

Université de Montréal

**Rôle et implication du système cannabinoïde
dans la modulation périphérique de la douleur
inflammatoire et neuropathique**

par

Julie Desroches

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Pharmacologie,
option Neuropharmacologie

Avril, 2013

© Julie Desroches, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Rôle et implication du système cannabinoïde
dans la modulation périphérique de la douleur inflammatoire et neuropathique

Présentée par :
Julie Desroches

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Louis-Éric Trudeau, président-rapporteur
Dr Pierre Beaulieu, directeur de recherche
Dre Chantal Lambert, co-directrice de recherche
Dre Hélène Girouard, membre du jury
Dr Mark Ware, examinateur externe
Dre Sandra Boye, représentante du doyen de la FES

Résumé

Les dérivés de l'opium (opioïdes) et du cannabis (cannabinoïdes) présentent de nombreuses propriétés intéressantes. Suite à l'identification de leurs récepteurs respectifs, diverses stratégies pharmacologiques ont tenté d'exploiter leurs propriétés analgésiques. Le clonage des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ a favorisé la découverte de composés endogènes pour ces récepteurs, les endocannabinoïdes, dont les deux plus étudiés sont l'anandamide et le 2-arachidonyle glycérol (2-AG). Cette découverte a également mené à l'identification d'enzymes qui catalysent l'inactivation de ces cannabinoïdes endogènes : une amidohydrolase des acides gras ou FAAH ainsi qu'une monoacylglycérol lipase ou MAGL. Le système cannabinoïde endogène est régulé à la hausse dans une variété de processus pathologiques, tels que les douleurs inflammatoire et neuropathique. Cette augmentation est habituellement interprétée comme une réaction physiologique visant à rétablir l'homéostasie et elle a notamment été observée en périphérie. Les endocannabinoïdes semblent donc agir de façon spécifique à des moments clés dans certains tissus ciblés afin de minimiser les conséquences reliées au déclenchement de ces douleurs. Cette observation est très intéressante d'un point de vue thérapeutique puisqu'elle suggère la possibilité de cibler les enzymes de dégradation des endocannabinoïdes dans le but d'augmenter leurs concentrations locales et d'ainsi prolonger leur action neuromodulatrice. En périphérie, l'activation des récepteurs cannabinoïdes induit des effets antinociceptifs bénéfiques tout en minimisant les effets indésirables souvent associés à leur activation centrale. Nous avons orienté nos travaux vers la modulation périphérique de ce système endogène à l'aide d'inhibiteurs des enzymes de dégradation des endocannabinoïdes afin d'évaluer leur potentiel thérapeutique et d'élucider les mécanismes d'action qui sous-tendent leurs effets dans des modèles animaux de douleurs inflammatoire et neuropathique. Nous avons démontré que cette approche permet de soulager les symptômes associés à ces deux types de douleurs, et ce *via* les récepteurs CB₁ et CB₂.

Les systèmes cannabinoïde et opioïde présentent des similitudes, dont des localisations similaires le long des voies de la douleur, des mécanismes d'action relayés par

des récepteurs couplés aux protéines G et des propriétés pharmacologiques communes telles que l'analgésie. Le système opioïde est impliqué dans les effets antinociceptifs induits par les cannabinoïdes. À l'inverse, le rôle joué par le système cannabinoïde dans ceux induits par la morphine demeure incertain. Nous avons démontré que les effets antinociceptifs périphériques et spinaux produits par la morphine sont diminués chez les souris génétiquement modifiées chez lesquelles l'expression des récepteurs CB₁ ou CB₂ a été éliminée, laissant supposer un rôle pour ces récepteurs dans les effets de la morphine. Nous avons de plus démontré que la diminution de l'analgésie produite par la morphine dans ces souris n'est pas causée par un dysfonctionnement des récepteurs opioïdes mu (MOP) ni par une régulation à la baisse de ces récepteurs. Nos résultats confirment l'existence d'interactions fonctionnelles entre les systèmes cannabinoïde et opioïde au niveau périphérique et spinal.

Ces observations sont prometteuses d'un point de vue thérapeutique puisqu'une modulation périphérique ciblée des niveaux d'endocannabinoïdes et d'opioïdes endogènes permettrait de produire des effets analgésiques bénéfiques potentiellement synergiques tout en minimisant les effets indésirables associés à l'activation centrale de ces systèmes.

Mots-clés : 2-arachidonylglycérol, anandamide, récepteurs cannabinoïdes, monoacylglycérol lipase, amidohydrolase des acides gras, morphine, récepteurs opioïdes mu, douleur inflammatoire, douleur neuropathique.

Abstract

Opium (opioids) and cannabis (cannabinoids) derivatives present many interesting properties. Following the identification of their respective receptors, various pharmacological strategies have tried to exploit their analgesic properties. The cloning of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors has promoted the discovery of endogenous agonists of these receptors named endocannabinoids. The two mostly studied endocannabinoids are anandamide and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG). This has also led to the identification of enzymes that catalyze the inactivation of these endogenous cannabinoids: a fatty acid amide hydrolase or FAAH and a monoacylglycerol lipase or MAGL. It is known that the endogenous cannabinoid system is upregulated in a variety of pathological processes, such as inflammatory and neuropathic pain. This increase is usually interpreted as a physiological response to restore homeostasis and it was particularly observed in the periphery. Endocannabinoids seem to act specifically at key moments in targeted tissues to minimize the consequences related to the onset of pain. This observation is very interesting from a therapeutic perspective because it suggests the possibility of targeting the endocannabinoid degrading enzymes in order to increase their local concentrations and thus prolong their neuromodulatory action. At the peripheral level, the activation of cannabinoid receptors induces beneficial antinociceptive effects while minimizing side effects often associated with their central activation. We focused our work on the peripheral modulation of this endogenous system using inhibitors of endocannabinoid degrading enzymes to assess their therapeutic potential and to elucidate the mechanisms of action underlying their effects in animal models of inflammatory and neuropathic pain. We have demonstrated that this approach can relieve the symptoms associated with these two types of pain, through the activation of CB₁ and CB₂ receptors.

The opioid and cannabinoid systems have similarities, including comparable locations along the pain pathways, mechanisms of action relayed by G protein-coupled receptors and common pharmacological properties such as analgesia. The opioid system is involved in the antinociceptive effects induced by cannabinoids. In contrast, the participation of the cannabinoid system in those induced by morphine remains uncertain. We have

demonstrated that peripheral and spinal antinociceptive effects induced by morphine are reduced in genetically modified mice in which the expression of CB₁ and CB₂ receptors was eliminated, suggesting a role for these receptors in the effects of morphine. We have further demonstrated that the decrease in morphine-induced analgesia in these mice is not caused by a malfunction of the mu opioid receptors (MOP) or by a down-regulation of these receptors. Our results confirm the existence of functional interactions between cannabinoid and opioid systems at the peripheral and spinal levels.

These findings are promising from a therapeutic perspective since a targeted modulation of the levels of endocannabinoids and endogenous opioids would induce potentially synergistic beneficial analgesic effects while minimizing side effects associated with the central activation of these systems.

Keywords : 2-arachidonoylglycerol, anandamide, cannabinoid receptors, monoacylglycerol lipase, fatty acid amide hydrolase, morphine, mu opioid receptors, inflammatory pain, neuropathic pain

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	v
Liste des tableaux	xviii
Liste des figures	xix
Liste des sigles et abréviations	xx
Remerciements.....	xxvi
INTRODUCTION	1
SECTION I. La douleur.....	1
1 LES BASES NEUROPHYSIOLOGIQUES DE LA DOULEUR.....	2
1.1 De la périphérie à la moelle épinière.....	5
1.1.1 <i>Au niveau périphérique</i>	5
1.1.2 <i>Au niveau spinal</i>	8
1.2 De la moelle épinière au cerveau	10
1.3 Les mécanismes de modulation de la douleur	11
1.3.1 <i>Au niveau spinal (théorie du portillon)</i>	11
1.3.2 <i>Les contrôles inhibiteurs descendants</i>	12
1.3.3 <i>Au niveau des centres supérieurs du système nerveux central</i>	13
2 LES DIFFÉRENTS TYPES DE DOULEURS : INFLAMMATOIRE ET NEUROPATHIQUE	14
2.1 La douleur inflammatoire	14
2.1.1 <i>Activation et sensibilisation des nocicepteurs en contexte inflammatoire</i>	14
2.1.2 <i>Sensibilisation centrale et inflammation</i>	19
2.2 La douleur neuropathique	21

2.2.1	<i>Douleurs liées à une lésion nerveuse périphérique</i>	24
2.2.2	<i>Douleurs centrales</i>	29
2.3	Traitements actuels des douleurs inflammatoire et neuropathique	29
SECTION II. Le système cannabinoïde		31
1	HISTORIQUE.....	31
2	PHARMACOLOGIE DES CANNABINOÏDES	34
2.1	Généralités.....	34
2.2	Les phytocannabinoïdes	35
2.3	Pharmacologie des récepteurs cannabinoïdes CB ₁	36
2.3.1	<i>Localisation des récepteurs CB₁</i>	36
2.3.2	<i>Mécanismes de la transduction des signaux</i>	37
2.4	Pharmacologie des récepteurs cannabinoïdes CB ₂	40
2.4.1	<i>Localisation des récepteurs CB₂</i>	40
2.4.2	<i>Mécanismes de la transduction des signaux</i>	42
2.5	Modifications de l'expression des récepteurs cannabinoïdes	43
2.6	Les ligands synthétiques	45
2.7	Invalidation des gènes des récepteurs cannabinoïdes	46
2.7.1	<i>Souris <i>cnr1</i>KO</i>	47
2.7.2	<i>Souris <i>cnr2</i>KO</i>	48
2.8	Autres récepteurs cannabinoïdes	50
2.8.1	<i>Récepteurs GPR55</i>	50
2.8.2	<i>Récepteurs PPARs</i>	52
2.8.3	<i>Récepteurs ionotropes</i>	52
2.9	Les cannabinoïdes endogènes	52

2.9.1	<i>Anandamide</i>	54
2.9.2	<i>2-arachidonyl glycérol (2-AG)</i>	62
2.9.3	<i>Oléoyléthanolamide</i>	69
2.9.4	<i>Palmitoyléthanolamide</i>	70
2.9.5	<i>Autres endocannabinoïdes</i>	71
2.10	Les endocannabinoïdes comme messagers synaptiques agissant de façon rétrograde	72
2.10.1	<i>Rôle des endocannabinoïdes dans la plasticité synaptique à court terme</i>	72
2.10.2	<i>Rôle des endocannabinoïdes dans la plasticité à long terme</i>	75
2.11	Modulation du système cannabinoïde	76
SECTION III. Rôle du système cannabinoïde endogène dans la modulation de la douleur.....		77
1	GÉNÉRALITÉS.....	77
2	MODE D'ACTION DES CANNABINOÏDES DANS LA DOULEUR	78
2.1	Au niveau central	79
2.2	Au niveau spinal.....	81
2.3	Au niveau périphérique	82
3	ANALGÉSIE INDUITE PAR LES CANNABINOÏDES DANS DIFFÉRENTS MODÈLES ANIMAUX.....	85
3.1	Modèles de douleur inflammatoire.....	85
3.1.1	<i>Test à la formaline</i>	86
3.1.2	<i>Autres modèles de douleur inflammatoire</i>	92
3.2	Modèles de douleur neuropathique.....	94
3.2.1	<i>Ligature partielle du nerf sciatique</i>	95

3.2.2	<i>Autres modèles de douleur neuropathique</i>	99
4	INDICATIONS ET USAGES CLINIQUES	102
SECTION IV. L'implication du système cannabinoïde dans la modulation de la douleur : interactions avec le système opioïde		
1	SYSTÈME OPIOÏDE	106
1.1	Récepteurs opioïdes	106
1.2	Système opioïde endogène	107
1.3	Effets antinociceptifs des agonistes des récepteurs opioïdes	109
1.3.1	<i>Mécanismes d'action central</i>	109
1.3.2	<i>Mécanismes d'action spinal</i>	111
1.3.3	<i>Mécanismes d'action périphérique</i>	111
2	GÉNÉRALITÉS : INTERACTIONS ENTRE LES SYSTÈMES OPIOÏDE ET CANNABINOÏDE	113
3	INTERACTIONS BIDIRECTIONNELLES ENTRE LES SYSTÈMES OPIOÏDE ET CANNABINOÏDE	116
3.1	Participation du système opioïde dans les effets antinociceptifs du système cannabinoïde	116
3.1.1	<i>Antagonistes non sélectifs pour les sous-types de récepteurs opioïdes</i>	117
3.1.2	<i>Antagonistes sélectifs pour les sous-types de récepteurs opioïdes</i>	118
3.1.3	<i>Souris dont les gènes ont été invalidés (souris « knock-out »)</i>	118
3.2	Participation du système cannabinoïde dans les effets antinociceptifs du système opioïde	120
3.2.1	<i>Peu d'évidences dans la littérature actuelle</i>	120
3.2.2	<i>Incohérences entre études pharmacologiques et génétiques</i>	122
3.3	Synergie possible entre les systèmes opioïde et cannabinoïde	124
3.4	Mécanismes qui sous-tendent les interactions entre les systèmes opioïde et cannabinoïde.....	126

4	IMPLICATIONS CLINIQUES	128
	SECTION V. Problématique et hypothèses de recherche	131
	SECTION VI. Objectifs.....	133
	SECTION VII. Articles	135
1	ARTICLE 1 PUBLIÉ DANS LA REVUE <i>BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY</i>	135
	« <i>The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB₂ receptors</i> ».....	135
1.1	Abstract.....	136
1.2	Introduction	138
1.3	Methods.....	139
	1.3.1 <i>Animals</i>	139
	1.3.2 <i>Formalin test</i>	140
	1.3.3 <i>Protocol</i>	140
	1.3.4 <i>Paw edema</i>	141
	1.3.5 <i>Statistical analysis</i>	142
	1.3.6 <i>Drug sources and preparation</i>	142
1.4	Results.....	143
	1.4.1 <i>Antinociceptive effects of 2-AG and involvement of cannabinoid receptors</i> 143	
	1.4.2 <i>Paw oedema</i>	143
	1.4.3 <i>Antinociceptive effects of URB602, 2-AG and their combination at ED₅₀ doses</i>	143
	1.4.4 <i>Paw oedema</i>	144
	1.4.5 <i>Antinociceptive effects of URB602 and involvement of cannabinoid receptors</i>	144

1.4.6	<i>Paw oedema</i>	144
1.5	Discussion	145
1.6	Acknowledgements	149
1.7	References	150
1.8	Figures legend	159
2	ARTICLE 2 PUBLIÉ DANS LA REVUE <i>BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY</i>	169
	« <i>Modulation of the antinociceptive effects of 2-arachidonoyl glycerol by peripherally administered FAAH and MGL inhibitors in a neuropathic pain model</i> »	169
2.1	Abstract.....	170
2.2	Introduction	172
2.3	Methods.....	174
	2.3.1 <i>Animals</i>	174
	2.3.2 <i>Drug administration</i>	174
	2.3.3 <i>Neuropathic pain model</i>	174
	2.3.4 <i>Sensory testing</i>	175
	2.3.5 <i>Experimental protocols</i>	176
	2.3.6 <i>Statistical analysis</i>	177
2.4	Results.....	177
	2.4.1 <i>Mechanical allodynia</i>	177
	2.4.2 <i>Thermal hyperlagesia</i>	179
2.5	Discussion	180
2.6	Acknowledgements	184
2.7	References	185

2.8	Table.....	192
2.9	Legends to Figures	193
3	ARTICLE 3 EN RÉVISION À LA REVUE <i>NEUROPHARMACOLOGY</i>	204
	« <i>Endocannabinoids decrease neuropathic pain-related behavior in mice through the activation of one or both peripheral CB₁ and CB₂ receptors</i> »	204
3.1	Abstract.....	205
3.2	Introduction	206
3.3	Methods.....	208
	3.3.1 <i>Animals</i>	208
	3.3.2 <i>Drug administration</i>	209
	3.3.3 <i>Mouse model of neuropathic pain</i>	209
	3.3.4 <i>Sensory testing</i>	210
	3.3.5 <i>Experimental design</i>	211
	3.3.6 <i>Statistical analysis</i>	212
3.4	Results.....	212
	3.4.1 <i>Anti-allodynic effects of AEA, 2-AG and WIN 55,212-2 in the absence or presence of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptor antagonists in C57BL/6, cnr1KO and cnr2KO mice</i>	212
	3.4.2 <i>Anti-hyperalgesic effects of AEA, 2-AG and WIN 55,212-2 in the absence or presence of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptor antagonists in C57BL/6, cnr1KO and cnr2KO mice</i>	214
	3.4.3 <i>Anti-allodynic effects of AEA and 2-AG in the absence or presence of FAAH and MGL inhibitors in C57BL/6, cnr1KO and cnr2KO mice</i>	216
	3.4.4 <i>Anti-hyperalgesic effects of AEA and 2-AG in the absence or presence of FAAH and MGL inhibitors in C57BL/6, cnr1KO and cnr2KO mice</i>	217

3.4.5	<i>Anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of drugs are mediated locally in C57BL/6 mice</i>	219
3.5	Discussion	220
3.6	Conclusions	223
3.7	References	224
3.8	Legends to Figures	231
4	ARTICLE 4 SOUMIS À LA REVUE <i>NEUROSCIENCE</i>	241
	« <i>Involvement of cannabinoid receptors in peripheral and spinal morphine analgesia</i> »	241
4.1	Abstract.....	242
4.2	Introduction	243
4.3	Material and methods	245
	4.3.1 <i>Animals</i>	245
	4.3.2 <i>Drugs</i>	245
	4.3.3 <i>Behavioral studies</i>	246
	4.3.4 <i>Peripheral hindpaw oedema</i>	248
	4.3.5 <i>Saturation binding assays</i>	248
	4.3.6 <i>Immunofluorescence</i>	249
	4.3.7 <i>[³⁵S]GTPγS binding assay</i>	250
	4.3.8 <i>Calculation and statistical analysis</i>	251
4.4	Results.....	252
	4.4.1 <i>Intradermal formalin injection induces a similar biphasic nociceptive profile within all genotypes</i>	252
	4.4.2 <i>Involvement of CB₁ cannabinoid receptors in the antinociceptive effects of i.paw morphine in the formalin test</i>	253

4.4.3	<i>Involvement of CB₂ cannabinoid receptors in the antinociceptive effects of i.paw morphine in the formalin test.....</i>	253
4.4.4	<i>Locally mediated antinociceptive effects of i.paw morphine in the formalin test</i>	254
4.4.5	<i>Involvement of CB₁ cannabinoid receptors in the antinociceptive effects of i.t. morphine in the formalin test.....</i>	256
4.4.6	<i>Involvement of CB₂ cannabinoid receptors in the antinociceptive effects of i.t. morphine in the formalin test.....</i>	257
4.4.7	<i>Effect of formalin on thickness and edema of the hind paw.....</i>	257
4.4.8	<i>Cannabinoid receptors are not involved in the antinociceptive effects of s.c. morphine in the formalin test.....</i>	258
4.4.9	<i>Cannabinoid receptors are not involved in the antinociceptive effects of s.c. morphine in the hot-water immersion tail-flick test.....</i>	259
4.4.10	<i>No differences were detected in spinal MOP expression between the wild type and the knockout mice using immunofluorescence against spinal MOP.....</i>	260
4.4.11	<i>No differences detected in spinal MOP expression and binding properties between wild type and knockout mice using saturation binding assays.....</i>	260
4.4.12	<i>No differences were detected in spinal MOP activity between wild type and knockout mice using [³⁵S]GTPγS binding assay on mice spinal cord.....</i>	261
4.5	Discussion	262
4.6	Acknowledgments	267
4.7	References	268
4.8	Tables.....	278
4.9	Legends to Figure.....	281
SECTION VIII.	Discussion.....	295

1	RÔLE DU SYSTÈME ENDOCANNABINOÏDE DANS LA MODULATION PÉRIPHÉRIQUE DE LA DOULEUR INFLAMMATOIRE	295
1.1	Effets antinociceptifs périphériques du 2-AG.....	296
1.2	Effets antinociceptifs périphériques induits par la modulation du système endocannabinoïde.....	301
1.3	Effets antinociceptifs de la combinaison de 2-AG et d'URB602.....	305
2	RÔLE DU SYSTÈME ENDOCANNABINOÏDE DANS LA MODULATION PÉRIPHÉRIQUE DE LA DOULEUR NEUROPATHIQUE.....	307
2.1	Effets antinociceptifs périphériques des endocannabinoïdes.....	307
2.1.1	<i>Anandamide</i>	308
2.1.2	<i>2-arachidonyl glycérol</i>	310
2.2	Effets antinociceptifs périphériques produits par la modulation du système endocannabinoïde.....	313
2.2.1	<i>Modulation de l'anandamide avec un inhibiteur de la FAAH (URB597)</i>	314
2.2.2	<i>Modulation du 2-AG avec un inhibiteur de la MAGL (URB602)</i>	316
2.2.3	<i>Modulation du 2-AG avec un inhibiteur de la FAAH (URB597)</i>	317
2.2.4	<i>Disparités dans les mécanismes d'action sous-jacents à la modulation du système endocannabinoïde</i>	318
2.3	Approches pharmacologiques et génétiques utilisées pour élucider les mécanismes d'action des endocannabinoïdes	322
2.3.1	<i>Approches pharmacologiques</i>	322
2.3.2	<i>Approches génétiques</i>	324
2.3.3	<i>Combinaison complémentaire des approches pharmacologiques et génétiques</i>	326
2.4	Conclusions préliminaires.....	327

3	IMPLICATION DU SYSTÈME ENDOCANNABINOÏDE DANS LES EFFETS ANTINOCICEPTIFS DE LA MORPHINE.....	329
3.1	Au niveau périphérique et spinal.....	331
3.2	Au niveau systémique	332
3.2.1	<i>Test à la formaline</i>	332
3.2.2	<i>Test de retrait de la queue</i>	333
3.3	Hypothèses concernant les différences.....	334
3.3.1	<i>Implication des voies sérotoninergiques et noradrénergiques dans les effets systémiques de la morphine</i>	334
3.3.2	<i>Modifications compensatoires chez les souris knock-out</i>	335
3.3.3	<i>Interactions directes entre récepteurs opioïdes et cannabinoïdes</i>	337
3.3.4	<i>Libération d'endocannabinoïdes suite à l'activation du système opioïde</i>	339
3.3.5	<i>Altérations du tonus endocannabinoïde chez les souris knock-out</i>	341
SECTION IX.	Conclusion et perspectives	343
SECTION X.	Bibliographie	347

Liste des tableaux

Tableau I	Différents types de fibres nerveuses	6
Tableau II	Classification et causes de douleurs neuropathiques	22
Tableau III	Résumé des principaux ligands des récepteurs cannabinoïdes CB ₁ et CB ₂	46
Tableau IV	Principaux inhibiteurs de la FAAH	58
Tableau V	Principaux inhibiteurs de la MAGL	68
Tableau VI	Les comportements observés chez l'animal lors du test à la formaline	88
Tableau VII	Tableau comparatif des effets antinociceptifs de différents modulateurs du système endocannabinoïde dans le test à la formaline	91
Tableau VIII	Tableau comparatif des effets antinociceptifs de différents modulateurs du système endocannabinoïde dans différents tests de douleur inflammatoire	93
Tableau IX	Tableau comparatif des effets anti-allodyniques et anti-hyperalgésiques de différents modulateurs du système endocannabinoïde dans le modèle de ligature partielle du nerf sciatique	98
Tableau X	Tableau comparatif des effets anti-allodyniques et anti-hyperalgésiques de différents modulateurs du système endocannabinoïde dans différents modèles de douleur neuropathique	100
Tableau XI	Substances à bases de cannabinoïdes disponibles en thérapeutique au Canada	103
Tableau XII	Affinité des peptides opioïdes endogènes pour les différents récepteurs opioïdes	108

Liste des figures

Figure 1	Schéma général des voies de la douleur	3
Figure 2	Principaux sites de projection des fibres afférentes primaires dans la corne dorsale de la moelle épinière	9
Figure 3	Activation d'un nocicepteur au niveau périphérique	16
Figure 4	Sensibilisation centrale et périphérique	17
Figure 5	Le phénomène de sensibilisation centrale	20
Figure 6	Mécanismes des douleurs neuropathiques périphériques	24
Figure 7	Résumé des principales caractéristiques qui distinguent la douleur neuropathique	25
Figure 8	Simplification des principales voies de signalisation des récepteurs cannabinoïdes CB ₁ suivant leur activation par des agonistes	38
Figure 9	Principales voies de la biosynthèse et de la dégradation de l'anandamide	55
Figure 10	Les endocannabinoïdes tels que l'anandamide et le 2-AG sont métabolisés <i>via</i> plusieurs voies enzymatiques	60
Figure 11	Principales voies de la biosynthèse et de la dégradation du 2-AG	63
Figure 12	Synthèse du 2-AG et signalisation de façon rétrograde dans une synapse glutamatergique	64
Figure 13	Complexité du système cannabinoïde	70
Figure 14	Mécanismes de la plasticité à court et à long terme associée aux endocannabinoïdes	74
Figure 15	Schéma des principaux modèles de douleur neuropathique	95
Figure 16	Mode d'action des opioïdes dans le système nerveux central	110
Figure 17	Mode d'action des opioïdes au niveau périphérique	112
Figure 18	Les opioïdes endogènes et les cannabinoïdes endogènes sont présents aux trois niveaux de contrôle de la douleur	115
Figure 19	Trois principales hypothèses liées aux mécanismes des interactions entre les opioïdes et les cannabinoïdes	127

Liste des sigles et abréviations

2-AG	2-arachidonyl glycérol
5-HT	sérotonine
AA	acide arachidonique
ABHD6	<i>α-β-hydrolase domain 6</i>
ABHD12	<i>α-β-hydrolase domain 12</i>
AEA	anandamide
AINS	anti-inflammatoires non stéroïdiens
AM251	antagoniste des récepteurs CB ₁
AM630	antagoniste des récepteurs CB ₂
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole proprionic acid</i>
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
APN	aminopeptidase
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
AUC	aire sous la courbe
BDNF	facteur neurotrophe dérivé du cerveau
CB ₁	récepteur cannabinoïde 1
CB ₂	récepteur cannabinoïde 2
CBC	cannabichromène
CBD	cannabidiol
CBG	cannabigérol
CBN	cannabinol
CE ₅₀	concentration efficace 50
CFA	adjuvant complet de Freund
CCI	<i>chronic constriction injury</i>
CCK	cholécystokinine

CGRP	peptide relié au gène de la calcitonine
CIDN	contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs
<i>cnr1KO</i>	lignées de souris génétiquement modifiées chez lesquelles l'expression du récepteur CB ₁ a été éliminée
<i>cnr2KO</i>	lignées de souris génétiquement modifiées chez lesquelles l'expression du récepteur CB ₂ a été éliminée
COX	cyclo-oxygénase
CPS-WST _{0,1,2}	<i>composite pain score-weighted scores techniques</i>
CRF	facteur de libération de la corticotropine
DAGL	diacylglycérol lipase
DE ₅₀	dose efficace 50
DENK	inhibiteurs doubles des enképhalines
DMSO	diméthylsulfoxyde
DOP	récepteur opioïde δ (delta)
DRG	ganglions de la racine dorsale
DRt	noyau réticulaire dorsal
DSE	<i>depolarization-induced suppression of excitation</i>
DSI	<i>depolarization-induced suppression of inhibition</i>
EMT	transporteur membranaire des endocannabinoïdes
ENK	enképhalines
ERK	protéine kinase régulatrice de signaux extracellulaires
FAAH	amidohydrolase des acides gras
FABPs	<i>fatty acid binding proteins</i>
FLAT	variante « <i>FAAH-like</i> »
GABA	acide γ -aminobutyrique
GDNF	facteur neurotrophe dérivé de la glie
GIRK	canaux potassiques de la rectification entrante
GPR55	récepteur cannabinoïde potentiel

IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
i.c.v.	intracérébroventriculaire
i.p.	intrapéritonéal
i.paw.	intraplantaire
i.t.	intrathécal
IB4	isolectine B4
IFN- γ	interféron-gamma
IL	interleukine
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KOP	récepteur opioïde κ (kappa)
LC	<i>locus coeruleus</i>
LOX	lipoxygénase
LPS	lipopolysaccharide
LTD	<i>long term depression</i>
MAFP	methyl arachidonoyl fluorophosphonate
MAGL	monoacylglycérol lipase
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
mGluR5	récepteur métabotrope du groupe 1
mN	millinewtons
MOP	récepteur opioïde μ (mu)
NA	noradrénaline
NAAA	<i>N-acyléthanolamine acide amide hydrolase</i>
NADA	<i>N-arachidonyldopamine</i>
NAPE	<i>N-acyl phosphatidyléthanolamine</i>
NarPE	<i>N-arachidonyl phosphatidyléthanolamine</i>
NAT	<i>N-acyltransférase</i>
Na _v	canaux sodiques sensibles au voltage
NEP	néprilysine

NF- κ B	facteur de transcription nucléaire
NGF	facteur de croissance neuronal
NK	<i>natural killer</i>
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
nNOS	NO synthase neuronale
NO	monoxyde d'azote
NPY	neuropeptide Y
NRCG	noyau réticulo-(para)-giganto-cellulaire
NRM	noyau raphé magnus
OEA	oléoyléthanolamide
OFQ	orphanine FQ
ON/OFF	cellules « ON » et « OFF »
ORL1	<i>opioid receptor-like 1</i>
P2X	récepteurs purinergiques à l'ATP
PAG	substance grise périaqueducule
PANE	<i>N</i> -arachidonyl phosphatidyléthanolamine
PEA	palmitoyléthanolamide
PGE ₂	prostaglandine E ₂
PG	prostaglandine
PIP2	phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphates
PIP3	phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphates
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PLD	phospholipase D
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPTA	préprotachykynine
PSNL	ligature partielle du nerf sciatique

RVM	moelle rostrale ventromédiale
s.c.	sous-cutanée
SNC	système nerveux central
SNI	<i>spared nerve injury</i>
SNL	<i>spinal nerve ligation</i>
SP	substance P
TENS	<i>transcutaneous electrical nerve stimulation</i>
THCA	acide monocarboxylique
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TrkA	tyrosine kinase A
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TRPV1	<i>transient receptor potential vanilloid 1</i>
URB597	inhibiteur de la FAAH
URB602	inhibiteur de la MAGL
VIP	peptide vasoactif intestinal
VSM	voie spinomésencéphalique
VSR	voie spinoréticulée
WDR	<i>wide dynamic range</i>
Δ^9 -THC	Δ^9 -tétrahydrocannabinol

*À mes amours Jonathan & Matteo, les
deux hommes qui m'accordent leur amour
inconditionnel*

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de recherche le Dr Pierre Beaulieu pour l'encadrement unique dont j'ai bénéficié au cours de mes études. Merci Pierre de m'avoir accordé une confiance absolue et de m'avoir donné la chance unique de me perfectionner à plusieurs niveaux. Tu m'as permis d'acquérir un niveau d'autonomie exceptionnel et tu m'as appris à sans cesse repousser mes limites. Malgré la distance, tu as toujours été très présent pour moi, en me plaçant au premier rang de ta liste de priorités. Ton sens de l'humour m'a grandement marqué, merci de m'avoir enseigné que l'on doit toujours garder son cœur d'enfant. Merci également à mon amie Josée Guindon pour m'avoir accueillie au laboratoire et pour m'avoir épaulée dans mon cheminement scientifique.

Je remercie tous les membres de mon jury de thèse pour avoir lu et révisé ce manuscrit : Dr Louis-Éric Trudeau, Dre Hélène Girouard, Dr Mark Ware et Dre Sandra Boye.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance au professeur Louis Gendron de l'Université de Sherbrooke pour m'avoir accueillie si chaleureusement dans son laboratoire à l'occasion d'un projet de collaboration d'une durée de 13 mois. Sa grande générosité, sa disponibilité et sa patience m'ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances dans un environnement très stimulant. Merci Louis, tu es devenu pour moi un très bon ami et un mentor exceptionnel. Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe Gendron pour leur soutien mais plus particulièrement Hélène Beaudry pour sa générosité et son aide précieuse ainsi que Valérie, Dave, Kristina et Audrey pour leur accueil si chaleureux. Merci également au Dr Philippe Sarret ainsi qu'à tous les membres de son équipe, plus particulièrement Pascal et Alexandre, qui ont marqué mon passage à Sherbrooke.

Je suis également reconnaissante à ma co-directrice de recherche la Dre Chantal Lambert pour avoir dès le début cru en mon potentiel scientifique et pour m'avoir donné d'innombrables justes et précieux conseils. Merci Chantal, ton expérience, ton éloquence, ton charisme, ta grande générosité ont été pour moi de grandes sources d'inspiration. Je

voudrais également remercier le Dr Patrick du Souich pour m'avoir transmis cette passion pour la pharmacologie lors de mes premiers cours de baccalauréat, c'est grâce à vous si je me suis dirigée vers ce champ d'études.

Un merci tout spécial au Dr Jean-François Bouchard qui collabore avec nous depuis les dernières années. Merci également à ses assistantes de recherche Sophie et Florence qui m'ont toujours appuyé, même dans mes délais un peu fous et mes nombreux trajets Montréal - Sherbrooke. Votre appui m'a grandement aidé.

Un merci tout simple à mes amis du Département de Pharmacologie Pierre-Luc et Julie-Émilie, avec qui j'ai passé plusieurs bons moments autour d'un café, que ce soit pour évacuer le stress ou rire un bon coup, ils étaient toujours présents. Merci d'avoir ensoleillé mon quotidien! Merci également à tout le personnel de soutien du Département de pharmacologie, plus particulièrement Francine, Sylvie et Carole.

Je voudrais souligner l'implication émotionnelle de toute ma famille, leur appui constant, leur soutien et leurs mots d'encouragement dans les moments plus difficiles m'ont aidé à persévérer.

Je tiens à remercier du fond du cœur mon amoureux Jonathan pour tous les sacrifices qu'il a dû endurer tout au long de mes études, que ce soit mes sautes d'humeur, mes nuits blanches, mon stress, mes absences... Merci énormément pour ton appui si réconfortant, ton aide précieuse, ta patience et tes mots d'encouragements à toujours persévérer. Tu fais partie intégrante de ma réussite!

Matteo, mon petit amour, grâce à toi tout ce que j'ai réalisé jusqu'à présent prend un sens particulier... Merci d'avoir ensoleillé mes journées lorsque ma persévérance était mise à l'épreuve.

Un merci plus spécifique à ma mère et à mon père pour avoir toujours cru en moi et pour leur fierté immense par rapport à toutes mes réussites. Je voudrais également remercier ma meilleure amie Annie qui m'a toujours appuyé dans toutes mes décisions et qui

est toujours à mes côtés, ainsi que mes chères amies Audrey, Caroline, Évelyne, Isabelle, Julie et Vanessa pour leur amitié si sincère, vous êtes mes perles.

Enfin, je voudrais remercier tous les organismes subventionnaires qui ont contribué à mon cheminement académique en me permettant d'assister et de présenter mes travaux dans des congrès nationaux et internationaux, ainsi que de me concentrer pleinement sur mes travaux de recherche : le Réseau Québécois de la Recherche sur la Douleur (RQRD), le Consortium Canadien pour l'Investigation des Cannabinoïdes (CCIC), la Faculté des Études Supérieures (FES), le Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament (GRUM), sans oublier la bourse Vanier octroyée par les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC).

INTRODUCTION

Section I. La douleur

La douleur est « Une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrite en des termes évoquant de telles lésions » selon l'*International Association for the Study of Pain* (IASP).

La douleur est donc une expérience multidimensionnelle s'articulant autour de quatre composantes fondamentales : sensori-discriminative, motivo-affective, cognitive et comportementale (Apkarian et coll., 2005). Elle occupe tout d'abord une fonction biologique en protégeant l'organisme tel un signal d'alarme et en prévenant ainsi d'éventuelles atteintes. En conditions normales, son rôle est bénéfique et indispensable, d'ailleurs les individus atteints d'insensibilité congénitale à la douleur subissent des lésions tissulaires importantes en raison de l'absence de ce mécanisme de défense (Rotthier et coll., 2012). Une douleur chronique (douleur qui persiste plus de 3 mois) peut cependant être due à plusieurs mécanismes physiopathologiques sans causes identifiables, comme par exemple dans le cas de la fibromyalgie. Ce type de douleur ne joue aucun rôle de protection de l'organisme et s'avère uniquement délétère.

Avant d'aborder le thème principal de cette thèse qui porte sur le rôle du système cannabinoïde dans la modulation de la douleur, il convient tout d'abord de se familiariser avec les mécanismes qui sous-tendent les bases neurophysiologiques de la douleur. De plus, dans cette section, les mécanismes impliqués dans le développement des douleurs inflammatoire et neuropathique seront détaillés pour permettre au lecteur de prendre en compte l'ampleur de la complexité du phénomène douloureux ainsi que le rôle important du système cannabinoïde endogène dans la modulation de ces douleurs. Deux modèles animaux de douleur seront utilisés : un modèle inflammatoire (Articles 1 & 4) pour étudier les effets antinociceptifs des cannabinoïdes; et un modèle de douleur neuropathique pour examiner les effets anti-allodyniques et anti-hyperalgésiques des cannabinoïdes (Articles 2 & 3).

1 LES BASES NEUROPHYSIOLOGIQUES DE LA DOULEUR

La nociception se définit par l'activation de récepteurs périphériques suite à des stimuli ou lésions des tissus de types thermiques, chimiques ou mécaniques, et la transmission vers le cerveau des potentiels d'action associés. La nociception et la douleur sont habituellement étroitement liées, bien que l'une ne conduise pas nécessairement à l'autre.

Il existe quatre étapes distinctes entre l'application d'un stimulus nociceptif initial et la sensation de douleur, la nociception correspondant à la transduction, la transmission et la modulation du signal nerveux en réponse à un stimulus nociceptif (Fields, 1987) (Figure 1):

- la *transduction* correspond à la transformation d'un stimulus mécanique, thermique ou chimique en influx nerveux dans les terminaisons nerveuses sensibles spécialisées. Elle implique des récepteurs / canaux qui dépolarisent les terminaisons libres des nocicepteurs, définis comme étant des neurones qui répondent de façon sélective aux stimuli engendrés par les lésions tissulaires (Sherrington, 1906) (voir Section I, 1.1.1). Ceci active ainsi des canaux ioniques dépendants du voltage (Na_v 1.6 - 1.9) (Waxman et coll., 1999; Wood et coll., 2002), permettant la génération et la propagation de potentiels d'action;

- la *transmission* concerne le passage de l'influx nerveux de la périphérie à la moelle épinière, de la moelle vers les noyaux latéraux du thalamus par la voie spinothalamique ou vers différentes structures du tronc cérébral et les noyaux médians du thalamus par la voie spinoréticulée, puis finalement du thalamus au cortex (voie ascendante);

- la *modulation* correspond à l'ensemble des mécanismes par lesquels le message nerveux provenant des nocicepteurs peut être modulé au niveau spinal mais aussi central au cours de la transmission de la périphérie au cortex. En particulier, il existe des contrôles inhibiteurs descendants issus du tronc cérébral qui s'exercent sur la transmission spinale des messages nociceptifs. Ces contrôles inhibiteurs impliquent les voies noradrénergiques, sérotoninergiques et enképhalinergiques;

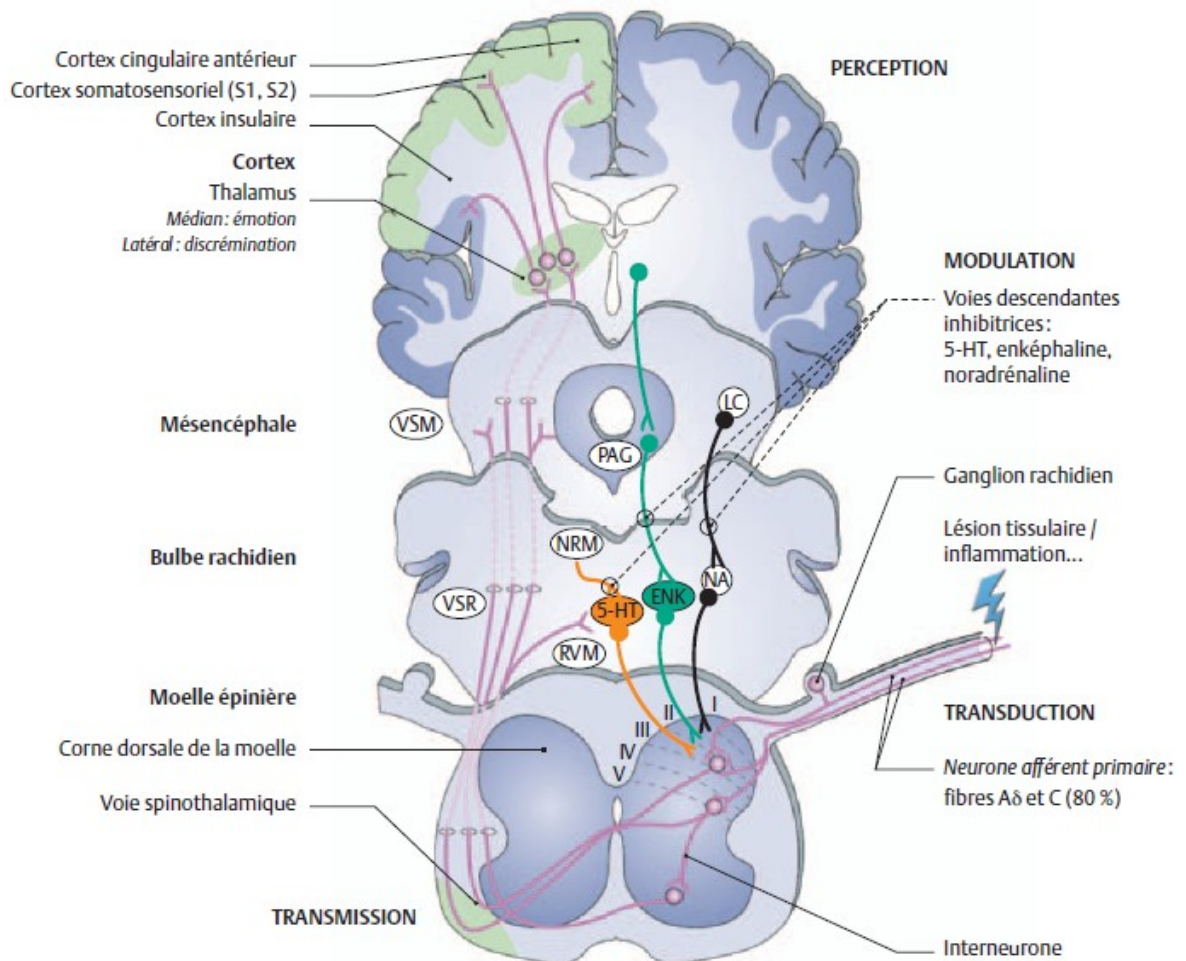


Figure 1 : Schéma général des voies de la douleur. Suite à l'activation des nocicepteurs en périphérie, les influx nociceptifs sont relayés à la corne dorsale de la moelle épinière par les fibres nerveuses A δ et C. Les nocicepteurs sont classiquement associés aux fibres A δ et C, bien qu'il soit reconnu qu'une proportion significative de nocicepteurs soit associée à des fibres A β (Djouhri & Lawson, 2004). L'information nociceptive emprunte ensuite de nombreuses voies entre la moelle épinière et le cerveau, où elle active de multiples régions. Parallèlement, il existe des systèmes de modulation descendante de la douleur constitués par des projections descendantes du cerveau vers la corne dorsale pouvant inhiber ou faciliter la transmission nociceptive spinale. Il existe également des connexions entre différentes structures cérébrales permettant l'intégration des diverses composantes de la douleur et sa modulation. 5-HT : sérotonine; ENK : enképhaline; LC : locus *coeruleus*; NA : noradrénaline; NRM : noyau du raphé magnus; PAG : substance grise périaqueducale; RVM : moelle rostrale ventromédiale; VSM : voie spinomésencéphalique; VSR : voie spinoréticulée. Figure modifiée d'après (Fields, 2004), tirée de *La Douleur : Guide pharmacologique et thérapeutique* (Beaulieu, 2013).

- la *perception* de la douleur, reliée à l'intégration au niveau du cerveau du message nociceptif en message conscient, basé sur l'ensemble des expériences antérieures et des émotions d'un individu. Les centres supérieurs de la douleur permettent de réaliser la complexité de l'équilibre entre les composantes sensorielles / discriminatives (aires somesthésiques pariétales S1 et S2) et affectives / émotionnelles (cortex cingulaire antérieur, cortex insulaire ou *insula*) de la douleur. La nociception devient douleur seulement lorsqu'il y a eu intégration corticale faisant intervenir la mémoire et l'émotion, ce qui peut expliquer la nature subjective de cette sensation. L'analgésie se définit donc comme un moyen de moduler, en réduisant partiellement ou en abolissant complètement, la perception du message douloureux.

De la stimulation nociceptive jusqu'à la perception, il y a plusieurs mécanismes endogènes excitateurs et inhibiteurs qui modulent la douleur. Ces mécanismes endogènes augmentent ou réduisent le signal nociceptif, ce qui se traduit par plus ou moins de douleur. Une vision purement linéaire n'est donc plus suffisante pour expliquer comment une douleur peut apparaître; voire même persister sans blessure apparente (Marchand, 2005).

En plus de la modulation de la douleur par des systèmes de neurotransmetteurs bien connus tels que les opioïdes endogènes et les contrôles inhibiteurs descendants impliquant la sérotonine et la noradrénaline (voir Section I, 1.3.2), de plus en plus de données indiquent que les cannabinoïdes endogènes (endocannabinoïdes) peuvent inhiber la douleur. Nous verrons plus en détails que l'expression des récepteurs cannabinoïdes se situe tout le long des voies de la douleur, leur activation pouvant ainsi produire des actions à plusieurs niveaux et moduler la transmission des informations nociceptives (voir Sections II & III de l'introduction). Il serait donc intéressant de pouvoir réguler les niveaux endogènes de ces composés afin de moduler de façon ciblée la transmission des messages douloureux.

1.1 De la périphérie à la moelle épinière

À la périphérie, les stimuli de nature mécanique, thermique ou chimique activent des nocicepteurs, ce qui entraîne la génération d'un potentiel d'action qui est propagé le long des neurones des fibres afférentes primaires sous forme d'influx nerveux vers la corne postérieure de la moelle épinière.

1.1.1 Au niveau périphérique

Les nocicepteurs sont constitués par les terminaisons nerveuses libres des fibres sensibles primaires disséminées de façon ubiquitaire dans la peau, les muscles, les articulations ou les parois des viscères. Un récepteur doit posséder deux caractéristiques essentielles pour être qualifié de nocicepteur : une capacité de réponse proportionnelle à l'intensité du stimulus (la fréquence de décharge augmente avec l'intensité de la stimulation), ainsi qu'un seuil de réponse plus élevé que les simples thermorécepteurs et mécanorécepteurs répondant à des stimuli légers (qui sont des récepteurs dits de « bas seuil »). La réponse obtenue est dite sélective (Marchand, 2009).

Les fibres nerveuses sont les prolongements périphériques ou axones du premier neurone (neurone afférent primaire) dont le corps cellulaire est situé dans le ganglion spinal ou rachidien (DRG; *dorsal root ganglion*). Les fibres sensibles ne sont pas uniformes; elles propagent le signal sensitif à des vitesses de conduction différentes, proportionnelles à leur diamètre et à leur degré de myélinisation (Tableau I).

Type de fibres	Myélinisation	Diamètre (μm)	Vitesse de conduction (m/s)	Fonction
A α	+++	10 – 25	60 – 100	Fibres motrices
A β	++	4 – 12	20 – 100	Fibres sensibles : toucher, pression
A γ	++	4 – 8	20 – 80	Fibres proprioceptives
A δ	+	1 – 6	5 – 25	Douleur, température
B	+	< 3	3 – 15	SNA, fibres préganglionnaires
C	0	0,3 – 2	0,2 – 2,5	Douleur, température, SNA, fibres postganglionnaires

Tableau I. Différents types de fibres nerveuses. Tableau tiré de La Douleur : Guide pharmacologique et thérapeutique (Beaulieu, 2013).

Les fibres nerveuses jouant, directement ou indirectement, un rôle dans la perception de la douleur peuvent être divisées en plusieurs classes, dont trois principales:

- Les fibres **A β** sont des fibres myélinisées de gros calibre à conduction rapide qui assurent, dans des conditions normales, la conduction des afférences non nociceptives; elles sont majoritairement des mécanorécepteurs dont le seuil de réponse est très bas (Marchand, 2009). La stimulation de ces fibres ne produit pas de douleur. En revanche, leur blocage lors d'une stimulation nociceptive des fibres C et A δ entraîne une douleur plus intense (Price, 1999). Dans certaines conditions de sensibilisation du système nerveux central (en particulier dans la douleur neuropathique [voir Section I, 2.2]), elles participent à la modulation de la douleur (Marchand, 2009).

- Les fibres **A δ** sont des fibres myélinisées de plus petit calibre possédant des vitesses de conduction plus lentes que les fibres A β . Elles ont un seuil de dépolarisation élevé et assurent la transmission rapide et précise de l'information nociceptive (douleurs aiguës bien localisées); elles sont normalement responsables de la première douleur ressentie lors d'une stimulation nociceptive (Marchand, 2005). Il existe différents types de fibres A δ dont les mécano-nocicepteurs, qui ne répondent normalement qu'aux stimuli mécaniques susceptibles d'endommager les tissus cutanés (piqûres, pincements), ainsi que les récepteurs

polymodaux, qui répondent à des stimulations mécaniques ou thermiques intenses, et parfois même chimiques (Treede et coll., 1998; Marchand, 2005).

- Les fibres **C** sont des fibres amyéliniques de faible calibre, donc leur vitesse de conduction est plus lente. Ces fibres répondent préférentiellement à des stimulations nociceptives et conduisent l'information de manière diffuse (Marchand, 2009). Elles représentent près des trois quart des fibres des nerfs périphériques, et la très grande majorité d'entre elles sont des nocicepteurs. De par la complexité de leurs réponses aux stimulations thermiques, chimiques et mécaniques, ces fibres sont qualifiées de polymodales (Marchand, 2005). Parmi les fibres C, on distingue les fibres peptidergiques, qui synthétisent des peptides tels que la substance P, le CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) et qui expriment le récepteur TrkA (tyrosine kinase A) du facteur de croissance neuronal (NGF; *nerve growth factor*). Les fibres non peptidergiques expriment une sous-classe de récepteurs purinergiques (P2X₃) de l'ATP (adénosine triphosphate) ainsi que le récepteur du GDNF (*glial cell-derived neurotrophic factor*) en plus d'avoir la capacité de lier l'isolectine B4 (IB4). Elles sont responsables de la seconde douleur, plus tardive et diffuse (sourde, mal localisée) s'apparentant à une brûlure (Marchand, 2009). Les deux types de fibres utilisent très probablement le glutamate comme neurotransmetteur principal (Julius & Basbaum, 2001).

Leur degré d'activation résulte d'une stimulation directe exercée à leur niveau par des stimuli de haute intensité ou d'une stimulation indirecte par l'intermédiaire de molécules libérées par l'inflammation au site de lésion qui produira une sensibilisation localisée. Ces médiateurs inflammatoires ont principalement trois origines: 1) ils proviennent des cellules endommagées par l'application du stimulus qui libèrent des ions H⁺, de l'histamine, du potassium, de la sérotonine (5-HT), de la bradykinine, de l'ATP, etc. ; 2) ils sont synthétisés sur place par des enzymes provenant des cellules lésées ou activées à partir de substrats cellulaires (en général les lipides, dérivés de l'acide arachidonique): la cyclo-oxygénase (COX) permet la formation de prostaglandines et la lipoxygénase (LOX) celle des leucotriènes ou alors; 3) ils sont sécrétés suite à l'activation du nocicepteur (substance P, CGRP, neurokinine A, etc.) (Marchand, 2009). Les messages nerveux encodant une stimulation nociceptive sont

véhiculés par les fibres afférentes primaires des nerfs sensitifs. L'ensemble des substances nociceptives responsables de la cascade inflammatoire forme ce qui est appelée la «soupe inflammatoire». Ces facteurs pro-inflammatoires mènent au recrutement des nocicepteurs avoisinant le site de blessure et produisent une sensibilisation (Marchand, 2005). Le site de la lésion et les régions avoisinantes présenteront ainsi une diminution du seuil de douleur définie comme étant de l'*allodynie* et une amplification de la douleur après stimulation au-dessus du seuil nociceptif définie comme étant de l'*hyperalgésie* (voir Section I, 2.1.1).

1.1.2 Au niveau spinal

La substance grise de la moelle épinière est classiquement divisée en 10 couches (*laminae*) selon la classification de Rexed, basée sur les différences de densité et de taille entre les différentes populations neuronales (Rexed, 1952) (Figure 2). Le réseau de la corne dorsale s'étend de la couche I, fine et superficielle, à la couche VI profonde. La couche II, aussi appelée substance gélatineuse, est habituellement subdivisée en couche II externe (IIo) et couche II interne (IIi). Les couches I-IIi et III-VI regroupent respectivement la corne dorsale superficielle et profonde. Les couches I, IIo, V et VI sont principalement impliquées dans le traitement de l'information nociceptive, alors que les couches III-IV concernent surtout, bien que non exclusivement, le traitement des informations somato-sensorielles non-nociceptives (D'Mello & Dickenson, 2008).

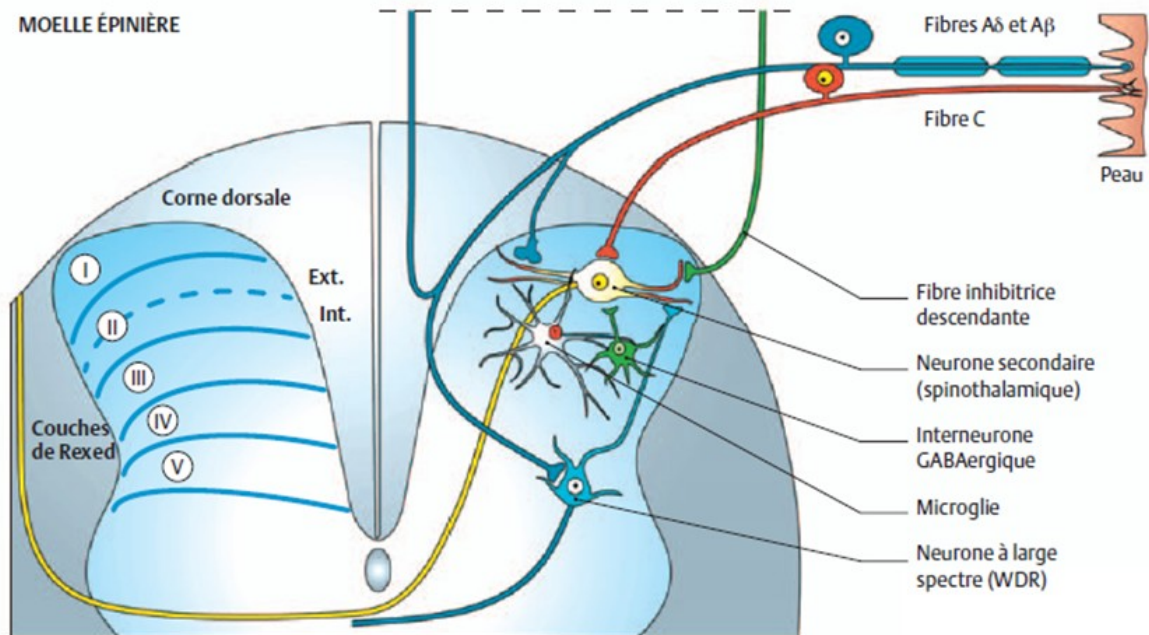


Figure 2. Principaux sites de projection des fibres afférentes primaires dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les fibres nociceptives C (rouge) et A δ se projettent vers le neurone spinothalamique dans la couche supérieure (neurone jaune), tandis que les fibres non nociceptives myélinisées A β se projettent vers les couches profondes. Le neurone de projection de second ordre est un neurone nociceptif non spécifique, appelé aussi «neurone à convergence» ou «*wide dynamic range (WDR) neuron*», qui peut répondre à la fois à des stimuli douloureux et non douloureux. Les neurones nociceptifs spécifiques sont plus volontiers localisés dans les couches superficielles (I et II) tandis que les neurones WDR le sont préférentiellement dans les couches profondes (IV-V). Figure modifiée d'après (Baron et coll., 2010), tirée de La Douleur : Guide pharmacologique et thérapeutique (Beaulieu, 2013).

Dans la corne dorsale de la moelle, les nocicepteurs et les fibres A β (fibres du toucher et de la pression) font synapse principalement dans les couches superficielles (I-II) de la moelle épinière, au niveau de neurones secondaires (spinothalamiques ou neurones à large spectre) qui se projettent ensuite vers le cerveau. Une fois l'influx nerveux acheminé jusqu'à la terminaison axonale des neurones afférents primaires, les potentiels d'action provoquent l'entrée de calcium qui permet la libération de nombreux neuromodulateurs et molécules de signalisation dans la fente synaptique.

