ± 1.15 ($n = 13$)
LSC[a]	34.87 ± 5.63 ($n = 17$)	59.71 ± 3.49[c] ($n = 11$)	36.76 ± 4.09 ($n = 15$)	49.59 ± 9.29 ($n = 9$)
OB[a]	15.64 ± 1.87 ($n = 16$)	13.04 ± 1.07 ($n = 13$)	13.67 ± 0.80 ($n = 16$)	9.59 ± 1.23 ($n = 13$)

Note: Data are expressed as mean ± SEM. *n* are indicated in the table. Two-way ANOVA was applied and followed by Tukey's multiple comparisons test only if *F* was significant and there was no variance homogeneity. Morphine and M3G in the OB were analysed with the non-parametric approach ART ANOVA.

[a]Sex, $P < 0.05$.

[b]Treatment, $P < 0.05$.

[c]Control males versus control females, $P < 0.05$.

[d]Tolerant males versus tolerant females, $P < 0.05$.

[e]Control females versus tolerant females, $P < 0.05$.

observed in the metabolic ratio in the LSC (Figure 3d). In addition, no significant difference was found in the LSC between control and tolerant mice.

3.3.4 | OB

Significantly lower levels of morphine and M3G were present in the OB of female mice compared to male mice (Table 2). The metabolic ratios were significantly lower in males than in females (Figure 3e). In addition, tolerant mice showed significantly lower levels of morphine than control mice in the OB. Moreover, a trend was observed for M3G in the same direction (Table 2). However, there was no effect of the treatment on the M3G/morphine metabolic ratio, although a trend was reported (Figure 3e).

Taken together, these results indicate sex differences in morphine and M3G levels, as well as in their metabolic ratio, in pain-related brain regions 30 min after the injection of morphine. However, the induction of morphine tolerance did not modify the metabolic ratio. These results suggest a limited effect of tolerance on the balance between morphine and M3G in the analysed regions. Furthermore, sex was not implicated in the differences between control and tolerant mice, as witnessed by the absence of any interactions between the two factors.

3.4 | Morphine and M3G brain/blood ratios

To investigate the origin of the differences in morphine and M3G levels and metabolic ratios in the different groups of mice, we determined whether these differences (i) are the consequence of the differences observed in peripheral metabolism, (ii) rely on differences in M3G BBB permeability, and/or (iii) are dependent on the central metabolism of morphine.

First, we established brain/blood ratios to investigate whether the differences in morphine and M3G concentrations found in the CNS regions were based on those found in the blood. The left and middle panels of Figure 4 illustrate the brain/blood ratios calculated for morphine and M3G following an i.p. injection of morphine. Statistical details are presented in Table S5.

3.4.1 | Amygdala

The analysis revealed no significant difference in morphine brain/blood ratios (Figure 4a). However, an interaction between sex and chronic morphine treatment was observed on the M3G brain/blood ratios in the amygdala (Figure 4b). Post hoc analysis indicated significantly higher M3G brain/blood ratios in female control mice than in male control mice, while significantly higher M3G brain/blood ratios were found between control and tolerant males. This last difference was observed only in males, resulting in the interaction.

3.4.2 | PAG

Moreover, significantly higher morphine (Figure 4d) and M3G (Figure 4e) brain/blood ratios were observed in the PAG of males compared to females. Unexpectedly, tolerant mice also tended to show higher morphine brain/blood ratios than control mice. However, this effect did not reach statistical significance (Figure 4d). In addition, no effect of chronic morphine treatment was observed on the M3G brain/blood ratios in the PAG (Figure 4e).

3.4.3 | LSC

Females showed higher morphine brain/blood ratios in the LSC than males (Figure 4g). Conversely, no difference was noticed in the M3G brain/blood ratios (Figure 4h). In addition, no effect of chronic treatment on the brain/blood ratios was observed in the LSC.

3.4.4 | OB

No sex difference was noticed in the morphine brain/blood ratios in the OB (Figure 4j), although males showed significantly higher M3G brain/blood ratios than females (Figure 4k). Furthermore, chronic treatment did not influence the morphine or M3G brain/blood ratios in the OB.

Overall, the M3G brain/blood ratios were 10-fold lower than those for morphine, suggesting that M3G is less BBB permeant than morphine, as already reported in the literature (Bickel et al., 1996; Xie et al., 1999).

Taken together, these results suggested that the sex differences in morphine and M3G levels observed in the CNS regions between males and females do not necessarily reflect the differences found in the blood. Morphine and/or M3G BBB permeability or central metabolism of morphine could be partially responsible for such differences. However, it appeared that chronic morphine treatment had a rather limited influence on the brain/blood ratios, suggesting that the differences in morphine and M3G levels observed in the CNS regions between control and tolerant mice might reflect those observed in the blood.

3.5 | M3G BBB permeability in males and females

As the main differences observed in the M3G brain/blood ratios differed by sex, we evaluated to what extent the BBB permeability for M3G differed between males and females. Different doses of M3G were injected into naïve male and female mice. Then, the levels of M3G were quantified in the blood and brain regions of interest. The M3G brain/blood ratios in each CNS structure as a function of the M3G blood concentrations after i.p. injections of increasing concentrations of M3G are illustrated in Figure 4c,f,i,l. Statistical details are presented in Table S6.

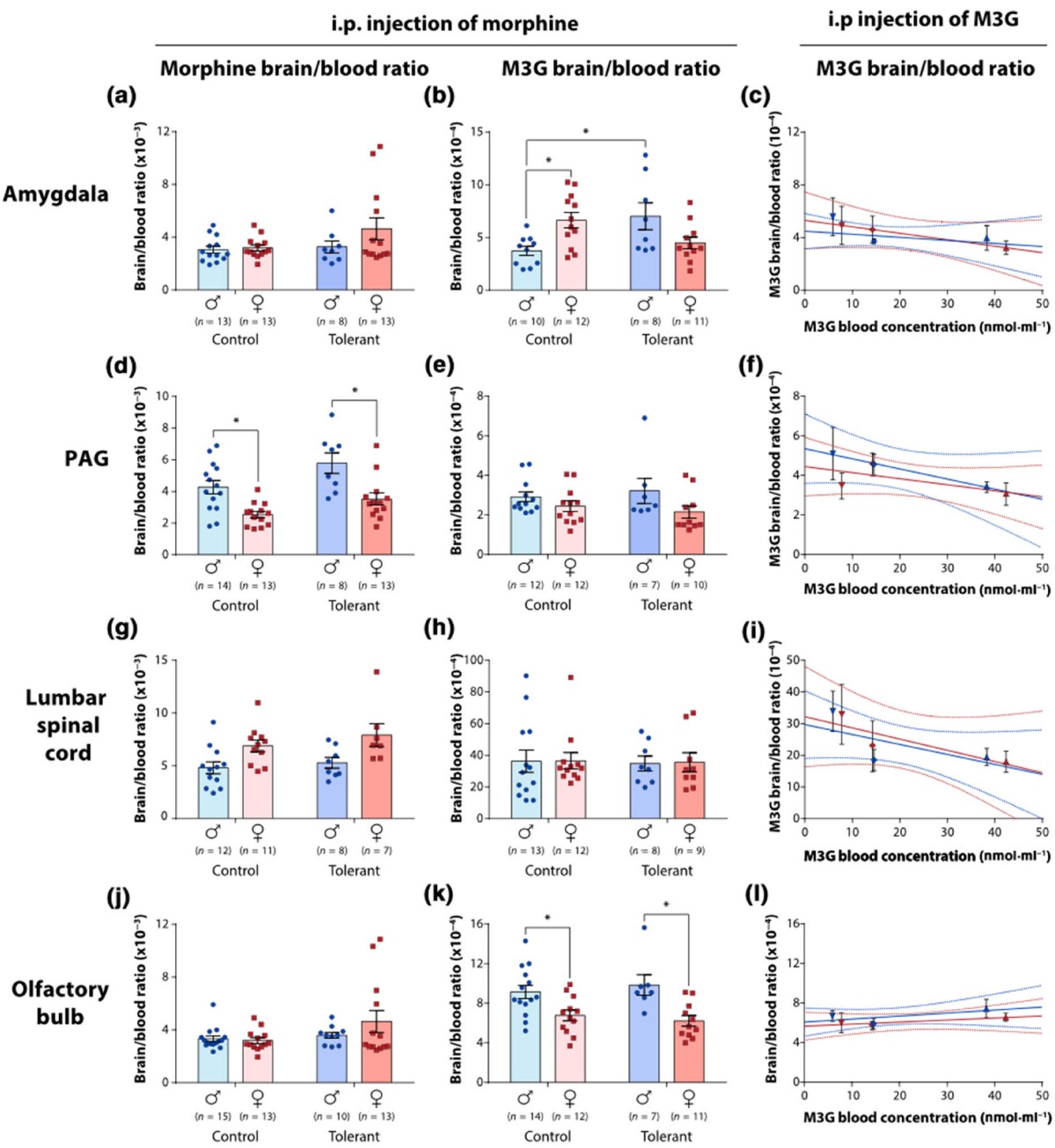


FIGURE 4 Brain/blood ratio of morphine and M3G in the different brain areas and lumbar spinal cord of male and female control and tolerant mice. Brain/blood ratio of (a) morphine and (b) M3G in the amygdala following an i.p. injection of morphine. (c) M3G brain/blood ratio obtained in the amygdala as a function of M3G blood concentration after i.p. injections of increasing concentrations of M3G. $n = 4$ for the injection of 10 mg·kg^{-1} of M3G in males and females, $n = 5$ for the other conditions. Brain/blood ratio of (d) morphine and (e) M3G in the PAG following an i.p. injection of morphine. (f) M3G brain/blood ratio obtained in the PAG as a function of M3G blood concentration after i.p. injections of increasing concentrations of M3G. $n = 3$ for the injection of 10 mg·kg^{-1} of M3G in females, $n = 5$ for the other conditions. Brain/blood ratio of (g) morphine and (h) M3G in the LSC following an i.p injection of morphine. (i) M3G brain/blood ratio obtained in the LSC as a function of M3G blood concentration after i.p. injections of increasing concentrations of M3G. $n = 4$ for the injection of 10 mg·kg^{-1} of M3G in males, $n = 5$ for the other conditions. Brain/blood ratio of (j) morphine and (k) M3G in the OB following an i.p injection of morphine. (l) M3G brain/blood ratio obtained in the OB as a function of M3G blood concentration after i.p. injections of increasing concentrations of M3G. $n = 4$ for the injection of 40 mg·kg^{-1} of M3G in males, $n = 5$ for the other conditions. Ratio values are displayed as $\times 10^3$ for morphine and $\times 10^4$ for M3G. M3G injected doses are depicted as (▼) 10 mg·kg^{-1}, (♦) 20 mg·kg^{-1} and (▲) 40 mg·kg^{-1} in blue for males and red for females. The blue and red lines represent linear curve fitting of the BBB permeability for M3G in males and females, respectively. 95% CI are represented as dotted-line with the appropriate colour. Data are expressed as means ± SEM; *n* are indicated in the figure. Two-way ANOVA was applied and followed by Tukey's multiple comparisons test only if *F* was significant and there was no variance homogeneity. The morphine and M3G brain/blood ratio in the PAG and the M3G brain/blood ratio in the LSC were analysed with the non-parametric approach ART ANOVA. Tukey's multiple comparisons results are reported as *, $P < 0.05$

As shown in Figure 4, there were no significant differences in M3G BBB permeability in any structure analysed when the M3G brain/blood ratios were plotted as a function of the M3G blood concentration in female and male mice (red and blue lines, respectively; Figure 4c,f,i,l). In addition, the BBB permeability of M3G seemed to be relatively linear with increasing doses of M3G (Figure S3).

3.6 | Central metabolism of morphine

We next hypothesized that the differences observed in M3G brain/blood ratios in the CNS regions relied on the central metabolism of morphine, which could differ between male and female mice. Hence, we evaluated whether the M3G brain/blood ratios found in each CNS region after injection of morphine (Figure 4b for amygdala, Figure 4e for PAG, Figure 4h for LSC and Figure 4k for OB) were different from those obtained after injection of M3G (Figure 4c for amygdala, Figure 4f for PAG, Figure 4i for LSC and Figure 4l for OB). As each mouse showed different concentrations of M3G in the blood, we performed linear regression analysis for the M3G brain/blood ratio as a function of the M3G blood concentrations observed following the injection of morphine. Then, for each CNS region, we compared the obtained regression fit with its associated M3G BBB permeability analysis to evaluate whether significant central metabolism exists and whether it is different between male and female mice. Statistical details are presented in Table S6.

As shown in Figure 4, based on the M3G concentrations found in the blood of each mouse, the M3G brain/blood ratios obtained in the amygdala after the injection of morphine were significantly higher than those obtained after the injection of M3G in female mice (Figure 4b,c) but not in male mice. In addition, it appeared that female mice displayed significantly higher M3G brain/blood ratios than male mice in this region. These results indicated that morphine was metabolised into M3G directly in the CNS and that such metabolism differed between male and female mice. In contrast, male mice showed significantly more robust central morphine metabolism in the OB than females (Figure 4k,l). However, the M3G brain/blood ratios reported in the PAG were unexpectedly low, and there were no differences in the LSC.

Taken together, these results suggested that morphine is metabolised within the CNS in vivo in key areas related to pain. In addition, sex differences were observed in the central metabolism of morphine, which may contribute to the behavioural differences observed in the antinociceptive effects of morphine between male and female mice.

4 | DISCUSSION

4.1 | Sex differences in morphine antinociceptive effects

The sex differences in morphine antinociceptive effects observed in our experiment were consistent with the ED_{50} values reported in the literature (Cicero et al., 1997; Craft et al., 1999; Doyle & Murphy, 2018). Most of the studies using rodents have shown that morphine elicits weaker antinociception in females, but the origin of this sex disparity remains controversial.

Indeed, sex differences have been observed in key pharmacodynamic processes involved in morphine antinociception. For instance, a higher expression of MORs in the PAG and locus coeruleus has been observed in male mice than in female mice (Guajardo et al., 2017; Loyd, Morgan, & Murphy, 2008). This differential expression in the PAG seems to be essential to elicit sex differences in morphine antinociception (Loyd, Wang, & Murphy, 2008). Sex differences in MOR splicing and trafficking have also been observed, although these mechanisms require further investigation in order to understand the extent to which they participate to sex differences in morphine antinociception (Enman et al., 2019; Liu et al., 2018). On the other hand, no or only minor sex differences have been observed in morphine binding affinity and MOR-mediated G protein activation (Kepler et al., 1991; Peckham et al., 2005; Selley et al., 2003). Concomitantly, other mechanisms have also been proposed, including organisational and activational differences (Cicero et al., 2002), functional differences in the recruited pain circuit (Loyd & Murphy, 2014), dimorphism in glial cell activation (Doyle et al., 2017) and a potential role for drug metabolism (Soldin & Mattison, 2009).

4.2 | Influence of sex on peripheral metabolism of morphine

The morphine and M3G concentrations found in the blood of control mice were consistent with the higher potency of morphine observed in male C57BL/6J mice (Kest et al., 1999). Female mice showed higher morphine metabolism, as witnessed by the two-fold higher M3G/morphine ratio observed at several time points. These results were consistent with the differences observed after intravenous (i.v.) injection (South et al., 2009). Interestingly, no difference in morphine glucuronidation by hepatic microsomes was observed between male and female rats (Rush et al., 1983). In addition, sex differences have previously been shown in the distribution of glucuronide metabolites (Bond et al., 1981). Taken together, it is possible that the distribution in the body and excretion of morphine and M3G differ between males and females, leading to higher concentrations of M3G in the blood of female mice. Although sex differences in mouse peripheral metabolism of morphine were observed in our experiment, Sarton et al. did not observe any sex differences in morphine, M3G and M6G levels in the plasma of healthy human volunteers (Sarton et al., 2000). These species differences are likely due to differences in UGT and/or transporter expression. Nevertheless, experiments performed mainly in rats have shown that differences in the M3G/morphine plasma ratio might play a role in the sex differences observed in morphine antinociception (Baker & Ratka, 2002; Craft, 2003; Smith & Smith, 1995).

4.3 | Sex differences in central metabolism of morphine in pain-related CNS regions

Sex differences in morphine antinociception might rely on the central metabolism of morphine. Indeed, in vitro studies have shown the capability of brain homogenates and glial cells to metabolise morphine into M3G in both rodents and humans (Wahlstrom et al., 1988; Yamada et al., 2003). In addition, UGTs involved in morphine metabolism are expressed in the brain of humans and rodents (Buckley & Klaassen, 2007; Kutsuno et al., 2015; Shelby et al., 2003). Several reports in humans have indirectly suggested the existence of morphine central metabolism (Goudas et al., 1999; Sandouk et al., 1991; Smith et al., 1999). Even though M3G displays low BBB permeability (Bickel et al., 1996), we showed here that higher levels of M3G were present in several CNS regions following peripheral injection of morphine compared with after peripheral injection of M3G, consistent with the data reported for the brains of guinea pigs (Murphey & Olsen, 1994).

Consequently, our results suggest that morphine metabolism occurs in some areas of the CNS in vivo. Interestingly, the M3G brain/blood ratios were higher in females than in males, at least in the amygdala, although no sex difference in M3G BBB permeability was observed. Furthermore, even though the M3G brain/blood ratios observed in the PAG after the injection of morphine were unexpectedly lower than those reported following the injection of M3G, it should be noted that the M3G half-life reported after the injection of M3G is approximately 30 min (Handal et al., 2002). In contrast, we reported a MRT for M3G between 45 min and 55 min following morphine injection. Therefore, the total amount of M3G present in the blood before quantification in the CNS regions is likely much higher after administration of M3G than after administration of morphine. Morphine glucuronides brain kinetics are delayed compared to those observed in the blood (Barjavel et al., 1994; Stain et al., 1995; Xie et al., 2000), and as we showed that the BBB permeability of M3G increases proportionally with its blood concentration, the central metabolism of morphine is probably underestimated in our experiment.

In agreement with these statements, the lower morphine levels found in the PAG and amygdala of female mice are consistent with their lower response to morphine in light of the role of these structures in morphine-induced antinociception (Jensen & Yaksh, 1986; McGaraughty & Heinricher, 2002). Moreover, several studies have described the neuroexcitatory and pronociceptive effects of M3G following intrathecal and intracerebroventricular injections (Bartlett et al., 1994; Lewis et al., 2010). Alternatively, Peckmann et al. reported a higher ED_{50} in female rats than in males for several opiates that produce 3-glucuronide metabolites (Peckham & Traynor, 2006). Hence, M3G and other 3-glucuronide metabolites might act as excitatory signals, and M3G levels found in the CNS might modulate morphine antinociception in mice. However, conflicting results have been reported suggesting no pronociceptive effects of M3G (Ouellet & Pollack, 1997; Penson et al., 2000; Swartjes et al., 2012). The M3G/morphine ratios were remarkably higher in the PAG and amygdala of female mice compared to male mice. It is worth noting that there were surprisingly no differences in the M3G/morphine ratios in the LSC. Importantly, the antinociceptive effect of morphine following s.c. injection in male rats has been correlated with the M3G/morphine ratio found in the cortical extracellular fluid in a microdialysis study (Barjavel et al., 1995).

Taken together, our results indicate that the metabolism of morphine occurs in the CNS in vivo and modulates morphine and M3G levels in some pain-related CNS regions. Therefore, it might modulate morphine antinociception. Importantly, this central metabolism is influenced by sex in C57BL/6J mice and might therefore participate in the sex differences in morphine antinociception. In the brain, the expression of UGT1A8 and UGT2B36, two enzymes involved in M3G production (Kurita et al., 2017; Stone et al., 2003), is higher in female than in male mice (Buckley & Klaassen, 2007). Interestingly, UGT expression has been shown to be modulated by sex hormones (Strasser et al., 1997), and both the **androgen receptor** and **oestrogen receptor α** modulate the expression of several UGT isoforms (Bao et al., 2008; Cho et al., 2016). Although morphine antinociception has been shown to be influenced by the oestrous cycle in females (Krzanowska & Bodnar, 1999; Loyd, Morgan, et al., 2008; Stoffel et al., 2003), several reports indicate the implication of the organisational rather than activational effects of steroid hormones in the sex differences observed in morphine antinociception (Cataldo et al., 2005; Cicero et al., 2002). Future studies will investigate whether sex hormones are involved in the sex differences observed in central metabolism of morphine and to what extent these differences contribute to the behavioural contrast observed in morphine antinociception.

It is worth noting that, in the PAG, lower morphine brain/blood ratio were observed in females than in males suggesting either sex differences in the BBB permeability of morphine or in the central metabolism of morphine. Morphine has been shown to be a substrate of **P-glycoprotein** which limits its distribution in the brain (Callaghan & Riordan, 1993; Hamabe et al., 2007). In addition, **multidrug resistance associated proteins** also have been shown to be involved in morphine transport in the brain (Su & Pasternak, 2013). Therefore, sex differences in these transporter expressions could also explain the differences observed in morphine quantities in the PAG between males and females (Soldin et al., 2011). It is however unlikely that sex differences in morphine BBB permeability or hepatic metabolism can fully explain the differences observed in morphine antinociception, considering that sex differences in response to morphine were observed following direct i.c.v. injections (Kest et al., 1999).

4.4 | Sex differences in antinociceptive tolerance to morphine

We observed significant sex differences in the development of antinociceptive tolerance to morphine. However, the rate at which the tolerance developed remained the same for males and females, as witnessed by the absence of differences in the Hill slope coefficients.

These results suggest that, in our paradigm, the sex disparities observed in the development of morphine tolerance might be due to the sex differences in the initial morphine effectiveness rather than to sex-specific mechanisms involved in the development of tolerance. Such findings are corroborated by a study in which sex differences in acute morphine potency were controlled during the assessment of tolerance (Barrett et al., 2001). Nonetheless, a sexual dimorphism in antinociceptive tolerance has been previously documented, although strong discrepancies exist in the literature (Craft et al., 1999; Kest et al., 2000). Importantly, in our experiments, sex differences in the Hill-slope coefficient might have been hidden as male mice reached the cut-off of the test for at least the first three days of the tolerance protocol. Indeed, if males were allowed to reach higher latencies, the Hill-slope coefficient could change.

4.5 | Peripheral metabolism during antinociceptive tolerance to morphine

We observed significant interactions at day 10 between sex and treatment in the maximal concentration, AUC, AUMC and clearance of morphine. However, there was no interaction in the reported parameters for M3G, the metabolic ratios obtained in the blood, or any condition tested in the CNS, except for the M3G brain/blood ratios in the amygdala. These results suggest that the rapid induction of antinociceptive tolerance in females might not be related to sex-specific mechanisms involving morphine metabolism into M3G.

We observed that tolerant mice had lower levels of morphine in the blood than control mice. The M3G/morphine ratios were increased in the blood of tolerant mice, suggesting that chronic morphine injections increased morphine metabolism. Interestingly, the mRNAs of metabolic enzymes implicated in **testosterone** metabolism are up-regulated in the liver following acute morphine administration (Aloisi et al., 2010). Therefore, morphine might directly or indirectly regulate metabolic enzyme and transporter expression, hence modulating its own metabolism, distribution and/or excretion. It is, however, unlikely that these differences in M3G metabolic pathway play a major role in morphine tolerance, as tolerant male mice show the same metabolic ratio as control females.

Interestingly, in rats, although the metabolism of morphine into M3G is predominant, a significant proportion of morphine is converted into **normorphine**, an antinociceptive metabolite, which is readily converted into normorphine-3-glucuronide described to possess pronociceptive effects (Evans & Shanahan, 1995; Lasagna & De Kornfeld, 1958; Smith & Smith, 1998). Therefore, it is possible that the morphine chronic treatment induces metabolic adaptations of this side pathway, resulting in an increase of morphine metabolism into normorphine that could participate in morphine tolerance (South et al., 2001). This hypothesis is supported by the increase of morphine clearance after morphine chronic treatment in females, although no differences was observed in any M3G pharmacokinetic parameters. Therefore, the apparent decrease in morphine levels in tolerant mice may result from metabolic adaptations in the normorphine pathway. Further investigation in which normorphine and normorphine-3-glucuronide are quantified is required.

4.6 | Central metabolism in pain-related CNS regions during antinociceptive tolerance to morphine

The quantification in the blood was consistent with the decreased levels of morphine observed in the amygdala and OB. However, morphine was still present and should have continued to produce an antinociceptive effect. Furthermore, M3G levels remained unchanged or even decreased in the region tested, eliminating a potential increase in its pronociceptive effect due to higher concentrations in the CNS. Finally, the M3G/morphine ratio in the analysed CNS regions did not differ between control and tolerant mice, excluding a potential role for central metabolism of morphine into M3G in morphine tolerance.

In contrast to these pharmacokinetic findings, pharmacodynamic processes have been shown to be involved in morphine tolerance. For instance, enhanced MOR desensitisation has been observed in the PAG and locus coeruleus after chronic administration of morphine (Dang & Williams, 2004; Ingram et al., 2008). In addition, impaired recovery from desensitisation has also been observed after chronic morphine exposure and was absent in β-arrestin-2 knockout animals (Connor et al., 2015; Quillinan et al., 2011), in agreement with behavioural studies suggesting the involvement of the **G protein-coupled receptor kinase** (GRK)-arrestin system in the tolerance phenomenon (Bohn et al., 2000, 2002). To what extent these mechanisms are involved in the sex differences observed in the antinociceptive tolerance to morphine remains to be investigated.

5 | CONCLUSION

In conclusion, our results showed sex differences in morphine antinociception, tolerance and metabolism in mice. Female mice displayed lower antinociception following the administration of morphine, consistent with (i) higher levels of M3G found in the blood and (ii) lower levels of morphine and greater levels of M3G found in some pain-related CNS regions. The differences observed in these regions were related to sex differences in the central metabolism of morphine.

In addition, morphine tolerance appeared earlier during the protocol in females, although this effect seemed to not be influenced by sex. Moreover, tolerant mice showed lower concentrations of morphine in the blood and higher M3G/morphine metabolic ratios. However, globally, no changes were observed in the CNS regions of tolerant mice.

All these data support that morphine hepatic and central metabolism are related to the observed sex differences in morphine antinociception in C57BL/6J mice, but their role in antinociceptive tolerance seems to be relatively limited.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), University of Strasbourg (Unistra) and French

Ministère Délégué à la Recherche et à l'Enseignement Supérieur (PhD fellowship to F.G., and V.H.). We thank Institut national de la santé et de la recherche (INSERM) to support this work. We thank the following research programs of excellence for their support: FHU Neurogenycs, French National Research Agency (ANR) through the Programme d'Investissement d'Avenir (contract ANR-17-EURE-0022, EURIDOL graduate school of pain).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Florian Gabel: Conceptualisation; methodology; investigation; writing – original draft; writing – review and editing. **Volodya Hovhannisyan**: Conceptualisation; methodology; investigation; writing – review and editing. **Virginie Andry**: Methodology; investigation. **Yannick Goumon**: Conceptualisation; methodology; writing – original draft; writing – review and editing; funding acquisition; resources; supervision.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

DECLARATION OF TRANSPARENCY AND SCIENTIFIC RIGOUR

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research as stated in the *BJP* guidelines for Design and Analysis, and Animal Experimentation, and as recommended by funding agencies, publishers and other organisations engaged with supporting research.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

ORCID

Florian Gabel https://orcid.org/0000-0003-1768-7067
Yannick Goumon https://orcid.org/0000-0003-4336-3437

REFERENCES

Alexander, S. P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Southan, C., Buneman, O. P., Cidlowski, J. A., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Fabbro, D., Spedding, M., Striessnig, J., Davies, J. A., Ahlers-Dannen, K. E., … Zolghadri, Y. (2021). The concise guide to pharmacology 2021/22: Introduction and other protein targets. *British Journal of Pharmacology*, *178*(Suppl 1), S1–S26. https://doi.org/10.1111/bph.15537

Aloisi, A. M., Ceccarelli, I., Fiorenzani, P., Maddalena, M., Rossi, A., Tomei, V., Sorda, G., Danielli, B., Rovini, M., Cappelli, A., Anzini, M., & Giordano, A. (2010). Aromatase and 5-alpha reductase gene expression: Modulation by pain and morphine treatment in male rats. *Molecular Pain*, *6*, 69. https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-69

Aubrun, F., Salvi, N., Coriat, P., & Riou, B. (2005). Sex- and age-related differences in morphine requirements for postoperative pain relief. *Anesthesiology*, *103*(1), 156–160. https://doi.org/10.1097/00000542-200507000-00023

Bai, L., Zhai, C., Han, K., Li, Z., Qian, J., Jing, Y., Zhang, W., & Xu, J. T. (2014). Toll-like receptor 4-mediated nuclear factor-kappaB activation in spinal cord contributes to chronic morphine-induced analgesic tolerance and hyperalgesia in rats. *Neuroscience Bulletin*, *30*(6), 936–948. https://doi.org/10.1007/s12264-014-1483-7

Baker, L., & Ratka, A. (2002). Sex-specific differences in levels of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine antinociception in rats. *Pain*, *95*(1–2), 65–74. https://doi.org/10.1016/s0304-3959(01)00376-1

Bao, B. Y., Chuang, B. F., Wang, Q., Sartor, O., Balk, S. P., Brown, M., Kantoff, P. W., & Lee, G. S. M. (2008). Androgen receptor mediates the expression of UDP-glucuronosyltransferase 2 B15 and B17 genes. *Prostate*, *68*(8), 839–848. https://doi.org/10.1002/pros.20749

Barjavel, M., Sandouk, P., Plotkine, M., & Scherrmann, J. M. (1994). Morphine and morphine metabolite kinetics in the rat brain as assessed by transcortical microdialysis. *Life Sciences*, *55*(16), 1301–1308. https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)90069-8

Barjavel, M. J., Scherrmann, J. M., & Bhargava, H. N. (1995). Relationship between morphine analgesia and cortical extracellular fluid levels of morphine and its metabolites in the rat: A microdialysis study. *British Journal of Pharmacology*, *116*(8), 3205–3210. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb15125.x

Barrett, A. C., Cook, C. D., Terner, J. M., Craft, R. M., & Picker, M. J. (2001). Importance of sex and relative efficacy at the mu opioid receptor in the development of tolerance and cross-tolerance to the antinociceptive effects of opioids. *Psychopharmacology*, *158*(2), 154–164. https://doi.org/10.1007/s002130100821

Bartlett, S. E., Cramond, T., & Smith, M. T. (1994). The excitatory effects of morphine-3-glucuronide are attenuated by LY274614, a competitive NMDA receptor antagonist, and by midazolam, an agonist at the benzodiazepine site on the GABAA receptor complex. *Life Sciences*, *54*(10), 687–694. https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00552-4

Bickel, U., Schumacher, O. P., Kang, Y. S., & Voigt, K. (1996). Poor permeability of morphine 3-glucuronide and morphine 6-glucuronide through the blood-brain barrier in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *278*(1), 107–113.

Blomqvist, K. J., Viisanen, H., Ahlstrom, F. H. G., Jokinen, V., Sidorova, Y. A., Suleymanova, I., Rauhala, P. V., Kalso, E. A., & Lilius, T. O. (2020). Morphine-3-glucuronide causes antinociceptive cross-tolerance to morphine and increases spinal substance P expression. *European Journal of Pharmacology*, *875*, 173021. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173021

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*(6813), 720–723. https://doi.org/10.1038/35047086

Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (2002). Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in (beta) arrestin-2 knock-out mice. *The Journal of Neuroscience*, *22*(23), 10494–10500.

Bond, J. A., Medinsky, M. A., Dent, J. G., & Rickert, D. E. (1981). Sex-dependent metabolism and biliary excretion of [2,4-14C] dinitrotoluene in isolated perfused rat livers. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *219*(3), 598–603.

Bryant, C. D., Eitan, S., Sinchak, K., Fanselow, M. S., & Evans, C. J. (2006). NMDA receptor antagonism disrupts the development of morphine analgesic tolerance in male, but not female C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *291*(2), R315–R326. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00831.2005

Buckley, D. B., & Klaassen, C. D. (2007). Tissue- and gender-specific mRNA expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in mice. *Drug Metabolism and Disposition*, *35*(1), 121–127. https://doi.org/10.1124/dmd.106.012070

Callaghan, R., & Riordan, J. R. (1993). Synthetic and natural opiates interact with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *The Journal of*

Biological Chemistry, *268*(21), 16059–16064. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)82357-2

Cataldo, G., Bernal, S., Markowitz, A., Ogawa, S., Ragnauth, A., Pfaff, D. W., & Bodnar, R. J. (2005). Organizational manipulation of gonadal hormones and systemic morphine analgesia in female rats: Effects of adult ovariectomy and estradiol replacement. *Brain Research*, *1059*(1), 13–19. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.08.003

Cepeda, M. S., & Carr, D. B. (2003). Women experience more pain and require more morphine than men to achieve a similar degree of analgesia. *Anesthesia and Analgesia*, *97*(5), 1464–1468. https://doi.org/10.1213/01.ane.0000080153.36643.83

Cepeda, M. S., Farrar, J. T., Baumgarten, M., Boston, R., Carr, D. B., & Strom, B. L. (2003). Side effects of opioids during short-term administration: Effect of age, gender, and race. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *74*(2), 102–112. https://doi.org/10.1016/S0009-9236(03)00152-8

Charan, J., & Kantharia, N. D. (2013). How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, *4*(4), 303–306. https://doi.org/10.4103/0976-500X.119726

Cho, S. J., Ning, M., Zhang, Y., Rubin, L. H., & Jeong, H. (2016). 17beta-estradiol up-regulates UDP-glucuronosyltransferase 1A9 expression via estrogen receptor alpha. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *6*(5), 504–509. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.04.005

Cicero, T. J., Nock, B., & Meyer, E. R. (1996). Gender-related differences in the antinociceptive properties of morphine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *279*(2), 767–773.

Cicero, T. J., Nock, B., & Meyer, E. R. (1997). Sex-related differences in morphine's antinociceptive activity: Relationship to serum and brain morphine concentrations. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *282*(2), 939–944.

Cicero, T. J., Nock, B., O'Connor, L., & Meyer, E. R. (2002). Role of steroids in sex differences in morphine-induced analgesia: Activational and organizational effects. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *300*(2), 695–701. https://doi.org/10.1124/jpet.300.2.695

Comer, S. D., Cooper, Z. D., Kowalczyk, W. J., Sullivan, M. A., Evans, S. M., Bisaga, A. M., & Vosburg, S. K. (2010). Evaluation of potential sex differences in the subjective and analgesic effects of morphine in normal, healthy volunteers. *Psychopharmacology*, *208*(1), 45–55. https://doi.org/10.1007/s00213-009-1703-4

Connor, M., Bagley, E. E., Chieng, B. C., & Christie, M. J. (2015). Beta-Arrestin-2 knockout prevents development of cellular mu-opioid receptor tolerance but does not affect opioid-withdrawal-related adaptations in single PAG neurons. *British Journal of Pharmacology*, *172*(2), 492–500. https://doi.org/10.1111/bph.12673

Craft, R. M. (2003). Sex differences in opioid analgesia: "From mouse to man". *The Clinical Journal of Pain*, *19*(3), 175–186. https://doi.org/10.1097/00002508-200305000-00005

Craft, R. M., Stratmann, J. A., Bartok, R. E., Walpole, T. I., & King, S. J. (1999). Sex differences in development of morphine tolerance and dependence in the rat. *Psychopharmacology*, *143*(1), 1–7. https://doi.org/10.1007/s002130050911

Curtis, M. J., Alexander, S., Cirino, G., Docherty, J. R., George, C. H., Giembycz, M. A., Hoyer, D., Insel, P. A., Izzo, A. A., Ji, Y., MacEwan, D. J., Sobey, C. G., Stanford, S. C., Teixeira, M. M., Wonnacott, S., & Ahluwalia, A. (2018). Experimental design and analysis and their reporting II: Updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *British Journal of Pharmacology*, *175*(7), 987–993. https://doi.org/10.1111/bph.14153

Dang, V. C., & Williams, J. T. (2004). Chronic morphine treatment reduces recovery from opioid desensitization. *The Journal of Neuroscience*, *24*(35), 7699–7706. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2499-04.2004

Doyle, H. H., Eidson, L. N., Sinkiewicz, D. M., & Murphy, A. Z. (2017). Sex differences in microglia activity within the periaqueductal gray of the rat: A potential mechanism driving the dimorphic effects of morphine. *The Journal of Neuroscience*, *37*(12), 3202–3214. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2906-16.2017

Doyle, H. H., & Murphy, A. Z. (2018). Sex-dependent influences of morphine and its metabolites on pain sensitivity in the rat. *Physiology & Behavior*, *187*, 32–41. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.11.030

Due, M. R., Piekarz, A. D., Wilson, N., Feldman, P., Ripsch, M. S., Chavez, S., Yin, H., Khanna, R., & White, F. A. (2012). Neuroexcitatory effects of morphine-3-glucuronide are dependent on toll-like receptor 4 signaling. *Journal of Neuroinflammation*, *9*, 200. https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-200

Eidson, L. N., Inoue, K., Young, L. J., Tansey, M. G., & Murphy, A. Z. (2017). Toll-like receptor 4 mediates morphine-induced neuroinflammation and tolerance via soluble tumor necrosis factor signaling. *Neuropsychopharmacology*, *42*(3), 661–670. https://doi.org/10.1038/npp.2016.131

Enman, N. M., Reyes, B. A. S., Shi, Y., Valentino, R. J., & Van Bockstaele, E. J. (2019). Sex differences in morphine-induced trafficking of mu-opioid and corticotropin-releasing factor receptors in locus coeruleus neurons. *Brain Research*, *1706*, 75–85. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.11.001

Evans, A. M., & Shanahan, K. (1995). The disposition of morphine and its metabolites in the in-situ rat isolated perfused liver. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *47*(4), 333–339. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1995.tb05805.x

Fields, H. (2004). State-dependent opioid control of pain. *Nature Reviews. Neuroscience*, *5*(7), 565–575. https://doi.org/10.1038/nrn1431

Fullerton, E. F., Doyle, H. H., & Murphy, A. Z. (2018). Impact of sex on pain and opioid analgesia: A review. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *23*, 183–190. https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.08.001

Glaum, S. R., Miller, R. J., & Hammond, D. L. (1994). Inhibitory actions of delta 1-, delta 2-, and mu-opioid receptor agonists on excitatory transmission in lamina II neurons of adult rat spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, *14*(8), 4965–4971. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-08-04965.1994

Goudas, L. C., Langlade, A., Serrie, A., Matson, W., Milbury, P., Thurel, C., Sandouk, P., & Carr, D. B. (1999). Acute decreases in cerebrospinal fluid glutathione levels after intracerebroventricular morphine for cancer pain. *Anesthesia and Analgesia*, *89*(5), 1209–1215. https://doi.org/10.1213/00000539-199911000-00023

Guajardo, H. M., Snyder, K., Ho, A., & Valentino, R. J. (2017). Sex differences in mu-opioid receptor regulation of the rat locus coeruleus and their cognitive consequences. *Neuropsychopharmacology*, *42*(6), 1295–1304. https://doi.org/10.1038/npp.2016.252

Hamabe, W., Maeda, T., Kiguchi, N., Yamamoto, C., Tokuyama, S., & Kishioka, S. (2007). Negative relationship between morphine analgesia and P-glycoprotein expression levels in the brain. *Journal of Pharmacological Sciences*, *105*(4), 353–360. https://doi.org/10.1254/jphs.FP0071287

Handal, M., Grung, M., Skurtveit, S., Ripel, A., & Morland, J. (2002). Pharmacokinetic differences of morphine and morphine-glucuronides are reflected in locomotor activity. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *73*(4), 883–892. https://doi.org/10.1016/s0091-3057(02)00925-5

Heydel, J. M., Holsztynska, E. J., Legendre, A., Thiebaud, N., Artur, Y., & Le Bon, A. M. (2010). UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in neuro-olfactory tissues: Expression, regulation, and function. *Drug Metabolism Reviews*, *42*(1), 74–97. https://doi.org/10.3109/03602530903208363

Ho, Y. S., Liu, R. H., Nichols, A. W., & Kumar, S. D. (1990). Isotopic analog as the internal standard for quantitative-determination—Evaluation of mass-spectra of commonly abused drugs and their deuterated analogs. *Journal of Forensic Sciences*, *35*(1), 123–132. https://doi.org/10.1520/JFS12809J

Ingram, S. L., Macey, T. A., Fossum, E. N., & Morgan, M. M. (2008). Tolerance to repeated morphine administration is associated with increased potency of opioid agonists. *Neuropsychopharmacology*, *33*(10), 2494–2504. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301634

Jensen, T. S., & Yaksh, T. L. (1986). Comparison of antinociceptive action of morphine in the periaqueductal gray, medial and paramedial medulla in rat. *Brain Research*, *363*(1), 99–113. https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90662-1

Kepler, K. L., Standifer, K. M., Paul, D., Kest, B., Pasternak, G. W., & Bodnar, R. J. (1991). Gender effects and central opioid analgesia. *Pain*, *45*(1), 87–94. https://doi.org/10.1016/0304-3959(91)90168-W

Kest, B., Sarton, E., & Dahan, A. (2000). Gender differences in opioid-mediated analgesia: Animal and human studies. *Anesthesiology*, *93*(2), 539–547. https://doi.org/10.1097/00000542-200008000-00034

Kest, B., Wilson, S. G., & Mogil, J. S. (1999). Sex differences in supraspinal morphine analgesia are dependent on genotype. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *289*(3), 1370–1375.