Les médiateurs chimiques de cette synapse sont de deux types : acides aminés excitateurs et neuropeptides. Ces substances peuvent se lier à leurs récepteurs situés sur les neurones de deuxième ordre surtout dans les couches I-II de la moelle épinière (Hunt & Mantyh, 2001). L'activation des neurones permettra la transmission de l'information douloureuse jusqu'au thalamus et l'aire parabrachiale (Hunt & Mantyh, 2001). Une modulation du signal nerveux peut s'effectuer au niveau spinal par l'intermédiaire d'interneurones excitateurs ou inhibiteurs (ex. glutamatergiques et GABAergiques), de la microglie (cellules immunitaires du système nerveux central [les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie forment les cellules gliales]) ou des fibres inhibitrices descendantes provenant de diverses régions supraspinales (Beaulieu, 2013).

1.2 De la moelle épinière au cerveau

Dans la corne dorsale de la moelle, il existe trois grandes populations de neurones avec lesquelles les fibres afférentes primaires peuvent faire synapse. On trouve : (1) des interneurones inhibiteurs ou excitateurs servant de relais aux voies descendantes et ascendantes et participant au traitement local de l'information nociceptive; (2) des neurones proprioceptifs spinaux intervenant dans les activités réflexes segmentaires ainsi que; (3) des neurones de projection assurant le relais de la transmission de l'influx nociceptif vers les centres nerveux supérieurs (Marchand, 2009), où son analyse sera complétée (Hunt et Mantyh, 2001). Ces neurones de projection se classent en deux groupes : les neurones de projection nociceptifs spécifiques et les neurones de projection nociceptifs non spécifiques (Meyer et coll., 1994; Marchand, 2009).

La transmission de l'influx nerveux ne se résume pas uniquement au passage de l'information nociceptive entre le neurone afférent primaire et le second neurone de projection dans la moelle. Avant d'être acheminées vers les centres supérieurs, les voies de la nociception, comme toutes les afférences sensorielles, traversent le thalamus. En ce qui concerne plus spécifiquement les voies de la douleur, les chemins que peuvent prendre les informations nociceptives sont divisés en deux voies principales: la voie spinothalamique et

la voie spinoréticulée (Fields, 1987). La voie spinothalamique (associée aux noyaux thalamiques latéraux) achemine l'information nociceptive des membres et du tronc, de la corne dorsale de la moelle épinière vers plusieurs noyaux thalamiques. La voie spinoréticulée (associée aux noyaux médians du thalamus) achemine quant à elle les afférences nociceptives de la moelle épinière vers des structures du tronc cérébral, incluant la moelle rostrale ventromédiale (RVM), le noyau du raphé magnus (NRM), la substance grise périaqueducule (PAG) et le noyau réticulaire dorsal (DRt) de la moelle épinière (Willis, 1985).

L'information nociceptive est ensuite globalement relayée des noyaux latéraux du thalamus au cortex somesthésique primaire (SI) et secondaire (SII) (système latéral), ainsi qu'au cortex cingulaire antérieur (système médian) et insulaire, alors que les noyaux médians du thalamus font relais vers le système limbique. Plusieurs autres structures corticales sont indirectement activées par des projections corticocorticales (Price, 2000); la perception et la transmission de la douleur reposent donc sur un vaste réseau de structures dont la revue détaillée dépasse le cadre de cette thèse.

1.3 Les mécanismes de modulation de la douleur

Tout au long de son trajet nerveux, le message nociceptif fait l'objet de modulations facilitatrices ou inhibitrices. Le contrôle inhibiteur de la modulation des messages douloureux s'effectue plus spécifiquement *via* trois mécanismes : 1) un contrôle médullaire (théorie du portillon), 2) un contrôle inhibiteur diffus induit par des stimulations nociceptives et 3) un contrôle exercé par les centres supérieurs du système nerveux central (Marchand, 2009).

1.3.1 Au niveau spinal (théorie du portillon)

En plus de la transmission du message nociceptif, il existe des contrôles endogènes de la douleur qui ont pour effet de réduire les signaux nociceptifs en provenance de la périphérie. Les mécanismes du contrôle descendant de la douleur ont d'abord été détaillés dans la moelle épinière avec la théorie du portillon (*gate control theory of pain*) (Melzack &

Wall, 1965; Wall, 1978). Selon cette théorie, la stimulation sélective des grosses fibres afférentes A β (non douloureuses) bloque les petites fibres nociceptives A δ et C par le recrutement d'interneurones inhibiteurs dans la substance gélatineuse (couches I-II) des cornes postérieures de la moelle, modulant ainsi la douleur à ce niveau. L'intégration médullaire des messages excitateurs et inhibiteurs s'achemine ensuite vers les cellules de projection concernées. Même si des modifications ont été apportées à cette théorie, l'idée d'une modulation de la perception douloureuse dès son entrée dans la moelle épinière demeure fondamentale. Cette théorie est d'ailleurs à l'origine d'applications cliniques, dont la plus connue est la neurostimulation transcutanée ou TENS conventionnel (*transcutaneous electrical nerve stimulation*), basée sur la stimulation électrique des afférences non nociceptives A β de la peau afin d'inhiber le message douloureux provenant des afférences nociceptives A δ et C (Garrison & Foreman, 1994).

1.3.2 Les contrôles inhibiteurs descendants

Les voies de la douleur peuvent être contrôlées au niveau spinal, mais également par des interneurones et des contrôles inhibiteurs descendants provenant de diverses régions du système nerveux central supérieur (noyau du raphé magnus, *locus coeruleus*, substance grise périaqueducale) (Marchand, 2005). Ces mécanismes de modulation, provenant de nombreuses régions du tronc cérébral et mettant en jeu des voies noradrénergiques, sérotoninergiques et enképhalinergiques, affectent les neurones à convergence de tous les niveaux (diffus) et ils ne sont déclenchés que par des stimulations intenses (nociceptives). De nombreuses applications cliniques reposent sur ces mécanismes, dont les plus connues sont l'acupuncture ainsi que le TENS acupuncture, basées sur le principe qu'une stimulation nociceptive localisée peut produire une inhibition généralisée des afférences nociceptives *via* des mécanismes inhibiteurs descendants, les contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs (CIDN) (Le Bars et coll., 1979a, b).

Selon cette théorie, une stimulation douloureuse, en plus de conduire l'information nociceptive vers les centres supérieurs par la voie spinothalamique, envoie des afférences

vers différents centres du tronc cérébral, dont la substance grise périaqueducule (Reynolds, 1969) et le noyau du raphé magnus (Basbaum & Fields, 1978, 1984). Ces structures envoient des efférences inhibitrices respectivement sérotoninergiques et noradrénergiques vers les divers segments spinaux et elles produisent ainsi une inhibition diffuse (Marchand, 2005). En effet, ces voies descendantes auraient pour fonction de recruter les interneurons enképhalinergiques dans la moelle et ainsi produire une réponse analgésique par une réduction de l'activité des afférences nociceptives (Marchand, 2009). Une stimulation nociceptive active ainsi la population de neurones nociceptifs correspondant au segment spinal qu'ils innervent tout en inhibant les autres neurones nociceptifs de la moelle desservant le reste du corps. Ceci explique comment une stimulation localisée produit une hypoalgésie globale par inhibition des afférences nociceptives (Marchand, 2009).

1.3.3 Au niveau des centres supérieurs du système nerveux central

Outre les structures participant au contrôle médullaire ainsi qu'au contrôle inhibiteur diffus induit par des stimulations nociceptives, plusieurs régions du système nerveux supérieur interviennent dans la perception de la douleur, dont quatre centres cérébraux principaux: l'aire somatosensorielle primaire SI, l'aire somatosensorielle secondaire SII ainsi que les cortex cingulaire antérieur et insulaire (Calvino & Grilo, 2006; Tracey & Mantyh, 2007). Ces régions sont importantes pour la modulation de la douleur. La dissociation par lobotomie entre le lobe frontal (pensée rationnelle) et le système limbique (émotions) provoque chez certains patients une dissociation entre l'intensité et l'aspect désagréable de la douleur. Le patient juge alors que sa douleur est aussi intense qu'avant, mais qu'elle n'est plus désagréable (Marchand, 2009). D'autres exemples faisant intervenir une modulation de la composante motivo-affective de la douleur par les centres supérieurs incluent l'hypnose ainsi que l'effet placebo.

2 LES DIFFÉRENTS TYPES DE DOULEURS : INFLAMMATOIRE ET NEUROPATHIQUE

Bien que l'on puisse identifier plusieurs types de douleurs (aiguë, inflammatoire, neuropathique, musculo-squelettique, ostéoarthritique, cancéreuse), seules les douleurs inflammatoire et neuropathique seront abordées dans le cadre de cette thèse, en lien avec les différentes recherches effectuées et les différents articles présentés. Les modèles de douleurs inflammatoire et neuropathique seront utilisés pour tenter de reproduire ou de mimer les mécanismes qui sous-tendent le développement de ces types de douleur afin d'évaluer, dans notre cas précis, le potentiel thérapeutique associé à la modulation du système cannabinoïde.

2.1 La douleur inflammatoire

La réaction inflammatoire est la réponse à une exposition continue à une stimulation nociceptive de haute intensité. Une lésion de nature mécanique, thermique ou chimique produit une cascade d'événements provoquant la libération de substances potentiellement nociceptives ainsi que la mise en jeu de nombreuses cellules immunitaires activées, telles que les macrophages et les cellules lymphocytaires. C'est un processus habituellement bénéfique dont le but est d'éliminer un agent pathogène et/ou de réparer les lésions tissulaires. Il arrive cependant que l'inflammation se maintienne et qu'elle se prolonge dans le temps, résultant en un phénomène d'inflammation chronique. De ce fait, ces mécanismes mènent à la sensation de douleur au-delà du retrait de la stimulation nociceptive.

2.1.1 Activation et sensibilisation des nocicepteurs en contexte inflammatoire

Suite à un traumatisme tissulaire, le processus inflammatoire se développe impliquant différents médiateurs qui stimulent ou sensibilisent les nocicepteurs. Outre leur capacité à réagir à certaines stimulations mécaniques et thermiques, la majorité des

nocicepteurs se comporte comme des chémorécepteurs (Le Bars & Adam, 2002; Wang & Woolf, 2005). Cette fonction chémoréceptrice est essentielle pour engendrer les douleurs inflammatoires.

La sensibilisation périphérique des fibres C et A δ se produit sur le site de l'inflammation (Hedo et coll., 1999). Elle est déclenchée par des substances nociceptives circulantes ou formées localement : les protons (ions H⁺) et l'ATP libérés par les cellules lésées, la sérotonine, l'histamine, la phospholipase A2 (enzyme clé dans la formation des prostaglandines), le facteur de croissance nerveux, la bradykinine, les cytokines pro-inflammatoires (TNF α ou *tumour necrosis factor*, les interleukines IL-1 et IL-6) libérées par les plaquettes, les mastocytes et les macrophages activés. De plus, la substance P, le CGRP et la neurokinine A sont libérés par les nocicepteurs et ils les sensibilisent directement (réflexe d'axone) ou indirectement. Toutes ces substances nociceptives participent à ces phénomènes (pour une revue (Kidd & Urban, 2001; Petho & Reeh, 2012; Beaulieu, 2013) (Figure 3). Au cours de l'inflammation, le facteur de croissance nerveux joue également un rôle important dans la sensibilisation des nocicepteurs (Donnerer et coll., 1992). Par une cascade de réactions, ces différentes substances interagissent entre elles pour créer une vasodilatation, une inflammation ainsi qu'une activation des nocicepteurs.

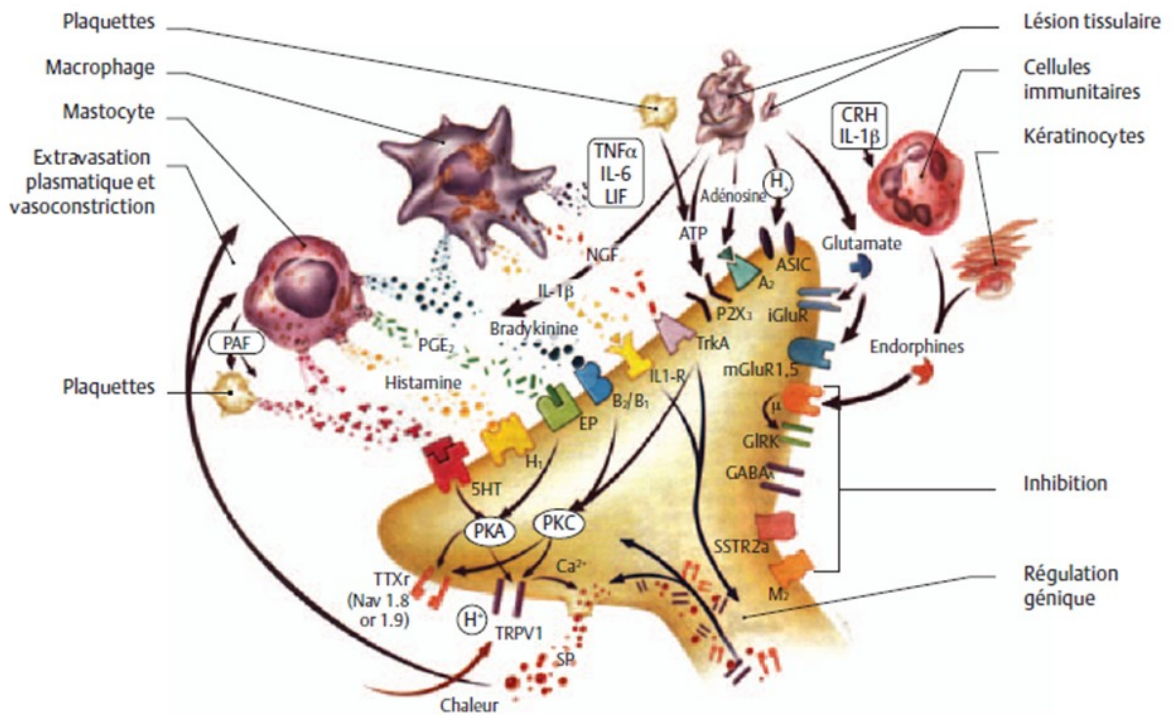


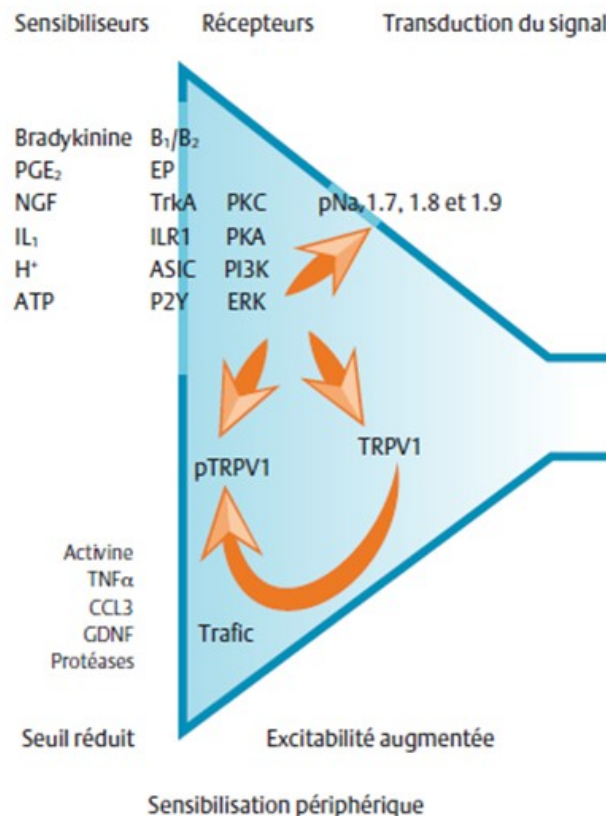
Figure 3 : Activation d'un nocicepteur au niveau périphérique. 5-HT : 5-hydroxytryptamine ; A2 : adénosine 2 ; ASIC : *acid-sensing ion channel* ; ATP : adénosine triphosphate ; B2/B1 : bradykinine 2/1 ; CRH : *corticotropin releasing hormone* ; EP : récepteur de la prostaglandine E ; GABA_A : acide γ -aminobutyrique ; GIRK : canaux potassiques à rectification entrante ; H1 : histamine 1 ; iGluR : récepteur glutamate ionotropique ; IL : interleukine ; LIF : *leukemia inhibitory factor* ; M2 : muscarinique 2 ; mGluR : récepteur glutamate métabotropique ; NGF : *nerve growth factor* ; P2X3 : purinergique 2X3 ; PAF : *platelet activating factor* ; PGE₂ : prostaglandine E₂ ; PKA : protéine kinase A ; PKC : protéine kinase C ; SP : substance P ; SSTR2a : récepteur 2a de la somatostatine ; TNF α : *tumor necrosis factor α* ; trkA : tyrosine kinase A ; TRPV1 : *transient receptor potential 1* ; TTXr : tétrodoxtine résistant. Figure modifiée d'après (Textbook of Pain., 2006), tirée de La Douleur : Guide pharmacologique et thérapeutique (Beaulieu, 2013).

D'un autre côté, la production de nouveaux canaux et récepteurs apparaît suite à une sensibilisation post-transcriptionnelle. La surexpression des canaux sodiques voltage-dépendants est particulièrement évidente en cas de processus inflammatoire. Des stimuli forts et persistants peuvent déclencher des changements dans l'expression des gènes dans

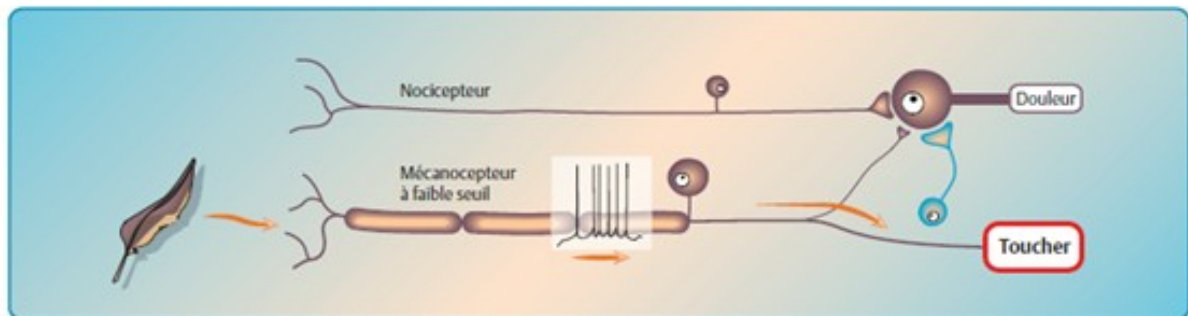
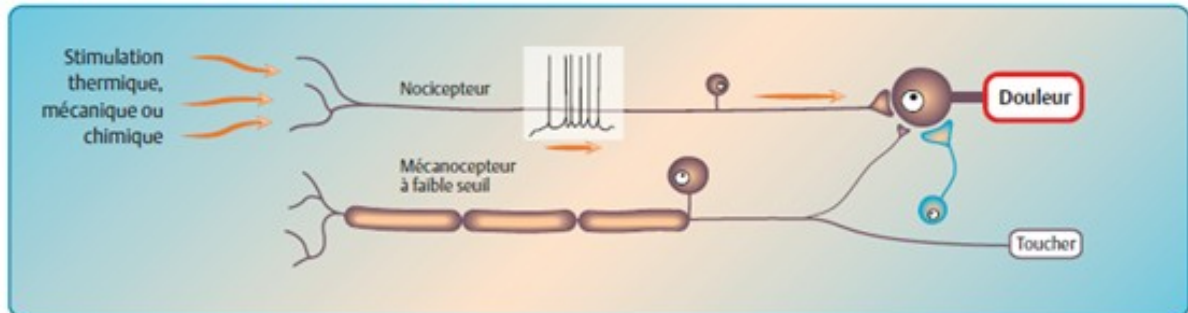
les neurones afférents primaires grâce à l'activation de facteurs de transcription, pour une revue de la littérature voir (Woolf & Salter, 2000). La libération d'une multitude de protéines est augmentée dans les neurones afférents primaires en réponse à l'inflammation: le CGRP, la COX-2, qui génère des prostanoïdes, la dynorphine, la NO (monoxyde d'azote) synthase neuronale (nNOS), qui génère du NO ainsi que des facteurs de croissance tels que le NGF et le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*). Cette amplification de la réactivité du nocicepteur participe aux phénomènes cliniques de réduction du seuil nociceptif (allodynie) et d'amplification de la douleur après stimulation au-dessus du seuil nociceptif (hyperalgésie) observés en clinique (Figure 4). Le phénomène inflammatoire peut produire une hyperalgésie primaire (sensibilisation périphérique au niveau de la lésion) et secondaire (reflète une hyperexcitabilité centrale).

A

Sensibilisation périphérique (modifiée d'après Ma et Woolf, 2007)



B Sensation normale (modifiée d'après Woolf, 2011)



C Sensibilisation centrale démontrant les phénomènes d'hyperalgésie et d'allodynie (modifiée d'après Woolf, 2011)

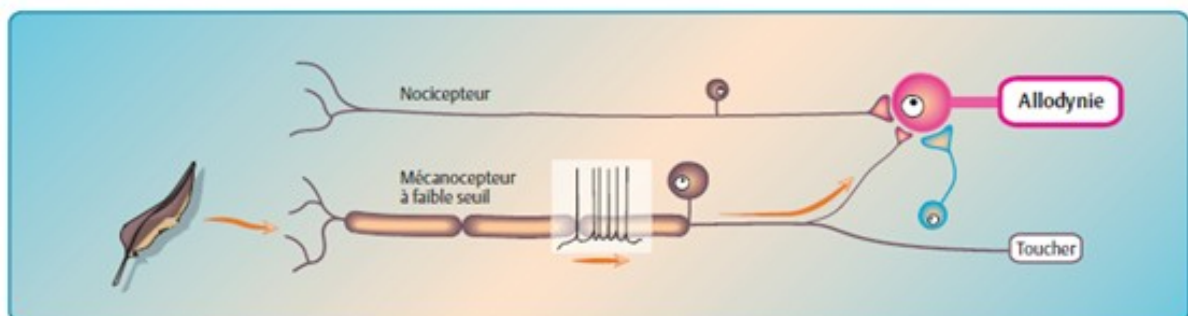
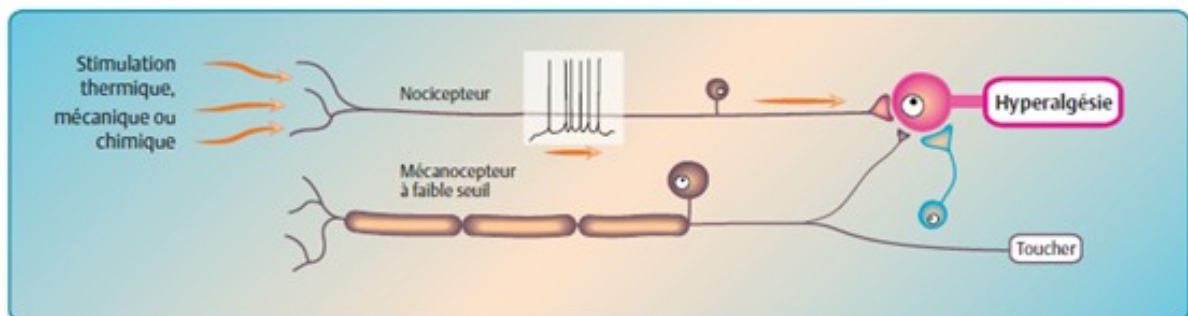


Figure 4 : Sensibilisation périphérique et centrale. (A) Sensibilisation périphérique; (B) Sensibilité normale suite à l'application de stimuli nociceptifs thermique, mécanique et chimique ou de stimuli non nociceptifs tels qu'un léger toucher ; (C) Sensibilisation centrale démontrant les phénomènes d'hyperalgésie et d'allodynie. Figure modifiée d'après (Woolf &

Ma, 2007; Woolf, 2011), tirée de La Douleur : Guide pharmacologique et thérapeutique (Beaulieu, 2013).

2.1.2 Sensibilisation centrale et inflammation

On appelle sensibilisation centrale une réponse accrue des nocicepteurs du système nerveux central à une stimulation afférente normale ou inférieure au seuil d'activation. La sensibilisation centrale est distincte de la sensibilisation périphérique. Elle est associée à une hyperexcitabilité des neurones de la corne dorsale suite à une lésion tissulaire, au cours de laquelle les réponses aux stimuli sont accentuées au niveau du site de la lésion. La sensibilisation périphérique induite par l'inflammation augmente l'importance des influx nociceptifs projetés vers le système nerveux central. Les influx nociceptifs génèrent une activation des neurones centraux et, dans certains cas, une sensibilisation de ces neurones. Les mécanismes de cette sensibilisation impliquent une libération excessive de nombreux médiateurs tels que le glutamate, les kinines, la substance P, les facteurs de croissance dont le BDNF ainsi que les prostaglandines (Calvino, 2009) (Figure 5). Le phénomène de *wind up*¹ représente ainsi une forme élémentaire de la sensibilisation spinale dépendante du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et des acides aminés neuroexcitateurs.

En résumé, la sensibilisation centrale est caractérisée par une diminution du seuil d'activation des nocicepteurs, une augmentation de leur fréquence de décharge ou activité spontanée, une augmentation de leurs réponses à un même stimulus supraliminaire et le recrutement de fibres A β à faible seuil d'activation. Globalement, l'inflammation crée une sensibilisation du système nerveux et une amplification du message nociceptif par une association de facteurs périphériques, centraux et humoraux.

¹ Le *wind up* se caractérise par une réponse croissante des neurones à une stimulation constante et répétée, sans doute par un phénomène de sommation temporelle lié au fait que les potentiels postsynaptiques générés par les fibres C sont lents et se superposent lorsqu'ils sont répétés à intervalles brefs.

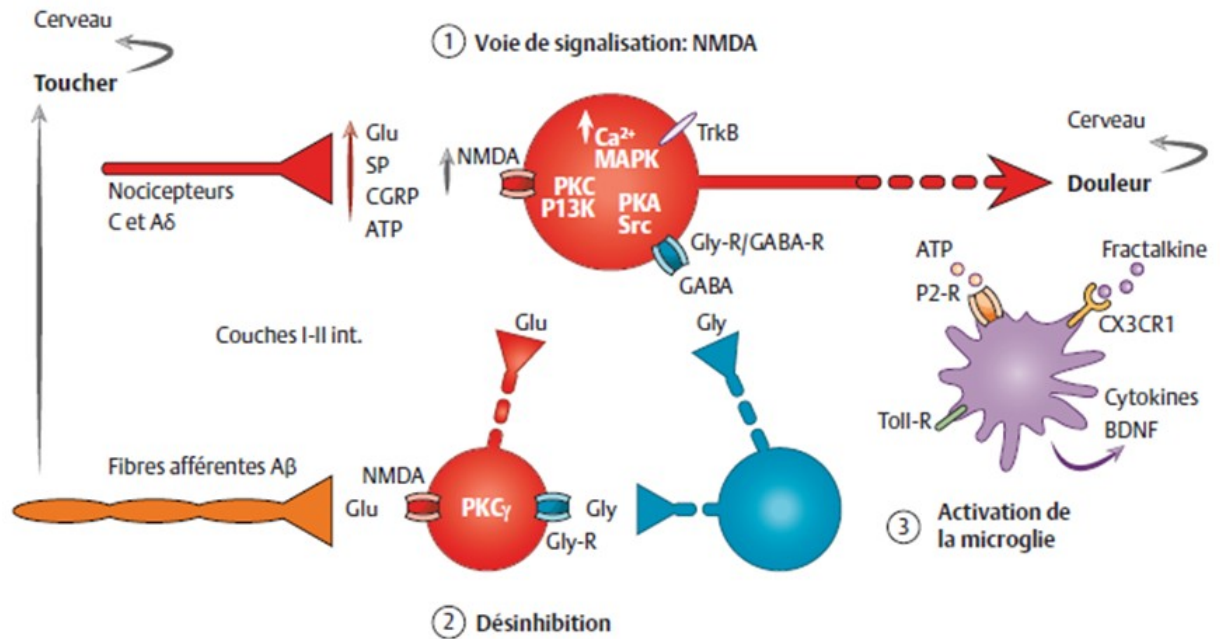


Figure 5 : Le phénomène de sensibilisation centrale. Trois composantes sont impliquées dans ce phénomène: (1) une sensibilisation en lien avec le glutamate (récepteurs NMDA); (2) une désinhibition; (3) une activation de la microglie. ATP : adénosine triphosphate; BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*; CGRP : peptide relié au gène de la calcitonine ou *calcitonin gene-related peptide*; CX3CR1 : récepteur des chimiokines CX3C1 ou de la fractalkine; GABA : acide γ -aminobutyrique; GABA-R : récepteur GABA; Glu : glutamate; Gly : glycine; Gly-R : récepteur de la glycine; MAPK : *mitogen-activated protein kinase*; NGF : *nerve growth factor*; NMDA : N-méthyl-D-aspartate; P2-R : récepteurs purinergiques 2; PKA : protéine kinase A; PKC : protéine kinase C; SP : substance P; TNF α : *tumor necrosis factor α* ; Toll-R : récepteur toll; trkB : tyrosine kinase B; TRPV1 : *transient receptor potential vanilloid 1*. Figure modifiée d'après (Basbaum et coll., 2009), tirée de *La Douleur : Guide pharmacologique et thérapeutique* (Beaulieu, 2013).

Dans un contexte de douleur inflammatoire, une partie des effets analgésiques périphériques induits par les cannabinoïdes endogènes ou endocannabinoïdes (voir Section II, 2.9) peuvent être attribués à des mécanismes neuronaux agissant par l'intermédiaire des récepteurs cannabinoïdes CB₁ localisés sur les neurones afférents primaires. Cependant, les actions anti-inflammatoires des endocannabinoïdes sont majoritairement produites suite à

l'activation des récepteurs cannabinoïdes CB₂ (Rice et coll., 2002). Il serait donc intéressant de vérifier si l'activation ciblée des récepteurs CB₂ dans un modèle de douleur inflammatoire peut induire des effets analgésiques.

2.2 La douleur neuropathique

Auparavant, la douleur neuropathique était définie comme une douleur chronique consécutive à un dommage, une dysfonction ou une atteinte d'une fibre nerveuse sensitive au niveau du système nerveux central (cerveau, moelle épinière) ou périphérique (nerfs, racines nerveuses, etc.). Depuis 2011, l'*International Association for the Study of Pain* (IASP) a proposé une nouvelle définition puisque le terme dysfonction portait à confusion. On définit désormais la douleur neuropathique comme une « douleur causée par une lésion ou une maladie du système nerveux somatosensoriel ». Le terme lésion est utilisé lorsque l'investigation (imagerie, biopsie, etc.) révèle une anomalie ou que le traumatisme est évident, tandis que le terme maladie est employé lorsque la cause de la lésion est connue (zona, diabète, accident vasculaire cérébral, etc.). La douleur neuropathique se démarque de la douleur inflammatoire de par sa chronicité, la complexité de ses mécanismes et la résistance aux traitements conventionnels.

La douleur neuropathique est toujours pathologique et elle est le reflet de lésions ou de pathologies du système nociceptif physiologique. Les mécanismes exacts de la douleur neuropathique sont encore méconnus. Elle résulte habituellement d'une lésion nerveuse qui peut être d'origine diverse, comme par exemple métabolique (diabète), traumatique (fracture), toxique (effets secondaires d'un médicament), etc. Une classification des causes des douleurs neuropathiques est présentée dans le Tableau II.

Neuropathies périphériques douloureuses

Douleurs fantômes, lésions nerveuses, névralgies (postherpétique, diabétique, du trijumeau), vasculite, neuropathie ischémique, plexopathie radique, compression vasculaire...

Polyneuropathies

- Métabolique et nutritionnelle: diabète, alcoolisme, amyloïdose, hypothyroïdie
- Médicamenteuses : antirétroviraux, cisplatine, éthambutol, isoniazide, nitrofurantoïne, thalidomide, méthylthiouracil, vincristine, métronidazole, taxoïdes...
- Toxiques: acrylamide, arsenic, dinitrophénol, thallium...
- Hérititaires: maladie de Fabry, maladie de Charcot-Marie-Tooth, neuropathies sensibles et autonomiques...
- Malignes: carcinome, myélome
- Infectieuses et immunes: Guillain-Barré, VIH, borréliose

Syndromes centraux douloureux

- Lésions vasculaires centrales
- Sclérose en plaques
- Lésions de la moelle épinière et cérébrales
- Syringomyélie
- Tumeurs
- Abscesses
- Maladies inflammatoires: syphilis, myélites
- Épilepsie
- Maladie de Parkinson

Syndromes douloureux régionaux complexes (types I et II)**Syndromes douloureux mixtes**

- Lombalgies chroniques
- Douleurs cancéreuses

Tableau II. Classification et causes de douleurs neuropathiques. Tableau modifié d'après (Baron et coll., 2010).

Ce type de douleur se manifeste par un large éventail de symptômes cliniques allant de l'hypoesthésie (diminution de la perception d'un stimulus) à un état d'hyperexcitabilité général. Dans ce cas, le système nerveux central est sensibilisé et on observe fréquemment de l'allodynie (douleur produite par un stimulus non douloureux), de l'hyperalgésie (réponse exagérée à un stimulus douloureux), de l'hyperesthésie (augmentation de la perception d'un stimulus) ou encore de la dysesthésie (sensation anormale, déplaisante et non douloureuse). On constate donc que la douleur peut être évoquée (par un stimulus) ou être spontanée de manière continue ou paroxystique, démontrant le caractère pathologique de ce type de douleur (Boulanger, 2005). Plusieurs modèles impliquant des lésions des nerfs périphériques ou centraux ont été développés afin d'élucider les mécanismes responsables du développement de la douleur neuropathique (Héon, 2005).

Dans un contexte de douleur neuropathique, une partie des effets analgésiques périphériques induits par les endocannabinoïdes peuvent être attribués à des mécanismes périphériques agissant par l'intermédiaire des récepteurs CB₁ localisés sur les fibres afférentes primaires (Agarwal et coll., 2007; Yu et coll., 2010) (voir Section II, 2.3). Une avenue intéressante serait d'étudier l'implication possible du système cannabinoïde dans la modulation périphérique de la douleur neuropathique à l'aide du modèle de ligature partielle du nerf sciatique (voir Section III, 3.2.1). Il serait intéressant de déterminer si la modulation de ce système peut soulager certains des symptômes associés à la douleur neuropathique, tels que l'allodynie et l'hyperalgésie.

2.2.1 Douleurs liées à une lésion nerveuse périphérique

Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer l'apparition de douleurs neuropathiques consécutives à des lésions nerveuses périphériques (Figure 6).

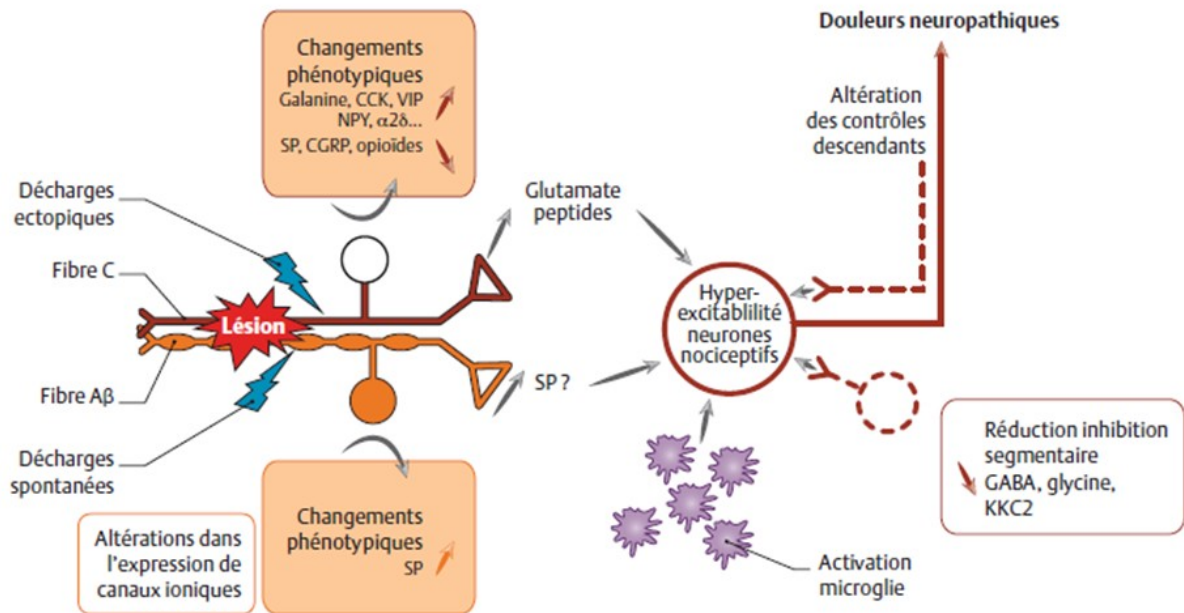


Figure 6 : Mécanismes des douleurs neuropathiques périphériques. CCK : cholécystokinine; CGRP : peptide relié au gène de la calcitonine ou *calcitonin gene-related peptide*; GABA : acide γ -aminobutyrique; KCC₂ : potassium chloride cotransporter 2; NPY : neuropeptide Y; SP : substance P; VIP : peptide vasoactif intestinal ou *vasoactive intestinal peptide*. Figure modifiée d'après (Bouhassira, 2009), tirée de *La Douleur : Guide pharmacologique et thérapeutique* (Beaulieu, 2013).

2.2.1.1 Mécanismes périphériques impliqués dans le développement de la douleur neuropathique

La physiopathologie de la douleur neuropathique est normalement divisée selon le site anatomique (périphérique ou central) (Figure 7). Suite à une lésion périphérique, de nombreux changements physiopathologiques apparaissent dans le système nerveux périphérique. Ceci se caractérise tout d'abord par une réaction inflammatoire, donc par la

libération de neuropeptides / neurotransmetteurs comme la substance P, des prostaglandines et des cytokines. Ceci provoque une diminution du seuil de dépolarisation des nocicepteurs secondaire à la réaction inflammatoire (hyperexcitabilité) ainsi que par une distribution et une expression altérées des canaux sodiques dans les nerfs périphériques.

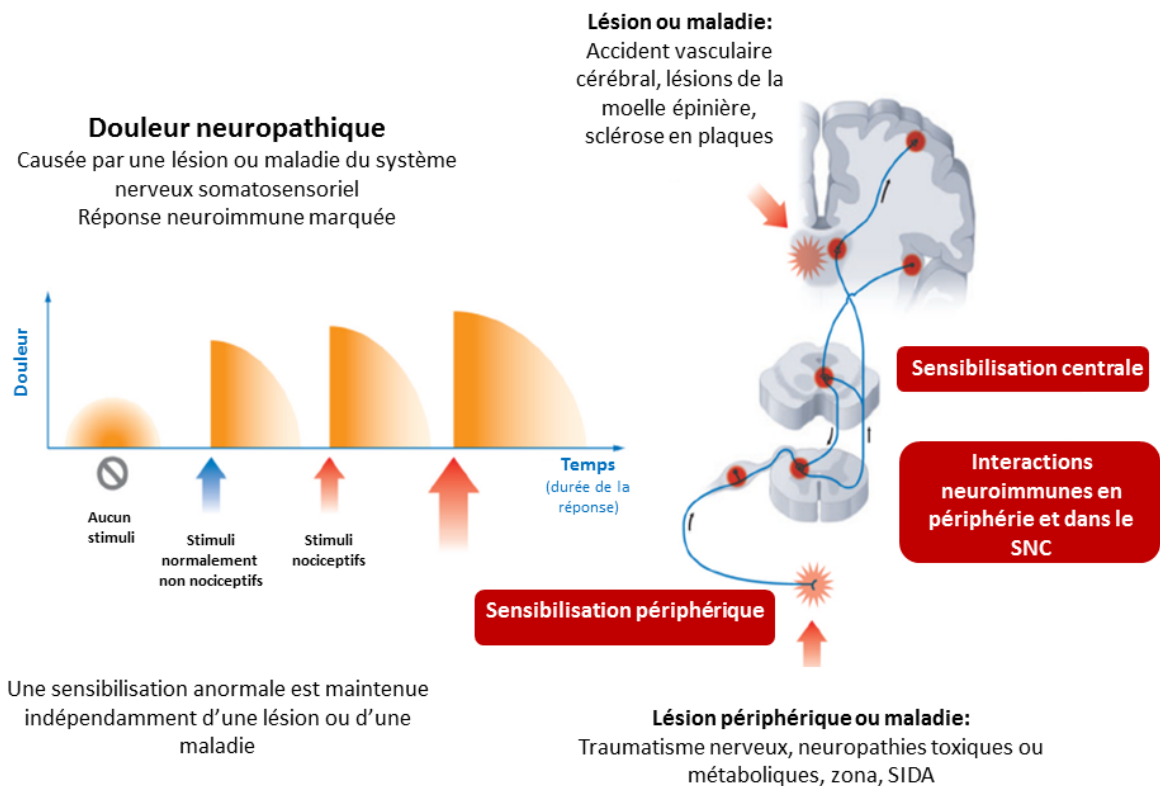


Figure 7. Résumé des principales caractéristiques qui distinguent la douleur neuropathique. SNC, système nerveux central. Figure modifiée d'après (Griffin & Woolf, 2007; Costigan et coll., 2009).

Tous ces changements vont entraîner plusieurs modifications périphériques (Bouhassira, 2009; Beaulieu, 2013) :

- *décharges spontanées et ectopiques des afférences*, générées au site de la lésion nerveuse. L'hyperexcitabilité associée à la réaction inflammatoire sensibilise des groupes

de nocicepteurs situés sur des fibres qui normalement ne participent pas à la transmission des signaux douloureux, comme par exemple les fibres A β (Wu et coll., 2002; Amir et coll., 2005). Ce phénomène de décharges ectopiques met en jeu certains canaux ioniques, plus précisément des canaux sodiques sensibles au voltage (Nav1.3, Nav1.7, Nav1.8) (Cummins et coll., 2000; Lai et coll., 2004; Wood et coll., 2004), des canaux potassiques (Bahia et coll., 2005), des canaux calciques (surexpression de la sous-unité $\alpha 2\delta$ des canaux calciques dépendant du voltage) (Luo et coll., 2001) et des récepteurs de la famille de TRP (*transient receptor potential*) (Woolf & Salter, 2000; Julius & Basbaum, 2001);

- conduction par l'intermédiaire de « courts-circuits / communications croisées » entre des fibres de gros (A β) et de petit calibres (A δ et C) (*conduction éphaptique*) ou phénomène de « couplage électrique » entre fibres nerveuses entraînant une activation de fibres contiguës se prolongeant au-delà de la décharge initiale et aboutissant à une sensibilisation du nocicepteur (Seltzer & Devor, 1979; Amir & Devor, 1992). Ce phénomène peut ainsi mener à de l'allodynie puisque la stimulation des fibres du toucher par un stimulus approprié peut entraîner de façon concomitante l'excitation des fibres nociceptives ;
- ramifications ou bourgeonnement axonal des neurones afférents primaires et des neurones sympathiques (Woolf et coll., 1992);
- *transformations phénotypiques* touchant les fibres A β (message non nociceptif) qui pourraient se comporter comme des nocicepteurs et synthétiser des neuromédiateurs pronociceptifs, tels que la substance P et le BDNF, normalement synthétisés uniquement ou préférentiellement par les fibres A δ et C, participant ainsi au développement d'une sensibilisation centrale (Neumann et coll., 1996) ;
- *implication du système immunitaire dans l'hyperexcitabilité du système nerveux périphérique*: les macrophages recrutés au site de l'atteinte tissulaire peuvent activer les

cellules de Schwann *via* une libération de l'IL-1 β . Ces cellules synthétisent alors de nombreuses molécules dont le NGF et le TNF α , ce qui leur permet d'activer directement les nocicepteurs ou de les sensibiliser indirectement *via* les prostaglandines (Marchand et coll., 2005).

2.2.1.2 Mécanismes centraux impliqués dans le développement de la douleur neuropathique

Les fibres sensibilisées peuvent désormais conduire le message nociceptif de la périphérie à la moelle épinière, ce qui génère une libération accrue par les nocicepteurs de neurotransmetteurs tels que la substance P et le glutamate. La stimulation accrue des nocicepteurs mène à la sensibilisation centrale, caractérisée par une libération de calcium intracellulaire, une régulation à la hausse des récepteurs NMDA ainsi que l'activation de cascades enzymatiques. Tous ces changements entraînent une diminution du seuil d'activation des neurones de la corne postérieure ainsi qu'une augmentation de l'intensité et de la durée de la réponse au stimulus. Le message douloureux est ensuite conduit vers le thalamus et le cerveau.

En plus des modifications périphériques, une lésion nerveuse périphérique entraîne des modifications au niveau central (Bouhassira, 2009; Beaulieu, 2013):

- *sensibilisation centrale* correspondant à une hyperexcitabilité des neurones nociceptifs centraux de la corne postérieure de la moelle en réponse à une augmentation des décharges des fibres C (*wind up*) (Herrero et coll., 2000). La libération de substance P et de BDNF ainsi que de nombreux autres médiateurs de la corne dorsale de la moelle active la libération d'acides aminés excitateurs comme le glutamate par l'intermédiaire de ses récepteurs AMPA mais surtout NMDA qui jouent un rôle essentiel dans cette sensibilisation centrale ;
- *modifications métaboliques* dans les corps cellulaires de neurones afférents primaires : modifications de la synthèse et de la libération des neuropeptides ainsi que de l'expression de plusieurs centaines de gènes (Costigan et coll., 2002). Ces gènes ne sont

pas forcément impliqués dans le phénomène douloureux mais plutôt dans les processus de dégénérescence et de régénération nerveuses ;

- *phénomènes de neuroplasticité*. Suite à des lésions périphériques, il y a développement de modifications morphologiques complexes dans la corne postérieure de la moelle. Il existerait des ramifications des neurones de gros calibre non nociceptifs A β (véhiculant l'information tactile) vers les couches superficielles de la moelle (couche II). Par exemple, suite à une lésion du nerf sciatique, des études ont observé que les terminaisons centrales des fibres de gros calibre allaient innover la couche II (Woolf 1992; Koerber 1994). Cette réorganisation fournirait une explication anatomique au phénomène d'allodynie, dans la mesure où les neurones de la couche II activés normalement et exclusivement par des stimulations nociceptives pourraient dans ces conditions l'être aussi par des stimulations non nociceptives (Woolf et coll., 1992). Par contre, certaines données n'appuient pas cette théorie de réorganisation anatomique; les changements anatomiques pourraient plutôt être d'ordre phénotypiques associés aux fibres C (Hökefelt et coll., 2006) ;
- *activation des cellules gliales*. Des mécanismes neuro-immunitaires faisant intervenir les cellules gliales pourraient expliquer l'hyperexcitabilité des neurones nociceptifs. En effet, une lésion neuronale périphérique entraîne une activation importante de la microglie (les cellules microgliales expriment les mêmes marqueurs de surface que les macrophages en périphérie; elles sont qualifiées de cellules immunitaires du système nerveux central) (pour une revue récente de la littérature voir Calvo et coll., 2012).

2.2.1.3 Altération des contrôles descendants inhibiteurs

Dans le but de moduler les signaux douloureux, le système nerveux central possède des voies inhibitrices descendantes, composées principalement du noyau du raphé magnus (sérotonine), du *locus coeruleus* (noradrénaline) et de la substance grise périaqueducale (opioïdes endogènes). Il possède également des interneurons GABAergiques, mais il semble

que dans le contexte de douleurs neuropathiques, ces modulateurs soient insuffisants ou qu'il y ait une diminution de la modulation centrale soulageant la douleur. En effet, des *altérations des systèmes de modulation* de la transmission des messages nociceptifs sont observées dans le contexte de douleurs neuropathiques. Il y aurait un phénomène de désinhibition segmentaire par réduction de la concentration en GABA (acide γ -aminobutyrique) dans la corne postérieure de la moelle, alors que l'hypothèse d'une destruction ou un dysfonctionnement des interneurons inhibiteurs locaux a également été avancée (Coull et coll., 2003).

2.2.2 Douleurs centrales

Les douleurs neuropathiques centrales résultent d'une lésion qui peut être localisée au niveau de la moelle épinière ou du cerveau. Elles sont majoritairement reliées à un accident cérébral vasculaire, quoiqu'elles puissent être également causées par la sclérose en plaques, une lésion médullaire, l'épilepsie, une myélopathie secondaire au VIH, etc. Les douleurs neuropathiques centrales seraient dues à une sensibilisation centrale, une réorganisation fonctionnelle (corticale) et/ou une désinhibition thermosensorielle (Craig, 1998).

2.3 Traitements actuels des douleurs inflammatoire et neuropathique

Plusieurs traitements sont disponibles pour soulager les douleurs inflammatoires, ciblant surtout l'inflammation périphérique ou neurogénique (centrale). Les principaux traitements sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques (AINS), ainsi que de nouvelles générations d'inhibiteurs sélectifs de la COX-2 (coxibs). De par leur localisation dans les cellules du système immunitaire ainsi que leurs fonctions de neuromodulateurs, les cannabinoïdes présentent des propriétés analgésiques très intéressantes dans ce contexte.

La prise en charge des douleurs neuropathiques représente souvent une tâche difficile. Il est impossible de déterminer les mécanismes exacts de la douleur neuropathique puisque plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans une même pathologie. De ce fait, il existe de nombreux traitements pharmacologiques. Le premier choix se fait en fonction des symptômes, des effets secondaires, du degré de toxicité et du potentiel d'interaction médicamenteuse. Les antidépresseurs tricycliques se situent habituellement en première ligne du traitement pharmacologique puisqu'ils inhibent la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline et qu'ils bloquent les canaux sodiques et calciques. Également en première ligne de traitement, il est possible de débiter le traitement avec des anticonvulsivants analgésiques comme la gabapentine ou la prégabaline. Les principaux mécanismes de leurs effets analgésiques sont le blocage des canaux sodiques et calciques (sous-unité $\alpha_2\delta$), l'inhibition de la neurotransmission glutamatergique ainsi que l'augmentation de la transmission GABAergique. Toujours en première ligne, les anesthésiques locaux topiques (emplâtre de lidocaïne) sont souvent utilisés pour bloquer la transmission du message douloureux par l'inhibition des canaux sodiques. Les opioïdes ainsi que le tramadol sont utilisés pour leur part le plus souvent en deuxième ligne. Il est conseillé d'administrer de faibles doses, préférentiellement des formules à longue action et d'augmenter progressivement jusqu'au soulagement ou l'apparition d'effets indésirables. Malheureusement, l'efficacité et la tolérance de ces médicaments sont souvent inadéquates et il n'est donc pas surprenant que plusieurs autres substances soient actuellement à l'étude pour le traitement de la douleur neuropathique.

Toujours en deuxième ligne, il est possible d'administrer d'autres anticonvulsivants, comme la lamotrigine, la carbamazépine et le topiramate ainsi que d'autres antidépresseurs comme la paroxétine, le citalopram et la venlafaxine si les médicaments de première ligne n'apportent pas l'effet bénéfique souhaité. Finalement, en troisième ligne, lorsque la douleur persiste malgré l'utilisation optimale des autres analgésiques, il existe toujours les formulations topiques à base de capsaïcine, l'utilisation des antagonistes des récepteurs NMDA comme la kétamine et le dextrométorphan, l'emploi d'agonistes α_2 -adrénergiques

comme la clonidine, l'administration d'antiarythmiques comme la mexilétine ainsi que l'utilisation des cannabinoïdes naturels ou synthétiques.

Les cannabinoïdes sont inclus dans les directives internationales associées au traitement de la douleur chronique. Ils sont considérés en tant que quatrième ligne dans l'algorithme de traitement canadien (Moulin et coll., 2007), alors qu'ils se situent en deuxième ligne de traitement dans l'algorithme québécois (Boulangier et coll., 2008). La publication de nombreuses études portant sur l'utilisation des cannabinoïdes en clinique a suscité un intérêt marqué dans le domaine médical et les travaux sur le sujet ne cessent de réaliser d'énormes progrès quant à la compréhension du système cannabinoïde et de ses applications thérapeutiques possibles. Dans l'ensemble des études, les effets des cannabinoïdes sont bénéfiques dans le traitement adjuvant des douleurs réfractaires à la plupart des analgésiques actuels.

De ce fait, les résultats des dernières études cliniques indiquent que le système cannabinoïde représente une cible thérapeutique intéressante afin d'améliorer les symptômes associés aux douleurs inflammatoire et neuropathique, bien qu'une certaine prudence soit requise afin de cibler les tissus et les pathologies où la modulation de ce système et des concentrations de cannabinoïdes endogènes pourraient être efficaces.

Après une revue générale de la pharmacologie du système cannabinoïde (Section II), le rôle des cannabinoïdes dans différentes conditions douloureuses sera abordé (Section III).

Section II. Le système cannabinoïde

1 HISTORIQUE

Depuis des millénaires, le cannabis est connu pour ses vertus thérapeutiques, recommandées notamment dans le traitement de la douleur, de l'asthme, de la dysenterie, des nausées et vomissements ainsi que des spasmes et convulsions (Mechoulam, 1986). Son utilisation dans la pharmacopée chinoise constitue l'une des premières références à son

usage thérapeutique, décrite notamment dans le traité des plantes médicinales *Pên-ts'ao Ching* de l'empereur chinois Shen Nung, datant approximativement de 2737 avant J.C. (Adams & Martin, 1996).

Plus récemment, au cours du XIX^e siècle, la teinture de cannabis était un médicament très communément prescrit dans les officines de pharmacie. Un médecin irlandais au service de l'armée britannique en Inde, W.B. O'Shaughnessy, a d'ailleurs publié un traité sur le cannabis en 1839, présentant ses vertus à la médecine occidentale (Snyder, 1971). Il a permis d'introduire le cannabis dans la pratique occidentale, en démontrant son efficacité et son innocuité par des expérimentations animales. Par la suite, plusieurs publications médicales ont vanté son utilisation pour le soulagement de diverses maladies et inconforts, énonçant souvent même que le cannabis soulageait la douleur aussi bien que l'opium.

Dans les années 1890, certains médecins se sont cependant mis à douter de l'efficacité du cannabis et des réactions individuelles qu'il provoquait, qualifiées d'erratiques et d'imprévisibles (Spicer, 2002). Dès le début du XX^e siècle, des médicaments de synthèse ont vu le jour, faisant ainsi compétition au cannabis en Amérique du Nord et en Europe, où l'engouement pour ce dernier a diminué peu à peu au profit de l'utilisation des opiacés et d'autres substances pouvant soulager la douleur beaucoup plus rapidement. Des médicaments comme l'aspirine, l'hydrate de chloral et les barbituriques ont également été mis au point à la fin du XIX^e siècle. Le développement plus lent de la recherche faite sur le cannabis, comparativement à celle sur l'opium, n'était pas dû à un manque d'intérêt de la communauté scientifique, mais bien à la nature lipophile du principal constituant actif du cannabis qui posait ainsi des problèmes de dissolution et d'administration.

Par la suite, simultanément à la diminution de l'usage thérapeutique du cannabis, son utilisation récréative comme hallucinogène a été de plus en plus répandue aux États-Unis. La propagation de cette utilisation récréative au début du XX^e siècle a favorisé la classification du cannabis en tant que narcotique par les intervenants du monde médical. En 1915, la Californie est devenue le premier État à rendre illégale la possession de cannabis. Un climat de peur croissante s'est installé progressivement dans les foyers américains, notamment

suite à la pression exercée par les nouvelles compagnies de textile synthétique à base de pétrole et par les grands barons du commerce du bois et des journaux qui considéraient la production de chanvre comme une menace pour leurs affaires. Par conséquent, en 1937, les États-Unis ont instauré la « *American Marihuana Tax Act* » et ont imposé une taxe d'accise professionnelle aux producteurs de fibres de cannabis. Le gouvernement canadien a suivi son voisin américain et en a également interdit la production en vertu de la *Loi sur l'opium et les drogues narcotiques* le 1^{er} août 1938 (Spicer, 2002). Ainsi, ces deux lois nord-américaines contrôlaient l'industrie économique des producteurs de fibres de cannabis à l'aide de taxes prohibitives et empêchaient toute poursuite de l'expérimentation sur les propriétés thérapeutiques du cannabis. Ces interdictions ont notamment mené au retrait du cannabis de la pharmacopée américaine en 1942, son emploi étant proscrit de la médecine occidentale par le législateur sur des bases non scientifiques.

Dans les années 1960, les esprits se sont peu à peu libérés et les adeptes du mouvement hippie ont commencé à utiliser le cannabis à des fins récréatives. Dans les années 1990, l'intérêt pour l'usage thérapeutique du cannabis a été reconsidéré, notamment par différents groupes de professionnels œuvrant dans le domaine médical et de patients revendiquant son utilisation, conduisant ainsi à l'élaboration de différents rapports sur le sujet, en France et au Canada notamment (Roques, 1998; Nolin & Kenny, 2003). Dès le milieu du XX^e siècle, des substances cannabinoïdes synthétiques sont entrées sur les marchés américain, canadien et britannique, telles que le dronabinol, un dérivé synthétique du Δ^9 -tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), utilisé pour le traitement des nausées et vomissements associés à la chimiothérapie anticancéreuse, et plus récemment pour stimuler l'appétit chez les patients sidéens. Dès 2001, Santé Canada a émis l'autorisation de se procurer du cannabis à des fins thérapeutiques et a progressivement autorisé trois composés synthétiques (dronabinol, nabilone et nabiximols). Les deux premiers ont été prescrits initialement pour soulager les nausées et vomissements liés à la chimiothérapie et pour le dronabinol pour soulager la douleur ainsi que pour stimuler l'appétit chez les patients sidéens. Pour sa part, le troisième est utilisé pour le traitement de la douleur neuropathique chez les patients souffrant de sclérose en plaques. Au cours des vingt dernières années, les avancées dans la

pharmacologie des cannabinoïdes et leurs mécanismes d'action se sont accélérées en raison de l'intérêt grandissant pour ces substances aux vertus médicales très intéressantes (Di Marzo & Petrocellis, 2006; Youssef & Irving, 2012).

2 PHARMACOLOGIE DES CANNABINOÏDES

Le système cannabinoïde est composé de phytocannabinoïdes (issus de la plante *Cannabis sativa*) et de composés synthétiques, des récepteurs cannabinoïdes et de leurs ligands endogènes (endocannabinoïdes) ainsi que des enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation des endocannabinoïdes. Deux sous-types de récepteurs cannabinoïdes, CB₁ et CB₂, ont été décrits jusqu'à présent, ces derniers appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G possédant sept domaines transmembranaires (Devane et coll., 1988; Matsuda et coll., 1990; Munro et coll., 1993). Plusieurs études supportent par ailleurs l'existence d'autres récepteurs sur lesquels se lieraient les composés cannabinoïdes.

Au cours des dernières années, des progrès considérables ont été accomplis dans la compréhension du rôle des endocannabinoïdes dans la modulation de la douleur. Les endocannabinoïdes ont présenté des effets analgésiques dans des modèles de douleurs inflammatoire et neuropathique ainsi que de nombreux autres modèles (douleurs cancéreuses, musculo-squelettiques, ostéoarthritiques).

2.1 Généralités

Les études concernant l'évaluation des propriétés des cannabinoïdes sont habituellement effectuées *in vivo* en utilisant des animaux de laboratoire (rats, souris plus fréquemment) ou *in vitro* à l'aide de tissus isolés exprimant les récepteurs cannabinoïdes (Pertwee, 1997). Les critères recherchés chez l'animal pour fins d'évaluation lors d'essais *in vivo* sont regroupés en une tétrade qui consiste en l'observation simultanée de quatre effets typiques des cannabinoïdes : l'hypolocomotion ou réduction de l'activité spontanée,

l'apparition d'une hypothermie, la catalepsie et la diminution de la nociception. Cette tétrade est encore utilisée aujourd'hui pour l'identification des composés cannabinoïdes (Martin, 1985a; Guindon & Beaulieu, 2005). Au cours des vingt dernières années, il y a eu une véritable révolution dans notre compréhension du système cannabinoïde et en particulier des endocannabinoïdes et de leur importance dans la transmission neuronale. Les gènes qui encodent les récepteurs cannabinoïdes ont été identifiés (Onaivi et coll., 1996), les récepteurs ont été clonés et des souris chez lesquelles le gène encodant le récepteur CB₁ (Ledent et coll., 1999; Zimmer et coll., 1999) ou le récepteur CB₂ a été inactivé ont été générées (Buckley et coll., 2000). Toutes ces percées ont permis d'élucider les diverses composantes de ce que l'on appelle maintenant le système endocannabinoïde et de mieux comprendre le rôle de ce système, élargissant de ce fait les possibilités thérapeutiques liées à son utilisation (Starowicz & Di Marzo, 2013; Zogopoulos et coll., 2013).

2.2 Les phytocannabinoïdes

La marihuana (marijuana) est le nom usuel du *Cannabis sativa* (cannabis), également connu sous l'appellation de chanvre indien (Abel, 1980). Cette plante produit des feuilles et des sommités fleuries qui contiennent quelques 489 composés distincts répartis selon 18 classes chimiques différentes et qui produisent plus de 70 phytocannabinoïdes (Elsohly & Slade, 2005). La première découverte pharmacologique dans ce domaine a véritablement été l'isolation et la synthèse du Δ^9 -THC qui demeure le constituant psychotrope le plus important du cannabis (Gaoni & Mechoulam, 1964). Dans la plante vivante, les phytocannabinoïdes existent autant sous forme inactive en tant qu'acide monocarboxylique (THCA) que sous forme décarboxylée active (THC); la chaleur (à des températures au-dessus de 120°C) provoque leur décarboxylation (passage de THCA à THC) et résulte en une activation biologique (Whittle & Guy, 2004; Dussy et coll., 2005; Huestis, 2007). Le Δ^9 -THC est le cannabinoïde le plus étudié et il est responsable de la plupart des effets physiques et psychotropes du cannabis (Ashton, 2001). Les deux autres constituants les plus connus sont le cannabinol (CBN) et le cannabidiol (CBD) (Zhu et coll., 2006; Balducci et coll., 2009;

Yamaori et coll., 2010), présents en moindre quantité dans la plante, et qui possèdent peu, sinon aucune, propriété psychotrope (Ashton, 2001). On trouve également d'autres cannabinoïdes dans la marijuana, notamment le cannabigérol (CBG), le cannabichromène (CBC), le tétrahydrocannabivarine (THCV) ainsi que de nombreux autres (Elsohly & Slade, 2005).

2.3 Pharmacologie des récepteurs cannabinoïdes CB₁

Les récepteurs CB₁ sont omniprésents dans le système nerveux central; ils comptent parmi les récepteurs couplés aux protéines G les plus abondants du cerveau avec une densité similaire à celle des récepteurs du GABA (acide γ -aminobutyrique) et du glutamate (Herkenham et coll., 1990; Howlett et coll., 2004).

2.3.1 Localisation des récepteurs CB₁

Les récepteurs CB₁ sont les plus abondamment exprimés dans le cerveau des mammifères et également dans les tissus périphériques. Ils sont fortement exprimés dans plusieurs régions du cerveau telles que le cortex, le système limbique, l'hippocampe, le cervelet, le tronc cérébral ainsi que dans plusieurs noyaux des ganglions de la base associés aux émotions, à la cognition, à la mémoire et aux fonctions motrices et exécutives (Piomelli, 2003; Guindon & Beaulieu, 2005). Ils sont également localisés dans les zones du cerveau impliquées dans la modulation de la douleur telles que la substance grise périaqueducale, le cortex cingulaire antérieur, le thalamus, la corne dorsale de la moelle épinière ainsi que les ganglions de la racine dorsale (Herkenham, 1991; Herkenham et coll., 1991; Farquhar-Smith et coll., 2000; Lever & Rice, 2007). Bien que la présence des récepteurs CB₁ sur les terminaisons centrales des fibres afférentes primaires ait été controversée (Ong & Mackie, 1999; Farquhar-Smith et coll., 2000), des études ont montré la présence de ces récepteurs sur les terminaisons glutamatergiques dans l'hippocampe et le cervelet (Katona et coll., 1999; Kawamura et coll., 2006).

Au niveau périphérique, les récepteurs CB₁ se trouvent principalement sur les terminaisons nerveuses des neurones afférents primaires (Agarwal et coll., 2007), ainsi que dans les axones, les corps cellulaires et les dendrites des neurones centraux et périphériques, où ils provoquent généralement l'inhibition de la libération d'acides aminés et de neurotransmetteurs (par exemple le GABA) (Schlicker & Kathmann, 2001; Iversen, 2003; Matyas et coll., 2006). La présence de ces récepteurs sur les fibres afférentes primaires A δ et C ainsi que sur les synapses excitatrices dans la moelle épinière a récemment été confirmée (Nyilas et coll., 2009). En périphérie, on les retrouve plus particulièrement dans les neurones, les leucocytes, les cellules endothéliales, quelques glandes endocrines, le cœur, les poumons ainsi que les appareils reproducteur, urinaire et digestif (Pertwee, 1997; Guindon & Beaulieu, 2005).

De par leur localisation dans le système nerveux central, il a été suggéré que l'activation des récepteurs CB₁ produit la plupart des effets psychoactifs du cannabis (Huestis et coll., 2001; Mackie, 2005; Monory et coll., 2007). Ces effets chez l'homme incluent une euphorie, de l'anxiété, des altérations cognitives, une sécheresse de la bouche, une tachycardie, etc. Il pourrait donc être intéressant de cibler les récepteurs localisés en périphérie afin de dissocier les effets analgésiques bénéfiques des effets centraux non souhaitables. Dans ce sens, plusieurs options sont envisageables, et certaines d'entre elles seront présentées plus en détails dans la section II, 2.6.

2.3.2 Mécanismes de la transduction des signaux

Globalement, l'activation des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et la stimulation subséquente des protéines G_{i/o} hétérotrimériques permettent d'initier différentes voies de signalisation, comprenant une inhibition de la voie de l'AMP cyclique ainsi qu'une activation des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) (Figure 8). Ces événements intracellulaires entraînent la régulation de l'expression de plusieurs gènes. L'activation des récepteurs CB₁ est également reliée à une régulation négative de l'activité des canaux calciques et une

régulation positive de celle des canaux potassiques, ce qui mène à l'inhibition de la libération de neurotransmetteurs (Howlett, 1995).

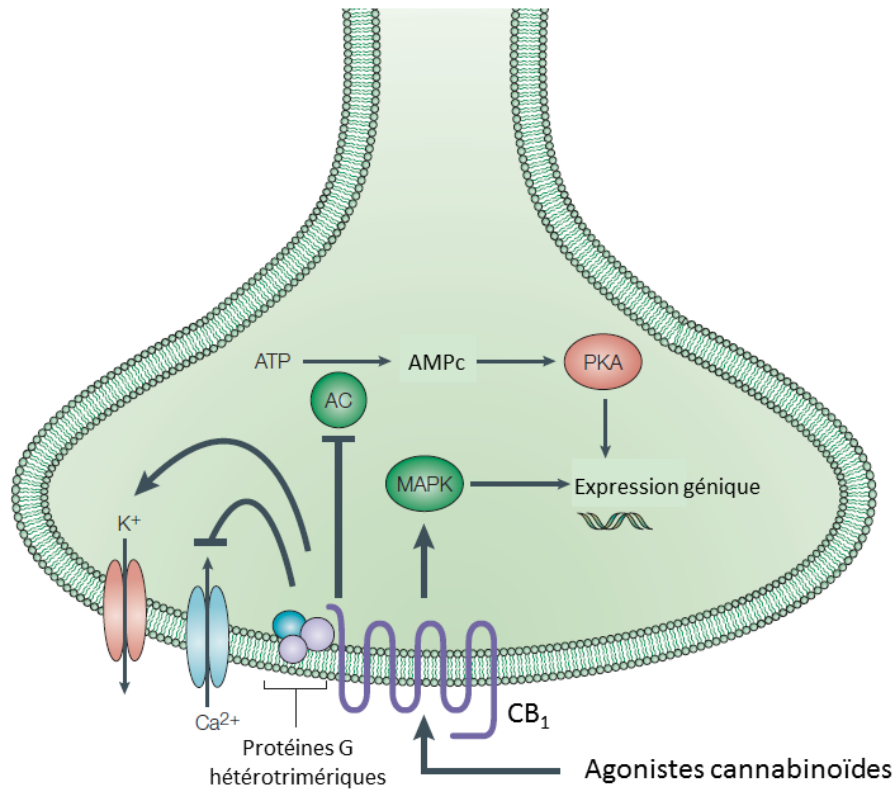


Figure 8 : Simplification des principales voies de signalisation des récepteurs cannabinoïdes CB₁ suivant leur activation par des agonistes. AC : adénylate cyclase; AMPc : adénosine monophosphate cyclique; ATP : adénosine triphosphate; MAPK : *mitogen-activated protein kinases*; PKA : protéine kinase A. Figure modifiée d'après (Di Marzo et coll., 2004).

Plus précisément, il a été démontré que les récepteurs CB₁ inhibent l'activité de l'adénylate cyclase de manière stéréo-sélective, dépendante de la dose et par l'intermédiaire de la sous-unité α de la protéine de type G_{i/o} (Matsuda et coll., 1990; Di Marzo & De Petrocellis, 2006). Le couplage des récepteurs CB₁ aux protéines G_{i/o} sensibles à la toxine pertussique permet le blocage des canaux calciques de type L, N et P/Q (Choi & Lovinger, 1996; Twitchell et coll., 1997) et des canaux potassiques de type D (Mackie & Hille, 1992;

Mackie et coll., 1995), ainsi que l'activation des canaux potassiques de la rectification entrante (GIRK) (Deadwyler et coll., 1995; Felder et coll., 1995). L'activation des récepteurs CB₁ entraîne également celle de la phospholipase C (*via* les sous-unités βγ de la protéine G), ainsi que celle de diverses voies des MAPK telles que p44/42, p38, ERK1/2 (*extracellular signal-related protein kinase*) et Jun (c-Jun N-terminal) kinase (JNK) (Bouaboula et coll., 1995; Di Marzo et coll., 2004; Pertwee et coll., 2010). Les agonistes des récepteurs cannabinoïdes stimulent les MAPK par le biais de la sous-unité α des protéines G et non par l'intermédiaire d'un mécanisme dépendant de l'AMP cyclique (Bouaboula et coll., 1996; Guindon & Beaulieu, 2005; Di Marzo & Petrocellis, 2006). Il a de plus été démontré que la régulation de l'expression génique par les récepteurs CB₁ dépend du recrutement de réseaux complexes de protéines kinases intracellulaires, comme par exemple l'axe signalétique PI3Kinase/Akt (PI3; phosphatidyl inositol-3, Akt; protéine effectrice à activité sérine-thréonine kinase) (Howlett et coll., 2004; Di Marzo & Petrocellis, 2006).

Lorsqu'ils sont activés, les récepteurs CB₁ peuvent aussi inhiber les récepteurs ionotropes de type 5-HT₃ (Barann et coll., 2002), moduler la production de NO et mobiliser l'acide arachidonique (Pertwee, 1997; Howlett & Mukhopadhyay, 2000). La modulation de certains canaux sodiques a également été démontrée (Nicholson et coll., 2003). Ces mécanismes ont été proposés pour expliquer une partie des effets antinociceptifs périphériques induits par les endocannabinoïdes et les agonistes des récepteurs CB₁ (pour une revue de la littérature, voir (Guindon & Beaulieu, 2009; Kress & Kuner, 2009)).

La conceptualisation traditionnelle de la pharmacologie des récepteurs CB₁ suggère que ce sont des récepteurs couplés à des protéines G_{i/o} inhibitrices, menant à une diminution de l'excitabilité neuronale et à l'inhibition de la libération de neurotransmetteurs. Cette conceptualisation est par contre probablement reliée à une trop grande simplification de la signalisation de ce système. Ce point de vue classique a été remis en question par des études montrant un autre couplage des récepteurs CB₁ avec des protéines G_s excitatrices (Glass & Felder, 1997; Rhee et coll., 1998). L'activation successive de protéines G_{i/o} et G_s à l'aide de concentrations croissantes d'agonistes cannabinoïdes conduit à des profils de réponses

biphasiques, tels que la modulation biphasique de canaux sodiques voltage-dépendants (Rubovitch et coll., 2002; Fan & Yazulla, 2003) ou la libération de GABA (Gonzalez et coll., 2009). L'activation physiologique de différentes protéines G suggère l'existence de mécanismes complexes régulant les effets modulateurs précis induits par l'activation des récepteurs CB₁ (Bosier et coll., 2010).

De plus en plus de données montrent que l'activation des récepteurs CB₁ localisés sur les fibres nerveuse sensibles inhibe l'activité neuronale, réduisant ainsi les comportements douloureux dans plusieurs modèles (Calignano 1998; Fox 2001; Johaneck 2004; Khasabova 2004 Ko 1999; Richardson, 1998). Ces récepteurs présynaptiques CB₁ sont probablement responsables des effets inhibiteurs induits par les agonistes cannabinoïdes sur la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs enregistrés dans les neurones de la moelle épinière, contribuant ainsi à la modulation de la transmission nociceptive au niveau spinal (Morisset et coll., 2001). En périphérie, l'inhibition de l'excitabilité des terminaisons libres entraîne une diminution de la génération de potentiels d'action avec une réduction conséquente de la transmission nociceptive.

2.4 Pharmacologie des récepteurs cannabinoïdes CB₂

Le deuxième sous-type de récepteurs cannabinoïdes, CB₂, appartient lui aussi à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G. Le récepteur CB₂ présente une homologie de 68 % avec le récepteur CB₁ au niveau de la région transmembranaire et de 44 % pour l'ensemble de la protéine (Munro et coll., 1993).

2.4.1 Localisation des récepteurs CB₂

Les premières études sur la localisation exacte des récepteurs CB₂ ont suggéré qu'ils n'étaient pas présents dans le système nerveux central. L'ARNm des récepteurs CB₂ n'a pas été détecté dans le cerveau de rat (Munro et coll., 1993; Griffin et coll., 1999) et les agonistes sélectifs pour ces récepteurs ne produisent pas les effets psychotropes indésirables

généralement causés par les agonistes non sélectifs des récepteurs cannabinoïdes du système nerveux central (hypoactivité, hypothermie et catalepsie) (Hanus et coll., 1999; Malan et coll., 2001). La liaison du [³H] CP55,940 (agoniste cannabinoïde non sélectif) dans le cerveau de souris a été réduite par l'invalidation du gène du récepteur CB₁ (Zimmer et coll., 1999), alors qu'elle n'a pas été affectée par celle du gène du récepteur CB₂ (Buckley et coll., 2000).

Ces observations suggèrent que l'expression de ces récepteurs est restreinte aux tissus périphériques (Munro et coll., 1993). Ils ont d'ailleurs été localisés sur les cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes B, les macrophages, les mastocytes, les cellules tueuses (NK ou *natural killer*), les cellules microgliales et, dans une moindre mesure, les monocytes et les neutrophiles polynucléaires (Bouaboula et coll., 1993; Facci et coll., 1995; Galiegue et coll., 1995; Schatz et coll., 1997; Maresz et coll., 2005). Cette localisation explique le rôle immunomodulateur qui leur est attribué (Buckley et coll., 2000); pour une revue récente de la littérature voir (Rom & Persidsky, 2013). En périphérie, ils sont notamment localisés dans les ganglions de la racine dorsale, la moelle épinière, les neurones sensitifs, le myocarde, les cellules endothéliales coronariennes, les cellules musculaires lisses, la rate, les amygdales, la moelle osseuse, le thymus, le pancréas, etc. (Galiegue et coll., 1995; Griffin et coll., 1997).

De plus en plus de données montrent néanmoins que les récepteurs CB₂ sont également exprimés dans le système nerveux central, principalement dans les cellules microgliales périvasculaires (Carrier et coll., 2004; Gong et coll., 2006) et les astrocytes (Sheng et coll., 2005; Onaivi et coll., 2006), où ils modulent les réponses immunitaires (Cabral & Griffin-Thomas, 2008; Cabral et coll., 2008; Sagredo et coll., 2009). Ils sont également exprimés dans les cellules endothéliales cérébro-microvasculaires (Golech et coll., 2004) ainsi que dans les neurones périphériques et centraux (tronc cérébral) (Van Sickle et coll., 2005; Wotherspoon et coll., 2005; Ashton et coll., 2006; Beltramo et coll., 2006). Une interprétation prudente des données relatives à leur localisation dans le système nerveux central est néanmoins recommandée (Atwood & Mackie, 2010; Atwood et coll., 2012b).

À la lumière de ces récentes mises en garde, il convient de cibler les récepteurs CB₂ au niveau périphérique puisque de plus en plus de données montrent que ces derniers sont également exprimés dans le système nerveux central. Il n'est donc pas exclu que des mécanismes d'action centraux aient participé aux effets antinociceptifs observés dans les différentes études ayant injectés les agonistes des récepteurs CB₂ au niveau systémique.

Il a par ailleurs été montré que l'expression des récepteurs CB₂ augmente dans certaines conditions physiologiques et pathologiques, ce qui ajoute à leur attrait en tant que cible thérapeutique (Zhang et coll., 2003; Wotherspoon et coll., 2005; Yiangou et coll., 2006).

2.4.2 Mécanismes de la transduction des signaux

Les voies de signalisation impliquées dans les effets des récepteurs CB₂ sont sensiblement les mêmes que celles des récepteurs CB₁. L'activation des récepteurs CB₂ inhibe l'adénylate cyclase (Slipetz et coll., 1995; Di Marzo & Petrocellis, 2006) et active les MAPK par le biais de la sous-unité α des protéines G (Bouaboula et coll., 1996; Di Marzo & Petrocellis, 2006). Contrairement aux récepteurs CB₁, les récepteurs CB₂ ne semblent pas se coupler aux canaux calciques de type L, N et P/Q et aux canaux potassiques de la rectification entrante (Felder et coll., 1995; Di Marzo et coll., 2004), bien que certaines études tendent à démontrer le contraire (Atwood et coll., 2012a). En effet, ces auteurs suggèrent que les récepteurs CB₂ peuvent moduler les canaux calciques et ils proposent que les résultats des études antérieures étaient basés sur le concept de sélectivité fonctionnelle ou d'agonisme biaisé des ligands (Atwood et coll., 2012a). Ce concept et ses répercussions sur le système cannabinoïde seront abordés de façon plus détaillée dans la deuxième partie de la discussion.

De par leur localisation sur les cellules du système immunitaire, les récepteurs CB₂ sont impliqués dans les effets anti-inflammatoires des cannabinoïdes au niveau des astrocytes et de la microglie. Ils diminuent l'activité des cellules présentatrices d'antigènes et régulent de façon négative la production de cytokines telles que l'interféron-gamma (IFN- γ),

le TNF α et l'IL-6 durant les réponses inflammatoires *in vivo* et *in vitro* (Berdyshev, 2000; Lombard et coll., 2007). Les propriétés anti-inflammatoires des cannabinoïdes sur les cellules gliales impliquent l'inhibition de la transcription de chimiokines pro-inflammatoires et de cytokines *via* le facteur de transcription nucléaire (NF- κ B) (Jacobsson et coll., 2000; Panikashvili et coll., 2005). Suite à un processus inflammatoire ou neuropathique, l'augmentation de la production d'endocannabinoïdes dans la moelle épinière fournit probablement un système de défense endogène, qui vise à limiter les dommages aux cellules neuronales, par exemple en induisant l'expression de protéines protectrices dans les neurones et en réduisant la libération de neurotoxines et de cytokines par les cellules gliales activées. L'activation des récepteurs CB₂ entraîne ainsi des effets neuroprotecteurs et immunomodulateurs (Berdyshev, 2000; Howlett et coll., 2002; Cabral & Griffin-Thomas, 2009). Le potentiel thérapeutique de la modulation des récepteurs CB₂ dans des modèles de douleur inflammatoire représente donc une option très intéressante puisqu'en plus des actions directes sur la libération de neurotransmetteurs, une diminution de la libération de médiateurs pro-inflammatoires pourrait participer aux effets antinociceptifs produits, renforçant ainsi leur rôle de composés endogènes ayant des propriétés immunomodulatrices (Rom & Persidsky, 2013).

2.5 Modifications de l'expression des récepteurs cannabinoïdes

En plus d'une modulation des niveaux d'endocannabinoïdes, des modifications de l'expression des récepteurs CB₁ et CB₂ sont également observées en situations pathologiques. Ces altérations de l'expression des récepteurs cannabinoïdes ont été revues par plusieurs auteurs (Di Marzo et coll., 2004; Pertwee, 2005; Pacher et coll., 2006; Di Marzo, 2008; Izzo & Camilleri, 2008; Pertwee, 2009). Au cours de certaines pathologies, telles que la douleur neuropathique, il y a augmentation de l'expression des récepteurs CB₁ et CB₂ dans les voies de la douleur au niveaux périphérique et central (Siegling et coll., 2001; Lim et coll., 2003; Zhang et coll., 2003; Walczak et coll., 2005; Mitirattanakul et coll., 2006). Ces résultats suggèrent que cette augmentation vise à réduire les symptômes ou à inhiber la progression

de la maladie, jouant ainsi un rôle protecteur (pour une revue de la littérature, voir (Pertwee, 2009)).

Cette régulation de l'expression des récepteurs cannabinoïdes est d'un intérêt fort appréciable d'un point de vue thérapeutique puisqu'elle peut, dans plusieurs cas, être corrélée avec une puissance et une efficacité accrues des agonistes cannabinoïdes dans plusieurs modèles animaux. En conditions neuropathiques, l'inhibition de cette surexpression des récepteurs CB₁ au niveau spinal a d'ailleurs réduit les effets analgésiques des cannabinoïdes (Lim et coll., 2003). De ce fait, l'identification des situations physiologiques ou pathologiques précises où une absence de régulation à la hausse des récepteurs cannabinoïdes est notée pourrait être tout autant importante (Miller & Devi, 2011).

En somme, dû à la très large expression des récepteurs CB₁ et CB₂ dans différents tissus périphériques ou centraux, il est clair que le système endocannabinoïde intervient dans la régulation de fonctions physiologiques et physiopathologiques très variées, en exerçant des effets bénéfiques ou nuisibles, probablement produits selon leur localisation (Miller & Devi, 2011). Ainsi, il serait intéressant de pouvoir moduler de façon positive ou négative les concentrations locales de certains endocannabinoïdes et d'observer quels sont les effets produits. En effet, tout dépendamment des situations, il n'est pas clair si les altérations du système endocannabinoïde participent au développement de pathologies précises ou si elles sont une réponse physiologique compensatoire tentant de rétablir l'homéostasie (Starowicz & Di Marzo, 2013). Dans notre cas, nous évaluerons si les endocannabinoïdes administrés de façon exogène possèdent des propriétés antinociceptives dans des contextes bien établis de douleurs inflammatoire et neuropathique, dans lesquels l'expression des récepteurs cannabinoïdes ainsi que les concentrations d'endocannabinoïdes sont modifiées.

2.6 Les ligands synthétiques

Suite à l'identification et au clonage des récepteurs cannabinoïdes, des cannabinoïdes synthétiques ont été développés. Ces composés sont généralement plus hydrophiles et plus efficaces que le Δ^9 -THC. Plusieurs agonistes synthétiques non sélectifs ont été développés ainsi que des agonistes sélectifs pour les deux types de récepteurs CB₁ et CB₂ (Tableau III). Ils présentent tous des sélectivités plus ou moins importantes pour chaque sous-type de récepteurs, bien que ces sélectivités soient fréquemment remises en question dans la littérature. Il est important de considérer le fait que des agonistes et antagonistes sélectifs pour un récepteur peuvent altérer de façon différente le couplage à des voies de signalisation distinctes, un concept connu sous le nom de *sélectivité fonctionnelle* (Urban et coll., 2007). Ce concept doit être considéré lorsque l'on compare les études pharmacologiques qui utilisent différents agonistes et antagonistes puisqu'il peut y avoir activation de différentes voies de signalisation, présence de réponses physiologiques différentes voire opposées et implication d'autres cibles dans les effets de ces composés (Urban et coll., 2007; Atwood & Mackie, 2010). Quelques antagonistes sélectifs (certains qualifiés d'agonistes inverses) pour chacun des récepteurs cannabinoïdes ont également été développés afin d'étudier l'implication spécifique des deux récepteurs dans plusieurs processus physiologiques.

Des travaux récents ont également permis de développer des agonistes des récepteurs CB₁ périphériques, c'est-à-dire restreints à la périphérie de par leur pénétration limitée dans le système nerveux central (Yu et coll., 2010). L'administration systémique de ces agonistes, tels que l'AZ11713908, produit des effets analgésiques robustes dans des modèles de douleurs inflammatoire et neuropathique. Ces effets sont comparables à ceux du WIN55,212-2 (agoniste non sélectif), mais son profil d'effets indésirables est nettement amélioré.

	Récepteurs cannabinoïdes	
	CB ₁	CB ₂
Agonistes non sélectifs	WIN55,212-2 CP55,940 HU-210 Δ^9 -THC Nabilone , Dronabinol, Nabiximols SAB378	
Agonistes sélectifs	ACEA O-1812 ACPA Noladin éther Methanandamide AZ11713908*	AM1241 JWH-015** JWH-133 GW405833 HU-308 L-759633 L-759656 MT178 GW833972A MDA7 A-796260 A-836339
Antagonistes sélectifs***	AM251 AM281 SR141716A LY320135	AM630 SR144528

Tableau III. Résumé des principaux ligands des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂.

*L'AZ11713908 est un agoniste sélectif pour les récepteurs CB₁ périphériques. **Bien que considéré comme un agoniste sélectif pour les récepteurs CB₂, le JWH-015 a récemment montré une action *via* les récepteurs GPR55. ***Certains antagonistes se sont comportés comme des agonistes inverses dans plusieurs études. Tableau modifié d'après (McDougall 2011).

2.7 Invalidation des gènes des récepteurs cannabinoïdes

Les souris génétiquement modifiées, présentant des mutations sélectives sur certaines composantes du système (récepteurs, enzymes de synthèse ou de dégradation) endocannabinoïde, ont été largement utilisées afin d'étudier l'implication de ce système dans la modulation de la douleur. La suppression constitutive d'un gène encodant une composante précise du système endocannabinoïde a mené à des progrès importants dans l'identification de la contribution spécifique de chacune des composantes de ce système dans

la perception des stimuli douloureux. Avec l'avènement des techniques de mutagenèse conditionnelle permettant la suppression spécifique de gènes dans des types cellulaires particuliers, il a été possible d'étudier la participation des différentes populations neuronales dans les réponses aux cannabinoïdes. Le comportement nociceptif des différentes lignées de souris génétiquement modifiées pour les récepteurs cannabinoïdes (*cnr1KO*, *cnr2KO*, *GPR55KO*) et pour les principales enzymes de dégradation des endocannabinoïdes a par conséquent été évalué dans une grande variété de modèles de douleur. L'utilisation de souris *knock-out* permet en partie d'éviter les problèmes liés à la sélectivité des différents antagonistes. Une évaluation des outils pharmacologiques et génétiques utilisés dans nos différentes études sera présentée dans la deuxième section de la discussion.

2.7.1 Souris *cnr1KO*

Le gène encodant le récepteur humain CB₁ a été identifié dans la région q14-q15 du chromosome 6 (Hoehe et coll., 1991). Les différentes espèces étudiées jusqu'à présent possèdent une séquence similaire (Pertwee, 1997). De ce fait, le récepteur CB₁ humain partage une homologie de séquence de 97,3 % avec le récepteur CB₁ murin pour l'ensemble de la protéine et de 100 % pour la région transmembranaire (Gerard et coll., 1991). Le développement de lignées de souris génétiquement modifiées chez lesquelles l'expression du récepteur CB₁ a été éliminée de façon constitutive (*cnr1KO*) a montré que les réponses spontanées à différents stimuli nociceptifs (stimuli thermiques, mécaniques et chimiques) étaient similaires à ceux des souris de type sauvage (Ledent et coll., 1999; Valverde et coll., 2000a). Ces résultats suggèrent que l'activation endogène du récepteur CB₁ n'est pas cruciale pour le contrôle de ces réponses dans des conditions basales. Une autre étude a cependant montré que les souris *cnr1KO* montraient une activité motrice réduite (également démontré par Steiner et coll., 1999), une catalepsie accrue ainsi qu'une hypoalgésie lors des tests à la formaline et de la plaque chauffante (Zimmer et coll., 1999). D'autres études ont rapporté une sensibilité normale aux stimuli thermiques, mais une sensibilité mécanique accrue chez ces souris (Ibrahim et coll., 2003). Ces différences sont probablement dues à l'arrière-plan

génétique propre à chacune des lignées de souris (CD1, C57BL/6J et 129/SvJ) ainsi qu'aux diverses conditions expérimentales. Toujours chez la souris, l'expression diminuée de façon transitoire de récepteurs CB₁ (*knock-down*) dans la moelle épinière a provoqué une augmentation des effets nociceptifs en réponse à des stimuli tactiles et thermiques (Richardson et coll., 1998b; Dogrul et coll., 2002), suggérant une modulation tonique de la douleur au niveau spinal induite par le système endocannabinoïde.

De nombreuses lignées de souris chez lesquelles le gène encodant le récepteur CB₁ a été invalidé par mutagénèse conditionnelle² ont été utilisées afin d'étudier l'implication spécifique de ces récepteurs (Kuhn et coll., 1995; Monory et coll., 2007). Grâce à cette technique de mutations conditionnelles, il a été démontré que les récepteurs CB₁ localisés au niveau périphérique jouent un rôle primordial dans la modulation de la douleur. Bien que le système nerveux central soit impliqué dans les effets antinociceptifs induits suite à l'activation du récepteur CB₁, une étude utilisant des souris génétiquement modifiées possédant une délétion conditionnelle du gène du récepteur CB₁ exclusivement dans les nocicepteurs périphériques (SNS-*cnr1KO*) a démontré l'implication majeure de ce récepteur dans le contrôle de la douleur au niveau périphérique (Agarwal et coll., 2007). En effet, ces souris mutantes dépourvues de récepteurs CB₁ uniquement dans les neurones sensitifs (ceux exprimant les canaux sodiques Na_v1.8) ont montré une sensibilité accrue face à la douleur causée par des stimuli thermique et mécanique.

2.7.2 Souris *cnr2KO*

Contrairement aux récepteurs CB₁, le rôle physiologique des récepteurs CB₂ est moins bien compris. Alors que l'on observe de nombreux effets provoqués par l'invalidation du gène encodant les récepteurs CB₁ (souris *cnr1KO*), les conséquences chez les souris *cnr2KO*

² La mutagénèse conditionnelle représente une nouvelle approche d'analyse fonctionnelle du génome. Grâce à l'utilisation du système de recombinaison Cre/loxP ainsi que des souris transgéniques exprimant l'enzyme Cre recombinase dans des tissus spécifiques, il est possible d'obtenir des souris présentant des mutations sélectives sur certaines composantes du système endocannabinoïde (ex. récepteurs CB₁ exprimés sur les nocicepteurs) afin d'étudier l'implication précise de cette composante dans la modulation de la douleur.

sont plus subtiles, entraînant principalement de faibles perturbations du système immunitaire (Buckley et coll., 2000; Buckley, 2008).

La première souche de souris génétiquement modifiées chez lesquelles l'expression du récepteur CB₂ a été éliminée de façon constitutive a été créée afin de réaliser des tests sur les effets immunomodulateurs des cannabinoïdes (Buckley et coll., 2000). Dans cette étude, il a été démontré que le Δ^9 -THC inhibe l'activation des cellules T par l'intermédiaire des macrophages chez les souris normales, mais pas chez les souris *cnr2KO*, confirmant le rôle immunomodulateur des récepteurs CB₂. Les effets centraux des cannabinoïdes étaient par contre préservés chez ces souris (Buckley et coll., 2000). Une autre étude a montré que les réponses nociceptives basales ne sont pas modifiées dans des tests de douleur thermique et mécanique chez les souris *cnr2KO* (Ibrahim et coll., 2006; Racz et coll., 2008). De façon similaire, aucun changement dans les réponses nociceptives basales n'a été révélé chez des souris transgéniques surexprimant les récepteurs CB₂ au niveau du système nerveux central (Racz et coll., 2008). Les réponses de base face aux stimuli thermiques dans le test plantaire ont toutefois été renforcées chez les souris *cnr2KO*, ce qui suggère que les récepteurs CB₂ modulent ce seuil thermique (Ibrahim et coll., 2006). Dans cette même étude, les effets des agonistes cannabinoïdes AM1241 (CB₂) et WIN55-212, 2 (CB₁/CB₂) dans la nociception thermique étaient respectivement absents ou réduits chez les souris *cnr2KO*.

L'utilisation unique de souris *knock-out* présente par contre des inconvénients, tels que la possibilité de changements compensatoires, une hypoalgésie dans certains tests, une susceptibilité génétique différente selon les modalités de douleur testées, etc. L'utilisation unique d'antagoniste présente par ailleurs également quelques inconvénients, tels que la sélectivité fonctionnelle des antagonistes, la présence d'effets hors-cibles, etc. Ainsi, une des manières de remédier à ces problèmes serait de combiner ces approches pharmacologiques et génétiques afin de préserver uniquement leurs avantages respectifs.

2.8 Autres récepteurs cannabinoïdes

Les composés cannabinoïdes produisent des réponses pharmacologiques qui ne sont pas induites uniquement *via* les récepteurs CB₁ ou CB₂, renforçant l'hypothèse que d'autres récepteurs sont impliqués dans les actions des cannabinoïdes (Begg et coll., 2005). En effet, il a été démontré que la liaison d'agonistes cannabinoïdes (anandamide et WIN55,212-2) dans des cerveaux de souris *cnr1KO* était toujours présente (Breivogel et coll., 2001; Monory et coll., 2002), que certains composés endocannabinoïdes étaient « orphelins » et finalement que le Δ^9 -THC, le cannabinoïde ou l'HU-210 (agoniste non sélectif) produisaient des effets *via* l'activation de lymphocytes et de splénocytes chez des souris *cnr1/cnr2KO* (Brown et al., 2007). De plus en plus de données supportent l'existence d'autres récepteurs auxquels peuvent se lier les cannabinoïdes; les plus étudiés sont les récepteurs GPR55 (Baker et al., 2006), les récepteurs PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) (Burstein, 2005) ainsi que des récepteurs ionotropes (Jordt et coll., 2004).

2.8.1 Récepteurs GPR55

Les récepteurs GPR55 sont exprimés dans les organes périphériques, tels que la rate ainsi que dans plusieurs régions du cerveau telles que l'hippocampe, le thalamus, le cortex frontal, le cervelet, le striatum, l'hypothalamus et le tronc cérébral. Ces récepteurs ne sont pas couplés aux protéines G_{i/o}, mais plutôt aux protéines G₁₃ et indirectement par l'intermédiaire de petites protéines G monomériques de la famille Ras (Ryberg et coll., 2007). Bien qu'ils présentent une faible homologie de structure avec les récepteurs CB₁ et CB₂, les récepteurs GPR55 ont des sites de liaison de haute affinité pour les endocannabinoïdes, les cannabinoïdes synthétiques et les antagonistes CB₁ (Brown, 2007). Il a été démontré que les récepteurs GPR55 peuvent être activés par des composés cannabinoïdes endogènes (anandamide, 2-AG, noladin éther) (Di Marzo et coll., 2000) et synthétiques (Δ^9 -THC, HU210, CP 55,940) (Pertwee, 2007; Ryberg et coll., 2007). Il est donc difficile de déterminer si les mécanismes d'action qui sous-tendent les effets de l'anandamide et du 2-AG sont reliés

uniquement à l'activation des récepteurs CB₁ et CB₂. Le WIN55,212-2 (agoniste cannabinoïde non sélectif) peut cependant être utilisé à titre comparatif puisqu'il ne se lie pas aux récepteurs GPR55 (voir Article 3). Une autre étude utilisant des cellules en culture (HEK293) surexprimant le récepteur GPR55 a montré qu'elles répondent à différents cannabinoïdes par une augmentation de calcium intracellulaire suite à l'activation de ce dernier (Lauckner et coll., 2008). Ce récepteur pourrait également jouer un rôle pro-nociceptif puisque son activation inhibe les canaux potassiques de type M (Lauckner et coll., 2008). En somme, la liaison de divers cannabinoïdes (phytocannabinoïdes, endocannabinoïdes ou cannabinoïdes synthétiques) aux récepteurs GPR55 semble dépendre du type cellulaire et du tissu étudié. De ce fait, sa classification en tant que récepteur cannabinoïde est problématique et il est actuellement considéré comme un récepteur cannabinoïde « atypique » (Sharir & Abood, 2010).

La création de souris dépourvues de ce récepteur (GPR55KO) a fourni un outil utile pour étudier son rôle dans la gestion de la douleur. Il a été démontré que les souris GPR55KO ne développent pas d'hyperalgésie mécanique suite à l'injection intraplantaire de l'adjuvant complet de Freund (CFA) ou suite à la ligature partielle du nerf sciatique (PSNL), et que leur seuil de perception mécanique n'est pas altéré (Staton et coll., 2008). Dans le modèle CFA, les manifestations comportementales ont été corrélées avec les niveaux de cytokines accrus dans la patte des souris GPR55KO, suggérant que la signalisation *via* le récepteur GPR55 influence la régulation des cytokines et contribue à l'absence de douleur inflammatoire chez ces souris (Staton et coll., 2008). Ces résultats confirment l'intérêt du GPR55 en tant que cible potentielle pour le développement de nouveaux composés pour le traitement des douleurs inflammatoire et/ou neuropathique. Par ailleurs, le statut d'autres récepteurs, tels que les récepteurs GPR35 et GPR119, en tant que récepteurs cannabinoïdes est de plus en plus accepté (Zhao & Abood, 2013).

2.8.2 Récepteurs PPARs

Les récepteurs PPARs sont des récepteurs nucléaires favorisant la transcription de protéines impliquées dans la modulation de l'inflammation (Sun et coll., 2006). Il a été démontré que les cannabinoïdes agissent sur ces récepteurs comme par exemple le palmitoylethanolamide (PEA) qui induit ses effets anti-inflammatoires *via* ce mécanisme d'action (Lo Verme et coll., 2005a). L'implication des différents sous-types des récepteurs PPARs (α, γ, δ) dans les mécanismes d'action de plusieurs composés cannabinoïdes a été étudiée et revue (O'Sullivan, 2007).

2.8.3 Récepteurs ionotropes

Plusieurs composés cannabinoïdes activent et désensibilisent des récepteurs ionotropes de la famille des TRP (ex: TRPV1, TRPA1), jouant un rôle important dans le contrôle de l'hyperalgésie dans des modèles de douleur inflammatoire. Il a notamment été démontré que les effets antinociceptifs périphériques induits par des injections de WIN55,212-2 (agoniste non sélectif) ou d'AM1241 (agoniste CB₂) sont altérés chez des souris dont les gènes encodant le récepteur TRPA1 sont invalidés (TRPA1KO). Cette étude prouve que certains cannabinoïdes exercent leurs effets antinociceptifs périphériques *via* l'activation de la voie TRPA1, plus précisément sur les neurones sensitifs (Akopian et coll., 2008), et ce *via* différents mécanismes (Kress & Kuner, 2009).

2.9 Les cannabinoïdes endogènes

Par définition, un cannabinoïde endogène ou endocannabinoïde est une molécule capable de se lier à un récepteur cannabinoïde et d'activer les voies de signalisation couplées à ce récepteur; elle possède donc des propriétés cannabinoïdiques (Di Marzo, 1998; Di Marzo et coll., 2002b). L'identification des endocannabinoïdes et de leurs effets pharmacologiques est plus récente que celle des phytocannabinoïdes. Comme les cannabinoïdes exogènes, les endocannabinoïdes sont des substances très lipophiles.

Pourtant, il ne s'agit pas de molécules aromatiques cycliques, mais d'une famille d'eicosanoïdes, dérivés d'un acide gras polyinsaturé, l'acide arachidonique, qui est aussi le précurseur des prostaglandines et des leucotriènes, médiateurs importants des phénomènes inflammatoires.

Les deux principaux endocannabinoïdes sont la *N*-arachidonoyléthanolamine (anandamide), un agoniste des récepteurs CB₁, et le 2-arachidonyl glycérol (2-AG), un agoniste des récepteurs CB₁ et CB₂. L'anandamide et le 2-AG sont produits à partir des phospholipides membranaires *via* différentes voies de biosynthèse en réponse à une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire. Les endocannabinoïdes ne sont pas des neurotransmetteurs classiques; leur synthèse et leur métabolisme suggèrent plutôt un rôle comme neuromodulateurs puisqu'ils sont synthétisés «à la demande» (Di Marzo & Deutsch, 1998) et qu'ils ne sont pas stockés dans des vésicules synaptiques de par leur nature lipidique. Les endocannabinoïdes agissent de façon rétrograde au niveau synaptique pour inhiber la libération de neurotransmetteurs, tels que le glutamate, le GABA, la glycine, la noradrénaline, la sérotonine, l'acétylcholine et de nombreux neuropeptides (Wilson & Nicoll, 2002). La synthèse, la relâche, la recapture, l'action des endocannabinoïdes sur leurs récepteurs et leur hydrolyse sont résumées dans cette section.

Outre l'anandamide et le 2-AG, plusieurs autres eicosanoïdes conformes aux critères de classification ont été identifiés : le *N*-docosatétranoïl-éthanolamine et le *N*-di-homo- γ -linolénoïl-éthanolamine, l'oléoyléthanolamide (OEA), le 2-arachidonylglycéryl éther (noladin éther), le *N*-arachidonyldopamine (NADA), la virodhamine, etc. Le palmitoyléthanolamide (PEA) représente un autre acide gras composé d'une longue chaîne aux propriétés cannabinoïdes, mais qui ne se lie pas avec une grande affinité aux récepteurs cannabinoïdes connus.

2.9.1 *Anandamide*

L'anandamide est le premier ligand endogène à avoir été identifié (Devane et coll., 1992). Il possède une affinité modeste pour les récepteurs CB₁ (K_i = 89 nM) (Di Marzo et coll., 2001; Palmer et coll., 2002). Par ailleurs, des arguments ont été présentés en faveur de la liaison de l'anandamide aux récepteurs CB₂ (K_i = 371 nM) même si le composé n'évoque pas de manière significative les effets qui sont dépendants de ces récepteurs (Zygmunt et coll., 1999; Di Marzo et coll., 2001). Des données plus récentes suggèrent qu'il interagit également directement avec d'autres cibles moléculaires (voir Section II, 2.8) (Venance et coll., 1995; Sagan et coll., 1999; Di Marzo et coll., 2000; Szoke et coll., 2000).

2.9.1.1 *Biosynthèse de l'anandamide*

L'anandamide est formé à partir de phospholipides membranaires tels que la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine. À la base, une dépolarisation postsynaptique ainsi qu'une entrée de calcium intracellulaire permettent d'initier sa biosynthèse; ces mécanismes sont toutefois encore peu élucidés (Di Marzo, 2011). L'AMP cyclique et le calcium modulent l'activité de la *N*-acyltransférase (NAT) et ainsi contrôlent la quantité de substrat disponible pour la synthèse de l'anandamide (Cadas et coll., 1996). La synthèse de l'anandamide peut également être déclenchée par la stimulation des récepteurs dopaminergiques D₂, muscariniques M₁/M₃, ainsi que glutamatergiques mGluR₁ (Giuffrida et coll., 1999; Varma et coll., 2001; Kim et coll., 2002).

L'anandamide et son précurseur, la *N*-arachidonyl phosphatidyléthanolamine (PANE), sont normalement exprimés à de faibles concentrations dans le cerveau de rat et leur expression est augmentée de façon dépendante du calcium suite à de graves lésions neuronales (Sugiura et coll., 2000; Hansen et coll., 2001). Une biosynthèse de l'anandamide en deux étapes a d'abord été suggérée, et par la suite trois autres voies ont été proposées (Figure 9) (Liu et coll., 2008; Simon & Cravatt, 2008; Luchicchi & Pistis, 2012). La voie de synthèse principale de l'anandamide implique l'action séquentielle d'une *N*-acyltransférase

(NAT) dépendante du calcium, qui convertit la PANE en *N*-acyl phosphatidyléthanolamine (NAPE), et d'une phospholipase D (PLD) qui transforme cette dernière en anandamide (Natarajan et coll., 1983; Di Marzo et coll., 1994; Cadas et coll., 1997). L'implication d'une phospholipase D sélective pour la NAPE (NAPE-PLD) a également été démontrée et permet d'hydrolyser la *N*-arachidonyl phosphatidyléthanolamine (NARPE) en anandamide *in vitro* (Okamoto et coll., 2004).

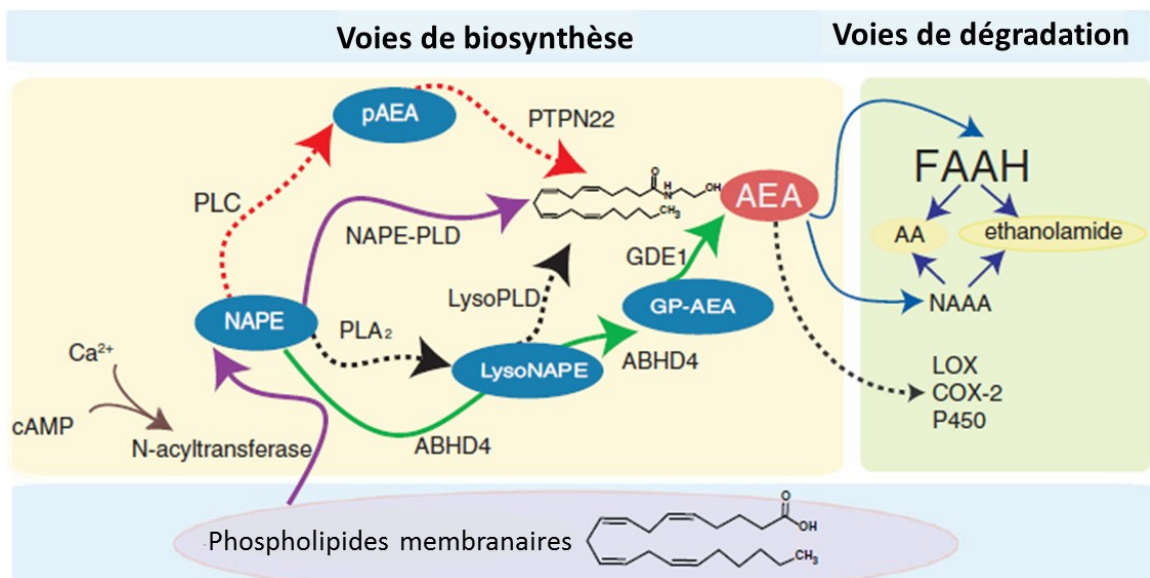


Figure 9. Principales voies de la biosynthèse et de la dégradation de l'anandamide. AA : acide arachidonique; ABHD4 : α - β -hydrolase domain 4; AEA : anandamide; cAMP : adénosine monophosphate cyclique; COX-2 : cyclo-oxygénase-2; GDE₁ : *glycerolphosphodiesterase 1*; GP-AEA : glycerol-phosphoanandamide; FAAH : amide hydrolase des acides gras; LOX : lipoxygénase; LysoNAPE : *lyso Nacyl phosphatidylethanolamine*; LysoPLD : *lyso phospholipase D*; NAAA : *N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase*; NAPE : *N-arachidonyl-phosphatidylethanolamine*; NAPE-PLD : *N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D*; P450 : cytochromes P450; pAEA : phosphoanandamide; PLA₂ : phospholipase 2; PLC : phospholipase C; PTPN22 : *protein tyrosine phosphatase N22*. Figure modifiée d'après (Luchicchi & Pistis, 2012).

2.9.1.2 Transporteur de l'anandamide

Suite à leur synthèse, les endocannabinoïdes sont libérés dans le milieu extracellulaire, vraisemblablement *via* un transporteur transmembranaire qui n'a pas encore été identifié. Il semble néanmoins que la recapture se produise *via* un transport très rapide (Gerdeman et coll., 2002; Ronesi et coll., 2004) puisque les endocannabinoïdes présents dans la fente synaptique sont presque immédiatement inactivés (Di Marzo & Petrosino, 2007). Quatre mécanismes sont actuellement proposés pour tenter d'expliquer la recapture des endocannabinoïdes : (1) une protéine transmembranaire; (2) une diffusion passive à travers la bicouche lipidique, induite par une amidohydrolase des acides gras (FAAH); (3) la création de cavéoles possédant des sites de liaison pour l'anandamide, ainsi que; (4) la séquestration intracellulaire dans une forme d'enveloppe lipidique (pour une revue récente, voir (Yates & Barker, 2009)). Le transporteur de l'anandamide serait bloqué par différents inhibiteurs dont l'AM404 et l'arvanil (Palmer et coll., 2002). Ce transporteur membranaire hypothétique, capable de transporter autant l'anandamide que le 2-AG, jouerait aussi un rôle dans la recapture des endocannabinoïdes en vue de leur dégradation (Beltramo et coll., 1997; Hillard et coll., 1997). Ce transporteur pourrait ainsi conduire l'anandamide dans des compartiments intracellulaires où est localisée son enzyme de dégradation, la FAAH (Gulyas et coll., 2004). D'autres études ont examiné le rôle des protéines de liaison des acides gras FABPs (*fatty acid binding proteins*) en tant que transporteurs potentiels pour l'anandamide au niveau intracellulaire. Elles suggèrent que les FABPs sont les premières protéines reconnues pour le transport de l'anandamide de la membrane plasmique vers la FAAH (Kaczocha et coll., 2009). Il a récemment été démontré qu'une variante de la FAAH, la «*FAAH-like*» (FLAT), peut se lier à l'anandamide avec une affinité similaire mais sans activité enzymatique, pour faciliter le transfert de l'anandamide dans les cellules (Fu et coll., 2012), pour une revue récente voir (Fowler, 2012).

2.9.1.3 Dégradation de l'anandamide

Une fois absorbée par les cellules, l'anandamide est principalement métabolisée en acide arachidonique et en éthanolamine par l'enzyme FAAH (Figure 9) (Cravatt et coll., 1996; Cravatt et coll., 2001). Cette enzyme est fortement exprimée par les neurones dans le cerveau des mammifères, principalement au niveau postsynaptique sur le réticulum endoplasmique, et elle peut être régulée à la hausse suite à une lésion neuronale (Zhang et coll., 2003; Wotherspoon et coll., 2005). Elle est également localisée dans l'hippocampe, le néocortex et le cervelet (Egertova et coll., 1998; Ahn et coll., 2008) ainsi que le long des voies de la douleur, plus spécifiquement dans les ganglions de la racine dorsale, le nerf sciatique et la moelle épinière (Lever et coll., 2009). La FAAH catalyse également l'hydrolyse de plusieurs autres endocannabinoïdes tels que le 2-AG (Bisogno et coll., 2005), l'oléoyléthanolamide ainsi que le palmitoyléthanolamide (Karbarz et coll., 2009). Une autre enzyme de dégradation de l'anandamide a été décrite, la NAAA ou *N*-acyléthanolamine acide amide hydrolase, qui régule aussi le métabolisme du palmitoyléthanolamide (Ueda et coll., 2010). L'anandamide possède une très courte demi-vie. Chez la souris, elle est éliminée en moins d'une demi-heure au niveau cérébral et plasmatique (Willoughby et coll., 1997). Le métabolisme rapide de l'anandamide joue un rôle important dans la durée de l'activité pharmacologique de ce composé naturel liant les récepteurs cannabinoïdes et fait en sorte que l'anandamide exogène est rapidement éliminée.

En théorie, l'administration d'inhibiteurs de la FAAH permet d'augmenter les niveaux locaux d'anandamide et d'activer localement les récepteurs CB₁ afin de produire des effets analgésiques. Il faut tenir compte par contre du fait que son inhibition augmente probablement aussi les concentrations d'autres cannabinoïdes tels que le 2-AG, l'oléoyléthanolamide et le palmitoyléthanolamide, qui pourraient alors agir de façon synergique.

La FAAH est considérée comme une cible thérapeutique pertinente, en particulier dans des modèles de douleur inflammatoire (Bisogno & Maccarrone, 2013). La possibilité d'augmenter sélectivement le tonus endocannabinoïde dans les tissus où une telle

amélioration serait bénéfique se traduirait par un bénéfice thérapeutique relié à des effets secondaires plus limités par rapport à l'utilisation d'agonistes directs des récepteurs CB₁. Ainsi, la recherche d'inhibiteurs sélectifs pour la FAAH gagne en popularité dans la découverte de médicaments. Plusieurs classes d'inhibiteurs ont été rapportées jusqu'ici, pouvant être classées en deux grandes catégories: les réversibles et les irréversibles (Tableau IV). Ces inhibiteurs présentent des activités ainsi que des sélectivités différentes pour la FAAH. Ces dernières années, des efforts considérables ont été déployés pour développer de nouveaux inhibiteurs de la FAAH, pour une revue récente voir (Bisogno & Maccarrone, 2013).

Les différents inhibiteurs spécifiques pour la FAAH sont classés comme des composés réversibles ou irréversibles en fonction de leur demi-vie à l'intérieur du site catalytique de l'enzyme (Fegley et coll., 2005; Ahn et coll., 2008). Une première avancée dans l'inhibition de la FAAH a permis le développement d'inhibiteurs spécifiques tels que l'OL-135 (Boger et coll., 2005) ainsi que l'URB597 (Kathuria et coll., 2003). L'URB597 est actuellement considéré comme la référence parmi les différents inhibiteurs de la FAAH (Kathuria et coll., 2003), bien que d'autres inhibiteurs soient disponibles (Ahn et coll., 2008; Guindon & Hohmann, 2009). Une nouvelle famille d'inhibiteurs irréversibles de la FAAH incluant le JNJ-1661010, le PF-750 et le PF-04457845, possède une efficacité accrue (Mileni et coll., 2008; Mileni et coll., 2010).

	Réversibles	Irréversibles
Principaux inhibiteurs de la FAAH	OL-135 ST4070 Rofécoxib Ibuprofène	URB597 URB937* PF-3845 PF-04457845 JNJ-1661010 PF-750 VER-156084 AM3506
Doubles inhibiteurs de la FAAH et de la MAGL	MAFP	JZL195 SA-57

Tableau IV. Principaux inhibiteurs de la FAAH. *L'URB937 est un inhibiteur de la FAAH restreint à la périphérie de par sa pénétration limitée au niveau du système nerveux central.