Krzanowska, E. K., & Bodnar, R. J. (1999). Morphine antinociception elicited from the ventrolateral periaqueductal gray is sensitive to sex and gonadectomy differences in rats. *Brain Research*, *821*(1), 224–230. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)01364-x

Kurita, A., Miyauchi, Y., Ikushiro, S. I., Mackenzie, P. I., Yamada, H., & Ishii, Y. (2017). Comprehensive characterization of mouse UDP-glucuronosyltransferase (Ugt) belonging to the Ugt2b subfamily: Identification of Ugt2b36 as the predominant isoform involved in morphine Glucuronidation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *361*(2), 199–208. https://doi.org/10.1124/jpet.117.240382

Kutsuno, Y., Hirashima, R., Sakamoto, M., Ushikubo, H., Michimae, H., Itoh, T., Tukey, R. H., & Fujiwara, R. (2015). Expression of UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1) and glucuronidation activity toward endogenous substances in humanized UGT1 mouse brain. *Drug Metabolism and Disposition*, *43*(7), 1071–1076. https://doi.org/10.1124/dmd.115.063719

Lasagna, L., & De Kornfeld, T. J. (1958). Analgesic potency of normorphine in patients with postoperative pain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *124*(3), 260–263.

Laux-Biehlmann, A., Mouheiche, J., Veriepe, J., & Goumon, Y. (2013). Endogenous morphine and its metabolites in mammals: History, synthesis, localization and perspectives. *Neuroscience*, *233*, 95–117. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.013

Lewis, S. S., Hutchinson, M. R., Rezvani, N., Loram, L. C., Zhang, Y., Maier, S. F., Rice, K. C., & Watkins, L. R. (2010). Evidence that intrathecal morphine-3-glucuronide may cause pain enhancement via toll-like receptor 4/MD-2 and interleukin-1beta. *Neuroscience*, *165*(2), 569–583. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.011

Lilley, E., Stanford, S. C., Kendall, D. E., Alexander, S. P., Cirino, G., Docherty, J. R., George, C. H., Insel, P. A., Izzo, A. A., Ji, Y., Panettieri, R. A., Sobey, C. G., Stefanska, B., Stephens, G., Teixeira, M., & Ahluwalia, A. (2020). ARRIVE 2.0 and the *British Journal of Pharmacology*: Updated guidance for 2020. *British Journal of Pharmacology*, *177*, 3611–3616. https://doi.org/10.1111/bph.15178

Liu, A., Zhang, H., Qin, F., Wang, Q., Sun, Q., Xie, S., Wang, Q., Tang, Z., & Lu, Z. (2018). Sex associated differential expressions of the alternatively spliced variants mRNA of OPRM1 in brain regions of C57BL/6 mouse. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *50*(4), 1441–1459. https://doi.org/10.1159/000494644

Lotsch, J., & Geisslinger, G. (2001). Morphine-6-glucuronide: An analgesic of the future? *Clinical Pharmacokinetics*, *40*(7), 485–499. https://doi.org/10.2165/00003088-200140070-00001

Loyd, D. R., Morgan, M. M., & Murphy, A. Z. (2008). Sexually dimorphic activation of the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary circuit during the development of tolerance to morphine in the rat. *The European Journal of Neuroscience*, *27*(6), 1517–1524. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06100.x

Loyd, D. R., & Murphy, A. Z. (2014). The neuroanatomy of sexual dimorphism in opioid analgesia. *Experimental Neurology*, *259*, 57–63. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.04.004

Loyd, D. R., Wang, X., & Murphy, A. Z. (2008). Sex differences in micro-opioid receptor expression in the rat midbrain periaqueductal gray are essential for eliciting sex differences in morphine analgesia. *The Journal of Neuroscience*, *28*(52), 14007–14017. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4123-08.2008

Mattioli, T. A., Leduc-Pessah, H., Skelhorne-Gross, G., Nicol, C. J., Milne, B., Trang, T., & Cahill, C. M. (2014). Toll-like receptor 4 mutant and null mice retain morphine-induced tolerance, hyperalgesia, and physical dependence. *PLoS ONE*, *9*(5), e97361. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097361

McGaraughty, S., & Heinricher, M. M. (2002). Microinjection of morphine into various amygdaloid nuclei differentially affects nociceptive responsiveness and RVM neuronal activity. *Pain*, *96*(1–2), 153–162. https://doi.org/10.1016/s0304-3959(01)00440-7

Mogil, J. S. (2012). Sex differences in pain and pain inhibition: Multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nature Reviews. Neuroscience*, *13*(12), 859–866. https://doi.org/10.1038/nrn3360

Mogil, J. S. (2020). Qualitative sex differences in pain processing: Emerging evidence of a biased literature. *Nature Reviews. Neuroscience*, *21*(7), 353–365. https://doi.org/10.1038/s41583-020-0310-6

Murphey, L. J., & Olsen, G. D. (1994). Diffusion of morphine-6-beta-D-glucuronide into the neonatal Guinea pig brain during drug-induced respiratory depression. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *271*(1), 118–124.

Ouellet, D. M., & Pollack, G. M. (1997). Effect of prior morphine-3-glucuronide exposure on morphine disposition and antinociception. *Biochemical Pharmacology*, *53*(10), 1451–1457. https://doi.org/10.1016/s0006-2952(97)00086-5

Ouzzine, M., Gulberti, S., Ramalanjaona, N., Magdalou, J., & Fournel-Gigleux, S. (2014). The UDP-glucuronosyltransferases of the blood-brain barrier: Their role in drug metabolism and detoxication. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 349. https://doi.org/10.3389/Fncel.2014.00349

Paller, C. J., Campbell, C. M., Edwards, R. R., & Dobs, A. S. (2009). Sex-based differences in pain perception and treatment. *Pain Medicine*, *10*(2), 289–299. https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2008.00558.x

Peckham, E. M., Barkley, L. M., Divin, M. F., Cicero, T. J., & Traynor, J. R. (2005). Comparison of the antinociceptive effect of acute morphine in female and male Sprague-Dawley rats using the long-lasting mu-antagonist methocinnamox. *Brain Research*, *1058*(1–2), 137–147. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.07.060

Peckham, E. M., & Traynor, J. R. (2006). Comparison of the antinociceptive response to morphine and morphine-like compounds in male and female Sprague-Dawley rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *316*(3), 1195–1201. https://doi.org/10.1124/jpet.105.094276

Penson, R. T., Joel, S. P., Bakhshi, K., Clark, S. J., Langford, R. M., & Slevin, M. L. (2000). Randomized placebo-controlled trial of the activity of the morphine glucuronides. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *68*(6), 667–676. https://doi.org/10.1067/mcp.2000.111934

Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., … Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, *18*(7), e3000410. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410

Quillinan, N., Lau, E. K., Virk, M., von Zastrow, M., & Williams, J. T. (2011). Recovery from mu-opioid receptor desensitization after chronic treatment with morphine and methadone. *The Journal of Neuroscience*, *31*(12), 4434–4443. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4874-10.2011

Richner, M., Jager, S. B., Siupka, P., & Vaegter, C. B. (2017). Hydraulic extrusion of the spinal cord and isolation of dorsal root ganglia in rodents. *Journal of Vision Experiment*, *119*, e55226. https://doi.org/10.3791/55226

Roeckel, L. A., Utard, V., Reiss, D., Mouheiche, J., Maurin, H., Robe, A., Audouard, E., Wood, J. N., Goumon, Y., Simonin, F., & Gaveriaux-Ruff, C. (2017). Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. *Scientific Reports*, *7*(1), 10406. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11120-4

Rush, G. F., Newton, J. F., & Hook, J. B. (1983). Sex differences in the excretion of glucuronide conjugates: The role of intrarenal glucuronidation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *227*(3), 658–662.

Sandouk, P., Serrie, A., Scherrmann, J. M., Langlade, A., & Bourre, J. M. (1991). Presence of morphine metabolites in human cerebrospinal fluid after intracerebroventricular administration of morphine. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, *3*, 166–171.

Sarton, E., Olofsen, E., Romberg, R., den Hartigh, J., Kest, B., Nieuwenhuijs, D., Burm, A., Teppema, L., & Dahan, A. (2000). Sex differences in morphine analgesia: An experimental study in healthy volunteers. *Anesthesiology*, *93*(5), 1245–1254. discussion 1246A. https://doi.org/10.1097/00000542-200011000-00018

Selley, D. E., Herbert, J. T., Morgan, D., Cook, C. D., Picker, M. J., & Sim-Selley, L. J. (2003). Effect of strain and sex on mu opioid receptor-mediated G-protein activation in rat brain. *Brain Research Bulletin*, *60*(3), 201–208. https://doi.org/10.1016/s0361-9230(03)00014-5

Shelby, M. K., Cherrington, N. J., Vansell, N. R., & Klaassen, C. D. (2003). Tissue mRNA expression of the rat UDP-glucuronosyltransferase gene family. *Drug Metabolism and Disposition*, *31*(3), 326–333. https://doi.org/10.1124/dmd.31.3.326

Smith, G. D., & Smith, M. T. (1995). Morphine-3-glucuronide: Evidence to support its putative role in the development of tolerance to the antinociceptive effects of morphine in the rat. *Pain*, *62*(1), 51–60. https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)00228-7

Smith, G. D., & Smith, M. T. (1998). The excitatory behavioral and antianalgesic pharmacology of normorphine-3-glucuronide after intracerebroventricular administration to rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *285*(3), 1157–1162.

Smith, M. T., Watt, J. A., & Cramond, T. (1990). Morphine-3-glucuronide—A potent antagonist of morphine analgesia. *Life Sciences*, *47*(6), 579–585. https://doi.org/10.1016/0024-3205(90)90619-3

Smith, M. T., Wright, A. W., Williams, B. E., Stuart, G., & Cramond, T. (1999). Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine-6-glucuronide in patients before and after initiation of intracerebroventricular morphine for cancer pain management. *Anesthesia and Analgesia*, *88*(1), 109–116. https://doi.org/10.1213/00000539-199901000-00021

Soldin, O. P., Chung, S. H., & Mattison, D. R. (2011). Sex differences in drug disposition. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, *2011*, 187103. https://doi.org/10.1155/2011/187103

Soldin, O. P., & Mattison, D. R. (2009). Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clinical Pharmacokinetics*, *48*(3), 143–157. https://doi.org/10.2165/00003088-200948030-00001

South, S. M., Edwards, S. R., & Smith, M. T. (2009). Antinociception versus serum concentration relationships following acute administration of intravenous morphine in male and female Sprague-Dawley rats: Differences between the tail flick and hot plate nociceptive tests. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, *36*(1), 20–28. https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05019.x

South, S. M., Wright, A. W., Lau, M., Mather, L. E., & Smith, M. T. (2001). Sex-related differences in antinociception and tolerance development following chronic intravenous infusion of morphine in the rat: Modulatory role of testosterone via morphine clearance. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *297*(1), 446–457.

Stain, F., Barjavel, M. J., Sandouk, P., Plotkine, M., Scherrmann, J. M., & Bhargava, H. N. (1995). Analgesic response and plasma and brain extracellular fluid pharmacokinetics of morphine and morphine-6-beta-D-glucuronide in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *274*(2), 852–857.

Stoffel, E. C., Ulibarri, C. M., & Craft, R. M. (2003). Gonadal steroid hormone modulation of nociception, morphine antinociception and reproductive indices in male and female rats. *Pain*, *103*(3), 285–302. https://doi.org/10.1016/s0304-3959(02)00457-8

Stone, A. N., Mackenzie, P. I., Galetin, A., Houston, J. B., & Miners, J. O. (2003). Isoform selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human UDP-glucuronosyltransferases: Evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7. *Drug Metabolism and Disposition*, *31*(9), 1086–1089. https://doi.org/10.1124/dmd.31.9.1086

Strasser, S. I., Smid, S. A., Mashford, M. L., & Desmond, P. V. (1997). Sex hormones differentially regulate isoforms of UDP-glucuronosyltransferase. *Pharmaceutical Research*, *14*(9), 1115–1121. https://doi.org/10.1023/a:1012130118186

Su, W., & Pasternak, G. W. (2013). The role of multidrug resistance-associated protein in the blood-brain barrier and opioid analgesia. *Synapse*, *67*(9), 609–619. https://doi.org/10.1002/syn.21667

Swartjes, M., Mooren, R. A. G., Waxman, A. R., Arout, C., van de Wetering, K., den Hartigh, J., Beijnen, J. H., Kest, B., & Dahan, A. (2012). Morphine induces hyperalgesia without involvement of mu-opioid receptor or Morphine-3-glucuronide. *Molecular Medicine*, *18*(9), 1320–1326. https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00244

Trescot, A. M., Datta, S., Lee, M., & Hansen, H. (2008). Opioid pharmacology. *Pain Physician*, *11*(2 Suppl), S133–S153. https://doi.org/10.36076/ppj.2008/11/S133

Wahlstrom, A., Winblad, B., Bixo, M., & Rane, A. (1988). Human brain metabolism of morphine and naloxone. *Pain*, *35*(2), 121–127. https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90219-9

Weinsanto, I., Laux-Biehlmann, A., Mouheiche, J., Maduna, T., Delalande, F., Chavant, V., Gabel, F., Darbon, P., Charlet, A., Poisbeau, P., Lamshöft, M., van Dorsselaer, A., Cianferani, S., Parat, M. O., & Goumon, Y. (2018). Stable isotope-labelled morphine to study in vivo central and peripheral morphine glucuronidation and brain transport in tolerant mice. *British Journal of Pharmacology*, *175*(19), 3844–3856. https://doi.org/10.1111/bph.14454

Williams, J. T., Ingram, S. L., Henderson, G., Chavkin, C., von Zastrow, M., Schulz, S., Koch, T., Evans, C. J., & Christie, M. D. J. (2013). Regulation of mu-opioid receptors: Desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacological Reviews*, *65*(1), 223–254. https://doi.org/10.1124/pr.112.005942

Wobbrock, J. O., Findlater, L., Gergle, D., & Higgins, J. J. (2011). The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only anova procedures. Proceedings of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems, 143–146. https://doi.org/10.1145/1978942.1978963

Xie, R., Bouw, M. R., & Hammarlund-Udenaes, M. (2000). Modelling of the blood-brain barrier transport of morphine-3-glucuronide studied using microdialysis in the rat: Involvement of probenecid-sensitive transport. *British Journal of Pharmacology*, *131*(8), 1784–1792. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703759

Xie, R., Hammarlund-Udenaes, M., de Boer, A. G., & de Lange, E. C. (1999). The role of P-glycoprotein in blood-brain barrier transport of morphine: Transcortical microdialysis studies in mdr1a (−/−) and mdr1a (+/+) mice. *British Journal of Pharmacology*, *128*(3), 563–568. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702804

Yamada, H., Ishii, K., Ishii, Y., Ieiri, I., Nishio, S., Morioka, T., & Oguri, K. (2003). Formation of highly analgesic morphine-6-glucuronide following physiologic concentration of morphine in human brain. *The Journal*

of Toxicological Sciences, *28*(5), 395–401. https://doi.org/10.2131/jts.28.395

Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., & Xie, S. (2010). PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft excel. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, *99*(3), 306–314. https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.01.007

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Gabel, F., Hovhannisyan, V., Andry, V., & Goumon, Y. (2022). Central metabolism as a potential origin of sex differences in morphine antinociception but not induction of antinociceptive tolerance in mice. *British Journal of Pharmacology*, 1–19. https://doi.org/10.1111/bph.15792

Publication 3: Différences de sexe de l'effet anti-nociceptif et du métabolisme de la codéine

De la même manière que la morphine, nous avons étudié le lien entre les différences de sexe de l'effet anti-nociceptif de la codéine avec son métabolisme périphérique et central Cet article est actuellement en révision dans le journal *Biology of Sex Differences*.

Sex differences in the anti-nociceptive effect of codeine and its peripheral but not central metabolism.

Abbreviated title: codeine-induced anti-nociception and metabolism are influenced by sex.

Volodya Hovhannisyan[1#], Abdel-Karim Berkati[1#], Florian Gabel[1]

Virginie Andry[1,2] & Yannick Goumon[1,2*]

[1] CNRS UPR3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique and University of Strasbourg, Strasbourg, France.

[2] SMPMS-INCI, Mass Spectrometry Facilities of the CNRS UPR3212, CNRS UPR3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique and University of Strasbourg, Strasbourg, France.

# Contributed equally.

* To whom correspondence should be addressed: Dr Yannick Goumon, CNRS UPR3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives; 8 Allée du Général Rouvillois, F-67000 Strasbourg, France, phone : (33)-3-88-45-67-18; E-mail: ygoumon@unistra.fr

ABBREVIATIONS

ACN, acetonitrile; AMY, amygdale; AUC, area under the curve; CID, collision gas; CNS, central nervous system; CYP, cytochrome p450; C6G, codeine-6-glucuronide; ED50, half-maximal effective dose; FA, formic acid; GIRK, inward rectifying potassium channels; GPCR, G proteine-coupled receptor; IS, internal standard; LC-MS/MS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; LSC, lumbar spinal cord; MOR, mu-opioid receptor; MPE, maximal possible effect; MRM, multiple reaction monitoring mode; M3G, morphine-3-glucuronide; M6G, morphine-6-glucuronide; PAG, periaqueductal gray; SPE, solid phase extraction; TIT, tail immersion test; UGT, UDP-glucuronosyl-transferase.

ABSTRACT

Background- Codeine is a natural opiate extracted from opium poppy (Papaver somniferum) and used to alleviate mild to moderate pain. The analgesic effect of this molecule results from its metabolism into morphine which is an agonist of the mu opioid receptor. The fact that morphine analgesia, generated from codeine metabolism, relies not only on the activation of peripheral but also central mu opioid receptors means that codeine metabolism is important both at the periphery and in the central nervous system. Finally, other metabolites such as morphine-3-glucuronide or codeine-6-glucuronide were both shown to be biologically active. Morphine-3-glucuronide was shown to induce both thermal and mechanical hypersensitivies while codeine-6-glucuronide has been proposed to be analgesic.

Methods- Male and female mice were treated with codeine (10 mg/kg) and thermal hypersensitivity was assessed 30 minutes after injection using the Tail Immersion Test (TIT). Moreover, both peripheral and central metabolism of codeine were evaluated respectively in the blood or pain-related brain structures in the central nervous system. The amounts of

codeine and its metabolites were quantified using the isotopic dilution method by liquid chromatography coupled to a mass spectrometer.

Results- Codeine induces a greater anti-nociceptive effect in males than females mice. Moreover, major sex differences were found in the peripheral metabolism of this molecule, with higher amounts of pro-algesic morphine-3-glucuronide and less anti-nociceptive codeine-6-glucuronide in females than in males. Concerning the central metabolism of codeine, we did not find significant sex differences in pain-related brain structures.

Conclusions- Collectively, these findings support a greater codeine anti-nociceptive effect in males than females in mice. These sex differences could be influenced by a higher peripheral metabolism of this molecule in female mice rather than rely on central metabolism.

PLAIN ENGLISH SUMMARY

Although sex differences in the perception of painful stimuli have been extensively described in animal rodent models and humans, pain-relief treatments are seldom adapted based on sex or gender. Opiates, such as codeine and morphine, are the gold-standard pain relievers widely used in clinics to treat pain ranging from mild to severe. It has been observed that women require 30% more morphine than men to achieve the same analgesic effect, with several mechanisms, including metabolism (i.e., degradation), proposed to explain these differences. However, few studies have explored whether this phenomenon also applies to codeine. As a pro-drug, codeine must be metabolized into morphine to exert its analgesic effects. In our study, we demonstrate a more pronounced analgesic effect of codeine in male compared to female mice. Examining the peripheral metabolism of codeine, we uncovered significant differences between males and females, while the central metabolism of the drug remained unchanged. Our

findings underscore the necessity of considering sex differences in opiate use, particularly codeine, for pain treatment in clinical settings.

HIGHLIGHTS

- Codeine generates greater anti-nociceptive effect in male mice.
- In periphery, codeine is highly metabolised into pro-algesic M3G in female mice.
- In periphery, codeine can be metabolised into anti-nociceptive C6G.
- Male mice display two times higher C6G at the periphery.
- No sex-differences in codeine metabolism in the CNS.

INTRODUCTION

The fight against pain is a major social issue. Among painkillers used to treat mild to moderate pain, codeine (or 3-methylmorphine) is widely used despite several side effects including nausea, constipation and addiction [1, 2]. Codeine is an alkaloid extracted from poppy latex considered as a grade II analgesic drug by the World Health Organization.

Codeine has no direct analgesic effect due to its weak affinity for the μ opioid receptor [3] (MOR). Indeed, codeine metabolism follows a complex pattern resulting in active and inactive metabolites [4, 5] (**Figure 1**). In humans, UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7; phase II metabolism) forms codeine-6-glucuronide (C6G), the major codeine metabolite (50-70%) [6]. In addition, up to 10% of codeine is O-demethylated into morphine by the cytochrome p450 2D6 (CYP2D6; phase I metabolism; **Figure 1**). Additional metabolites, including norcodeine and normorphine, are also found as trace compounds [7].

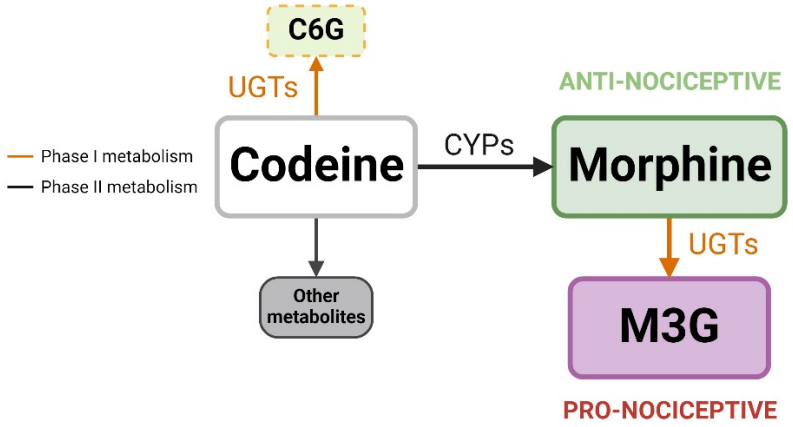


Figure 1: Simplified codeine metabolism in mice

CYPs metabolize codeine into morphine. Morphine is mainly converted into pro-nociceptive M3G by UGTs. Other metabolites include C6G and norcodeine as traces, whereas M6G is not produced.

As codeine, C6G displays a very weak affinity for opioid receptors [8, 9]. However, only one research group has reported that C6G might be responsible for codeine anti-nociception in rats [10]. Morphine is thought thoroughly responsible for the analgesic properties of codeine as it binds to the MORs and induces analgesia [11, 12]. Morphine binds to MORs located on nociceptors and neurons of the central nervous system (CNS), more particularly in areas related to pain such as the lumbar spinal cord (LSC), periaqueductal gray (PAG) and amygdala (AMY) [13-15]. MORs are $G_{i/o}$ protein-coupled receptors (GPCRs) with seven transmembrane domains. Once morphine binds to this receptor, it induces conformational changes allowing dissociation of $G_{\alpha i}$ subunit from $G_{\beta\gamma}$ subunit. The $G_{\alpha i}$ subunit inhibits adenylate cyclase activity and G protein gated inward rectifying potassium channels (GIRKs). On the other hand, $G_{\beta\gamma}$ subunit binds to voltage-gated channels and inhibits Ca^{2+} influx. Together, these mechanisms produce a strong hyperpolarization of MOR-expressing neurons, particularly in pain-processing brain areas, that inhibit the nociceptive signal [16].

After inducing analgesia, morphine is metabolized through a glucuronidation process mediated by UGTs expressed in the liver, intestines, kidneys and brain cells [6, 17]. In humans, the conjugation of a glucuronide moiety by UGTs on the 3-OH or 6-OH group of morphine results in two major metabolites, morphine-3-glucuronide (M3G, 60-70%) and morphine-6-glucuronide (M6G, 10%) [18-20]. Among all the UGTs, the 1A1, 1A3, 1A6, 1A8, 1A9, and 1A10 and 2B7 isoforms were described to be involved in M3G production [21]. Counterintuitively, M3G induces mechanical allodynia and thermal hyperalgesia [22-24]. The mechanisms involving these pro-nociceptive effects are still debated [32]. On the opposite, M6G is a MOR agonist like morphine and produces pain relief [17, 19, 20]. In mice, even though CYP2D6 and UGT2B7 are lacking, C6G, morphine, and M3G were found in urine following injection of codeine, whereas M6G was absent [25]. Moreover, morphine is mainly metabolized into M3G by UGT1A1, 1A3, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10 and 2B36 [26], whereas M6G is not produced at all.

Codeine and morphine anti-nociception and the development of side effects are influenced by sex in humans and rodents [27-31]. Besides the fact that female mice require more morphine to display similar anti-nociception than males, they also exhibit a higher metabolism of morphine into pro-nociceptive M3G [32]. This leads to an unbalance of the pro-nociception/anti-nociception ratio (*i.e.*, M3G/morphine) at the periphery and in brain structures involved in the analgesic effect of morphine.

Although multiple evidences of sex-dependent expression of metabolic enzymes were reported, to our knowledge, no study documents codeine metabolism in male and female mice. Therefore, the present article aims to determine whether sex-dependent differences exist in the anti-nociceptive effects and the peripheral and central metabolism of codeine in adult C57BL/6J mice.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Experiments were performed with 10 weeks-old male and female C57BL/6J mice (26 ± 4 g and 20 ± 4 g, respectively; JAX:006362; Charles River, L'Arbresle, France). Mice were group-housed at five per cage according to the sex with a 12-hour light-dark cycle, at a temperature of 23°C ± 2° C. Water and food were provided *ad libitum*. All procedures were carried out following the ethical rules of the European Union, CREMEAS and the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (APAFIS #37039-2022050211068109 v8).

Behavioural assessment

The tail-immersion-test (TIT) was used to assess the anti-nociceptive effect of codeine. Mice were acclimated to the animal housing conditions for 1 week before the manipulation and habituated to be restrained in a grid pocket for 1 additional week. Mice were then tested every day during the 1 week by measuring the baseline latencies of the tail withdrawal when 2/3 of the tail was immersed in a constant temperature water bath heated at 48°C. A cut-off was set at 20 s to avoid any tissue damage. When baselines were considered steady (three consecutive days of stable measurements), mice were weighed and received an i.p. injection of 10 mg/kg of codeine (volume of 10 µl/g of animal). The tail-flick reflex latency was measured 30 min after injection of codeine. Results are expressed as the maximal possible effect (%MPE) according to the following formula:

$$\%\text{MPE} = \frac{(\text{test latency}) - (\text{baseline latency})}{(\text{cut-off latency}) - (\text{baseline latency})} \times 100$$

Peripheral pharmacokinetics of codeine

Peripheral pharmacokinetics of codeine were assessed using 12-week-old mice. All mice were injected with codeine (10 mg/kg) and blood was collected for 3 h (every 10 min for 2 h and every 20 min for the last hour). A small incision was performed at the end of the tail and 5 µl of blood was collected using a heparinized calibrated capillary (Minicaps End-to-End 5 µl; Hischmann, Eberstadt Germany). Samples were immediately transferred from the capillary in a 1.5 ml microtube containing 4 µl of heparin (0.5 mg/ml. Each tube was vortexed, quickly centrifuged and stored at -20°C before further analysis.

Central metabolism of codeine

The central metabolism of codeine was assessed using 12-week-old mice. Mice were sacrificed by cervical dislocation 30 min after the i.p. injection of 10 mg/kg of codeine. Blood, brain structures and the lumbar spinal cord (LSC) were collected. The brain was placed on an ice-cold mouse brain matrix (Bioseb, Vitrolles, France). Razor blades were used to cut the brain into 1 mm-thick slices. A puncher of 1 mm diameter (WPI, Friedberg, Germany) was used to sample the PAG and AMY. The LSC was recovered by hydraulic extrusion as previously described [33]. All structures were immediately transferred in 1.5 ml microtubes and frozen at -80°C until further analysis.

Sample preparation

Blood- Frozen blood was thawed and 10 µl of the internal standard (IS) containing 1.9 pmol of D3-codeine, 5 pmol of D3-morphine, 1.36 pmol of D3-M3G and 47.5 pmol of D3-C6G; Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) were added. Proteins were precipitated with 200 µl of ice-cold acetonitrile (ACN; Thermo Scientific, Villebon-Sur-Yvette, France). The samples were vortexed and centrifuged (20,000 g, 30 min, 4°C). The supernatants were collected, dried under vacuum and resuspended in 800 µl of H_2O / 0.1% formic acid (FA; v/v; Sigma Aldrich)

before solid-phase extraction (SPE). HyperSep SPE cartridges (1 cc, 25 mg, Thermo Electron) were used with a positive pressure manifold (Thermo Electron). Briefly, cartridges were activated with 1 ml of ACN 100% followed by a step wash with 2 ml of H_2O / 0.1% FA (v/v). Then, samples were loaded onto the cartridges and let to dry for 1 min under a high vacuum. Cartridges were subsequently washed with 1 ml of H_2O / 0.1% FA (v/v) followed by 1 ml of 98.9% H_2O / 1% ACN / 0.1% FA (v/v). Elution was performed with 800 µl of 79.9% H_2O / 20% ACN / 0.1% FA (v/v). Eluates were centrifuged (20,000 g, 15 min, 4°C). Supernatants were dried under vacuum and resuspended in 30 µl of H_2O / 0.1% FA (v/v).

Tissues- Frozen tissues were sonicated (two times 5 s; 100 W) in 0.1 mM of ascorbic acid (100 µl for PAG and AMY and 200 µl for LSC). After centrifugation (20,000 g, 30 min, 4°C), the supernatants were collected and received 10 µl of IS (containing 0.3 pmol of D3-codeine, 0.8 pmol of D3-morphine, 0.2 pmol of D3-M3G and 7.92 pmol of D3-C6G). Samples were precipitated with 1 ml of ice-cold ACN and were centrifuged (20,000 g, 30min, 4°C). The supernatants were dried under vacuum and suspended in 15 µl of H_2O 99.9% / 0.1% FA (v/v) before mass spectrometry analysis.

Dansyl-chloride derivation- Blood and tissue samples were derived using dansyl-chloride derivation to enhance the morphine signal (Kang *et al.*,2022). Samples were dried under vacuum and suspended with 40 µl of 0.2M bicarbonate ($NaHCO_3$, Sigma Aldrich) and 40 µl of dansyl-chloride (0.85 mg/ml; Sigma Aldrich). They were vortexed, heated at 60°C for 10 min and then precipitated with 400 µl of ice-cold 99.8% ACN / 0.2% FA (v/v). After centrifugation (20,000 g, 30 min, 4°C), supernatants were collected and dried under vacuum and resuspended in 15 µl of 29.8% H_2O / 50% methanol / 10% Ammonium formate 50 mM / 0.2% FA before mass spectrometry analysis.

LC-MS/MS instrumentation and analytical conditions

Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analyses were performed with a Dionex Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Electron) coupled with a triple quadrupole Endura mass spectrometer (Thermo Electron). Xcalibur v4.0 software (RRID:SCR_014593) was used to control the system (Thermo Electron). Samples were loaded onto a ZORBAX SB-C18 column (150 x 1 mm, 3.5 µm, flow of 90 $\mu l.min^{-1}$; Agilent, Les Ulis, France) heated at 40°C. Identification of the compounds was based on precursor ions, selective fragment ions and retention times obtained for the heavy counterpart present in the IS. Selection of the monitored transitions and optimization of collision energy and RF Lens parameters were determined manually. Qualification and quantification were performed using the multiple reaction monitoring mode (MRM) according to the isotopic dilution method (Ho et al., 1990). LC and MS conditions used are detailed in **Table S1**.

Determination of peripheral pharmacokinetic

The pharmacokinetic parameters of codeine metabolism were determined by non-compartmental analysis using the PKsolver tool described by Zhang et al. (Zhang *et al*., 2010). The linear up-log-down trapezoidal rule was used to determine the area under the curve (AUC) of codeine, C6G, morphine and M3G after extrapolation to infinity.

Statistical analysis

For the behavioral tests, baselines and post-treatment latencies were compared using a repeated measures analysis of variance with two factors (mixed model 2-way ANOVA): sex and treatment. Multiple comparisons were performed with Sidak post hoc test. For the %MPE, a parametric Student's t-test was used. These different tests require the normality of the residuals of our series of values, verified by a Shapiro test, as well as the homogeneity of the variances, verified by a Fischer test. For the pharmacokinetic study, T-tests were performed on the AUCs

of all the compounds. When the results did not show homogeneity of variances (*e.g.*, AUC of C6G), a T-test with a Welch correction enabled us to compare the means. The results are shown with error bars that reflect the standard error of the mean (SEM). All analyses were performed using GraphPadPrism 8.0.2 software (RRID:SCR_002798).

RESULTS

Anti-nociceptive effect of codeine

First, we have determined whether a difference in the anti-nociceptive effect of codeine exists between male and female C57BL/6J mice after a single administration of 10 mg/kg of codeine. The dose of 10mg/kg of codeine was chosen to be under the cut-off of the nociceptive test. We used the tail-immersion test (TIT) to assess the anti-nociceptive effect of codeine 30 min after codeine i.p. injection (**Figure 2A**). Male and female mice display no significant difference in basal latency time at 48°C of 3.71 ± 0.508 and 3.79 ± 0.584 s, respectively (**Figure 2B**). However, a significant anti-nociceptive effect was observed 30 min after codeine injection, with an interaction between sex and codeine treatment (p-value < 0.05; **Figure 2B**). In addition, tail reflex latency was significantly higher in males (11.37 ± 1.03 s) compared to females (8.42 ± 0.93 s) **Figure 2B**) indicating that codeine has a stronger anti-nociceptive effect in males than female mice. After MPE calculation (**Figure 2C**), male mice showed a significantly higher percentage of MPE (47% of MPE) compared to females (28% of MPE; p-value < 0.05).