Le rôle primordial joué par la FAAH dans la régulation de la signalisation de l'anandamide *in vivo* a été confirmé chez les souris dont le gène encodant la FAAH a été invalidé (FAAHKO) (Cravatt et coll., 2001). Les souris FAAHKO ont des niveaux élevés d'anandamide et d'autres amides d'acides gras dans différentes régions du cerveau et de la moelle épinière puisque leur dégradation est altérée (Clement et coll., 2003; Cravatt & Lichtman, 2004). Ceci est en corrélation avec le fait que ces souris réagissent moins fortement à la douleur dans différents modèles nociceptifs (revue dans (Cravatt & Lichtman, 2004). Ces résultats suggèrent donc que la FAAH est un élément essentiel dans la modulation endogène de l'anandamide en ce qui concerne ses niveaux endogènes qui réduisent la perception des sensations douloureuses (Cravatt & Lichtman, 2003).

Les récepteurs cannabinoïdes périphériques exercent un contrôle inhibiteur puissant sur l'initiation de la douleur, mais le signal endocannabinoïde qui engage normalement ce mécanisme intrinsèque analgésique est inconnu. Pour répondre à cette question, un groupe de chercheurs a utilisé un inhibiteur sélectif de la FAAH restreint à la périphérie, l'URB937 (Clapper et coll., 2010). Cet inhibiteur a efficacement inhibé l'activité de la FAAH et augmenté les niveaux d'anandamide à l'extérieur du système nerveux central chez les rongeurs. En dépit de son incapacité à accéder au cerveau et à la moelle épinière, l'URB937 a diminué les réponses comportementales dans des modèles de douleur inflammatoire et neuropathique, par l'intermédiaire des récepteurs CB₁ (Clapper et coll., 2010). Ces résultats suggèrent que l'anandamide induit ses effets antinociceptifs *via* l'activation des récepteurs CB₁ périphériques.

Il existe également des preuves du métabolisme oxydatif des endocannabinoïdes par les cyclo-oxygénases (COX), les lipoxygénases (LOX) et les cytochromes P450 (Kozak & Marnett, 2002; van der Stelt et coll., 2002; Vandevorde & Lambert, 2007) suggérant une interaction entre les différentes voies métaboliques des eicosanoïdes (Figure 10). La COX-2 est responsable de l'oxydation de l'anandamide et du 2-AG en dérivés oxygénés des prostaglandines tels que, dans le cas de l'anandamide, la prostaglandine E2-éthanolamine et l'acide hydroxyeicosatétraénoïque (HETE)-éthanolamine (Burstein et coll., 2000; Woodward

et coll., 2008). Fait intéressant, certains de ces métabolites sont biologiquement actifs (Nomura et coll., 2011) et peuvent moduler la fonction synaptique. La biotransformation des cannabinoïdes doit être considérée de façon qualitative, et il faut désormais reconnaître que certains organes, tissus ou types cellulaires représentent des environnements biochimiques spéciaux qui peuvent influencer les effets spécifiques des endocannabinoïdes (Guindon & Hohmann, 2008b; Pamplona & Takahashi, 2012). Il faut ainsi cibler de façon très précise les tissus où l'on désire augmenter les concentrations d'endocannabinoïdes.

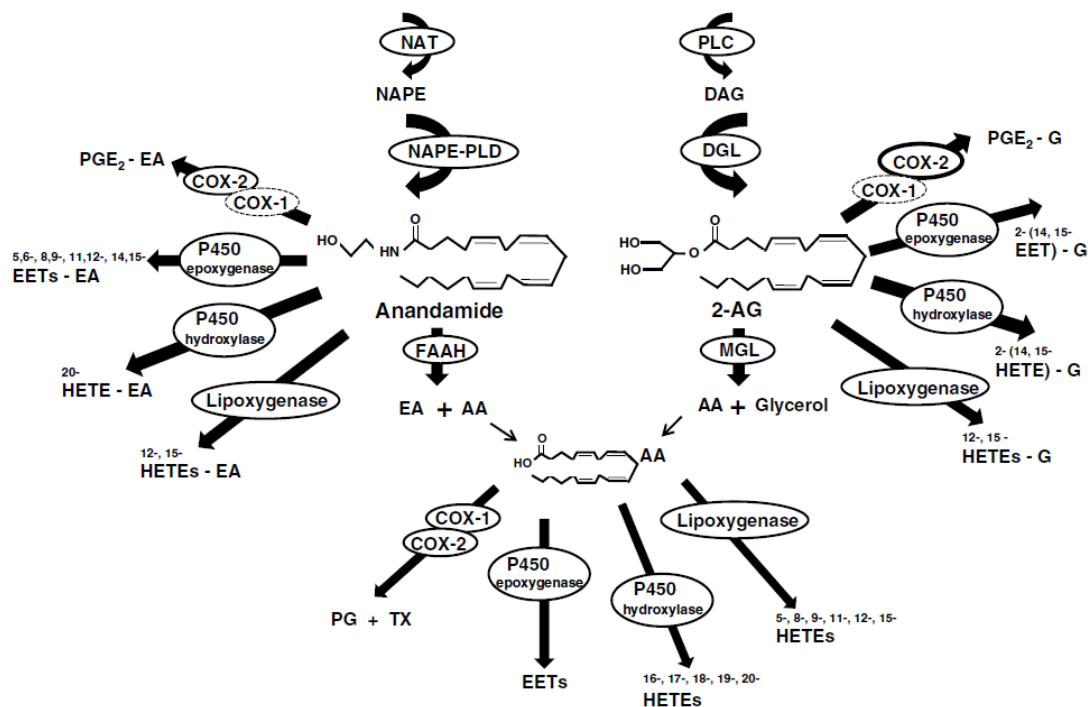


Figure 10. Les endocannabinoïdes tels que l'anandamide et le 2-AG sont métabolisés *via* plusieurs voies enzymatiques. L'enzyme monoacylglycérol lipase (MAGL) catalyse l'hydrolyse du 2-AG en acide arachidonique (AA) et en glycérol, alors que la FAAH catalyse celle de l'anandamide pour produire de l'acide arachidonique et de l'éthanolamine. La COX-2 et d'autres enzymes catalysent le métabolisme de ces mêmes endocannabinoïdes en divers composés oxygénés. COX-1 : cyclo-oxygénase-1; DAG : diacylglycérol; DGL : diacylglycérol lipase; EA : éthanolamine; EETs : acides époxyeicosatétraénoïques; FAAH : amidohydrolase des acides gras; G : ester de glycérol; HETE : acides hydroxyeicosatétraénoïques; NAPE : N-acyl phosphatidyléthanolamine; NAT : N-acyltransférase; P450 : cytochromes P450, PG : prostaglandines; PGE₂ : prostaglandine E₂; PLC : phospholipase C; PLD : phospholipase D; TX : thromboxanes. Figure modifiée d'après (Guindon & Hohmann, 2008b).

2.9.1.4 *Anandamide comme endovanilloïde*

Outre les récepteurs cannabinoïdes classiques CB₁ et CB₂, il y a des preuves croissantes montrant que l'anandamide participe à la signalisation cellulaire *via* d'autres récepteurs (Di Marzo et coll., 2000) tels que les récepteurs vanilloïdes de type TRPV1 (Tognetto et coll., 2001; Di Marzo, 2008) et les récepteurs nucléaires (par exemple, PPAR) (Sun & Bennett, 2007; Pistis & Melis, 2010). Ainsi, bien que l'anandamide soit principalement considérée comme un endocannabinoïde, elle est aussi un endovanilloïde, car elle peut agir sur les récepteurs TRPV1 sensibles à la capsaïcine, aux protons et à la chaleur (Caterina et coll., 1997; Di Marzo et coll., 2001; Piomelli, 2001; Di Marzo, 2010). Des études démontrent même que l'anandamide est un agoniste complet des récepteurs TRPV1 (Zygmunt et coll., 1999; Smart & Jerman, 2000), mais partiel des récepteurs CB₁.

Les récepteurs TRPV1 sont largement exprimés dans les neurones afférents primaires, où leur activation est modulée par la transmission synaptique associée à la sensation de douleur (Caterina & Julius, 2001). En plus de leur expression au niveau périphérique, les récepteurs TRPV1 ont été trouvés dans le système nerveux central où ils semblent réguler la fonction synaptique (Cristino et coll., 2006; Cristino et coll., 2008; Cavanaugh et coll., 2011). La capsaïcine et l'anandamide partagent le même site de liaison (Di Marzo et coll., 2002a), mais ce n'est qu'à des concentrations plus élevées (0,5 – 10 µM) que celles requises pour la capsaïcine (10-100 nM) que l'anandamide est capable d'activer les récepteurs vanilloïdes (Ross, 2003). L'activation de ces récepteurs engendre l'entrée de Ca²⁺ et la dépolarisation de la cellule qui libère le CGRP et la substance P causant une vasodilatation locale et une extravasation plasmatique (Di Marzo et coll., 2001). Ainsi, l'anandamide à fortes concentrations peut activer les récepteurs TRPV1 et ainsi induire des effets inverses de ceux obtenus suite à l'activation des récepteurs CB₁.

Précédemment, notre laboratoire a démontré que l'anandamide, ainsi que l'ibuprofène et le rofécoxib, des AINS classiques pouvant également inhiber la FAAH, produisent des effets analgésiques dans des modèles de douleur inflammatoire et neuropathique (Guindon et coll., 2006a; Guindon et coll., 2006b). Les effets antinociceptifs

induits par l'injection locale d'anandamide impliquaient l'activation des récepteurs CB₁, en accord avec des études précédentes (Calignano et coll., 1998; Richardson et coll., 1998c), bien qu'une étude récente montre plutôt une implication des récepteurs CB₁ et CB₂ (Schreiber et coll., 2012). Ainsi, il serait très intéressant d'évaluer le rôle du deuxième endocannabinoïde, le 2-AG, dans ce même contexte puisque son potentiel n'a pas encore été évalué.

2.9.2 2-arachidonyl glycérol (2-AG)

Le 2-AG est le deuxième ligand des récepteurs cannabinoïdes à avoir été identifié (Mechoulam et coll., 1995; Sugiura et coll., 1995). Il est le cannabinoïde endogène le plus abondant dans le système nerveux central, à des concentrations 170 fois supérieures à celles de l'anandamide (Sugiura et coll., 1996). Contrairement à l'anandamide, il est un agoniste complet pour les deux types de récepteurs cannabinoïdes avec de faibles affinités (CB₁ : Ki = 472 nM; CB₂ : Ki = 1400 nM) (Sugiura et coll., 1999; Sugiura et coll., 2000; Mackie, 2006; Di Marzo & Petrosino, 2007).

2.9.2.1 Biosynthèse du 2-AG

Tel que vu précédemment, les endocannabinoïdes sont produits à partir de phospholipides membranaires *via* différentes voies de biosynthèse. Les conditions favorisant la synthèse et la libération des endocannabinoïdes dans le cerveau ne sont pas encore complètement élucidées. Cependant, une dépolarisation neuronale, associée à une entrée de calcium dans le compartiment somatodendritique de la cellule semble être une situation propice à la production d'endocannabinoïdes (Llano et coll., 1991; Pitler & Alger, 1992).

La synthèse du 2-AG se produit par l'intermédiaire de deux étapes distinctes, impliquant l'action séquentielle d'une phospholipase C (PLC), qui transforme les phospholipides membranaires en un composé intermédiaire, le sn-1-acyl-2-arachidonylglycérol, puis d'une diacylglycérol lipase (DAGL), qui hydrolyse ce composé

intermédiaire en 2-AG (Figure 11) (Piomelli, 2003; Di Marzo et coll., 2004). Ces deux enzymes sont surtout localisées sur la membrane plasmique et dans les neurones postsynaptiques du système nerveux central (Bisogno et coll., 2003). Les niveaux de DAGL sont accrus suite à une lésion neuronale (Zhang et coll., 2003; Wotherspoon et coll., 2005). Deux isoformes de la DAGL ont été clonées : DAGL α et DAGL β (Bisogno et coll., 2003), dont l'expression cellulaire est étroitement associée à la biosynthèse ainsi qu'à la libération du 2-AG. Une voie alternative impliquant une phospholipase A1 ainsi qu'une lyso-phospholipase C est également proposée (Piomelli, 2003; Basavarajappa, 2007).

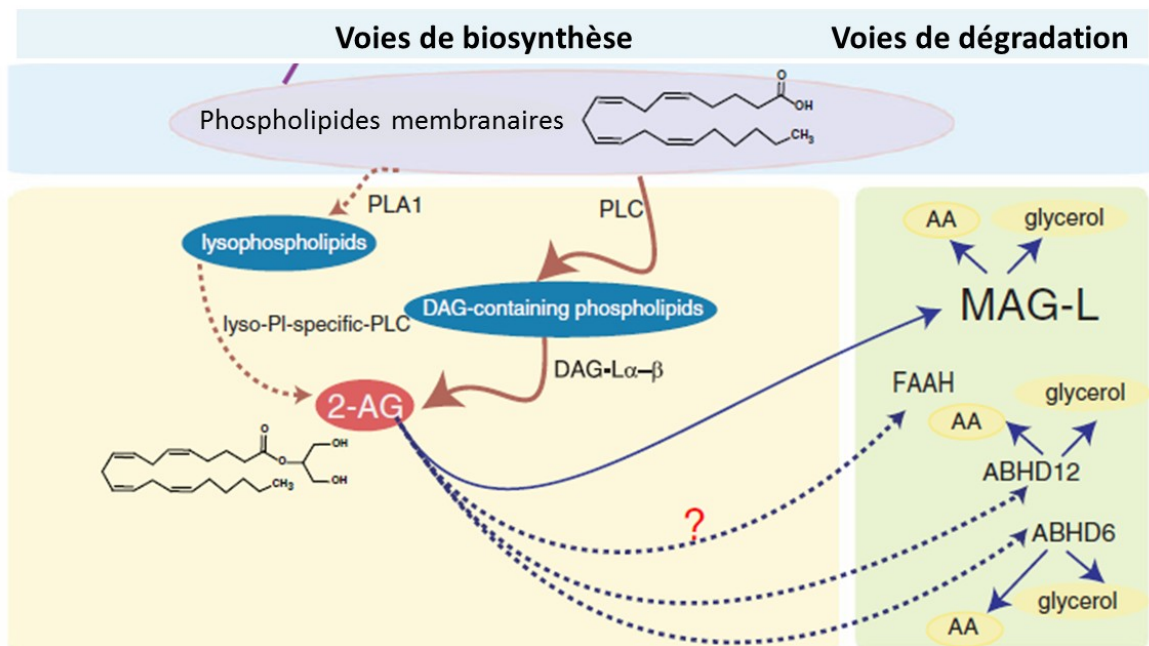


Figure 11. Principales voies de la biosynthèse et de la dégradation du 2-AG. AA : acide arachidonique; ABHD6 : α - β -hydrolase domain 6; ABHD12 : α - β -hydrolase domain 12; FAAH : amidohydrolase des acides gras; MAGL : monoacylglycérol lipase. Figure modifiée d'après (Luchicchi & Pistis, 2012).

Le 2-AG est synthétisé à la demande, principalement au niveau postsynaptique, et il agit comme un messenger synaptique modulant de façon rétrograde la libération d'une variété de neurotransmetteurs au niveau présynaptique (Figure 12) (Kreitzer & Regehr, 2001;

Ohno-Shosaku et coll., 2001; Wilson & Nicoll, 2001; Katona & Freund, 2008). Certaines données récentes suggèrent néanmoins qu'un « *pool* » d'endocannabinoïdes synthétisés peut exister sans l'exigence d'une synthèse « sur demande », ce qui complexifie la signalisation reconnue actuellement (Zhang et coll., 2011). Son rôle en tant que messenger synaptique agissant de façon rétrograde sera abordé plus en détails dans la Section II, 2.10.

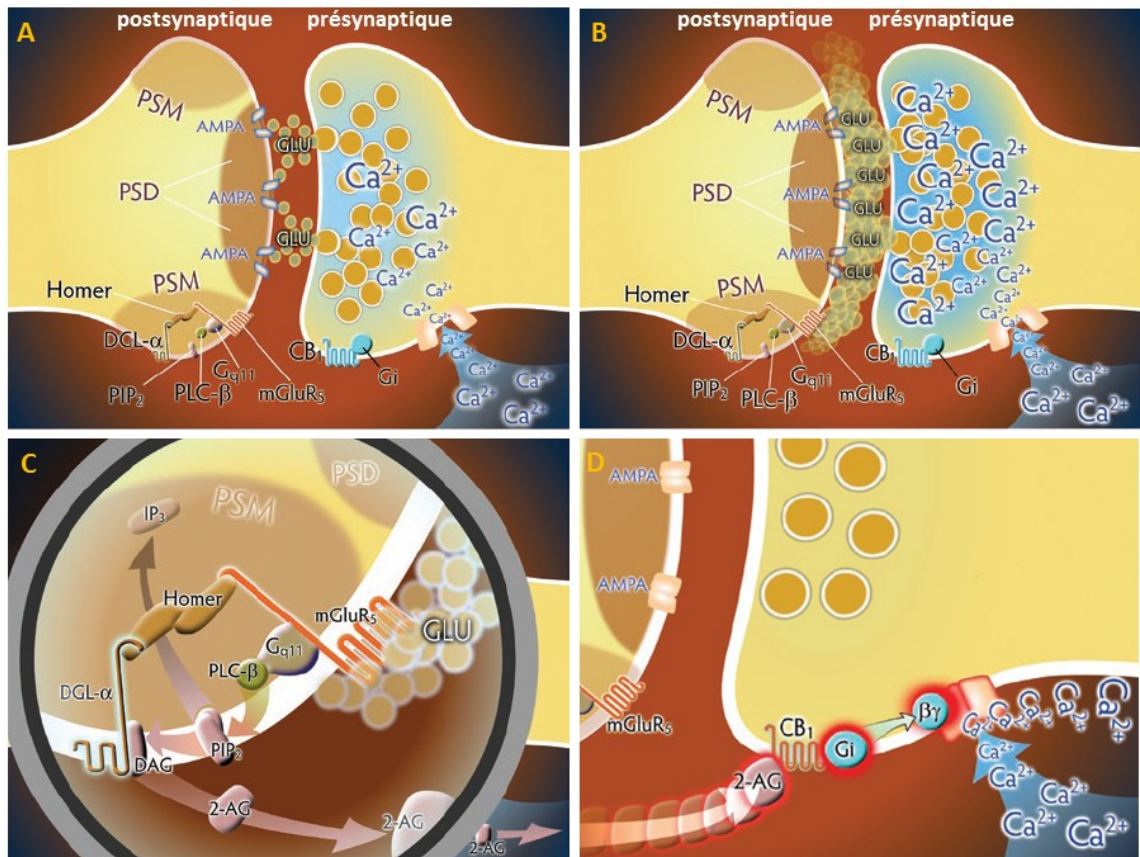


Figure 12. Synthèse du 2-AG et signalisation de façon rétrograde dans une synapse glutamatergique. (A) L'activité synaptique basale est associée à la relâche de glutamate dans la fente synaptique, déclenchée par l'activation des canaux calciques voltage-dépendants et l'entrée de calcium consécutives. Par la suite, le glutamate libéré ira activer des récepteurs AMPA localisés sur le neurone postsynaptique, mais aussi les récepteurs NMDA. (B) Dans le cas d'une activité présynaptique accrue (ex. décharges spontanées, représentée par des concentrations excessives de calcium dans la terminaison axonale), il y aura libération accrue de glutamate dans la fente synaptique, où il pourra alors activer des récepteurs mGluR5. (C) La transduction du signal commence par l'activation du récepteur mGluR5, qui déclenche l'activité enzymatique de la PLC- β par l'intermédiaire de la signalisation *via* la protéine G_{q11} . (D) Le 2-AG agit de façon rétrograde en se liant au récepteur CB_1 (couplé à G_i), ce qui inhibe l'entrée de calcium (Ca^{2+}) dans la terminaison axonale, réduisant ainsi la libération de glutamate.

La PLC- β assure le clivage des PIP2 en PIP3 et en diacylglycérol. Ce dernier est ensuite hydrolysé par l'enzyme de biosynthèse du 2-AG, la DGL- α pour produire du 2-AG. (D) Le 2-AG synthétisé au niveau postsynaptique sera relâché dans la fente synaptique et ira activer les récepteurs CB₁ présynaptiques, agissant ainsi comme un messenger synaptique de façon rétrograde. Lors de la liaison du 2-AG aux récepteurs CB₁, l'activation de ces récepteurs produira une suppression à court terme de la libération des neurotransmetteurs *via* la sous-unité $\beta\gamma$ de G_i et l'inhibition de canaux calciques voltage-dépendants, ce qui mènera à la diminution de l'excitabilité neuronale. GLU : glutamate; AMPA : récepteurs ionotropes α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole proprionic acid; NMDA : récepteurs ionotropes N-méthyl-D-aspartate; mGluR5 : récepteurs métabotropes du groupe 1; PLC- β : phospholipase C- β ; PIP2 : phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphates; PIP3 : phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphates; DAG : diacylglycérol; DGL- α : diacylglycérol lipase- α . Figure modifiée d'après (Katona & Freund, 2008).

L'existence de voies de biosynthèse différentes pour l'anandamide et le 2-AG suggère que ces deux endocannabinoïdes fonctionnent de façon indépendante. Bien que cela soit vrai dans plusieurs situations (Stella et coll., 1997; Stella & Piomelli, 2001), il y a des preuves récentes d'un mécanisme de partage de la biosynthèse entre ces endocannabinoïdes (Maccarrone, 2008).

2.9.2.2 Transporteur du 2-AG

Étant donné que les précurseurs et les enzymes de synthèse pour les endocannabinoïdes sont localisés sur la surface cellulaire, il semble raisonnable de penser que les endocannabinoïdes soient générés dans la membrane plasmique et libérés par diffusion passive ou facilitée par des protéines de liaison des lipides (Piomelli, 2003).

L'action des endocannabinoïdes est essentiellement terminée par un système de recapture qui est présent dans les deux neurones pré- et postsynaptique ainsi que dans les cellules gliales. La protéine qui régule cette recapture n'a pas encore été identifiée (Beltramo et coll., 1997; Hillard et coll., 1997). Le 2-AG diffuse rapidement dans les cellules sans toutefois qu'il y ait un consensus sur l'existence d'un transporteur permettant sa diffusion (Di

Marzo et coll., 1998; Di Marzo & Deutsch, 1998). Il existe néanmoins des preuves convaincantes que la recapture des endocannabinoïde est sélective, saturable, sensible à l'inhibition pharmacologique et entièrement partagée par l'anandamide et le 2-AG, suggérant l'existence d'une protéine qui fonctionne comme un transporteur endocannabinoïde (Di Marzo et coll., 1994; Beltramo et coll., 1997; Beltramo & Piomelli, 2000; Bisogno et coll., 2001). Ainsi, selon des données récentes, la recapture et le transport de l'anandamide et du 2-AG seraient contrôlés par un seul et même transporteur endocannabinoïde localisé sur la membrane (Chicca et coll., 2012).

2.9.2.3 Dégradation du 2-AG

La principale enzyme de dégradation du 2-AG est la monoacylglycérol lipase (MAGL) (Blankman et coll., 2007), bien qu'il soit également un substrat pour la FAAH *in vitro* (Cravatt et coll., 1996; Goparaju et coll., 1998) et *in vivo* (Maione et coll., 2007) (Figure 11). La MAGL se retrouve au niveau présynaptique (Gulyas et coll., 2004; Ludanyi et coll., 2011) et son expression semble être hétérogène à travers les synapses (Uchigashima et coll., 2011; Yoshida et coll., 2011; Tanimura et coll., 2012). Elle est responsable d'environ 85% de l'hydrolyse du 2-AG. La MAGL est colocalisée avec les récepteurs CB₁ dans les terminaisons axonales, elle est ainsi idéalement localisée pour inactiver la voie de signalisation induite par le 2-AG (Savinainen et coll., 2012).

Le rôle primordial joué par la MAGL dans la régulation de la signalisation du 2-AG *in vivo* a été confirmé chez les souris dont le gène encodant la MAGL a été invalidé (MAGLKO). L'inactivation prolongée de la MAGL, grâce à des outils pharmacologiques (inhibiteurs de la MAGL) ou génétiques (souris MAGLKO), produit une altération profonde du système endocannabinoïde suite à l'élévation prolongée des niveaux de 2-AG dans le système nerveux (Schlosburg et coll., 2010). Il a été démontré chez ces souris que les comportements douloureux n'étaient pas modifiés dans le test d'immersion de la queue. Cependant, les souris MAGLKO ou des souris qui ont été traitées chroniquement avec un inhibiteur de la MAGL, le JZL184, ont montré une réduction de l'analgésie induite par le THC et le

WIN55,212-2, révélant que le développement de la tolérance aux cannabinoïdes peut survenir suite à un blocage chronique de la MAGL (génétique ou pharmacologique), probablement à cause d'une désensibilisation des récepteurs CB₁ (Schlosburg et coll., 2010). Une étude très récente montre cependant une absence de tolérance suite à une administration prolongée du JZL184 (Kinsey et coll., 2013).

Parmi les autres enzymes cataboliques impliquées dans la dégradation du 2-AG, des études récentes ont rapporté l'implication de deux sérine hydrolases localisées au niveau postsynaptique, nommées ABHD6 (*α-β-hydrolase domain 6*) (Marrs et coll., 2010) et ABHD12 (*α-β-hydrolase domain 12*) (Blankman et coll., 2007), qui catalysent une petite fraction du 2-AG en acide arachidonique et en glycérol (pour une revue récente voir Savinainen et coll., 2012) (Figure 11). Il semble néanmoins clair que la MAGL contrôle la durée et l'ampleur de la plasticité synaptique induite par le 2-AG (Szabo et coll., 2006; Hashimoto et coll., 2007; Schlosburg et coll., 2010; Pan et coll., 2011). Par ailleurs, tel que vu précédemment, des données récentes révèlent que les cannabinoïdes endogènes sont également des substrats pour la COX et peuvent être sélectivement oxygénés *via* une voie COX-2 pour former de nouvelles classes de prostaglandines.

La compréhension des rôles de la MAGL aux niveaux métabolique et pathophysiologique a été fortement accélérée ces dernières années en raison de la création de souris MAGLKO et de la synthèse d'inhibiteurs de la MAGL présentant des sélectivités différentes (Tableau V) (pour une revue récente de la littérature voir Mulvihill & Nomura, 2013) . La sélectivité de ces derniers est cependant remise en question dans quelques études, comme c'est le cas pour l'URB602. Il convient donc de demeurer prudent quant à l'interprétation des résultats des études utilisant divers inhibiteurs de la même enzyme puisque ces composés agissent probablement *via* différents mécanismes, en produisant même dans certains cas des effets hors cibles.

	Réversibles	Irréversibles
Principaux inhibiteurs de la MAGL	URB602 OMDM169 O-5596	URB754 JZL184 KML29
Doubles inhibiteurs pour la FAAH et la MAGL		JZL195 SA-57

Tableau V. Tableau des principaux inhibiteurs de la MAGL.

En résumé, les endocannabinoïdes sont produits de façon endogène suite au développement de plusieurs pathologies, incluant les douleurs inflammatoire et neuropathique. Ils peuvent donc agir de façon spécifique dans certains tissus et à certains moments précis afin de minimiser les conséquences reliées à de telles conditions. Cette observation est très intéressante puisqu'elle offre la possibilité de cibler les enzymes de dégradation des endocannabinoïdes dans le but d'augmenter les concentrations locales de ces composés et de prolonger leur action homéostatique de neuromodulateurs.

L'inhibition sélective de la dégradation du 2-AG permet de mieux étudier ses fonctions faisant suite au blocage de sa dégradation, causant une amplification de son action intrinsèque et de ses propriétés analgésiques. En théorie, les concentrations locales de 2-AG seraient augmentées puisqu'il ne serait pas métabolisé par la MAGL, tel que démontré au niveau de la substance grise périaqueducule (Hohmann et coll., 2005) et des neurones pyramidaux de l'hippocampe (Makara et coll., 2005). L'utilisation d'inhibiteurs de la MAGL permettrait ainsi d'augmenter les niveaux endogènes de 2-AG et de comparer les effets antinociceptifs de ces endocannabinoïdes avec ceux des endocannabinoïdes exogènes. Il serait intéressant d'évaluer si les endocannabinoïdes exogènes provoquent les mêmes réponses physiologiques que la modulation des niveaux endogènes, en sachant que dans certaines pathologies il existe un tonus endocannabinoïde basal.

Globalement, ces résultats suggèrent que l'inhibition de la FAAH produit des effets analgésiques sans développer une tolérance et que des effets analgésiques similaires peuvent également être obtenus par le biais de l'inhibition de la MAGL, surtout si cette

inhibition est partielle (Schlosburg et coll., 2010). Par conséquent, l'inhibition de la FAAH et de la MAGL offre une stratégie unique pour le traitement de la douleur en favorisant l'activation des récepteurs CB₁ et CB₂ *via* une augmentation des concentrations locales d'endocannabinoïdes, permettant d'obtenir un profil d'effets indésirables nettement amélioré.

2.9.3 Oléoyléthanolamide

L'oléoyléthanolamide (OEA) est un analogue structural de l'anandamide qui n'active pas les récepteurs cannabinoïdes (Lambert & Di Marzo, 1999). Les preuves actuelles suggèrent qu'il peut se lier au récepteur GPR119, un récepteur orphelin qui est actuellement considéré comme un récepteur cannabinoïde potentiel (Mackie & Stella, 2006) (Figure 13). Ce lipide endogène module la prise de nourriture (Navarro et coll., 2001), la masse corporelle et le métabolisme des lipides par sa grande affinité pour le récepteur PPAR α (Guzman et coll., 2004; Lo Verme et coll., 2005b). L'OEA est présent dans tous les tissus exprimant le PPAR α ; toutefois, la régulation de sa biosynthèse dans certains tissus demeure inconnue (Lo Verme et coll., 2005b). Il est synthétisé « à la demande » à partir des précurseurs phospholipidiques trouvés dans la membrane cellulaire puis il est éliminé par hydrolyse enzymatique, conduisant à la formation d'acide oléique et d'éthanolamine.

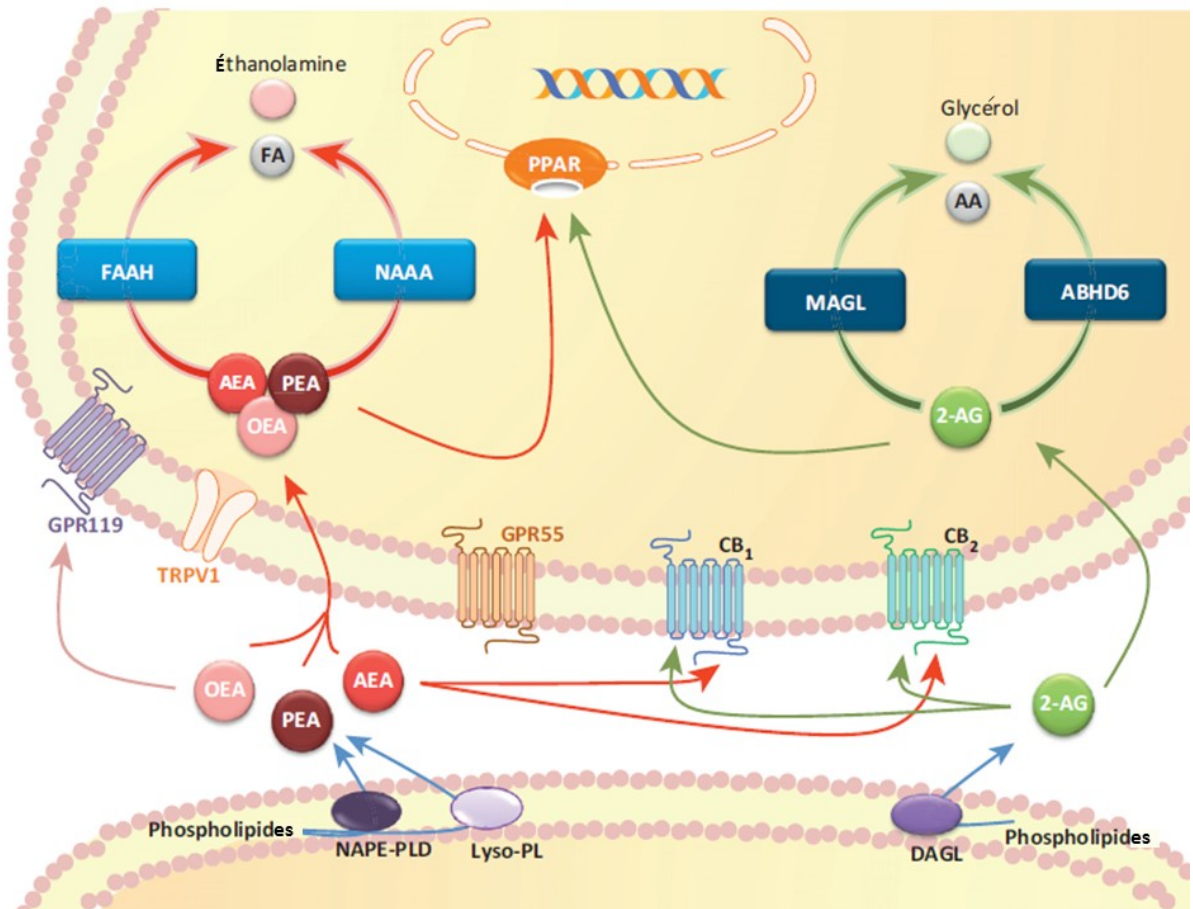


Figure 13. Complexité du système endocannabinoïde. AA : acide arachidonique; ABHD6 : α - β -hydrolase domain 6; AEA : anandamide; DAGL : diacylglycérol lipase; FA : acides gras; FAAH : amide hydrolase des acides gras; MAGL : monoacylglycérol lipase; NAAA : *N*-acyléthanolamine-hydrolyzing acid amidase; OEA : oléoyléthanolamide; PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptor*; PEA : palmitoyléthanolamide. Figure modifiée d'après (Alhouayek & Muccioli, 2012).

2.9.4 Palmitoyléthanolamide

Le palmitoyléthanolamide (PEA) est un congénère de l'anandamide qui a été identifié dans plusieurs tissus (cerveau, foie, muscles, moelle épinière, tissus périphériques) (Calignano et coll., 1998; Baker et coll., 2001). Il est habituellement retrouvé à des concentrations tissulaires plus élevées que celles de l'anandamide. Il a été suggéré qu'il est un agoniste des récepteurs CB₂ (Facci et coll., 1995), alors que d'autres études rapportent

qu'il produit ses effets par un mécanisme essentiellement indépendant des récepteurs cannabinoïdes (Devane et coll., 1992; Griffin et coll., 2000) (Figure 13). Des propriétés anti-inflammatoires et anti-anaphylactiques lui ont été attribuées (Bachur et coll., 1965; Berdyshev et coll., 1998). Il a été démontré que le PEA produit ses effets anti-inflammatoires par l'intermédiaire du récepteur nucléaire PPAR α , indépendamment des récepteurs CB₂ (Lo Verme et coll., 2005a). De récentes données suggèrent également que le PEA agit *via* les récepteurs GPR55 (Cantarella et coll., 2011; Kumar et coll., 2012). Récemment, il a été démontré que le PEA agit comme un modulateur allostérique des effets de l'anandamide par l'intermédiaire de récepteurs PPAR α (De Petrocellis et coll., 2011) ainsi que par l'activation des récepteurs TRPV1 et partiellement *via* les récepteurs PPAR α (Ambrosino et coll., 2013).

En général, le PEA est impliqué dans les mécanismes de protection endogènes qui sont activés dans l'organisme suite à différents types de lésions tissulaires ainsi qu'à la réponse inflammatoire et la stimulation des fibres nociceptives (Re et coll., 2007). Bien que le PEA ne soit pas strictement considéré comme un endocannabinoïde classique puisqu'il ne possède pas d'affinité pour les récepteurs CB₁ et CB₂ (O'Sullivan & Kendall, 2010), il est reconnu pour améliorer l'activité de l'anandamide grâce à un effet relié à son environnement immédiat (Ho et coll., 2008).

2.9.5 Autres endocannabinoïdes

D'autres cannabinoïdes endogènes font partie du système cannabinoïde, tels que les deux congénères de l'anandamide, le N-docosatétraénoyl-éthanolamine et le N-di-homo- γ -linolénoyl-éthanolamine, le 2-arachidonylglycéryl éther (2-AGE; noladin éther) qui est un analogue éther du 2-AG, la N-arachidonyldopamine (NADA) ainsi que l'O-arachidonyléthanolamide (virodhamine). Toutes ces substances présentent des affinités plus ou moins élevées pour les récepteurs cannabinoïdes.

2.10 Les endocannabinoïdes comme messagers synaptiques agissant de façon rétrograde

Les endocannabinoïdes sont des neuromodulateurs qui agissent de façon rétrograde sur des récepteurs présynaptiques CB₁ (Wilson & Nicoll, 2002). Ils modulent des synapses inhibitrices GABAergiques ainsi que des synapses excitatrices glutamatergiques (voir Figure 12) (Wilson et coll., 2001; Wilson & Nicoll, 2001; Alger, 2002; Wilson & Nicoll, 2002). Ils contrôlent de plus la libération de nombreux autres neurotransmetteurs tels que la glycine, la noradrénaline, la sérotonine, la dopamine, l'acétylcholine ainsi que plusieurs neuropeptides; pour une revue récente voir (Katona & Freund, 2012). Les effets produits suite à l'activation d'un récepteur dépendent de l'endroit où il est exprimé sur le neurone: si les récepteurs cannabinoïdes sont situés au niveau présynaptique et qu'ils inhibent la libération de GABA, ceci aura pour résultat net un effet excitateur. Toutefois, si les récepteurs cannabinoïdes sont localisés au niveau postsynaptique sur une synapse glutamatergique, alors ils induiront un effet inhibiteur (Alsasua del Valle, 2006).

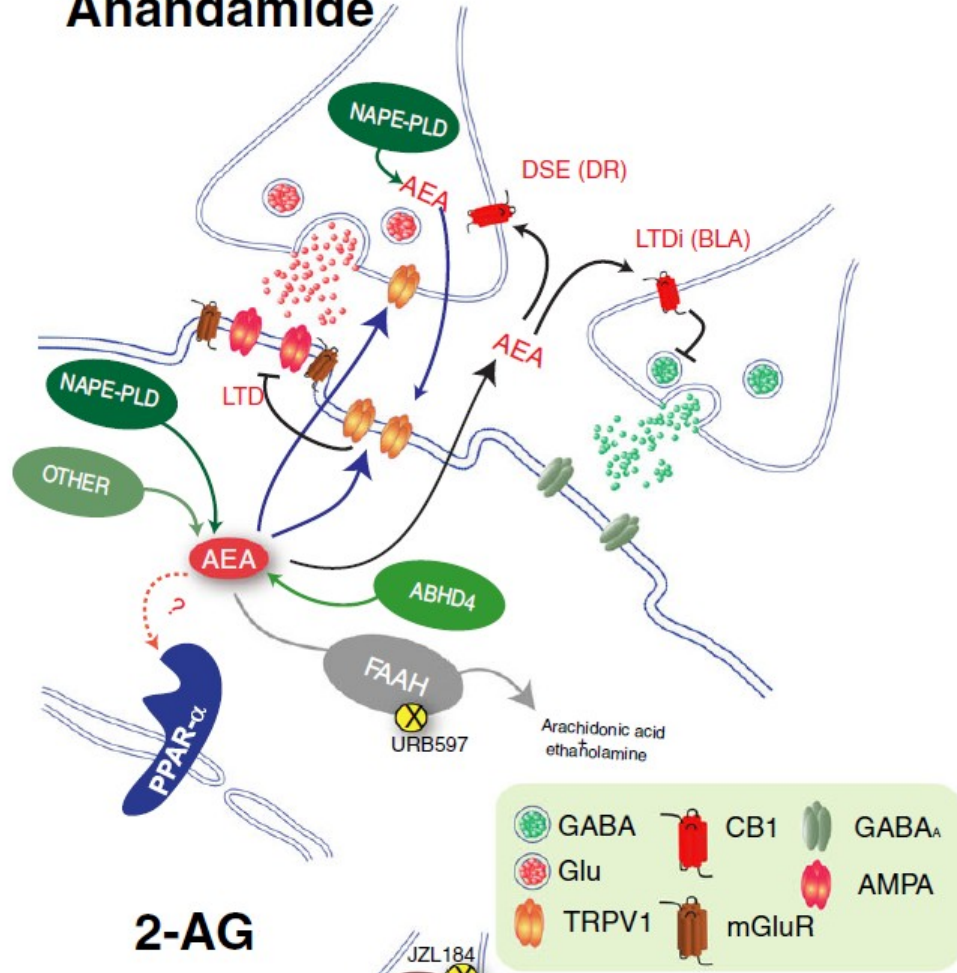
2.10.1 Rôle des endocannabinoïdes dans la plasticité synaptique à court terme

La libération des endocannabinoïdes induit habituellement une diminution de brève durée de la libération des neurotransmetteurs. Il s'agit d'une forme de plasticité synaptique à court terme, appelée phénomène de suppression de l'inhibition induite par une dépolarisation ou DSI (*depolarization-induced suppression of inhibition*) (Figure 14). Au cours de ce phénomène, une forte dépolarisation d'un neurone postsynaptique induit une libération de signaux qui agissent sur les récepteurs CB₁ présynaptiques et inhibent transitoirement la libération de GABA. Une telle signalisation rétrograde induite par les endocannabinoïdes a été observée notamment dans les cellules de Purkinje du cervelet (Llano et coll., 1991) et les neurones pyramidaux de l'hippocampe (Pitler & Alger, 1992), entraînant une suppression transitoire de la fréquence des événements postsynaptiques spontanés inhibiteurs GABAergiques. Un phénomène similaire a été démontré dans la transmission synaptique glutamatergique dans les cellules de Purkinje, démontrant un rôle des

endocannabinoïdes dans le phénomène de suppression de l'excitation induite par une dépolarisation ou DSE (*depolarization-induced suppression of excitation*) (Kreitzer & Regehr, 2001; Freund et coll., 2003).

La littérature actuelle suggère que le 2-AG, mais pas l'anandamide, est la principale molécule de signalisation dans la régulation de la plasticité synaptique (DSI ou DSE) induite par l'activation des récepteurs CB₁ (Kim & Alger, 2004; Mackie, 2006), l'anandamide jouant un rôle mineur (Szabo et coll., 2006; Kano et coll., 2009; Kim & Alger, 2010). Les enzymes qui synthétisent le 2-AG sont présentes dans les épines dendritiques postsynaptiques, ce qui apporte une preuve directe que le 2-AG est synthétisé au niveau postsynaptique et qu'il agit sur les récepteurs CB₁ localisés au niveau présynaptique (Katona et coll., 2006; Yoshida et coll., 2006). Les études réalisées avec des souris dont les gènes encodant les enzymes de synthèse du 2-AG (DAGL) (Gao et coll., 2010; Tanimura et coll., 2010) ou de dégradation du 2-AG (MAGL) (Pan et coll., 2011) étaient invalidés, ainsi qu'avec des inhibiteurs sélectifs pour chacune de ces deux enzymes, ont permis de démontrer l'implication critique du 2-AG dans la modulation de la plasticité synaptique à court et à long termes.

Anandamide



2-AG

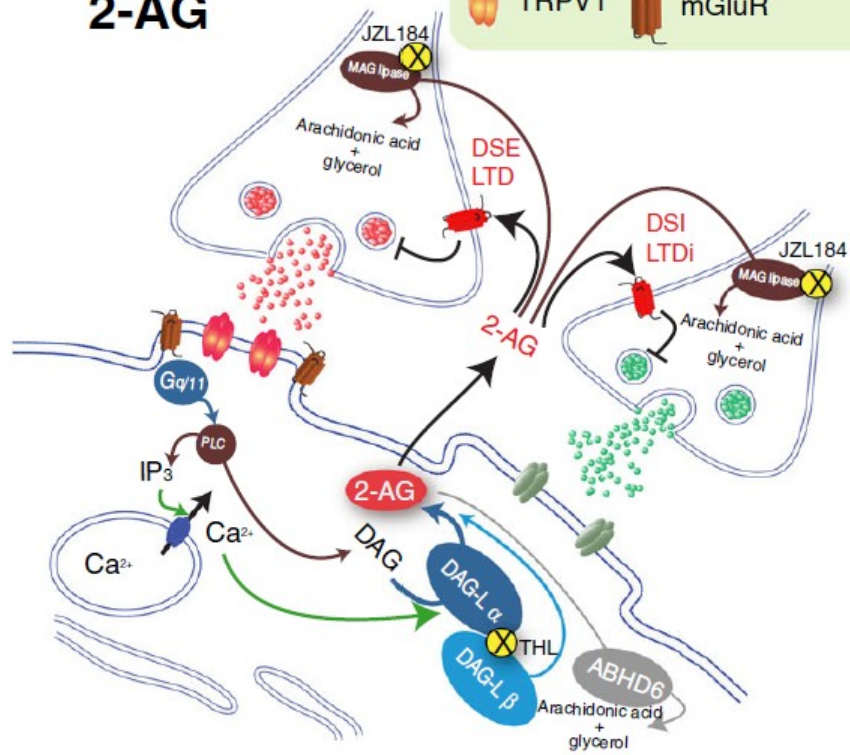


Figure 14. Mécanismes de la plasticité à court et à long terme associée aux endocannabinoïdes. Les endocannabinoïdes sont des messagers lipidiques produits « à la demande » au niveau postsynaptique suite à une dépolarisation de la membrane neuronale secondaire à l'entrée de calcium. Ils sont relâchés dans la fente synaptique et vont activer des récepteurs CB₁ présynaptiques; ils sont ainsi capables d'intervenir « à contre-courant » de la transmission synaptique classique pour moduler de manière transitoire ou durable la libération de neurotransmetteurs inhibiteurs (GABA) ou excitateurs (glutamate). Les mécanismes synaptiques d'action au niveau d'une synapse GABAergique (rose) ou glutamatergique (turquoise) sont présentés pour (A) l'anandamide et (B) le 2-AG. DSE : *depolarization-induced suppression of excitation*; DSI : *depolarization-induced suppression of inhibition*; LTD : *long term depression*. Figure modifiée d'après (Luchicchi & Pistis, 2012).

2.10.2 Rôle des endocannabinoïdes dans la plasticité à long terme

Les endocannabinoïdes induisent également des modifications de la transmission synaptique à plus long terme, prenant généralement la forme d'une dépression à long terme (DLT). Ce phénomène peut être induit dans plusieurs régions du cerveau, autant dans les terminaisons glutamatergiques que GABAergiques (Chevalleyre et coll., 2006). Son induction nécessite la présence et l'activation des récepteurs CB₁ (Gerdeman et coll., 2002), mais aussi celle des récepteurs D2 de la dopamine (Giuffrida et coll., 1999). La DLT a été démontrée dans le striatum dorsal (Lovinger et coll., 1993; Gerdeman et coll., 2002) et le noyau *accumbens* (Robbe et coll., 2001; Robbe et coll., 2002) ainsi que dans l'amygdale, l'hippocampe, le néocortex et le cervelet. Pour une revue récente de la littérature voir (Lovinger & Mathur, 2012; Luchicchi & Pistis, 2012).

Bien que la signalisation rétrograde soit le mode principal par lequel les endocannabinoïdes induisent la modulation de la plasticité synaptique à court et à long termes, de récentes données suggèrent qu'ils modulent également la transmission synaptique par l'intermédiaire de différents mécanismes «non rétrogrades». Pour une revue récente de la littérature voir (Castillo et coll., 2012; Luchicchi & Pistis, 2012). Ces mécanismes se basent sur la localisation présynaptique plutôt que postsynaptique de la NAPE-PLD (enzyme synthétisant l'anandamide) dans les terminaisons glutamatergiques de

l'hippocampe (Nyilas et coll., 2008) ainsi que sur la participation de l'anandamide ou d'autres N-acyléthanolamides agissant de façon antérograde en activant possiblement des récepteurs TRPV1 localisés au niveau postsynaptique (Cristino et coll., 2008) ou de façon autocrine par l'intermédiaire de récepteurs TRPV1 (Maione et coll., 2009).

2.11 Modulation du système cannabinoïde

Des altérations dans le système cannabinoïde endogène ont été décrites dans presque toutes les pathologies existantes, en passant par les maladies neurodégénératives, le cancer, les maladies du foie, les douleurs neuropathiques et plus encore (Pacher et coll., 2006; Di Marzo, 2008; Pertwee, 2009; Miller & Devi, 2011). Ces changements peuvent aggraver les états pathologiques ou au contraire tenter de rétablir une homéostasie physiologique. Le défi consiste donc à cibler sélectivement les sites de la maladie, à identifier les changements régionaux de l'expression des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ ainsi que ceux associés à la modulation des niveaux de cannabinoïdes endogènes. Les mécanismes qui sous-tendent ces changements commencent à être élucidés. Leur compréhension est importante et potentiellement pertinente en thérapeutique. Dans les maladies pour lesquelles l'activation des récepteurs cannabinoïdes entraîne des effets bénéfiques ou même protecteurs, la connaissance des mécanismes qui permettent leur régulation à la hausse pourrait être utilisée pour concevoir des thérapies spécialisées afin d'accroître l'expression locale des récepteurs et ainsi possiblement augmenter l'efficacité des agonistes ciblant ces récepteurs. Alternativement, l'inhibition d'une régulation à la hausse dans les cas de dysfonctionnement pourrait être une alternative intéressante à l'antagonisme global du système (Di Marzo, 2008; Miller & Devi, 2011).

Ainsi, grâce à l'injection locale d'endocannabinoïdes exogènes ou d'inhibiteurs de la dégradation des endocannabinoïdes, il serait possible d'activer directement les récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ au niveau périphérique. L'interprétation de ces études demeure complexe puisque plusieurs mécanismes d'action peuvent être impliqués dans les effets systémiques des agonistes cannabinoïdes.

Une meilleure connaissance des mécanismes de régulation des récepteurs cannabinoïdes nous permettrait d'élucider les processus physiopathologies qui sous-tendent le développement de certaines pathologies et ainsi de mieux orienter les recherches d'un point de vue thérapeutique. Le défi consiste à cibler sélectivement le système endocannabinoïde dans les tissus où de telles augmentations seraient bénéfiques. Dans la douleur neuropathique, par exemple, l'augmentation des effets analgésiques induits par les cannabinoïdes est reliée à la régulation à la hausse de l'expression des récepteurs CB₁ de la moelle épinière (Lim et coll., 2003). Par ailleurs, il a été suggéré que l'augmentation de la biosynthèse des endocannabinoïdes, notamment observée en contexte neuropathique (Walczak et coll., 2005; Mitrirattanakul et coll., 2006; Spigelman, 2010) pourrait saturer les récepteurs cannabinoïdes, suggérant qu'une augmentation du nombre de récepteurs améliorerait les effets induits par une libération endogène d'endocannabinoïdes. Un tel raisonnement a déjà été proposé pour le traitement de la sclérose en plaques (Maresz et coll., 2007) et du cancer colorectal (Wang et coll., 2008). La compréhension de ces mécanismes de régulation des récepteurs cannabinoïdes permettra sans aucun doute de multiplier les options thérapeutiques reliées à la modulation du système endocannabinoïde.

Section III. Rôle du système cannabinoïde endogène dans la modulation de la douleur

1 GÉNÉRALITÉS

Le système cannabinoïde endogène est impliqué dans le contrôle physiologique de la douleur et présente un intérêt particulier pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Son rôle dans le contrôle de la douleur a été étudié depuis des décennies grâce à l'utilisation de composés ayant des affinités différentes pour les récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ ou pour les principales enzymes impliquées dans la biosynthèse (DAGL) et le métabolisme des endocannabinoïdes (FAAH, MAGL). La sélectivité relative de

ces outils pharmacologiques *in vivo* représente cependant une limitation importante aux recherches sur le sujet. La génération de souris génétiquement modifiées, présentant des mutations sélectives pour des composantes spécifiques du système endocannabinoïde, a permis l'avancement des connaissances dans ce domaine. Ceci a aidé à l'identification de la contribution spécifique de chaque composante du système endogène dans la perception des stimuli nociceptifs et du développement d'états pathologiques douloureux. Différentes lignées de souris *knock-out*, générées par mutagenèse constitutive (ex. *cnr1KO*) ou conditionnelle (ex. *SNS-cnr1KO*), sont maintenant disponibles; ce sont des souris dont les gènes encodant des récepteurs cannabinoïdes spécifiques ou des enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation des endocannabinoïdes ont été invalidés. Ces souris *knock-out* ont également été utilisées pour évaluer la contribution de chaque composante du système endocannabinoïde dans les effets antinociceptifs des agonistes cannabinoïdes ainsi que pour approfondir les connaissances actuelles reliées à la régulation physiologique de plusieurs types de douleur telle que les douleurs inflammatoire et neuropathique.

Les études actuelles dans le domaine des cannabinoïdes ont également révélé la remarquable complexité de ce système, comme en témoignent les différences dans le profil thérapeutique d'activation et/ou d'inhibition du même récepteur dans le système nerveux central ou dans les tissus périphériques, les redondances dans la signalisation des endocannabinoïdes, le fait que les récepteurs cannabinoïdes ont plus d'un ligand endogène, ainsi que les effets opposés induits par l'activation des récepteurs CB₁ et CB₂ dans divers modèles animaux (Pacher et coll., 2006; Di Marzo, 2008; Pacher & Mechoulam, 2011; Di Marzo & De Petrocellis, 2012; Horvath et coll., 2012; Piscitelli & Di Marzo, 2012).

2 MODE D'ACTION DES CANNABINOÏDES DANS LA DOULEUR

Au cours des dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension du rôle des cannabinoïdes dans la modulation de la douleur. Les endocannabinoïdes ainsi que les récepteurs cannabinoïdes sont omniprésents à tous les niveaux des voies de la douleur, de la périphérie jusqu'au système nerveux central (Martin et

coll., 1995; Hohmann & Herkenham, 1999b; Hohmann, 2002). Les composés cannabinoïdes endogènes et exogènes exercent leurs effets antinociceptifs à plusieurs niveaux : par une action centrale suite à l'activation d'un mécanisme spinal descendant, par une action directe sur la moelle épinière, et/ou par une action sur les fibres afférentes primaires (Guindon & Beaulieu, 2005).

2.1 Au niveau central

Le système endocannabinoïde inhibe la transmission de la douleur en agissant sur les voies ascendantes, principalement au niveau du thalamus (Martin et coll., 1999) et il modifie l'interprétation subjective de la douleur *via* la modulation de l'activité neuronale dans les structures limbiques telles que l'amygdale (Manning et coll., 2003). L'activité antinociceptive des cannabinoïdes administrés par voie systémique est d'ailleurs diminuée chez des animaux suite à une lésion chirurgicale du funiculus dorsal ou à une section de la moelle épinière, ce qui démontre que les sites supraspinaux ainsi que les voies descendantes de modulation de la douleur jouent un rôle crucial dans les effets des cannabinoïdes (Lichtman & Martin, 1991b; Seyrek et coll., 2010).

De nombreuses études expérimentales ont mis en évidence la participation directe du système nerveux central dans les effets des cannabinoïdes grâce à la micro-injection d'agonistes cannabinoïdes dans différentes structures cérébrales. En effet, il a été démontré que l'administration ciblée de cannabinoïdes dans des structures précises impliquées dans la modulation de la douleur entraîne une antinociception, alors que les injections faites en dehors des zones de régulation de la douleur n'avaient aucun effet. Ainsi, des réponses antinociceptives ont été observées dans la substance grise périaqueducule (Martin et coll., 1995; Lichtman et coll., 1996; Welch et coll., 1998; Martin et coll., 1999; Kawahara et coll., 2011), du noyau basolatéral de l'amygdale (Connell et coll., 2006) et de la moelle rostrale ventromédiale (Martin et coll., 1998; Meng et coll., 1998). Il est à noter que ces régions cérébrales sont riches en récepteurs CB₁ (voir Section II).

La substance grise périaqueducale constitue l'un des sites supraspinaux les plus importants de la modulation des processus douloureux par les cannabinoïdes. En effet, il a été démontré qu'une stimulation douloureuse périphérique, telle que l'injection intradermique de formaline ou une lésion nerveuse, entraîne une augmentation de la libération d'anandamide et de 2-AG dans la substance grise périaqueducale (Walker et coll., 1999b; Suplita et coll., 2005; Fields et coll., 2006; Petrosino et coll., 2007; Olango et coll., 2012). Par ailleurs, les niveaux de ces deux endocannabinoïdes sont également augmentés dans la substance grise périaqueducale suite à l'administration de l'URB602, un inhibiteur de la MAGL, dans un modèle de stress induisant l'analgésie (Hohmann et coll., 2005).

D'autres études ont montré que les cannabinoïdes agissent directement sur des cellules spécialisées de la moelle rostrale ventromédiale pour moduler la douleur en augmentant l'activité spontanée de cellules dénommées « *off-cells* » qui inhibent le message nociceptif (Meng & Johansen, 2004). Des recherches ont montré que l'injection d'un inhibiteur de la FAAH, l'URB597, et du WIN55,212-2 (agoniste CB₁/CB₂) dans la substance grise périaqueducale entraîne la stimulation des cellules « OFF » de la moelle rostrale ventromédiale, ce qui entraîne des effets antinociceptifs associés aux récepteurs CB₁ (Maione et coll., 2006). Finalement, il a été établi que le système endocannabinoïde module la douleur principalement par le biais des récepteurs CB₁ localisés au niveau spinal et supraspinal (Meng et coll., 1998; Ledent et coll., 1999).