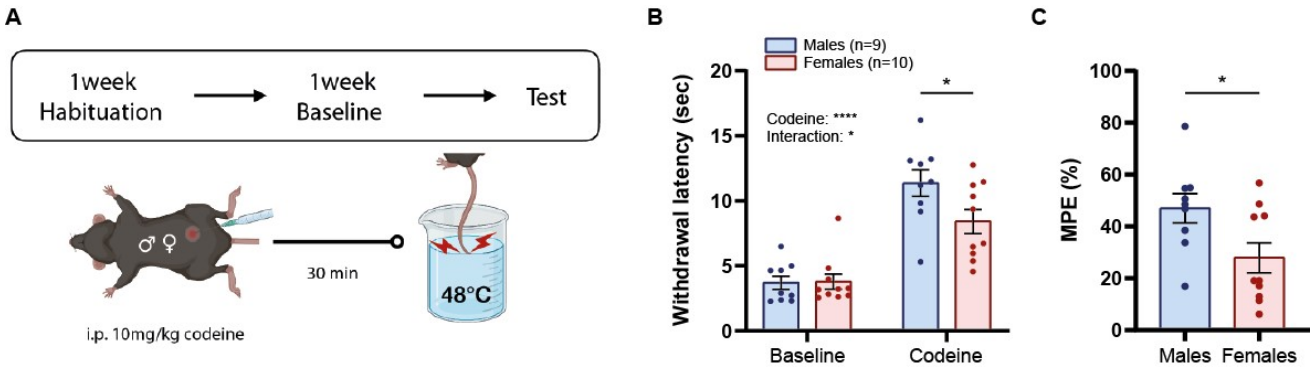


Figure 2: Behavioural assessment of codeine in male and female mice.

*A) Protocol used to assess the anti-nociceptive effect of codeine with the tail immersion test. B) Comparison of tail withdrawal latencies (in seconds) obtained before (baseline) and 30 min after i.p. injection of 10 mg/kg of codeine. C) Percentage of maximum possible effect (%MPE) was calculated in male and female mice 30 min after codeine injection. n=9 for males and n=10 for females. Two-way ANOVA (repeated measures mixed model) followed by a Sidak multiple comparison test or unpaired T-test analysis. *, p-value < 0.05; T-test; Data are expressed as Means ± SEM*

Peripheral metabolism of codeine:

Peripheral metabolism occurring in the liver is the main regulator of the concentrations of codeine, C6G, morphine and M3G in the blood. Due to the opposite effects (*i.e.*, pro-nociceptive and anti-nociceptive) of codeine metabolites, differences in the anti-nociceptive effect in male and female mice might occur. *In vivo* pharmacokinetics studies were carried out by collecting blood at the tip of the tail at different time points before and following a 10 mg/kg codeine injection (see **Figure 3A** for the protocol). LC-MS/MS analysis using the isotopic dilution quantification method allowed us to quantify codeine and its metabolites. This enabled us to determine pharmacokinetics parameters (**Table 1)**.

Parameters	Codeine	
	Males (n=6)	Females (n=7)
C_{max} (nmol.mL^{-1})**	24.08 ± 1.99	18.12 ± 0.97
AUC (nmol.min.mL^{-1})	983.6 ± 71.05	897.7 ± 87.55
$T_{1/2}$ (min)	44.60 ± 4.18	44.77 ± 6.64
MRT (min)	58.87 ± 1.33	71.63 ± 10.44
Cl/F ((mg/kg)/(nmol/mL)/min))	0.03 ± 0.002	0.03 ± 0.004
Vz/F ((mg/kg)/(nmol/mL))	1.85 ± 0.14	1.82 ± 0.19

Table 1: Pharmacokinetic parameters obtained from the NCA for codeine in the blood. *C_{max}: maximal concentration, AUC: area under the curve, $T_{1/2}$: half-life, MRT:, mean residence time, Cl/f: clearance, Vz/f: volume of distribution.*

*Datas were analysed by t-test or Mann-Whitney test. *: p-value < 0,05, ***: p-value < 0,0005, ****: p-value < 0,0001.*

Codeine- Codeine blood concentrations did not differ significantly between males and females throughout the kinetics overall (**Figure 3B**). However, profiles differed only slightly at the 10 min time point (**Figure 3B**). Furthermore, pharmacokinetics analysis revealed no differences between male and female mice (**Table 1**).

C6G- The blood concentrations of C6G were found to be up to 40 times lower than codeine. The overall kinetics between males and females differ with a shift in the maximum concentration peak of C6G. More precisely, male mice reach a maximum concentration of C6G at 20 min while female mice display a peak at 30 min (**Figure 3C**). The AUC values calculation indicates that the overall concentration of C6G is significantly 2-fold higher in males compared to females (Welch T-test; p-value < 0.01; **Table 2**).

Morphine- No significant difference was observed between male and female mice throughout the kinetics in morphine levels (**Figure 3D**) and between AUC (Welch T-test; p-value =0,8625;

Table 2). Levels of morphine were close to C6G concentrations. However, C6G disappears quickly from the blood compared to morphine.

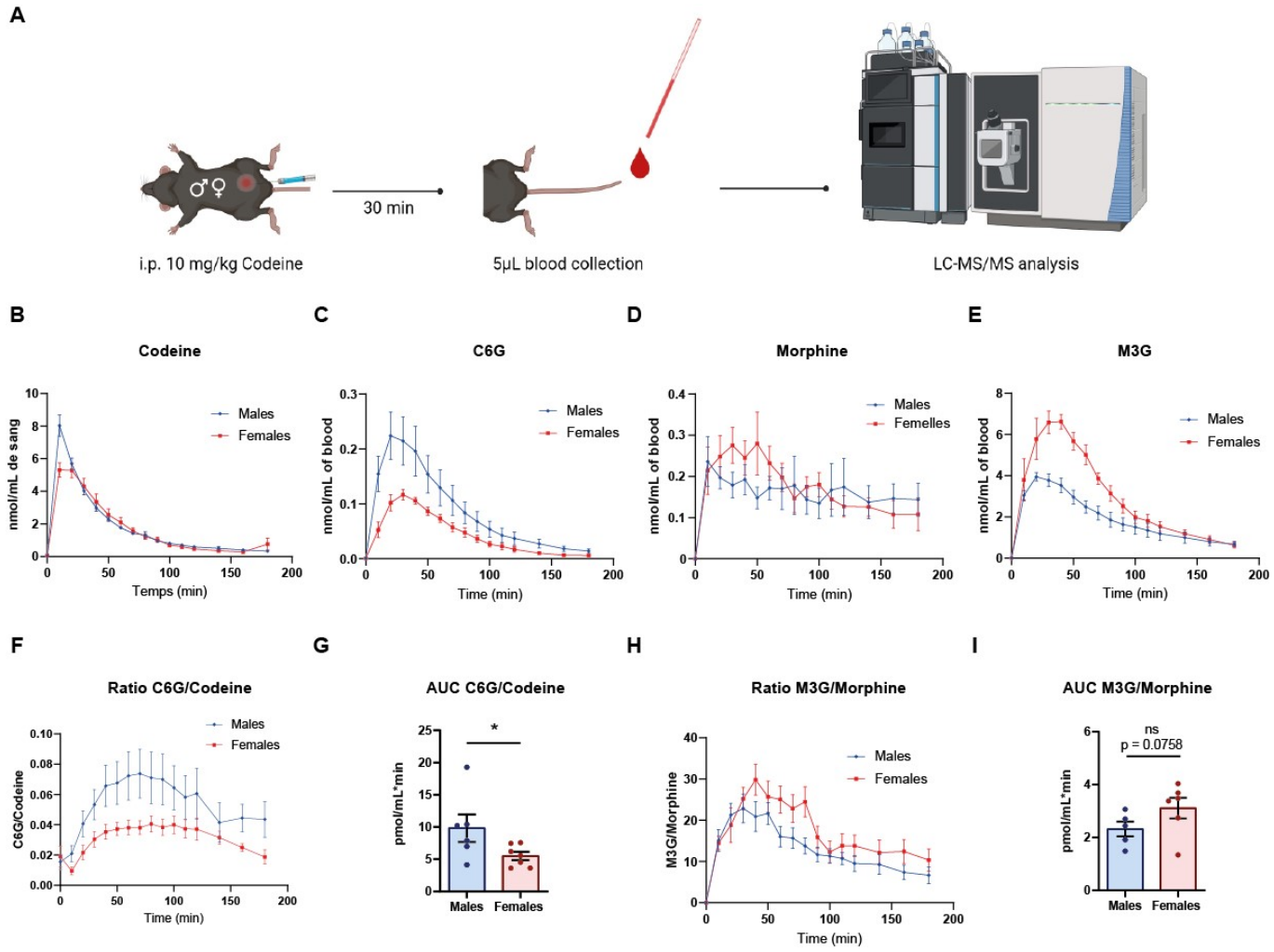


Figure 3: Pharmacokinetics of codeine and its metabolites in male and female mice.

A) *Protocol of the peripheral pharmacokinetic study.* ***B-E)*** *Blood kinetic profile of codeine and codeine-metabolites over 180 min.* ***F)*** *Ratio C6G/codeine over 180 min and* ***G)*** *associated AUC analysis.* ***H)*** *Ratio M3G/Morphine over 180 min and* ***I)*** *associated AUC analysis. Kinetics for codeine, C6G and M3G were performed on n=6 males and n=7 females. Kinetics for morphine were performed on n=5 males and n=6 females Non-compartemental analysis. T-test or Welch t-test analysis for the AUC; *, p-value < 0.05; **, p-value < 0.0; ***, p-value < 0.001. Data are expressed as means ± SEM.*

Parameters	Codeine-6-Glucuronide		Morphine		Morphine-3-Glucuronide	
	Males	Females	Males	Females	Males	Females
C_{max} (nmol.mL^{-1})	0.55 ± 0.08	0.39 ± 0.02	0.34 ± 0.05	0.37 ± 0.07	12.41 ± 0.76 ****	23.91 ± 1.44
AUC (nmol.min.mL^{-1})	36.75 ± 4.18 *	23.72 ± 1.39	59.30 ± 14.74	41.56 ± 10.60	1040 ± 123.20 ***	1645 ± 78.48
MRT (min)	6.87 ± 2.80	6.82 ± 2.78	228.6 ± 48.13	118.30 ± 19.48	130.20 ± 23.49 *	73.01 ± 6.19

Table 2: Pharmacokinetic parameters obtained from the NCA for codeine metabolites in the blood.

C_{max} : maximal concentration, AUC : area under the curve, MRT : mean residence time.

*Datas were analysed by t-test or Mann-Whitney test. *: p-value < 0,05, ***: p-value < 0,0005, ****: p-value < 0,0001.*

M3G- For M3G, we observed higher concentrations in female blood all along the kinetics compared to male mice (**Figure 3E**) with a slight shift in the peak of maximum concentration between male (20 min) and female mice (30 min; **Figure 3E**). The analysis of the AUC shows that the amount of M3G were approximately 1.5 times higher in females than in males (T-test; p-value < 0.001; **Table 2**). Finally, it appears that M3G is the major metabolite produced after codeine administration.

C6G/codeine ratio- We have observed that the metabolic ratio of C6G/codeine throughout the time course is higher in males compared to females (**Figure 3F**). The statistical analysis of the AUC of the ratios confirms a significantly higher ratio in males than in females (Welch T-test; *, p-value < 0.05; **Figure 3G**).

M3G/morphine ratio- Neither ratios observed throughout the kinetic (**Figure 3H**) nor the AUC of the ratios significantly differ between male and female mice (Welch T-test; p-value =0.0758; **Figure 3I**).

Central metabolism of codeine:

Because of its hydrophobic nature, codeine can easily cross the blood-brain barrier (BBB; Oldendorf *et al.*, 1972; Xie *et al.*, 1998). We therefore wanted to evaluate whether a sex-dependent metabolism of codeine exists in the CNS. We targeted different brain structures implicated in pain modulation (*i.e.*, PAG, AMY and LSC; **Figure 4A**) [16, 32]. After quantification, we found codeine, morphine and M3G within PAG (**Figure 4B-E**), AMY (**Figure 4F-I**) and LSC (**Figure 4J-M**), whereas C6G was below our limit of detection. At the opposite of the periphery, we only found more M3G in the LSC of females compared to males (**Figure 4L**).

To assess the central amount of the targeted molecules without the peripheral blood contamination we have calculated a ratio between the central concentration and the blood concentration in PAG, AMY and LSC and the same animals (Brain/Blood ratios of codeine, morphine and M3G; **Figure 5**). No differences in the Brain/Blood ratios for each structures were observed between male and female mice. These results show that the central metabolism of codeine is different from the peripheral one. Furthermore, this central metabolism does not

appear to be involved in the sex-dependent effect of codeine observed in our behavioral experiment.

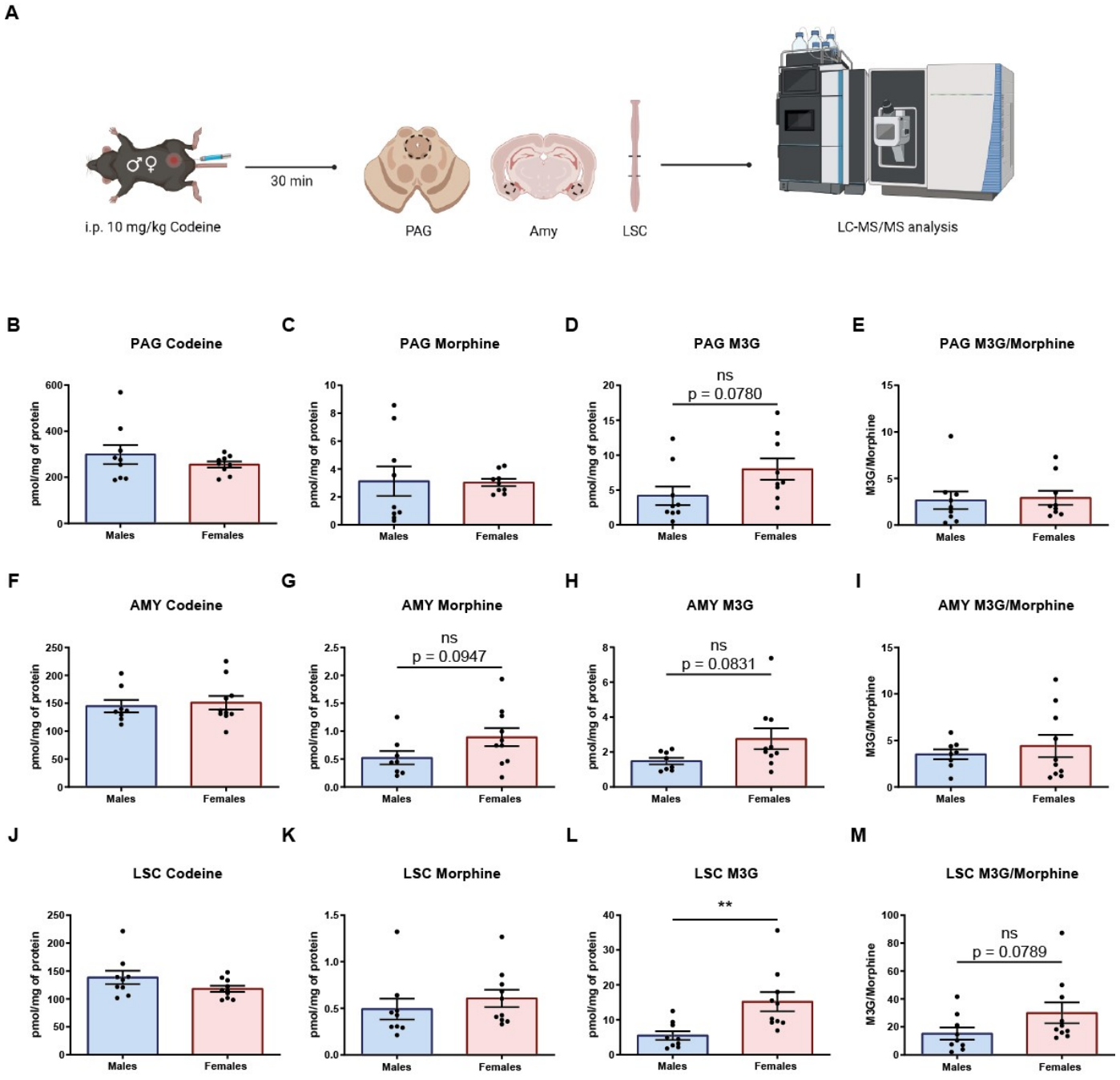


Figure 4: Central metabolism of codeine in male and female mice.

A) *Protocol of tissue collections in the CNS. Brain/Blood ratio at 30 min in periaqueductal grey (PAG;* ***B-E****), in bilateral amygdala (AMY;* ***F-I****) and in lumbar spinal cord (LSC* ***J-M****). n=9 males and n=9 females for PAG. n=8 males and n=10 females for AMY. n=9 males and females for LSC. T-test or Mann-Whitney analysis. Data are expressed as means ± SEM.*

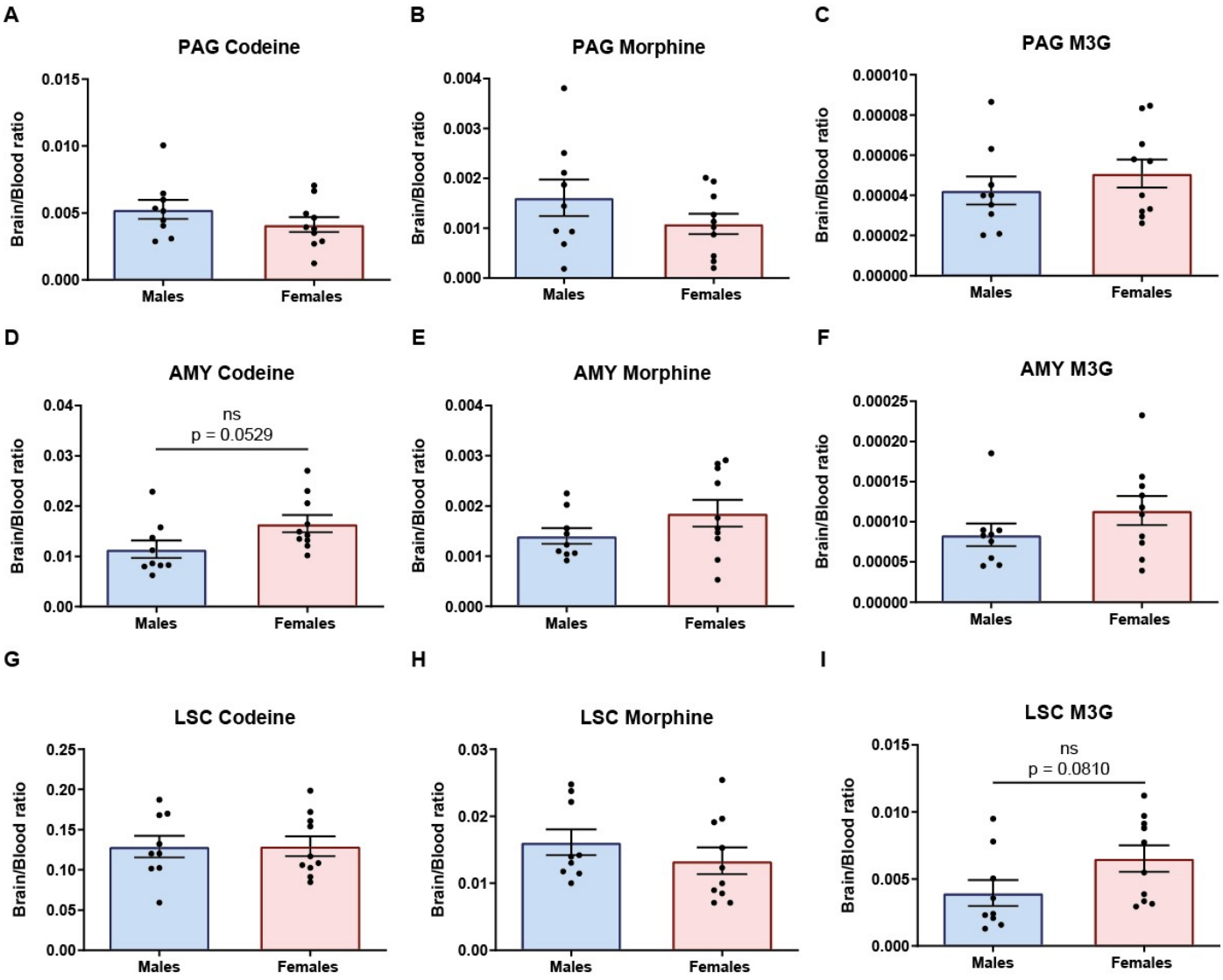


Figure 5: Brain/Blood ratios in CNS structures in male and female mice.

A-C) *Brain/Blood ratio at 30 min in periaqueductal grey (PAG),* ***D-F)*** *in bilateral amygdala (AMY) and* ***G-I)*** *in lumbar spinal cord (LSC). n=9 males and n=9 females for PAG. n=8 males and n=10 females for AMY. n=9 males and females for LSC. T-test or Mann-Whitney analysis. Data are expressed as means ± SEM.*

DISCUSSION

The anti-nociceptive effect of codeine

Many studies have observed differences in pain thresholds between male and female, with females having a lower pain threshold in experimental models (for review [34]). However, in our study performed on mice, we did not observe any difference in baseline sensitivities, consistent with our previous article [32].

Morphine anti-nociception is modulated by sex in rodents [28, 32], whereas codeine ED50 was found to be identical in male and female rats [35, 36]. In our context, after i.p. administration of 10mg/kg codeine, we observed a 47% anti-nociceptive effect in males, which is close to a 50% effective dose (ED50). In contrast, for the same dose of codeine, females achieved only 28% of MPE. These results are consistent with previous studies showing that morphine anti-nociception is 30% more effective in male compared to female mice [31, 32, 37, 38]. One hypothesis is that codeine's anti-nociceptive effect relies on its conversion into morphine. However, due to the pro-nociceptive effect of M3G (major morphine metabolite) [24, 32, 39], the differences between male and female mice concerning M3G blood concentration might explain the sex-dependent effect of anti-nociceptive effect of codeine (see next paragraph). It is worth mentioning that depending on the study, the ED50 of codeine is highly variable. Such differences could be explained by the route of administration, mouse strains, nociceptive tests as well as sex [40-42].

Codeine, C6G, morphine and M3G in the blood

The peripheral pharmacokinetics study enabled us to determine differences in the peripheral metabolism of codeine in male and female C57BL/6J mice. Mice convert most of the codeine into M3G (through a first conversion into morphine) and, to a lesser extent, C6G. Furthermore, the differences in the concentrations of these metabolites observed between males and females indicate a sex-dependent peripheral metabolism which might explain anti-nociceptive differences. At the peripheral level, our data showed that after injection of codeine, morphine

is quickly converted into M3G. In the blood, morphine peak concentration reaches 300 nM, which is in the range of the MOR's affinity (*i.e.* Ki of 1-20nM) to produce anti-nociception. Since no difference in morphine levels in the blood of male and female mice was observed, peripheral morphine seems to be not implicated in the sex-dependent anti-nociceptive effect observed with the TIT. However, we have shown that after injection of codeine, morphine is transformed into M3G to a higher extent in females. As this metabolite was described to produce mechanical allodynia and thermal hyperalgesia, it might decrease morphine anti-nociception more in females and therefore reduce its anti-nociceptive effects.

Sex differences in CYPs and UGTs

CYPs- In humans, associations of CYP2D6 and response to opioids have been shown to be stronger in women than in men [43]. However, apparent CYP2D6 activity is highly variable, independent of the menstrual cycle, sex hormones or phenotype [44]. In addition, higher CYP3A4 activity was found in women than in men [45-48]. On the opposite, higher activity of CYP2D6 was described in men. In addition to a sex-dependent expression, a wide inter-individual variability in CYP2D6 exists due to genetic polymorphisms in humans. Up to 6% of the population are deficient in CYP2D6 [49] and are more sensitive to codeine-induced analgesia. Alternatively, CYP2D6 ultra-rapid metabolizers (1.4–21.2% of the population) are poorly responsive to codeine [1].

Differences in CYPs expression related to sex were also reported in rodents [50]. In mice, both ovariectomy and tamoxifen (antagonist of the receptor of oestrogens) suppress CYP2D22 expression. CYP2D22 mRNA expression in males was similar to that in ovariectomised mice and was lower than in females at oestrous. In addition, an ovariectomy induces hepatic CYP2D6 expression in the same humanized CYP2D6 mice [51]. Studies on mice also revealed that liver

CYP2D22 expression and activity are higher during the estrous period in female CYP2D6 humanized mice [51].

UGTs- Unlike CYPs, UGTs are less prone to genetic polymorphism even though some were reported in the literature [52, 53]. A study on humans carrying polymorphism on UGT2B7 amino acid 268 showed however no significant impact on morphine metabolism into M3G [54]. Conflicting results were however reported showing that UGT1A1, UGT1A9 and UGT2B7 common single-nucleotide polymorphisms and the dimers between these UGTs can region-selectively affect the generation of M3G and M6G via altering their intrinsic clearance [55].

Only a few studies investigated sex differences in UGTs expression in humans [56, 57]. It however appears that men exhibit a 4-fold higher level of expression of UGT2B17 than women accompanied by an increased glucuronidation activity in men [56]. Other human studies have also demonstrated that UGT2B15-mediated oxazepam glucuronidation is faster in men than in women [58-60].

In rodents, sex differences in UGTs expression were reported in the liver, and the kidney [61]. More precisely, UGT1A isoforms are generally more expressed in females compared to males while the opposite is found for UGT2B members [61]. Sex hormones could potentially drive these differences as they were shown to induce/repress directly some UGTs [62, 63].

Finally, even though most of the metabolism takes place in the liver, expression of CYPs and UGT was also reported in the brain, paving the way for potential metabolism in the CNS [61, 64-67].

Codeine, C6G, morphine and M3G in the CNS

Codeine is a compound more hydrophobic than morphine that can cross more easily the BBB to reach the CNS [68-70]. Moreover, a central metabolism of codeine and morphine was described in the CNS, consistent with the previously described expression of CYPs and UGTs

[66, 71]. As morphine and C6G [10] are thought to be responsible for codeine anti-nociceptive effects, we have quantify levels of these morphine, C6G and M3G after a single administration of 10mg/kg codeine in male and female mice. We did not find any sex differences in the PAG, amygdala and LSC. Therefore, it seems that the central metabolism of codeine is not influenced by sex even though literature shows sex differences in CYP and UGT expression within the brain [61, 72].

CONCLUSION

Despite the fact that codeine has been used for more than a hundred years, its metabolism and effects were poorly investigated in male and female rodents. Our study shows that codeine metabolism follows a complex interaction between CYPs and UGTs which will require additional studies to decipher precisely this mechanism. Our results show that codeine displays a stronger anti-nociceptive effect in male mice compared to females. A pharmacokinetics study unveiled the presence of C6G in the blood of C57BL6/J mice. Moreover, blood analysis revealed higher levels of pro-nociceptive M3G in the blood of females. In contrast, no sex differences were found in the central metabolism of codeine in pain-related structures. Taken together, these results suggest that the sex differences in the anti-nociceptive effect of codeine is probably not due to its central metabolism.

PERSPECTIVES AND SIGNIFICANCE

Utilizing the C57BL/6J mouse model, our research indicates a more effective anti-nociceptive response to codeine in males. An examination of codeine's peripheral metabolism revealed elevated levels of the pro-algesic M3G in female blood samples. Nonetheless, we detected no sex-based differences in pain-related brain structures or the lumbar spinal cord of the animals. These results highlight the significant role of peripheral codeine metabolism in influencing its

anti-nociceptive effectiveness and emphasize the importance of recognizing sex as a crucial biological variable in opiate-based pain management.

AUTHOR CONTRIBUTIONS - Conceptualisation, Y.G., V.H., A.-K.B. ; **Methodology**, Y.G., V.H., A.-K.B., F.G.; **Investigation**, V.H., A.-K.B., V.A., F.G.; **Writing – Original Draft**, Y.G., V.H., A.-K.B., F.G.; **Writing – Review & Editing**, Y.G., V.H., A.-K.B., F.G.; **Funding Acquisition**, Y.G. ; **Resources**, Y.G. ; **Supervision**, Y.G., V.H., A.-K.B., F.G.

DATA AVAILABILITY - The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

CONSENT FOR PUBLICATION – All authors have agreed to publish this manuscript

COMPETING INTERESTS - The authors declare that they have no competing interests.

DECLARATION OF TRANSPARENCY AND SCIENTIFIC RIGOUR - This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research as stated in the PLOS one guidelines for Design and Analysis, and Animal Experimentation, and as recommended by funding agencies, publishers and other organisations engaged with supporting research.

DECLARATION

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Funding

This work was funded by INSERM, CNRS, University of Strasbourg (Unistra), French Ministère Délégué à la Recherche et à l'Enseignement Supérieur (Ph.D. fellowship to V.H. and A.-K.B) and SFRI STRAT'US (ANR-20-SFRI-0012 PhD extension to V.H.). We thank the following research programs of excellence for their support: FHU Neurogenycs, French National Research Agency (ANR) through the Programme d'Investissement d'Avenir (V.H. and A.-K.B.; contract ANR-17- EURE-0022, EURIDOL graduate school of pain) and Ligue contre le Cancer. This work of the Interdisciplinary Thematic Institute NeuroStra, as part of the ITI 2021-2028 program of the University of Strasbourg, CNRS and lnserm, was supported by ldEx Unistra (ANR-10-IDEX-0002) under the framework of the French Program Investments for the Future.

BIBLIOGRAPHY

1. Tay EMY, Roberts DM. A spotlight on the role, use, and availability of codeine and the implications faced. Expert Rev Clin Pharmacol. 2018;11:11:1057-9; doi:10.1080/17512433.2018.1537122.

2. Gasche Y, Daali Y, Fathi M, Chiappe A, Cottini S, Dayer P, et al. Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 metabolism. N Engl J Med. 2004;351:27:2827-31; doi:10.1056/NEJMoa041888.

3. Volpe DA, McMahon Tobin GA, Mellon RD, Katki AG, Parker RJ, Colatsky T, et al. Uniform assessment and ranking of opioid mu receptor binding constants for selected opioid drugs. Regul Toxicol Pharmacol. 2011;59:3:385-90; doi:S0273-2300(11)00003-1 [pii] 10.1016/j.yrtph.2010.12.007.

4. Smith HS. Opioid metabolism. Mayo Clin Proc. 2009;84:7:613-24; doi:S0025-6196(11)60750-7 10.1016/S0025-6196(11)60750-7.

5. Smith HS. The metabolism of opioid agents and the clinical impact of their active metabolites. Clin J Pain. 2011;27:9:824-38; doi:10.1097/AJP.0b013e31821d8ac1.

6. Coffman BL, Rios GR, King CD, Tephly TR. Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation. Drug Metab Dispos. 1997;25:1:1-4; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9010622.

7. Leppert W. CYP2D6 in the metabolism of opioids for mild to moderate pain. Pharmacology. 2011;87:5-6:274-85; doi:10.1159/000326085.

8. Chen ZR, Irvine RJ, Somogyi AA, Bochner F. Mu receptor binding of some commonly used opioids and their metabolites. Life Sci. 1991;48:22:2165-71; doi:10.1016/0024-3205(91)90150-a.

529 9. Mignat C, Wille U, Ziegler A. Affinity profiles of morphine, codeine, dihydrocodeine and
530 their glucuronides at opioid receptor subtypes. Life Sci. 1995;56:10:793-9; doi:10.1016/0024-
531 3205(95)00010-4.
532 10. Srinivasan V, Wielbo D, Tebbett IR. Analgesic effects of codeine-6-glucuronide after
533 intravenous administration. Eur J Pain. 1997;1:3:185-90; doi:10.1016/s1090-3801(97)90103-
534 8.
535 11. Vree TB, Verwey-van Wissen CP. Pharmacokinetics and metabolism of codeine in humans.
536 Biopharm Drug Dispos. 1992;13:6:445-60;
537 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&
538 list_uids=1391681.
539 12. Kirchheiner J, Schmidt H, Tzvetkov M, Keulen JT, Lotsch J, Roots I, et al.
540 Pharmacokinetics of codeine and its metabolite morphine in ultra-rapid metabolizers due to
541 CYP2D6 duplication. Pharmacogenomics J. 2007;7:4:257-65; doi:10.1038/sj.tpj.6500406.
542 13. Glaum SR, Miller RJ, Hammond DL. Inhibitory actions of delta 1-, delta 2-, and mu-opioid
543 receptor agonists on excitatory transmission in lamina II neurons of adult rat spinal cord. J
544 Neurosci. 1994;14:8:4965-71.
545 14. Jensen TS, Yaksh TL. Comparison of antinociceptive action of morphine in the
546 periaqueductal gray, medial and paramedial medulla in rat. Brain Res. 1986;363:1:99-113;
547 doi:10.1016/0006-8993(86)90662-1.
548 15. McGaraughty S, Heinricher MM. Microinjection of morphine into various amygdaloid
549 nuclei differentially affects nociceptive responsiveness and RVM neuronal activity. Pain.
550 2002;96:1-2:153-62; doi:10.1016/s0304-3959(01)00440-7.
551 16. Fields H. State-dependent opioid control of pain. Nat Rev Neurosci. 2004;5:7:565-75;
552 doi:10.1038/nrn1431.

553 17. Gabel F, Hovhannisyan V, Berkati AK, Goumon Y. Morphine-3-Glucuronide, Physiology
554 and Behavior. Front Mol Neurosci. 2022;15:882443; doi:10.3389/fnmol.2022.882443.
555 18. Hasselstrom J, Sawe J. Morphine pharmacokinetics and metabolism in humans.
556 Enterohepatic cycling and relative contribution of metabolites to active opioid concentrations.
557 Clin Pharmacokinet. 1993;24:4:344-54; doi:10.2165/00003088-199324040-00007.
558 19. Lotsch J. Opioid metabolites. J Pain Symptom Manage. 2005;29:5 Suppl:S10-24;
559 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&
560 list_uids=15907643
561 20. Lotsch J, Geisslinger G. Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? Clin
562 Pharmacokinet. 2001;40:7:485-99; doi:10.2165/00003088-200140070-00001.
563 21. Stone AN, Mackenzie PI, Galetin A, Houston JB, Miners JO. Isoform selectivity and
564 kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human udp-glucuronosyltransferases:
565 evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7. Drug Metab Dispos.
566 2003;31:9:1086-9.
567 22. Lewis SS, Hutchinson MR, Rezvani N, Loram LC, Zhang Y, Maier SF, et al. Evidence that
568 intrathecal morphine-3-glucuronide may cause pain enhancement via toll-like receptor 4/MD-
569 2 and interleukin-1beta. Neuroscience. 2010;165:2:569-83; doi:S0306-4522(09)01651-0
570 10.1016/j.neuroscience.2009.10.011.
571 23. Smith MT, Watt JA, Cramond T. Morphine-3-glucuronide--a potent antagonist of morphine
572 analgesia. Life Sci. 1990;47:6:579-85.
573 24. Roeckel LA, Utard V, Reiss D, Mouheiche J, Maurin H, Robe A, et al. Morphine-induced
574 hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. Sci
575 Rep. 2017;7:1:10406; doi:10.1038/s41598-017-11120-4.
576 25. Oguri K, Hanioka N, Yoshimura H. Species differences in metabolism of codeine: urinary
577 excretion of codeine glucuronide, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in

578 mice, rats, guinea pigs and rabbits. Xenobiotica. 1990;20:7:683-8;
579 doi:10.3109/00498259009046884.
580 26. Kurita A, Miyauchi Y, Ikushiro S, Mackenzie PI, Yamada H, Ishii Y. Comprehensive
581 Characterization of Mouse UDP-Glucuronosyltransferase (Ugt) Belonging to the Ugt2b
582 Subfamily: Identification of Ugt2b36 as the Predominant Isoform Involved in Morphine
583 Glucuronidation. J Pharmacol Exp Ther. 2017;361:2:199-208; doi:10.1124/jpet.117.240382.
584 27. Pleuvry BJ, Maddison SE. A sex difference in the effects of oral codeine and promethazine
585 on the ventilatory response to carbon dioxide in human volunteers. Br J Clin Pharmacol.
586 1980;9:2:159-64; doi:10.1111/j.1365-2125.1980.tb05827.x.
587 28. Fullerton EF, Doyle HH, Murphy AZ. Impact of sex on pain and opioid analgesia: a review.
588 Curr Opin Behav Sci. 2018;23:183-90; doi:10.1016/j.cobeha.2018.08.001.
589 29. Cicero TJ, Nock B, O'Connor L, Meyer ER. Role of steroids in sex differences in morphine-
590 induced analgesia: activational and organizational effects. J Pharmacol Exp Ther.
591 2002;300:2:695-701; doi:10.1124/jpet.300.2.695.
592 30. Craft RM. Sex differences in opioid analgesia: "from mouse to man". Clin J Pain.
593 2003;19:3:175-86; doi:10.1097/00002508-200305000-00005.
594 31. Kest B, Wilson SG, Mogil JS. Sex differences in supraspinal morphine analgesia are
595 dependent on genotype. J Pharmacol Exp Ther. 1999;289:3:1370-5.
596 32. Gabel F, Hovhannisyan V, Andry V, Goumon Y. Central metabolism as a potential origin
597 of sex differences in morphine antinociception but not induction of antinociceptive tolerance in
598 mice. Br J Pharmacol. 2023;180:7:843-61; doi:10.1111/bph.15792.
599 33. Richner M, Jager SB, Siupka P, Vaegter CB. Hydraulic Extrusion of the Spinal Cord and
600 Isolation of Dorsal Root Ganglia in Rodents. J Vis Exp. 2017:119; doi:10.3791/55226.
601 34. Hurley RW, Adams MC. Sex, gender, and pain: an overview of a complex field. Anesth
602 Analg. 2008;107:1:309-17; doi:10.1213/01.ane.0b013e31816ba437.

603 35. Peckham EM, Barkley LM, Divin MF, Cicero TJ, Traynor JR. Comparison of the
604 antinociceptive effect of acute morphine in female and male Sprague-Dawley rats using the
605 long-lasting mu-antagonist methocinnamox. Brain Res. 2005;1058:1-2:137-47;
606 doi:10.1016/j.brainres.2005.07.060.
607 36. Peckham EM, Traynor JR. Comparison of the antinociceptive response to morphine and
608 morphine-like compounds in male and female Sprague-Dawley rats. J Pharmacol Exp Ther.
609 2006;316:3:1195-201; doi:10.1124/jpet.105.094276.
610 37. Juni A, Klein G, Kowalczyk B, Ragnauth A, Kest B. Sex differences in hyperalgesia during
611 morphine infusion: effect of gonadectomy and estrogen treatment. Neuropharmacology.
612 2008;54:8:1264-70; doi:10.1016/j.neuropharm.2008.04.004.
613 38. Kest B, Sarton E, Dahan A. Gender differences in opioid-mediated analgesia: animal and
614 human studies. Anesthesiology. 2000;93:2:539-47; doi:10.1097/00000542-200008000-00034.
615 39. Klimas R, Mikus G. Morphine-6-glucuronide is responsible for the analgesic effect after
616 morphine administration: a quantitative review of morphine, morphine-6-glucuronide, and
617 morphine-3-glucuronide. British Journal of Anaesthesia. 2014;113:6:935-44;
618 doi:10.1093/bja/aeu186.
619 40. Lichtman AH. The up-and-down method substantially reduces the number of animals
620 required to determine antinociceptive ED50 values. Journal of pharmacological and
621 toxicological methods. 1998;40:2:81-5; doi:10.1016/s1056-8719(98)00041-0.
622 41. Milo S, Ansonoff M, King M, Rossi GC, Zuckerman A, Pintar J, et al. Codeine and 6-
623 acetylcodeine analgesia in mice. Cellular and molecular neurobiology. 2006;26:4-6:1011-9;
624 doi:10.1007/s10571-006-9101-5.
625 42. Miranda HF, Noriega V, Zepeda RJ, Sierralta F, Prieto JC. Systemic synergism between
626 codeine and morphine in three pain models in mice. Pharmacological reports : PR.
627 2013;65:1:80-8; doi:10.1016/s1734-1140(13)70966-6.

628 43. Lopes GS, Bielinski SJ, Moyer AM, Black Iii JL, Jacobson DJ, Jiang R, et al. Sex
629 Differences in Associations Between CYP2D6 Phenotypes and Response to Opioid Analgesics.
630 Pharmgenomics Pers Med. 2020;13:71-9; doi:10.2147/PGPM.S239222.
631 44. Labbe L, Sirois C, Pilote S, Arseneault M, Robitaille NM, Turgeon J, et al. Effect of gender,
632 sex hormones, time variables and physiological urinary pH on apparent CYP2D6 activity as
633 assessed by metabolic ratios of marker substrates. Pharmacogenetics. 2000;10:5:425-38;
634 doi:10.1097/00008571-200007000-00006.
635 45. Tanaka E. Gender-related differences in pharmacokinetics and their clinical significance. J
636 Clin Pharm Ther. 1999;24:5:339-46; doi:10.1046/j.1365-2710.1999.00246.x.
637 46. Yang L, Li Y, Hong H, Chang CW, Guo LW, Lyn-Cook B, et al. Sex Differences in the
638 Expression of Drug-Metabolizing and Transporter Genes in Human Liver. J Drug Metab
639 Toxicol. 2012;3:3:1000119; doi:10.4172/2157-7609.1000119.
640 47. Scandlyn MJ, Stuart EC, Rosengren RJ. Sex-specific differences in CYP450 isoforms in
641 humans. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2008;4:4:413-24; doi:10.1517/17425255.4.4.413.
642 48. Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A, Carroll KM. The effects of gender, age,
643 ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes
644 and inducibility in cultured human hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol. 2004;199:3:193-209;
645 doi:10.1016/j.taap.2004.01.010.
646 49. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Leeder JS. Prediction of CYP2D6
647 phenotype from genotype across world populations. Genet Med. 2017;19:1:69-76;
648 doi:10.1038/gim.2016.80.
649 50. Gerges SH, El-Kadi AOS. Sexual Dimorphism in the Expression of Cytochrome P450
650 Enzymes in Rat Heart, Liver, Kidney, Lung, Brain, and Small Intestine. Drug Metab Dispos.
651 2023;51:1:81-94; doi:10.1124/dmd.122.000915.

652 51. Konstandi M, Andriopoulou CE, Cheng J, Gonzalez FJ. Sex steroid hormones differentially
653 regulate CYP2D in female wild-type and CYP2D6-humanized mice. J Endocrinol.
654 2020;245:2:301-14; doi:10.1530/JOE-19-0561.
655 52. Miners JO, McKinnon RA, Mackenzie PI. Genetic polymorphisms of UDP-
656 glucuronosyltransferases and their functional significance. Toxicology. 2002;181-182:453-6;
657 doi:10.1016/s0300-483x(02)00449-3.
658 53. Chen X, Hao Z, Wang N, Zhu J, Yi H, Tang S. Genetic Polymorphisms of UDP-
659 Glucuronosyltransferases and Susceptibility to Antituberculosis Drug-Induced Liver Injury: A
660 Systematic Review and Meta-Analysis. J Trop Med. 2023;2023:5044451;
661 doi:10.1155/2023/5044451.
662 54. Bhasker CR, McKinnon W, Stone A, Lo AC, Kubota T, Ishizaki T, et al. Genetic
663 polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) at amino acid 268: ethnic
664 diversity of alleles and potential clinical significance. Pharmacogenetics. 2000;10:8:679-85;
665 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&
666 list_uids=11186130
667 55. Yang ZZ, Li L, Wang L, Yuan LM, Xu MC, Gu JK, et al. The regioselective glucuronidation
668 of morphine by dimerized human UGT2B7, 1A1, 1A9 and their allelic variants. Acta Pharmacol
669 Sin. 2017;38:8:1184-94; doi:10.1038/aps.2016.157.
670 56. Gallagher CJ, Balliet RM, Sun D, Chen G, Lazarus P. Sex differences in UDP-
671 glucuronosyltransferase 2B17 expression and activity. Drug Metab Dispos. 2010;38:12:2204-
672 9; doi:10.1124/dmd.110.035345.
673 57. Mukai M, Isobe T, Okada K, Murata M, Shigeyama M, Hanioka N. Species and sex
674 differences in propofol glucuronidation in liver microsomes of humans, monkeys, rats and
675 mice. Pharmazie. 2015;70:7:466-70; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26373207.

676 58. Greenblatt DJ, Divoll M, Harmatz JS, Shader RI. Oxazepam kinetics: effects of age and
677 sex. J Pharmacol Exp Ther. 1980;215:1:86-91;
678 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7452494.
679 59. Court MH, Hao Q, Krishnaswamy S, Bekaii-Saab T, Al-Rohaimi A, von Moltke LL, et al.
680 UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 pharmacogenetics: UGT2B15 D85Y genotype and
681 gender are major determinants of oxazepam glucuronidation by human liver. J Pharmacol Exp
682 Ther. 2004;310:2:656-65; doi:10.1124/jpet.104.067660.
683 60. Court MH, Duan SX, Guillemette C, Journault K, Krishnaswamy S, Von Moltke LL, et al.
684 Stereoselective conjugation of oxazepam by human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): S-
685 oxazepam is glucuronidated by UGT2B15, while R-oxazepam is glucuronidated by UGT2B7
686 and UGT1A9. Drug Metab Dispos. 2002;30:11:1257-65; doi:10.1124/dmd.30.11.1257.
687 61. Buckley DB, Klaassen CD. Tissue- and gender-specific mRNA expression of UDP-
688 glucuronosyltransferases (UGTs) in mice. Drug Metab Dispos. 2007;35:1:121-7;
689 doi:10.1124/dmd.106.012070.
690 62. Muraca M, Fevery J. Influence of sex and sex steroids on bilirubin uridine diphosphate-
691 glucuronosyltransferase activity of rat liver. Gastroenterology. 1984;87:2:308-13;
692 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6428963.
693 63. Strasser SI, Smid SA, Mashford ML, Desmond PV. Sex hormones differentially regulate
694 isoforms of UDP-glucuronosyltransferase. Pharm Res. 1997;14:9:1115-21;
695 doi:10.1023/a:1012130118186.
696 64. Berczi I. Neuroendocrine response to endotoxin. Ann N Y Acad Sci. 1998;851:411-5;
697 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&
698 list_uids=9668633
699 65. Wahlstrom A, Winblad B, Bixo M, Rane A. Human brain metabolism of morphine and
700 naloxone. Pain. 1988;35:2:121-7; doi:10.1016/0304-3959(88)90219-9.

66. Suleman FG, Abid A, Gradinaru D, Daval JL, Magdalou J, Minn A. Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. Arch Biochem Biophys. 1998;358:1:63-7; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9750165

67. Sakakibara Y, Katoh M, Kondo Y, Nadai M. Effects of Phenobarbital on Expression of UDP-Glucuronosyltransferase 1A6 and 1A7 in Rat Brain. Drug Metab Dispos. 2016;44:3:370-7; doi:dmd.115.067439 10.1124/dmd.115.067439.

68. Oldendorf WH, Hyman S, Braun L, Oldendorf SZ. Blood-brain barrier: penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. Science. 1972;178:4064:984-6; doi:10.1126/science.178.4064.984.

69. Xie R, Hammarlund-Udenaes M. Blood-brain barrier equilibration of codeine in rats studied with microdialysis. Pharm Res. 1998;15:4:570-5; doi:10.1023/a:1011929910782.

70. Viscusi ER, Viscusi AR. Blood-brain barrier: mechanisms governing permeability and interaction with peripherally acting μ-opioid receptor antagonists. Regional anesthesia and pain medicine. 2020;45:9:688-95; doi:10.1136/rapm-2020-101403.

71. Ouzzine M, Gulberti S, Ramalanjaona N, Magdalou J, Fournel-Gigleux S. The UDP-glucuronosyltransferases of the blood-brain barrier: their role in drug metabolism and detoxication. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2014;8; doi:10.3389/Fncel.2014.00349.

72. Renaud HJ, Cui JY, Khan M, Klaassen CD. Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome P450 mRNAs in mice. Toxicol Sci. 2011;124:2:261-77; doi:10.1093/toxsci/kfr240.

Supporting Information

Sex differences in the anti-nociceptive effect of codeine and its peripheral but not central metabolism.

Table S1. LC-MS/MS conditions. LC and MS/MS conditions for the purification, detection and quantification of morphine and M3G and their respective heavy-tagged counterparts. The flow rate was set at 90 µl/min on a ZORBAX SB-C18 column (150 x 1mm, 3.5µm).

	Mobile phase		
	ACN	**H_2O**	**Formic acid**
Mobile phase A	1%	98.9%	0.1%
Mobile phase B	99.9%	0	0.1%

	HPLC gradient						
Time (min)	0	2.5	5	9	10.5	11.5	16
% B mobile phase	0	0	20	98	98	0	0

MS parameters	
Mode	positive
Spray voltage	3,500 V
Nebulizer gas	Nitrogen
Desolvation (nitrogen) sheath gas	18 Arb
Aux gas	7 Arb
Ion transfer tube temperature	297°C
Vaporizer temperature	131°C
Q1 and Q3 resolutions	0.7 FWHM
Collision gas (CID, argon) pressure	2 mTorr

736 **MS ionization, selection, fragmentation and identification parameters**

737

Compound	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Ion product type	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
Morphine	Positive	285.98	201.11 165.36 181.06	Quantification Qualification Qualification	26.23 40.89 36.24	183
D3-morphine	Positive	289.1	201.06 153.13 165.04	Quantification Qualification Qualification	26.48 43.16 39.02	178
M3G	Positive	462.19	286.11	Quantification	30.02	276
D3-M3G	**Positive**	465.19	289.17	Quantification	29.92	242
Codeine	Positive	300.12	165.04 215.04 225.06	Quantification Qualification Qualification	40.64 24.61 27.77	177
D3-Codeine	Positive	303.15	165.04 199.06 215.11	Quantification Qualification Qualification	40.337 28.96 24.71	174
C6G	Positive	476.14	242.92 281.97 300.11	Quantification Qualification Qualification	31.89 26.43 28.71	236
D3-C6G	Positive	479.22	215.04 285.11 303.11	Quantification Qualification Qualification	38.32 25.73 29.82	248
DNS-Morphine	Positive	519.17	240.11 268.11 285.11 501.17	Quantification Qualification Qualification Qualification	55 44.84 33.41 22.14	298
DNS-D3-Morphine	Positive	522.21	243.11 271.11 288.11 504.22	Quantification Qualification Qualification Qualification	55 44.99 33.06 22.29	298

738

Publication 4: Compétition métabolique entre le tamoxifène et la morphine

La morphine est largement utilisée dans le traitement des douleurs cancéreuses, comme dans le cas du cancer du sein chez la Femme. De manière intéressante, le cancer du sein chez la Femme est pris en charge par des modulateurs sélectifs des récepteurs d'œstrogènes tels que le tamoxifène. Il apparait donc que lors de ces traitements, certaines personnes soient exposées au tamoxifène et à la morphine en même. Ces deux molécules partagent des voies de métabolisme qui sont communes et qui font intervenir les UGTs et c'est dans ce contexte que nous avons étudié la compétition métabolique entre ces deux molécules chez la souris.

frontiers in Oncology

ORIGINAL RESEARCH
published: 21 February 2020
doi: 10.3389/fonc.2020.00025

Unveiling the Impact of Morphine on Tamoxifen Metabolism in Mice *in vivo*

Florian Gabel[1], *Anne-Sophie Aubry*[1], *Volodya Hovhannisyan*[1], *Virginie Chavant*[1,2], *Ivan Weinsanto*[1], *Tando Maduna*[1], *Pascal Darbon*[1] *and Yannick Goumon*[1,2]*

[1] *CNRS UPR3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, University of Strasbourg, Strasbourg, France,* [2] *Mass Spectrometry Facilities of the CNRS UPR3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France*

Background: Tamoxifen is used to treat breast cancer and cancer recurrences. After administration, tamoxifen is converted into two more potent antitumor compounds, 4OH-tamoxifen and endoxifen by the CYP3A4/5 and 2D6 enzymes in human. These active compounds are inactivated by the same UDP-glucuronosyltransferase isoforms as those involved in the metabolism of morphine. Importantly, cancer-associated pain can be treated with morphine, and the common metabolic pathway of morphine and tamoxifen suggests potential clinically relevant interactions.

Methods: Mouse liver microsomes were used to determine the impact of morphine on 4OH-tamoxifen metabolism *in vitro*. For *in vivo* experiments, female mice were first injected with tamoxifen alone and then with tamoxifen and morphine. Blood was collected, and LC-MS/MS was used to quantify tamoxifen, 4OH-tamoxifen, N-desmethyltamoxifen, endoxifen, 4OH-tamoxifen-glucuronide, and endoxifen-glucuronide.

Results: *In vitro*, we found increased K_m values for the production of 4OH-tamoxifen-glucuronide in the presence of morphine, suggesting an inhibitory effect on 4OH-tamoxifen glucuronidation. Conversely, *in vivo* morphine treatment decreased 4OH-tamoxifen levels in the blood while dramatically increasing the formation of inactive metabolites 4OH-tamoxifen-glucuronide and endoxifen-glucuronide.

Conclusions: Our findings emphasize the need for caution when extrapolating results from *in vitro* metabolic assays to *in vivo* drug metabolism interactions. Importantly, morphine strongly impacts tamoxifen metabolism in mice. It suggests that tamoxifen efficiency could be reduced when both drugs are co-administered in a clinical setting, e.g., to relieve pain in breast cancer patients. Further studies are needed to assess the potential for tamoxifen-morphine metabolic interactions in humans.

Keywords: Tamoxifen, 4OH-tamoxifen, endoxifen, Morphine, metabolism, CYP, UDP-glucuronosyltransferase, drug-drug interactions

OPEN ACCESS

Edited by:
Robert Clarke,
Georgetown University, United States

Reviewed by:
James M. Rae,
University of Michigan, United States
John Hawse,
Mayo Clinic, United States

***Correspondence:**
Yannick Goumon
yannick.goumon@inserm.u-strasbg.fr

Specialty section:
This article was submitted to Pharmacology of Anti-Cancer Drugs, a section of the journal Frontiers in Oncology

Received: *24 September 2019*
Accepted: *08 January 2020*
Published: *21 February 2020*

Citation:
Gabel F, Aubry A-S, Hovhannisyan V, Chavant V, Weinsanto I, Maduna T, Darbon P and Goumon Y (2020) Unveiling the Impact of Morphine on Tamoxifen Metabolism in Mice in vivo. Front. Oncol. 10:25. doi: 10.3389/fonc.2020.00025

BACKGROUND

Breast cancer is the most common and deadliest cancer diagnosed in women, even though major advances in screening and treatment have been made in the last 20 years (1). In estrogen receptor (ER)-positive breast tumors, the main strategy of breast anticancer drugs is to either antagonize ER signaling or decrease estrogen synthesis to prevent cancer cell proliferation. Among those drugs,

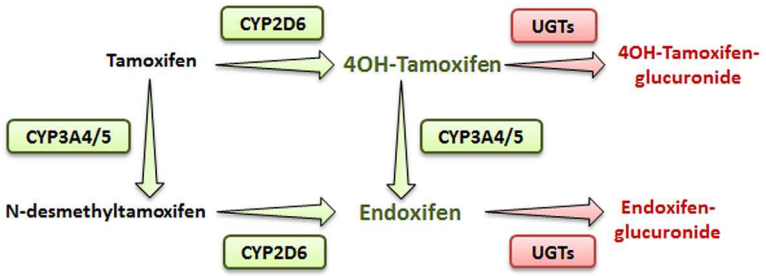


FIGURE 1 | Simplified metabolic pathway of tamoxifen in humans. Compounds in green and red are the active and inactive metabolites of tamoxifen, respectively.

tamoxifen is a selective estrogen receptor modulator (SERM) used for decades to decrease breast cancer recurrence (2). Nowadays, tamoxifen remains one of the major treatment for breast cancer, especially in countries with limited health care resources (3).

Tamoxifen is a pro-drug metabolized mostly in the liver by the phase I cytochrome P450 (CYP) 2D6 and 3A4/5 enzymes (4). In human, hydroxylation of tamoxifen (CYP2D6) leads to 4OH-tamoxifen that can be further processed into endoxifen (via CYP3A4/5) through N-desmethylation (**Figure 1**). These two major metabolites are 30- to 100-fold more potent than tamoxifen itself and are responsible for its anti-tumoral activity.

In addition, N-desmethylation of tamoxifen generates the N-desmethyltamoxifen intermediate (CYP3A4/5) that is further metabolized into endoxifen through CYP2D6-mediated hydroxylation.

Endoxifen is the major metabolite of tamoxifen in humans. Alternatively, in mice, even though CYP2D6 isoform is absent, 4OH-tamoxifen is the main anticancer product of tamoxifen, suggesting that other CYP2D isoforms, such as CYP2D22, could be involved in its metabolism (4, 5).

Phase II metabolizing enzymes including Uridine 5′-diphospho (UDP)-glucuronosyltransferases (UGT1A10, 1A4, 1A8, 2B7, and 2B15) convert active tamoxifen metabolites into inactive 4OH-tamoxifen-glucuronide and endoxifen-glucuronide (**Figure 1**) (6). Approximately 75% of a given dose of tamoxifen is excreted into the biliary tract as inactive glucuronides (7).

Cancer-associated pain resulting from metastases, anticancer treatment or surgery represents a major problem that is treated with analgesic drugs including morphine, codeine, and/or paracetamol (8). Morphine remains the gold standard for moderate and severe pain relief despite side effects that limit its chronic use (9). In humans, morphine acts on Mu opioid receptors (MORs) to produce analgesia. Its metabolism in the liver and brain leads mainly to the formation of morphine-3-glucuronide (M3G) (10) and morphine-6-glucuronide (M6G) (10–12). In human, morphine-glucuronidation is catalyzed by UGT2B7 and to a lower extent by a number of other UGT isoforms (UGT1A10, UGT1A1, 1A3, 1A6, 1A8, 1A9, 2A1, and UGT2B21) (9, 13, 14). However, in mice, UGT2B7 (the major enzyme involved in morphine metabolism in human) is absent but its activity is rescued by UGT2B21 and UGT2B36 (14–16).

Drug–drug interactions, resulting in either enzyme inhibition or induction, are a major limitation for the use of co-treatments (17). Usually, these drug–drug interactions are initially studied *in vitro* and then *in vivo* (18). While *in vitro* studies provide interesting results, their interpretation has proven to be complex when translated to *in vivo* drug metabolism (18).

Although anti-cancer agents share common catabolic pathways with many opiates, the impact of their co-administration on the metabolism and thus on the activity of anticancer drugs remains unexplored. These potential interactions between analgesic and anticancer drug metabolism could be used to treat more efficiently breast cancer. Therefore, as a proof of concept, we have investigated in mice whether morphine can alter tamoxifen metabolism.

Abbreviations: ACN, acetonitrile; ADME, absorption, distribution, metabolism, and/or excretion; AF, formic acid; AI, aromatase-inhibitors; CYP, cytochrome P450; ER, estrogen receptor; i.p., injected intraperitoneally; IS, internal standard; LC-MS/MS, liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry; M3G, morphine-3-glucuronide; M6G, morphine-6-glucuronide; MOR, Mu opioid receptors; SEM, standard error of the mean; SERM, selective estrogen receptor modulator; TDM, therapeutic drug monitoring; UGT, UDP-glucuronosyltransferases; SULT, sulfotransferase.

METHODS

Animals

Experiments were performed with 11- to 29-week-old female C57BL/6J mice (23 ± 4 g; Charles River, L'Arbresle, France). Animals were housed according to a 12-h light–dark cycle, at a temperature of 22°C ± 2°C and provided with food and water *ad libitum*. All procedures were performed in accordance with European directives (2010/63/EU) and were approved by the regional ethics committee and the French Ministry of Agriculture (license no. APAFIS#16827-2018092113192911 v4 to YG).

Blood Collection

The tail of the mouse was anesthetized locally with a cutaneous application of lidocaine/prilocaïne 5% (Zentiva, Paris, France). After 5 min, a small incision was performed at the end of the tail and 10 µl of blood was collected using a

calibrated capillary (Minicaps End-to-End 10 µl; Hischmann, Eberstadt Germany).

Tamoxifen and Morphine Injections

Female mice were injected intraperitoneally (i.p., calibrated Hamilton syringe) with 10 mg/kg of tamoxifen (in 90% olive oil/10% ethanol, v/v; Sigma Aldrich, Lyon, France), and then with NaCl 0.9% at 0, 1, and 2 h following tamoxifen administration (**Figure 2**). Blood was collected by tail vein sampling (see above) just before and at 1, 2, 4, 8, 24, and 48 h after tamoxifen injection (**Figure 2**). A second injection of tamoxifen was then performed at 48 h and immediately followed by an injection of either 10 mg/kg of morphine–HCl (diluted in 0.9% NaCl; Francopia, Paris, France) or saline solution (0.9% NaCl only). Mice then received two additional injections of morphine or saline at 1 and 2 h after the second tamoxifen dose. Blood was collected at 1, 2, 4, 8, 24, and 48 h after the second tamoxifen injection (**Figure 2**).

Sample Preparation

The blood was transferred from the capillary into a microtube containing 10 µl of heparin and frozen at −20°C. On the next day, blood was thawed and 10 µl of an internal standard (IS; see below) and 100 µl of ice-cold acetonitrile (ACN; Thermo Scientific, San Jose, USA) were added. The samples were next vortexed and centrifuged at 20,000 g during 15 min at 4°C. The supernatants were collected, dried under vacuum, and suspended in 15 µl of 50% methanol/0.1% formic acid (v/v; Sigma Aldrich) prior to LC-MS/MS analysis.

Microsome Preparation

Liver tissues were collected from 10-week-old male C57/BL6J mice. Samples were pooled and homogenized with an Ultra Turrax instrument (Ika, Staufen, Germany) in 10 ml of extraction buffer (100 mM Na phosphate buffer, pH 7.4, 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, protease inhibitor cOmplete Mini, EDTA-free, Roche, Basel, Switzerland). The homogenate was then sonicated (2 × 10 s, 100 W) and centrifuged for 12 min at 2,000 g (4°C). The supernatant was transferred into polycarbonate ultracentrifuge tubes (Beckman Instruments, Palo Alto, USA), completed with extraction buffer and centrifuged 40 min at 10,000 g and 4°C in a type-70 Ti Rotor (Beckman Coulter, Brea, USA). The resulting supernatant was then centrifuged for 130 min at 130,000 g (4°C), and the pellet obtained was suspended in 800 µl of storage buffer (100 mM Na phosphate buffer, pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 20% glycerol; Sigma Aldrich) and frozen. Protein concentration was determined using the Bradford method (Protein Assay, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Enzymatic Activity Assay

One hundred micrograms of liver microsomes were used to perform 4OH-tamoxifen glucuronidation assays. First, increasing concentrations of 4OH-tamoxifen (10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 125, 150, 200, 250, and 300 µM; LGC Standard, Molsheim, France) with a fixed concentration of morphine (500 µM) were dried under vacuum. Morphine was suspended in 4 mM $MgCl_2$ adjusted with H_2O, and each 4OH-tamoxifen concentration was diluted with 69 µl of the morphine-containing mix.

Microsomes were incubated for 15 min at 4°C in the presence of alamethicin (30 µg/mg of protein; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) and Tris–HCl buffer (400 mM) adjusted with H_2O. Then, 75 µl of microsome were added to each 4OH-tamoxifen concentration and tubes were equilibrated at 37°C during 5 min. The enzymatic reactions were started with the addition of 6 µl of UDPGA to a final concentration of 5 mM. Reactions were stopped 20 s later with 900 µl of cold 100%

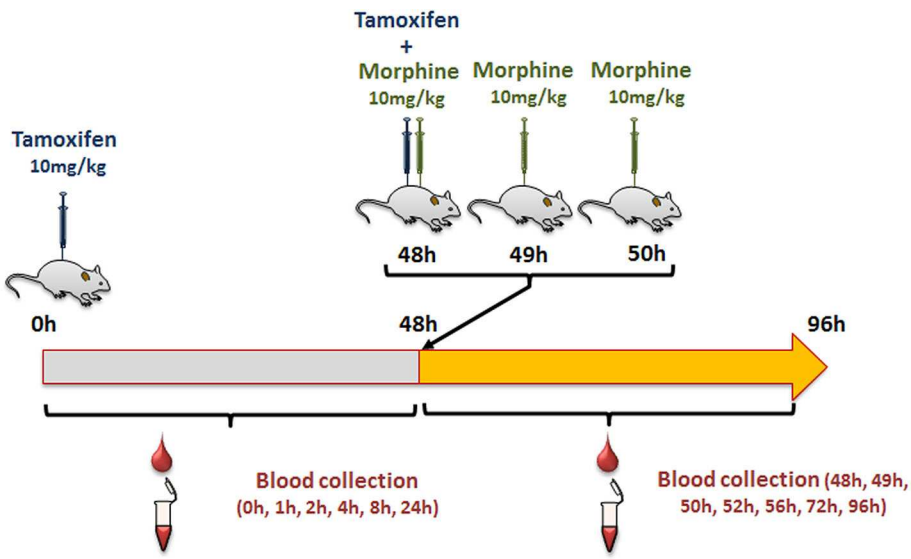


FIGURE 2 | Protocol used to study tamoxifen–morphine drug–drug interactions.

methanol. Samples were then diluted (1:5), and an IS (see below) was added to each sample. Samples were centrifuged for 15 min at 20,000 *g*, and 4°C and the supernatants were dried under vacuum and then suspended in 45 µl of 50% methanol/0.1% formic acid (v/v) prior to LC-MS/MS analysis. K_m and V_{max} were obtained with a Michaelis-Menten plot following a non-linear curve fit with the least-squares method (GraphPad Prism 6 software).

LC-MS/MS Instrumentation and Analytical Conditions

Analyses were performed with a Dionex Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Scientific) coupled with a triple quadrupole Endura mass spectrometer. Xcalibur v2.0 software was used to control the system (Thermo Electron, Villebon Sur Yvette, France). Samples were loaded onto an Accucore RP-MS column (150 × 1 mm, 2 µm, flow of 90 µl/min; Thermo Electron) heated at 40°C. Buffer A was 1% ACN/98.9% H_2O/0.1% formic acid (v/v/v), whereas buffer B was 99.9% ACN/0.1% formic acid (v/v). The gradient used is detailed in **Supplementary Table 1**.

Electrospray ionization was achieved in the positive mode with the spray voltage set at 3,500 V. Nitrogen was used as the nebulizer gas, and the ionization source was heated to 250°C. Desolvation (nitrogen) sheath gas was set to 18 Arb and Aux gas was set to 7 Arb. Ion transfer tube was heated at 297°C. Q1 and Q2 resolutions were set at 0.7 FWHM, whereas collision gas (CID, argon) was set to 2 mTorr. Identification of the compounds was based on precursor ion, selective fragment ions, and retention times. Selection of the monitored transitions and optimization of collision energy and RF Lens parameters were manually determined (see **Supplementary Table 1** for details). Qualification and quantification were performed in MRM mode using Quan Browser software (Thermo Scientific).

Statistics

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 Software. Results were presented as mean values ± standard error of the mean (SEM). Groups were compared using multiple *t*-tests.

RESULTS

Enzymatic Study *in vitro*

As 4OH-tamoxifen is the major active metabolite of tamoxifen in mice, *in vitro* experiments were performed on mouse liver microsomes to study the impact of 500 µM of morphine on the glucuronidation of 4OH-tamoxifen. Morphine was used at 500 µM to determine the K_m of the glucuronidation of 4OH-tamoxifen as this concentration corresponds to the K_m previously determined for morphine glucuronidation in mice (12, 19). As shown in **Figure 3**, morphine significantly affects the production of 4OH-tamoxifen-glucuronide. Specifically, morphine significantly reduced the production of 4OH-tamoxifen-glucuronide when 10 to 50 µM and 70 µM of tamoxifen were used. K_m values for the production of 4OH-tamoxifen-glucuronide in the absence and presence of morphine, as determined by the Michaelis-Menten equation, were 68 and 98.6 µM (+45%), respectively.

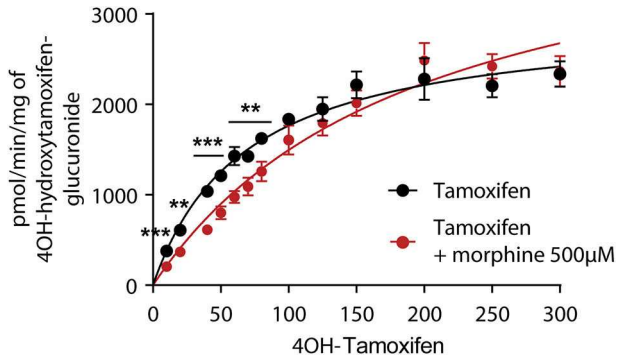


FIGURE 3 | Morphine (500 µM) inhibits the formation of 4OH-tamoxifen-glucuronide *in vitro*. A *t*-test using the Holm–Sidak method was performed to compare each concentration of 4OH-tamoxifen. $n = 7$ for tamoxifen alone and $n = 5$ in the presence of morphine; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$. Values are means ± SEM.

These results indicate that morphine reduces 4OH-tamoxifen glucuronidation *in vitro*.

Study of Tamoxifen Metabolism *in vivo*

First, we determined whether multiple injections of tamoxifen would alter its own metabolism (**Figures 2**, **4A**). Blood was collected before and 1, 2, 4, 8, 24, and 48 h after the first (**Figure 4A**, white part) and the second injection of tamoxifen (**Figure 4A**, gray part). Tamoxifen, 4OH-tamoxifen, and endoxifen-glucuronide concentrations in the blood did not vary significantly at any time point between the two tamoxifen injections (**Figure 4B**). In contrast, a significant increase in the concentrations of 4OH-tamoxifen-glucuronide, N-desmethyltamoxifen and endoxifen was observed. Accordingly, drug metabolic ratios (i.e., the concentration ratio of a metabolite compared to its parent molecule) were significantly altered at different time points (**Figures 5A–F**). The ratio of endoxifen/N-desmethyltamoxifen was significantly elevated at 4 and 8 h compared to the first injection suggesting an increase in endoxifen synthesis (**Figure 5C**). In a more dramatic manner, 4OH-tamoxifen glucuronidation was increased by 1.5- to 2-fold at all time points compared to the first injection (**Figure 5F**). Similarly, the $t = 2$ h ratio of endoxifen-glucuronide to its parent molecule endoxifen showed a 3-fold increase compared to the first injection (**Figure 5E**). On the other hand, no difference was observed for 4OH-tamoxifen/tamoxifen (**Figure 5A**), N-desmethyltamoxifen/tamoxifen (**Figure 5B**), and endoxifen/4OH-tamoxifen ratios (**Figure 5D**). Together, these results indicate that tamoxifen metabolism is slightly potentiated following two subsequent injections of the drug.

As morphine has a short half-life in mice (30 min), we have performed three injections of morphine to reach adequate concentrations in the blood (**Supplementary Figure 1**). The highest concentrations of morphine and M3G in the blood were reached after 2 h (1,599 ± 336 pmol/ml and 9,773 ± 1,274 pmol/ml, respectively). Morphine was still present after 8 h, allowing a long-lasting competition with tamoxifen metabolism.

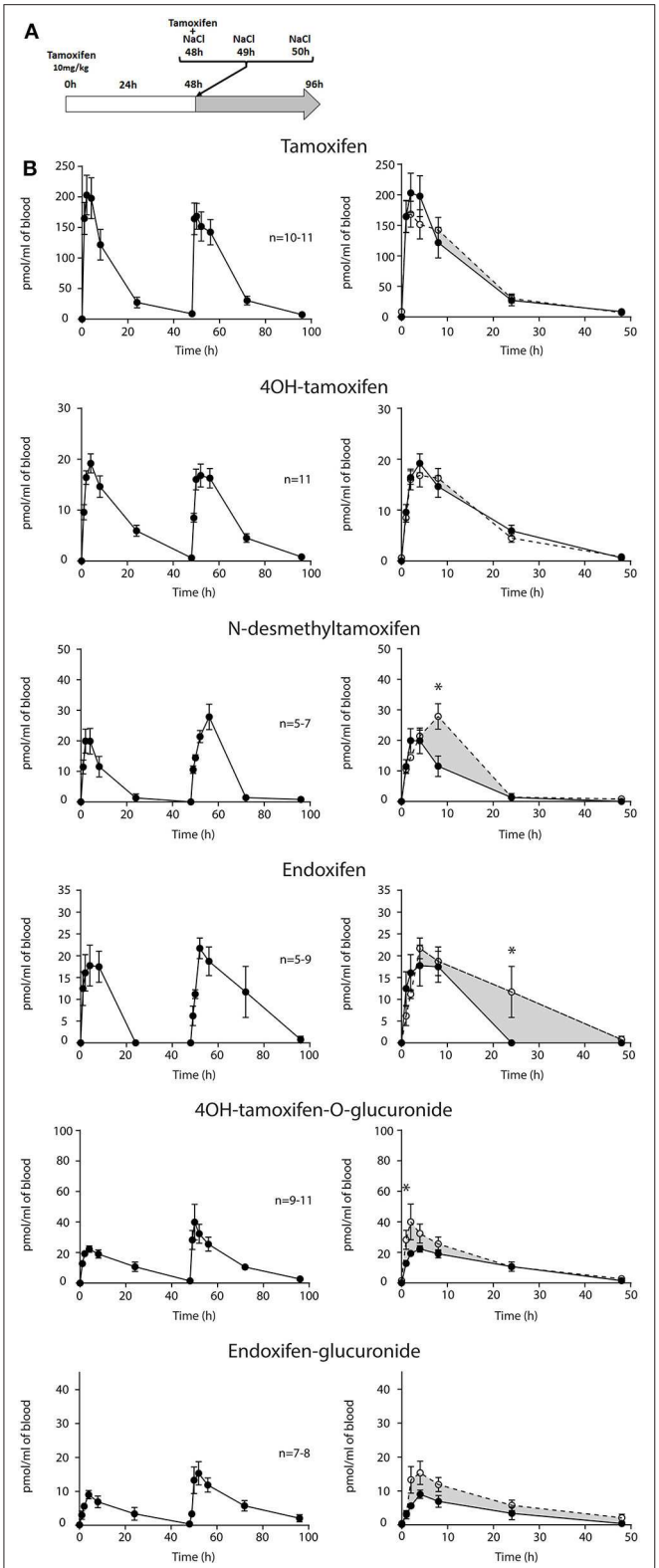


FIGURE 4 | Tamoxifen metabolism is affected by a prior injection. Effect of two subsequent injections of tamoxifen (10 mg/kg i.p.) on the levels of tamoxifen and its metabolites. **(A)** Protocol. Injections of NaCl 0.9% at 0 h, 1 h, and 2 h are not represented. **(B)** Left panels, levels of tamoxifen, 4OH-tamoxifen,

(Continued)

FIGURE 4 | N-desmethyltamoxifen, endoxifen, 4OH-tamoxifen-glucuronide, and endoxifen-glucuronide during 96 h. Right panels correspond to the superimposition of the first 0–48 h (white area) and last 48–96 h (gray area). The gray area corresponds to an increase in the quantity of the corresponding molecule after the second injection (48–96 h). Multiple *t*-tests with the Holm–Sidak correction were applied. Values are means ± SEM. $^*p < 0.05$.