Une partie des effets antinociceptifs centraux des cannabinoïdes semble être associée à la modulation des voies descendantes inhibitrices (Meng et coll., 1998; Hohmann et coll., 1999b). Pour une revue récente de la littérature voir (Dogrul et coll., 2012). Une libération tonique de cannabinoïdes endogènes semble ainsi participer à l'activation du système inhibiteur descendant dans cette structure cérébrale, indépendamment des opioïdes (Meng et coll., 1998). Dans la substance grise périaqueducale, il existe également une libération d'anandamide lors de la stimulation nociceptive périphérique, qui semble participer à l'inhibition de l'entrée des stimuli nociceptifs (Walker et coll., 1999b). Les cannabinoïdes bloqueraient les influences inhibitrices des voies descendantes *via* l'inhibition de la libération

de GABA dans ces structures par un mécanisme similaire à celui décrit pour les opioïdes, soit l'activation de neurones de la substance grise périaqueducale et de la moelle rostrale ventromédiale (Vaughan et coll., 1999; Vaughan et coll., 2000). Cette modulation supraspinale induite par les cannabinoïdes implique également fort probablement un système spinal noradrénergique descendant (Lichtman & Martin, 1991a; Khodayar et coll., 2006).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les cannabinoïdes agissent sur les cellules gliales et les neurones afin d'inhiber la libération de cytokines pro-inflammatoires (TNF α), d'interleukines IL-6 et IL-1 β et d'augmenter la libération de facteurs anti-inflammatoires tels que les cytokines IL-4 et IL-10 (Shohami et coll., 1997a; Shohami et coll., 1997b; Cabral et coll., 2001; Sheng et coll., 2005).

2.2 Au niveau spinal

L'activité antinociceptive des cannabinoïdes est diminuée chez des animaux spinalisés, bien qu'elle soit partiellement préservée (Gilbert, 1981; Clarke et coll., 2001). Ceci confirme l'implication des mécanismes spinaux dans cette réponse antinociceptive, indépendante de la participation des voies inhibitrices descendantes (Lichtman & Martin, 1991b). L'administration intrathécale d'agonistes cannabinoïdes bloque l'expression de *c-fos* (un facteur de transcription utilisé comme marqueur de l'activité neuronale suite à un processus douloureux) induite dans la moelle épinière par un stimulus nociceptif (Tsou et coll., 1996). Les cannabinoïdes administrés par voie intrathécale inhibent également la décharge des neurones à large gamme réceptive «*wide dynamic range neurons*» (Ross, 2003) en réponse à un stimulus douloureux.

De nombreuses études supportent l'hypothèse selon laquelle l'analgésie observée suite à l'administration spinale de composés cannabinoïdes est induite, en partie, par l'activation des récepteurs CB₁ localisés dans la moelle épinière (Martin & Lichtman, 1998; Richardson et coll., 1998a). Les récepteurs CB₁ se trouvent principalement dans la corne

dorsale de la moelle épinière, plus spécifiquement dans les régions recevant les informations nociceptives (Herkenham et coll., 1991; De Petrocellis & Di Marzo, 2010). Les cannabinoïdes inhibent d'une manière sélective le phénomène de « *wind-up* » dans la corne dorsale de la moelle épinière (Strangman & Walker, 1999), un phénomène impliqué dans les mécanismes qui sous-tendent l'hyperalgésie et l'allodynie, voir Section I, 2.2.1.2. L'ARNm du récepteur CB₁ est également fortement exprimé dans les ganglions de la racine dorsale (Gonsiorek et coll., 2000; Hohmann, 2002) et la stimulation des récepteurs CB₁ à ce niveau diminue la libération des neurotransmetteurs impliqués dans la transmission de la douleur (Tal & Bennett, 1994).

La participation des récepteurs CB₂ a également été proposée dans la modulation de la douleur au niveau médullaire. D'ailleurs, l'activation spinale des récepteurs CB₂ produit une diminution de l'activité gliale (Romero-Sandoval & Eisenach, 2007; Romero-Sandoval et coll., 2008) ainsi que des effets analgésiques dans des modèles de douleurs inflammatoire chronique (Curto-Reyes et coll., 2011; Hsieh et coll., 2011), neuropathique (Welch & Stevens, 1992; Sagar et coll., 2005; Hsieh et coll., 2011) et cancéreuse (Curto-Reyes et coll., 2010; Gu et coll., 2011).

2.3 Au niveau périphérique

Malgré la croyance de longue date que les effets antinociceptifs des cannabinoïdes sont principalement induits par l'activation des récepteurs CB₁ au niveau central (Walker et coll., 1999a), de plus en plus de données montrent que l'activation périphérique des récepteurs cannabinoïdes joue un rôle majeur dans la modulation de la douleur (Agarwal et coll., 2007; Guindon & Beaulieu, 2009; Kress & Kuner, 2009; McDougall, 2011). Globalement, les récepteurs cannabinoïdes participent à la modulation de la sensibilisation périphérique des fibres afférentes primaires, puisqu'ils atténuent la libération de neurotransmetteurs au niveau présynaptique, ce qui leur permet de moduler les processus qui contribuent à la sensibilisation centrale.

Les récepteurs cannabinoïdes CB₁ (Hohmann & Herkenham, 1999a, b; Ahluwalia et coll., 2000; Salio et coll., 2002) et CB₂ (Ross et coll., 2001; Walczak et coll., 2005) sont également présents dans les neurones des ganglions de la racine dorsale. Ils sont d'ailleurs synthétisés à ce niveau, puis transportés de façon antérograde vers les terminaisons périphériques des neurones afférents primaires (Hohmann & Herkenham, 1999a, b). De nombreuses études confirment la présence des récepteurs cannabinoïdes le long de ces fibres sensibles (Hohmann & Herkenham, 1999a; Ahluwalia et coll., 2000; Gonsiorek et coll., 2000; Ross et coll., 2001; Price et coll., 2003; Stander et coll., 2005; Agarwal et coll., 2007). La plupart des neurones afférents primaires qui expriment l'ARNm du récepteur CB₁ sont des fibres de large diamètre qui participent à la transmission non nociceptive (Hohmann & Herkenham, 1999b; Gonsiorek et coll., 2000; Price et coll., 2003). Les récepteurs CB₁ sont faiblement exprimés dans les fibres nociceptives de petit diamètre (Ahluwalia et coll., 2000) et ils sont colocalisés de façon minoritaire avec des neuropeptides (substance P, CGRP, somatostatine) (Hohmann & Herkenham, 1999a), ce qui ne diminue toutefois pas leur efficacité en tant qu'inhibiteurs de la libération de neurotransmetteurs impliqués dans la transmission des messages douloureux (Strangman & Walker, 1999; Drew et coll., 2000; Pertwee, 2001; Walker & Huang, 2002; Wilson & Nicoll, 2002).

Grâce à l'utilisation de souris *knock-out* déficientes en récepteurs CB₁ exprimés sélectivement sur les nocicepteurs périphériques (*SNS-cnr1KO*), il a été démontré que les récepteurs CB₁ périphériques jouent un rôle primordial dans la modulation de la douleur (Agarwal et coll., 2007). En effet, ces souris mutantes dépourvues de récepteurs CB₁ uniquement sur les neurones sensitifs (ceux qui expriment les canaux sodiques Na_v1.8) ont montré une sensibilité accrue face à la douleur causée par des stimuli thermiques et mécaniques. De même, l'administration locale, dans des tissus inflammatoires, d'un antagoniste sélectif des récepteurs CB₁ (AM281) a augmenté la sensibilité à un stimulus mécanique chez des souris naïves (Khasabova et coll., 2008). Des études ont montré que l'hypersensibilité mécanique est associée à des changements phénotypiques dans les neurones afférents primaires dans des modèles de douleurs cancéreuses (Honore et coll., 2000; Khasabova et coll., 2007; Niiyama et coll., 2007), ce qui contribue à l'excitabilité des

nocicepteurs (Cain et coll., 2001). Les effets des endocannabinoïdes se manifestent également dans un modèle de douleur inflammatoire périphérique dans lequel les comportements douloureux sont accrus suite à l'administration d'un antagoniste CB₁ par voie intraplantaire (Calignano et coll., 1998). Ces études suggèrent que l'activité constitutive des récepteurs cannabinoïdes CB₁ localisés sur les nocicepteurs joue un rôle important pour la sensibilité des neurones face aux stimuli mécaniques et thermiques.

Les niveaux d'endocannabinoïdes et l'activité de la FAAH ont été mesurés dans la peau de la patte de rongeurs (Calignano et coll., 1998; Beaulieu et coll., 2000; Holt et coll., 2005; Guindon et coll., 2006b). Les deux sous-types de récepteurs cannabinoïdes ont également été retrouvés dans les différentes couches de la peau, ainsi que dans certaines structures annexes de la peau (glandes sudoripares, cellules sébacées, etc.) qui peuvent contribuer aux actions antinociceptives locales des cannabinoïdes (Casanova et coll., 2003; Ibrahim et coll., 2005; Stander et coll., 2005; Burns & Ineck, 2006; Guindon & Beaulieu, 2009). Les cellules immunitaires et les kératinocytes semblent également être impliqués dans les actions analgésiques locales induites par l'activation des récepteurs CB₂. Il a d'ailleurs été démontré que l'activation des récepteurs CB₂ situés sur les kératinocytes stimule la relâche de β -endorphines, qui stimulent les récepteurs opioïdes mu (MOP) localisés sur les neurones afférents primaires (Ibrahim et coll., 2005).

Malgré le fait que les cannabinoïdes peuvent agir à plusieurs niveaux des voies de la douleur, impliquant plusieurs mécanismes d'action, les dernières études montrant l'importance du système endocannabinoïde au niveau périphérique nous guident vers une modulation locale de ce système. Il serait intéressant d'évaluer les effets antinociceptifs induits par la modulation du système endocannabinoïde dans des modèles de douleur inflammatoire et neuropathique puisqu'en plus des actions directes sur la libération de neurotransmetteurs, ils produisent une diminution de la libération de médiateurs pro-inflammatoires.

3 ANALGÉSIE INDUITE PAR LES CANNABINOÏDES DANS DIFFÉRENTS MODÈLES ANIMAUX

L'analgésie est l'une des principales propriétés thérapeutiques des cannabinoïdes. Ils se sont révélés efficaces dans pratiquement tous les modèles animaux de douleur utilisés jusqu'à présent et ce, quelle que soit la voie d'administration employée. Dans le cadre de cette thèse, l'emphasis sera mise sur les résultats obtenus dans des modèles de douleur inflammatoire et neuropathique suite à l'administration locale de composés cannabinoïdes.

3.1 Modèles de douleur inflammatoire

L'inflammation peut se manifester par un érythème (rougeur), un œdème, une sensation de brûlure, une hyperalgésie ainsi qu'une altération fonctionnelle. L'inflammation périphérique est provoquée par la libération d'un grand nombre de médiateurs par les cellules du système immunitaire et des neurones tels que la sérotonine, l'histamine, la prostaglandine E₂, la substance P, le CGRP, la noradrénaline ainsi que la bradykinine (voir Section I). Les mastocytes résidants libèrent de l'histamine et de la sérotonine, qui agissent sur les cellules endothéliales pour provoquer une vasodilatation ainsi qu'une perméabilité accrue des vaisseaux sanguins. La sérotonine, de même que les prostaglandines et la bradykinine, participent à l'excitation directe des terminaisons nerveuses sensibles, ce qui provoque une sensation douloureuse. La stimulation persistante des neurones sensitifs entraîne la libération de substance P, qui agit en tant que vasodilatateur sur les vaisseaux sanguins et stimule les mastocytes, ce qui va promouvoir de façon croissante le processus inflammatoire.

Les cannabinoïdes sont efficaces dans les modèles de douleur aiguë, inflammatoire, viscérale, arthritique, neuropathique et cancéreuse, et ce, quelle que soit la voie d'administration utilisée. Dans le cadre de cette thèse, puisque nos recherches se concentrent à déterminer le rôle et l'importance du système cannabinoïde dans la modulation de la douleur inflammatoire et neuropathique, l'emphasis sera mise sur le test à

la formaline (Articles 1 & 4) et sur le modèle de la ligature partielle du nerf sciatique (Articles 2 & 3).

L'inflammation périphérique a été largement étudiée en utilisant une variété de modèles, tels que le test à la carraghénine, à l'adjuvant complet de Freund (CFA) ainsi qu'à la formaline (formol). Bien que chacun de ces modèles produise une inflammation périphérique après une injection sous-cutanée, les mécanismes qui sous-tendent le développement et le maintien des états douloureux ainsi que la durée des effets sont différents, ce qui peut expliquer les disparités obtenues entre les modèles quant aux effets antinociceptifs induits par les composés cannabinoïdes.

Il est établi que l'activation des récepteurs CB₁ inhibe la libération de substances pronociceptives par les fibres afférentes primaires en périphérie mais aussi au niveau central. En effet, la libération de GABA dans la substance grise périaqueducule et la moelle rostrale ventromédiale ainsi que la libération de glutamate dans la moelle épinière sont inhibées (Richardson et coll., 1998c). Cette forme d'inhibition présynaptique est un mécanisme particulièrement puissant de la modulation neuronale puisqu'elle influence de façon importante la transmission des informations nociceptives, ce qui renforce le rôle possible des composés cannabinoïdes dans la modulation de la douleur inflammatoire.

3.1.1 Test à la formaline

3.1.1.1 Description du test

Le test à la formaline est un modèle bien établi de douleur persistante caractérisée par deux phases distinctes (Dubuisson & Dennis, 1977). La première phase est décrite comme l'activation directe des fibres A δ et C par la formaline. La seconde phase apparaît suite à une période d'inhibition active où l'animal ne présente aucun comportement d'évitement. Cette deuxième phase est caractérisée par une réaction inflammatoire dans les tissus périphériques (Tjolsen et coll., 1992) et le développement d'une sensibilisation des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Coderre & Melzack, 1992; Coderre &

Katz, 1997). Elle implique en outre l'activation des fibres afférentes primaires (Dickenson & Sullivan, 1987; Puig & Sorkin, 1996). Ce test est également décrit dans la littérature comme un modèle de douleur chimique ou tonique, bien que les mécanismes le sous-tendant soient d'origine inflammatoire. En effet, il a été démontré que la phase II est provoquée par une libération locale de substances nociceptives telles que la sérotonine, l'histamine, la bradykinine, la substance P ainsi que des prostaglandines (Rosland et coll., 1990). Ceci sensibilise les fibres afférentes primaires et entraîne une sensibilisation centrale (Coderre & Melzack, 1992). Une étude récente a confirmé l'implication de la substance P dans les comportements douloureux induits par la formaline à l'aide de souris invalidées pour le gène de la préprotachykinine A (PPTA) (Beaudry et coll., 2011). Chez ces souris, la douleur induite par la formaline est réduite en comparaison avec celle ressentie par les animaux de type sauvage, ce qui confirme l'implication de la substance P dans la perception de la douleur en réponse à la formaline.

Le potentiel thérapeutique de la modulation des récepteurs CB₂ dans des modèles de douleur inflammatoire représente une option très intéressante puisqu'en plus des actions directes sur la libération de neurotransmetteurs, une diminution de la libération de médiateurs pro-inflammatoires amplifiait possiblement les effets antinociceptifs produits. Nous avons donc évalué si la modulation périphérique du système cannabinoïde produit des effets antinociceptifs dans le test à la formaline (Article 1).

3.1.1.2 Mesures de la douleur inflammatoire chez les animaux

Suite à l'injection intradermique ou intraplantaire de formaline dans la patte des rongeurs, le comportement douloureux de ces derniers est observé toutes les cinq minutes pour une période d'une heure. Pour chaque période de cinq minutes, le temps total passé par l'animal dans chacune des trois catégories suivantes est comptabilisé: (1) l'animal met peu ou pas de poids sur la patte injectée; (2) la patte injectée reste élevée sans la poser; (3) l'animal secoue, mordille ou lèche la patte ayant reçu l'injection (Tableau VI).





Comportement		Observations	Cote de douleur
Comportement normal		L'animal met du poids sur la patte qui a reçu l'injection.	0
Comportement de douleur - 1 -		L'animal met peu ou pas de poids sur la patte qui a reçu l'injection.	0
Comportement de douleur - 2 -		L'animal garde la patte qui a reçu l'injection élevée, ne la pose pas.	1
Comportement de douleur - 3 -		L'animal secoue, mordille ou lèche la patte qui a reçu l'injection.	2

Tableau VI. Les comportements observés chez l'animal lors du test à la formaline. On caractérise les comportements observés suite à l'injection de formaline dans la patte arrière d'un animal à l'aide d'une cote de douleur standardisée. Tableau modifié d'après (Watson et coll., 1997).

Les comportements douloureux sont ensuite quantifiés en utilisant une cote de douleur standardisée (*composite pain score-weighted scores technique (CPS-WST_{0,1,2})*) et calculée pour la première phase (0-15 minutes) et la seconde phase (15-50 minutes) (Watson et coll., 1997), tel que présenté dans le premier article de cette thèse. Les comportements douloureux peuvent également être évalués à l'aide d'un score pondéré (Dubuisson & Dennis, 1977;Coderre et coll., 1993), tel que présenté dans le quatrième article de cette thèse. Suite à l'injection de formaline, le score moyen nociceptif est déterminé pour chaque bloc de trois minutes (180 secondes) pendant 60 minutes. Dans chacun de ces blocs, le temps total passé par l'animal dans ces quatre catégories différentes de comportement est

enregistré (similaire à la méthode précédente). Le score nociceptif pondéré varie donc de 0 à 3 et est calculé en multipliant le temps (en secondes) passé dans chaque catégorie par son score assigné, en additionnant ces produits et en divisant par le temps total pour chaque bloc de 3 min de temps. Les comportements douloureux sont donc évalués à l'aide de cette formule $(1T_1 + 2T_2 + 3T_3)/180$. Par la suite, il suffit de calculer l'aire sous la courbe (AUC) pour la phase aiguë (0-9 min; Phase I) et pour la phase inflammatoire (21-60 min Phase II). Dans ce test, dépendamment de la méthode utilisée pour quantifier les comportements douloureux, des concentrations de formaline injectées ainsi que des espèces de rongeurs utilisées, la durée précise des phases aiguës et inflammatoires ne sont pas bien définies dans la littérature. Certains auteurs évaluent même les comportements douloureux sur une période de 90 minutes, ce qui complique les comparaisons entre les différentes études.

3.1.1.3 Effets antinociceptifs des cannabinoïdes

Les cannabinoïdes produisent des effets antinociceptifs dans plusieurs modèles de douleur inflammatoire, dont le test à la formaline, tel qu'illustré dans le Tableau VII. L'administration locale, dans des tissus inflammatoires, d'anandamide et de palmitoylethanolamide (Calignano et coll., 1998; Jaggar et coll., 1998) ainsi que de l'agoniste non sélectif WIN 55,212-2 (CB₁/CB₂) (Tsou et coll., 1996) ont induit des effets antinociceptifs impliquant les récepteurs cannabinoïdes dans ce modèle de douleur inflammatoire. Ces résultats confirment le potentiel analgésique des ligands endogènes activant les récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ localisés en périphérie. De plus, l'administration locale d'antagonistes sélectifs pour les récepteurs CB₁ ou CB₂ induit des effets hyperalgésiques dans ce modèle de douleur inflammatoire (Calignano et coll., 1998; Strangman et coll., 1998). Il a également été montré que l'injection locale d'anandamide est cent fois plus puissante pour prévenir le comportement douloureux lié à la formaline comparativement à son injection intraveineuse (Calignano et coll., 1998). L'administration combinée de palmitoylethanolamide et d'anandamide a également induit des effets analgésiques synergiques, qui n'impliquaient pas le système nerveux central (Calignano et coll., 1998). Ces

observations sont très intéressantes puisqu'elles permettent de séparer les effets psychotropes centraux de l'action analgésique des cannabinoïdes agissant en périphérie lors de conditions inflammatoires. En accord avec ces résultats, un agoniste sélectif pour les récepteurs CB₂, le HU-308, induit des effets antinociceptifs par l'intermédiaire de ces récepteurs dans le test à la formaline (Hanus et coll., 1999). Cet agoniste cannabinoïde CB₂ est dépourvu d'effets antinociceptifs dans des modèles de douleur mettant en jeu des mécanismes centraux (Hanus et coll., 1999). Il a de plus été montré que l'injection de CP55,940 (agoniste non sélectif) au niveau spinal peut induire un effet antinociceptif dans les deux phases du test à la formaline (Khodayar et coll., 2006). L'injection d'anandamide produit des effets antinociceptifs dépendants des récepteurs CB₁ dans ce test (Calignano et coll., 1998; Guindon et coll., 2006a), alors que celle du 2-AG produit principalement ses effets *via* les récepteurs CB₂ (Guindon et coll., 2007). Il est intéressant de noter que dans ces différentes études, les mécanismes d'action des différents agonistes varient grandement selon le composé utilisé dans le même modèle de douleur.

Par ailleurs, il a été démontré que les souris FAAHKO présentent une hypoalgésie dans les deux phases du test à la formaline (Cravatt et coll., 2001; Lichtman et coll., 2004). Ces effets sont produits par une élévation des niveaux endogènes d'anandamide, qui peut alors activer des récepteurs CB₁. La participation de ces récepteurs dans les réponses antinociceptives induites par l'anandamide a également été confirmée à l'aide de souris double *knock-out* déficientes en récepteurs CB₁ et en FAAH (DKO) (Wise et coll., 2007).

Modèle de douleur : Test à la formaline	Substances		Effets antinociceptifs induits <i>via</i> :		Références
			CB ₁	CB ₂	
Rats	EndoCBs exogènes	AEA	Oui	Non	Guindon et coll., 2006
			NT	NT	Jaggar et coll., 1998
			Oui	Oui	Schreiber et coll., 2012
		2-AG	Non	Oui	Guindon et coll., 2007*
			NT	NT	Guindon et coll., 2011
	Inhibiteurs de la FAAH	URB937	Oui	NT	Clapper et coll., 2010
	Inhibiteurs de la MAGL	URB602	Oui	Oui	Guindon et coll., 2007*
		URB602	Oui	Oui	Guindon et coll., 2011
		JZL184	Oui	Oui	Guindon et coll., 2011
	EndoCBs exogènes + Inhibiteurs de la MAGL	2-AG + URB602	NT	NT	Guindon et coll., 2007*
2-AG + URB602		NT	NT	Guindon et coll., 2011	
2-AG + JZL184		NT	NT	Guindon et coll., 2011	
Souris					
WT	EndoCBs exogènes	AEA	NT	NT	Russo et coll., 2007
			Oui	Non	Calignano et coll., 1998
			Oui	Oui	Bisogno et coll., 2009
<i>cnr1KO</i>	-	-	↓ Comportements douloureux vs WT		Zimmer et coll., 1999
SNS- <i>cnr1KO</i>	-	-	↑ Comportements douloureux		Agarwal et coll., 2007
FAAHKO	-	-	↓ Comportements douloureux		Cravatt et coll., 2001 Lichtman et coll., 2004
FAAH-NS	-	-	↓ Comportements douloureux		Naidu et coll., 2010

* L'article Guindon et coll., 2007 est le premier article présenté dans cette thèse.

Tableau VII. Tableau comparatif des effets antinociceptifs de différents modulateurs du système endocannabinoïde dans le test à la formaline. Les différents effets antinociceptifs ont été observés suite à l'administration d'antagonistes des récepteurs cannabinoïdes chez des rats ou des souris ainsi que chez des souris *knock-out*. EndoCBs : endocannabinoïdes; NT : effets non testés; WT : souris de type sauvage; SNS-*cnr1KO* : souris génétiquement modifiées possédant une délétion conditionnelle du gène du récepteur CB₁ exclusivement

dans les nocicepteurs périphériques; FAAH-NS : souris génétiquement modifiées exprimant la FAAH exclusivement dans les neurones et non dans les tissus périphériques. Tableau modifié d'après (Guindon & Hohmann, 2009; Nadal et coll., 2013).

3.1.2 Autres modèles de douleur inflammatoire

Les composés cannabinoïdes produisent leurs effets antinociceptifs dans d'autres modèles de douleur inflammatoire, parmi lesquels se trouvent les tests à la carraghénine, à l'adjuvant complet de Freund (CFA) et à la capsaïcine (Tableau VIII) (Guindon & Hohmann, 2009).

La carraghénine (extrait d'algue rouge) est un agent inflammatoire qui produit une infiltration de cellules immunitaires, un oedème de la patte et une hypersensibilité à des stimuli mécaniques ou thermiques (Hargreaves et coll., 1988). Son injection intraplantaire induit l'expression de *Fos* (Honore et coll., 1995). La capsaïcine est l'ingrédient responsable du goût piquant des piments forts. Cette molécule provoque une sensation de brûlure en activant les récepteurs TRPV1 (Caterina et coll., 1997). Son injection intradermique produit une hypersensibilité mécanique et thermique ainsi qu'une douleur spontanée (Simone et coll., 1987). L'hyperalgésie évoquée dans le modèle à la capsaïcine se réfère à une augmentation des comportements douloureux provoquée par des stimuli supraliminaires et/ou une diminution du seuil nociceptif (Simone et coll., 1987; Gilchrist et coll., 1996). L'adjuvant complet de Freund (CFA) (mycobactéries tuées), administré dans la surface plantaire, produit un oedème périphérique ainsi qu'une hypersensibilité mécanique et thermique chez les rongeurs (Iadarola et coll., 1988; Stein et coll., 1988; Ren & Dubner, 1999). L'inflammation apparaît environ deux heures après son injection et son effet maximal est atteint en six à huit heures. L'hypersensibilité peut persister pendant des semaines après l'injection (Ren & Dubner, 1999; Walker et coll., 2003). Il est à noter que non seulement les cannabinoïdes administrés au niveau périphérique sont efficaces dans le traitement de la douleur inflammatoire, mais que l'expression des récepteurs CB₁ est augmentée au cours de l'inflammation induite par le CFA dans les ganglions de la racine dorsale ainsi que dans les fibres nerveuses innervant la patte arrière de l'animal (Amaya et coll., 2006).

Modèles de douleur inflammatoire	Substances			Effets antinociceptifs induits <i>via</i> :		Références	
				CB ₁	CB ₂		
Test à la carraghénine	Rats	EndoCBs exogènes	AEA	NT	NT	Richardson et coll., 1998	
				Oui	NT	Richardson et coll., 1998	
				NT	NT	Tuboly et coll., 2009	
		Inhibiteurs de la FAAH	URB597	NT	NT	Jhaveri et coll., 2008	
				Non	NT	Sagar et coll., 2008	
			URB937	Oui	Non	Clapper et coll., 2010	
	Souris	WT	Inhibiteurs de la FAAH	URB597	Non	Oui	Holt et coll., 2005
					Non	Oui	Comelli et coll., 2007
			Inhibiteurs de la MAGL	URB602 JZL184	Oui	Oui	Ghosh et coll., 2013
		<i>cnr1</i> KO	Inhibiteurs de la MAGL	JZL184	Oui	-	Ghosh et coll., 2013
		<i>cnr2</i> KO	Inhibiteurs de la MAGL	JZL184	Oui	-	Ghosh et coll., 2013
		FAAHKO	-	-	↓ Comportements douloureux		Lichtman et coll., 2004
		Test à l'adjuvant complet de Freund (CFA)	Rats	EndoCBs exogènes	AEA	Non	NT
Inhibiteurs de la FAAH	URB597			Oui	Oui	Jayamanne et coll., 2006	
Souris	<i>cnr1</i> KO		-	-	↑ Comportements douloureux		Agarwal et coll., 2007
					↑ Comportements douloureux		Agarwal et coll., 2007
	SNS- <i>cnr1</i> KO		-	-	↑ Comportements douloureux		Whiteside et coll., 2005
	<i>cnr2</i> KO		-	-	= Comportements douloureux		Sain et coll., 2009 Yu et coll., 2010
	GPR55KO		-	-	Absents		Staton et coll., 2008
Test à la capsaïcine	Rats		EndoCBs exogènes	AEA	NT	NT	Calignano et coll., 2001
		Inhibiteurs de la FAAH	URB597	Oui	Non	Spradley et coll., 2010	
		Inhibiteurs de la MAGL	JZL184	Oui	Oui	Spradley et coll., 2010	
	Souris	<i>cnr1</i> KO	-	-	↓ Comportements douloureux		Fioravanti et coll., 2008
					↑ Comportements douloureux		Agarwal et coll., 2007
		SNS- <i>cnr1</i> KO	-	-	↑ Comportements douloureux		

Tableau VIII. Tableau comparatif des effets antinociceptifs de différents modulateurs du système endocannabinoïde dans différents tests de douleur inflammatoire. Les différents effets antinociceptifs ont été observés suite à l'administration d'antagonistes des récepteurs cannabinoïdes chez des rats ou des souris ainsi que chez des souris *knock-out*. EndoCBs : endocannabinoïdes; NT : effets non testés; WT : souris de type sauvage. Tableau modifié d'après (Guindon & Hohmann, 2009; Nadal et coll., 2013).

Globalement, la modulation périphérique de la douleur inflammatoire par les cannabinoïdes endogènes et synthétiques, ainsi que par les inhibiteurs des enzymes de dégradation, représente un outil thérapeutique avantageux associé à de faibles effets indésirables puisqu'il est possible de cibler précisément les tissus où l'on désire augmenter les concentrations locales d'endocannabinoïdes.

3.2 Modèles de douleur neuropathique

Les modèles animaux de douleur neuropathique ont été développés pour imiter les symptômes associés à une lésion nerveuse. Tel que vu précédemment dans la Section I, 2.2, ce type de douleur se manifeste par un large éventail de symptômes cliniques tels que l'allodynie (douleur produite par un stimulus non douloureux), l'hyperalgésie (réponse exagérée à un stimulus douloureux), l'hyperesthésie (augmentation de la perception d'un stimulus) ou encore la dysesthésie (sensation anormale, déplaisante et non douloureuse). Les analgésiques actuellement utilisés en clinique pour soulager la douleur neuropathique produisent une analgésie insuffisante et/ou des effets indésirables. Ce constat renforce l'importance d'identifier et de valider de nouvelles approches thérapeutiques qui inhibent la douleur neuropathique. Les cannabinoïdes ont démontré des propriétés anti-allodyniques et anti-hyperalgésiques très intéressantes dans divers modèles de douleur neuropathique (Herzberg et coll., 1997; Bridges et coll., 2001a; Fox et coll., 2001; Ibrahim et coll., 2003; Walczak et coll., 2005, 2006).

3.2.1 Ligature partielle du nerf sciatique

3.2.1.1 Description du test

Le modèle de Seltzer ou PSNL (*partial sciatic nerve ligation*) consiste en la ligature partielle du nerf sciatique causant une neuropathie unilatérale (Seltzer et coll., 1990). Le nerf sciatique est exposé de façon proximale à la tête fémorale et 1/3 à 1/2 de la surface dorsale du nerf est ligaturé (Figure 15) (Seltzer et coll., 1990), laissant la présence d'afférences nerveuses *via* la portion intacte du nerf. Dans ce modèle, une allodynie (douleur ressentie à la suite d'une stimulation non nociceptive) et une hyperalgésie (douleur exacerbée suivant une stimulation nociceptive) se développent dans les jours suivants la chirurgie, de même qu'une réduction de l'appui sur la patte opérée, celle-ci étant recroquevillée, entraînant alors une claudication du membre touché (Héon, 2005). La douleur neuropathique peut être évaluée selon plusieurs modalités, mais dans le cadre de cette thèse l'emphasis sera mise sur les mesures de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie thermique qui sont des symptômes fréquents ressentis par les patients souffrant de douleur neuropathique.

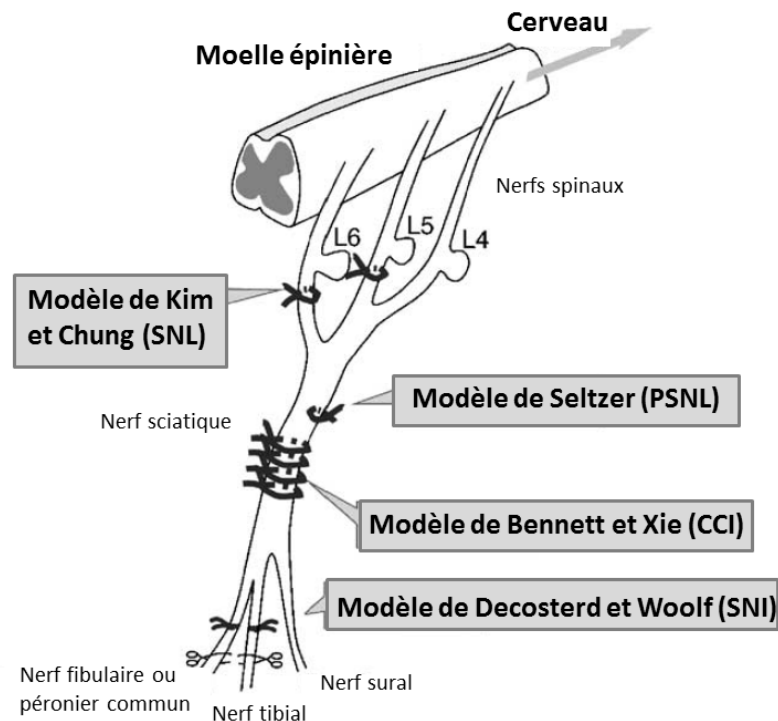


Figure 15 : Schéma des principaux modèles de douleur neuropathique. Dans le modèle de Seltzer, le nerf sciatique est scindé dans le sens longitudinal, puis le tiers ou la moitié des fibres nerveuses sont ligaturées. Dans le modèle de Bennett et Xie, plusieurs ligatures lâches du nerf sciatique sont faites alors que dans le modèle de Kim et Chung, la section transversale des nerfs spinaux L5 et L6 sont faites. Dans le modèle de Decosterd et Woolf, la ligature des nerfs tibial et péronier commun est réalisée, laissant le nerf sural intact (Decosterd & Woolf, 2000). Il existe d'autres modèles de douleur neuropathique autres que ceux décrits, tels qu'un modèle ciblant le nerf saphène. Figure modifiée d'après (Ueda, 2006). CCI : *chronic constriction injury*; PSNL : *partial sciatic nerve ligation*; SNI : *spared nerve injury*; SNL : *spinal nerve ligation*.

3.2.1.2 Mesures de la douleur neuropathique

3.2.1.2.1 Allodynie mécanique

L'allodynie mécanique est évaluée à l'aide de monofilaments de von Frey de divers calibre, correspondant à l'application de force de valeur ascendante (Tal & Bennett, 1994). Ce stimulus considéré comme non douloureux. Les filaments sont appliqués de façon perpendiculaire sous la surface plantaire de la patte arrière des animaux. Ils sont calibrés pour appliquer une certaine pression ponctuelle sur l'endroit testé lorsqu'ils sont appliqués avec une force suffisante pour provoquer une légère courbe dans le filament. Cette méthode de détermination du seuil de perception mécanique permet de quantifier l'allodynie mécanique par la diminution du seuil, qui est quantifié en unités de pression, soit en grammes ou convertis en millinewtons (mN). Pour chaque filament, la stimulation est répétée cinq fois, avec un intervalle de 1-2 secondes entre chaque essai. Le seuil est déterminé comme étant la plus faible force qui évoque une réponse de retrait de la patte à l'un des cinq stimuli (Tal & Bennett, 1994). Il est donc possible d'évaluer un seuil de perception mécanique en déterminant le plus petit filament provoquant une réponse.

3.2.1.2.2 Hyperalgésie thermique

L'hyperalgésie thermique est déterminée en utilisant une source de chaleur radiante, un stimulus douloureux. Cette source de chaleur est appliquée sous la surface plantaire de la patte arrière des animaux. Le temps de retrait de la patte est mesuré par un détecteur de mouvements (Hargreaves et coll., 1988). Cette méthode de détermination du temps de latence permet de quantifier l'hyperalgésie thermique par la diminution du temps de retrait de la patte, qui est mesuré automatiquement en secondes.

3.2.1.3 Effets antinociceptifs des cannabinoïdes

Les cannabinoïdes produisent des effets antinociceptifs dans plusieurs modèles de douleur neuropathique, dont le modèle de Seltzer, tel que présenté dans le Tableau IX. L'administration intrathécale de WIN 55,212-2 (agoniste CB₁/CB₂) a atténué l'hyperalgésie mécanique dans ce modèle (Fox et coll., 2001). Il a également été démontré que l'administration intraplantaire de WIN 55,212-2 renversait l'hyperalgésie mécanique du côté ipsilatéral dans ce modèle (Fox et coll., 2001). Deux autres études ont également démontré que l'anandamide produisait des effets antinociceptifs suite à son injection locale (Helyes et coll., 2003; Guindon & Beaulieu, 2006). Ces différentes études démontrent que le soulagement de la douleur est produit par l'activation des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ situés en périphérie.

Modèle de la ligature partielle du nerf sciatique	Substances		Effets antinociceptifs induits <i>via</i> :		Références
			CB ₁	CB ₂	
Rats	EndoCBs exogènes	AEA	Oui	Non	Helyes et coll., 2003
		2-AG	Oui	Non	Guindon et coll., 2006
		2-AG	Oui	Oui	Desroches et coll., 2008*
	Inhibiteurs de la FAAH	URB597	X	X	Jayamanne et coll., 2006
		URB602	Oui	Non	Desroches et coll., 2008*
	Inhibiteurs de la MAGL	URB602	Oui	Oui	Desroches et coll., 2008*
EndoCBs exogènes +		2-AG +	NT	NT	Desroches et coll., 2008*
URB597					
	Inhibiteurs de la FAAH	2-AG +	NT	NT	Desroches et coll., 2008*
	EndoCBs exogènes +	URB602			
	Inhibiteurs de la MAGL				
Souris					
WT	EndoCBs exogènes	AEA	Oui	Non	Article 3
		2-AG	Oui	Oui	Article 3
	Inhibiteurs de la FAAH	URB597	Oui	Non	Article 3
		URB602	Oui	Oui	Article 3
cnr1KO	EndoCBs exogènes	AEA	Oui	-	Article 3
		2-AG	Oui	-	Article 3
	Inhibiteurs de la FAAH	URB597	Oui	-	Article 3
		URB602	Oui	-	Article 3
	-	-	= Comportements douloureux	Castane et coll., 2006	
cnr2KO	EndoCBs exogènes	AEA	-	Non	Article 3
		2-AG	-	Oui	Article 3
	Inhibiteurs de la FAAH	URB597	-	Non	Article 3
		URB602	-	Oui	Article 3
	-	-	↑ HH, MA = CA	Racz et coll., 2008	
cnr2RxP	-	-	↑ Comportements douloureux	Racz et coll., 2008	
GPR55KO	-	-	Absents	Staton et coll., 2008	

* L'article Desroches et al., 2008 est le deuxième article présenté dans cette thèse.

Tableau IX. Tableau comparatif des effets anti-allodyniques et anti-hyperalgésiques de différents modulateurs du système endocannabinoïde dans le modèle de ligature partielle du nerf sciatique. Les différents effets antinociceptifs ont été observés suite à l'administration d'antagonistes des récepteurs cannabinoïdes chez des rats ou des souris ainsi que chez des souris *knock-out*. EndoCBs : endocannabinoïdes; NT : effets non testés; X : pas d'effets; WT : souris de type sauvage; *cnr2RxP* : souris transgéniques surexprimant les récepteurs CB₂ au niveau du système nerveux central; HH : hyperalgésie thermique; MA : allodynie mécanique; CA : allodynie au froid. Tableau modifié d'après (Guindon & Hohmann, 2009; Nadal et coll., 2013).

3.2.2 Autres modèles de douleur neuropathique

Le modèle de Bennett et Xie ou constriction chronique du nerf sciatique (CCI) est un modèle largement utilisé qui est produit par des ligatures lâches autour du nerf sciatique, sans toutefois en affecter le flot sanguin (Figure 15) (Bennett & Xie, 1988). La constriction du nerf sciatique provoque la perte des grosses fibres myélinisées, tandis que les fibres myélinisées de plus petit calibre et les fibres non myélinisées sont moins endommagées (Kim et coll., 1997; Wang & Wang, 2003). Ce modèle présente donc la propriété de laisser une proportion de fibres nerveuses «intactes». Les animaux qui subissent cette chirurgie développent de l'allodynie et de l'hyperalgésie dans les 10 à 14 jours suivants la chirurgie, et ces effets persistent pour une période d'environ huit semaines.

Dans le modèle de Kim et Chung ou ligature de nerfs spinaux (SNL), les nerfs spinaux L5 et L6 sont ligaturés et sectionnés après le ganglion de la racine dorsale (Figure 15) (Kim & Chung, 1992), alors que le nerf spinal L4 demeure intact. Une étude récente a démontré que l'induction d'une neuropathie à l'aide de ce modèle engendre une régulation à la hausse de l'expression des récepteurs cannabinoïdes et de leurs ligands endogènes du côté ipsilatéral dans les ganglions de la racine dorsale (Mitrirattanakul et coll., 2006). Plusieurs études ont examiné le potentiel thérapeutique de divers composés cannabinoïdes dans ces modèles (Tableau X).

Modèles de douleur neuropathique	Substances		Effets antinociceptifs induits <i>via</i> :		Références	
Constriction chronique du nerf sciatique (CCI)	Rats	EndoCBs exogènes	AEA	Non	NT	Starowicz et coll., 2012
		Inhibiteurs de la FAAH	URB597	NT	NT	Maione et coll., 2007
			URB597	Oui	NT	Starowicz et coll., 2012
		EndoCBs Exogènes + inhibiteurs de la FAAH	AEA + URB597	Oui	NT	Starowicz et coll., 2012
Ligature du nerf spinal (SNL)	Souris WT	Inhibiteurs de la FAAH	URB597	Oui	Oui	Russo et coll., 2007
		Inhibiteurs de la FAAH	URB597	Oui	Oui	Kinsey et coll., 2009
		Inhibiteurs de la MAGL	JZL184	Oui	Non	
	<i>cnr1KO</i>	-	-	= Comportements douloureux		Kinsey et coll., 2010
		Inhibiteurs de la FAAH	PF-3845	Oui	-	Kinsey et coll., 2010
		Inhibiteurs de la MAGL	JZL184	Oui	-	Kinsey et coll., 2010
	<i>cnr2KO</i>	-	-	= Comportements douloureux		Kinsey et coll., 2010
		Inhibiteurs de la FAAH	PF-3845	-	Oui	Kinsey et coll., 2010
		Inhibiteurs de la MAGL	JZL184	-	Non	Kinsey et coll., 2010
	FAAHKO	-	-	= Comportements douloureux		Lichtman et coll., 2004; Kinsey et coll., 2009
		Inhibiteurs de la FAAH	URB597	Absents		Kinsey et coll., 2009
		Inhibiteurs de la MAGL	JZL184	NT	NT	Kinsey et coll., 2009
	Rats	Inhibiteurs de la FAAH	URB597	Oui	NT	Jhaveri et coll., 2006
	Souris <i>cnr1KO</i>	-	-	= Comportements douloureux		Sain et coll., 2009; Ibrahim et coll., 2003
<i>cnr2KO</i>	-	-	= Comportements douloureux		Yamamoto et coll., 2008; Sain et coll., 2009	

Tableau X. Tableau comparatif des effets anti-allodyniques et anti-hyperalgésiques de différents modulateurs du système endocannabinoïde dans différents modèles de douleur neuropathique. Les différents effets antinociceptifs ont été observés suite à l'administration d'antagonistes des récepteurs cannabinoïdes chez des rats ou des souris ainsi que chez des souris *knock-out*. EndoCBs : endocannabinoïdes; AEA : anandamide; NT : effets non testés; WT : souris de type sauvage. Tableau modifié d'après (Guindon & Hohmann, 2009; Nadal et coll., 2013).

Un autre modèle a été développé dans notre laboratoire; le modèle du nerf saphène (Walczak et coll., 2005). Une des propriétés importantes de ce modèle est que ce nerf est exclusivement sensitif, donc il n'y a aucune lésion de fibres motrices. En théorie, cet avantage est important puisqu'il permet de déterminer avec plus de précision le rôle des fibres motrices dans le développement de la douleur neuropathique par rapport aux modèles utilisant un nerf mixte (nerf sciatique). Ce modèle comporte cependant quelques problèmes du fait que le territoire cutané est localisé au niveau de la face dorsale et non pas sur la face plantaire de la patte des animaux, compliquant les évaluations comportementales ; le territoire cutané du nerf saphène étant très similaire à celui du nerf tibial, une branche du nerf sciatique. Dans ce modèle, une augmentation des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ localisés en périphérie (patte) ainsi que dans les ganglions de la racine dorsale a été observée (Walczak et coll., 2005). Cette implication des récepteurs cannabinoïdes dans la douleur neuropathique a également été corroborée par une autre étude utilisant le modèle de ligature des nerfs spinaux L5-L6 (Sagar et coll., 2005).

Globalement, les résultats obtenus jusqu'à ce jour sont positifs quant aux effets anti-allodyniques et anti-hyperalgésiques des cannabinoïdes dans les différents modèles de douleur neuropathique décrits précédemment. Les études portent à croire que le développement de nouvelles options thérapeutiques concernant la modulation de l'activité des endocannabinoïdes afin de soulager les douleurs neuropathiques est une avenue prometteuse. La modulation du système endocannabinoïde par l'inhibition de son catabolisme en utilisant une approche périphérique optimiserait le soulagement des

douleurs neuropathiques, tout en évitant les effets psychotropes indésirables liés à l'administration centrale ou systémique des cannabinoïdes. Cependant, les échecs des essais cliniques utilisant des antagonistes CB₁ pour traiter l'obésité ou d'autres études avec des agonistes CB₁ restreint à la périphérie et des inhibiteurs de la FAAH pour traiter la douleur suggèrent qu'une meilleure compréhension du rôle physiopathologique des endocannabinoïdes est nécessaire afin de mettre au point des stratégies de traitement cliniquement efficaces (Di Marzo, 2012). Dans ce sens, les Articles 2 & 3 évaluent les effets antinociceptifs produits par la modulation périphérique du système endocannabinoïde dans un modèle de douleur neuropathique. Des approches pharmacologiques ont été utilisées afin d'élucider les mécanismes par lesquels les cannabinoïdes endogènes (anandamide et 2-AG) et les inhibiteurs de leur dégradation (URB597; FAAH et URB602; MGL) produisent leurs effets antinociceptifs, notamment par l'activation directe ou indirecte des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et/ou CB₂ chez le rat (Article 2) ainsi qu'une combinaison d'outils pharmacologiques (antagonistes spécifiques pour chacun des récepteurs cannabinoïdes) et génétiques (deux lignées de souris génétiquement modifiées chez lesquelles le gène encodant les récepteurs CB₁ (*cnr1*) ou CB₂ (*cnr2*) a été invalidé) chez la souris (Article 3).

4 INDICATIONS ET USAGES CLINIQUES

Au cours des dernières années, Santé Canada a émis l'autorisation de se procurer du cannabis à des fins thérapeutiques et a progressivement autorisé trois composés synthétiques : dronabinol, nabilone et nabiximols (Tableau XI). Bien que leur indication première ne soit pas le traitement des douleurs chroniques, plusieurs médecins prescrivent actuellement des cannabinoïdes en tant que traitement adjuvant dans le cadre d'une analgésie multimodale afin de contrôler plus efficacement les souffrances de nombreux patients.

Cannabinoïdes	Présentation	Indications	Posologie	Pharmacocinétique	Remarques
Cannabis	Plante : fumée ou inhalée par vaporisation	Principalement douleurs chroniques	Individuelle	Début : 5 min Durée : 2-4 h	Nécessite autorisation spéciale de Santé Canada*
Dronabinol (Marinol®)	Capsules de 2,5; 5 et 10 mg	Nausées et vomissements liés à la chimiothérapie anticancéreuse; anorexie	2,5 à 5 mg q 12 h max. 20 mg/j	Début : 30-60 min Durée : 4-6 h	Utilisé également dans les douleurs chroniques
Nabilone (Cesamet®)	Capsules de 0,25; 0,5 et 1 mg	Nausées et vomissements liés à la chimiothérapie anticancéreuse	0,25 à 2 mg q 12 h max. 6 mg/j	Début : 60-90 min Durée : 8-12 h	Utilisé également dans les douleurs chroniques
Nabiximols Tétrahydrocannabinol (THC)/Cannabidiol et autres cannabinoïdes mineurs (Sativex®)	Vaporisation sous la langue contenant THC (2,7 mg) et cannabidiol (2,5 mg) par 100 µL	Traitement d'appoint pour le soulagement de la douleur neuropathique en présence de sclérose en plaques	1 vaporisation aux 4 h Dose moyenne : 5 vaporisations/jour Maximum 16/jour	Début : 15-40 min Durée : 2-4 h	Autorisation avec conditions

Tableau XI. Substances à bases de cannabinoïdes disponibles en thérapeutique au Canada.

Figure modifiée de (Desroches & Beaulieu, 2008; Beaulieu, 2013).

La forme orale du THC synthétique, le dronabinol (2,5; 5 ou 10 mg, dissout dans de l'huile de sésame) en capsule est vendue aux États-Unis et au Canada sous le nom de Marinol®. Il est indiqué pour le traitement des fortes nausées et des vomissements causés par la chimiothérapie ainsi que de l'anorexie associée au SIDA accompagnée d'une perte de poids. Pour sa part, la nabilone, un dérivé synthétique du Δ^9 -THC, est autorisée pour le traitement des nausées et vomissements liés à la chimiothérapie anticancéreuse.

Le nabiximols, présenté sous forme d'atomiseur buccal, contient 27 mg/mL de Δ^9 -THC et 25 mg/mL de cannabidiol. Il est prescrit comme traitement auxiliaire pour le soulagement symptomatique de la douleur neuropathique chez les adultes atteints de sclérose en plaques et comme traitement analgésique d'appoint pour les patients adultes souffrant d'un cancer avancé qui présentent une douleur modérée ou grave malgré un puissant traitement opioïde administré à la plus forte dose tolérée contre une douleur de fond persistante.

La recherche sur les propriétés du cannabis dans le traitement de la douleur chez l'homme en est encore à son début malgré l'utilisation de celui-ci depuis des millénaires et malgré les progrès récents dans la pharmacologie de ces substances. Bien qu'il existe de nombreux rapports anecdotiques sur la valeur thérapeutique de la marijuana fumée, des études scientifiques récentes tentant d'appuyer l'innocuité et l'efficacité de la marijuana à des fins thérapeutiques ont été réalisées mais elles ne sont pas complètement concluantes (Lynch & Campbell, 2011). Une des difficultés sera de privilégier ou non des extraits complets de la plante ou un des nombreux principes actifs (principalement le Δ^9 -THC ou un agoniste CB₂ dénué d'effets psychotropes) contenus dans le cannabis. Les problèmes qui seront rencontrés dans ces essais cliniques sont ceux du choix d'une formulation galénique et d'une voie d'administration adaptées. Il faudra également tenter de dissocier les effets analgésiques potentiels du cannabis de ses effets secondaires. Les résultats des diverses études en cours de par le monde sont très attendus et seront importants pour déterminer la place que prendront les cannabinoïdes dans l'arsenal thérapeutique contre la douleur.

En résumé, les cannabinoïdes modulent efficacement la douleur grâce à différents mécanismes, et ce à différents niveaux. Par contre, de réels avantages sont présents lorsque les récepteurs périphériques sont ciblés, permettant de bénéficier des effets analgésiques tout en évitant les effets psychotropes indésirables. Les fibres afférentes primaires constituent une cible importante pour le développement de nouvelles thérapies analgésiques, pour plusieurs raisons: les nocicepteurs contiennent des molécules fonctionnellement importantes qui ne se retrouvent pas dans d'autres cellules (par exemple, les canaux sodiques voltage-dépendants Na_v1.8); seulement une sous-population de nocicepteurs participe au développement d'une condition pathologique donnée; les analgésiques qui agissent à ce niveau des voies de la douleur peuvent en fait agir en amont de l'entrée des signaux de la douleur dans le système nerveux central et avant la mise en jeu des différentes voies de signalisation; et finalement, les analgésiques dont les effets sont restreints à la périphérie n'entraînent pas d'effets indésirables centraux. Ainsi, l'inhibition de la dégradation des substances endogènes présentes localement, telles que les endocannabinoïdes et également des peptides opioïdes endogènes, semble être une

approche prometteuse pour soulager la douleur (Roques et coll., 2012a). Dans la prochaine section, nous allons brièvement aborder la pharmacologie du système opioïde dans l'optique d'évaluer les interactions bidirectionnelles entre les systèmes opioïde et cannabinoïde. Le système opioïde est impliqué dans les effets antinociceptifs des cannabinoïdes, mais qu'en est-il de la participation du système cannabinoïde dans ceux induits par les opioïdes?

Section IV. L'implication du système cannabinoïde dans la modulation de la douleur : interactions avec le système opioïde

Les récepteurs cannabinoïdes sont omniprésents à tous les niveaux des voies de la douleur. Ainsi, les cannabinoïdes endogènes et exogènes peuvent agir tant au niveau central que spinal et périphérique pour moduler la douleur. Les cannabinoïdes se sont révélés efficaces dans la plupart des modèles animaux de douleur évalués jusqu'à présent et ce, quelle que soit leur voie d'administration (voir Section III). De plus, le système cannabinoïde peut interagir avec plusieurs autres systèmes tels que les systèmes opioïde, GABAergique, glycinergique, dopaminergique, noradrénergique, sérotoninergique, cholinergique ou avec d'autres médiateurs (prostaglandines, etc.).

Le système opioïde est largement impliqué dans la modulation (opioïdes endogènes et récepteurs) et le traitement (morphine et ses dérivés) de la douleur. Par ailleurs, depuis la découverte du système cannabinoïde, de nombreux auteurs se sont intéressés aux interactions potentielles existant entre ces deux systèmes en raison de leurs implications respectives dans la modulation de la douleur : localisations similaires dans les voies de la douleur, mécanismes d'action par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G, propriétés pharmacologiques communes, etc. Ces deux systèmes sont impliqués dans le contrôle physiologique de la douleur et présentent un intérêt particulier pour le développement d'approches thérapeutiques pour soulager la douleur. Dans le cadre de cette thèse, les interactions bidirectionnelles entre les systèmes opioïde et cannabinoïde dans la

modulation de la douleur seront approfondies et l'implication du système cannabinoïde dans les effets antinociceptifs des opioïdes sera examinée (Article 4).

1 SYSTÈME OPIOÏDE

L'opium, provenant de la plante *Papaver somniferum*, renferme de nombreux alcaloïdes naturels dont la morphine, la codéine, la thébaine et la noscapine. Ces substances possèdent des propriétés analgésiques plus ou moins importantes. Les opioïdes peuvent être classés en fonction de leur structure chimique (composés naturels, synthétiques ou semi-synthétiques) ou de leur action pharmacologique sur les différents types de récepteurs.

1.1 Récepteurs opioïdes

Les récepteurs opioïdes sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui partagent 60% d'homologie de séquence (Kane et coll., 2006). Bien que l'existence de récepteurs membranaires spécifiques des opioïdes dans le cerveau ait été décrite en 1973 (Pert & Snyder, 1973; Simon et coll., 1973; Terenius, 1973), ce n'est qu'au début des années 1990 que les trois principaux récepteurs opioïdes ont été clonés et caractérisés au niveau moléculaire. Il s'agit des récepteurs μ (MOP) (Fukuda et coll., 1993; Wang et coll., 1993; Yasuda et coll., 1993), δ (DOP) (Evans et coll., 1992; Kieffer et coll., 1992) et κ (KOP) (Chen et coll., 1993). Un quatrième récepteur, ORL1 (*Opioid Receptor Like 1*) a de plus été proposé (Mollereau et coll., 1994). Ce dernier montre une forte homologie avec les autres récepteurs opioïdes, toutefois il ne possède pas d'affinité pour les ligands classiques de ces récepteurs (Zeilhofer & Calo, 2003). Il existe également des données pharmacologiques quant à l'existence de subdivisions additionnelles au sein des sous-types de récepteurs opioïdes, quoique non confirmées par les techniques de clonage. Il a été proposé que ces différents

sous-types de récepteurs dont la signification réelle demeure incertaine seraient en fait des hétéromères de récepteurs opioïdes plutôt que des entités distinctes (van Rijn et coll., 2010).

Les récepteurs opioïdes sont des récepteurs de la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires et ils sont couplés à des protéines de type $G_{i/o}$. Ainsi, ils inhibent l'adénylate cyclase et, par conséquent, le contenu intracellulaire en AMP cyclique. L'activation de ces récepteurs est aussi associée à une modulation des canaux ioniques. Les agonistes des récepteurs opioïdes inhibent l'activité neuronale principalement *via* l'ouverture de canaux potassiques à rectification entrante (GIRK : *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels*), entraînant une hyperpolarisation cellulaire (au niveau postsynaptique). Cette activation de canaux GIRK a notamment été démontrée dans les neurones postsynaptiques de la moelle épinière (Schneider et coll., 1998; Marker et coll., 2006). De plus, les agonistes opioïdes inhibent l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage, réduisant de ce fait la libération de neurotransmetteurs, notamment dans les neurones des ganglions de la racine dorsale (Moises et coll., 1994; Acosta & Lopez, 1999; Beedle et coll., 2004; Wu et coll., 2008). L'ensemble de ces mécanismes permet entre autres une diminution de la transmission des signaux nociceptifs.

1.2 Système opioïde endogène

La transmission et l'amplification du stimulus douloureux sont modulées par des peptides opioïdes endogènes. Ces ligands endogènes des récepteurs opioïdes tels que la Met- et la Leu-enképhaline ont été découverts dans le cerveau des mammifères en 1975 (Hughes et coll., 1975). Depuis cette découverte, la pharmacologie du système opioïde endogène a été largement étudiée et récemment revue (Eguchi, 2004; Trescot et coll., 2008; Maldonado, 2010). Les récepteurs opioïdes sont activés par les peptides opioïdes produits localement, incluant notamment les enképhalines, les dynorphines et les β -endorphines. Un autre peptide, le peptide orphanine FQ ou nociceptine, a été découvert plus récemment et il est un ligand endogène des récepteurs ORL1 (Meunier et coll., 1995). Ces peptides sont encodés par quatre gènes précurseurs de peptides opioïdes endogènes : préproenképhaline,

préprodynorphine, préproopiomélanocortine et préproN/OFQ (Kieffer & Gaveriaux-Ruff, 2002). Ces différents peptides endogènes présentent une affinité différente pour chaque type de récepteur opioïde, à l'exception de la nociceptine (Tableau XII).

	μ	δ	κ	ORL1
β -endorphines	+++	++	++	-
Leu-enképhaline	+	+++	-	-
Met-enképhaline	++	+++	-	-
Dynorphine	++	+	+++	-
Orphanine FQ / nociceptine	-	-	-	+++

Affinité +: faible; ++: modérée; +++: forte; -: aucune.

Tableau XII. Affinité des peptides opioïdes endogènes pour les différents récepteurs opioïdes. μ : Récepteurs MOP; δ : Récepteurs DOP; κ : Récepteurs KOP. Tableau tiré du Chapitre 14, Précis de Pharmacologie (Boulanger & Beaulieu, 2010).

Les β -endorphines montrent une affinité préférentielle pour les récepteurs MOP, la Leu- et la Met-enképhaline montrent une meilleure affinité pour les récepteurs DOP, les dynorphines pour les récepteurs KOP tandis que la nociceptine se lie uniquement aux récepteurs ORL1 (Roth-Deri et coll., 2008). De plus, deux autres peptides opioïdes endogènes, l'endomorphine-1 et -2, ont été identifiés. Ces peptides se lieraient plus spécifiquement aux récepteurs MOP (Zadina et coll., 1997). Néanmoins, leur existence demeure controversée pour le moment puisqu'aucun gène encodant leur précurseur protéique n'a été identifié à ce jour et qu'il n'existe aucune preuve irréfutable de leur libération *in vivo*. Les peptides opioïdes endogènes sont inactivés par un mécanisme de dégradation enzymatique. Deux enzymes sont impliquées dans la dégradation des enképhalines endogènes: les enképhalines néprilysine (NEP) et aminopeptidase N (APN) (Roques et coll., 1993). En périphérie, ces substances endogènes sont présentes dans plusieurs organes ainsi que sur différents types de cellules immunitaires (Labuz et coll.,

2009). Suite à la découverte des ligands endogènes, l'utilisation de ligands pharmacologiques s'est rapidement répandue en clinique puisqu'elle permettait des actions plus spécifiques par l'intermédiaire d'un seul des types de récepteurs opioïdes.

1.3 Effets antinociceptifs des agonistes des récepteurs opioïdes

Les agonistes des récepteurs opioïdes peuvent moduler de façon importante les réponses nociceptives dans divers modèles animaux, tels que des modèles de douleur inflammatoire (Parsons et coll., 1990; Stein et coll., 1990; Hylden et coll., 1991; Maldonado et coll., 1994; Taylor & Dickenson, 1998; Przewlocka et coll., 1999; Jessop, 2006) ou neuropathique (Mao et coll., 1995; Wegert et coll., 1997; Przewlocka et coll., 1999) ainsi qu'ostéoarthritique (Inglis et coll., 2008). Cependant, de nombreuses études ont démontré une altération de l'efficacité de l'analgésie opioïde dans divers états de douleur neuropathique (Mao et coll., 1995; Ossipov et coll., 1995; Przewlocka et coll., 1999; Narita et coll., 2004).

1.3.1 Mécanismes d'action central

La distribution anatomique des récepteurs opioïdes est cohérente avec leur fonction de modulation de la douleur au niveau central, spinal et périphérique. En effet, ils sont principalement exprimés à des niveaux élevés dans plusieurs zones du système nerveux central impliquées dans la transmission et la modulation nociceptive telles que le thalamus, l'hypothalamus, l'amygdale, le cortex et l'hippocampe (Mansour et coll., 1987, 1988; Mansour et coll., 1994; Arvidsson et coll., 1995; Mansour et coll., 1995; Akil et coll., 1998). Un mécanisme majeur est également associé à l'activation des récepteurs opioïdes au niveau du mésencéphale, en particulier de la substance grise périaqueducule et des voies descendantes inhibitrices. En effet, la population neuronale de la région bulbaire rostroventrale, appelée cellules « ON » et « OFF », sont impliquées dans les effets analgésiques des opioïdes par interférence avec le système inhibiteur GABA (Figure 16). Des études ont démontré que ces

cellules se projettent vers la moelle épinière et modulent la douleur (Fields et coll., 1991; Mason, 1999). La transmission nociceptive dans la corne dorsale de la moelle est inhibée par les cellules « OFF » et facilitée par les cellules « ON ». Par conséquent, les cellules « OFF » sont stimulées et inhibent la douleur suite à la micro-injection de morphine dans la moelle rostrale ventromédiale, alors que l'administration de naloxone stimule les cellules « ON » et produit des effets hyperalgiques (Fields, 2004).

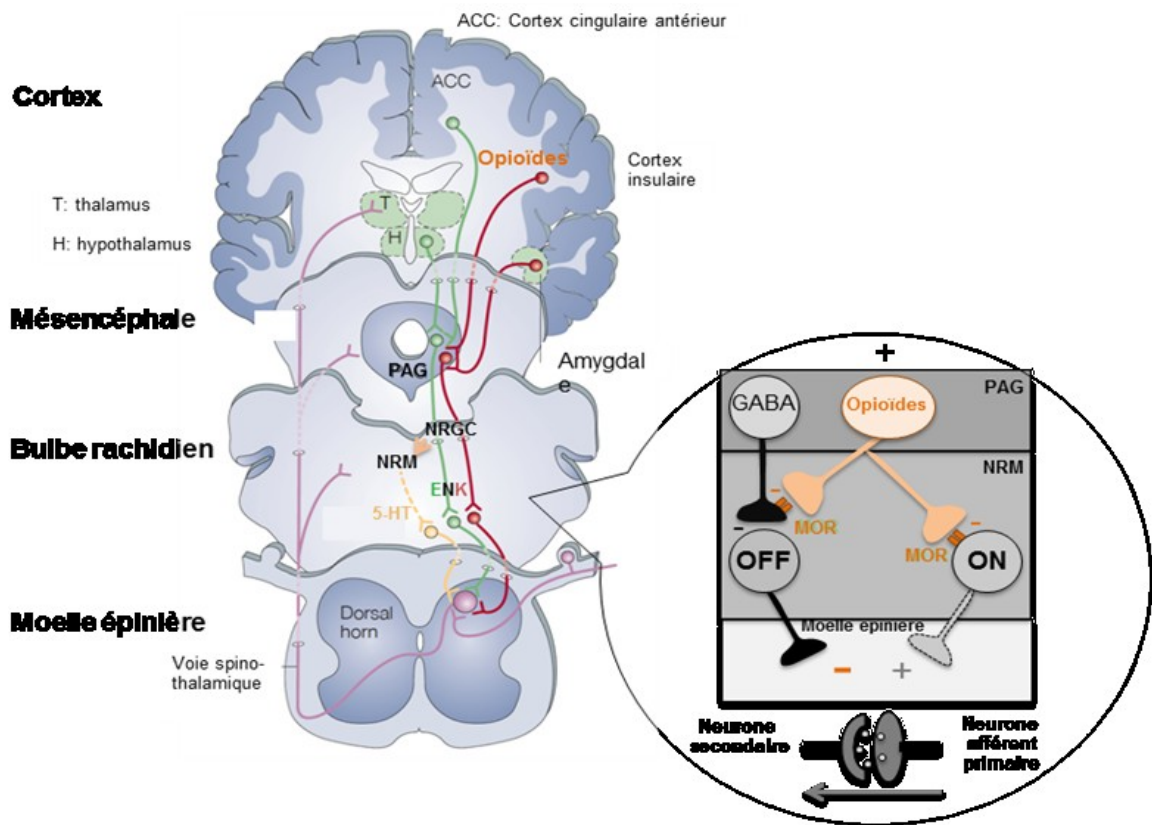


Figure 16 : Mode d'action des opioïdes dans le système nerveux central. 5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine ; ENK : enképhaline ; GABA : acide γ -aminobutyrique ; MOR : récepteurs opioïdes mu ; NRGC : noyau réticulo-(para)-giganto-cellulaire ; PAG : substance grise périaqueducale ; NRM : noyau du raphé magnus ; ON/OFF : cellules « ON » et « OFF ». Figure modifiée d'après Fields, 2004, tirée de La Douleur : Guide pharmacologique et thérapeutique (Beaulieu, 2013).

De plus, la microglie exprime également les récepteurs opioïdes MOP, DOP et KOP (Calvo et coll., 2000; Turchan-Cholewo et coll., 2008). Il a ainsi été suggéré que les opioïdes induisent l'activation des cellules gliales, telles les astrocytes et la microglie dans le système nerveux central, ce qui est associé à une altération de l'excitabilité neuronale et une diminution de l'analgésie (Hutchinson et coll., 2007). Ainsi, l'inhibition de l'activation gliale, en raison du blocage de la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires, peut améliorer l'efficacité de la morphine (Hutchinson et coll., 2008). En effet, la modulation de la microglie peut atténuer les symptômes de douleur neuropathique et améliorer l'efficacité de la morphine (Mika, 2008).

1.3.2 Mécanismes d'action spinal

Dans la moelle épinière, l'expression des récepteurs opioïdes est concentrée dans les couches (*laminae*) superficielles des cornes dorsales (Gouarderes et coll., 1985; Maekawa et coll., 1994; Arvidsson et coll., 1995; Honda & Arvidsson, 1995; Robertson et coll., 1999; Chen et coll., 2002; Pettersson et coll., 2002). Plus spécifiquement, les récepteurs opioïdes sont tous localisés dans le ganglion rachidien (avec alors migration vers les terminaisons périphériques et centrales des neurones afférents primaires) et la corne dorsale de la moelle épinière (Mansour et coll., 1995). La présence stratégique de ces récepteurs sur les voies impliquées dans la modulation de la douleur permet l'inhibition de la transmission des impulsions nociceptives à travers la moelle épinière par un mécanisme d'action présynaptique (le plus important) et postsynaptique (Chauvin & Beaulieu, 2005).

1.3.3 Mécanismes d'action périphérique

L'expression des récepteurs opioïdes a été démontrée sur les neurones des ganglions de la racine dorsale (Dado et coll., 1993; Maekawa et coll., 1994; Wang & Wessendorf, 2001; Pettersson et coll., 2002) ainsi que dans les tissus périphériques (Stein et coll., 1989; Cheng et coll., 1997; Berg et coll., 2007). Dans ce sens, certaines études ont observé une diminution de

la liaison des agonistes MOP dans la moelle épinière suite au retrait des afférences primaires par rhizotomie dorsale. Ces résultats suggèrent qu'une partie du marquage des récepteurs MOP dans les couches superficielles de la moelle correspond en fait à la présence de MOP sur les terminaisons périphériques des neurones afférents primaires (Zajac et coll., 1989; Gouarderes et coll., 1991; Stevens & Seybold, 1995). Les opioïdes peuvent ainsi inhiber la libération, dépendante du calcium, de composés pronociceptifs et pro-inflammatoires (comme la substance P) à partir des terminaisons sensibles des neurones périphériques (Bailey et coll., 2000) (Figure 17).

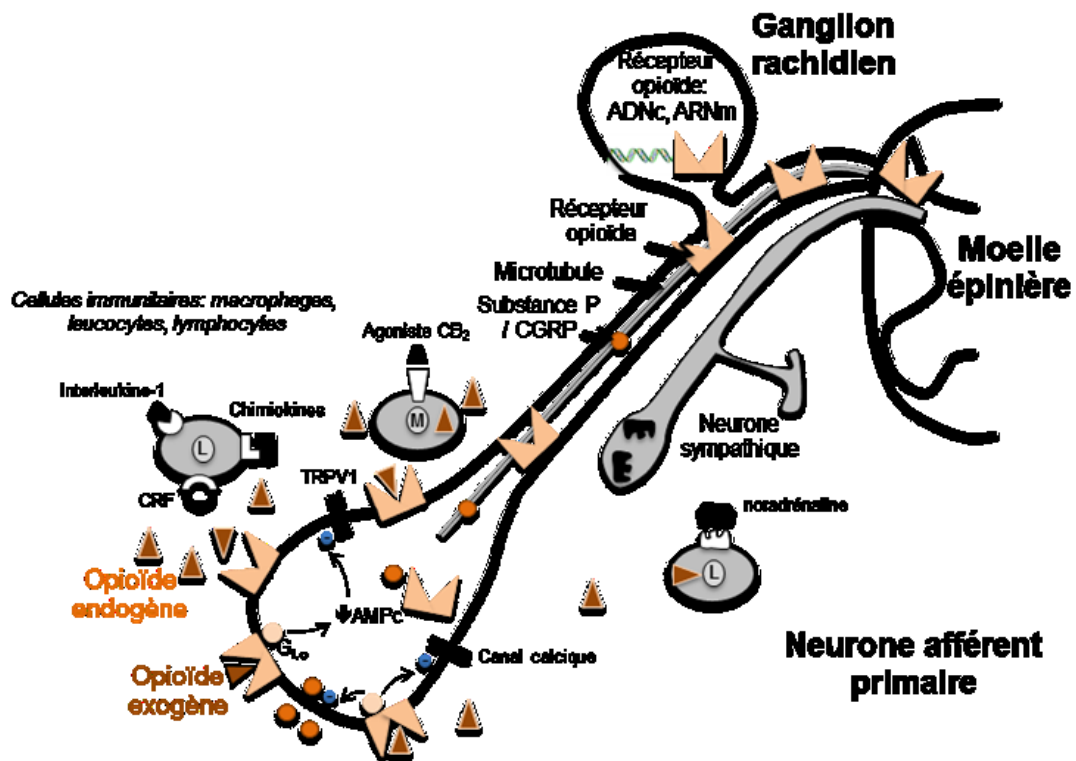


Figure 17 : Mode d'action des opioïdes au niveau périphérique. ADNc: ADN complémentaire; AMPc: AMP cyclique; ARNm: ARN messenger; CGRP: peptide relié au gène de la calcitonine ou *calcitonin gene-related peptide*; CRF: *corticotrophin-releasing factor*; L: leucocytes ou lymphocytes; M: macrophages. Figure modifiée d'après (Stein & Zollner, 2009), tirée de La Douleur : Guide pharmacologique et thérapeutique (Beaulieu, 2013).

Les effets analgésiques périphériques des opioïdes ont été observés surtout lors de conditions pathologiques comme l'inflammation ou lors d'une atteinte neuropathique. Ainsi, pendant le processus inflammatoire, une augmentation du transport axonal des récepteurs opioïdes et une expression à la hausse de ces mêmes récepteurs sont observées sur les terminaisons nerveuses périphériques des neurones afférents primaires. Les ligands opioïdes endogènes sont également présents dans les cellules immunitaires du tissu inflammatoire local. Ainsi, dans des conditions de stress ou lors de la libération de cytokines, les peptides opioïdes endogènes peuvent être libérés localement et être analgésiques. Les récepteurs opioïdes situés sur les cellules immunitaires peuvent supprimer l'activité des lymphocytes et également inhiber la synthèse ou la libération de cytokines (Bailey et coll., 2000; Stein et coll., 2001; Chauvin & Beaulieu, 2005).

2 GÉNÉRALITÉS : INTERACTIONS ENTRE LES SYSTÈMES OPIOÏDE ET CANNABINOÏDE

Les cannabinoïdes et les opioïdes sont des classes de médicaments distinctes qui ont été utilisées séparément ou en combinaison pour traiter différents états de douleur. En effet, l'activation des systèmes opioïde et cannabinoïde produit des effets antinociceptifs dans plusieurs modèles de douleur. Par ailleurs, plusieurs études biochimiques, moléculaires et pharmacologiques suggèrent l'existence d'interactions bidirectionnelles entre les deux systèmes, ce qui supporte un mécanisme d'action commun. D'autres études ont démontré que le système opioïde endogène pourrait être impliqué dans les effets antinociceptifs du système cannabinoïde et les données récentes ont également mis en évidence un rôle du système cannabinoïde endogène dans les effets antinociceptifs des opioïdes. Ces interactions peuvent produire des effets analgésiques additifs ou même synergiques, ce qui réaffirme la pertinence clinique de leur association chez l'homme en vue de renforcer les effets analgésiques à l'aide de doses plus faibles reliées à moins d'effets secondaires indésirables.

L'activation de ces deux systèmes induit de nombreux effets similaires, parmi lesquelles figurent l'hypothermie, la sédation, l'hypotension, l'inhibition de la motilité intestinale, la diminution de l'activité locomotrice ainsi que l'antinociception (Manzanares et coll., 1999; Massi et coll., 2001). L'interaction entre ces deux systèmes de modulation de la douleur a donc fait l'objet de beaucoup d'attention ces dernières années (Maldonado & Valverde, 2003; Cichewicz, 2004). L'existence de ces interactions pharmacologiques entre les opioïdes et les cannabinoïdes est principalement basée sur deux constats : il a d'abord été démontré qu'un antagoniste non sélectif mais préférentiel des récepteurs opioïdes MOP, la naloxone inhibe les effets antinociceptifs induits par un cannabinoïde (Manzanares et coll., 1999) et en second lieu, que les propriétés antinociceptives de plusieurs composés opioïdes administrés conjointement avec du Δ^9 -THC, à des doses sous le seuil d'efficacité thérapeutique, se sont avérées synergiques (Cichewicz, 2004).

De plus, les systèmes cannabinoïde et opioïde montrent de nombreux points communs. Ils présentent une distribution neuroanatomique très similaire (Figure 18a), des ligands endogènes, des mécanismes neurochimiques convergents (récepteurs couplés aux protéines $G_{i/o}$ et mécanismes de signalisation intracellulaire semblables tels que l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase avec une diminution des niveaux d'AMPc, l'inhibition de canaux calciques, la stimulation de canaux potassiques ainsi que la stimulation des MAPK) (Bidaut-Russell et coll., 1990; Childers et coll., 1992; Howlett, 1995), ainsi que des propriétés neurobiologiques fonctionnelles comparables (nociception, comportement locomoteur, récompense) (Navarro et coll., 2001).

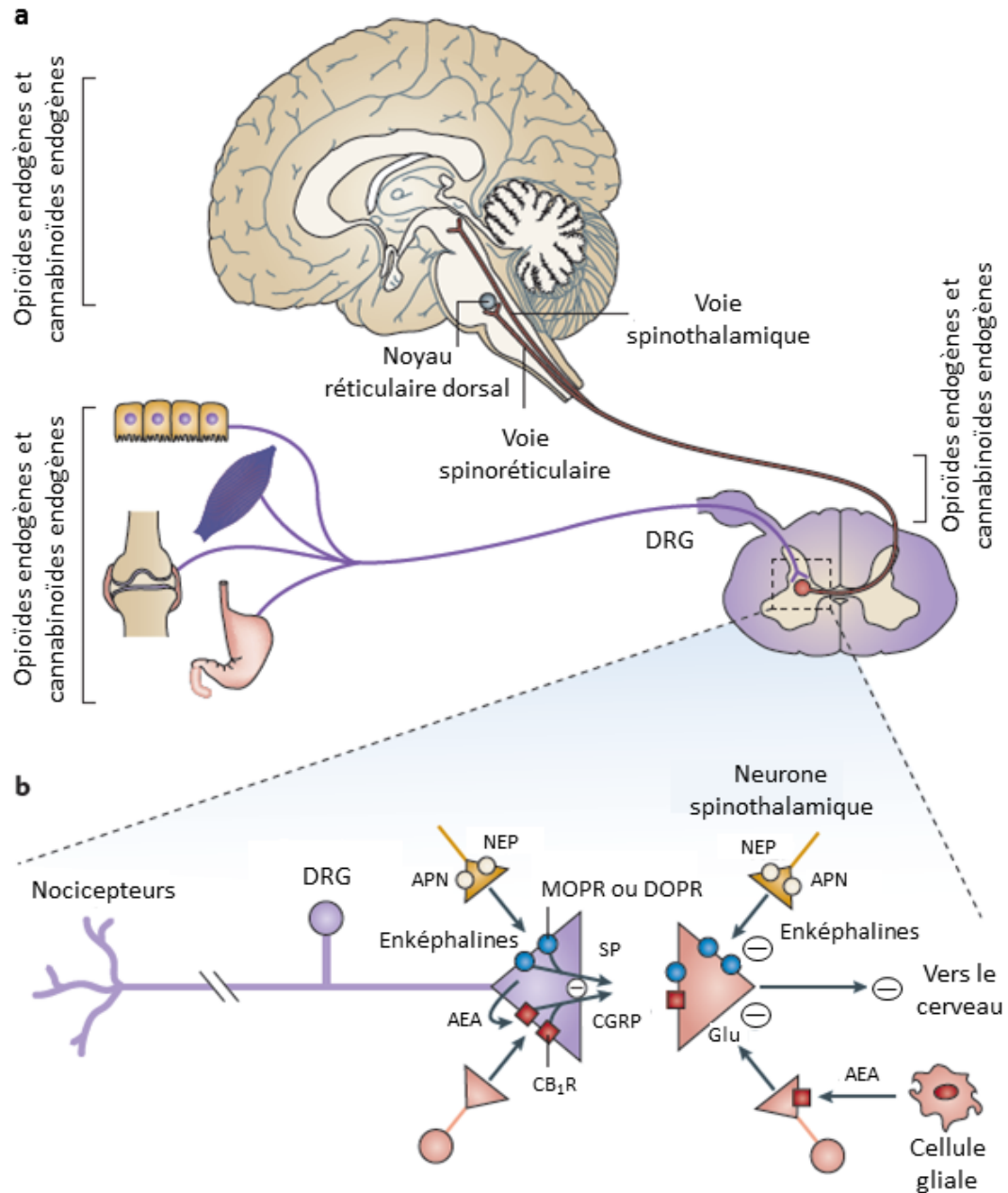


Figure 18: Les opioïdes endogènes et les cannabinoïdes endogènes sont présents aux trois niveaux de contrôle de la douleur. a | Les opioïdes et les cannabinoïdes endogènes sont largement distribués dans le système nerveux central, la moelle épinière et les tissus périphériques. Les récepteurs cannabinoïdes et la FAAH se trouvent au niveau des nocicepteurs (Hohmann & Herkenham, 1999a; Stander et coll., 2005; Agarwal et coll., 2007) et des cellules immunitaires (Croxford & Yamamura, 2005) où les inhibiteurs de la FAAH peuvent bloquer les influx nerveux (Calignano et coll., 1998; Clapper et coll., 2010). Les récepteurs opioïdes MOP et DOP sont principalement localisés sur les terminaisons axonales

des fibres afférentes dans la corne dorsale de la moelle épinière, tandis que la néprilysine (NEP) se retrouve dans les interneurons (Besse et coll., 1992). b | Un mécanisme simplifié est illustré par lequel les inhibiteurs doubles (DENK) des enképhalines (APN et NEP) ainsi que les inhibiteurs de la FAAH peuvent inhiber le relais de la transmission nociceptive de la moelle épinière vers le cerveau. Les récepteurs opioïdes et cannabinoïdes sont synthétisés dans les ganglions de la racine dorsale (DRG) et transportés vers les terminaisons spinales afférentes. La stimulation des récepteurs opioïdes par les enképhalines provenant des interneurons (illustrés en or) inhibe la libération de peptides pronociceptifs tels que la substance P et le CGRP. Par ailleurs, l'anandamide (AEA) provenant des neurones présynaptiques (indiquées en rouge) ou des terminaisons afférentes (mécanismes de libération autocrine) inhibe également la libération de substances pronociceptives. L'anandamide peut également bloquer la transmission nociceptive provenant des neurones spinothalamiques en inhibant l'activité glutamatergique. Figure modifiée de (Roques et coll., 2012a).

3 INTERACTIONS BIDIRECTIONNELLES ENTRE LES SYSTÈMES OPIOÏDE ET CANNABINOÏDE

3.1 Participation du système opioïde dans les effets antinociceptifs du système cannabinoïde

Depuis plusieurs années, des études démontrent que les cannabinoïdes améliorent les propriétés antinociceptives des opioïdes. Les effets de la morphine ont été bonifiés notamment par des extraits bruts de cannabis (Ghosh & Bhattacharya, 1979) ainsi que suite à l'administration par voie orale de Δ^6 -THC et de Δ^9 -THC (Mechoulam et coll., 1984). Une étude récente a voulu mettre en évidence les interactions bidirectionnelles entre cannabinoïdes et opioïdes en démontrant que la co-administration d'opioïdes et de cannabinoïdes peut améliorer le soulagement de la douleur, même lorsqu'ils sont administrés à des jours différents. Cette équipe a récemment démontré que la micro-injection de morphine dans la substance grise périaqueducule ventrolatérale de rat deux fois par jour pendant deux jours a permis d'accentuer les effets antinociceptifs du HU-210 (agoniste cannabinoïde non-sélectif) mesurés le lendemain (Wilson-Poe et coll., 2013). Ces résultats indiquent que le traitement

alternatif des opioïdes et des cannabinoïdes pourrait produire une analgésie de plus longue durée et plus puissante qu'un traitement avec un seul composé.

3.1.1 Antagonistes non sélectifs pour les sous-types de récepteurs opioïdes

De nombreuses études ont rapporté des résultats contradictoires concernant la capacité de la naloxone de bloquer les effets antinociceptifs des cannabinoïdes. Selon les différentes conditions expérimentales, la naloxone semble inhiber les effets analgésiques de la morphine, mais pas ceux des cannabinoïdes (Bloom & Dewey, 1978; Meng et coll., 1998; Massi et coll., 2001). Par contre, des études ont signalé que la naloxone inhibe partiellement ou totalement les réponses antinociceptives induites par le Δ^9 -THC dans les tests du retrait de la queue et de la plaque chaude (Wilson & May, 1975; Welch, 1994; Reche et coll., 1996a; Smith et coll., 1998a) ainsi que les effets analgésiques synergiques produits par de faibles doses orales de Δ^9 -THC et de morphine (Cichewicz et coll., 1999). D'autres études ont cependant indiqué que les effets antinociceptifs du Δ^9 -THC ne sont pas affectés par un prétraitement avec la naloxone (Martin, 1985b; Welch, 1993) ainsi que par l'administration intrathécale ou intracérébroventriculaire de naloxone dans le test du retrait de la queue chez la souris (Martin, 1985b; Welch & Stevens, 1992). Une étude a montré que l'anandamide ou l'URB597, un inhibiteur de la dégradation de l'anandamide, ne produisent pas d'effets antinociceptifs sensibles aux antagonistes des opioïdes dans des modèles de douleur viscérale (Haller et coll., 2006). Par ailleurs, il a été démontré que l'administration sous-cutanée de naloxone bloque les effets antinociceptifs de l'anandamide administrée par voie intrapéritonéale chez des rats arthritiques, ce qui semble indiquer l'existence d'interactions entre les opioïdes et l'anandamide (Smith et coll., 1998b). Ainsi, des doses élevées de naloxone semblent être efficaces pour altérer les propriétés analgésiques des cannabinoïdes puisqu'ils agissent vraisemblablement sur les récepteurs opioïdes MOP, DOP et KOP (Manzanares et coll., 1999).

3.1.2 Antagonistes sélectifs pour les sous-types de récepteurs opioïdes

L'implication spécifique des différents récepteurs opioïdes dans l'antinociception induite par les cannabinoïdes a été étudiée à l'aide de plusieurs antagonistes sélectifs pour les récepteurs opioïdes. En effet, des études avec un antagoniste opioïde MOP, le β -funaltrexamine ou un antagoniste sélectif des récepteurs KOP, la nor-binaltorphimine, ont démontré que les récepteurs MOP et préférentiellement les récepteurs KOP, mais pas les récepteurs DOP, sont impliqués dans les effets antinociceptifs du Δ^9 -THC (Welch & Stevens, 1992; Welch, 1993; Smith et coll., 1994a; Reche et coll., 1996a, b). Par conséquent, d'autres études ont rapporté que deux antagonistes sélectifs pour les récepteurs DOP, le naltrindole et l'ICI-174,864 n'inhibent pas les effets analgésiques du Δ^9 -THC (Welch, 1993; Reche et coll., 1996b), alors que diverses études ont montré que l'administration intrathécale de nor-binaltorphimine atténue les propriétés antinociceptives des cannabinoïdes (Smith et coll., 1994b; Welch et coll., 1995a; Pugh et coll., 1996; Reche et coll., 1996b; Pugh et coll., 1997; Mason et coll., 1999a). De plus, des études utilisant des oligonucléotides dirigés contre les récepteurs opioïdes KOP (Pugh et coll., 1995; Rowen et coll., 1998) ou un antisérum contre les dynorphines endogènes (Pugh et coll., 1996; Reche et coll., 1996b; Pugh et coll., 1997) ont également suggéré que les récepteurs opioïdes KOP étaient impliqués dans les effets antinociceptifs des cannabinoïdes. D'autres travaux suggèrent que les récepteurs opioïdes KOP participent à cette interaction uniquement au niveau spinal, mais qu'ils ne sont pas impliqués dans les réponses supraspinales (Reche et coll., 1996b). En effet, de nombreux auteurs ont suggéré que les récepteurs opioïdes MOP sont impliqués dans la modulation supraspinale des effets analgésiques induits par le Δ^9 -THC, alors que les récepteurs opioïdes KOP le sont dans les effets spinaux des cannabinoïdes (Reche et coll., 1996b; Fuentes et coll., 1999).

3.1.3 Souris dont les gènes ont été invalidés (souris « knock-out »)

L'implication du système opioïde endogène dans les effets antinociceptifs produits par le système cannabinoïde a été plus particulièrement étudiée à l'aide de souris dont les

gènes encodant les récepteurs opioïdes ou cannabinoïdes ont été invalidés (pour une revue récente voir Nadal et coll., 2013). Ces études ont montré que les souris *knock-out* pour chacun des trois sous-types de récepteurs opioïdes MOP, DOP et KOP (Ghozland et coll., 2002) ou les souris *knock-out* pour les récepteurs MOP/DOP (Castane et coll., 2003) ne présentent pas d'altération de l'antinociception induite par les cannabinoïdes.

Cependant, malgré l'absence de modifications des réponses du Δ^9 -THC après suppression d'un seul récepteur opioïde, une diminution de ces effets a été observée dans le test de retrait de la queue chez la souris dont le gène encodant la préproenképhaline a été invalidé (Valverde et coll., 2000b). D'autres études utilisant des souris dont le gène prodynorphine a été invalidé ont également montré une réduction de l'antinociception induite par l'administration intrapéritonéale de Δ^9 -THC (Zimmer et coll., 2001). Toutefois, cette réduction a été observée dans le test d'immersion de la queue mais pas dans celui de la plaque chaude (Zimmer et coll., 2001). Ces différences obtenues entre les deux tests expérimentaux a également été observée dans une autre étude utilisant le Δ^9 -THC et le WIN 55,212-2, un agoniste des récepteurs CB₁ et CB₂, administrés au niveau spinal (Gardell et coll., 2002). Il a été proposé que ces inégalités entre les résultats obtenus selon différentes conditions expérimentales peuvent être basées sur le fait que les doses d'antagonistes opioïdes utilisées pour les études pharmacologiques sont en général assez élevées (Maldonado & Valverde, 2003), ce qui pourrait expliquer la contradiction apparente entre les résultats obtenus en utilisant des souris *knock-out* ou des antagonistes opioïdes sélectifs. Ces contradictions dans les divers résultats expérimentaux obtenus suggèrent que l'utilisation des souris invalidées pour les gènes encodant les trois récepteurs MOP/DOP/KOP (Gaveriaux-Ruff et coll., 2001; Simonin et coll., 2001) serait utile afin de clarifier l'implication des opioïdes dans l'antinociception induite par les cannabinoïdes (Corchero et coll., 2004).

De ce fait, tout indique que les interactions entre les systèmes opioïde et cannabinoïde ne sont probablement pas unidirectionnelles, c'est-à-dire que les deux systèmes peuvent participer de façon plus ou moins importante dans les effets induits par l'autre système. Il serait donc intéressant d'évaluer ces interactions dans l'optique inverse,

soit celle où le système cannabinoïde occupe un rôle dans les effets antinociceptifs induits par l'activation du système opioïde.

3.2 Participation du système cannabinoïde dans les effets antinociceptifs du système opioïde

3.2.1 Peu d'évidences dans la littérature actuelle

Bien que la participation des opioïdes dans les effets antinociceptifs induits par les cannabinoïdes ait été documentée (Maldonado & Valverde, 2003; Cichewicz, 2004), il y a peu d'information concernant la participation des cannabinoïdes dans les mécanismes antinociceptifs des opioïdes. Quelques études ont cependant rapporté que l'analgésie induite par la morphine est plus grande chez les animaux précédemment exposés aux cannabinoïdes (Smith et coll., 1998a; Cichewicz et coll., 1999; Yesilyurt et coll., 2003; Cichewicz et coll., 2005). Il a été proposé que cette augmentation pourrait être reliée à une meilleure liaison des récepteurs opioïdes MOP aux protéines G (Corchero et coll., 1999b) ainsi qu'à l'augmentation de l'expression des gènes de la proopiomélanocortine (Corchero et coll., 1997; Corchero et coll., 1999a), de la préproenképhaline (Manzanares et coll., 1998; Corchero et coll., 1999b) et de la prodynorphine (Corchero et coll., 1997) dans certaines régions du système nerveux central suite à l'administration de Δ^9 -THC.

Les souris dont les gènes encodant les récepteurs CB₁ ont été invalidés (*cnr1KO*) ont été utilisées pour étudier les effets antinociceptifs induits par les opioïdes. Des études ont montré que des neuroadaptations au niveau de l'expression génique de la préproenképhaline et de la prodynorphine semblent avoir lieu dans le striatum des souris *cnr1KO* (Steiner et coll., 1999). Par contre, les effets antinociceptifs de la morphine (Ledent et coll., 1999; Zimmer et coll., 1999) et ceux induits par l'administration intracérébroventriculaire d'agonistes sélectifs pour les récepteurs DOP (DPDPE et les agonistes deltorphine II) ou KOP (U-50,488H) ne sont pas affectés par l'invalidation des récepteurs CB₁ (Valverde et coll., 2000a).

Une équipe a néanmoins démontré que l'activité du récepteur opioïde MOP est diminuée dans le cerveau antérieur suite à l'injection de noladin éther, un endocannabinoïde non sélectif des récepteurs cannabinoïdes. Cette diminution est inhibée par le SR144528, un antagoniste des récepteurs CB₂, ce qui suggère un effet induit par l'activation des récepteurs CB₂ (Paldyova et coll., 2008). Ce même groupe a mené une autre étude avec des souris dont les gènes encodant les récepteurs CB₂ ont été invalidés (*cnr2KO*). Avec cette deuxième étude ce groupe a démontré que l'activité du noladin éther n'est pas modulée par l'intermédiaire des récepteurs opioïdes MOP dans le tronc cérébral, mais plutôt *via* les récepteurs cannabinoïdes CB₂ (Paldy et coll., 2008).

Il a également été démontré qu'un antagoniste des récepteurs CB₁ (AM251) peut inhiber les effets antinociceptifs induits par la morphine dans des modèles de douleur inflammatoire (da Fonseca Pacheco et coll., 2008; Pacheco Dda et coll., 2009) ainsi que dans un test de retrait de la queue chez la souris (Pacheco Dda et coll., 2009). Ces observations ont conduit à l'hypothèse que l'activation des récepteurs opioïdes MOP par la morphine induit une libération locale d'endocannabinoïdes et que l'activation subséquente au niveau périphérique ou central des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et/ou CB₂ contribue aux effets antinociceptifs de la morphine. Cette même équipe a également montré que l'administration de méthyl arachidonoyl flurophosphate (MAFP), un inhibiteur irréversible de l'enzyme de dégradation de l'anandamide, la FAAH, a augmenté les effets antinociceptifs périphériques et centraux produits par une faible dose de morphine (da Fonseca Pacheco et coll., 2008; Pacheco Dda et coll., 2009). En somme, ces deux études indiquent que le système cannabinoïde est impliqué dans les effets induits par la morphine au niveau périphérique et central. Il serait donc intéressant de valider ces observations avec d'autres outils, tels que l'utilisation de souris *cnr1KO* et *cnr2KO* pour vérifier si les résultats concordent.

En revanche, les effets antinociceptifs de la morphine administrée par voie systémique n'ont pas été affectés par l'invalidation des récepteurs CB₁ autant dans des modèles utilisant des stimuli nociceptifs chimiques (Miller et coll., 2011) que thermiques (Ledent et coll., 1999; Valverde et coll., 2000a; Miller et coll., 2011). Une autre étude a

démontré que l'antinociception produite par une micro-injection de morphine dans la substance grise périaqueducule ventrolatérale a été augmentée suite au pré-traitement avec des micro-injections de HU-210, un agoniste non sélectif des récepteurs cannabinoïdes, alors que l'administration d'AM251, un antagoniste du récepteur CB₁, a bloqué les effets du HU-210. Ces données suggèrent que le HU-210 augmente les effets antinociceptifs de la morphine strictement par l'intermédiaire des récepteurs CB₁ (Wilson et coll., 2008). La même équipe a récemment démontré que des injections systémiques de THC deux fois par jour ont permis d'augmenter les effets antinociceptifs de la morphine administrée le lendemain (Wilson-Poe et coll., 2013). Ces résultats complètent les études mentionnées précédemment en montrant que les interactions morphine et cannabinoïdes sont bidirectionnelles et que la substance grise périaqueducule ventrolatérale joue un rôle important dans ce sens.

Il a toutefois été démontré que l'anandamide n'augmente pas les effets antinociceptifs des opioïdes, très probablement en raison de sa dégradation rapide par les enzymes d'hydrolyse (Pugh et coll., 1996; Welch, 1997; Fowler et coll., 2001). Dans ce sens, une étude récente a montré que l'administration d'URB597, un inhibiteur de la FAAH, augmente les niveaux intracellulaires d'anandamide et ainsi module les effets antinociceptifs des opioïdes dans un test de retrait de la queue chez les souris (Haller et coll., 2008). Il serait intéressant d'évaluer si un inhibiteur de la MAGL pourrait également moduler les effets antinociceptifs des opioïdes.

3.2.2 Incohérences entre études pharmacologiques et génétiques

Il existe actuellement plusieurs contradictions entre les études actuelles utilisant des outils pharmacologiques ou génétiques. Bien que les expériences utilisant des outils pharmacologiques pour modifier la signalisation des cannabinoïdes aient suggéré que les endocannabinoïdes sont clairement impliqués dans les effets antinociceptifs des opioïdes, les études utilisant des souris dont les gènes encodant les récepteurs cannabinoïdes ont été invalidés ne confirment pas cette implication du système cannabinoïde dans les effets

produits suite à l'activation du système opioïde. Ainsi, le rôle et l'implication du système cannabinoïde dans les effets antinociceptifs des opioïdes demeurent incertains.

En effet, des études antérieures utilisant des antagonistes sélectifs pour les récepteurs cannabinoïdes ont suggéré que les récepteurs CB₁ sont impliqués dans l'antinociception de la morphine au niveau périphérique (da Fonseca Pacheco et coll., 2008) et central (Pacheco Dda et coll., 2009) et que les récepteurs CB₂ sont partiellement impliqués dans ces effets au niveau local (da Fonseca Pacheco et coll., 2008). En revanche, les effets antinociceptifs de la morphine administrée par voie systémique n'ont pas été affectés par l'inactivation des récepteurs CB₁ autant dans des modèles utilisant des stimuli nociceptifs chimiques (Miller et coll., 2011) que thermiques (Ledent et coll., 1999; Valverde et coll., 2000a; Miller et coll., 2011). En fait, les données sur le rôle des récepteurs CB₁ décrits dans les études pharmacologiques réalisées à l'aide de souris de type sauvage ne sont pratiquement jamais corroborées par des études utilisant des souris *cnr1KO* (Miller et coll., 2011; Raffa & Ward, 2012). De ce fait, certains auteurs ont soulevé la possibilité que l'implication du système cannabinoïde dans les effets antinociceptifs de la morphine soit masquée chez les souris *cnr1KO* par des changements développementaux (Miller et coll., 2011). En effet, puisque le SR141716A (antagoniste CB₁) a inhibé les effets de la morphine dans cette étude mais pas ceux induits par la morphine chez des souris *cnr1KO*, cette hypothèse de modifications développementales est plausible et mérite une attention particulière. Il serait donc intéressant d'évaluer si les souris génétiquement modifiées chez lesquelles l'expression du récepteur CB₁ ou CB₂ a été éliminée présentent des altérations au niveau du profil d'expression des récepteurs MOP et des modifications des propriétés de liaison, ainsi que d'évaluer l'efficacité du couplage des récepteurs MOP aux protéines G.

Cette problématique sera abordée dans le quatrième article de cette thèse dont l'objectif principal est d'explorer l'implication du système cannabinoïde en interaction avec le système opioïde à différents niveaux du névraxe à l'aide de souris dont les gènes encodant les récepteurs cannabinoïdes ont été invalidés (souris *cnr1KO* et *cnr2KO*). Ceci nous

permettra d'élucider clairement si les récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ pourraient être impliqués dans ces effets, et à quels niveaux (central, spinal et périphérique).

3.3 Synergie possible entre les systèmes opioïde et cannabinoïde

Les récepteurs opioïdes et cannabinoïdes possèdent une distribution similaire et sont souvent colocalisés aux différents niveaux du contrôle de la douleur (Salio et coll., 2001). Par conséquent, l'administration simultanée d'opioïdes et de cannabinoïdes conduit à des interactions produisant des effets analgésiques additifs, voire même synergiques. En effet, des études utilisant une combinaison d'opioïdes et de cannabinoïdes à des doses uniques et non analgésiques ont rapporté des effets analgésiques additifs (Welch & Stevens, 1992; Pugh et coll., 1996; Pugh et coll., 1997; Smith et coll., 1998a) et synergiques (Smith & Martin, 1992; Welch & Stevens, 1992; Smith et coll., 1994b; Pugh et coll., 1996).

Les réponses synergiques obtenues en combinant des opioïdes et des cannabinoïdes exogènes ou endogènes sont communément observées dans le contexte de la modulation de la douleur (Cichewicz, 2004). Fait intéressant, il a été démontré que les interactions synergiques entre les cannabinoïdes et les opioïdes sont inhibées par des antagonistes des récepteurs cannabinoïdes ou opioïdes dans de nombreux modèles de douleur aiguë (Reche et coll., 1996b; Fuentes et coll., 1999), chronique (Welch & Stevens, 1992; Smith et coll., 1998a), diabétique (Williams et coll., 2008) et arthritique (Cox et coll., 2007). De plus, le Δ^9 -THC et la morphine sont reconnus pour agir en synergie dans de nombreux tests de douleur, tels que le test de retrait de la queue (Cichewicz & McCarthy, 2003), le test de pression de la patte (Cox et coll., 2007) ainsi que dans le test à la formaline (Finn et coll., 2004), potentialisant mutuellement leurs propriétés antinociceptives. Bien que la morphine induise ses effets antinociceptifs par l'activation des récepteurs MOP (Matthes et coll., 1996), certaines études ont suggéré que les trois types de récepteurs opioïdes sont impliqués dans les effets analgésiques synergiques (Sutters et coll., 1990; Cichewicz, 2004). Ces interactions ont été observées après l'administration de ces composés *via* différentes voies, incluant les voies systémique (Smith et coll., 1998a), intrathécale (Welch et coll., 1995a; Pugh et coll.,

1996; Pugh et coll., 1997; Welch & Eads, 1999), intracérébroventriculaire (Welch et coll., 1995b) ainsi que périphérique (da Fonseca Pacheco et coll., 2008).

Ces interactions potentielles, observées dans les tests expérimentaux chez les animaux, suscitent beaucoup d'intérêt en raison de leur potentiel thérapeutique dans le traitement de la douleur en clinique (Welch, 2009). Il a été montré qu'une dose orale non analgésique de Δ^9 -THC augmente l'efficacité d'une dose orale aiguë de morphine, de codéine, d'oxycodone ou d'autres analgésiques opioïdes (Cichewicz et coll., 1999). Des études ont également démontré que la combinaison par voie orale de faibles doses de morphine et de Δ^9 -THC pour le traitement de la douleur est aussi efficace qu'une dose élevée de morphine administrée seule (Cichewicz & Welch, 2003). Cette faible dose orale de Δ^9 -THC améliore de plus de manière synergique l'effet antinociceptif de la morphine ou de la codéine, clairement confirmée par une analyse isoblographique (Cichewicz & McCarthy, 2003). Une étude a également montré que les administrations intrapéritonéale de Δ^9 -THC, sous-cutanée de morphine ainsi que leur combinaison sont tout aussi efficaces pour soulager la douleur, alors que des doses beaucoup plus élevées de morphine ou de Δ^9 -THC seules ont été nécessaires pour produire plus de 80% de l'effet antinociceptif de leur combinaison (Smith et coll., 2007). Une telle synergie soutient l'hypothèse selon laquelle les opioïdes et les cannabinoïdes ont des propriétés antinociceptives *via* des mécanismes différents (Cichewicz & McCarthy, 2003; Tham et coll., 2005; Roberts et coll., 2006). Dans ce sens, d'autres études récentes ont également examiné les interactions synergiques entre le Δ^9 -THC et la morphine. En effet, Williams et ses collaborateurs ont observé qu'une dose orale de Δ^9 -THC, mais pas de morphine sous-cutanée, conserve sa capacité à produire une libération d'opioïdes endogènes dans un modèle de douleur diabétique chez le rat ainsi qu'à maintenir un effet antinociceptif significatif (Williams et coll., 2008), alors que leur combinaison produit des effets supérieurs à de simples effets additifs. Par ailleurs, Tuboly et ses collègues ont montré que la combinaison au niveau intrathécal de l'anandamide et de l'endomorphine-1, un ligand endogène des récepteurs opioïdes MOP, produit une potentialisation de leurs effets antihyperalgésiques, mais seulement lorsque des doses précises étaient combinées (Tuboly et coll., 2009).

Des études utilisant des inhibiteurs de la FAAH ou des inhibiteurs doubles (DENK) des enképhalines (APN et NEP) ont également démontré que la modulation des composés endogènes pouvait aussi mener à des effets synergiques (voir la Figure 18b). En outre, il a été démontré qu'une seule co-administration de doses sous-analgésiques des inhibiteurs doubles des enképhalines avec le Δ^9 -THC dans le test de la plaque chaude chez la souris produisait environ 60-80% d'analgésie, alors que des doses de 10 à 15 fois plus élevées de chaque composé étaient nécessaires pour atteindre des réponses similaires (Valverde et coll., 2001; Roques et coll., 2012a). Cette stratégie permet ainsi de réduire ou même d'éliminer les effets secondaires des opioïdes et des cannabinoïdes endogènes (Maldonado & Valverde, 2003; Haller et coll., 2008; Welch, 2009).

3.4 Mécanismes qui sous-tendent les interactions entre les systèmes opioïde et cannabinoïde

Les systèmes cannabinoïde et opioïde possèdent une distribution similaire tout au long des voies impliquées dans la modulation de la douleur, plus précisément dans plusieurs régions du cerveau, dans la moelle épinière et ainsi que dans des tissus périphériques (Bodnar, 2012; Zogopoulos et coll., 2013). Même si les cannabinoïdes et les opioïdes peuvent produire une synergie analgésique dans divers modèles animaux de douleur (Welch, 2009; Parolaro et coll., 2010), les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent les interactions pharmacologiques et biochimiques entre les deux systèmes dans le contexte de la douleur ne sont pas encore clairement élucidés.

Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer les mécanismes impliqués dans ces interactions, incluant notamment des modifications du système endocannabinoïde suite à une exposition aux opioïdes, des interactions au niveau de leurs mécanismes de transduction du signal ou directement sur les récepteurs ainsi qu'une relâche et/ou synthèse de peptides opioïdes endogènes suite à l'administration de cannabinoïdes (Manzanares et coll., 1999; Bushlin et coll., 2010; Parolaro et coll., 2010) (Figure 19).

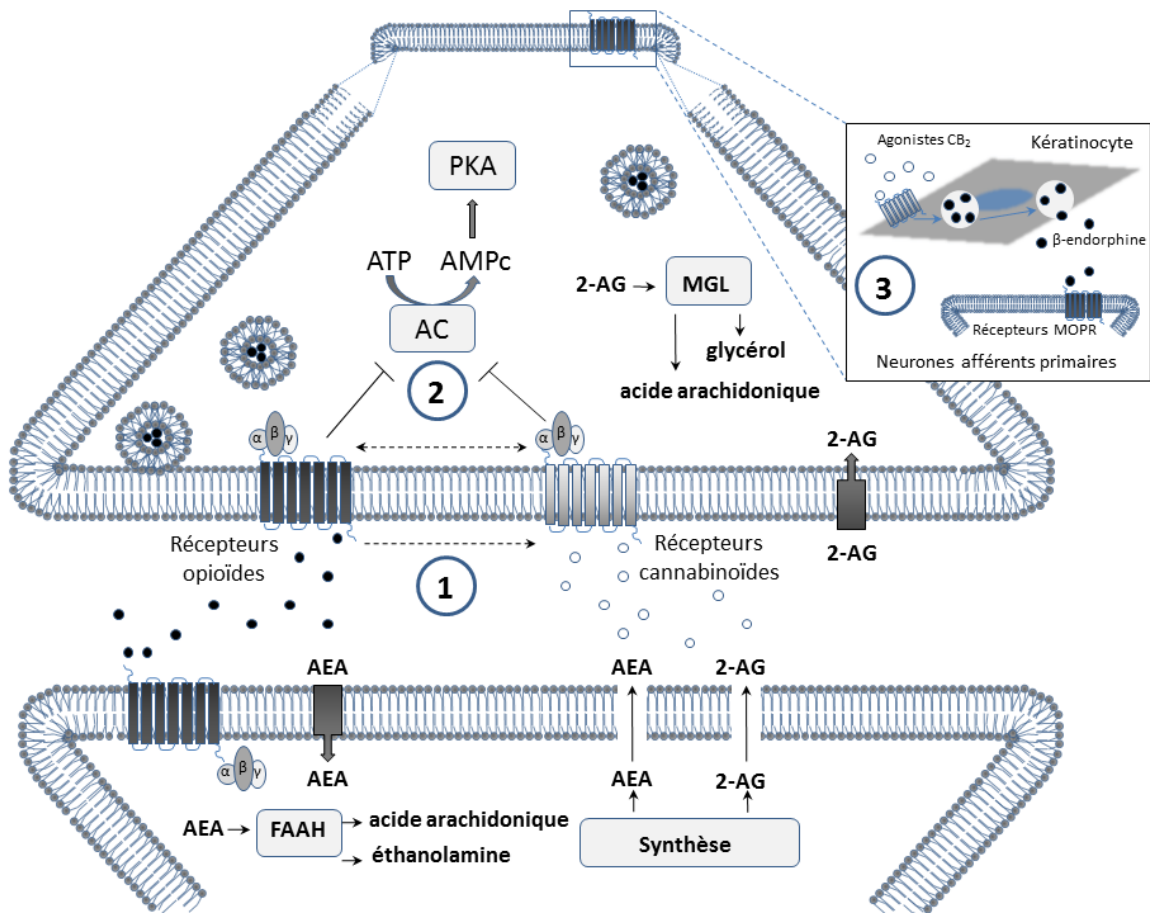


Figure 19. Trois principales hypothèses liées aux mécanismes des interactions entre les opioïdes et les cannabinoïdes. Ces trois hypothèses comprennent: 1) des altérations au sein du système endocannabinoïde après une exposition aux opioïdes, tels que des altérations de la fonctionnalité des récepteurs, des niveaux d'endocannabinoïdes, de la densité des récepteurs cannabinoïdes et de la transduction du signal; 2) des interactions au niveau de leurs mécanismes de transduction du signal intracellulaire ou de l'interaction directe avec le récepteur, en termes de perturbation de la disponibilité des sous-unités des protéines G, des protéines régulatrices associées ou en aval des cascades de signalisation par les deux récepteurs situés relativement près l'un de l'autre; 3) une libération et/ou une synthèse de peptides opioïdes endogènes suite à l'administration de cannabinoïdes, tel qu'illustré par l'activation périphérique des récepteurs cannabinoïdes CB₂ qui peuvent stimuler la libération locale de β-endorphine, un opioïde endogène, par des cellules telles que les kératinocytes et donc produire une antinociception périphérique *via* l'activation des récepteurs opioïdes MOP localisés sur les terminaisons libres des neurones sensitifs primaires (Ibrahim et coll., 2005). AC: adénylate cyclase; ATP: adénosine triphosphate; AMPc: AMP cyclique; AEA:

anandamide; 2-AG : 2-arachidonyl glycérol; FAAH : amide hydrolase d'acides gras; MGL : monoacylglycérol lipase. Figure modifiée d'après (Desroches & Beaulieu, 2010).

4 IMPLICATIONS CLINIQUES

Les agonistes sélectifs pour MOP (par exemple la morphine, le fentanyl ou la codéine) sont couramment prescrits comme analgésiques afin de soulager diverses conditions douloureuses graves puisqu'ils sont, sans contredit, les plus puissants analgésiques connus à ce jour (Bodnar, 2012). Malgré leur potentiel thérapeutique incroyable, leur utilisation est également associée à divers effets secondaires tels que de la constipation, des nausées et vomissements, de la dépression respiratoire et de la sédation (Lawlor & Bruera, 1998). De plus, une utilisation prolongée de ces composés provoque le développement d'une tolérance analgésique (Onofrio & Yaksh, 1983; Krames et coll., 1986). En raison de ces effets indésirables, le tiers des patients souffrant de douleur chronique choisissent d'abandonner le traitement opioïdérique (Devulder et coll., 2005). Les recherches se sont donc dirigées vers des thérapies alternatives permettant l'utilisation d'analgésiques produisant moins d'effets indésirables, telles que l'association des composés opioïdes et cannabinoïdes.

Les cannabinoïdes peuvent être utilisés pour le traitement de la douleur chronique qui est relativement réfractaire à la plupart des analgésiques courants dont les opioïdes. En outre, la capacité des cannabinoïdes à contrôler la douleur est souvent améliorée par un traitement parallèle des troubles du sommeil, de la perte d'appétit, des nausées et vomissements, des spasmes musculaires et d'une grande variété d'autres symptômes. Les interactions synergiques entre les opioïdes et les cannabinoïdes dans de multiples modèles animaux appuient la possibilité d'une pertinence clinique chez l'humain.

Des études comparant l'efficacité des opioïdes et des cannabinoïdes ont indiqué que des doses orales de Δ^9 -THC n'ont pas été plus efficaces que la codéine comme analgésique, tout en produisant quelques effets secondaires dysphoriques (Noyes et coll., 1975; Campbell et coll., 2001). Conformément à ces résultats, une étude récente comparant l'efficacité de la dihydrocodéine avec un cannabinoïde synthétique, la nabilone, a montré que la

dihydrocodéine soulage mieux la douleur que la nabilone avec des effets secondaires un peu moindres, même si aucun événement indésirable majeur ne s'est produit avec ces médicaments (Frank et coll., 2008). De plus, une autre étude a montré que l'ajout d'une forte dose de nabilone à un régime de morphine contrôlée par le patient est associé à une augmentation des scores de douleur chez les patients ayant subi une chirurgie majeure (Beaulieu, 2006).

Des études cliniques appuient l'administration combinée de cannabinoïdes et d'opioïdes pour moduler la douleur inflammatoire au niveau périphérique (Sawynok, 2003), la douleur aiguë (Naef et coll., 2003; Roberts et coll., 2006) ainsi que la douleur chronique (Narang et coll., 2008). En effet, l'efficacité combinée de la morphine et du Δ^9 -THC pour traiter la douleur aiguë a récemment été évaluée dans deux études cliniques qui ont noté un effet antinociceptif, bien que limité, pour la combinaison des deux composés. Cependant, Roberts et ses collaborateurs ont montré une légère amélioration de certaines dimensions de la douleur, se limitant à la composante affective de la douleur (Roberts et coll., 2006). Une autre étude examinant l'effet de l'ajout du dronabinol, un dérivé synthétique du Δ^9 -THC cannabinoïde, au régime des patients souffrant de douleurs chroniques réfractaires aux opioïdes a conclu que le dronabinol est un adjuvant utile pour soulager ces patients (Narang et coll., 2008).