Then, female mice were injected twice with tamoxifen (at 0 and 48 h) in addition to morphine (at 48, 49, and 50 h) and blood samples were collected (**Figure 6A**). Following morphine injections, the blood concentrations of tamoxifen, 4OH-tamoxifen, 4OH-tamoxifen-glucuronide, endoxifen, and endoxifen-glucuronide were significantly increased compared to the first injection of tamoxifen (**Figure 6B**). Only a tendency was observed for N-desmethytamoxifen. More importantly, ratios between 4OH-tamoxifen/tamoxifen (**Figure 7A**) were significantly decreased by 1/2- to 1/5-fold 1, 2, and 8 h after the injection of morphine, suggesting that 4OH-tamoxifen was processed into its metabolites at a faster rate in the presence of morphine. Indeed, the ratios of 4OH-tamoxifen-glucuronide/4OH-tamoxifen showed a significant increase (2- to 3-fold) at every time point (**Figure 7F**). Similarly, endoxifen-glucuronide/endoxifen ratios (**Figure 7E**) were dramatically increased (1.5- to 4-fold) at 2, 4, and 8 h after the injection of morphine. On the other hand, the ratios of N-desmethyltamoxifen/tamoxifen (**Figure 7B**), endoxifen/N-desmethyltamoxifen (**Figure 7C**) and endoxifen/4OH-tamoxifen (**Figure 7D**) were not altered by morphine administration. Together, these results indicate that the inactivation of tamoxifen and its active metabolites is exacerbated in the presence of equimolar amounts of morphine.

DISCUSSION

Repeated Tamoxifen Treatment Potentiates Glucuronide Formation *in vivo*

Our results show that the blood formation pattern of N-desmethyltamoxifen and endoxifen is slightly modified *in vivo* after two subsequent tamoxifen treatments. Indeed, we observed a higher peak concentration in the case of N-desmethyltamoxifen and a slower elimination for endoxifen upon the second administration of tamoxifen. Furthermore, analysis of metabolic ratios revealed an increase in 4OH-tamoxifen-glucuronide and endoxifen-glucuronide formation compared to their parent drugs when animals received a second injection of tamoxifen. Such an increase of glucuronidation can be related to induction of the expression of UGTs present in the liver occurring 48 h after the first injection of tamoxifen. Indeed, it has been described that several xenobiotics are able to promote UGT expression by acting on regulatory elements in the cell (20). Tamoxifen acts as a selective modulator on the ER, which, in turn, modulates the activity of numerous transcription factors implicated in the regulation of gene expression. Importantly, tamoxifen has been shown to increase the expression of CYP enzymes involved in its own metabolism, such as CYP3A4 (21). In the same manner,

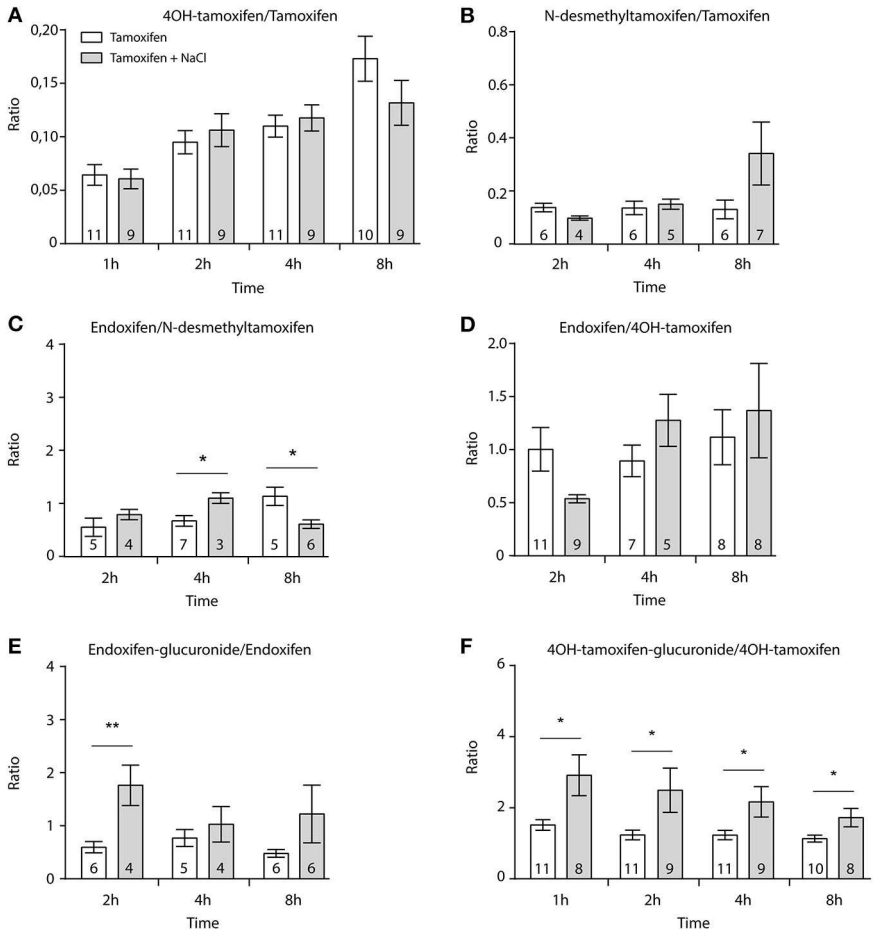


FIGURE 5 | Tamoxifen potentiates its own metabolism. Ratio between metabolites and parent compounds. **(A)** 4OH-tamoxifen/tamoxifen, **(B)** N-desmethyltamoxifen/tamoxifen, **(C)** endoxifen/N-desmethyltamoxifen, **(D)** endoxifen/4OH-tamoxifen, **(E)** endoxifen-glucuronide/endoxifen, and **(F)** 4OH-tamoxifen-glucuronide/4OH-tamoxifen. *N* are indicated within columns. Values are means ± SEM. *t*-tests; $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.001$.

one may hypothesize that the first injection of tamoxifen induced the expression of UGTs, resulting in a potentiation of 4OH-tamoxifen and endoxifen glucuronidation upon the second treatment.

Surprisingly, despite an increase in tamoxifen glucuronidation, we observed no concurrent decrease in the concentrations of 4OH-tamoxifen or endoxifen. The main degradation pathway of tamoxifen is glucuronidation, but significant amounts of its two active metabolites are eliminated through sulfation. Several sulfotransferase (SULT) isoforms (1A1, 1E1, and 2A1) have been implicated in the degradation of 4OH-tamoxifen (22). In addition, it has been shown *in vitro* that tamoxifen metabolites are able to inhibit SULT2A1 through mixed or non-competitive inhibition (23). Therefore, it is possible that our first tamoxifen administration inhibited SULT expression toward 4OH-tamoxifen and endoxifen. Thus, the balance between glucuronidation and sulfation could be modified without affecting 4OH-tamoxifen or endoxifen levels. Nevertheless, this hypothesis remains to be tested.

Morphine Increases Glucuronidation of Tamoxifen Active Metabolites

Morphine was expected to reduce the glucuronidation of tamoxifen active metabolites through direct competition on the UGT-binding site as observed *in vitro*. Surprisingly, our results showed a dramatic increase in the levels of all active and inactive metabolites of tamoxifen when morphine was co-administered. The significant elevated levels of tamoxifen found in the blood after the coinjection with morphine may explain the increase observed for all compounds. This increase is likely to rely on differences of absorption due to drug–drug interactions with morphine rather than variability in tamoxifen injections. This point is strengthened by the fact that 19 mice were injected using a calibrated Hamilton syringe. Ratio between metabolites and their corresponding parent molecules were established to normalize the metabolite production with the tamoxifen injections. Analysis of the ratio revealed that morphine dramatically decreased the amount of 4OH-tamoxifen relative to that of its prodrug in the blood of tamoxifen-treated mice. This decrease is likely related to the concurrent

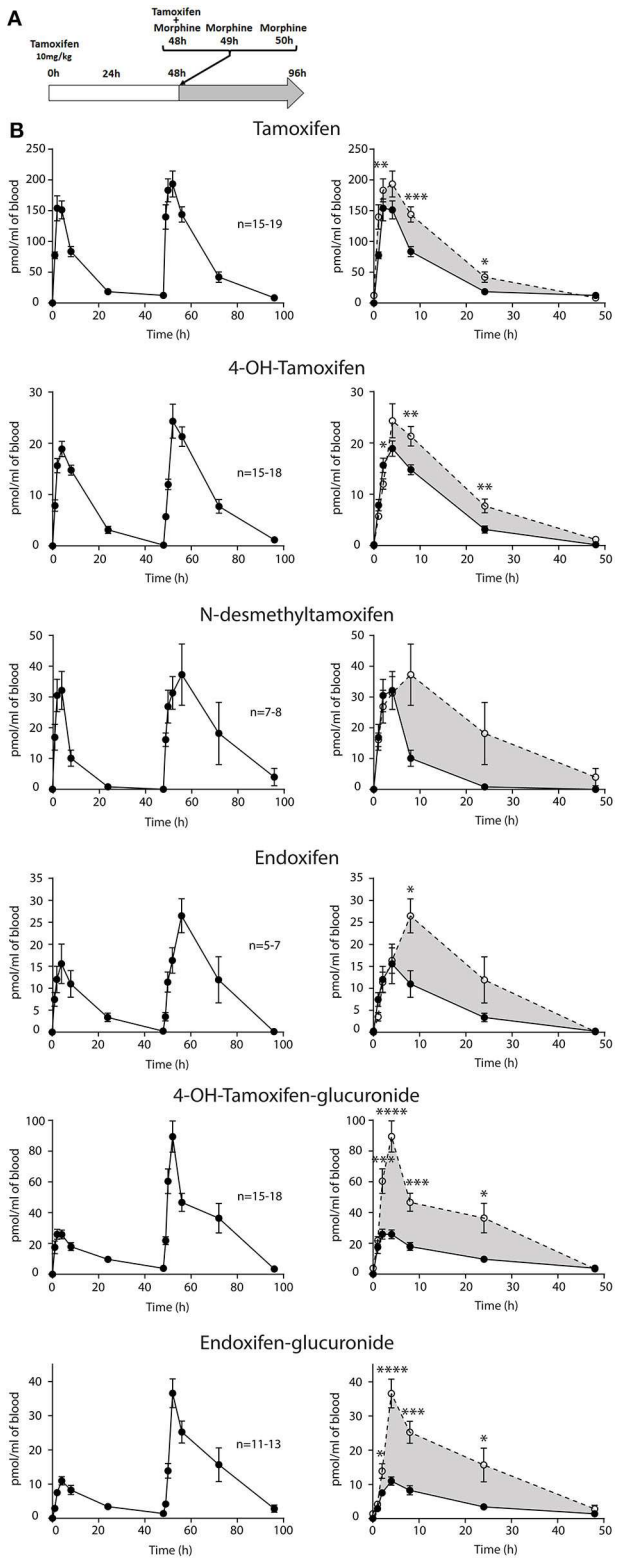


FIGURE 6 | Morphine increases tamoxifen metabolism. Effect of three injections of morphine (10 mg/kg i.p.) on the blood concentrations of tamoxifen, 4OH-tamoxifen, N-desmethyltamoxifen, endoxifen, 4OH-tamoxifen-glucuronide, and endoxifen-glucuronide. **(A)** Protocol.

(Continued)

FIGURE 6 | Injections of NaCl 0.9% at 0, 1, and 2 h are not represented. **(B)** Left panels, levels of tamoxifen, 4OH-tamoxifen, N-desmethyltamoxifen, endoxifen, 4OH-tamoxifen-glucuronide, and endoxifen-glucuronide during 96 h. Right panels correspond to the superimposition of the first 0–48 h (white area) and last 48–96 h (gray area). Gray area corresponds to an increase of the quantity of the corresponding molecule after the second injection (48–96 h). Values are means ± SEM. $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$.

massive increase of the glucuronidation of 4OH-tamoxifen and endoxifen.

It seems improbable that morphine would act as a cofactor of UGTs, allowing faster glucuronidation since it did not occur in our *in vitro* experiments. A potential impact of morphine on the entry of tamoxifen in hepatocytes is also unlikely because tamoxifen is known to cross the cell membrane passively (7), whereas morphine influx relies on transporters including organic cation transporter 1 (OCT1) (24). The last type of common molecular targets in the metabolism of tamoxifen and morphine are MRP (multidrug resistance-associated protein) and MDR (multidrug resistant protein) transporters driving M3G, 4OH-tamoxifen, endoxifen, 4OH-tamoxifen-glucuronide, and endoxifen-glucuronide out of the cell (7, 16, 25, 26). One hypothesis involving those transporters may be that morphine decreases the efflux rate of tamoxifen active metabolites (and thus increases their glucuronidation rate). Additional studies are needed to decipher the molecular mechanism underlying this atypical change in tamoxifen metabolism.

In conclusion, co-administration of morphine in mice appears to promote the inactivation of the potent 4OH-tamoxifen and endoxifen metabolites. In light of these findings, we hypothesize that morphine could reduce the potency of tamoxifen anticancer treatment in mice. Further studies should determine if the impact of morphine on tamoxifen metabolism is sufficient to result in changes in anticancer activity at therapeutic doses.

Strengths and Limitations

We chose to associate morphine with tamoxifen to develop our methodology as it was expected to be a simple model focusing primarily on the glucuronidation process. Morphine is mainly metabolized by UGTs and was not expected to impact CYP activity. Morphine and tamoxifen co-treatments are given after surgeries or in the case of severe cancer pain (27). Otherwise, codeine and/or paracetamol are widely prescribed (8). In human, these two compounds are metabolized by the same CYPs (6D6/3A4) and UGTs (1A10, 1A4, 1A8, 2B7, and 2B15) (28, 29) as tamoxifen and might have a more complex impact on tamoxifen metabolic pathways (30, 31).

A main limitation of our study is that tamoxifen and morphine metabolisms differ in mice compared to humans. 4OH-tamoxifen is the major active mouse metabolite whereas endoxifen is found at greater concentrations in human serum. However, our approach using the isotopic dilution allowed us to observe non-negligible levels of both endoxifen and endoxifen-glucuronide in the blood of tamoxifen-treated mice. In mice, the Cyp2d gene cluster displays nine functional genes

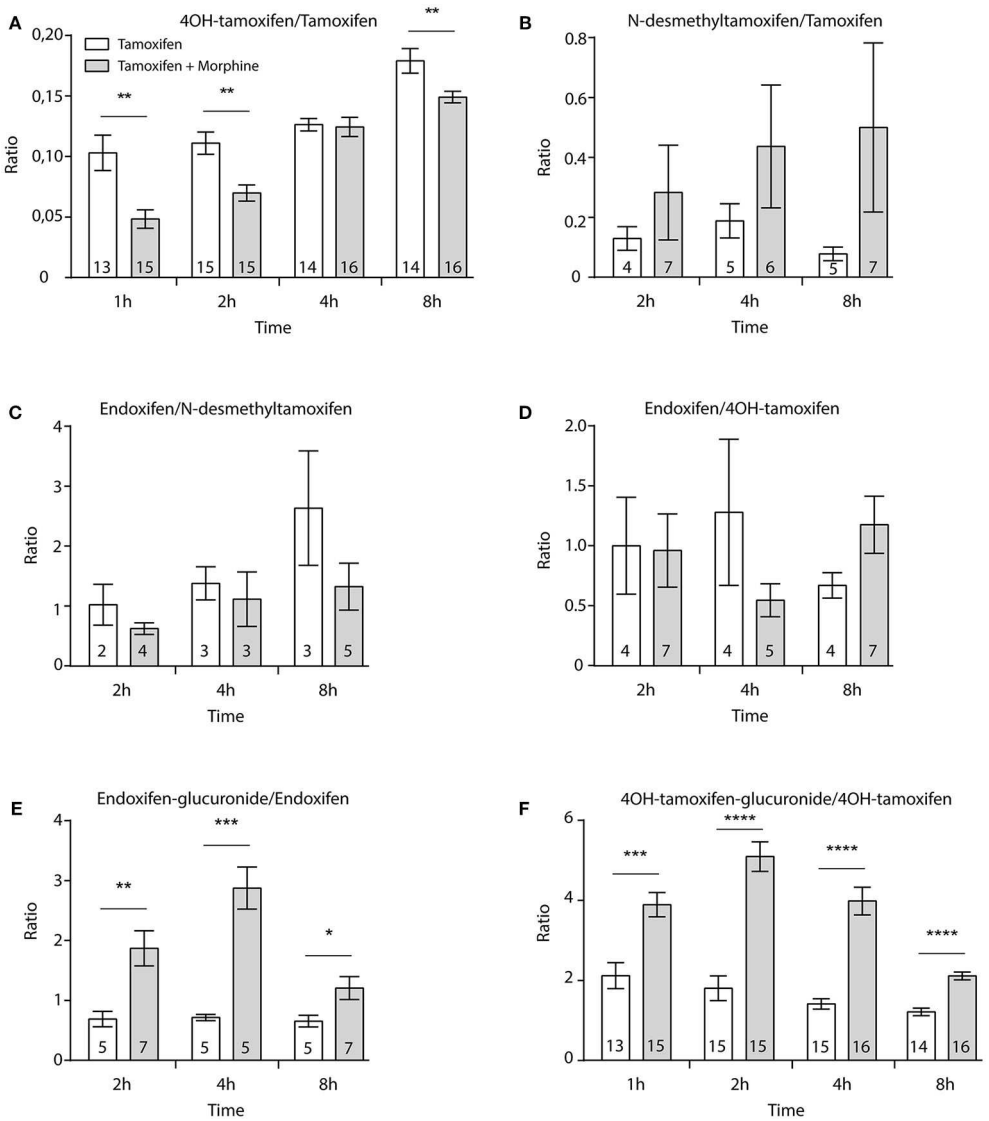


FIGURE 7 | Morphine promotes the inactivation of tamoxifen through increased glucuronidation. Effect of three injections of morphine (10 mg/kg i.p.) on the ratio between metabolites and parent compounds. **(A)** 4OH-tamoxifen/tamoxifen, **(B)** N-desmethyltamoxifen/tamoxifen, **(C)** endoxifen/N-desmethyltamoxifen, **(D)** endoxifen/4OH-tamoxifen, **(E)** endoxifen-glucuronide/endoxifen, and **(F)** 4OH-tamoxifen-glucuronide/4OH-tamoxifen. *N* are indicated within columns. *t*-tests; $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$; $^{****}p < 0.0001$.

(Cyp2d9, Cyp2d10, Cyp2d11, Cyp2d12, Cyp2d13, Cyp2d22, Cyp2d26, Cyp2d34, and Cyp2d40), whereas humans only have one (CYP2D6) (4). Therefore, the presence of endoxifen suggests that CYP2D6 activity is rescued by an alternative CYP.

In addition, morphine is only metabolized into M3G in mice vs. M3G and M6G in humans (32, 33). Nevertheless, both species eliminate tamoxifen and morphine predominantly through glucuronidation. UGT2B7 (15), the main UGT involved in morphine metabolism in humans, is absent in mice. However, morphine and tamoxifen glucuronidation could be compensated by other enzymes including the mouse homologs of human UGT2B6, 2C9, 2C19, 3A4/5 (34), UGT2B36, and UGT2B21 (14, 15). These differences lead to a tamoxifen half-life of 27 h in humans and 6.8 h in mice (4), as well as a morphine half-life of 30 min in mice and 2 h in humans (32, 33). Despite the existence of mouse equivalents to human CYP and UGT isoforms, major differences in isoform sequence and expression patterns limit the extrapolation of mouse data to humans. The development of humanized mouse models for CYP and UGT genes will allow overcoming such issues (34, 35).

Drug–drug interactions can lead to severe adverse effects and predicting these interactions *in vivo* is challenging. Thus, the Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA) are frequently publishing new guidelines regarding *in vitro* and *in vivo* drug–drug interaction

studies (36). We have used an *in vivo* methodology to monitor modulations of tamoxifen metabolism. Intraperitoneal injections of tamoxifen were used instead of oral administration (the typical route of administration in humans) in order to better control the given amounts of tamoxifen and morphine (37). Indeed, the most used method is intraperitoneal injection, because the amount of administered compound can be better controlled, but delivery by oral gavage is also possible. However, oral administration suffers from significant first-pass metabolism (38), which limits absorption (39) and introduces inter-individual variability in drug metabolism (40). The pharmacokinetics of tamoxifen were obtained by quantification of tamoxifen and its metabolites following an initial injection (10 mg/kg). Then, a second injection was used to determine its pharmacokinetics in the absence or the presence of the competing drug morphine. Therefore, it was possible to accurately compare tamoxifen pharmacokinetics in the same animal to assess its potential interaction with morphine *in vivo*. It is however important to determine whether an injection of the drug of interest can induce adaptive processes responsible for differences in its metabolism following a second injection or chronic treatment.

CONCLUSIONS

In this study, we have investigated the effects of morphine on tamoxifen metabolism *in vitro* and *in vivo*. We have shown that *in vitro* morphine inhibits 4OH-tamoxifen glucuronidation. Conversely, morphine reduced the blood levels of 4OH-tamoxifen in mice, while the inactivation of tamoxifen active compounds through glucuronidation greatly increased.

Our results suggest that morphine co-treatment could dramatically affect tamoxifen efficacy and emphasize the need to test more common analgesics (e.g., codeine or paracetamol) in humans to re-evaluate the impact of pain treatments on anti-cancer drug metabolism and pharmacological activity.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

All animal procedures were performed in accordance with European directives (2010/63/EU) and were approved by the regional ethics committee and the French Ministry of Agriculture (license No. APAFIS#16827-2018092113192911 v4 to YG).

CONSENT FOR PUBLICATION

All authors have approved the manuscript for submission.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: FG, VC, IW, and YG. Methodology: FG, VC, IW, PD, and YG. Investigation: FG, VC, IW, VH, TM, and A-SA. Writing—original draft: YG, FG, and PD. Writing—review and editing: YG, FG, A-SA, VH, TM, and PD. Funding acquisition, resources, and supervision: YG.

FUNDING

This work was funded by Fondation Alsace Contre le Cancer (YG), ITMO Cancer (YG), Inserm (YG), CNRS (YG), University of Strasbourg (YG), and Ministère Délégué à la Recherche et à l'Enseignement Supérieur (Ph.D. fellowship to IW and FG).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.00025/full#supplementary-material

REFERENCES

1. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers.* (2019) 5:66. doi: 10.1038/s41572-019-0111-2
2. Gail MH, Costantino JP, Bryant J, Croyle R, Freedman L, Helzlsouer K, et al. Weighing the risks and benefits of tamoxifen treatment for preventing breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* (1999) 91:1829–46. doi: 10.1093/jnci/91.21.1829
3. Kantelhardt EJ, Hanson C, Albert US, Wacker J. Breast cancer in countries of limited resources. *Breast Care.* (2008) 3:10–6. doi: 10.1159/000114409
4. Reid JM, Goetz MP, Buhrow SA, Walden C, Safgren SL, Kuffel MJ, et al. Pharmacokinetics of endoxifen and tamoxifen in female mice: implications for comparative *in vivo* activity studies. *Cancer Chemother Pharmacol.* (2014) 74:1271–8. doi: 10.1007/s00280-014-2605-7
5. Blume N, Leonard J, Xu ZJ, Watanabe O, Remotti H, Fishman J. Characterization of Cyp2d22, a novel cytochrome P450 expressed in mouse mammary cells. *Arch Biochem Biophys.* (2000) 381:191–204. doi: 10.1006/abbi.2000.1978
6. Wu B, Kulkarni K, Basu S, Zhang S, Hu M. First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *J Pharm Sci.* (2011) 100:3655–81. doi: 10.1002/jps.22568
7. Klein DJ, Thorn CF, Desta Z, Flockhart DA, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: tamoxifen pathway, pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics.* (2013) 23:643–7. doi: 10.1097/FPC.0b013e3283656bc1
8. Lee SK, Dawson J, Lee JA, Osman G, Levitin MO, Guzel RM, et al. Management of cancer pain: 1. Wider implications of orthodox analgesics. *Int J Gen Med.* (2014) 7:49–58. doi: 10.2147/IJGM.S42187
9. Laux-Biehlmann A, Mouheiche J, Veriepe J, Goumon Y. Endogenous morphine and its metabolites in mammals: history, synthesis, localization and perspectives. *Neuroscience.* (2013) 233:95–117. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.013
10. Grace PM, Ramos KM, Rodgers KM, Wang X, Hutchinson MR, Lewis MT, et al. Activation of adult rat CNS endothelial cells by opioid-induced Toll-like receptor 4 (Tlr4) signaling induces proinflammatory, biochemical, morphological, and behavioral sequelae. *Neuroscience.* (2014) 280:299–317. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.020
11. Lotsch J, Geisslinger G. Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clin Pharmacokinet.* (2001) 40:485–99. doi: 10.2165/00003088-200140070-00001
12. Weinsanto I, Laux-Biehlmann A, Mouheiche J, Maduna T, Delalande F, Chavant V, et al. Stable isotope-labelled morphine to study *in vivo* central and

peripheral morphine glucuronidation and brain transport in tolerant mice. *Br J Pharmacol.* (2018) 175:3844–56. doi: 10.1111/bph.14454
13. Depriest AZ, Puet BL, Holt AC, Roberts A, Cone EJ. Metabolism and disposition of prescription opioids: a review. *Forensic Sci Rev.* (2015) 27:115–45.
14. Ishii Y, Miyoshi A, Watanabe R, Tsuruda K, Tsuda M, Yamaguchi-Nagamatsu Y, et al. Simultaneous expression of guinea pig UDP-glucuronosyltransferase 2B21 and 2B22 in COS-7 cells enhances UDP-glucuronosyltransferase 2B21-catalyzed morphine-6-glucuronide formation. *Mol Pharmacol.* (2001) 60:1040–8. doi: 10.1124/mol.60.5.1040
15. Kurita A, Miyauchi Y, Ikushiro SI, Mackenzie PI, Yamada H, Ishii Y. Comprehensive characterization of mouse UDP-glucuronosyltransferase (Ugt) belonging to the Ugt2b subfamily: identification of Ugt2b36 as the predominant isoform involved in morphine glucuronidation. *J Pharmacol Exp Ther.* (2017) 361:199–208. doi: 10.1124/jpet.117.240382
16. Zelcer N, van de Wetering K, Hillebrand M, Sarton E, Kuil A, Wielinga PR, et al. Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2005) 102:7274–9. doi: 10.1073/pnas.0502530102
17. Beijnen JH, Schellens JH. Drug interactions in oncology. *Lancet Oncol.* (2004) 5:489–96. doi: 10.1016/S1470-2045(04)01528-1
18. Waters NJ. Evaluation of drug-drug interactions for oncology therapies: *in vitro-in vivo* extrapolation model-based risk assessment. *Br J Clin Pharmacol.* (2015) 79:946–58. doi: 10.1111/bcp.12563
19. Shiratani H, Katoh M, Nakajima M, Yokoi T. Species differences in UDP-glucuronosyltransferase activities in mice and rats. *Drug Metab Dispos.* (2008) 36:1745–52. doi: 10.1124/dmd.108.021469
20. Mackenzie PI, Hu DG, Gardner-Stephen DA. The regulation of UDP-glucuronosyltransferase genes by tissue-specific and ligand-activated transcription factors. *Drug Metab Rev.* (2010) 42:99–109. doi: 10.3109/03602530903209544
21. Johanning J, Kroner P, Thomas M, Zanger UM, Norenberg A, Eichelbaum M, et al. The formation of estrogen-like tamoxifen metabolites and their influence on enzyme activity and gene expression of ADME genes. *Arch Toxicol.* (2018) 92:1099–112. doi: 10.1007/s00204-017-2147-y
22. Falany JL, Pilloff DE, Leyh TS, Falany CN. Sulfation of raloxifene and 4-hydroxytamoxifen by human cytosolic sulfotransferases. *Drug Metab Dispos.* (2006) 34:361–8. doi: 10.1124/dmd.105.006551
23. Squirewell EJ, Qin X, Duffel MW. Endoxifen and other metabolites of tamoxifen inhibit human hydroxysteroid sulfotransferase 2A1 (hSULT2A1). *Drug Metab Dispos.* (2014) 42:1843–50. doi: 10.1124/dmd.114.059709
24. Tzvetkov MV, dos Santos Pereira JN, Meineke I, Saadatmand AR, Stingl JC, Brockmöller J. Morphine is a substrate of the organic cation transporter OCT1 and polymorphisms in OCT1 gene affect morphine pharmacokinetics after codeine administration. *Biochem Pharmacol.* (2013) 86:666–78. doi: 10.1016/j.bcp.2013.06.019
25. Iusuf D, Teunissen SF, Wagenaar E, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH. P-glycoprotein (ABCB1) transports the primary active tamoxifen metabolites endoxifen and 4-hydroxytamoxifen and restricts their brain penetration. *J Pharmacol Exp Ther.* (2011) 337:710–7. doi: 10.1124/jpet.110.178301
26. Teft WA, Mansell SE, Kim RB. Endoxifen, the active metabolite of tamoxifen, is a substrate of the efflux transporter P-glycoprotein (multidrug resistance 1). *Drug Metab Dispos.* (2011) 39:558–62. doi: 10.1124/dmd.110.036160
27. Swarm RA, Paice JA, Anghelescu DL, Are M, Bruce JY, Buga S, et al. Adult cancer pain, Version 3.2019, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Cancer Netw.* (2019) 17:977–1007. doi: 10.6004/jnccn.2019.0038
28. Vree TB, Verwey-van Wissen CP. Pharmacokinetics and metabolism of codeine in humans. *Biopharm Drug Dispos.* (1992) 13:445–60. doi: 10.1002/bdd.2510130607
29. Mutlib AE, Goosen TC, Bauman JN, Williams JA, Kulkarni S, Kostrubsky S. Kinetics of acetaminophen glucuronidation by UDP-glucuronosyltransferases 1A1, 1A6, 1A9 and 2B15. Potential implications in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol.* (2006) 19:701–9. doi: 10.1021/tx05 0317i
30. Goss PE, Strasser K. Aromatase inhibitors in the treatment and prevention of breast cancer. *J Clin Oncol.* (2001) 19:881–94. doi: 10.1200/JCO.200 1.19.3.881
31. Linardi A, Damiani D, Longui CA. The use of aromatase inhibitors in boys with short stature: what to know before prescribing? *Arch Endocrinol Metab.* (2017) 61:391–7. doi: 10.1590/2359-3997000000284
32. Hasselstrom J, Sawe J. Morphine pharmacokinetics and metabolism in humans. Enterohepatic cycling and relative contribution of metabolites to active opioid concentrations. *Clin Pharmacokinet.* (1993) 24:344–54. doi: 10.2165/00003088-199324040-00007
33. Handal M, Grung M, Skurtveit S, Ripel A, Morland J. Pharmacokinetic differences of morphine and morphine-glucuronides are reflected in locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav.* (2002) 73:883–92. doi: 10.1016/S0091-3057(02)00925-5
34. Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, et al. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst.* (2003) 95:1758–64. doi: 10.1093/jnci/djg108
35. MacLeod AK, McLaughlin LA, Henderson CJ, Wolf CR. Application of Mice Humanized for CYP2D6 to the study of tamoxifen metabolism and drug-drug interaction with antidepressants. *Drug Metab Dispos.* (2017) 45:17–22. doi: 10.1124/dmd.116.073437
36. Prueksaritanont T, Chu X, Gibson C, Cui D, Yee KL, Ballard J, et al. Drug-drug interaction studies: regulatory guidance and an industry perspective. *AAPS J.* (2013) 15:629–45. doi: 10.1208/s12248-013-9470-x
37. Whitfield J, Littlewood T, Soucek L. Tamoxifen administration to mice. *Cold Spring Harb Protoc.* (2015) 2015:269–71. doi: 10.1101/pdb.prot077966
38. Shin SC, Choi JS, Li X. Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. *Int J Pharm.* (2006) 313:144–9. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.01.028
39. Buchanan CM, Buchanan NL, Edgar KJ, Little JL, Malcolm MO, Ruble KM, et al. Pharmacokinetics of tamoxifen after intravenous and oral dosing of tamoxifen-hydroxybutenyl-beta-cyclodextrin formulations. *J Pharm Sci.* (2007) 96:644–60. doi: 10.1002/jps.20709
40. Undevia SD, Gomez-Abuin G, Ratain MJ. Pharmacokinetic variability of anticancer agents. *Nat Rev Cancer.* (2005) 5:447–58. doi: 10.1038/nrc1629

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

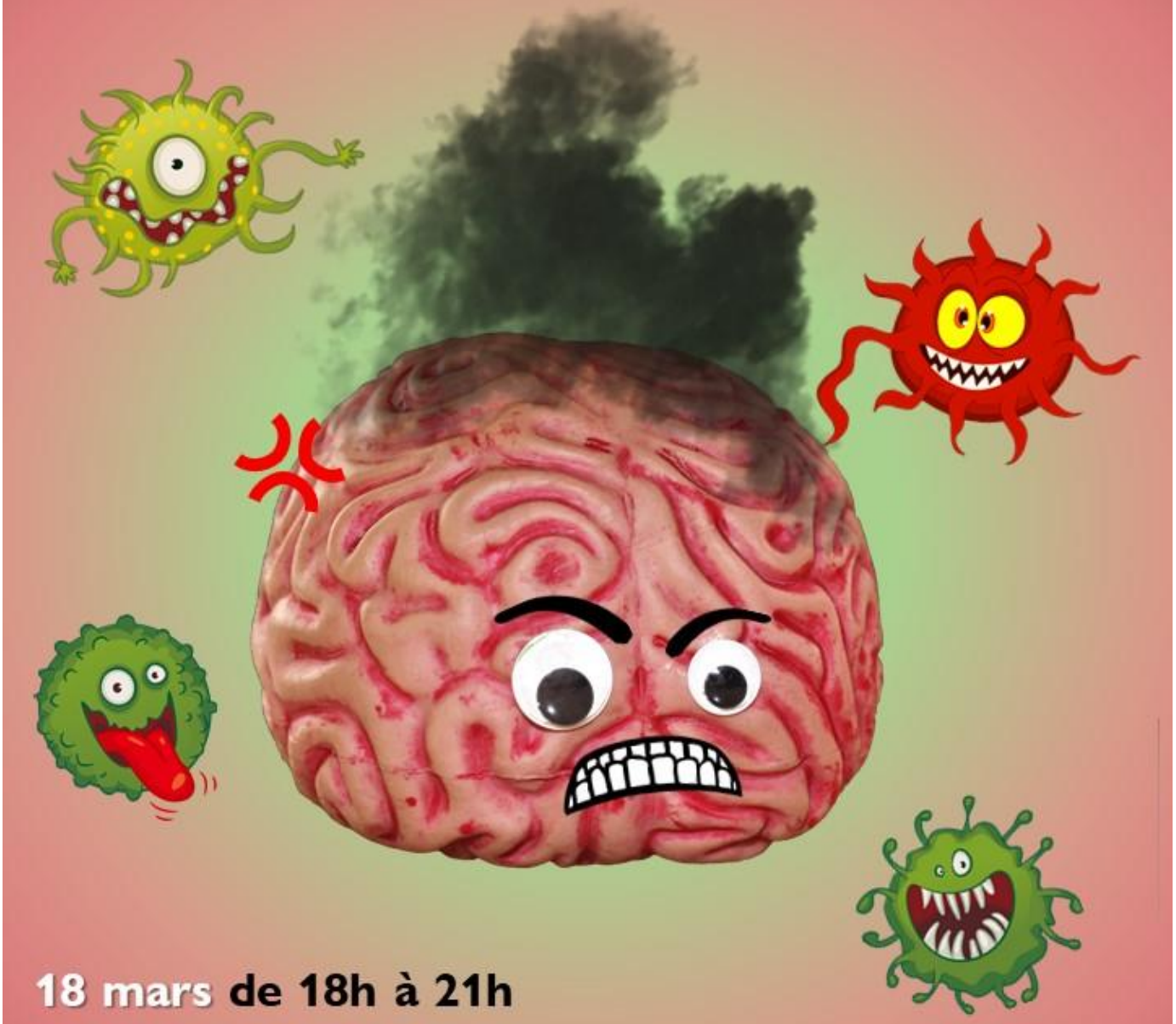
Copyright © 2020 Gabel, Aubry, Hovhannisyan, Chavant, Weinsanto, Maduna, Darbon and Goumon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Publication 5 en rédaction: Article principal de thèse

Neuroinflammation increases morphine metabolism in reactive astrocytes through Aryl Hydrocarbon Receptor and counteracts morphine anti-nociception in a mouse model of neuropathic pain.

Volodya Hovhannisyan, Abdel-Karim Berkati, Mélanie Kremer, Perrine Inquimbert, Florian Gabel, Virginie Andry, Alexandre Charlet & Yannick Goumon.

LE COVID NOUS TAPE SUR LE SYSTEME (NERVEUX) !



18 mars de 18h à 21h

Conférences interactives : Covid et atteintes neurologiques

A partir de 12 ans – Accès gratuit (sur réservation)

19 mars de 10h à 18h

Ateliers ludiques et pédagogiques pour toute la famille !

A partir de 5 ans – Prix d'entrée au Vaisseau

ALSACE | leVaisseau

LA SEMAINE DU CERVEAU

Annexe 6: Actions pédagogiques

Durant ma thèse, j'ai eu le plaisir d'avoir fait partie d'une association réunissant les étudiants en Master et en Doctorat, appelé Doctoneuro. Durant ces plusieurs années, j'ai été dans le pôle pédagogie en tant que chargé de mission ou vice-président de ce pôle. Le pôle pédagogie de Doctoneuro est connu pour participer à des événements tels que la Fête de la Science, les Kidz University ou encore la Semaine du Cerveau. Durant l'année 2021-2022, j'ai entrepris la création d'un nouvel événement avec l'équipe pédagogique du Vaisseau, un espace culturel pour les enfants.