Il y a un intérêt considérable à combiner différents composés opioïdes et cannabinoïdes dans le but d'améliorer l'activité de ces deux systèmes. Bien qu'à de fortes doses ces substances produisent des effets analgésiques, leur administration peut être associée à des effets secondaires dans le cas des opioïdes (voir ci-dessus) comparativement à l'anxiété, aux maux de tête, à la sécheresse de la bouche, à l'euphorie et la tachycardie associés avec l'administration de cannabinoïdes. La plupart des études cliniques se concentrent sur une gamme de doses limitées pour éviter l'apparition de ces effets secondaires indésirables. Par conséquent, l'administration conjointe de faibles doses de Δ^9 -THC et de morphine pourrait être une alternative qui minimise les effets secondaires indésirables associés à des doses plus élevées de n'importe lequel des deux médicaments

administré seul. En fait, un brevet a même été soumis pour une nouvelle invention qui est une molécule hybride morphine / Δ^9 -THC destinée à la modulation de la douleur (Holtman & Crooks, 2008). Des études cliniques se sont également intéressées à la synergie entre ces deux systèmes, notamment chez des patients présentant une douleur chronique non cancéreuse. Le groupe d'Abrams et de ses collaborateurs ont effectivement démontré que l'ajout d'une dose de 900 mg de cannabis vaporisé augmente l'efficacité de l'oxycodone et de la morphine chez ces patients (Abrams et coll., 2011), sans que le cannabis vaporisé n'affecte les niveaux plasmatiques de morphine et d'oxycodone. De plus en plus de données montrent que les cannabinoïdes et les opioïdes possèdent des effets synergiques significatifs au niveau clinique et que ces effets ne sont pas dus uniquement aux effets des cannabinoïdes sur le métabolisme des opioïdes, bien qu'un mécanisme pharmacodynamique n'ait pas été évalué (Chen & Hoffman, 2012).

Une étude récente réalisée auprès de patients cancéreux souffrant de douleurs résistantes à de fortes doses d'opioïdes a montré que l'utilisation à long terme du Sativex® (nabiximols) a été généralement bien tolérée, sans aucune perte d'effet analgésique au fil du temps (Johnson et coll., 2010; Johnson et coll., 2012). En outre, les patients qui ont conservé ce traitement n'ont pas cherché à augmenter les doses ou eu recours à d'autres analgésiques tout au long de leur traitement, ce qui suggère que l'utilisation des cannabinoïdes dans le traitement adjuvant de la douleur cancéreuse réfractaire à de fortes doses d'opioïdes pourrait s'avérer un choix profitable. En somme, bien que les cannabinoïdes soient efficaces dans les modèles animaux et qu'ils possèdent un potentiel thérapeutique certain, de futures études cliniques sont nécessaires afin de confirmer les résultats des études menées sur l'utilisation thérapeutique des composés cannabinoïdes en utilisant des substances normalisées au sein de populations cliniques bien définies (Ware, 2011).

Section V. Problématique et hypothèses de recherche

L'utilisation de thérapies alternatives pour le traitement de la douleur chronique s'avère nécessaire étant donné le nombre élevé de patients qui ne sont pas soulagés par la médication actuelle, les nombreux effets indésirables engendrés par les analgésiques disponibles, en particulier les opioïdes (morphine et dérivés), et le nombre limité de nouvelles options thérapeutiques. Les effets analgésiques des endocannabinoïdes, en plus du fait qu'ils produisent moins d'effets secondaires que les analgésiques actuellement utilisés en clinique, font des récepteurs cannabinoïdes des cibles intéressantes dans le traitement de la douleur chronique, tout particulièrement au niveau périphérique. Il a été démontré que les terminaisons périphériques des nocicepteurs sont majoritairement impliquées dans l'analgésie produite par les endocannabinoïdes (Agarwal et coll., 2007). Par contre, bien que l'utilisation des agonistes du système cannabinoïde dans divers modèles de douleur ait démontré son implication dans la modulation de la sensibilisation périphérique et centrale des nocicepteurs, les mécanismes qui sous-tendent ces effets ne sont pas encore clairement élucidés. En effet, les mécanismes d'action détaillés des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ dans la modulation de la douleur demeurent incertains. Dans le cadre de cette thèse, il était donc important d'évaluer les effets antinociceptifs induits suite à la modulation du système endocannabinoïde grâce à l'utilisation d'endocannabinoïdes (anandamide et 2-AG) et d'inhibiteurs de leur dégradation (URB597; FAAH et URB602; MGL) dans des modèles animaux de douleurs inflammatoire et neuropathique. Il était plus précisément important d'identifier la contribution exacte des récepteurs cannabinoïdes périphériques grâce à des outils pharmacologiques (antagonistes spécifiques pour chacun des récepteurs cannabinoïdes) et génétiques (deux lignées de souris génétiquement modifiées chez lesquelles le gène encodant les récepteurs CB₁ (*cnr1*) ou CB₂ (*cnr2*) a été invalidé).

En considérant les différentes familles d'analgésiques, les divers mécanismes qui modulent la douleur ainsi que les nombreuses études sur les combinaisons possibles entre les traitements actuels, on réalise qu'il existe un lien étroit entre les systèmes opioïde et cannabinoïde : localisation identique des récepteurs le long des voies de la douleur, même

famille de récepteurs, présence de substances endogènes, effets similaires, analgésie synergique, etc. Par ailleurs, les interactions entre les systèmes cannabinoïde et opioïde pour la modulation de la douleur peuvent être bidirectionnelles, suggérant un mécanisme d'action commun. Bien que l'implication du système opioïde dans les effets antinociceptifs du système cannabinoïde soit démontrée, à l'inverse le rôle et l'importance du système cannabinoïde dans les effets antinociceptifs des opioïdes demeurent encore incertains. En effet, les expériences utilisant des outils pharmacologiques pour modifier la signalisation du système cannabinoïde ont suggéré que les endocannabinoïdes sont clairement impliqués dans les effets antinociceptifs des opioïdes, alors que les études utilisant des souris dont les gènes encodant les récepteurs cannabinoïdes ont été invalidés ne confirment pas cette implication. Ainsi, il était donc intéressant d'étudier ces interactions et de mettre en évidence la participation du système cannabinoïde dans la modulation de la douleur inflammatoire lors de l'activation périphérique et spinale du système opioïde par la morphine. Les implications cliniques d'une possible interaction entre les systèmes cannabinoïde et opioïde, notamment au niveau périphérique, sont d'une grande importance thérapeutique puisqu'elles représentent une nouvelle méthode pour exploiter les effets analgésiques des deux systèmes tout en évitant les effets psychotropes indésirables, les effets secondaires systémiques de chacun des deux systèmes ainsi que le développement d'une éventuelle tolérance.

Section VI. Objectifs

Dans le cadre de cette thèse, l'objectif général était d'approfondir les connaissances actuelles quant au rôle et à l'implication du système cannabinoïde dans la modulation de la douleur inflammatoire et neuropathique. Il s'agissait donc :

- ✓ d'évaluer à l'aide de mesures du comportement animal l'efficacité des endocannabinoïdes dans l'amélioration des symptômes de la douleur inflammatoire (test à la formaline) et neuropathique (ligature partielle du nerf sciatique) grâce à l'administration périphérique de cannabinoïdes exogènes ainsi que d'inhibiteurs des enzymes de dégradation des endocannabinoïdes, séparément ou en combinaison ;
- ✓ d'élucider les mécanismes par lesquels les cannabinoïdes endogènes (anandamide et 2-AG) et les inhibiteurs de leur dégradation (URB597; FAAH et URB602; MGL) produisent leurs effets antinociceptifs, notamment par l'activation directe ou indirecte des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et/ou CB₂, grâce à la combinaison complémentaire d'outils pharmacologiques (antagonistes spécifiques pour chacun des récepteurs cannabinoïdes) et génétiques (deux lignées de souris génétiquement modifiées chez lesquelles le gène codant pour les récepteurs CB₁ (*cnr1*) ou CB₂ (*cnr2*) a été invalidé) ;
- ✓ de confirmer que les effets observés lors de la modulation du système cannabinoïde sont périphériques (localisés au site d'injection) et non systémiques (effets centraux) à l'aide d'une évaluation des effets antinociceptifs au niveau controlatéral dans les modèles de douleur utilisés.

Dans un deuxième temps, à la lumière des résultats obtenus suite à la réalisation des premiers objectifs de recherche, notre second objectif était d'explorer l'implication du système cannabinoïde en interaction avec le système opioïde, et d'évaluer si ces deux systèmes interagissaient à différents niveaux du névraxe. Il s'agissait donc :

- ✓ d'évaluer par des mesures du comportement animal le rôle du système cannabinoïde dans les effets antinociceptifs du système opioïde suite à l'administration de morphine au niveau périphérique, spinal et central chez des souris dont les gènes encodant les récepteurs cannabinoïdes ont été invalidés (souris *cnr1KO* et *cnr2KO*) ;

- ✓ d'explorer les modifications compensatoires possibles des souris *cnr1KO* et *cnr2KO* grâce à l'examen des niveaux et profils d'expression, des propriétés de liaison et de l'efficacité du couplage récepteur/protéine G du récepteur opioïde MOP au niveau spinal par des techniques pharmacologiques et de biologie moléculaire (liaison spécifique au récepteur par saturation, immunofluorescence contre les MOP au niveau spinal et techniques de radio-liaison).

Les résultats traitant du rôle du système cannabinoïde dans la modulation de la douleur inflammatoire et neuropathique sont présentés dans les trois premiers articles, tandis que le quatrième article met en évidence l'implication du système cannabinoïde dans les effets antinociceptifs induits par le système opioïde au niveau de la modulation de la douleur inflammatoire.

Section VII. Articles

1 ARTICLE 1 PUBLIÉ DANS LA REVUE *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY*

« *The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB₂ receptors* »

Short running title: Peripheral antinociceptive effects of 2-AG

Josée Guindon^{1,3}, Julie Desroches^{1,3} & Pierre Beaulieu^{1,2}

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Québec, Canada
and ²Department of Anesthesiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Québec,
Canada

³ **These authors contributed equally to the work**

Br J Pharmacol. 2007 Mar ; 150 (6) : 693-701.

Article 1. Contribution des co-auteurs:

JG : Conceptualisation du projet, participation à certaines expériences, analyses statistiques, participation à l'écriture de la section résultats du manuscrit et révision du manuscrit

JD : Réalisation de la majorité des expériences, analyses statistiques, écriture du manuscrit, montage des figures

PB : Conceptualisation du projet, écriture et révision du manuscrit, recherche des organismes subventionnaires

1.1 Abstract

Background and purpose: 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) is an endogenous cannabinoid with central antinociceptive properties. Its degradation is catalysed by monoacylglycerol lipase (MGL) whose activity can be inhibited by URB602, a new synthetic compound. The peripheral antinociceptive properties of 2-AG and URB602 in an inflammatory model of pain have not yet been determined. This was realised in the presence or absence of cannabinoid CB₁ (AM251) and CB₂ (AM630) receptor antagonists.

Experimental approach: Formalin tests were performed in 125 Wistar rats allocated to 19 groups: (1) control; (2-6) 2-AG (0.01-0.1-1-10-100 µg); (7) AM251 (80 µg); (8) AM251 + 2-AG (10 µg); (9) AM630 (25 µg); (10) AM630 + 2-AG (10 µg); (11-16) URB602 (0.1-1-10-30-100-500 µg); (17) 2-AG + URB602 (ED₅₀); (18) AM251 + URB602 (ED₅₀); (19) AM630 + URB602 (ED₅₀). Drugs were injected s.c. in the dorsal surface of the hind paw (50 µL) 15 min before 2.5% formalin injection into the same paw.

Key results: 2-AG and URB602 produced dose-dependent antinociceptive effects for the early and late phases of the formalin test with ED₅₀s of 0.65 µg ± 0.455 and 67.93 µg ± 14.31 for the latter phase, respectively. Their combination at ED₅₀ doses produced an additive antinociceptive effect. These effects were inhibited by AM630 but not by AM251 for 2-AG and by the two cannabinoid antagonists for URB602.

Conclusions and implications: Locally injected 2-AG and URB602 decreased pain behaviour in a dose-dependent manner in an inflammatory model of pain. The antinociceptive effect of 2-AG was mediated by the CB₂ receptor.

Key words: 2-arachidonoyl glycerol; URB602; endocannabinoids; cannabinoid receptors; monoacylglycerol lipase; formalin test; inflammatory pain.

LIST OF ABBREVIATIONS

2-AG: 2-arachidonoyl glycerol

AUC: area under the curve

CB: cannabinoid

CPS-WST_{0,1,2}: Composite pain score-weighted scores technique

DMSO: dimethylsulfoxide

DRG: dorsal root ganglia

FAAH: fatty-acid amide hydrolase

MGL: monoacylglycerol lipase:

NGF: nerve growth factor

PEA: palmitoylethanolamide

PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptor-alpha

1.2 Introduction

Δ^9 -tetrahydrocannabinol, the major psychoactive component of cannabis, activates two distinct G protein-coupled receptors, identified as the cannabinoid CB₁ (Matsuda et al., 1990) and CB₂ receptors (Munro et al., 1993). The CB₁ receptor is primarily expressed throughout the central nervous system including the spinal cord and on sensory neurons in dorsal root ganglia (DRG) and in the periphery (Hohmann & Herkenham, 1999; Farquhar-Smith et al., 2000; Rice et al., 2002; Walczak et al., 2005) whereas CB₂ expression seems restricted to peripheral tissues with immune functions (Munro et al., 1993; Galiègue et al., 1995). The two major and most investigated endogenous cannabinoids are anandamide and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG).

For many years, evidence has accumulated suggesting that cannabinoids can produce antinociception through peripheral mechanisms involving CB₁ (Hohmann, 2002 for review) and CB₂ receptors (Malan et al., 2002 for review). In rodents, anandamide attenuated formalin-induced nociceptive behaviours (Calignano et al., 1998; Guindon et al. 2006a,b) when administered locally into the hind paw. Although Richardson et al. (1998, 2000) have shown that cannabinoid antihyperalgesic effects are predominantly mediated by CB₁ cannabinoid receptors as most of cannabinoid effects are blocked by CB₁-selective antagonists, there is evidence that CB₂ mechanisms may also contribute to the antinociceptive effects of cannabinoids (Ibrahim et al., 2006). Indeed, Hanus et al., (1999) have shown that HU308, a CB₂ selective agonist, could suppress the late-phase response in the formalin test when injected intraperitoneally. Moreover, Calignano et al., (1998) and Jaggar et al. (1998) both demonstrated that palmitoylethanolamide, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist (Lo Verme et al., 2005) whose anti-inflammatory effects are antagonized by a CB₂ receptor antagonist, produced antinociception in the formalin test (late phase). In addition, AM1241, a CB₂ selective agonist, attenuated thermal nociception and hyperalgesia (Malan et al., 2001; 2002; Quartilho et al., 2003) and suppressed hyperalgesia evoked by intradermal administration of capsaicin (Hohmann et al.,

2004). These data suggest a potential therapeutic relevance of cannabinoid CB₂ receptors as a target for pain treatment without having unwanted central side effects.

There is also some evidence that 2-AG, but not anandamide, acts as a potent and full-efficacy agonist of the cannabinoid CB₂ receptor (Sugiura et al., 2000; Gonsiorek et al., 2000; Maresz et al., 2005). 2-AG is hydrolysed to arachidonic acid and glycerol by an enzyme, monoacylglycerol lipase (MGL) (Dinh et al., 2002; 2004; Saario et al., 2004), although some data suggested that 2-AG might also be metabolized by anandamide amidohydrolase/fatty acid amide hydrolase (FAAH) (Di Marzo et al., 1998; Goparaju et al., 1998; Lang et al., 1999). However, Kathuria et al. (2003) demonstrated that URB597, a selective FAAH inhibitor that greatly reduced anandamide degradation in the rat brain, had no effect on 2-AG levels. Moreover, Lichtman et al. (2002) have shown that 2-AG breakdown is preserved in mutant FAAH^{-/-} mice although anandamide hydrolysis was almost completely absent. Thus, URB602, a non-competitive MGL inhibitor that blocks 2-AG hydrolysis was developed (Hohmann et al., 2005; Makara et al., 2005), and found to be more potent than URB597 in enhancing 2-AG levels and antinociception in stress models.

Therefore, the present study was designed to investigate the peripherally mediated antinociceptive effects of 2-AG, URB602, separately and in combination, after intraplantar injection, in a model of inflammatory pain. The mechanism by which 2-AG might produce its antinociceptive effect was also investigated by using specific antagonists for the cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors.

1.3 Methods

1.3.1 Animals

This research protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the University of Montreal and all procedures related to the use of animals conformed to the guidelines of the Canadian Council for Animal Care. One hundred and twenty-five male Wistar rats (Charles River, St-Constant, Quebec, Canada) weighing 180-220 g, at the time of

testing, were housed two per cage in standard plastic cages with sawdust bedding in a climate-controlled room, under a 12h light/dark cycle. They were allowed free access to food pellets and water.

1.3.2 Formalin test

Rats were acclimatized to the testing environment (a clear Plexiglass box 29 x 29 x 25 cm) for 15 min or until cessation of explorative behaviour. 2-AG (0.01 - 0.1 - 1 - 10 or 100 µg in 50 µL), URB602 (0.1, 1, 10, 30, 100 or 500 µg in 50 µL), AM251 (80 µg in 50 µL), and AM630 (25 µg in 50 µL) were injected subcutaneously (s.c.) in the dorsal surface of the right hind paw 15 min before the injection of 2.5% formalin (50 µL) next to the previous injection. Following each injection, the rat was immediately put back in the observation chamber. Nociceptive behaviour was observed with the help of a mirror angled at 45° below the observation chamber. Observation of the animal's behaviour was made every 5 min and for 60 min, starting after formalin administration (Tjølsen et al., 1992). In each 5-min period, the total time the animal spent in three following different behavioural categories was recorded: (1) the injected paw has little or no weight placed on it; (2) the injected paw is raised; (3) the injected paw is licked, shaken or bitten. Nociceptive behaviour was quantified using the composite pain score-weighted scores technique (CPS-WST_{0,1,2}) calculated for the first (0-15 min) and second (15-50 min) phase of the behavioural response (Watson et al., 1997). The area under the curve (AUC) which corresponds to CPS-WST_{0,1,2} x time (min) was calculated for the early (first) phase (0-15 min) and the late (second) phase (15-50 min) using the trapezoidal rule.

1.3.3 Protocol

The experiments were conducted in a randomized manner by the same experimenter, without knowledge of the treatments. In a first study, the dose-response curve for 2-AG was determined using the data from the late phase. In a second study, the antinociceptive effects

of 2-AG (at 10 µg, an analgesic dose, dissolved in 2% acetonitrile) were studied in the absence or in presence of cannabinoid antagonists to determine whether these effects were mediated through the CB₁ or the CB₂ receptor: AM251 (80 µg; Malan et al., 2001; Guindon & Beaulieu, 2006; Guindon et al., 2006a, b) and AM630 (25 µg; Malan et al., 2001; Guindon & Beaulieu, 2006; Guindon et al., 2006a, b) were co-injected with the 2-AG. In a third study, the dose-response curve for URB602 was determined using the data from the late inflammatory phase. In a fourth study, the effects of 2-AG, URB602, and their combination were observed to note any additive or synergic effect of the drugs. In a fifth study, the antinociceptive effects of URB602 (at ED₅₀ dose, 70 µg in 6.6% dimethylsulphoxide (DMSO)) were studied in the absence or in presence of cannabinoid antagonists to determine whether these effects were mediated through the CB₁ or the CB₂ receptor: AM251 and AM630 were co-injected with URB602. For the second study (n = 7 per group) and for all of the other studies (n = 4 per group), the tested drugs were dissolved in the same total volume (50 µL) and administered in the right hind paw. Previous experiments in the formalin test have already shown that there was no difference in pain behaviour between 0.9% NaCl and 8% DMSO in normal saline injected in the paw of rats (Guindon et al., 2006a, b).

Finally, in order to exclude any possible systemic effect of the drugs, 100 µg of 2-AG and 500 µg of URB602 were administered s.c. on the dorsal surface of the contralateral (left hind paw) or ipsilateral paws (n = 4 and n=3 per group, respectively).

1.3.4 Paw edema

At the end of the formalin test, paw oedema was measured at the base of the right hind paw using a digital micrometer (Mitutoyo Corporation, USA) with an instrumental error of ± (maximum measuring length/75 µm) and a resolution of 0.001 mm (Petricevic et al., 1978; Nackley et al., 2003b; Ghilardi et al., 2004; Guindon et al., 2006a, b).

1.3.5 Statistical analysis

Pain behaviour for each treatment group was expressed as mean \pm s.e.m. The dose-response curve for 2-AG and URB602 were determined using ALLFIT software (De Léan et al., 1978). In the second study, the antinociceptive effects of 2-AG in absence or presence of cannabinoid antagonists were assessed for significance using factorial experimental design (Winer, 1971). In the next study, the effects of 2-AG, URB602 and their combination at ED₅₀ dose were assessed for significance using factorial experimental design. In the last study, the antinociceptive effects of URB602 in absence or presence of cannabinoid antagonists were assessed for significance using factorial experimental design. To compare ipsi vs. contralateral paw injections of the drugs (2-AG and URB602), an analysis of variance adapted for factorial experimental design was used. The different components of the total variation were settled *a priori* using multiple regression analysis (Draper and Smith, 1998). The critical level of significance was set at 5 % ($P < 0.05$).

1.3.6 Drug sources and preparation

2-AG, an endogenous cannabinoid, is an agonist with a threefold selectivity for the CB₁ receptor ($K_i = 0.47$ mM) over the CB₂ receptor ($K_i = 1.4$ mM) (Lee et al., 1995; Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1996). 2-AG was purchased from Sigma (St-Louis, MO, USA) in acetonitrile solution and further dissolved in normal saline (0.9% NaCl in water) to a final concentration of 0.002-20% acetonitrile. AM251 and AM630 are 306-fold (Gatley et al., 1996, 1997) and 70-165-fold (Pertwee et al., 1995; Hosohata et al., 1997; Ross et al., 1999; Malan et al., 2001) selective for CB₁ and CB₂ receptor antagonists, respectively. AM251 and AM630 were dissolved in normal saline containing 8 and 2.5% DMSO, respectively. AM251 and AM630 were purchased from Tocris (Ellisville, MO, USA). URB602, which is a selective inhibitor of MGL, was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) and further dissolved in normal saline containing between 0.01 and 33 % DMSO. Both 2-AG and URB602 were stored at -20°C, protected from light and were prepared freshly on the day of the experiment.

1.4 Results

1.4.1 *Antinociceptive effects of 2-AG and involvement of cannabinoid receptors*

2-AG decreased pain behaviour in the formalin test with an ED₅₀ of 0.65 µg ± 0.455 for the late phase (Figure 1). Pain behaviour following injection of 2-AG in the ipsilateral hind paw was statistically different when compared with the control (NaCl 0.9%) group only for the late phase of the formalin test (Figure 2A). Pain behaviour following injection of 2-AG in the contralateral hind paw was not statistically different when compared with the control (NaCl 0.9%) group (Figure 2B).

When given locally (dorsal surface of the paw) at 10 µg, 2-AG produced an antinociceptive effect when compared with the control group reaching significance only for the late phase of the formalin test (Figure 3A, 3C). This antinociceptive effect was inhibited only by AM630 as there was no statistical difference between this antagonist given alone compared with its combination with 2-AG for the early and late phases, respectively (Figure 3A, 3B, 3C). Indeed, pain behaviour was significantly greater in the AM630 / 2-AG co-administration group compared with the group receiving 2-AG alone.

1.4.2 *Paw oedema*

Oedema of the injected paw did not differ among the groups; thus neither 2-AG nor AM251 or AM630 influenced paw oedema (Figure 3D).

1.4.3 *Antinociceptive effects of URB602, 2-AG and their combination at ED₅₀ doses*

URB602 decreased pain behaviour in the formalin test with an ED₅₀ of 68 µg ± 14.3 for the late phase (Figure 4). Pain behaviour following injection of URB602 in the ipsilateral hind paw was statistically different when compared with the control (NaCl 0.9%) group either for the early or the late phase of the formalin test (Figure 5A). Pain behaviour following injection

of URB602 in the contralateral hind paw was not statistically different when compared with the control (NaCl 0.9%) group (Figure 5B).

When given locally (dorsal surface of the paw) at doses corresponding to their ED₅₀, 2-AG, URB602 and their combination produced a significant antinociceptive effect when compared with the control group either for the first (Figure 6A, 6B) or the second phase (Figure 6A, 6C) of the formalin test. The combination of 2-AG with URB602 was significantly different when compared with each drug given alone for the late phase (Figure 6A, 6C), revealing an additive antinociceptive effect of this combination.

1.4.4 Paw oedema

Oedema of the injected paw did not differ among the groups; 2-AG and URB602 did not influence paw oedema when given alone, neither did their combination (Figure 6D).

1.4.5 Antinociceptive effects of URB602 and involvement of cannabinoid receptors

When given locally (dorsal surface of the paw) at 70 µg, URB602 produced an antinociceptive effect when compared with the control group, reaching significance only for the late phase of the formalin test (Figure 7A, 7C). This antinociceptive effect was inhibited by AM251 and AM630 as there was no statistical difference between those antagonists given alone compared with their combination with URB602 for the early and late phases, respectively (Figure 7A, 7B, 7C).

1.4.6 Paw oedema

Oedema of the injected paw did not differ among the groups: neither URB602 nor AM251 nor AM630 influenced paw oedema (Figure 7D).

1.5 Discussion

In this study, we have shown that local administration of 2-AG, an endocannabinoid and URB602, a selective MGL inhibitor, induced a dose-dependent antinociceptive effect in an inflammatory pain model. These effects were locally mediated and not systemic as 2-AG and URB602 given in the contralateral paw were not antinociceptive at doses higher than the ED₅₀ doses used in the ipsilateral paw. Moreover, the antinociceptive effects of 2-AG were prevented by AM630, a selective CB₂ receptor antagonist, but not by AM251, a selective CB₁ receptor antagonist. It is important to note that the antinociceptive effects of non-selective (ibuprofen) or selective cyclooxygenase-2 inhibitors (rofecoxib) in this model were not affected by these CB₁ or CB₂ antagonists (Guindon et al., 2006a, b). Thus, these results suggest that 2-AG produces its local anti-inflammatory effects by activating CB₂ receptors in the periphery. Furthermore, local administration of 2-AG with URB602 produced an additive antinociceptive effect.

Although controversial (Coderre et al., 1990), there is evidence for the contribution of peripheral nociceptive activity to phase 2 of the behavioural response to formalin. Indeed, primary afferent activity is required for the expression of phase 2 nociceptive behaviours, and central sensitization alone does not underlie phase 2 (McCall et al., 1996; Puig & Sorkin, 1995). These authors report that C-fibres exhibit increased activity following the injection of formalin and that this activity occurs during the time periods corresponding to both phase 1 and phase 2, but not interphase, of the behavioural response. Furthermore, Pitcher and Henry (2002) have provided evidence for an essential role of afferent input during the second phase of the formalin test in generating and maintaining the elevated discharge of spinal nociceptive dorsal horn neurones in the second phase. Taken together, these findings on the second phase of the formalin test may favour a wider pharmacological approach to antinociception. Thus along with inhibitors of synaptic transmission from nociceptive afferents, antinociceptive treatments targeted at inhibiting primary afferent activity at a peripheral site could also be effective (Pitcher and Henry, 2002). These observations are important because in the presence of carrageenan inflammation, AM1241 (a CB₂ receptor

agonist) following both systemic (i.v.) and intraplantar injections, specifically suppressed C-fibre-mediated activity and wind-up in wide dynamic range neurones (Nackley et al., 2004). Similar results were observed following activation of spinal cannabinoid receptors by HU210 that suppressed C-fibre-mediated post-discharge responses (a measure of neuronal hyperexcitability) but through a CB₁ mechanism (Drew et al., 2000).

Moreover, CB₂-selective agonists have recently been shown to produce antinociception in models of acute, inflammatory, and nerve injury-induced nociception (Hanus et al., 1999; Clayton et al., 2002; Malan et al., 2002; Ibrahim et al., 2003, 2006; Nackley et al., 2003a; Quartilho et al., 2003). There is evidence that selective activation of peripheral CB₂ receptors is sufficient to display antinociceptive effects even though their exact distribution pattern in pain pathways and their precise role remain to be clarified. CB₂ receptors are mostly expressed in cells of the immune system such as B cells, T cells and macrophages (Munro et al., 1993; Galiègue et al., 1995). However, Munro et al. (1993) and Griffin et al. (1997) both demonstrated that CB₂ receptor messenger RNA (mRNA) was not detected in the brain, supporting the evidence that CB₂ receptors are absent in neurons of the central nervous system (Munro et al., 1993; Zimmer et al., 1999; Buckley et al., 2000) although recent data may have proved differently (Van Sickle et al., 2005). Nevertheless, such data predicts that CB₂ receptor-selective agonists will not produce the unwanted central nervous system effects, as caused by a CB₁-selective cannabinoid agonist. Moreover, there are also reports on the presence of CB₂ receptor mRNA in inflammatory and immune cells at levels 10-100 times those of CB₁ receptor mRNA (Facci et al., 1995; Galiègue et al., 1995) and on peripheral nerve terminals (Pertwee et al., 1995; Griffin et al., 1997). Indeed, Clayton et al. (2002) have shown that activation of CB₂ receptors by HU210 is sufficient to induce a substantial anti-inflammatory and analgesic effect in the carrageenan model of inflammation.

Endocannabinoids such as anandamide and 2-AG are present in peripheral tissues and their concentrations in paw tissue have already been measured (Beaulieu et al., 2000). Furthermore, the expression of CB₁ and CB₂ receptors has recently been reported in rat and

mouse paw tissues (Walczak et al., 2005, 2006). Therefore, the antinociceptive effects of 2-AG may be mediated by a direct action on cannabinoid CB₂ receptors located in the injected paw. Indeed, 2-AG given on the contralateral side did not attenuate formalin-evoked pain behaviour, strongly suggesting that the effects of 2-AG were mediated by a local peripheral site of action. Similar results have been reported with anandamide administered locally (Guindon et al., 2006a, b). However, it remains to be demonstrated whether the antinociceptive effects of 2-AG are mediated through locally expressed CB₂ receptors and whether 2-AG itself is involved in this analgesic response. Moreover, the present study measured the antinociceptive effects of exogenously administered 2-AG and endogenous 2-AG may behave differently under physiological conditions.

However, other mechanisms by which CB₂ selective agonists induce antinociceptive effects may be involved. One possibility is that they could act on the peripheral terminals of primary afferent neurons (Malan et al., 2002), but their presence on peripheral neurons is still a matter of debate. Alternatively, an indirect mechanism may be involved; CB₂ selective receptor agonists could activate the CB₂ receptor on mast or other immune cells, thereby decreasing the inflammation-evoked release from local inflammatory cells of sensitizing molecules acting on the peripheral nociceptor (e.g. nerve growth factor, prostanoids, cytokines, adenosine triphosphate, 5-hydroxytryptamine or histamine) and thus decreasing the sensitivity of primary afferent neurons and inhibiting pain response (Malan et al., 2002). Another hypothesis is that CB₂ cannabinoid receptors may inhibit the responsiveness of primary afferent neurones by stimulating local release of the endogenous opioid endorphin from cells such as keratinocytes (Malan et al., 2004).

Moreover, a selective inhibition of 2-AG degradation could offer the opportunity to investigate the functions of 2-AG by blocking its deactivation and thus amplify its intrinsic actions and enhance its analgesic effects. Therefore, we have tested the hypothesis that a selective inhibitor of the 2-AG deactivating enzyme, MGL, may selectively elevate 2-AG concentrations in the periphery and thereby decrease pain behaviour. Thus, Hohmann et al. (2005) developed URB602, a non-competitive MGL inhibitor that blocks 2-AG hydrolysis in rat

brain slices without affecting FAAH-catalysed anandamide degradation. Interestingly, Makara et al. (2005) have shown that URB602 increased 2-AG levels and enhanced retrograde signalling from pyramidal neurons to GABAergic terminals in the hippocampus. Therefore, a possible mechanism for the antinociceptive effects of locally administered URB602 in the hind paw may involve the increase of 2-AG concentrations in the periphery. Moreover, the ability of inhibitors of either MGL or FAAH to magnify endocannabinoid-dependent, stress-induced analgesia also highlights the significance of these enzymes as previously unexploited targets for the treatment of pain and stress-related disorders (Hohmann et al., 2005). However, the specificity of URB602 for inhibiting MGL at the concentrations employed in the present study cannot readily be determined without measuring endocannabinoid levels in the peripheral paw tissue.

The fact that the antinociceptive effects of URB602 were inhibited by both cannabinoid antagonists was unexpected. Indeed, if URB602 inhibited MGL and therefore 2-AG degradation, we would have thought that AM251 would not interfere with the antinociceptive effects of URB602, as it did not when administered together with 2-AG. One explanation may be that 2-AG present locally in a high concentration acted on both CB₁ and CB₂ receptors to produce its antinociceptive effects. Another possibility is that, in the presence of an inhibitor of MGL, there is a shift of 2-AG catabolism towards FAAH, the enzyme responsible for the hydrolysis of anandamide, which is also responsible for the degradation of 2-AG (Di Marzo et al., 1998). In that case, an increased concentration of anandamide, which is also present in peripheral tissue, may explain the antinociceptive effects observed.

Furthermore, although URB602 is a selective inhibitor of MGL, it has low potency (Hohmann et al., 2005). Therefore, the use of a more potent and selective agent could be considered, such as URB754 which inhibits MGL activity with a IC₅₀ of about two orders of magnitude lower than URB602 (Makara et al., 2005). In addition, Begg et al. (2005) have shown recent evidence for cannabinoid receptors beyond CB₁ and CB₂. Thus, 2-AG may exert

its antinociceptive effects at uncharacterized CB₂-like receptors, activated by 2-AG and inhibited by AM630, a selective CB₂ receptor antagonist.

These findings are the first to demonstrate that peripherally injected 2-AG, URB602 and their combination decreased pain behaviour in a model of inflammatory pain. The present work provides evidence that activation of a cannabinoid CB₂ mechanism in the periphery is sufficient to decrease nociception in animal models of inflammatory pain. Finally, as cannabinoid-based drugs could be effective for the treatment of inflammatory pain responses, this approach is interesting because peripheral administration of drugs could avoid troublesome psychotropic and other systemic effects.

1.6 Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Association des Anesthésiologistes du Québec.

Conflict of interest: The authors state no conflict of interest

1.7 References

Beaulieu P, Bisogno T, Punwar S, Farquhar-Smith WP, Ambrosino G, Di Marzo V et al. (2000). Role of the endogenous cannabinoid system in the formalin test of persistent pain in the rat. *Eur J Pharmacol* 396: 85–92.

Begg M, Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Mo FM et al. (2005). Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* 106: 133–145.

Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC et al. (2000). Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB2 receptor. *Eur J Pharmacol* 396: 141–149.

Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394: 277–281.

Clayton N, Marshall FH, Bountra C, O'Shaughnessy CT (2002). CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. *Pain* 96: 253–260.

Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R (1990). Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 535: 155–158.

De Léan A, Munson PJ, Rodbard D (1978). Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose–response curves. *Am J Physiol* 235: E97–E102.

Di Marzo V, Bisogno T, Sugiura T, Melck D, De Petrocellis L (1998). The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide. *Biochem J* 331: 15–19.

Dinh TP, Freund TF, Piomelli D (2002). A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids* 121: 149–158.

Dinh TP, Kathuria S, Piomelli D (2004). RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Mol Pharmacol* 66: 1260–1264.

Draper NR, Smith H (1998). *Applied Regression Analysis*. Wiley: New York.

Drew LJ, Harris J, Millins PJ, Kendall DA, Chapman V (2000). Activation of spinal cannabinoid1 receptors inhibits C-fibre driven hyperexcitable neuronal responses and increases [35S]GTP γ S binding in the dorsal horn of the spinal cord of noninflamed and inflamed rats. *Eur J Neurosci* 12: 2079–2086.

Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A (1995). Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3376–3380.

Farquhar-Smith WP, Egertova M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice AS, Elphick MR (2000). Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci* 15: 510–521.

Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P et al. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232: 54–61.

Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A (1996). 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 307: 331–338.

Gatley SJ, Lan R, Pyatt B, Gifford AN, Volkow ND, Makriyannis A (1997). Binding of the non-classical cannabinoid CP 55,940, and the diarylpyrazole AM251 to rodent brain cannabinoid receptors. *Life Sci* 61: PL191–PL197.

Ghilardi JR, Svensson CI, Rogers SD, Yaksh TL, Mantyh PW (2004). Constitutive spinal cyclooxygenase-2 participates in the initiation of tissue injury-induced hyperalgesia. *J Neurosci* 24: 2727–2732.

Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW (2000). Endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol* 57: 1045–1050.

Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H, Yamamoto S (1998). Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett* 422: 69–73.

Griffin G, Fernando SR, Ross RA, McKay NG, Ashford ML, Shire D et al. (1997). Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur J Pharmacol* 339: 53–61.

Guindon J, Beaulieu P (2006). Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 50: 814–823.

Guindon J, LoVerme J, De Lean A, Piomelli D, Beaulieu P (2006a). Synergistic antinociceptive effects of anandamide, an endocannabinoid, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peripheral tissue: a role for endogenous fatty-acid ethanolamides? *Eur J Pharmacol* 550: 68–77.

Guindon J, De Léan A, Beaulieu P (2006b). Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. *Pain* 121: 85–93.

Hanus L, Breuer A, Tchilibon S, Shiloah S, Goldenberg D, Horowitz M et al. (1999). HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14228–14233.

Hohmann AG (2002). Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem Phys Lipids* 121: 173–190.

Hohmann AG, Farthing JN, Zvonok AM, Makriyannis A (2004). Selective activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses hyperalgesia evoked by intradermal capsaicin. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 446–453.

Hohmann AG, Herkenham M (1999). Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience* 92: 1171–1175.

Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R et al. (2005). An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435: 1108–1112.

Hosohata Y, Quock RM, Hosohata K, Makriyannis A, Consroe P, Roeske WR et al. (1997). AM630 antagonism of cannabinoid-stimulated [³⁵S]GTP gamma S binding in the mouse brain. *Eur J Pharmacol* 321: 1–3.

Ibrahim MM, Deng H, Zvonok A, Cockayne DA, Kwan J, Mata HP et al. (2003). Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10529–10533.

Ibrahim MM, Rude ML, Stagg NJ, Mata HP, Lai J, Vanderah TW et al. (2006). CB2 cannabinoid receptor mediation of antinociception. *Pain* 122: 36–42.

Jaggar SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS (1998). The antihyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain* 76: 189–199.

Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valino F, Duranti A, Tontini A et al. (2003). Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 9: 76–81.

Lang W, Qin C, Lin S, Khanolkar AD, Goutopoulos A, Fan P et al. (1999). Substrate specificity and stereoselectivity of rat brain microsomal anandamide amidohydrolase. *J Med Chem* 42: 1682.

Lee M, Yang KH, Kaminski NE (1995). Effects of putative cannabinoid receptor ligands, anandamide and 2-arachidonyl-glycerol, on immune function in B6C3F1 mouse splenocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 275: 529–536.

Lichtman AH, Hawkins EG, Griffin G, Cravatt BF (2002). Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 73–79.

Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A et al. (2005). The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol* 67: 15–19.

Makara JK, Mor M, Fegley D, Szabo SI, Kathuria S, Astarita G et al. (2005). Selective inhibition of 2-AG hydrolysis enhances endocannabinoid signaling in hippocampus. *Nat Neurosci* 8: 1139–1141.

Malan TP, Ibrahim MM, Deng H, Liu Q, Mata HP, Vanderah T et al. (2001). CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 93: 239–245.

Malan TP, Ibrahim MM, Makriyannis A, Porreca F (2004). CB2 cannabinoid receptors may produce peripheral analgesia by stimulating local release of endogenous opioids. 14th annual symposium on the cannabinoids Paestum, Italy.

Malan TP, Ibrahim MM, Vanderah TW, Makriyannis A, Porreca F (2002). Inhibition of pain responses by activation of CB2 cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 121: 191–200.

Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN (2005). Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem* 95: 437–445.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561–564.

McCall WD, Tanner KD, Levine JD (1996). Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neurosci Lett* 208: 45–48.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50: 83–90.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61–65.

Nackley AG, Makriyannis A, Hohmann AG (2003a). Selective activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses spinal Fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience* 119: 747–757.

Nackley AG, Suplita II RL, Hohmann AG (2003b). A peripheral cannabinoid mechanism suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience* 117: 659–670.

Nackley AG, Zvonok AM, Makriyannis A, Hohmann AG (2004). Activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses C-fiber responses and windup in spinal wide dynamic range neurons in the absence and presence of inflammation. *J Neurophysiol* 92: 3562–3574.

Pertwee R, Griffin G, Fernando S, Li X, Hill A, Makriyannis A (1995). AM630, a competitive cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci* 56: 1949–1955.

Petricevic M, Wanek K, Denko CW (1978). A new mechanical method for measuring rat paw edema. *Pharmacology* 16: 153–158.

Pitcher GM, Henry JL (2002). Second phase of formalin-induced excitation of spinal dorsal horn neurons in spinalized rats is reversed by sciatic nerve block. *Eur J Neurosci* 15: 1509–1515.

Puig S, Sorkin LS (1996). Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* 64: 345–355.

Quartilho A, Mata HP, Ibrahim MM, Vanderah TW, Porreca F, Makriyannis A et al. (2003). Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology* 99: 955–960.

Rice AS, Farquhar-Smith WP, Nagy I (2002). Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 243–256.

Richardson JD (2000). Cannabinoids modulate pain by multiple mechanisms of actions. *J Pain* 1: 2–14.

Richardson JD, Kilo S, Hargreaves KM (1998). Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain* 75: 111–119.

Ross RA, Brockie HC, Stevenson LA, Murphy VL, Templeton F, Makriyannis A et al. (1999). Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br J Pharmacol* 126: 665–672.

Saario SM, Savinainen JR, Laitinen JT, Jarvinen T, Niemi R (2004). Monoglyceride lipase-like enzymatic activity is responsible for hydrolysis of 2-arachidonoylglycerol in rat cerebellar membranes. *Biochem Pharmacol* 67: 1381–1387.

Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Tonegawa T, Nakane S, Kishimoto S et al. (1996). 2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of intracellular free Ca²⁺ in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 58–64.

Sugiura T, Kondo S, Kishimoto S, Miyashita T, Nakane S, Kodaka T et al. (2000). Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not Npalmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *J Biol Chem* 275: 605–612.

Tjølsen A, Berge OG, Hunnskaar S, Rosland JH, Hole K (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51: 5–17.

Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K et al. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310: 329–332.

Walczak JS, Pichette V, Leblond F, Desbiens K, Beaulieu P (2005). Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain. *Neuroscience* 132: 1093–1102.

Walczak JS, Pichette V, Leblond F, Desbiens K, Beaulieu P (2006). Characterization of chronic constriction of the saphenous nerve, a model of neuropathic pain in mice showing rapid molecular and electrophysiological changes. *J Neurosci Res* 83: 1310–1322.

Watson GS, Sufka KJ, Coderre TJ (1997). Optimal scoring strategies and weights for the formalin test in rats. *Pain* 70: 53–58.

Winer BJ (1971). *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw-Hill: New York.

Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5780–5785.

1.8 Figures legend

Figure 1

Dose-response curve for 2-AG in the inflammatory phase of the formalin test. Data is expressed as mean \pm s.e.m (n = 4 per group).

Figure 2

Antinociceptive effects of 2-AG after injection in the dorsal surface of the ipsilateral (A) and contralateral (B) hind paws 15 min before 2.5% formalin (50 μ L). (A) Upper shows the antinociceptive effects of an active comparator in the formalin test, ibuprofen a non-steroidal anti-inflammatory drug administered in the dorsal surface of the paw 15 min before formalin (data from Guindon et al., 2006; † and # indicate a significant difference compared with controls for the first and second phases of the formalin test, respectively). Data is expressed as mean \pm s.e.m (n = 4 per group). AUC for the inflammatory phase, # $P < 0.025$ for 2-AG 100 μ g vs control (NaCl 0.9 %) group. In (B), there was no effect of 2-AG ($F(1,6) = 0.05$ and 4.50 for the early and late phases, respectively) given contralaterally in the formalin test.

Figure 3

(A) Antinociceptive effect of 2-AG when administered at a dose of 10 μ g into the hind paws 15 min before 2.5% formalin (50 μ L). Effects of cannabinoid antagonists on the antinociceptive effects of 2-AG, for the acute (B) and inflammatory (C) phases of the test. Data is expressed as mean \pm s.e.m (n = 7 per group). AUC for the inflammatory phase, # ($F(1,36) = 35.61$) $P < 0.001$ for 2-AG vs control (NaCl 0.9 %) group; * $P < 0.001$ for 2-AG vs control (NaCl 0.9 %) group; † $P < 0.05$ (early phase), $P < 0.001$ (late phase) for AM251 + 2-AG vs AM251 group. Note that the effects of 2-AG were reversed by AM630 ($F(1,36) = 0.04$ and 0.18; AM630 alone vs 2-AG + AM630). In (D) the corresponding values of paw oedema are

shown. None of the treatments, 2-AG ($F(1,36) = 0.79$) or AM251 ($F(1,36) = 0.38$) or AM630 ($F(1,36) = 0.10$) modified the oedema. For all groups ($F(5,36) = 0.58$).

Figure 4

Dose–response curve for URB602 in the inflammatory phase of the formalin test. Data is expressed as mean \pm s.e.m ($n = 4$ per group).

Figure 5

Antinociceptive effects of URB602 after injection in the dorsal surface of the ipsilateral (A) and contralateral (B) hind paws 15 min before 2.5% formalin (50 ml). Data is expressed as mean \pm s.e.m ($n = 3$ per group). AUC for the acute phase, † ($F(1,4) = 98.19$) $P < 0.001$ for URB602 500 μg vs control (NaCl 0.9 %); AUC for the inflammatory phase, # ($F(1,4) = 257.99$) # $P < 0.001$ for URB602 500 μg vs control (NaCl 0.9 %) group. In (B), there was no effect of URB602 given in the contralateral paw ($F(1,4) = 5.25$ and 1.96 for the early and late phases, respectively).

Figure 6

(A) Antinociceptive effects of 2-AG, URB602 and their combination at ED_{50} doses when administered into the hind paws 15 min before 2.5% formalin (50 μL). Antinociceptive effects of the combination of 2-AG with URB602 for the acute (B) and the inflammatory (C) phases of the test. Data is expressed as mean \pm s.e.m ($n = 4$ per group). AUC for the acute phase, † ($F(1,12) = 16.15$) $P < 0.005$ for all the drugs vs control (NaCl 0.9 %) group; AUC for the inflammatory phase, # ($F(1,12) = 56.46$) $P < 0.001$ for all the drugs vs control (NaCl 0.9 %) group. * $P < 0.005$ for all the drugs vs control (NaCl 0.9 %) group; ‡ ($F(1,12) = 7.91$) $P < 0.025$ for URB602 + 2-AG vs 2-AG or URB602 given alone. In (D), values for the corresponding paw oedema are shown. No treatment affected oedema ($F(3,12) = 0.17$): neither 2-AG nor URB602 ($F(1,12) = 0.22$) nor their combination ($F(1,12) = 0.15$) modified the oedema.

Figure 7

Antinociceptive effects of URB602 when administered at a dose of 70 μg into the hind paw, 15 min before 2.5% formalin (50 μL). Effects of cannabinoid antagonists on the antinociceptive effects of URB602 for the early (B) and late (C) phases of the test. Data is expressed as mean \pm s.e.m (n = 4 per group). AUC, # (F(1,18) = 33.94) $P < 0.001$ for URB602 vs control (NaCl 0.9%) group; * $P < 0.001$ for URB602 vs control (NaCl 0.9%) group. Note that the effect of URB602 was reversed by either AM251 (AM251 vs URB602 + AM251, (F(1,18) = 0.07 and 0.11) or AM630 (AM630 vs URB602 + AM630, (F(1,18) = 0.05 and 0.10), early and late phases respectively. In (D), values for paw oedema are shown; this did not differ among the groups (F(5,18) = 0.70); neither URB602 (F(1,18) = 0.10), AM251 (F(1,18) = 1.92) nor AM630 (F(1,18) = 0.01) affected oedema.

Figure 1

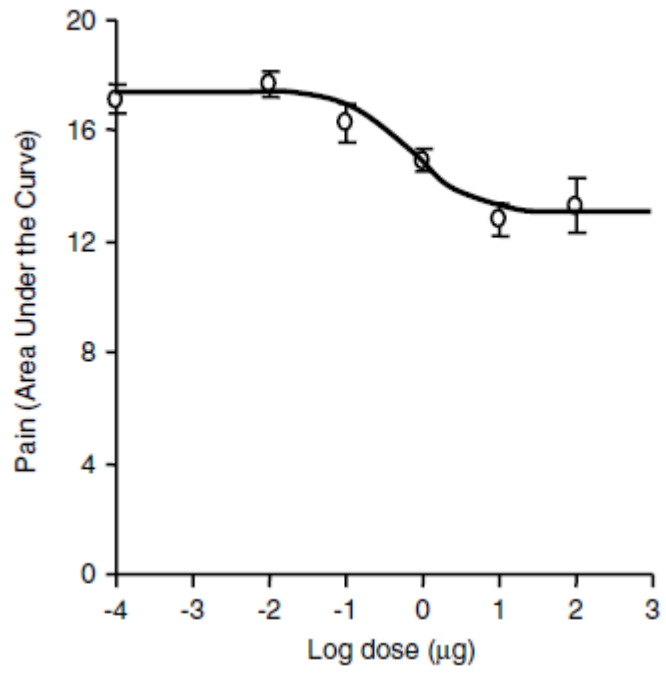


Figure 2

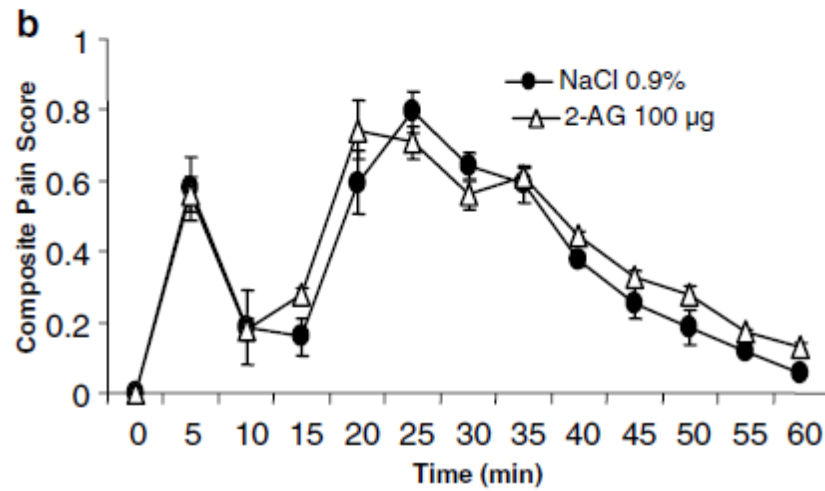
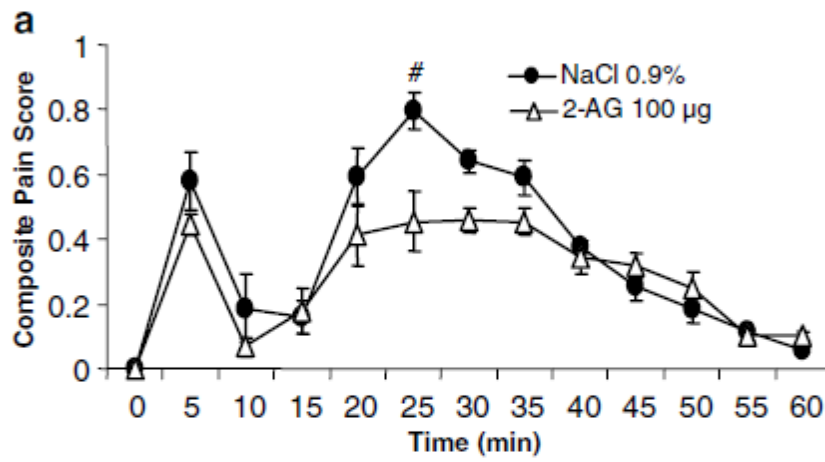
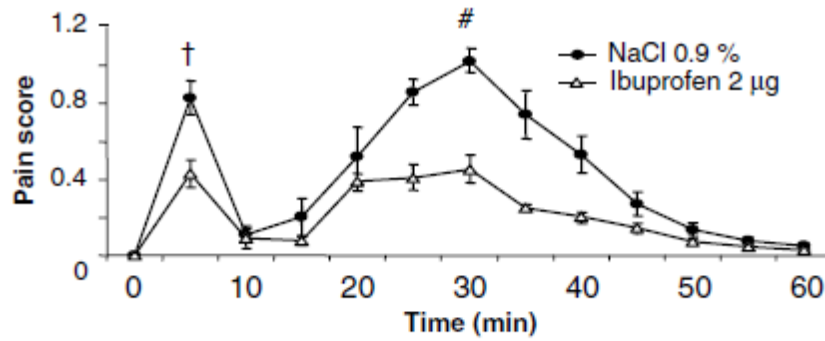