L'événement « Le Covid nous tape sur le système (nerveux) ! » a été mis en place dans le but de transmettre au grand public les connaissances actuelles sur les atteintes neurologiques causées par la pathologie ou pas les contraintes sanitaires pour endiguer l'épidémie. Cette action de vulgarisation scientifique interdisciplinaire, mêlant immunologie et neurosciences, a pris place lors de la Semaine du Cerveau, les 18 et 19 mars 2022. Le vendredi 18 mars, une série de conférences a été organisée dans la soirée avec la participation del'immunologiste Samuel Liégois (MCU, IBMC), ainsi que des neuroscientifiques Didier Desaintjan (CR, INCI), Lucas Lecourtier (CR, LNCA), Vincent Loizeau (PhD, LNCA) et Jorge Mendoza (DR, INCI).

Le samedi 19 mars, des étudiants de l'association Doctoneuro et de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire ont proposé des ateliers ludiques autour des thématiques abordées pendant les conférences. Les stands étaient érigés pour la journée entière et les animations étaient majoritairement à destination du jeune public.

Au final, cet événement m'a permis de gérer une équipe de plus de 20 personnes, de répartir les tâches et de gérer convenablement le budget mis à ma disposition. De plus, l'événement a été financé à hauteur de 400 euros de la part de l'ITI-Neurostra, ce qui nous a permis de couvrir l'ensemble des frais avancés, un grand merci à eux pour le soutien ! Finalement, merci à Robin et Sarah qui m'ont aidé pour l'organisation ainsi que Lisa Saraceni du Vaisseau pour la confiance qu'elle m'a accordée dès le début du projet.



NEUREX WORKSHOP

OCTOBER
24th 2022
STRASBOURG

In neuroscience, sex-based differences impact all organ systems and subsequently affect a majority of health conditions, resulting in differences between men and women in disease risk factors, prevalence, clinical picture, and response to treatment.

The nociception-pain field particularly illustrates those sex-based differences. Chronic pain is common worldwide and the lack of effective treatments confers a tremendous burden on individuals and on the overall healthcare systems and society. Although opiates, such as morphine and its derivatives, remain the most potent painkillers available at the hospital, their use and efficiency are limited by mild (i.e., nausea, constipation) to severe side effects, including analgesic tolerance, opioid use disorders and ultimately respiratory depression, which can lead to death.

Over the past thirty years, clinical studies have shown that women report more severe pain at more locations than do men but also indicated a higher prevalence of pain treatment failures in women. These results correlates with data from pre-clinical studies indicating sex differences in the analgesic effect of morphine with a higher efficacy in males. Since then, the involvement of sex hormones, mu opioid receptor signalling, glial cells and metabolism as potential actors of these sex differences have been enlighten.

During this symposium, results obtained on sex-difference studies in the nociception-pain field at the pre-clinical and clinical levels will be presented. The meeting will be the occasion to foster the inclusion of females/women in (pre-)clinical studies in substantial numbers, a paramount prerequisite to reducing the clinical and socioeconomic impact of chronic pain.

VENUE
INCI CNRS, 8 ALLÉE ROUVILLOIS, STRASBOURG

ORGANISERS
VOLODYA HOVHANNISYAN, ALEXANDRE CHARLET
with the support of Euridol, ITI-Neurostra, HaPpY & USIAS
(University Medical Center Freiburg, Department Of Psychiatry And Psychotherapy)
DOMITILLE BOUDARD (Neurex)

— PROJECT INTERNEURON —

Program Interreg V Upper Rhine «Transcending borders with every project», Neurex, Institut du médicament de Strasbourg, BioValley France, CNRS, Université de Strasbourg, Région Grand Est, Collectivité européenne d'Alsace, Eurométropole Strasbourg, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Bernstein Center Freiburg, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie Freiburg, Neurozentrum Freiburg, Universität Freiburg, Universität Basel, Universitäre Psychiatrische Kliniken Basel, Kanton Aargau, Kanton Basel-Landschaft, Confédération suisse.

SEX DIFFERENCES IN PAIN EXPERIENCE AND MANAGEMENT

MONDAY, OCTOBER 24TH, 2022

09.00—10.00 **Jeffrey MOGIL** — (McGill University, Canada)
"Pain, sex and death"

10.00—11.00 **Serge MARCHAND** — (Université de Sherbrook, Canada)
"Endogenous pain modulation in healthy subjects and patients"

11.00—11.30 **COFFEE BREAK**

11.30—12.00 PhD AND POST-DOC PRESENTATIONS

11.30—11.45 **Anne-Sophie AUBRY** — (University of Strasbourg, France)
"Effect of sucrose bingeing on well-being and nociception in female and male mice"

11.45—12.00 **Etienne CLAUSS-CREUSOT** — (University of Strasbourg, France)
"GRABing the oxytocin until the pain goes away"

12.00—13.00 **Anne MURPHY** — (Georgia State University, USA)
"Impact of biological sex and age on opioid signalling in the rat periaqueductal gray"

13.00—14.30 **LUNCH BREAK**

14.30—15.30 **Michael SALTER** — (University of Toronto, Canada)
"Sex and pain: it's not always about the differences"

15.30—16.00 PhD AND POST-DOC PRESENTATIONS

15.30—15.45 **Juliette KAEFFERT** — (University of Strasbourg, France)
"Development of analgesic tolerance to DOR agonist: involvment of GRASP1 in the mechanism and sex differences?"

15.45—16.00 **Lucien RUELLE-LE GLAUNEC** — (University of Strasbourg, France)
"Sex Differences in Nociception and Pain in context with Autism Spectrum Disorders"

16.00—16.30 **COFFEE BREAK**

16.30—17.30 **Yannick GOUMON** — (University of Strasbourg, France)
"Sex differences in morphine anti-nociceptive effects"

Interneuron

Program and registration at **www.neurex.org**

Annexe 7: Organisation symposium

Un point extrêmement important à préciser à mes yeux est la considération du sexe comme étant une réelle variable biologique. Dans un contexte de douleur, bien que la plupart des patients souffrant de douleurs chroniques soient des femmes, depuis plus d'un demi-siècle, les rongeurs mâles constituent l'organisme modèle par défaut dans la recherche préclinique. Ainsi, cela se traduit par une compréhension incomplète de l'étiologie, de la symptomatologie et du traitement de cette maladie. De ce fait, la considération du sexe en tant que variable biologique nécessitera un changement global dans la réflexion de la culture scientifique. Pour apporter ma contribution à ce combat, j'ai organisé un symposium sur les différences entre les sexes dans le domaine de la douleur afin de promouvoir l'importance du sexe en tant que véritable variable biologique dans la recherche fondamentale et préclinique. Pour ce faire, j'ai sollicité plusieurs subventions et obtenu environ 13 500 € pour organiser cet événement. Des pionniers du domaine ont été invités du Canada (Jeffrey Mogil, Michael Salter et Serge Marchand), des Etats-Unis (Anne Murphy) ainsi que le magnifique Yannick Goumon, gloire à lui. J'ai également donné l'opportunité à quatre doctorants de communiquer leurs recherches lors de ce symposium. Au total, cet événement a rassemblé 86 personnes sur place et a connu un pic de 95 personnes en ligne (Zoom), en plus, on a trop bien mangé (et bieeen bu).

Annexe 8: Communications orales

Morphine-3-Glucuronide as a key actor of the sexual dimorphism in morphine-induced analgesia

Volodya Hovhannisyan, Florain Gabel, Virginie Andry, Sylvain Hugel, Yannick Goumon.

Euridol Days: Strasbourg, presentation de poster, 1er octobre 2021.

Morphine-3-Glucuronide as a key actor of the sexual dimorphism in morphine-induced analgesia

Volodya Hovhannisyan, Florain Gabel, Virginie Andry, Sylvain Hugel, Yannick Goumon.

Neurofrance: Congrès virtuel, présentation de poster, 19 avril 2021.

Does microglia-astrocyte crosstalk orchestrate sex differences in morphine central metabolism and its anti-nociceptive effects?

Volodya Hovhannisyan, Florian Gabel, Abdel-Karim Berkati, Virginie Andry, Yannick Goumon.

INRC: Valence, Espagne, présentation de poster, 4 Juillet 2022.

Différences sexuelles dans l'efficacité antalgique de la morphine

SFETD: Communication orale session « Jeunes talents - Espoirs de la recherche », Lille, France, 16 Novembre 2022.

MICROGLIA-ASTROCYTE CROSSTALK INCREASES MORPHINE METABOLISM DURING NEUROINFLAMMATION

Volodya Hovhannisyan, Abdel-Karim Berkati, Florian Gabel, Virginie Andry, Yannick Goumon.

French Young Glial Cell Club: Lyon, France, présentation de poster, 23 Mai 2023.

MICROGLIA-ASTROCYTE CROSSTALK INCREASES MORPHINE METABOLISM DURING NEUROINFLAMMATION

Volodya Hovhannisyan, Abdel-Karim Berkati, Florian Gabel, Virginie Andry, Yannick Goumon.

Neurofrance: Lyon, France, présentation de poster, 24 Mai 2023.

Références Bibliographiques

1) Abbott BD, Birnbaum LS, Perdew GH (1995) Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo. Dev Dyn 204:133-143.
2) Abrimian A, Kraft T, Pan YX (2021) Endogenous Opioid Peptides and Alternatively Spliced Mu Opioid Receptor Seven Transmembrane Carboxyl-Terminal Variants. Int J Mol Sci 22.
3) Aimone LD, Yaksh TL (1989) Opioid modulation of capsaicin-evoked release of substance P from rat spinal cord in vivo. Peptides 10:1127-1131.
4) Akahoshi E, Yoshimura S, Uruno S, Ishihara-Sugano M (2009) Effect of dioxins on regulation of tyrosine hydroxylase gene expression by aryl hydrocarbon receptor: a neurotoxicology study. Environ Health 8:24.
5) Al-Hasani R, Bruchas MR (2011) Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. Anesthesiology 115:1363-1381.
6) Albina JE, Mills CD, Henry WL, Jr., Caldwell MD (1990) Temporal expression of different pathways of 1-arginine metabolism in healing wounds. J Immunol 144:3877-3880.
7) Alilain WJ, Horn KP, Hu H, Dick TE, Silver J (2011) Functional regeneration of respiratory pathways after spinal cord injury. Nature 475:196-200.
8) Allard J (2019) Physiological properties of the lamina I spinoparabrachial neurons in the mouse. J Physiol 597:2097-2113.
9) Allen WE, Blosser TR, Sullivan ZA, Dulac C, Zhuang X (2023) Molecular and spatial signatures of mouse brain aging at single-cell resolution. Cell 186:194-208 e118.
10) Allette YM, Kim Y, Randolph AL, Smith JA, Ripsch MS, White FA (2017) Decoy peptide targeted to Toll-IL-1R domain inhibits LPS and TLR4-active metabolite morphine-3 glucuronide sensitization of sensory neurons. Sci Rep 7:3741.
11) Alvarez JI, Katayama T, Prat A (2013) Glial influence on the blood brain barrier. Glia 61:1939-1958.
12) Amedee T, Robert A, Coles JA (1997) Potassium homeostasis and glial energy metabolism. Glia 21:46-55.
13) Andersen G, Christrup L, Sjogren P (2003) Relationships among morphine metabolism, pain and side effects during long-term treatment: an update. J Pain Symptom Manage 25:74-91.
14) ANSM (2019) État des lieux de la consommation des antalgiques opioïdes et leurs usages problématiques. In.
15) Auvray M, Myin E, Spence C (2010) The sensory-discriminative and affective-motivational aspects of pain. Neurosci Biobehav Rev 34:214-223.
16) Badimon A et al. (2020) Negative feedback control of neuronal activity by microglia. Nature 586:417-423.
17) Bai T, Duan H, Zhang B, Hao P, Zhao W, Gao Y, Yang Z, Li X (2023) Neuronal differentiation and functional maturation of neurons from neural stem cells induced by bFGF-chitosan controlled release system. Drug Deliv Transl Res 13:2378-2393.
18) Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. Neuron 41:849-857.
19) Barbara JG (2002) IP3-dependent calcium-induced calcium release mediates bidirectional calcium waves in neurones: functional implications for synaptic plasticity. Biochim Biophys Acta 1600:12-18.
20) Baron R, Schwarz K, Kleinert A, Schattschneider J, Wasner G (2001) Histamine-induced itch converts into pain in neuropathic hyperalgesia. Neuroreport 12:3475-3478.

21) Barrot M (2012) Tests and models of nociception and pain in rodents. Neuroscience 211:39-50.
22) Bartley EJ, Fillingim RB (2013) Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. Br J Anaesth 111:52-58.
23) Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. Cell 139:267-284.
24) Basilico B, Pagani F, Grimaldi A, Cortese B, Di Angelantonio S, Weinhard L, Gross C, Limatola C, Maggi L, Ragozzino D (2019) Microglia shape presynaptic properties at developing glutamatergic synapses. Glia 67:53-67.
25) Becker LJ, Journee SH, Lutz PE, Yalcin I (2020) Comorbidity of chronic pain and anxiodepressive disorders: Deciphering underlying brain circuits. Neurosci Biobehav Rev 115:131-133.
26) Becker LJ et al. (2023) The basolateral amygdala-anterior cingulate pathway contributes to depression-like behaviors and comorbidity with chronic pain behaviors in male mice. Nat Commun 14:2198.
27) Beggs S, Salter MW (2007) Stereological and somatotopic analysis of the spinal microglial response to peripheral nerve injury. Brain Behav Immun 21:624-633.
28) Beggs S, Liu XJ, Kwan C, Salter MW (2010) Peripheral nerve injury and TRPV1-expressing primary afferent C-fibers cause opening of the blood-brain barrier. Mol Pain 6:74.
29) Beischlag TV, Luis Morales J, Hollingshead BD, Perdew GH (2008) The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 18:207-250.
30) Bellemare J, Rouleau M, Harvey M, Guillemette C (2010) Modulation of the human glucuronosyltransferase UGT1A pathway by splice isoform polypeptides is mediated through protein-protein interactions. J Biol Chem 285:3600-3607.
31) Belzung C, Lemoine M (2011) Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. Biol Mood Anxiety Disord 1:9.
32) Ben Haddou T, Beni S, Hosztafi S, Malfacini D, Calo G, Schmidhammer H, Spetea M (2014) Pharmacological investigations of N-substituent variation in morphine and oxymorphone: opioid receptor binding, signaling and antinociceptive activity. PLoS One 9:e99231.
33) Benbouzid M, Pallage V, Rajalu M, Waltisperger E, Doridot S, Poisbeau P, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2008) Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. Eur J Pain 12:591-599.
34) Bendszus M, Stoll G (2003) Caught in the act: in vivo mapping of macrophage infiltration in nerve injury by magnetic resonance imaging. J Neurosci 23:10892-10896.
35) Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain 33:87-107.
36) Bentivoglio M, Cotrufo T, Ferrari S, Tesoriero C, Mariotto S, Bertini G, Berzero A, Mazzarello P (2019) The Original Histological Slides of Camillo Golgi and His Discoveries on Neuronal Structure. Front Neuroanat 13:3.
37) Benzi G, Berte F, Crema A, Frigo GM (1967) Cerebral drug metabolism investigated by isolated perfused brain in situ. J Pharm Sci 56:1349-1351.
38) Bernardino AL, Kaushal D, Philipp MT (2009) The antibiotics doxycycline and minocycline inhibit the inflammatory responses to the Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi. J Infect Dis 199:1379-1388.

39) Bernier LP, Bohlen CJ, York EM, Choi HB, Kamyabi A, Dissing-Olesen L, Hefendehl JK, Collins HY, Stevens B, Barres BA, MacVicar BA (2019) Nanoscale Surveillance of the Brain by Microglia via cAMP-Regulated Filopodia. Cell Rep 27:2895-2908 e2894.
40) Bernshausen T, Jux B, Esser C, Abel J, Fritsche E (2006) Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice. Arch Toxicol 80:206-211.
41) Bessou P, Perl ER (1969) Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. J Neurophysiol 32:1025-1043.
42) Binshtok AM, Wang H, Zimmermann K, Amaya F, Vardeh D, Shi L, Brenner GJ, Ji RR, Bean BP, Woolf CJ, Samad TA (2008) Nociceptors are interleukin-1beta sensors. J Neurosci 28:14062-14073.
43) Birla H, Xia J, Gao X, Zhao H, Wang F, Patel S, Amponsah A, Bekker A, Tao YX, Hu H (2022) Toll-like receptor 4 activation enhances Orai1-mediated calcium signal promoting cytokine production in spinal astrocytes. Cell Calcium 105:102619.
44) Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F (1990) Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. J Neuroimmunol 27:229-237.
45) Blier P, Abbott FV (2001) Putative mechanisms of action of antidepressant drugs in affective and anxiety disorders and pain. J Psychiatry Neurosci 26:37-43.
46) Blomqvist A, Ma W, Berkley KJ (1989) Spinal input to the parabrachial nucleus in the cat. Brain Res 480:29-36.
47) Bobeck EN, Chen Q, Morgan MM, Ingram SL (2014) Contribution of adenylyl cyclase modulation of pre- and postsynaptic GABA neurotransmission to morphine antinociception and tolerance. Neuropsychopharmacology 39:2142-2152.
48) Bock KW, Bock-Hennig BS (2010) UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): from purification of Ah-receptor-inducible UGT1A6 to coordinate regulation of subsets of CYPs, UGTs, and ABC transporters by nuclear receptors. Drug Metab Rev 42:6-13.
49) Bodea LG, Wang Y, Linnartz-Gerlach B, Kopatz J, Sinkkonen L, Musgrove R, Kaoma T, Muller A, Vallar L, Di Monte DA, Balling R, Neumann H (2014) Neurodegeneration by activation of the microglial complement-phagosome pathway. J Neurosci 34:8546-8556.
50) Bohlen CJ, Friedman BA, Dejanovic B, Sheng M (2019) Microglia in Brain Development, Homeostasis, and Neurodegeneration. Annu Rev Genet 53:263-288.
51) Bohlen CJ, Bennett FC, Tucker AF, Collins HY, Mulinyawe SB, Barres BA (2017) Diverse Requirements for Microglial Survival, Specification, and Function Revealed by Defined-Medium Cultures. Neuron 94:759-773 e758.
52) Boitano AE, Wang J, Romeo R, Bouchez LC, Parker AE, Sutton SE, Walker JR, Flaveny CA, Perdew GH, Denison MS, Schultz PG, Cooke MP (2010) Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. Science 329:1345-1348.
53) Borghese L, Dolezalova D, Opitz T, Haupt S, Leinhaas A, Steinfarz B, Koch P, Edenhofer F, Hampl A, Brustle O (2010) Inhibition of notch signaling in human embryonic stem cell-derived neural stem cells delays G1/S phase transition and accelerates neuronal differentiation in vitro and in vivo. Stem Cells 28:955-964.
54) Bouhassira D, Letanoux M, Hartemann A (2013) Chronic pain with neuropathic characteristics in diabetic patients: a French cross-sectional study. PLoS One 8:e74195.
55) Bouhassira D, Lanteri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C (2008) Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. Pain 136:380-387.

56) Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. Nature 416:636-640.
57) Brambilla R, Hurtado A, Persaud T, Esham K, Pearse DD, Oudega M, Bethea JR (2009) Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B leads to increased axonal sparing and sprouting following spinal cord injury. J Neurochem 110:765-778.
58) Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu WH, Frydel B, Bramwell A, Karmally S, Green EJ, Bethea JR (2005) Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. J Exp Med 202:145-156.
59) Brands A, Munzel PA, Bock KW (2000) In situ hybridization studies of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 expression in rat testis and brain. Biochem Pharmacol 59:1441-1444.
60) Bruck W (1997) The role of macrophages in Wallerian degeneration. Brain Pathol 7:741-752.
61) Buckley DB, Klaassen CD (2007) Tissue- and gender-specific mRNA expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in mice. Drug Metab Dispos 35:121-127.
62) Buckley DB, Klaassen CD (2009) Induction of mouse UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in liver and intestine by activators of aryl-hydrocarbon receptor, constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, peroxisome proliferator-activated receptor alpha, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2. Drug Metab Dispos 37:847-856.
63) Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV (1999) Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. Neuron 23:297-308.
64) Bushong EA, Martone ME, Ellisman MH (2004) Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. Int J Dev Neurosci 22:73-86.
65) Butt AM, Duncan A, Berry M (1994) Astrocyte associations with nodes of Ranvier: ultrastructural analysis of HRP-filled astrocytes in the mouse optic nerve. J Neurocytol 23:486-499.
66) Cahill LS, Laliberte CL, Liu XJ, Bishop J, Nieman BJ, Mogil JS, Sorge RE, Jones CD, Salter MW, Henkelman RM (2014) Quantifying blood-spinal cord barrier permeability after peripheral nerve injury in the living mouse. Mol Pain 10:60.
67) Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. J Neurosci 28:264-278.
68) Calovi S, Mut-Arbona P, Sperlagh B (2019) Microglia and the Purinergic Signaling System. Neuroscience 405:137-147.
69) Campbell CM, Edwards RR (2012) Ethnic differences in pain and pain management. Pain Manag 2:219-230.
70) Campbell JN, Meyer RA (2006) Mechanisms of neuropathic pain. Neuron 52:77-92.
71) Cao L, DeLeo JA (2008) CNS-infiltrating CD4+ T lymphocytes contribute to murine spinal nerve transection-induced neuropathic pain. Eur J Immunol 38:448-458.
72) Carmean CM, Yokoi N, Takahashi H, Oduori OS, Kang C, Kanagawa A, Kirkley AG, Han G, Landeche M, Hidaka S, Katoh M, Sargis RM, Seino S (2019) Arsenic modifies serotonin

metabolism through glucuronidation in pancreatic beta-cells. Am J Physiol Endocrinol Metab 316:E464-E474.
73) Carstens E, Leah J, Lechner J, Zimmermann M (1990) Demonstration of extensive brainstem projections to medial and lateral thalamus and hypothalamus in the rat. Neuroscience 35:609-626.
74) Cavaliere G, Trinchese G, Penna E, Cimmino F, Pirozzi C, Lama A, Annunziata C, Catapano A, Mattace Raso G, Meli R, Monda M, Messina G, Zammit C, Crispino M, Mollica MP (2019) High-Fat Diet Induces Neuroinflammation and Mitochondrial Impairment in Mice Cerebral Cortex and Synaptic Fraction. Front Cell Neurosci 13:509.
75) Celik MO, Labuz D, Henning K, Busch-Dienstfertig M, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL, Zimmer A, Machelska H (2016) Leukocyte opioid receptors mediate analgesia via Ca(2+)-regulated release of opioid peptides. Brain Behav Immun 57:227-242.
76) Chan KY, Jang MJ, Yoo BB, Greenbaum A, Ravi N, Wu WL, Sanchez-Guardado L, Lois C, Mazmanian SK, Deverman BE, Gradinaru V (2017) Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. Nat Neurosci 20:1172-1179.
77) Charron G, Doudnikoff E, Laux A, Berthet A, Porras G, Canron MH, Barroso-Chinea P, Li Q, Qin C, Nosten-Bertrand M, Giros B, Delalande F, Van Dorsselaer A, Vital A, Goumon Y, Bezard E (2011) Endogenous morphine-like compound immunoreactivity increases in parkinsonism. Brain 134:2321-2338.
78) Chen KC, Nicholson C (2000) Spatial buffering of potassium ions in brain extracellular space. Biophys J 78:2776-2797.
79) Chen T, Taniguchi W, Chen QY, Tozaki-Saitoh H, Song Q, Liu RH, Koga K, Matsuda T, Kaito-Sugimura Y, Wang J, Li ZH, Lu YC, Inoue K, Tsuda M, Li YQ, Nakatsuka T, Zhuo M (2018) Top-down descending facilitation of spinal sensory excitatory transmission from the anterior cingulate cortex. Nat Commun 9:1886.
80) Chen Y, Sha R, Xu L, Xia Y, Liu Y, Li X, Xie HQ, Tang N, Zhao B (2019) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin promotes migration ability of primary cultured rat astrocytes via aryl hydrocarbon receptor. J Environ Sci (China) 76:368-376.
81) Chen Z, Trapp BD (2016) Microglia and neuroprotection. J Neurochem 136 Suppl 1:10-17.
82) Chen ZR, Irvine RJ, Somogyi AA, Bochner F (1991) Mu receptor binding of some commonly used opioids and their metabolites. Life Sci 48:2165-2171.
83) 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.
84) Cheng T, Xu Z, Ma X (2022) The role of astrocytes in neuropathic pain. Front Mol Neurosci 15:1007889.
85) Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK (2014) Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. J Neuroinflammation 11:98.
86) Cirac A, Tsaktanis T, Beyer T, Linnerbauer M, Andlauer T, Grummel V, Nirschl L, Loesslein L, Quintana FJ, Hemmer B, Rothhammer V (2021) The Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent TGF-alpha/VEGF-B Ratio Correlates With Disease Subtype and Prognosis in Multiple Sclerosis. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 8.
87) Clarke LE, Liddelow SA, Chakraborty C, Munch AE, Heiman M, Barres BA (2018) Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. Proc Natl Acad Sci U S A 115:E1896-E1905.

88) Clatworthy AL, Illich PA, Castro GA, Walters ET (1995) Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. Neurosci Lett 184:5-8.
89) Clausen BH, Lambertsen KL, Babcock AA, Holm TH, Dagnaes-Hansen F, Finsen B (2008) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice. J Neuroinflammation 5:46.
90) Coderre TJ, Melzack R (1992) The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. J Neurosci 12:3671-3675.
91) Cong T, Sun Y, Zhou Y, Wu H, Li L, Chu Z, Chen X, Li J, Zhao D, Wang Y, Liu Y, Yin S, Xiao Z (2023) Blocking Two-Pore Domain Potassium Channel TREK-1 Inhibits the Activation of A1-Like Reactive Astrocyte Through the NF-kappaB Signaling Pathway in a Rat Model of Major Depressive Disorder. Neurochem Res 48:1737-1754.
92) Cooper TE, Chen J, Wiffen PJ, Derry S, Carr DB, Aldington D, Cole P, Moore RA (2017) Morphine for chronic neuropathic pain in adults. Cochrane Database Syst Rev 5:CD011669.
93) Corder G, Castro DC, Bruchas MR, Scherrer G (2018) Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. Annu Rev Neurosci 41:453-473.
94) Corder G, Tawfik VL, Wang D, Sypek EI, Low SA, Dickinson JR, Sotoudeh C, Clark JD, Barres BA, Bohlen CJ, Scherrer G (2017) Loss of mu opioid receptor signaling in nociceptors, but not microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesia. Nat Med 23:164-173.
95) Costa AR, Carvalho P, Flik G, Wilson SP, Reguenga C, Martins I, Tavares I (2019) Neuropathic Pain Induced Alterations in the Opioidergic Modulation of a Descending Pain Facilitatory Area of the Brain. Front Cell Neurosci 13:287.
96) Costigan M, Scholz J, Woolf CJ (2009) Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. Annu Rev Neurosci 32:1-32.
97) Cui JG, Holmin S, Mathiesen T, Meyerson BA, Linderoth B (2000) Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. Pain 88:239-248.
98) da Fonseca AC, Matias D, Garcia C, Amaral R, Geraldo LH, Freitas C, Lima FR (2014) The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. Front Cell Neurosci 8:362.
99) Dai W, Yin P, Zeng Z, Kong H, Tong H, Xu Z, Lu X, Lehmann R, Xu G (2014) Nontargeted modification-specific metabolomics study based on liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. Anal Chem 86:9146-9153.
100) Daneman R, Prat A (2015) The blood-brain barrier. Cold Spring Harb Perspect Biol 7:a020412.
101) Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat Neurosci 8:752-758.
102) de Ceglia R, Ledonne A, Litvin DG, Lind BL, Carriero G, Latagliata EC, Bindocci E, Di Castro MA, Savtchouk I, Vitali I, Ranjak A, Congiu M, Canonica T, Wisden W, Harris K, Mameli M, Mercuri N, Telley L, Volterra A (2023) Specialized astrocytes mediate glutamatergic gliotransmission in the CNS. Nature 622:120-129.
103) De Gregori S, De Gregori M, Ranzani GN, Allegri M, Minella C, Regazzi M (2012) Morphine metabolism, transport and brain disposition. Metab Brain Dis 27:1-5.
104) Debinski HS, Lee CS, Dhillon AP, Mackenzie P, Rhode J, Desmond PV (1996) UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome. Pathology 28:238-241.

105) Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. Pain 87:149-158.
106) DeHaven-Hudkins DL, Burgos LC, Cassel JA, Daubert JD, DeHaven RN, Mansson E, Nagasaka H, Yu G, Yaksh T (1999) Loperamide (ADL 2-1294), an opioid antihyperalgesic agent with peripheral selectivity. J Pharmacol Exp Ther 289:494-502.
107) Deloulme JC, Raponi E, Gentil BJ, Bertacchi N, Marks A, Labourdette G, Baudier J (2004) Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. Mol Cell Neurosci 27:453-465.
108) Depaulis A, Morgan MM, Liebeskind JC (1987) GABAergic modulation of the analgesic effects of morphine microinjected in the ventral periaqueductal gray matter of the rat. Brain Res 436:223-228.
109) Di Stefano G, Di Lionardo A, Di Pietro G, Truini A (2020) Neuropathic Pain Related to Peripheral Neuropathies According to the IASP Grading System Criteria. Brain Sci 11.
110) DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP (2016) Neuroinflammation: the devil is in the details. J Neurochem 139 Suppl 2:136-153.
111) Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI, Bradfield CA (1993) Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. Mol Pharmacol 44:911-917.
112) Domercq M, Matute C (2004) Neuroprotection by tetracyclines. Trends Pharmacol Sci 25:609-612.
113) Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. Biochim Biophys Acta 1793:1008-1022.
114) Dong ZB, Wang YJ, Wan WJ, Wu J, Wang BJ, Zhu HL, Xie M, Liu L (2022) Resveratrol ameliorates oxaliplatin-induced neuropathic pain via anti-inflammatory effects in rats. Exp Ther Med 24:586.
115) Donnelly CR, Andriessen AS, Chen G, Wang K, Jiang C, Maixner W, Ji RR (2020) Central Nervous System Targets: Glial Cell Mechanisms in Chronic Pain. Neurotherapeutics 17:846-860.
116) Doogue MP, Polasek TM (2013) The ABCD of clinical pharmacokinetics. Ther Adv Drug Saf 4:5-7.
117) Du B, Ding YQ, Xiao X, Ren HY, Su BY, Qi JG (2018) CD4+ alphabeta T cell infiltration into the leptomeninges of lumbar dorsal roots contributes to the transition from acute to chronic mechanical allodynia after adult rat tibial nerve injuries. J Neuroinflammation 15:81.
118) Du L, Wang SJ, Cui J, He WJ, Ruan HZ (2013) The role of HCN channels within the periaqueductal gray in neuropathic pain. Brain Res 1500:36-44.
119) Dubin AE, Patapoutian A (2010) Nociceptors: the sensors of the pain pathway. J Clin Invest 120:3760-3772.
120) Dubovy P, Klusakova I, Hradilova-Svizenska I, Joukal M, Boadas-Vaello P (2018) Activation of Astrocytes and Microglial Cells and CCL2/CCR2 Upregulation in the Dorsolateral and Ventrolateral Nuclei of Periaqueductal Gray and Rostral Ventromedial Medulla Following Different Types of Sciatic Nerve Injury. Front Cell Neurosci 12:40.
121) Due MR, Piekarz AD, Wilson N, Feldman P, Ripsch MS, Chavez S, Yin H, Khanna R, White FA (2012) Neuroexcitatory effects of morphine-3-glucuronide are dependent on Toll-like receptor 4 signaling. J Neuroinflammation 9:200.

122) Due MR, Yang XF, Allette YM, Randolph AL, Ripsch MS, Wilson SM, Dustrude ET, Khanna R, White FA (2014) Carbamazepine potentiates the effectiveness of morphine in a rodent model of neuropathic pain. PLoS One 9:e107399.
123) Duquenne M et al. (2021) Leptin brain entry via a tanycytic LepR-EGFR shuttle controls lipid metabolism and pancreas function. Nat Metab 3:1071-1090.
124) Duraku LS, Hossaini M, Hoendervangers S, Falke LL, Kambiz S, Mudera VC, Holstege JC, Walbeehm ET, Ruigrok TJ (2012) Spatiotemporal dynamics of re-innervation and hyperinnervation patterns by uninjured CGRP fibers in the rat foot sole epidermis after nerve injury. Mol Pain 8:61.
125) Durante W, Liao L, Reyna SV, Peyton KJ, Schafer AI (2000) Physiological cyclic stretch directs L-arginine transport and metabolism to collagen synthesis in vascular smooth muscle. FASEB J 14:1775-1783.
126) Durkee CA, Covelo A, Lines J, Kofuji P, Aguilar J, Araque A (2019) G(i/o) protein-coupled receptors inhibit neurons but activate astrocytes and stimulate gliotransmission. Glia 67:1076-1093.
127) Echeverry S, Shi XQ, Rivest S, Zhang J (2011) Peripheral nerve injury alters blood-spinal cord barrier functional and molecular integrity through a selective inflammatory pathway. J Neurosci 31:10819-10828.
128) Eisenstein TK (2019) The Role of Opioid Receptors in Immune System Function. Front Immunol 10:2904.
129) Erbs E, Faget L, Scherrer G, Matifas A, Filliol D, Vonesch JL, Koch M, Kessler P, Hentsch D, Birling MC, Koutsourakis M, Vasseur L, Veinante P, Kieffer BL, Massotte D (2015) A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. Brain Struct Funct 220:677-702.
130) Erichsen HK, Blackburn-Munro G (2002) Pharmacological characterisation of the spared nerve injury model of neuropathic pain. Pain 98:151-161.
131) Escartin C et al. (2021) Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. Nat Neurosci 24:312-325.
132) Fang Y, Ding X, Zhang Y, Cai L, Ge Y, Ma K, Xu R, Li S, Song M, Zhu H, Liu J, Ding J, Lu M, Hu G (2022) Fluoxetine inhibited the activation of A1 reactive astrocyte in a mouse model of major depressive disorder through astrocytic 5-HT(2B)R/beta-arrestin2 pathway. J Neuroinflammation 19:23.
133) Farmer AD, Drewes AM, Chiarioni G, De Giorgio R, O'Brien T, Morlion B, Tack J (2019) Pathophysiology and management of opioid-induced constipation: European expert consensus statement. United European Gastroenterol J 7:7-20.
134) Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. J Neurosci 24:2143-2155.
135) Feldman EL, Nave KA, Jensen TS, Bennett DLH (2017) New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. Neuron 93:1296-1313.
136) Fernandez-Salguero PM, Ward JM, Sundberg JP, Gonzalez FJ (1997) Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. Vet Pathol 34:605-614.
137) Fernandez M, Paradisi M, D'Intino G, Del Vecchio G, Sivilia S, Giardino L, Calza L (2010) A single prenatal exposure to the endocrine disruptor 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters developmental myelination and remyelination potential in the rat brain. J Neurochem 115:897-909.

138) Ferreira SH, Nakamura M (1979) II - Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonists. Prostaglandins 18:191-200.
139) Fields H (2004) State-dependent opioid control of pain. Nat Rev Neurosci 5:565-575.
140) Fields HL, Malick A, Burstein R (1995) Dorsal horn projection targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla. J Neurophysiol 74:1742-1759.
141) Filbrandt CR, Wu Z, Zlokovic B, Opanashuk L, Gasiewicz TA (2004) Presence and functional activity of the aryl hydrocarbon receptor in isolated murine cerebral vascular endothelial cells and astrocytes. Neurotoxicology 25:605-616.
142) Finnerup NB, Kuner R, Jensen TS (2021) Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment. Physiol Rev 101:259-301.
143) Fiore NT, Austin PJ (2016) Are the emergence of affective disturbances in neuropathic pain states contingent on supraspinal neuroinflammation? Brain Behav Immun 56:397-411.
144) Fitch MT, Silver J (2008) CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. Exp Neurol 209:294-301.
145) Foo LC, Allen NJ, Bushong EA, Ventura PB, Chung WS, Zhou L, Cahoy JD, Daneman R, Zong H, Ellisman MH, Barres BA (2011) Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. Neuron 71:799-811.
146) Gabel F, Hovhannisyan V, Berkati AK, Goumon Y (2022) Morphine-3-Glucuronide, Physiology and Behavior. Front Mol Neurosci 15:882443.
147) Gabel F, Hovhannisyan V, Andry V, Goumon Y (2023) Central metabolism as a potential origin of sex differences in morphine antinociception but not induction of antinociceptive tolerance in mice. Br J Pharmacol 180:843-861.
148) Gallagher RM, Verma S (1999) Managing pain and comorbid depression: A public health challenge. Semin Clin Neuropsychiatry 4:203-220.
149) Gao YJ, Ji RR (2010) Chemokines, neuronal-glial interactions, and central processing of neuropathic pain. Pharmacol Ther 126:56-68.
150) Gao YJ, Zhang L, Samad OA, Suter MR, Yasuhiko K, Xu ZZ, Park JY, Lind AL, Ma Q, Ji RR (2009) JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. J Neurosci 29:4096-4108.
151) Gattlen C, Clarke CB, Piller N, Kirschmann G, Pertin M, Decosterd I, Gosselin RD, Suter MR (2016) Spinal Cord T-Cell Infiltration in the Rat Spared Nerve Injury Model: A Time Course Study. Int J Mol Sci 17:352.
152) Gentilli M, Mazoit JX, Bouaziz H, Fletcher D, Casper RF, Benhamou D, Savouret JF (2001) Resveratrol decreases hyperalgesia induced by carrageenan in the rat hind paw. Life Sci 68:1317-1321.
153) Giani Tagliabue S, Faber SC, Motta S, Denison MS, Bonati L (2019) Modeling the binding of diverse ligands within the Ah receptor ligand binding domain. Sci Rep 9:10693.
154) Gilabert D, Duveau A, Carracedo S, Linck N, Langla A, Muramatsu R, Koch-Nolte F, Rassendren F, Grutter T, Fossat P, Boue-Grabot E, Ulmann L (2023) Microglial P2X4 receptors are essential for spinal neurons hyperexcitability and tactile allodynia in male and female neuropathic mice. iScience 26:108110.
155) Gilfillan AM, Austin SJ, Metcalfe DD (2011) Mast cell biology: introduction and overview. Adv Exp Med Biol 716:2-12.
156) Gilmore SA (1975) Proliferation of non-neuronal cells in spinal cords of irradiated, immature rats following transection of the sciatic nerve. Anat Rec 181:799-811.

157) Gilmore SA, Skinner RD (1979) Intraspinal non-neuronal cellular responses to peripheral nerve injury. Anat Rec 194:369-387.
158) Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science 330:841-845.
159) Girard H, Levesque E, Bellemare J, Journault K, Caillier B, Guillemette C (2007) Genetic diversity at the UGT1 locus is amplified by a novel 3' alternative splicing mechanism leading to nine additional UGT1A proteins that act as regulators of glucuronidation activity. Pharmacogenet Genomics 17:1077-1089.
160) Giulian D, Baker TJ (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. J Neurosci 6:2163-2178.
161) Glattard E, Welters ID, Lavaux T, Muller AH, Laux A, Zhang D, Schmidt AR, Delalande F, Laventie BJ, Dirrig-Grosch S, Colin DA, Van Dorsselaer A, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Schneider F, Goumon Y (2010) Endogenous morphine levels are increased in sepsis: a partial implication of neutrophils. PLoS One 5:e8791.
162) Goenaga J, Araque A, Kofuji P, Herrera Moro Chao D (2023) Calcium signaling in astrocytes and gliotransmitter release. Front Synaptic Neurosci 15:1138577.
163) Gohlke JM, Stockton PS, Sieber S, Foley J, Portier CJ (2009) AhR-mediated gene expression in the developing mouse telencephalon. Reprod Toxicol 28:321-328.
164) Gopalsamy B, Sambasevam Y, Zulazmi NA, Chia JSM, Omar Farouk AA, Sulaiman MR, Tengku Mohamad TAS, Perimal EK (2019) Experimental Characterization of the Chronic Constriction Injury-Induced Neuropathic Pain Model in Mice. Neurochem Res 44:2123-2138.
165) Gordon J, Amini S, White MK (2013) General overview of neuronal cell culture. Methods Mol Biol 1078:1-8.
166) Grabert K, Michoel T, Karavolos MH, Clohisey S, Baillie JK, Stevens MP, Freeman TC, Summers KM, McColl BW (2016) Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. Nat Neurosci 19:504-516.
167) Gradinaru D, Minn AL, Artur Y, Minn A, Heydel JM (2012) Effect of oxidative stress on UDP-glucuronosyltransferases in rat astrocytes. Toxicol Lett 213:316-324.
168) Grehl H, Grahmann F, Claus D, Neundorfer B (1993) Histologic evidence for a toxic polyneuropathy due to exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats. Acta Neurol Scand 88:354-357.
169) Griffin RS, Costigan M, Brenner GJ, Ma CH, Scholz J, Moss A, Allchorne AJ, Stahl GL, Woolf CJ (2007) Complement induction in spinal cord microglia results in anaphylatoxin C5a-mediated pain hypersensitivity. J Neurosci 27:8699-8708.
170) Grishanova AY, Perepechaeva ML (2022) Aryl Hydrocarbon Receptor in Oxidative Stress as a Double Agent and Its Biological and Therapeutic Significance. Int J Mol Sci 23.
171) Grishanova AY, Klyushova LS, Perepechaeva ML (2023) AhR and Wnt/beta-Catenin Signaling Pathways and Their Interplay. Curr Issues Mol Biol 45:3848-3876.
172) Guerra-Gomes S, Sousa N, Pinto L, Oliveira JF (2017) Functional Roles of Astrocyte Calcium Elevations: From Synapses to Behavior. Front Cell Neurosci 11:427.
173) Gui WS, Wei X, Mai CL, Murugan M, Wu LJ, Xin WJ, Zhou LJ, Liu XG (2016) Interleukin-1beta overproduction is a common cause for neuropathic pain, memory deficit, and depression following peripheral nerve injury in rodents. Mol Pain 12.
174) Guneykaya D, Ivanov A, Hernandez DP, Haage V, Wojtas B, Meyer N, Maricos M, Jordan P, Buonfiglioli A, Gielniewski B, Ochocka N, Comert C, Friedrich C, Artiles LS, Kaminska B,

Mertins P, Beule D, Kettenmann H, Wolf SA (2018) Transcriptional and Translational Differences of Microglia from Male and Female Brains. Cell Rep 24:2773-2783 e2776.
175) Guttenplan KA, Weigel MK, Adler DI, Couthouis J, Liddelow SA, Gitler AD, Barres BA (2020) Knockout of reactive astrocyte activating factors slows disease progression in an ALS mouse model. Nat Commun 11:3753.
176) Guttenplan KA, Weigel MK, Prakash P, Wijewardhane PR, Hasel P, Rufen-Blanchette U, Munch AE, Blum JA, Fine J, Neal MC, Bruce KD, Gitler AD, Chopra G, Liddelow SA, Barres BA (2021) Neurotoxic reactive astrocytes induce cell death via saturated lipids. Nature 599:102-107.
177) Gwak YS, Kang J, Unabia GC, Hulsebosch CE (2012) Spatial and temporal activation of spinal glial cells: role of gliopathy in central neuropathic pain following spinal cord injury in rats. Exp Neurol 234:362-372.
178) Haidar R, Henkler F, Kugler J, Rosin A, Genkinger D, Laux P, Luch A (2021) The role of DNA-binding and ARNT dimerization on the nucleo-cytoplasmic translocation of the aryl hydrocarbon receptor. Sci Rep 11:18194.
179) Hamdy MM, Elbadr MM, Barakat A (2018) Fluoxetine uses in nociceptive pain management: a promising adjuvant to opioid analgesics. Fundam Clin Pharmacol 32:532-546.
180) Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci 10:1387-1394.
181) Hanneman WH, Legare ME, Barhoumi R, Burghardt RC, Safe S, Tiffany-Castiglioni E (1996) Stimulation of calcium uptake in cultured rat hippocampal neurons by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Toxicology 112:19-28.
182) Harada K, Kamiya T, Tsuboi T (2015) Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. Front Neurosci 9:499.
183) Hart CG, Karimi-Abdolrezaee S (2021) Recent insights on astrocyte mechanisms in CNS homeostasis, pathology, and repair. J Neurosci Res 99:2427-2462.
184) Hasel P, Aisenberg WH, Bennett FC, Liddelow SA (2023) Molecular and metabolic heterogeneity of astrocytes and microglia. Cell Metab 35:555-570.
185) Hasel P, Rose IVL, Sadick JS, Kim RD, Liddelow SA (2021) Neuroinflammatory astrocyte subtypes in the mouse brain. Nat Neurosci 24:1475-1487.
186) Hashemzaei M, Abdollahzadeh M, Iranshahi M, Golmakani E, Rezaee R, Tabrizian K (2017) Effects of luteolin and luteolin-morphine co-administration on acute and chronic pain and sciatic nerve ligated-induced neuropathy in mice. J Complement Integr Med 14.
187) Hathway GJ, Vega-Avelaira D, Moss A, Ingram R, Fitzgerald M (2009) Brief, low frequency stimulation of rat peripheral C-fibres evokes prolonged microglial-induced central sensitization in adults but not in neonates. Pain 144:110-118.
188) Hays LE, Carpenter CD, Petersen SL (2002) Evidence that GABAergic neurons in the preoptic area of the rat brain are targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during development. Environ Health Perspect 110 Suppl 3:369-376.
189) Heath-Pagliuso S, Rogers WJ, Tullis K, Seidel SD, Cenijn PH, Brouwer A, Denison MS (1998) Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. Biochemistry 37:11508-11515.
190) Hemstapat K, Monteith GR, Smith D, Smith MT (2003) Morphine-3-glucuronide's neuro-excitatory effects are mediated via indirect activation of N-methyl-D-aspartic acid

receptors: mechanistic studies in embryonic cultured hippocampal neurones. Anesth Analg 97:494-505.
191) Herculano-Houzel S (2009) The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. Front Hum Neurosci 3:31.
192) Herculano-Houzel S (2014) The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. Glia 62:1377-1391.
193) Heurtaux T, Benani A, Moulin D, Muller N, Netter P, Minn A (2006) Induction of UGT1A6 isoform by inflammatory conditions in rat astrocytes. Neuropharmacology 50:317-328.
194) Heurtaux T, Benani A, Bianchi A, Moindrot A, Gradinaru D, Magdalou J, Netter P, Minn A (2004) Redox state alteration modulates astrocyte glucuronidation. Free Radic Biol Med 37:1051-1063.
195) Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. Physiol Rev 90:291-366.
196) Hsieh MT, Donaldson LF, Lumb BM (2015) Differential contributions of A- and C-nociceptors to primary and secondary inflammatory hypersensitivity in the rat. Pain 156:1074-1083.
197) Huang YJ, Hung CC, Hsu PC, Lee PY, Tsai YA, Hsin YC, Lee XT, Chou CC, Chen ML, Tarng DC, Lee YH (2023) Astrocytic aryl hydrocarbon receptor mediates chronic kidney disease-associated mental disorders involving GLT1 hypofunction and neuronal activity enhancement in the mouse brain. Glia 71:1057-1080.
198) Huck NA, Siliezar-Doyle J, Haight ES, Ishida R, Forman TE, Wu S, Shen H, Takemura Y, Clark JD, Tawfik VL (2021) Temporal Contribution of Myeloid-Lineage TLR4 to the Transition to Chronic Pain: A Focus on Sex Differences. J Neurosci 41:4349-4365.
199) Hutchinson MR et al. (2010) Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. Brain Behav Immun 24:83-95.
200) Hwang YJ, Shin DY, Kim MJ, Jang H, Kim S, Yang H, Jang WI, Park S, Shim S, Lee SB (2023) StemRegenin 1 Mitigates Radiation-Mediated Hematopoietic Injury by Modulating Radioresponse of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. Biomedicines 11.
201) Iizumi T, Takahashi S, Mashima K, Minami K, Izawa Y, Abe T, Hishiki T, Suematsu M, Kajimura M, Suzuki N (2016) A possible role of microglia-derived nitric oxide by lipopolysaccharide in activation of astroglial pentose-phosphate pathway via the Keap1/Nrf2 system. J Neuroinflammation 13:99.
202) Illes P, Rubini P, Ulrich H, Zhao Y, Tang Y (2020) Regulation of Microglial Functions by Purinergic Mechanisms in the Healthy and Diseased CNS. Cells 9.
203) Imaoka T, Huang W, Shum S, Hailey DW, Chang SY, Chapron A, Yeung CK, Himmelfarb J, Isoherranen N, Kelly EJ (2021) Bridging the gap between in silico and in vivo by modeling opioid disposition in a kidney proximal tubule microphysiological system. Sci Rep 11:21356.
204) Inoue K, Tsuda M (2018) Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. Nat Rev Neurosci 19:138-152.
205) Inquimbert P, Bartels K, Babaniyi OB, Barrett LB, Tegeder I, Scholz J (2012) Peripheral nerve injury produces a sustained shift in the balance between glutamate release and uptake in the dorsal horn of the spinal cord. Pain 153:2422-2431.
206) Inquimbert P, Moll M, Latremoliere A, Tong CK, Whang J, Sheehan GF, Smith BM, Korb E, Athie MCP, Babaniyi O, Ghasemlou N, Yanagawa Y, Allis CD, Hof PR, Scholz J (2018)

NMDA Receptor Activation Underlies the Loss of Spinal Dorsal Horn Neurons and the Transition to Persistent Pain after Peripheral Nerve Injury. Cell Rep 23:2678-2689.
207) Itaaho K, Court MH, Uutela P, Kostiainen R, Radominska-Pandya A, Finel M (2009) Dopamine is a low-affinity and high-specificity substrate for the human UDP-glucuronosyltransferase 1A10. Drug Metab Dispos 37:768-775.
208) Iyengar S, Webster AA, Hemrick-Luecke SK, Xu JY, Simmons RM (2004) Efficacy of duloxetine, a potent and balanced serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor in persistent pain models in rats. J Pharmacol Exp Ther 311:576-584.
209) Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. EMBO J 9:3153-3162.
210) Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA (1998) Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. Mech Dev 73:117-123.
211) Jasmin L, Wang H, Tarczy-Hornoch K, Levine JD, Basbaum AI (1994) Differential effects of morphine on noxious stimulus-evoked fos-like immunoreactivity in subpopulations of spinoparabrachial neurons. J Neurosci 14:7252-7260.
212) Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ (2014) Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. Nat Rev Drug Discov 13:533-548.
213) Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ (2003) Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? Trends Neurosci 26:696-705.
214) Jiang YZ, Wang K, Fang R, Zheng J (2010) Expression of aryl hydrocarbon receptor in human placentas and fetal tissues. J Histochem Cytochem 58:679-685.
215) Jin X, Gereau RWt (2006) Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha. J Neurosci 26:246-255.
216) Jiwaji Z, Hardingham GE (2022) Good, bad, and neglectful: Astrocyte changes in neurodegenerative disease. Free Radic Biol Med 182:93-99.
217) John LJ, Devi P, John J, Arifulla M, Guido S (2011) Utilization patterns of central nervous system drugs: A cross-sectional study among the critically ill patients. J Neurosci Rural Pract 2:119-123.
218) Journee SH, Mathis VP, Fillinger C, Veinante P, Yalcin I (2023) Janus effect of the anterior cingulate cortex: Pain and emotion. Neurosci Biobehav Rev 153:105362.
219) Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. Nature 413:203-210.
220) Jung H, Bhangoo S, Banisadr G, Freitag C, Ren D, White FA, Miller RJ (2009) Visualization of chemokine receptor activation in transgenic mice reveals peripheral activation of CCR2 receptors in states of neuropathic pain. J Neurosci 29:8051-8062.
221) Kadry H, Noorani B, Cucullo L (2020) A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. Fluids Barriers CNS 17:69.
222) Kaur G, Singh N, Jaggi AS (2017) Mast cells in neuropathic pain: an increasing spectrum of their involvement in pathophysiology. Rev Neurosci 28:759-766.
223) Keller D, Ero C, Markram H (2018) Cell Densities in the Mouse Brain: A Systematic Review. Front Neuroanat 12:83.
224) Kempuraj D, Mentor S, Thangavel R, Ahmed ME, Selvakumar GP, Raikwar SP, Dubova I, Zaheer S, Iyer SS, Zaheer A (2019) Mast Cells in Stress, Pain, Blood-Brain Barrier, Neuroinflammation and Alzheimer's Disease. Front Cell Neurosci 13:54.

225) Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, David E, Baruch K, Lara-Astaiso D, Toth B, Itzkovitz S, Colonna M, Schwartz M, Amit I (2017) A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. Cell 169:1276-1290 e1217.
226) Khakh BS, Sofroniew MV (2015) Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. Nat Neurosci 18:942-952.
227) Khalid S, Tubbs RS (2017) Neuroanatomy and Neuropsychology of Pain. Cureus 9:e1754.
228) Kibaly C, Xu C, Cahill CM, Evans CJ, Law PY (2019) Non-nociceptive roles of opioids in the CNS: opioids' effects on neurogenesis, learning, memory and affect. Nat Rev Neurosci 20:5-18.
229) Kierdorf K et al. (2013) Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. Nat Neurosci 16:273-280.
230) Kim A, Garcia-Garcia E, Straccia M, Comella-Bolla A, Miguez A, Masana M, Alberch J, Canals JM, Rodriguez MJ (2020) Reduced Fractalkine Levels Lead to Striatal Synaptic Plasticity Deficits in Huntington's Disease. Front Cell Neurosci 14:163.
231) Kim RD, Marchildon AE, Frazel PW, Hasel P, Guo AX, Liddelow SA (2023) Temporal and spatial analysis of astrocytes following stroke identifies novel drivers of reactivity. bioRxiv.
232) Kim SY, Yang JH (2005) Neurotoxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells. Exp Mol Med 37:58-64.
233) Kimura E, Kohda M, Maekawa F, Fujii-Kuriyama Y, Tohyama C (2021) Neurons expressing the aryl hydrocarbon receptor in the locus coeruleus and island of Calleja major are novel targets of dioxin in the mouse brain. Histochem Cell Biol 156:147-163.
234) King CD, Rios GR, Assouline JA, Tephly TR (1999) Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. Arch Biochem Biophys 365:156-162.
235) Kline RHt, Wiley RG (2008) Spinal mu-opioid receptor-expressing dorsal horn neurons: role in nociception and morphine antinociception. J Neurosci 28:904-913.
236) Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, Hirakawa A, Takeuchi H, Suzumura A, Ishiguro N, Kadomatsu K (2013) Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. Cell Death Dis 4:e525.
237) Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C, DeLeo FR (2005) Neutrophils in the innate immune response. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 53:505-517.
238) Kobiela Ketz A, Byrnes KR, Grunberg NE, Kasper CE, Osborne L, Pryor B, Tosini NL, Wu X, Anders JJ (2017) Characterization of Macrophage/Microglial Activation and Effect of Photobiomodulation in the Spared Nerve Injury Model of Neuropathic Pain. Pain Med 18:932-946.
239) Koda H, Mizumura K (2002) Sensitization to mechanical stimulation by inflammatory mediators and by mild burn in canine visceral nociceptors in vitro. J Neurophysiol 87:2043-2051.
240) Koes BW, van Tulder MW, Peul WC (2007) Diagnosis and treatment of sciatica. BMJ 334:1313-1317.
241) Kofuji P, Newman EA (2004) Potassium buffering in the central nervous system. Neuroscience 129:1045-1056.
242) Kohler S, Winkler U, Hirrlinger J (2021) Heterogeneity of Astrocytes in Grey and White Matter. Neurochem Res 46:3-14.

243) Kohno T, Kumamoto E, Higashi H, Shimoji K, Yoshimura M (1999) Actions of opioids on excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord. J Physiol 518 (Pt 3):803-813.
244) Kohno T, Ji RR, Ito N, Allchorne AJ, Befort K, Karchewski LA, Woolf CJ (2005) Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. Pain 117:77-87.
245) Krishnaswamy S, Duan SX, Von Moltke LL, Greenblatt DJ, Court MH (2003) Validation of serotonin (5-hydroxtryptamine) as an in vitro substrate probe for human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A6. Drug Metab Dispos 31:133-139.
246) Krishnaswamy S, Hao Q, Von Moltke LL, Greenblatt DJ, Court MH (2004) Evaluation of 5-hydroxytryptophol and other endogenous serotonin (5-hydroxytryptamine) analogs as substrates for UDP-glucuronosyltransferase 1A6. Drug Metab Dispos 32:862-869.
247) Kumamoto E, Fujita T, Jiang CY (2014) TRP Channels Involved in Spontaneous L-Glutamate Release Enhancement in the Adult Rat Spinal Substantia Gelatinosa. Cells 3:331-362.
248) Kumar BV, Connors TJ, Farber DL (2018) Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. Immunity 48:202-213.
249) Kumar V (2019) Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. J Neuroimmunol 332:16-30.
250) Kwon HS, Koh SH (2020) Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. Transl Neurodegener 9:42.
251) Labib D, Wang Z, Prakash P, Zimmer M, Smith MD, Frazel PW, Barbar L, Sapar ML, Calabresi PA, Peng J, Liddelow SA, Fossati V (2022) Proteomic Alterations and Novel Markers of Neurotoxic Reactive Astrocytes in Human Induced Pluripotent Stem Cell Models. Front Mol Neurosci 15:870085.
252) Lambertsen KL, Clausen BH, Babcock AA, Gregersen R, Fenger C, Nielsen HH, Haugaard LS, Wirenfeldt M, Nielsen M, Dagnaes-Hansen F, Bluethmann H, Faergeman NJ, Meldgaard M, Deierborg T, Finsen B (2009) Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. J Neurosci 29:1319-1330.
253) Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. J Pain 10:895-926.
254) Lau CG, Zukin RS (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. Nat Rev Neurosci 8:413-426.
255) Laux-Biehlmann A, Mouheiche J, Veriepe J, Goumon Y (2013) Endogenous morphine and its metabolites in mammals: history, synthesis, localization and perspectives. Neuroscience 233:95-117.
256) Laux-Biehlmann A, Grafe N, Mouheiche J, Stuber D, Welters ID, Delalande F, Poisbeau P, Garnero P, Metz-Boutigue MH, Schneider F, Goumon Y (2012) Comparison of serum and lithium-heparinate plasma for the accurate measurements of endogenous and exogenous morphine concentrations. Br J Clin Pharmacol 74:381-383.
257) Laux-Biehlmann A, Chung H, Mouheiche J, Veriepe J, Delalande F, Lamshoft M, Welters ID, Soldevila S, Bazin H, Lamarque L, Van Dorsselaer A, Poisbeau P, Schneider F, Goumon Y, Garnero P (2014) Endogenous morphine-6-glucuronide (M6G) is present in the plasma of patients: validation of a specific anti-M6G antibody for clinical and basic research. Biofactors 40:113-120.

258) Laux A, Delalande F, Mouheiche J, Stuber D, Van Dorsselaer A, Bianchi E, Bezard E, Poisbeau P, Goumon Y (2012) Localization of endogenous morphine-like compounds in the mouse spinal cord. J Comp Neurol 520:1547-1561.
259) Laux A, Muller AH, Miehe M, Dirrig-Grosch S, Deloulme JC, Delalande F, Stuber D, Sage D, Van Dorsselaer A, Poisbeau P, Aunis D, Goumon Y (2011) Mapping of endogenous morphine-like compounds in the adult mouse brain: Evidence of their localization in astrocytes and GABAergic cells. J Comp Neurol 519:2390-2416.
260) Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. Neuroscience 39:151-170.
261) LeBien TW, Tedder TF (2008) B lymphocytes: how they develop and function. Blood 112:1570-1580.
262) Lee CY, Perez FM, Wang W, Guan X, Zhao X, Fisher JL, Guan Y, Sweitzer SM, Raja SN, Tao YX (2011) Dynamic temporal and spatial regulation of mu opioid receptor expression in primary afferent neurons following spinal nerve injury. Eur J Pain 15:669-675.
263) Lee YW, Chaplan SR, Yaksh TL (1995) Systemic and supraspinal, but not spinal, opiates suppress allodynia in a rat neuropathic pain model. Neurosci Lett 199:111-114.
264) Legare ME, Hanneman WH, Barhoumi R, Tiffany-Castiglioni E (1997) The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure in primary rat astroglia: identification of biochemical and cellular targets. Neurotoxicology 18:515-524.
265) Lehrman EK, Wilton DK, Litvina EY, Welsh CA, Chang ST, Frouin A, Walker AJ, Heller MD, Umemori H, Chen C, Stevens B (2018) CD47 Protects Synapses from Excess Microglia-Mediated Pruning during Development. Neuron 100:120-134 e126.
266) Leong ML, Gu M, Speltz-Paiz R, Stahura EI, Mottey N, Steer CJ, Wessendorf M (2011) Neuronal loss in the rostral ventromedial medulla in a rat model of neuropathic pain. J Neurosci 31:17028-17039.
267) Levine JD, Lau W, Kwiat G, Goetzl EJ (1984) Leukotriene B4 produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. Science 225:743-745.
268) Levine JD, Gooding J, Donatoni P, Borden L, Goetzl EJ (1985) The role of the polymorphonuclear leukocyte in hyperalgesia. J Neurosci 5:3025-3029.
269) Levine JD, Coderre TJ, White DM, Finkbeiner WE, Basbaum AI (1990) Denervation-induced inflammation in the rat. Neurosci Lett 119:37-40.
270) Levitt T (2021) Morphine Dreams: Auguste Laurent and the Active Principles of Organised Matter. Ambix 68:97-115.
271) Lewis SS, Hutchinson MR, Rezvani N, Loram LC, Zhang Y, Maier SF, Rice KC, Watkins LR (2010) Evidence that intrathecal morphine-3-glucuronide may cause pain enhancement via toll-like receptor 4/MD-2 and interleukin-1beta. Neuroscience 165:569-583.
272) Li J, Shui X, Sun R, Wan L, Zhang B, Xiao B, Luo Z (2021) Microglial Phenotypic Transition: Signaling Pathways and Influencing Modulators Involved in Regulation in Central Nervous System Diseases. Front Cell Neurosci 15:736310.
273) Li L, Chen J, Li YQ (2023) The Downregulation of Opioid Receptors and Neuropathic Pain. Int J Mol Sci 24.
274) Li T, Chen X, Zhang C, Zhang Y, Yao W (2019a) An update on reactive astrocytes in chronic pain. J Neuroinflammation 16:140.
275) Li XH, Miao HH, Zhuo M (2019b) NMDA Receptor Dependent Long-term Potentiation in Chronic Pain. Neurochem Res 44:531-538.
276) Liddelow SA, Barres BA (2017) Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. Immunity 46:957-967.

277) Liddelow SA et al. (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature 541:481-487.
278) Likar R, Mousa SA, Philippitsch G, Steinkellner H, Koppert W, Stein C, Schafer M (2004) Increased numbers of opioid expressing inflammatory cells do not affect intra-articular morphine analgesia. Br J Anaesth 93:375-380.
279) Lin CH, Juan SH, Wang CY, Sun YY, Chou CM, Chang SF, Hu SY, Lee WS, Lee YH (2008) Neuronal activity enhances aryl hydrocarbon receptor-mediated gene expression and dioxin neurotoxicity in cortical neurons. J Neurochem 104:1415-1429.
280) Lin CH, Chen CC, Chou CM, Wang CY, Hung CC, Chen JY, Chang HW, Chen YC, Yeh GC, Lee YH (2009) Knockdown of the aryl hydrocarbon receptor attenuates excitotoxicity and enhances NMDA-induced BDNF expression in cortical neurons. J Neurochem 111:777-789.
281) Liu H, Leak RK, Hu X (2016) Neurotransmitter receptors on microglia. Stroke Vasc Neurol 1:52-58.
282) Liu RH, Foster G, Cone EJ, Kumar SD (1995) Selecting an appropriate isotopic internal standard for gas chromatography/mass spectrometry analysis of drugs of abuse--pentobarbital example. J Forensic Sci 40:983-989.
283) Liu SN, Lu JBL, Watson CJW, Lazarus P, Desta Z, Gufford BT (2019) Mechanistic Assessment of Extrahepatic Contributions to Glucuronidation of Integrase Strand Transfer Inhibitors. Drug Metab Dispos 47:535-544.
284) Liu T, van Rooijen N, Tracey DJ (2000) Depletion of macrophages reduces axonal degeneration and hyperalgesia following nerve injury. Pain 86:25-32.
285) Lloret-Linares C, Miyauchi E, Luo H, Labat L, Bouillot JL, Poitou C, Oppert JM, Laplanche JL, Mouly S, Scherrmann JM, Uchida Y, Tachikawa M, Terasaki T, Bergmann JF, Decleves X (2016) Oral Morphine Pharmacokinetic in Obesity: The Role of P-Glycoprotein, MRP2, MRP3, UGT2B7, and CYP3A4 Jejunal Contents and Obesity-Associated Biomarkers. Mol Pharm 13:766-773.
286) Loeser JD, Treede RD (2008) The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. Pain 137:473-477.
287) Lopez-Suarez L, Awabdh SA, Coumoul X, Chauvet C (2022) The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants. Neurotoxicology 92:131-155.
288) Lu HJ, Gao YJ (2023) Astrocytes in Chronic Pain: Cellular and Molecular Mechanisms. Neurosci Bull 39:425-439.
289) Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine 42:145-151.
290) Lyons A, Minogue AM, Jones RS, Fitzpatrick O, Noonan J, Campbell VA, Lynch MA (2017) Analysis of the Impact of CD200 on Phagocytosis. Mol Neurobiol 54:5730-5739.
291) Ma H, Zhou Y, Li Z, Zhu L, Li H, Zhang G, Wang J, Gong H, Xu D, Hua W, Liu P, Zhang X, Zhang Y, Zhang L, Hong B, Zhou W, Yang P, Liu J (2022) Single-Cell RNA-Sequencing Analyses Revealed Heterogeneity and Dynamic Changes of Metabolic Pathways in Astrocytes at the Acute Phase of Ischemic Stroke. Oxid Med Cell Longev 2022:1817721.
292) Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, Nebert DW (2005) Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. Pharmacogenet Genomics 15:677-685.
293) Madry C, Attwell D (2015) Receptors, ion channels, and signaling mechanisms underlying microglial dynamics. J Biol Chem 290:12443-12450.

294) Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y, Ikuta T, Ozaki M, Kishioka S (2009) Leptin derived from adipocytes in injured peripheral nerves facilitates development of neuropathic pain via macrophage stimulation. Proc Natl Acad Sci U S A 106:13076-13081.
295) Malsch P, Andratsch M, Vogl C, Link AS, Alzheimer C, Brierley SM, Hughes PA, Kress M (2014) Deletion of interleukin-6 signal transducer gp130 in small sensory neurons attenuates mechanonociception and down-regulates TRPA1 expression. J Neurosci 34:9845-9856.
296) Marks DM, Shah MJ, Patkar AA, Masand PS, Park GY, Pae CU (2009) Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors for pain control: premise and promise. Curr Neuropharmacol 7:331-336.
297) Martucci KT, Mackey SC (2018) Neuroimaging of Pain: Human Evidence and Clinical Relevance of Central Nervous System Processes and Modulation. Anesthesiology 128:1241-1254.
298) Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. Nature 383:819-823.
299) Matyash V, Kettenmann H (2010) Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. Brain Res Rev 63:2-10.
300) Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg2+ of NMDA responses in spinal cord neurones. Nature 309:261-263.
301) McCluskey LP, Lampson LA (2001) Local immune regulation in the central nervous system by substance P vs. glutamate. J Neuroimmunol 116:136-146.
302) McGlone F, Vallbo AB, Olausson H, Loken L, Wessberg J (2007) Discriminative touch and emotional touch. Can J Exp Psychol 61:173-183.
303) McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J (1991) Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. J Neurosci 11:3398-3411.
304) Meech R, Hu DG, McKinnon RA, Mubarokah SN, Haines AZ, Nair PC, Rowland A, Mackenzie PI (2019) The UDP-Glycosyltransferase (UGT) Superfamily: New Members, New Functions, and Novel Paradigms. Physiol Rev 99:1153-1222.
305) Mehta AK, Gracias DT, Croft M (2018) TNF activity and T cells. Cytokine 101:14-18.
306) Meissner W (1819) Uber Pflanzenalkalien: II. Uber ein neues pflanzenalkali (alkaloid). Journal für Chemie und Physik 25:379-381.
307) Metzger D, Chambon P (2001) Site- and time-specific gene targeting in the mouse. Methods 24:71-80.
308) Meyer MJ, Neumann VE, Friesacher HR, Zdrazil B, Brockmoller J, Tzvetkov MV (2019) Opioids as Substrates and Inhibitors of the Genetically Highly Variable Organic Cation Transporter OCT1. J Med Chem 62:9890-9905.
309) Miao W, Hu L, Scrivens PJ, Batist G (2005) Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. J Biol Chem 280:20340-20348.
310) Millan MJ (2002) Descending control of pain. Prog Neurobiol 66:355-474.
311) Millecamps M, Sotocinal SG, Austin JS, Stone LS, Mogil JS (2023) Sex-specific effects of neuropathic pain on long-term pain behavior and mortality in mice. Pain 164:577-586.

312) Miyamoto K, Kume K, Ohsawa M (2017) Role of microglia in mechanical allodynia in the anterior cingulate cortex. J Pharmacol Sci 134:158-165.
313) Miyazaki T, Choi IY, Rubas W, Anand NK, Ali C, Evans J, Gursahani H, Hennessy M, Kim G, McWeeney D, Pfeiffer J, Quach P, Gauvin D, Riley TA, Riggs JA, Gogas K, Zalevsky J, Doberstein SK (2017) NKTR-181: A Novel Mu-Opioid Analgesic with Inherently Low Abuse Potential. J Pharmacol Exp Ther 363:104-113.
314) Moalem G, Tracey DJ (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. Brain Res Rev 51:240-264.
315) Moalem G, Xu K, Yu L (2004) T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. Neuroscience 129:767-777.
316) Mogil JS (2020) Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. Nat Rev Neurosci 21:353-365.
317) Moore LD, Le T, Fan G (2013) DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology 38:23-38.
318) Moran TD, Smith PA (2002) Morphine-3beta-D-glucuronide suppresses inhibitory synaptic transmission in rat substantia gelatinosa. J Pharmacol Exp Ther 302:568-576.
319) Moreau JL, Fields HL (1986) Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons that modulate nociceptive transmission. Brain Res 397:37-46.
320) Morgado C, Terra PP, Tavares I (2010) Neuronal hyperactivity at the spinal cord and periaqueductal grey during painful diabetic neuropathy: effects of gabapentin. Eur J Pain 14:693-699.
321) Morgan MM, Whittier KL, Hegarty DM, Aicher SA (2008) Periaqueductal gray neurons project to spinally projecting GABAergic neurons in the rostral ventromedial medulla. Pain 140:376-386.
322) Morris SM, Jr. (2009) Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. Br J Pharmacol 157:922-930.
323) 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.
324) Motaln H, Koren A, Gruden K, Ramsak Z, Schichor C, Lah TT (2015) Heterogeneous glioblastoma cell cross-talk promotes phenotype alterations and enhanced drug resistance. Oncotarget 6:40998-41017.
325) Mou W, Ma L, Zhu A, Cui H, Huang Y (2022) Astrocyte-microglia interaction through C3/C3aR pathway modulates neuropathic pain in rats model of chronic constriction injury. Mol Pain 18:17448069221140532.
326) Moy JK, Hartung JE, Duque MG, Friedman R, Nagarajan V, Loeza-Alcocer E, Koerber HR, Christoph T, Schroder W, Gold MS (2020) Distribution of functional opioid receptors in human dorsal root ganglion neurons. Pain 161:1636-1649.
327) Mueller M, Leonhard C, Wacker K, Ringelstein EB, Okabe M, Hickey WF, Kiefer R (2003) Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. Lab Invest 83:175-185.
328) Muller A, Glattard E, Taleb O, Kemmel V, Laux A, Miehe M, Delalande F, Roussel G, Van Dorsselaer A, Metz-Boutigue MH, Aunis D, Goumon Y (2008) Endogenous morphine in SH-SY5Y cells and the mouse cerebellum. PLoS One 3:e1641.
329) Muraoka M, Kawakita M, Ishida N (2001) Molecular characterization of human UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter, a novel nucleotide sugar transporter with dual substrate specificity. FEBS Lett 495:87-93.

330) Muzio L, Viotti A, Martino G (2021) Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy. Front Neurosci 15:742065.
331) Nagashima S, Hirotani M, Yoshikawa T (2000) Purification and characterization of UDP-glucuronate: baicalein 7-O-glucuronosyltransferase from Scutellaria baicalensis Georgi. cell suspension cultures. Phytochemistry 53:533-538.
332) Nakagawa Y, Chiba K (2014) Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. Pharmaceuticals (Basel) 7:1028-1048.
333) Nam Y, Kim JH, Kim JH, Jha MK, Jung JY, Lee MG, Choi IS, Jang IS, Lim DG, Hwang SH, Cho HJ, Suk K (2016) Reversible Induction of Pain Hypersensitivity following Optogenetic Stimulation of Spinal Astrocytes. Cell Rep 17:3049-3061.
334) Ndubaku U, de Bellard ME (2008) Glial cells: old cells with new twists. Acta Histochem 110:182-195.
335) Nebert DW (2017) Aryl hydrocarbon receptor (AHR): "pioneer member" of the basic-helix/loop/helix per-Arnt-sim (bHLH/PAS) family of "sensors" of foreign and endogenous signals. Prog Lipid Res 67:38-57.
336) Ngo V, Duennwald ML (2022) Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. Antioxidants (Basel) 11.
337) Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science 308:1314-1318.
338) Noh MY, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Arakane Y (2018) A chitinase with two catalytic domains is required for organization of the cuticular extracellular matrix of a beetle. PLoS Genet 14:e1007307.
339) Novakovic MM, Korshunov KS, Grant RA, Martin ME, Valencia HA, Budinger GRS, Radulovic J, Prakriya M (2023) Astrocyte reactivity and inflammation-induced depression-like behaviors are regulated by Orai1 calcium channels. Nat Commun 14:5500.
340) Obara I, Gunduz Cinar O, Starowicz K, Benyhe S, Borsodi A, Przewlocka B (2010) Agonist-dependent attenuation of mu-opioid receptor-mediated G-protein activation in the dorsal root ganglia of neuropathic rats. J Neural Transm (Vienna) 117:421-429.
341) Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M (2012) Heterogeneity of astrocytic form and function. Methods Mol Biol 814:23-45.
342) Ohno Y, Kinboshi M, Shimizu S (2018) Inwardly Rectifying Potassium Channel Kir4.1 as a Novel Modulator of BDNF Expression in Astrocytes. Int J Mol Sci 19.
343) Ondo K, Arakawa H, Nakano M, Fukami T, Nakajima M (2020) SLC35B1 significantly contributes to the uptake of UDPGA into the endoplasmic reticulum for glucuronidation catalyzed by UDP-glucuronosyltransferases. Biochem Pharmacol 175:113916.
344) Osborne PB, Vaughan CW, Wilson HI, Christie MJ (1996) Opioid inhibition of rat periaqueductal grey neurones with identified projections to rostral ventromedial medulla in vitro. J Physiol 490 (Pt 2):383-389.
345) Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F (2010) Central modulation of pain. J Clin Invest 120:3779-3787.
346) Ossipov MH, Morimura K, Porreca F (2014) Descending pain modulation and chronification of pain. Curr Opin Support Palliat Care 8:143-151.
347) Ossipov MH, Lopez Y, Nichols ML, Bian D, Porreca F (1995a) The loss of antinociceptive efficacy of spinal morphine in rats with nerve ligation injury is prevented by reducing spinal afferent drive. Neurosci Lett 199:87-90.
348) Ossipov MH, Kovelowski CJ, Nichols ML, Hruby VJ, Porreca F (1995b) Characterization of supraspinal antinociceptive actions of opioid delta agonists in the rat. Pain 62:287-293.

349) Palmer ME, Andrews LJ, Abbey TC, Dahlquist AE, Wenzler E (2022) The importance of pharmacokinetics and pharmacodynamics in antimicrobial drug development and their influence on the success of agents developed to combat resistant gram negative pathogens: A review. Front Pharmacol 13:888079.
350) Paolicelli RC et al. (2022) Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. Neuron 110:3458-3483.
351) Park C, Kim JH, Yoon BE, Choi EJ, Lee CJ, Shin HS (2010) T-type channels control the opioidergic descending analgesia at the low threshold-spiking GABAergic neurons in the periaqueductal gray. Proc Natl Acad Sci U S A 107:14857-14862.
352) Park H, Jin UH, Karki K, Jayaraman A, Allred C, Michelhaugh SK, Mittal S, Chapkin RS, Safe S (2020) Dopamine is an aryl hydrocarbon receptor agonist. Biochem J 477:3899-3910.
353) Pasternak GW, Pan YX (2013) Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. Pharmacol Rev 65:1257-1317.
354) Peacock S, Patel S (2008) Cultural Influences on Pain. Rev Pain 1:6-9.
355) Peng Z, Li X, Fu M, Zhu K, Long L, Zhao X, Chen Q, Deng DYB, Wan Y (2019) Inhibition of Notch1 signaling promotes neuronal differentiation and improves functional recovery in spinal cord injury through suppressing the activation of Ras homolog family member A. J Neurochem 150:709-722.
356) Perkins NM, Tracey DJ (2000) Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. Neuroscience 101:745-757.
357) Pezet S, Marchand F, D'Mello R, Grist J, Clark AK, Malcangio M, Dickenson AH, Williams RJ, McMahon SB (2008) Phosphatidylinositol 3-kinase is a key mediator of central sensitization in painful inflammatory conditions. J Neurosci 28:4261-4270.
358) Pitcher GM, Ritchie J, Henry JL (1999) Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain. Pain 83:37-46.
359) Pocock JM, Kettenmann H (2007) Neurotransmitter receptors on microglia. Trends Neurosci 30:527-535.
360) Polgar E, Gray S, Riddell JS, Todd AJ (2004) Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. Pain 111:144-150.
361) Polgar E, Hughes DI, Arham AZ, Todd AJ (2005) Loss of neurons from laminas I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. J Neurosci 25:6658-6666.
362) Polgar E, Hughes DI, Riddell JS, Maxwell DJ, Puskar Z, Todd AJ (2003) Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. Pain 104:229-239.
363) Porreca F, Tang QB, Bian D, Riedl M, Elde R, Lai J (1998) Spinal opioid mu receptor expression in lumbar spinal cord of rats following nerve injury. Brain Res 795:197-203.
364) Prat A, Biernacki K, Wosik K, Antel JP (2001) Glial cell influence on the human blood-brain barrier. Glia 36:145-155.
365) Price DD (2000) Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. Science 288:1769-1772.
366) Prince DA, Lux HD, Neher E (1973) Measurement of extracellular potassium activity in cat cortex. Brain Res 50:489-495.

367) Rachinger-Adam B, Conzen P, Azad SC (2011) Pharmacology of peripheral opioid receptors. Curr Opin Anaesthesiol 24:408-413.
368) Raghavendra V, Tanga F, DeLeo JA (2003) Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. J Pharmacol Exp Ther 306:624-630.
369) Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, Keefe FJ, Mogil JS, Ringkamp M, Sluka KA, Song XJ, Stevens B, Sullivan MD, Tutelman PR, 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.
370) Ransohoff RM (2016) A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? Nat Neurosci 19:987-991.
371) Raoof AA, van Obbergh LJ, de Ville de Goyet J, Verbeeck RK (1996) Extrahepatic glucuronidation of propofol in man: possible contribution of gut wall and kidney. Eur J Clin Pharmacol 50:91-96.
372) Rashid MH, Inoue M, Toda K, Ueda H (2004) Loss of peripheral morphine analgesia contributes to the reduced effectiveness of systemic morphine in neuropathic pain. J Pharmacol Exp Ther 309:380-387.
373) Reed A, Ware T, Li H, Fernando Bazan J, Cravatt BF (2023) TMEM164 is an acyltransferase that forms ferroptotic C20:4 ether phospholipids. Nat Chem Biol 19:378-388.
374) Ren K, Dubner R (2010) Interactions between the immune and nervous systems in pain. Nat Med 16:1267-1276.
375) Reyes H, Reisz-Porszasz S, Hankinson O (1992) Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. Science 256:1193-1195.
376) Rickmann M, Wolff JR (1995) S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain. Neuroscience 67:977-991.
377) Riedy M, Wang JY, Miller AP, Buckler A, Hall J, Guida M (2000) Genomic organization of the UGT2b gene cluster on human chromosome 4q13. Pharmacogenetics 10:251-260.
378) Rigaud M, Gemes G, Barabas ME, Chernoff DI, Abram SE, Stucky CL, Hogan QH (2008) Species and strain differences in rodent sciatic nerve anatomy: implications for studies of neuropathic pain. Pain 136:188-201.
379) Rizk ML, Zou L, Savic RM, Dooley KE (2017) Importance of Drug Pharmacokinetics at the Site of Action. Clin Transl Sci 10:133-142.
380) Roeckel LA, Utard V, Reiss D, Mouheiche J, Maurin H, Robe A, Audouard E, Wood JN, Goumon Y, Simonin F, Gaveriaux-Ruff C (2017) Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. Sci Rep 7:10406.
381) Rojewska E, Wawrzczak-Bargiela A, Szucs E, Benyhe S, Starnowska J, Mika J, Przewlocki R, Przewlocka B (2018) Alterations in the Activity of Spinal and Thalamic Opioid Systems in a Mice Neuropathic Pain Model. Neuroscience 390:293-302.
382) Rothhammer V, Quintana FJ (2019) The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. Nat Rev Immunol 19:184-197.
383) Rothhammer V et al. (2018) Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. Nature 557:724-728.
384) Rothhammer V et al. (2016) Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. Nat Med 22:586-597.

385) Rouleau M, Roberge J, Bellemare J, Guillemette C (2014) Dual roles for splice variants of the glucuronidation pathway as regulators of cellular metabolism. Mol Pharmacol 85:29-36.
386) Rouleau M, Roberge J, Falardeau SA, Villeneuve L, Guillemette C (2013) The relative protein abundance of UGT1A alternative splice variants as a key determinant of glucuronidation activity in vitro. Drug Metab Dispos 41:694-697.
387) Rowland A, Mackenzie PI, Miners JO (2015) Transporter-mediated uptake of UDP-glucuronic acid by human liver microsomes: assay conditions, kinetics, and inhibition. Drug Metab Dispos 43:147-153.
388) Sadler KE, Mogil JS, Stucky CL (2022) Innovations and advances in modelling and measuring pain in animals. Nat Rev Neurosci 23:70-85.
389) Sahu MP, Nikkila O, Lagas S, Kolehmainen S, Castren E (2019) Culturing primary neurons from rat hippocampus and cortex. Neuronal Signal 3:NS20180207.
390) Sakakibara Y, Katoh M, Kawayanagi T, Nadai M (2016a) Species and tissue differences in serotonin glucuronidation. Xenobiotica 46:605-611.
391) Sakakibara Y, Katoh M, Imai K, Kondo Y, Asai Y, Ikushiro S, Nadai M (2016b) Expression of UGT1A subfamily in rat brain. Biopharm Drug Dispos 37:314-319.
392) Salter MW, Stevens B (2017) Microglia emerge as central players in brain disease. Nat Med 23:1018-1027.
393) Salvi V, Sozio F, Sozzani S, Del Prete A (2017) Role of Atypical Chemokine Receptors in Microglial Activation and Polarization. Front Aging Neurosci 9:148.
394) Samineni VK, Grajales-Reyes JG, Copits BA, O'Brien DE, Trigg SL, Gomez AM, Bruchas MR, Gereau RWt (2017) Divergent Modulation of Nociception by Glutamatergic and GABAergic Neuronal Subpopulations in the Periaqueductal Gray. eNeuro 4.
395) Sandal M, Paltrinieri D, Carloni P, Musiani F, Giorgetti A (2013) Structure/function relationships of phospholipases C Beta. Curr Protein Pept Sci 14:650-657.
396) Saw G, Krishna K, Gupta N, Soong TW, Mallilankaraman K, Sajikumar S, Dheen ST (2020) Epigenetic regulation of microglial phosphatidylinositol 3-kinase pathway involved in long-term potentiation and synaptic plasticity in rats. Glia 68:656-669.
397) Sawada S, Suzuki H, Ichimaida F, Yamaguchi MA, Iwashita T, Fukui Y, Hemmi H, Nishino T, Nakayama T (2005) UDP-glucuronic acid:anthocyanin glucuronosyltransferase from red daisy (Bellis perennis) flowers. Enzymology and phylogenetics of a novel glucuronosyltransferase involved in flower pigment biosynthesis. J Biol Chem 280:899-906.
398) Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA (2000) The neutrophil as a cellular source of chemokines. Immunol Rev 177:195-203.
399) Scheffel J, Regen T, Van Rossum D, Seifert S, Ribes S, Nau R, Parsa R, Harris RA, Boddeke HW, Chuang HN, Pukrop T, Wessels JT, Jurgens T, Merkler D, Bruck W, Schnaars M, Simons M, Kettenmann H, Hanisch UK (2012) Toll-like receptor activation reveals developmental reorganization and unmasks responder subsets of microglia. Glia 60:1930-1943.
400) Schmitz T, Endesfelder S, Chew LJ, Zaak I, Buhrer C (2012) Minocycline protects oligodendroglial precursor cells against injury caused by oxygen-glucose deprivation. J Neurosci Res 90:933-944.
401) Scholz J, Broom DC, Youn DH, Mills CD, Kohno T, Suter MR, Moore KA, Decosterd I, Coggeshall RE, Woolf CJ (2005) Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. J Neurosci 25:7317-7323.

402) Scholz J et al. (2019) The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. Pain 160:53-59.
403) Schwabenland M, Bruck W, Priller J, Stadelmann C, Lassmann H, Prinz M (2021) Analyzing microglial phenotypes across neuropathologies: a practical guide. Acta Neuropathol 142:923-936.
404) Seifert S, Pannell M, Uckert W, Farber K, Kettenmann H (2011) Transmitter- and hormone-activated Ca(2+) responses in adult microglia/brain macrophages in situ recorded after viral transduction of a recombinant Ca(2+) sensor. Cell Calcium 49:365-375.
405) Sertürner FWA (1806) Darstellung der reinen Mohnsäure (Opiumsäure) nebst einer Chemischen Untersuchung des Opiums mit vorzüglicher Hinsicht auf einendarin neu entdeckten Stoff und die dahin gehörigen Bemerkungen. Journal der Pharmazie für Ärzte, Apotheker und Chemisten 14:47-93.
406) Shackleton DA, Castillo LIR, Hampton AJD, Volodin A, Hadjistavropoulos T (2023) Age Differences in Thermal Pain Responses: A Direct Laboratory Comparison. J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci 78:1521-1525.
407) Shansky RM, Murphy AZ (2021) Considering sex as a biological variable will require a global shift in science culture. Nat Neurosci 24:457-464.
408) Shao F, Wang X, Wu H, Wu Q, Zhang J (2022) Microglia and Neuroinflammation: Crucial Pathological Mechanisms in Traumatic Brain Injury-Induced Neurodegeneration. Front Aging Neurosci 14:825086.
409) Sheehan GD, Martin MK, Young VA, Powell R, Bhattacharjee A (2021) Thermal hyperalgesia and dynamic weight bearing share similar recovery dynamics in a sciatic nerve entrapment injury model. Neurobiol Pain 10:100079.
410) Shen ES, Whitlock JP, Jr. (1992) Protein-DNA interactions at a dioxin-responsive enhancer. Mutational analysis of the DNA-binding site for the liganded Ah receptor. J Biol Chem 267:6815-6819.
411) Sheu ML, Pan LY, Sheehan J, Yang MY, Pan HC (2022) Modulation of Aryl Hydrocarbon Receptor Expression Alleviated Neuropathic Pain in a Chronic Constriction Nerve Injury Animal Model. Int J Mol Sci 23.
412) Shields SD, Eckert WA, 3rd, Basbaum AI (2003) Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. J Pain 4:465-470.
413) Shyu BC, He AB, Yu YH, Huang ACW (2021) Tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors but not anticonvulsants ameliorate pain, anxiety, and depression symptoms in an animal model of central post-stroke pain. Mol Pain 17:17448069211063351.
414) Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. Cell Stem Cell 7:483-495.
415) Silvin A, Ginhoux F (2018) Microglia heterogeneity along a spatio-temporal axis: More questions than answers. Glia 66:2045-2057.
416) Simpson DSA, Oliver PL (2020) ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. Antioxidants (Basel) 9.
417) Slominski AT, Kim TK, Slominski RM, Song Y, Qayyum S, Placha W, Janjetovic Z, Kleszczynski K, Atigadda V, Song Y, Raman C, Elferink CJ, Hobrath JV, Jetten AM, Reiter RJ (2023) Melatonin and Its Metabolites Can Serve as Agonists on the Aryl Hydrocarbon Receptor and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. Int J Mol Sci 24.

418) Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. Trends Neurosci 32:638-647.
419) Sojka KM, Kern CB, Pollenz RS (2000) Expression and subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) protein in mouse and chicken over developmental time. Anat Rec 260:327-334.
420) Somjen GG (2002) Ion regulation in the brain: implications for pathophysiology. Neuroscientist 8:254-267.
421) Sommi RW, Crismon ML, Bowden CL (1987) Fluoxetine: a serotonin-specific, second-generation antidepressant. Pharmacotherapy 7:1-15.
422) Song X, Tanaka S, Cox D, Lee SC (2004) Fcgamma receptor signaling in primary human microglia: differential roles of PI-3K and Ras/ERK MAPK pathways in phagocytosis and chemokine induction. J Leukoc Biol 75:1147-1155.
423) Sontheimer H, Black JA, Waxman SG (1996) Voltage-gated Na+ channels in glia: properties and possible functions. Trends Neurosci 19:325-331.
424) Soulet D, Rivest S (2008) Microglia. Curr Biol 18:R506-508.
425) South SM, Edwards SR, Smith MT (2009) Antinociception versus serum concentration relationships following acute administration of intravenous morphine in male and female Sprague-Dawley rats: differences between the tail flick and hot plate nociceptive tests. Clin Exp Pharmacol Physiol 36:20-28.
426) Srinivasan R, Huang BS, Venugopal S, Johnston AD, Chai H, Zeng H, Golshani P, Khakh BS (2015) Ca(2+) signaling in astrocytes from Ip3r2(-/-) mice in brain slices and during startle responses in vivo. Nat Neurosci 18:708-717.
427) Staahl C, Upton R, Foster DJ, Christrup LL, Kristensen K, Hansen SH, Arendt-Nielsen L, Drewes AM (2008) Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of morphine and oxycodone concentrations and analgesic effect in a multimodal experimental pain model. J Clin Pharmacol 48:619-631.
428) Stachowski NJ, Dougherty KJ (2021) Spinal Inhibitory Interneurons: Gatekeepers of Sensorimotor Pathways. Int J Mol Sci 22.
429) Stander S, Gunzer M, Metze D, Luger T, Steinhoff M (2002) Localization of mu-opioid receptor 1A on sensory nerve fibers in human skin. Regul Pept 110:75-83.
430) Stein C, Lang LJ (2009) Peripheral mechanisms of opioid analgesia. Curr Opin Pharmacol 9:3-8.
431) Stein C, Schafer M, Hassan AH (1995) Peripheral opioid receptors. Ann Med 27:219-221.
432) Stein C, Pfluger M, Yassouridis A, Hoelzl J, Lehrberger K, Welte C, Hassan AH (1996) No tolerance to peripheral morphine analgesia in presence of opioid expression in inflamed synovia. J Clin Invest 98:793-799.
433) Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. Cell 131:1164-1178.
434) Stiller CO, Bergquist J, Beck O, Ekman R, Brodin E (1996) Local administration of morphine decreases the extracellular level of GABA in the periaqueductal gray matter of freely moving rats. Neurosci Lett 209:165-168.
435) Su N, Cai P, Dou Z, Yin X, Xu H, He J, Li Z, Li C (2023) Brain nuclei and neural circuits in neuropathic pain and brain modulation mechanisms of acupuncture: a review on animal-based experimental research. Front Neurosci 17:1243231.

436) Suleman FG, Abid A, Gradinaru D, Daval JL, Magdalou J, Minn A (1998) Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. Arch Biochem Biophys 358:63-67.
437) Sun H, He X, Tao X, Hou T, Chen M, He M, Liao H (2020) The CD200/CD200R signaling pathway contributes to spontaneous functional recovery by enhancing synaptic plasticity after stroke. J Neuroinflammation 17:171.
438) Sun L, Zhao JY, Gu X, Liang L, Wu S, Mo K, Feng J, Guo W, Zhang J, Bekker A, Zhao X, Nestler EJ, Tao YX (2017a) Nerve injury-induced epigenetic silencing of opioid receptors controlled by DNMT3a in primary afferent neurons. Pain 158:1153-1165.
439) Sun W, Cornwell A, Li J, Peng S, Osorio MJ, Aalling N, Wang S, Benraiss A, Lou N, Goldman SA, Nedergaard M (2017b) SOX9 Is an Astrocyte-Specific Nuclear Marker in the Adult Brain Outside the Neurogenic Regions. J Neurosci 37:4493-4507.
440) Sun Y, Che J, Zhang J (2023) Emerging non-proinflammatory roles of microglia in healthy and diseased brains. Brain Res Bull 199:110664.
441) Suter MR, Wen YR, Decosterd I, Ji RR (2007) Do glial cells control pain? Neuron Glia Biol 3:255-268.
442) Sykova E, Rothenberg S, Krekule I (1974) Changes of extracellular potassium concentration during spontaneous activity in the mesencephalic reticular formation of the rat. Brain Res 79:333-337.
443) Tan YL, Yuan Y, Tian L (2020) Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. Mol Psychiatry 25:351-367.
444) Tanaka M, Fujikawa M, Oguro A, Itoh K, Vogel CFA, Ishihara Y (2021) Involvement of the Microglial Aryl Hydrocarbon Receptor in Neuroinflammation and Vasogenic Edema after Ischemic Stroke. Cells 10.
445) Tansley S et al. (2022a) Single-cell RNA sequencing reveals time- and sex-specific responses of mouse spinal cord microglia to peripheral nerve injury and links ApoE to chronic pain. Nat Commun 13:843.
446) Tansley S et al. (2022b) Microglia-mediated degradation of perineuronal nets promotes pain. Science 377:80-86.
447) Tao L, Ding Q, Gao C, Sun X (2016) Resveratrol attenuates neuropathic pain through balancing pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines release in mice. Int Immunopharmacol 34:165-172.
448) Tashima R, Koga K, Sekine M, Kanehisa K, Kohro Y, Tominaga K, Matsushita K, Tozaki-Saitoh H, Fukazawa Y, Inoue K, Yawo H, Furue H, Tsuda M (2018) Optogenetic Activation of Non-Nociceptive Abeta Fibers Induces Neuropathic Pain-Like Sensory and Emotional Behaviors after Nerve Injury in Rats. eNeuro 5.
449) Tay TL, Mai D, Dautzenberg J, Fernandez-Klett F, Lin G, Sagar, Datta M, Drougard A, Stempfl T, Ardura-Fabregat A, Staszewski O, Margineanu A, Sporbert A, Steinmetz LM, Pospisilik JA, Jung S, Priller J, Grun D, Ronneberger O, Prinz M (2017) A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. Nat Neurosci 20:793-803.
450) Thomas JHL, Lui L, Abell A, Tieu W, Somogyi AA, Bajic JE, Hutchinson MR (2022) Toll-like receptors change morphine-induced antinociception, tolerance and dependence: Studies using male and female TLR and signalling gene KO mice. Brain Behav Immun 102:71-85.

451) Thompson SJ, Pitcher MH, Stone LS, Tarum F, Niu G, Chen X, Kiesewetter DO, Schweinhardt P, Bushnell MC (2018) Chronic neuropathic pain reduces opioid receptor availability with associated anhedonia in rat. Pain 159:1856-1866.
452) Todd AJ, Puskar Z, Spike RC, Hughes C, Watt C, Forrest L (2002) Projection neurons in lamina I of rat spinal cord with the neurokinin 1 receptor are selectively innervated by substance p-containing afferents and respond to noxious stimulation. J Neurosci 22:4103-4113.
453) Togna AR, Antonilli L, Dovizio M, Salemme A, De Carolis L, Togna GI, Patrignani P, Nencini P (2013) In vitro morphine metabolism by rat microglia. Neuropharmacology 75:391-398.
454) Toyoshima S, Okayama Y (2022) Neuro-allergology: Mast cell-nerve cross-talk. Allergol Int 71:288-293.
455) Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. Pharmacol Rev 62:405-496.
456) Treede RD 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.
457) Trouvin AP, Perrot S (2019) New concepts of pain. Best Pract Res Clin Rheumatol 33:101415.
458) Tsaktanis T, Beyer T, Nirschl L, Linnerbauer M, Grummel V, Bussas M, Tjon E, Muhlau M, Korn T, Hemmer B, Quintana FJ, Rothhammer V (2021) Aryl Hydrocarbon Receptor Plasma Agonist Activity Correlates With Disease Activity in Progressive MS. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 8.
459) Tzvetkov MV, dos Santos Pereira JN, Meineke I, Saadatmand AR, Stingl JC, Brockmoller J (2013) Morphine is a substrate of the organic cation transporter OCT1 and polymorphisms in OCT1 gene affect morphine pharmacokinetics after codeine administration. Biochem Pharmacol 86:666-678.
460) Uchihashi S, Nishikawa M, Sakaki T, Ikushiro S (2013) Comparison of serotonin glucuronidation activity of UDP-glucuronosyltransferase 1a6a (Ugt1a6a) and Ugt1a6b: evidence for the preferential expression of Ugt1a6a in the mouse brain. Drug Metab Pharmacokinet 28:260-264.
461) Uddin O, Studlack P, Akintola T, Raver C, Castro A, Masri R, Keller A (2018) Amplified parabrachial nucleus activity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. Neurobiol Pain 3:22-30.
462) Ulusoy A, Decressac M, Kirik D, Bjorklund A (2010) Viral vector-mediated overexpression of alpha-synuclein as a progressive model of Parkinson's disease. Prog Brain Res 184:89-111.
463) Unkila M, Tuomisto JT, Pohjanvirta R, MacDonald E, Tuomisto L, Koulu M, Tuomisto J (1993) Effect of a single lethal dose of TCDD on the levels of monoamines, their metabolites and tryptophan in discrete brain nuclei and peripheral tissues of Long-Evans rats. Pharmacol Toxicol 72:279-285.
464) Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y (2009) Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 877:2198-2207.
465) Van Zeller M, Sebastiao AM, Valente CA (2022) Microglia Depletion from Primary Glial Cultures Enables to Accurately Address the Immune Response of Astrocytes. Biomolecules 12.

466) Vankriekelsvenne E, Chrzanowski U, Manzhula K, Greiner T, Wree A, Hawlitschka A, Llovera G, Zhan J, Joost S, Schmitz C, Ponsaerts P, Amor S, Nutma E, Kipp M, Kaddatz H (2022) Transmembrane protein 119 is neither a specific nor a reliable marker for microglia. Glia 70:1170-1190.
467) Velasco-Estevez M, Rolle SO, Mampay M, Dev KK, Sheridan GK (2020) Piezo1 regulates calcium oscillations and cytokine release from astrocytes. Glia 68:145-160.
468) Vergne-Salle P, Bertin P (2021) Chronic pain and neuroinflammation. Joint Bone Spine 88:105222.
469) Verkhratsky A, Parpura V, Li B, Scuderi C (2021) Astrocytes: The Housekeepers and Guardians of the CNS. Adv Neurobiol 26:21-53.
470) Vidal-Itriago A, Radford RAW, Aramideh JA, Maurel C, Scherer NM, Don EK, Lee A, Chung RS, Graeber MB, Morsch M (2022) Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. Front Immunol 13:997786.
471) Vieira MS, Santos AK, Vasconcellos R, Goulart VAM, Parreira RC, Kihara AH, Ulrich H, Resende RR (2018) Neural stem cell differentiation into mature neurons: Mechanisms of regulation and biotechnological applications. Biotechnol Adv 36:1946-1970.
472) Vives V, Alonso G, Solal AC, Joubert D, Legraverend C (2003) Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. J Comp Neurol 457:404-419.
473) Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, Ao Y, Morales LB, Tiwari-Woodruff S, Sofroniew MV (2009) Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. J Neurosci 29:11511-11522.
474) Wagner JE, Jr., Brunstein CG, Boitano AE, DeFor TE, McKenna D, Sumstad D, Blazar BR, Tolar J, Le C, Jones J, Cooke MP, Bleul CC (2016) Phase I/II Trial of StemRegenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-Alone Graft. Cell Stem Cell 18:144-155.
475) Wahlstrom A, Winblad B, Bixo M, Rane A (1988) Human brain metabolism of morphine and naloxone. Pain 35:121-127.
476) Walz W, Lang MK (1998) Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. Neurosci Lett 257:127-130.
477) Wan C, Zhang Y, Jiang J, Jiang S, Nie X, Li A, Guo A, Wu Q (2015) Critical Role of TAK1-Dependent Nuclear Factor-kappaB Signaling in 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced Astrocyte Activation and Subsequent Neuronal Death. Neurochem Res 40:1220-1231.
478) Wang F, Qi X, Zhang J, Huang JH (2020) Astrocytic modulation of potassium under seizures. Neural Regen Res 15:980-987.
479) Wei F, Dubner R, Zou S, Ren K, Bai G, Wei D, Guo W (2010) Molecular depletion of descending serotonin unmasks its novel facilitatory role in the development of persistent pain. J Neurosci 30:8624-8636.
480) Wei F, Vadakkan KI, Toyoda H, Wu LJ, Zhao MG, Xu H, Shum FW, Jia YH, Zhuo M (2006) Calcium calmodulin-stimulated adenylyl cyclases contribute to activation of extracellular signal-regulated kinase in spinal dorsal horn neurons in adult rats and mice. J Neurosci 26:851-861.
481) Weibel R, Reiss D, Karchewski L, Gardon O, Matifas A, Filliol D, Becker JA, Wood JN, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C (2013) Mu opioid receptors on primary afferent nav1.8 neurons contribute to opiate-induced analgesia: insight from conditional knockout mice. PLoS One 8:e74706.

482) Weil MT, Schulz-Eberlin G, Mukherjee C, Kuo-Elsner WP, Schafer I, Muller C, Simons M (2019) Isolation and Culture of Oligodendrocytes. Methods Mol Biol 1936:79-95.
483) Weinhard L, di Bartolomei G, Bolasco G, Machado P, Schieber NL, Neniskyte U, Exiga M, Vadisiute A, Raggioli A, Schertel A, Schwab Y, Gross CT (2018) Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. Nat Commun 9:1228.
484) Wercberger R, Basbaum AI (2019) Spinal cord projection neurons: a superficial, and also deep, analysis. Curr Opin Physiol 11:109-115.
485) White DM, Basbaum AI, Goetzl EJ, Levine JD (1990) The 15-lipoxygenase product, 8R,15S-diHETE, stereospecifically sensitizes C-fiber mechanoheat nociceptors in hairy skin of rat. J Neurophysiol 63:966-970.
486) White SS, Birnbaum LS (2009) An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev 27:197-211.
487) Wiberg M, Westman J, Blomqvist A (1987) Somatosensory projection to the mesencephalon: an anatomical study in the monkey. J Comp Neurol 264:92-117.
488) Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, Ellisman MH, Pekny M (2006) Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. Proc Natl Acad Sci U S A 103:17513-17518.
489) Willis WD, Westlund KN (1997) Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. J Clin Neurophysiol 14:2-31.
490) Willis WD, Kenshalo DR, Jr., Leonard RB (1979) The cells of origin of the primate spinothalamic tract. J Comp Neurol 188:543-573.
491) Witcher MR, Kirov SA, Harris KM (2007) Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. Glia 55:13-23.
492) Witcher MR, Park YD, Lee MR, Sharma S, Harris KM, Kirov SA (2010) Three-dimensional relationships between perisynaptic astroglia and human hippocampal synapses. Glia 58:572-587.
493) Wobbrock JO, Findlater L, Gergle D, Higgins JJ (2011) The Aligned Rank Transform for Nonparametric Factorial Analyses Using Only ANOVA Procedures. Proceedings of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems: 143–146.
494) Woodburn SC, Bollinger JL, Wohleb ES (2021) The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress. J Neuroinflammation 18:258.
495) Woolf CJ, Thompson SWN (1991) The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. Pain 44:293-299.
496) Woolf CJ, Salter MW (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. Science 288:1765-1769.
497) Wright M (1996) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. Hum Exp Toxicol 15:176-179.
498) Xie JD, Chen SR, Pan HL (2017) Presynaptic mGluR5 receptor controls glutamatergic input through protein kinase C-NMDA receptors in paclitaxel-induced neuropathic pain. J Biol Chem 292:20644-20654.
499) Xie R, Bouw MR, Hammarlund-Udenaes M (2000) Modelling of the blood-brain barrier transport of morphine-3-glucuronide studied using microdialysis in the rat: involvement of probenecid-sensitive transport. Br J Pharmacol 131:1784-1792.

500) Xie W, Strong JA, Zhang JM (2009) Early blockade of injured primary sensory afferents reduces glial cell activation in two rat neuropathic pain models. Neuroscience 160:847-857.
501) Xing GG, Liu FY, Qu XX, Han JS, Wan Y (2007) Long-term synaptic plasticity in the spinal dorsal horn and its modulation by electroacupuncture in rats with neuropathic pain. Exp Neurol 208:323-332.
502) Xu M, Cheng Z, Ding Z, Wang Y, Guo Q, Huang C (2018) Resveratrol enhances IL-4 receptor-mediated anti-inflammatory effects in spinal cord and attenuates neuropathic pain following sciatic nerve injury. Mol Pain 14:1744806918767549.
503) Xu N, Tang XH, Pan W, Xie ZM, Zhang GF, Ji MH, Yang JJ, Zhou MT, Zhou ZQ (2017) Spared Nerve Injury Increases the Expression of Microglia M1 Markers in the Prefrontal Cortex of Rats and Provokes Depression-Like Behaviors. Front Neurosci 11:209.
504) Yaksh TL, Yeung JC, Rudy TA (1976) Systematic examination in the rat of brain sites sensitive to the direct application of morphine: observation of differential effects within the periaqueductal gray. Brain Res 114:83-103.
505) Yalcin I, Megat S, Barthas F, Waltisperger E, Kremer M, Salvat E, Barrot M (2014) The sciatic nerve cuffing model of neuropathic pain in mice. J Vis Exp.
506) Yam MF, Loh YC, Tan CS, Khadijah Adam S, Abdul Manan N, Basir R (2018) General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. Int J Mol Sci 19.
507) Yang G, Ge S, Singh R, Basu S, Shatzer K, Zen M, Liu J, Tu Y, Zhang C, Wei J, Shi J, Zhu L, Liu Z, Wang Y, Gao S, Hu M (2017) Glucuronidation: driving factors and their impact on glucuronide disposition. Drug Metab Rev 49:105-138.
508) Yang L, Zhou Y, Zhang L, Wang Y, Zhang Y, Xiao Z (2023) Aryl hydrocarbon receptors improve migraine-like pain behaviors in rats through the regulation of regulatory T cell/T-helper 17 cell-related homeostasis. Headache 63:1045-1060.
509) Yang ZZ, Li L, Wang L, Xu MC, An S, Jiang C, Gu JK, Wang ZJ, Yu LS, Zeng S (2016) siRNA capsulated brain-targeted nanoparticles specifically knock down OATP2B1 in mice: a mechanism for acute morphine tolerance suppression. Sci Rep 6:33338.
510) Yeager RL, Reisman SA, Aleksunes LM, Klaassen CD (2009) Introducing the "TCDD-inducible AhR-Nrf2 gene battery". Toxicol Sci 111:238-246.
511) Yeh SY (1975) Urinary excretion of morphine and its metabolites in morphine-dependent subjects. J Pharmacol Exp Ther 192:201-210.
512) Yi MH, Liu YU, Umpierre AD, Chen T, Ying Y, Zheng J, Dheer A, Bosco DB, Dong H, Wu LJ (2021) Optogenetic activation of spinal microglia triggers chronic pain in mice. PLoS Biol 19:e3001154.
513) Yousefpour N, Locke S, Deamond H, Wang C, Marques L, St-Louis M, Ouellette J, Khoutorsky A, De Koninck Y, Ribeiro-da-Silva A (2023) Time-dependent and selective microglia-mediated removal of spinal synapses in neuropathic pain. Cell Rep 42:112010.
514) Yun SP et al. (2018) Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. Nat Med 24:931-938.
515) Yune TY, Lee JY, Jung GY, Kim SJ, Jiang MH, Kim YC, Oh YJ, Markelonis GJ, Oh TH (2007) Minocycline alleviates death of oligodendrocytes by inhibiting pro-nerve growth factor production in microglia after spinal cord injury. J Neurosci 27:7751-7761.
516) Zabel MK, Kirsch WM (2013) From development to dysfunction: microglia and the complement cascade in CNS homeostasis. Ageing Res Rev 12:749-756.

517) Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA (2012) Genomic analysis of reactive astrogliosis. J Neurosci 32:6391-6410.
518) Zelcer N, van de Wetering K, Hillebrand M, Sarton E, Kuil A, Wielinga PR, Tephly T, Dahan A, Beijnen JH, Borst P (2005) Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. Proc Natl Acad Sci U S A 102:7274-7279.
519) Zhang HY, Wang Y, He Y, Wang T, Huang XH, Zhao CM, Zhang L, Li SW, Wang C, Qu YN, Jiang XX (2020) A1 astrocytes contribute to murine depression-like behavior and cognitive dysfunction, which can be alleviated by IL-10 or fluorocitrate treatment. J Neuroinflammation 17:200.
520) Zhang J, De Koninck Y (2006) Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. J Neurochem 97:772-783.
521) Zhang L, Jia Z, Wu Q, Bai T, Wang B, Hu X, Li T, Liu X, Fu J, Chen Y, Ding X, Liu Z, Xu Z, Zhou H (2023) Alleviating symptoms of neurodegenerative disorders by astrocyte-specific overexpression of TMEM164 in mice. Nat Metab 5:1787-1802.
522) Zhang X, Bao L, Shi TJ, Ju G, Elde R, Hokfelt T (1998) Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. Neuroscience 82:223-240.
523) Zhang Y, Chen SR, Laumet G, Chen H, Pan HL (2016) Nerve Injury Diminishes Opioid Analgesia through Lysine Methyltransferase-mediated Transcriptional Repression of mu-Opioid Receptors in Primary Sensory Neurons. J Biol Chem 291:8475-8485.
524) Zhou XL, Yu LN, Wang Y, Tang LH, Peng YN, Cao JL, Yan M (2014) Increased methylation of the MOR gene proximal promoter in primary sensory neurons plays a crucial role in the decreased analgesic effect of opioids in neuropathic pain. Mol Pain 10:51.
525) Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, Borsello T, Bonny C, Strichartz GR, Decosterd I, Ji RR (2006) A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. J Neurosci 26:3551-3560.
526) Zhuo M, Wu G, Wu LJ (2011) Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. Mol Brain 4:31.
527) Zuo Y, Perkins NM, Tracey DJ, Geczy CL (2003) Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. Pain 105:467-479.

Volodya
HOVHANNISYAN

Implication des microglies et des astrocytes dans le métabolisme central de la morphine

Résumé

La morphine est l'opiacée de référence utilisée en clinique pour lutter contre la douleur. Néanmoins, dans certains cas, comme lors de douleurs neuropathiques, celle-ci est inefficace. La douleur neuropathique se caractérise par une neuroinflammation qui peut impacter l'activité des cellules gliales au sein du système nerveux central. Mes travaux de thèse montrent que ces cellules gliales, notamment les astrocytes réactifs, métabolisent la morphine de façon plus intense lors d'une neuroinflammation. Ce phénomène est relié à l'augmentation de l'expression d'un facteur de transcription appelé AhR qui est capable d'augmenter l'expression des enzymes de métabolisme de la morphine. En inhibant l'activité de l'AhR *via* l'injection d'un inhibiteur appelé SR1, j'ai pu montrer, pour la première fois que l'effet analgésique de la morphine était augmenté dans un modèle de douleurs neuropathiques. Ces travaux ouvrent alors la voie à un potentiel mécanisme, jusqu'alors inexploité, dans lequel il est possible d'augmenter les effets de la morphine pour traiter la douleur neuropathique.

Mots-clés : morphine – métabolisme central – cellules gliales – douleurs neuropathiques – AhR – SR1

Résumé en anglais

Morphine is the standard opiate used clinically to combat pain. However, in some cases, such as neuropathic pain, it is ineffective. Neuropathic pain is characterized by neuroinflammation that can affect glial cell activity within the central nervous system. My thesis work shows that these glial cells, particularly reactive astrocytes, metabolize morphine more intensely during neuroinflammation. This phenomenon is linked to increased expression of a transcription factor called AhR, which is capable of increasing expression of morphine-metabolizing enzymes. By inhibiting AhR activity via injection of an inhibitor called SR1, I was able to show, for the first time, that the analgesic effect of morphine was increased in a model of neuropathic pain. This work paves the way to a potential, hitherto unexploited, mechanism for enhancing the effects of morphine to treat neuropathic pain.

Key words: morphine - central metabolism - glial cells - neuropathic pain - AhR – SR1