Figure 3

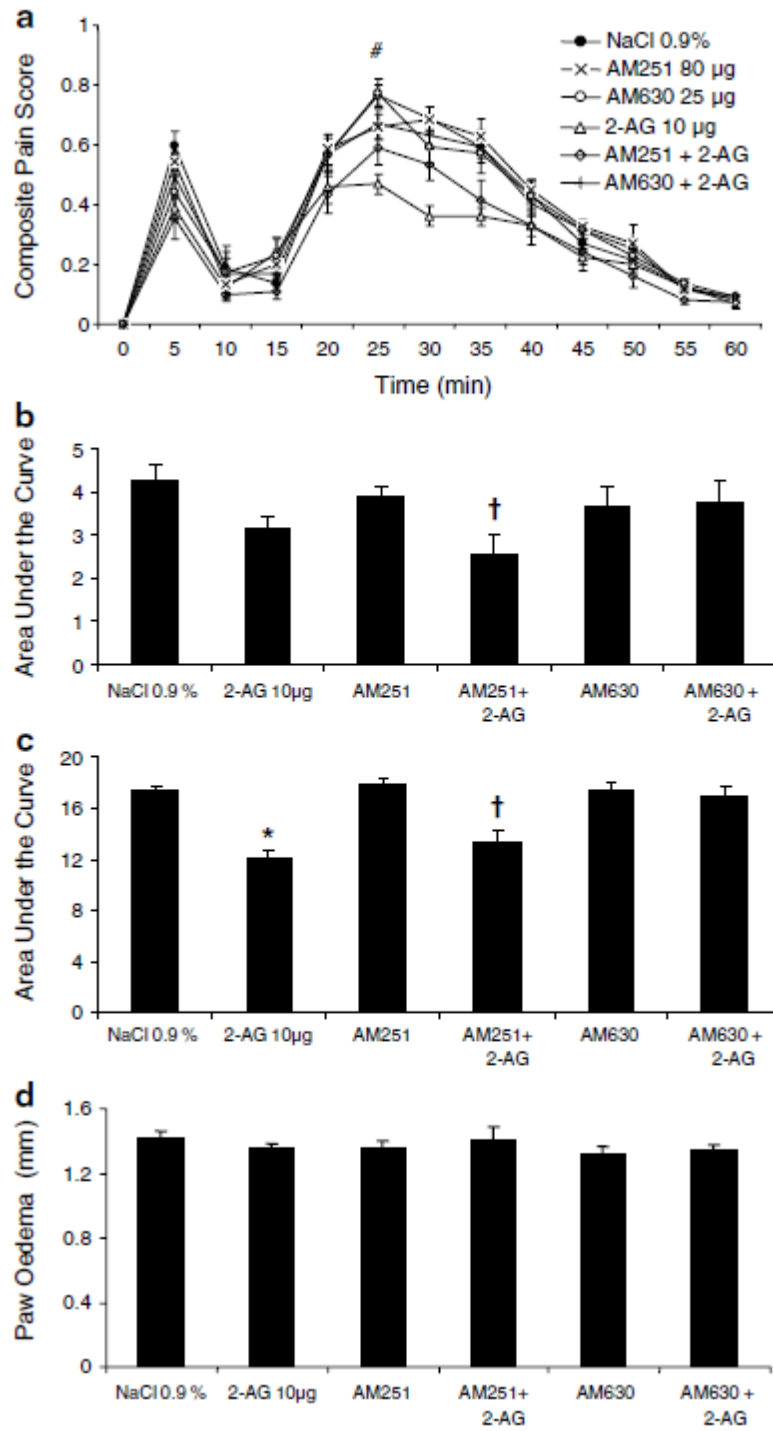


Figure 4

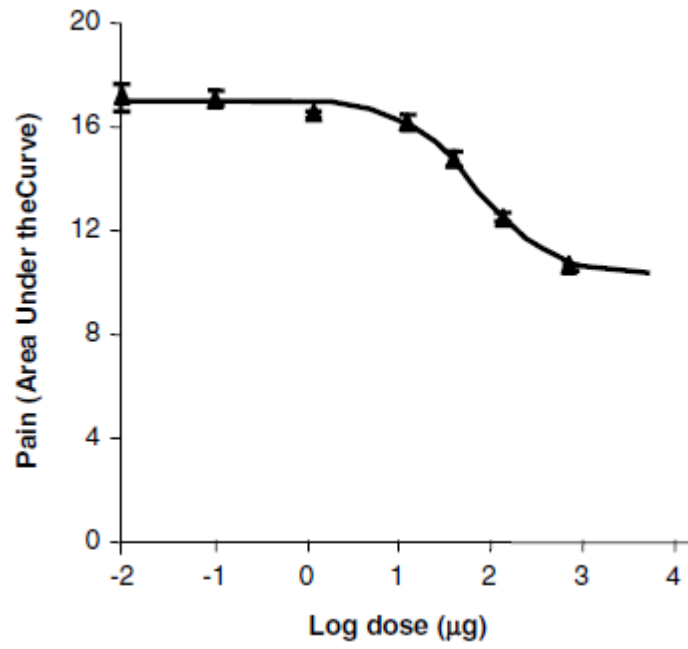


Figure 5

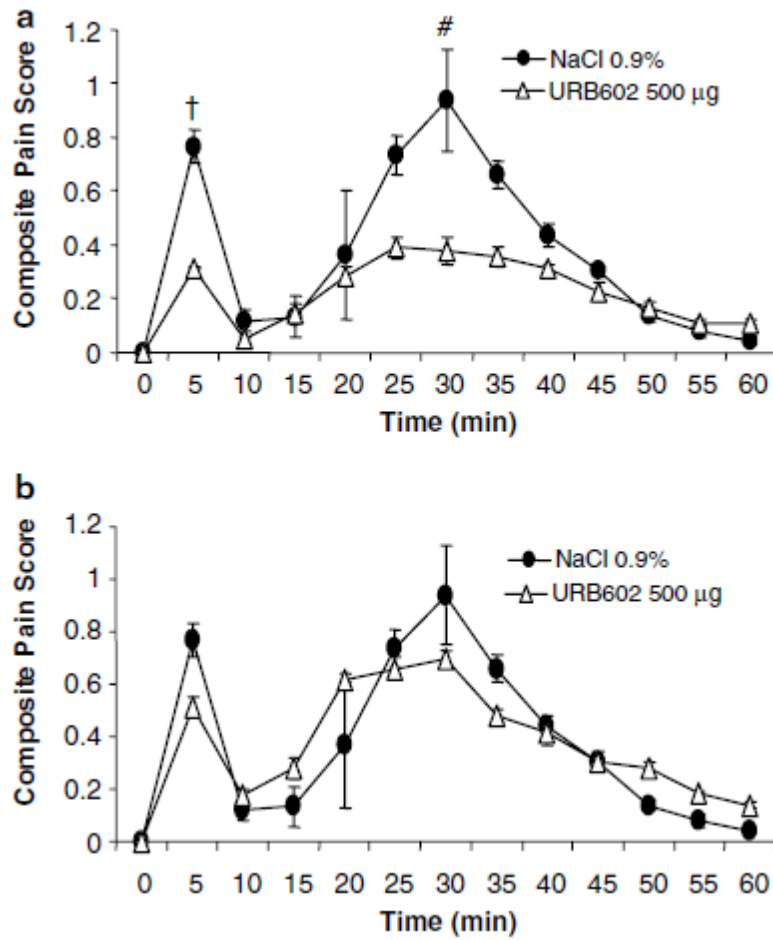


Figure 6

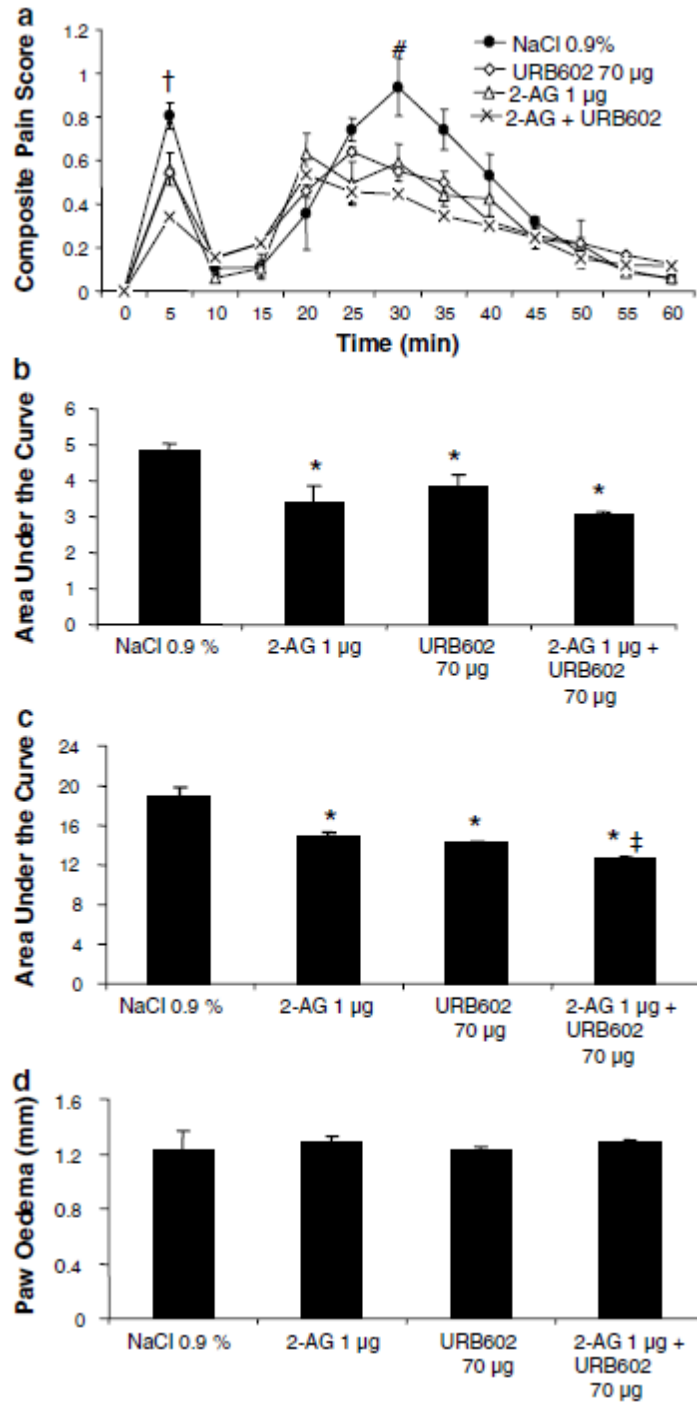
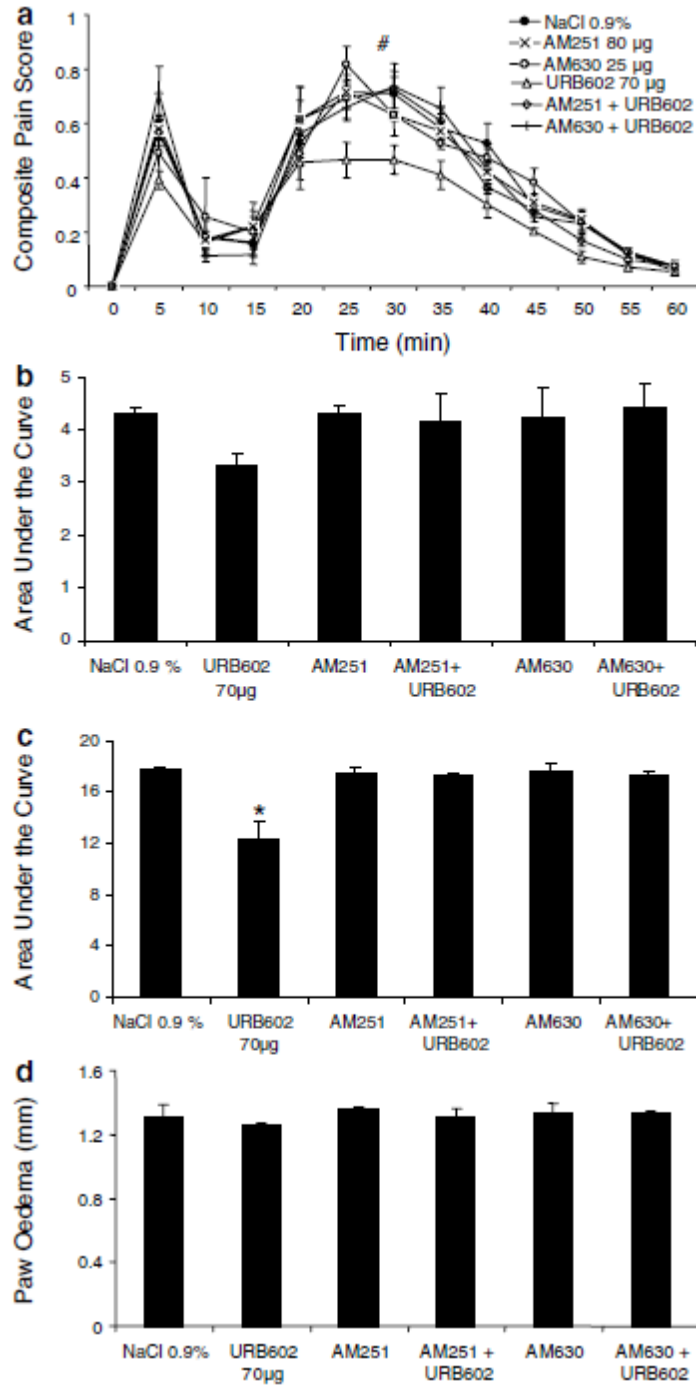


Figure 7



2 ARTICLE 2 PUBLIÉ DANS LA REVUE *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY*

« *Modulation of the antinociceptive effects of 2-arachidonoyl glycerol by peripherally administered FAAH and MGL inhibitors in a neuropathic pain model* »

Short running title: 2-AG peripheral antinociceptive effects

Julie Desroches¹, Josée Guindon¹, Chantal Lambert¹ & Pierre Beaulieu^{1,2}

Department of Pharmacology¹ and Anesthesiology², Faculty of Medicine, Université de Montréal
– CHUM, 3840 rue St-Urbain, Montréal, H2W 1T8, Québec, Canada

Br J Pharmacol. 2008 Nov ; 155 (6) : 913-24.

Article 2. Contribution des co-auteurs:

JD : Conceptualisation du projet, réalisation de la majorité des expériences, analyses statistiques, écriture du manuscrit, montage des figures

JG : Conceptualisation du projet, participation à certaines expériences, analyses statistiques, participation à l'écriture de la section résultats du manuscrit et révision du manuscrit

CL : Recherche des organismes subventionnaires

PB : Conceptualisation du projet, écriture et révision du manuscrit, recherche des organismes subventionnaires

2.1 Abstract

Background and purpose: There are limited options for the treatment of neuropathic pain. Endocannabinoids, such as anandamide and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG), are promising pain modulators and there is recent evidence of interactions between anandamide and 2-AG biosynthesis and metabolism. It has been clearly demonstrated that 2-AG degradation is mainly catalysed not only by monoacylglycerol lipase (MGL) but also by a fatty acid amide hydrolase (FAAH). Inhibitors specifically targeting these two enzymes have also been described: URB602 and URB597, respectively. However, the antinociceptive effects of the combination of peripherally injected 2-AG, URB602 and URB597 in a neuropathic pain model have not yet been determined. This was performed in the presence or absence of cannabinoid CB₁ (AM251) and CB₂ (AM630) receptor antagonists.

Experimental approach: Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were evaluated in 213 male Wistar rats allocated to 32 different groups. Drugs were injected subcutaneously in the dorsal surface of the hind paw (50 μ L) 15 min before pain tests.

Key results: 2-AG, URB602 and URB597 significantly decreased mechanical allodynia and thermal hyperalgesia with ED₅₀ of 1.6 ± 1.5 and 127 ± 83 mg for 2-AG and URB602, respectively. These effects were mediated locally and were mostly inhibited by the two cannabinoid antagonists.

Conclusions and implications: The combination of the three compounds did not produce any greater anti-allodynic or antihyperalgesic effects, suggesting that FAAH inhibition could reduce or limit the anti-nociceptive effects of 2-AG. Peripheral administration of endocannabinoids or MGL/FAAH inhibitors is a promising analgesic approach requiring further investigation.

Key words: 2-arachidonoyl glycerol; URB602; URB597; endocannabinoids; cannabinoid receptors; monoacylglycerol lipase; fatty acid amide hydrolase; neuropathic pain

LIST OF ABBREVIATIONS

2-AG: 2-arachidonoyl glycerol

CB: cannabinoid

DMSO: dimethylsulfoxide

FAAH: fatty-acid amide hydrolase

MGL: monoacylglycerol lipase

2.2 Introduction

Neuropathic pain is a complex disorder resulting from nerve injury or insult to the peripheral or CNS. Unfortunately, it is still considered to be relatively refractory to most of the current analgesics, including opioids, emphasizing the importance of identifying novel pharmacological agents for its treatment. Recent treatment strategies have suggested that cannabinoids may be more effective against chronic than acute pain (Beaulieu and Ware, 2007).

There is accumulating evidence supporting the suggestion that the endogenous cannabinoid system, mainly comprising anandamide and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG), may be involved in pain modulation via the activation of two distinct G-protein-coupled receptors, CB₁ and CB₂ (Pertwee, 2006; Di Marzo, 2008). The cannabinoid CB₁ receptor is primarily expressed at high levels in several brain areas and throughout the CNS, including the spinal cord, in neurons of the dorsal root ganglia and also in peripheral tissues (Walczak et al., 2005, 2006; Agarwal et al., 2007; Lever and Rice, 2007). By contrast, cannabinoid CB₂ receptor expression seems to be found predominantly, but not exclusively, in peripheral tissues with immune functions. It has also recently been found in the brain, on dorsal root ganglia, in the lumbar spinal cord, on sensory neurons, on microglia and in peripheral tissues (for review see Jhaveri et al., 2007b).

Recent studies have demonstrated the anti-nociceptive efficacy of cannabinoids in several animal models of inflammatory and neuropathic pain (for review see Walker and Hohmann, 2005). Moreover, it has been suggested that cannabinoids can exert their anti-nociceptive action through peripheral mechanisms involving CB₁ and CB₂ receptors (Sokal et al., 2003; Elmes et al., 2004; Jhaveri et al., 2006; Gutierrez et al., 2007).

In neuropathic pain conditions, several studies have shown that both CB₁ (Agarwal et al., 2007) and CB₂ (for review see Guindon and Hohmann, 2008) receptors are involved in cannabinoid-induced anti-nociception at peripheral sites. Furthermore, we have already shown that local administration of anandamide into the hind paw reversed mechanical

allodynia and thermal hyperalgesia by a mechanism involving only CB₁ receptors (Guindon and Beaulieu, 2006).

There is evidence that 2-AG acts as an endogenous ligand, as a full agonist, for both CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors (Mechoulam et al., 1995; Sugiura and Waku, 2000), with no direct binding to the TRPV1 receptor (Pertwee, 2006). However, it seems to act mostly as a potent and full-efficacy agonist at the cannabinoid CB₂ receptor (Gonsiorek et al., 2000; Guindon et al., 2007). 2-AG is mainly hydrolysed into arachidonic acid and glycerol by the enzyme monoacylglycerol lipase (MGL) (Goparaju et al., 1999; Dinh et al., 2004). However, evidence suggests that 2-AG might also be metabolized by another enzyme, fatty acid amide hydrolase (FAAH), known to be responsible for the degradation of anandamide (Bisogno et al., 2005), and by two other previously uncharacterized serine hydrolases ABHD6 and ABHD12 (Blankman et al., 2007). A cautious interpretation is that both FAAH and MGL participate in 2-AG inactivation to an extent depending on the tissue or cell type (Di Marzo and Petrosino, 2007). FAAH inhibitors have been described, such as URB597 (Kathuria et al., 2003), and FAAH knockout mice have been developed (Cravatt et al., 2001). More recently, as MGL knockout mice have not yet been described to investigate the precise role of these enzymes in pain modulation, MGL inhibitors, such as URB602 (Hohmann et al., 2005) have been developed.

However, Vandevorde et al. (2007) and Muccioli et al. (2007) have recently questioned the selectivity of URB602 for MGL. In their study, *in vitro* URB602 was as effective at inhibiting MGL as FAAH. Nevertheless, recent data using both a purified recombinant MGL and intact brain neurons unequivocally showed that URB602 successfully inhibits MGL and blocks 2-AG hydrolysis in brain slices (King et al., 2007).

Therefore, this study was designed to investigate the peripherally mediated anti-nociceptive effects of 2-AG, URB602 and URB597, after intraplantar injection, in a model of neuropathic pain. The mechanism by which the three compounds might produce their anti-nociceptive effect was also investigated by using specific antagonists for the cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors.

2.3 Methods

2.3.1 Animals

The research protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the Université de Montréal, and all procedures related to the use of animals conformed to the guidelines of the Canadian Council for Animal Care. A total of 213 adult male Wistar rats (Charles River, St-Constant, Quebec, Canada) weighing 180–220 g, at the time of testing, were housed, two per cage, in standard plastic cages with sawdust bedding in a climate-controlled room, under a 12-h light/ dark cycle. They were allowed free access to food pellets and water.

2.3.2 Drug administration

2-AG was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA) in acetonitrile solution and further diluted in normal saline (0.9% NaCl in water). AM251 and AM630 are selective antagonists for CB₁ and CB₂ receptors, respectively, and were purchased from Tocris (Ellisville, MO, USA); they were dissolved in normal saline containing 8 and 2.5% dimethylsulphoxide (DMSO), respectively. URB602 and URB597 were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) and dissolved in normal saline containing between 1 and 10% DMSO for the experimental doses. Preliminary experiments with our model of neuropathic pain in rats (n = 4–6) have shown that there was no difference in nociceptive responses between the effects of 0.9% NaCl and 0.9% NaCl solution with 8% DMSO (Guindon and Beaulieu, 2006). 2-AG, URB602 and URB597 were stored at -20°C, protected from light and were prepared freshly on the day of the experiment.

2.3.3 Neuropathic pain model

The partial sciatic nerve ligation (PNL) model was used in this study to achieve unilateral hindlimb neuropathy (Seltzer et al., 1990). Briefly, rats were anaesthetized using isoflurane (induction, 3%; maintenance, 1–2%). The left sciatic nerve was isolated under

aseptic conditions and exposed at high thigh level and a one-third to a one-half of the dorsal thickness of the nerve was then tightly ligated using an 8-0 monofilament nylon suture. After surgery, the wound was closed using 5-0 absorbable sutures for muscles and two wound clips for the skin; the rats were allowed 9 days to recover and their posture and behaviour were closely monitored for 48 h. From day 10, rats were tested to assess the development of mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. On the 11th day, drugs were administered 15 min prior to nociceptive testing.

2.3.4 Sensory testing

During sensory testing, animals were placed in elevated Plexiglas boxes (21 x 17 x 14 cm) with a 0.7cm diameter mesh grid floor for mechanical allodynia testing and a dry glass floor for thermal hyperalgesia testing. Rats were allowed to acclimatize for 15 min or until exploratory behaviour ceased before behavioural testing. Effect of drugs with short half-lives, such as 2-AG, may be influenced by the testing order. To minimize this effect, the sequence of testing was alternated between mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. The time to complete one battery of tests was approximately 40 min.

2.3.4.1 Mechanical allodynia

Mechanical sensitivity of the ipsilateral and contralateral hindpaws was assessed using von Frey hairs (Senselab aesthesiometer, Somedic, Sweden). Innocuous mechanical punctuate stimuli were delivered to the plantar surface of the hind paw with a series of individual von Frey filaments of ascending forces (with a range comprised between 0.63 and 300 mN). For each filament, the stimulus was repeated five times with an interval of 1–2 s between each trial. The threshold was determined as the lower force that evoked a withdrawal response to one of the five stimuli (Tal and Bennett, 1994).

2.3.4.2 Thermal hyperalgesia

Thermal sensitivity of the ipsilateral and contralateral hind paws was assessed using an infrared noxious heat stimulus of increasing temperature range, from non-noxious to noxious range (Plantar test, Ugo Basile, Italy). Thermal punctuate stimuli were delivered to the plantar surface of the hind paw with a focused beam of radiant heat, and the withdrawal latency time was recorded. Results of each test are expressed as the mean of three withdrawal latencies in seconds (s). Three minutes was allowed between each test (Hargreaves et al., 1988).

2.3.5 Experimental protocols

The experiments were conducted in a randomized and blinded manner by the same experimenter. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were evaluated the day before PNL and on the 10th day after PNL for the ipsilateral and contralateral paws to confirm that rats were neuropathic.

Dose–response curves for 2-AG (0.001–0.01–0.1–1–3–10– 30–100 µg; n = 4–6 per group) and URB602 (0.1–1–10–100–1000 µg; n = 4–6 per group) for mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were determined.

On the 11th day, rats were allocated to 32 different groups: (1) a control group for each set (five) of experiments (NaCl 0.9%); (2) 2-AG (10 µg); (3) AM251; (4) AM251 + 2-AG; (5) AM630; (6) AM630 + 2-AG; (7) URB602 (300 µg); (8) AM251 + URB602; (9) AM630 + URB602; (10) URB597 (25 µg); (11) AM251 + URB597; (12) AM630 + URB597; (13) 2-AG (ED₅₀); (14) URB602 (ED₅₀); (15) 2-AG + URB602; (16) 2-AG + URB597; (17) 2-AG + URB602 + URB597. 2-AG, URB602, URB597 (25 µg; Jhaveri et al., 2006), AM251 (80 µg; Malan et al., 2001) and AM630 (25 µg; Malan et al., 2001) were all dissolved in the same total volume of 50 µL and administered subcutaneously (s.c.) in the dorsal surface of the operated left hind paw, 15 min before pain tests (n = 6 per group).

To exclude any possible systemic effect of the drugs, NaCl 0.9%, 2-AG, URB602 and URB597 were also given subcutaneously on the dorsal surface of the contralateral side (right hind paw) (n = 6 per group).

2.3.6 Statistical analysis

Mechanical threshold and withdrawal latency for each treatment group are expressed as mean \pm s.e.mean. Assessment of the neuropathy, comparisons between rats receiving NaCl 0.9%, AM251 or AM630 and analgesic effects of 2-AG, URB602, URB597 and their combination with regard to the absence or presence of antagonists (AM251 or AM630) were all assessed separately for significance using an ANOVA adapted for factorial experimental design (Winer, 1971; Draper and Smith, 1998). Each of the analyses mentioned above was assessed for mechanical allodynia and thermal hyperalgesia of the ipsilateral side. The contralateral side was analysed separately, still using an ANOVA adapted for factorial experimental design. The dose–response curves for 2-AG and URB602 were determined using ALLFIT software (De Léan et al., 1978). The critical level of significance was set at 5% ($P < 0.05$).

2.4 Results

Animals showed signs of neuropathy 10 days after PNL, as a statistically significant difference was present, in comparison with pre-surgery values, for mechanical allodynia ($F(1, 94) = 142.65, P < 0.001$) (Figure 1a) and thermal hyperalgesia ($F(1, 94) = 144.45, P < 0.001$) (Figure 1b).

2.4.1 Mechanical allodynia

2-AG and URB602 produced a dose-dependent anti-allodynic effect with ED_{50} of 1.6 ± 1.5 and $127 \pm 83 \mu\text{g}$, respectively (Figures 2a and 3a). However, a light local intolerance was

observed following intraplantar injection of URB602 (1000 µg in 50 µL). This was probably an irritation, so we avoided using this dose. URB597, URB602, 2-AG and their combination produced a significant anti-allodynic effect, when compared with the control group ($F(1, 35) = 15.68, P < 0.001$) (Figure 4a). The combination of 2-AG with URB602 or with URB602 + URB597 was significantly different when compared with URB597, URB602, 2-AG or 2-AG + URB597 ($F(1, 35) = 12.93, P < 0.005$) (Figure 4a), revealing a superior anti-nociceptive effect of those combinations.

von Frey values obtained in animals after PNL were not affected by treatment with NaCl 0.9%, AM251 or AM630 ($F(1, 16) = 0.01$) (Table 1). Furthermore, values in the control group were not different from values obtained with both cannabinoid antagonists ($F(1, 16) = 0.01$). Finally, results in the AM251 group were not different from those found in the AM630 group ($F(1, 16) = 0.02$) (Table 1).

In the absence of cannabinoid antagonists, 2-AG, URB602 and URB597 produced significant anti-allodynic effects, when compared with control group ($F(1, 30) = 80.41, 52.57$ and 4.48), with values returning to pre-surgical levels (Figures 5a, 6a and 7a).

In the presence of AM251 and AM630, the anti-allodynic effects of 2-AG and URB602 were inhibited, as there was no statistical difference for the comparison between CB₁ and CB₂ antagonists alone or combined with 2-AG ($F(1, 30) = 0.61$ and 0.14 , respectively) (Figure 5a) and with URB602 ($F(1, 30) = 0.01$ and 0.01 , respectively) (Figure 6a). The combination of URB597 + AM251 (CB₁ antagonist) did not produce any anti-allodynic effects, when compared with AM251 alone ($F(1, 30) = 0.95$). By contrast, the combination of URB597 + AM630 (CB₂ antagonist) did produce significant anti-allodynic effects, when compared with AM630 alone ($F(1, 30) = 5.32$) (Figure 7a). Finally, there was no difference between all the groups tested on the contralateral side (Figures 4a, 5a, 6a and 7a, insets).

When the drugs were given on the contralateral side to rats after PNL ($F(1, 30) = 265.32, P < 0.001$), there was no statistical difference between days 10 and 11 (that is, before and after local drug administration) ($F(1, 30) = 0.01$) on the ipsilateral (tested) side (Figure 8a). On the contralateral side, there was no difference between the day before the surgery

(pre-lesion) compared with the days after surgery (days 10 and 11) ($F(1, 30) = 0.49$), and no difference was observed between days 10 and 11 ($F(1, 30) = 0.77$) (Figure 8a, inset).

2.4.2 Thermal hyperalgesia

2-AG and URB602 also produced a dose-dependent antihyperalgesic effect with ED_{50} of 0.20 ± 0.19 and $86 \pm 52 \mu\text{g}$, respectively (Figures 2b and 3b). 2-AG, URB602, URB597 and their combination produced a significant antihyperalgesic effect, when compared with the control group ($F(1, 35) = 38.74$, $P < 0.001$) (Figure 4b). The combination of 2-AG with URB602 or with URB602 + URB597 was not significantly different when compared with 2-AG, URB602, URB597 or 2-AG + URB597 ($F(1, 35) = 2.67$), showing that there was no greater antinociceptive effect of the combinations.

Responses to the noxious heat stimulus obtained after PNL were not different ($F(1, 16) = 0.02$) from those measured when rats received NaCl 0.9%, AM251 or AM630. Furthermore, values in the control group were not different from values obtained with both cannabinoid antagonists ($F(1, 16) = 0.35$). Finally, results in the AM251 group were not different from those found in the AM630 group ($F(1, 16) = 0.05$) (Table 1).

In the absence of cannabinoid antagonists, 2-AG, URB602 and URB597 produced significant anti-hyperalgesic effects, when compared with control group ($F(1, 30) = 26.67$, 32.58 and 31.59 , respectively, $P < 0.001$) with values returning to pre-surgical levels (Figures 5b, 6b and 7b).

In the presence of AM251 and AM630, the anti-hyperalgesic effects of 2-AG and URB602 were inhibited, as there was no statistical difference for the comparison between CB_1 and CB_2 antagonists alone or combined with 2-AG ($F(1, 30) = 1.45$) (Figure 5b) and URB602 ($F(1, 30) = 1.32$) (Figure 6b). However, the anti-hyperalgesic effects of URB597 were reversed by the CB_1 antagonist AM251 ($F(1, 30) = 0.37$), but were not inhibited by the CB_2 antagonist AM630 ($F(1, 30) = 15.26$) (Figure 7b). Finally, there was no difference between all the groups tested on the contralateral side (Figures 4b, 5b, 6b and 7b, insets).

When the drugs were given on the contralateral side to rats after PNL ($F(1, 30) = 254.56, P < 0.001$), there was no statistical difference between days 10 and 11 ($F(1, 30) = 0.42$) on the ipsilateral side (Figure 8b). On the contralateral side, there was no difference between the day before the surgery (pre-lesion) compared with the days after surgery (days 10 and 11) ($F(1, 30) = 0.01$), and no difference was observed between days 10 and 11 ($F(1, 30) = 0.30$) (Figure 8b, inset).

2.5 Discussion

In this study, we have demonstrated that local administration of 2-AG, an endocannabinoid, URB602, a MGL inhibitor and URB597, a selective FAAH inhibitor, induced antiallodynic and anti-hyperalgesic effects in a rat model of neuropathic pain. These antinociceptive effects were locally, rather than systemically, mediated, as 2-AG, URB602 and URB597 injected in the contralateral paw did not produce anti-nociceptive effects at doses higher than those used in the ipsilateral paw. Furthermore, these effects were likely to be mediated by cannabinoid CB_1 and CB_2 receptors, as antinociceptive effects of intraplantar 2-AG and URB602 were prevented by the selective CB_1 and CB_2 receptor antagonists, AM251 and AM630, respectively. However, the anti-nociceptive effects of intraplantar URB597 were not prevented by AM630, confirming the fact that URB597 produces its effects via direct or indirect activation of CB_1 receptors. Thus, these findings suggest that the activation of peripheral CB_1 and CB_2 receptors by endocannabinoids or with MGL and FAAH inhibitors are sufficient to produce anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects.

We have shown that 2-AG produced dose-dependent antinociceptive effects and significantly decreased mechanical allodynia and thermal hyperalgesia with ED_{50} in the microgram range, whereas a recent study from our group showed that anandamide was also anti-nociceptive but with doses in the nanogram range (Guindon and Beaulieu, 2006). In fact, anandamide is a partial or full agonist of CB_1 receptors: it mainly mediates its antinociceptive effects through the activation of CB_1 receptors and its pronociceptive effects through TRPV1 receptors (Maccarrone et al., 2008). Although it also binds CB_2 receptors, it

has very low efficacy and may act as an antagonist (Gonsiorek et al., 2000). In contrast, 2-AG acts as an agonist for both CB₁ and CB₂ receptors to modulate pain transmission in a model of neuropathic pain (Saario and Laitinen 2007).

MGL inhibitors such as URB602 (Hohmann et al., 2005) and selective FAAH inhibitors such as URB597 (Kathuria et al., 2003; Jayamanne et al., 2006) have been described. URB602 potentiates endocannabinoid-dependent stress-induced analgesia following local administration into either the periaqueductal grey or lumbar dorsal horn (Hohmann et al., 2005; Suplita et al., 2006). Accordingly, ultrastructural studies suggest that MGL is localized predominantly, if not exclusively on axon terminals (Gulyas et al., 2004). Thus, peripherally injected MGL inhibitors, as demonstrated in this study, could offer significant therapeutic potential for the treatment of neuropathic pain.

Although URB602 is an inhibitor of MGL, it has low potency (Hohmann et al., 2005). In addition, Begg et al. (2005) have recently shown evidence for cannabinoid receptors beyond CB₁ and CB₂. Thus, 2-AG anti-nociceptive action and degradation appear to be complex, to involve multiple enzymes and could vary between cell types. In fact, Muccioli et al. (2007) have reported the existence of a novel, pharmacologically distinct MGL that opens promising therapeutic avenues. However, our current knowledge of the roles of 2-AG in pain modulation is still limited, due to the lack of mutant MGL^{-/-} mice that are incapable of synthesizing or inactivating 2-AG. Nevertheless, we then wanted to evaluate whether 2-AG degradation could be affected both by MGL and by FAAH inhibitors. In fact, the addition of URB597, either with 2-AG or with 2-AG and URB602, failed to produce a significant additive anti-nociceptive effect. These results are in agreement with a recent publication by Maccarrone et al (2008), suggesting a 'reconceptualization' of the endocannabinoid system. Indeed, they proposed that anandamide and 2-AG may cooperate to modulate synaptic transmission. In fact, they have demonstrated that the elevation of anandamide concentrations by either pharmacological or genetic inhibition of FAAH can interfere with 2-AG levels, metabolism and physiological effects through the activation of TRPV1 receptors in the striatum (Maccarrone et al., 2008). This interaction could also be present in the

periphery, as nociceptive primary sensory neurons co-express CB₁ and TRPV1 receptors to a very high degree (Ahluwalia et al., 2000). However, it may not be adequate to apply this new concept, based on findings in the CNS, to events in the periphery.

Several recent studies have reported that both peripheral CB₁ (Agarwal et al., 2007) and CB₂ (for review see Guindon and Hohmann, 2008) receptors are involved in antiallodynic and anti-hyperalgesic effects of locally injected cannabinoids after nerve injury. In peripheral tissues, the expression of CB₁ and CB₂ receptors in rats and mice has been well described not only at basal level, but was also upregulated in the paw, DRG and ipsilateral spinal cord of rats in a new model of neuropathic pain, targeting the saphenous nerve (Walczak et al., 2005, 2006). Similarly, Mitrirattanakul et al. (2006) have reported that CB₁ receptors are upregulated in DRG following the development of neuropathic pain, thereby providing hope for the use of compounds targeting the peripheral endocannabinoid system. Furthermore, studies of knockout mice have confirmed that CB₁ and CB₂ receptors are involved in cannabinoid-induced analgesia (Ledent et al., 1999; Zimmer et al., 1999; Ibrahim et al., 2006), but have not revealed their precise site of action. To resolve this question, Agarwal et al. (2007) generated transgenic mice lacking CB₁ receptors in nociceptive neurons localized in the peripheral nervous system of mice, preserving expression in spinal neurons, the brain and all other organs. They showed that CB₁ receptors on nociceptors, and not those within the CNS, constitute an important target for mediating cannabinoid analgesia (Agarwal et al., 2007). However, one cannot rule out compensatory effects in transgenic mouse models. Furthermore, previous studies have reported that endocannabinoids, such as anandamide and 2-AG, are present in peripheral tissues (Beaulieu et al., 2000; Jhaveri et al., 2006; Mitrirattanakul et al., 2006). Elevation of endocannabinoids levels has been demonstrated in paw tissues following tissue injury (Calignano et al., 1998; Oka et al., 2005; Mitrirattanakul et al., 2006), in the spinal cord during L5–L6 spinal nerve ligation (Jhaveri et al., 2006) and chronic constriction injury of the sciatic nerve (Petrosino et al., 2007). Therefore, endocannabinoid levels in neuropathic pain conditions are consistently reported to be increased at many sites involved in the nociceptive processing (Jhaveri et al., 2007a). Indeed, Jhaveri et al. (2006) have recently demonstrated that intraplantar injection of URB597

suppressed the mechanically evoked responses of wide dynamic-range spinal neurons in sham-operated rats and increased anandamide and 2-AG levels. However, a higher dose of intraplantar URB597 was required to attenuate evoked responses of spinal neurons in nerve-ligated rats, but surprisingly failed to alter hind paw levels of endocannabinoids. The authors suggested that these levels may have been affected by other metabolic pathways, such as cyclooxygenase-2 (COX-2), or alterations of peripheral FAAH activity (Jhaveri et al., 2006). Measurement of endocannabinoid levels in peripheral paw tissue was not performed in the present study. The absence of such measures is a weakness and to that extent, the results presented herein do not contribute to the debate regarding the specificity of URB602 for MGL inhibition. It is, however, interesting to note that in a recent publication, concerns were raised about the correlation between the amounts of endocannabinoids measured in tissues and extracellular, and hence CB receptor-active, levels of endocannabinoids (Di Marzo, 2008). Endocannabinoids might be present in high concentrations to inhibit pain transmission by acting on CB₁ and CB₂ receptors, which have also been found to be upregulated in several regions of the pain pathway. Therefore, the anti-nociceptive effects of 2-AG may be mediated by a direct action on cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors located in the injected paw.

Other mechanisms to explain the peripheral antihyperalgesic action of cannabinoids may be linked to the anti-inflammatory effects of these compounds in peripheral tissues; CB₁ and CB₂ receptor agonists could act locally at the level of the peripheral axon of the primary afferent neuron and indirectly inhibit transmission in nociceptive afferents by reducing the inflammatory component of tissue injury. In fact, recent studies have reported that cannabinoids can reduce the production and release of pro-inflammatory signalling molecules, such as tumour necrosis factor- α , nitric oxide and interleukin-1 (IL-1), and enhance the release of anti-inflammatory cytokines like the IL-1 receptor antagonist, IL-4 and IL-10 (Walter and Stella, 2004). Moreover, another hypothesis is that the activation of CB₂ cannabinoid receptors may stimulate the local release of the endogenous opioid endorphin from cells such as keratinocytes (Ibrahim et al., 2005). These authors have postulated the release of b-endorphin by AM1241, a CB₂ selective agonist, acting on CB₂ receptors in skin

keratinocytes, as a mechanism to explain the peripheral analgesic actions of this compound. Therefore, endocannabinoids such as anandamide and 2-AG may interact directly or indirectly with cannabinoid receptors on the peripheral endings of cutaneous nociceptive sensory neurons to modulate the transmission of nociceptive signals to the spinal cord.

The anti-nociceptive effects of peripherally administered cannabinoids need to be counterbalanced by the fact that many reports have already demonstrated antinociceptive properties of central (cerebral and spinal) administrations of cannabinoid receptor agonists (for review see Hohmann et al., 2005; Lever and Rice, 2007), whereas others have questioned the involvement of CB₁ receptors in the analgesia evoked by peripheral administration of cannabinoids.

In conclusion, these findings are the first to demonstrate that peripherally injected 2-AG, URB602, URB597 and their combination decreased pain behaviour in a model of neuropathic pain. This study provides evidence that the activation of cannabinoid CB₁ and CB₂ mechanisms in the periphery is sufficient to decrease nociception in an animal model of neuropathic pain. Finally, as cannabinoid-based drugs seem to be effective for the treatment of neuropathic pain, this approach is of potential therapeutic importance because it may present a way of delivering the analgesic benefit of cannabinoid compounds while avoiding troublesome psychotropic and other systemic effects.

2.6 Acknowledgements

JD is supported by a Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament (GRUM) Pfizer doctoral study grant. JG is supported by a Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) postdoctoral fellowship. PB holds an FRSQ clinician scientist grant.

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

2.7 References

- Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, Amaya F, Constantin CE, Brenner GJ et al. (2007). Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci* 10: 870–879.
- Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S, Nagy I (2000). Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience* 100: 685–688.
- Beaulieu P, Bisogno T, Punwar S, Farquhar-Smith WP, Ambrosino G, Di Marzo V et al. (2000). Role of the endogenous cannabinoid system in the formalin test of persistent pain in the rat. *Eur J Pharmacol* 396: 85–92.
- Beaulieu P, Ware M (2007). Reassessment of the role of cannabinoids in the management of pain and other symptoms. *Curr Opin Anaesthesiol* 20: 473–477.
- Begg M, Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Mo FM et al. (2005). Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* 106: 133–145.
- Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V (2005). The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 224–238.
- Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol* 14: 1347–1356.
- Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394: 277–281.

Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR et al. (2001). Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9371–9376.

De Léan A, Munson PJ, Rodbard D (1978). Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am J Physiol* 235: E97–102.

Di Marzo V (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 7: 438–455.

Di Marzo V, Petrosino S (2007). Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol* 18: 129–140.

Dinh TP, Kathuria S, Piomelli D (2004). RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Mol Pharmacol* 66: 1260–1264.

Draper NR, Smith H (1998). *Applied Regression Analysis*. Wiley: New York.

Elmes SJ, Jhaveri MD, Smart D, Kendall DA, Chapman V (2004). Cannabinoid CB2 receptor activation inhibits mechanically evoked responses of wide dynamic range dorsal horn neurons in naïve rats and in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 20: 2311–2320.

Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW (2000). Endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol* 57: 1045–1050.

Goparaju SK, Ueda N, Taniguchi K, Yamamoto S (1999). Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 57: 417–423.

Guindon J, Beaulieu P (2006). Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 50: 814–823.

Guindon J, Desroches J, Beaulieu P (2007). The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB2 receptors. *Br J Pharmacol* 150: 693–701.

Guindon J, Hohmann AG (2008). Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 153: 319–334.

Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boschia F et al. (2004). Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdale. *Eur J Neurosci* 20: 441–458.

Gutierrez T, Farthing JN, Zvonok AM, Makriyannis A, Hohmann AG (2007). Activation of peripheral cannabinoid CB1 and CB2 receptors suppresses the maintenance of inflammatory nociception: a comparative analysis. *Br J Pharmacol* 150: 153–163.

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32: 77–88.

Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R et al. (2005). An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435: 1108–1112.

Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A et al. (2005). CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3093–3098.

Ibrahim MM, Rude ML, Stagg NJ, Mata HP, Lai J, Vanderah TW et al. (2006). CB2 cannabinoid receptor mediation of antinociception. *Pain* 122: 36–42.

Jayamanne A, Greenwood R, Mitchell VA, Aslan S, Piomelli D, Vaughan CW (2006). Actions of the FAAH inhibitor URB597 in neuropathic and inflammatory chronic pain models. *Br J Pharmacol* 147: 281–288.

Jhaveri MD, Richardson D, Chapman V (2007a). Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 152: 624–632.

Jhaveri MD, Richardson D, Kendall DA, Barrett DA, Chapman V (2006). Analgesic effects of fatty acid amide hydrolase inhibition in a rat model of neuropathic pain. *J Neurosci* 26: 13318–13327.

Jhaveri MD, Sagar DR, Elmes SJ, Kendall DA, Chapman V (2007b). Cannabinoid CB2 receptor-mediated anti-nociception in models of acute and chronic pain. *Mol Neurobiol* 36: 26–35.

Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valin˜o F, Duranti A, Tontini A et al. (2003). Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 9: 76–81.

King AR, Duranti A, Tontini A, Rivara S, Rosengarth A, Clapper JR et al. (2007). URB602 inhibits monoacylglycerol lipase and selectively blocks 2-arachidonoylglycerol degradation in intact brain slices. *Chem Biol* 14: 1357–1365.

Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitot F, Aubert JF, Beslot F et al. (1999). Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283: 401–404.

Lever IJ, Rice AS (2007). Cannabinoids and pain. *Handb Exp Pharmacol* 177: 265–306.

Maccarrone M, Rossi S, Bari M, De Chiara V, Fezza F, Musella A et al. (2008). Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nat Neurosci* 11: 152–159.

Malan TP, Ibrahim MM, Deng H, Liu Q, Mata HP, Vanderah T et al. (2001). CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 93: 239–245.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50: 83–90.

Mitrirattanakul S, Ramakul N, Guerrero AV, Matsuka Y, Ono T, Iwase H et al. (2006). Site-specific increases in peripheral cannabinoid receptors and their endogenous ligands in a model of neuropathic pain. *Pain* 126: 102–114.

Muccioli GG, Xu C, Odah E, Cudaback E, Cisneros JA, Lambert DM et al. (2007). Identification of a novel endocannabinoid-hydrolyzing enzyme expressed by microglial cells. *J Neurosci* 27: 2883–2889.

Oka S, Yanagimoto S, Ikeda S, Gokoh M, Kishimoto S, Waku K et al. (2005). Evidence for the involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced acute inflammation in mouse ear. *J Biol Chem* 280: 18488–18497.

Pertwee RG (2006). The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int J Obes* 30: S13–S18.

Petrosino S, Palazzo E, de Novellis V, Bisogno T, Rossi F, Maione S et al. (2007). Changes in spinal and supraspinal endocannabinoid levels in neuropathic rats. *Neuropharmacology* 52: 415–422.

Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43: 205–218.

Sokal DM, Elmes SJ, Kendall DA, Chapman V (2003). Intraplantar injection of anandamide inhibits mechanically-evoked responses of spinal neurones via activation of CB2 receptors in anaesthetised rats. *Neuropharmacology* 45: 404–411.

Sugiura T, Waku K (2000). 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 108: 89–106.

Suplita RL, Gutierrez T, Fegley D, Piomelli D, Hohmann AG (2006). Endocannabinoids at the spinal level regulate, but do not mediate, nonopioid stress-induced analgesia. *Neuropharmacology* 50: 372–379.

Saario SM, Laitinen JT (2007). Therapeutic potential of endocannabinoid- hydrolysing enzyme inhibitors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 101: 287–293.

Tal M, Bennett GJ (1994). Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 57: 375–382.

Vandevoorde S, Jonsson KO, Labar G, Persson E, Lambert DM, Fowler CJ (2007). Lack of selectivity of URB602 for 2-oleoylglycerol compared to anandamide hydrolysis in vitro. *Br J Pharmacol* 150: 186–191.

Walczak JS, Pichette V, Leblond F, Desbiens K, Beaulieu P (2005). Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain. *Neuroscience* 132: 1093–1102.

Walczak JS, Pichette V, Leblond F, Desbiens K, Beaulieu P (2006). Characterization of the chronic constriction of the saphenous nerve, a model of neuropathic pain in mice showing rapid molecular and electrophysiological changes. *J Neurosci Res* 83: 1310–1322.

Walker JM, Hohmann AG (2005). Cannabinoid mechanisms of pain suppression. *Handb Exp Pharmacol* 168: 509–554.

Walter L, Stella N (2004). Cannabinoids and neuroinflammation. *Br J Pharmacol* 141: 775–785.

Winer BJ (1971). *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw-Hill: New York.

Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5780–5785.

2.8 Table

Table 1

Mechanical allodynia using von Frey and thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimulus before, 10 and 11 days after surgery.

	Mechanical threshold (mN)		Withdrawal latency (s)	
	Mean	± s.e.	Mean	± s.e.
Pre-lesion baseline	300.90	90.822	11.42	1.715
10 Days after PNL	50.85	11.252	6.89	0.597
11 Days after PNL - NaCl	49.23	1.138	6.57	0.577
11 Days after PNL – AM251	53.17	7.540	7.39	0.558
11 Days after PNL – AM630	45.49	0.317	7.09	0.832

Abbreviation: PNL, partial sciatic nerve ligation

On the 11th day, rats received NaCl 0.9%, AM251 (cannabinoid CB₁ antagonist; 80 µg) and AM630 (cannabinoid CB₂ antagonist; 25 µg) on the ipsilateral side. Data are expressed as mean ± s.e.mean (n= 4-6 per group).

2.9 Legends to Figures

Figure 1

Mechanical allodynia using von Frey hair (a) and thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimulus (b) before surgery (baseline) and 10 days after surgery consisting of partial sciatic nerve ligation (PNL). # $P < 0.001$ for day 10 vs day 0. Data are expressed as mean \pm s.e.mean (n = 4–6 per group). Contralateral data are presented in the right inset of the figure.

Figure 2

Dose–response curve for 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) for mechanical allodynia using von Frey hair (a) and for thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimulus (b). Data are expressed as mean \pm s.e.mean (n = 4–6 per group).

Figure 3

Dose–response curve for URB602 for mechanical allodynia using von Frey hair (a) and for thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimulus (b). Data are expressed as mean \pm s.e.mean (n = 4–6 per group).

Figure 4

Mechanical allodynia using von Frey hair (a) and thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimulus (b) 11 days after surgery for the ipsilateral and contralateral sides (inset). Rats received NaCl 0.9%, URB597 (25 μ g), URB602 (125 μ g), 2-AG (2-arachidonoyl glycerol; 1.5 μ g) or their combination. Data are expressed as mean \pm s.e.mean (n = 6 per group). $\blacklozenge P < 0.001$ vs NaCl 0.9%; $\S P < 0.005$ vs 2-AG, URB602, URB597 or 2-AG + URB597.

Figure 5

Mechanical allodynia using von Frey hair (a) and thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimulus (b) 11 days after surgery for the ipsilateral and contralateral sides (inset). On this day, rats received NaCl 0.9% or 2-AG (2-arachidonoyl glycerol; 10 μ g), in the absence or presence of antagonists: AM251 (80 μ g)/AM630 (25 μ g). Data are expressed as mean \pm s.e.mean (n = 6 per group). * $P < 0.001$ vs NaCl 0.9%.

Figure 6

Mechanical allodynia using von Frey hair (a) and thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimulus (b) 11 days after surgery for the ipsilateral and contralateral sides (inset). On this day, rats received NaCl 0.9% or URB602 (300 μ g), in the absence or presence of antagonists: AM251 (80 μ g)/AM630 (25 μ g). Data are expressed as mean \pm s.e.mean (n = 6 per group). $\Delta P < 0.001$ vs NaCl 0.9%.

Figure 7

Mechanical allodynia using von Frey hair (a) and thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimulus (b) 11 days after surgery for the ipsilateral and contralateral sides (inset). On this day, rats received NaCl 0.9% or URB597 (25 μ g), in the absence or presence of antagonists: AM251 (80 μ g)/AM630 (25 μ g). Data are expressed as mean \pm s.e.mean (n = 6 per group). ‡ $P < 0.001$ vs NaCl 0.9%; ¥ $P < 0.05$ vs NaCl 0.9%; $\hat{\cup} P < 0.05$ AM630+URB597 vs AM630; $\diamond P < 0.001$ AM630+URB597 vs AM630.

Figure 8

Mechanical allodynia using von Frey hair (a) and thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimulus (b) before, 10 and 11 days after surgery partial sciatic nerve ligation (PNL), for the ipsilateral and contralateral sides (inset). On the 11th day, rats received NaCl 0.9%, 2-AG

(2-arachidonoyl glycerol; 100 μg), URB602 (1000 μg) and URB597 (25 μg) on the contralateral side. Data are expressed as mean \pm s.e.mean (n = 6 per group). † $P < 0.001$ vs baseline.

Figure 1

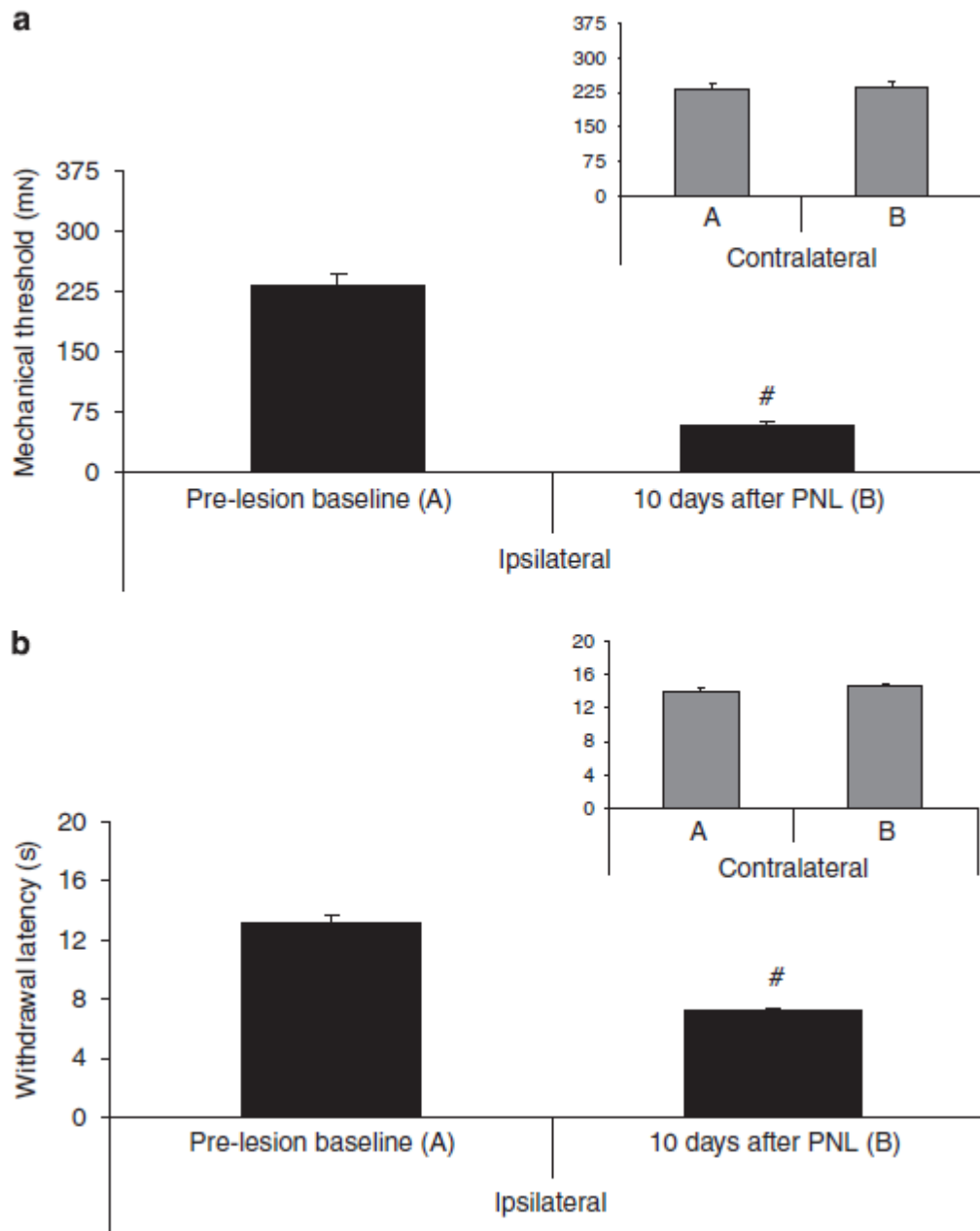


Figure 2

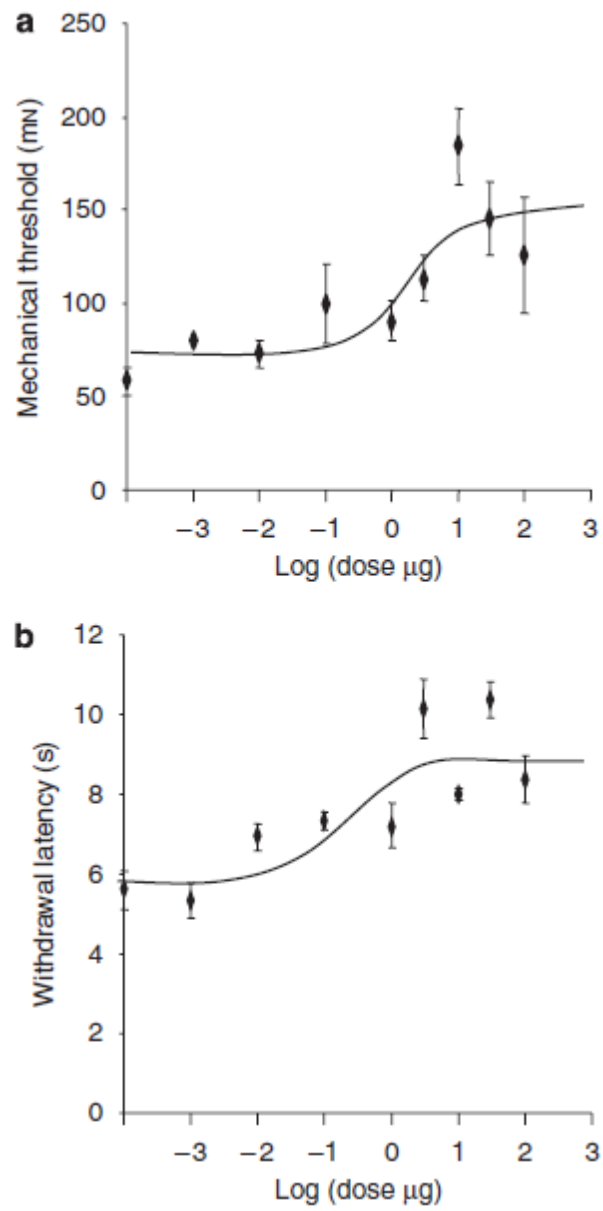


Figure 3

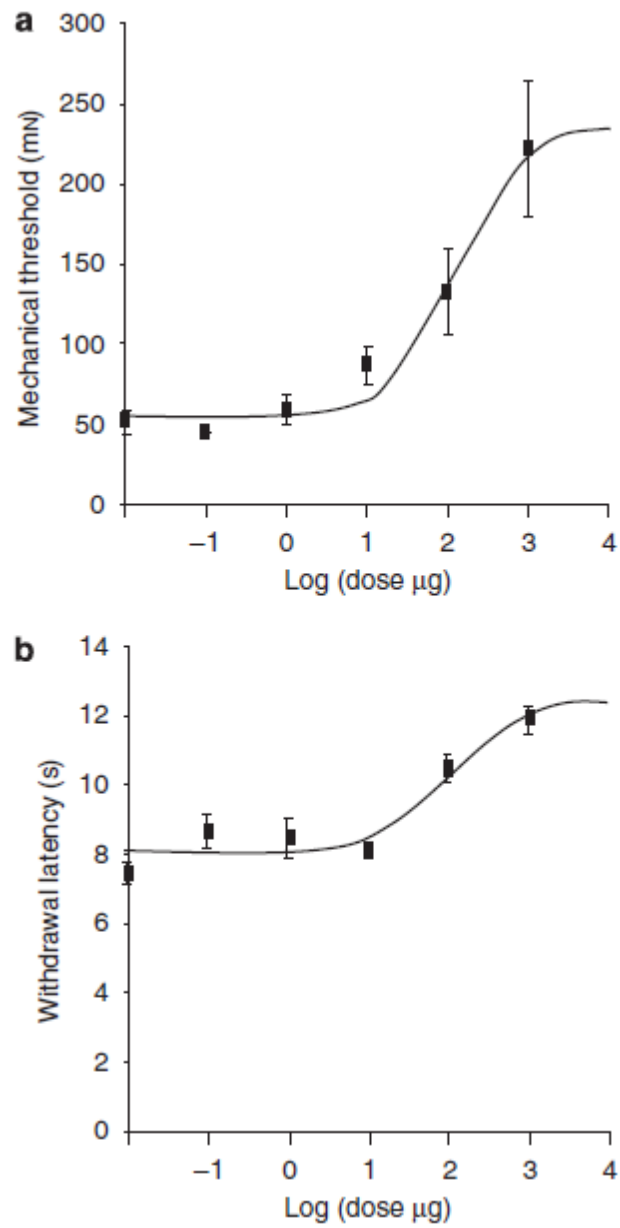


Figure 4

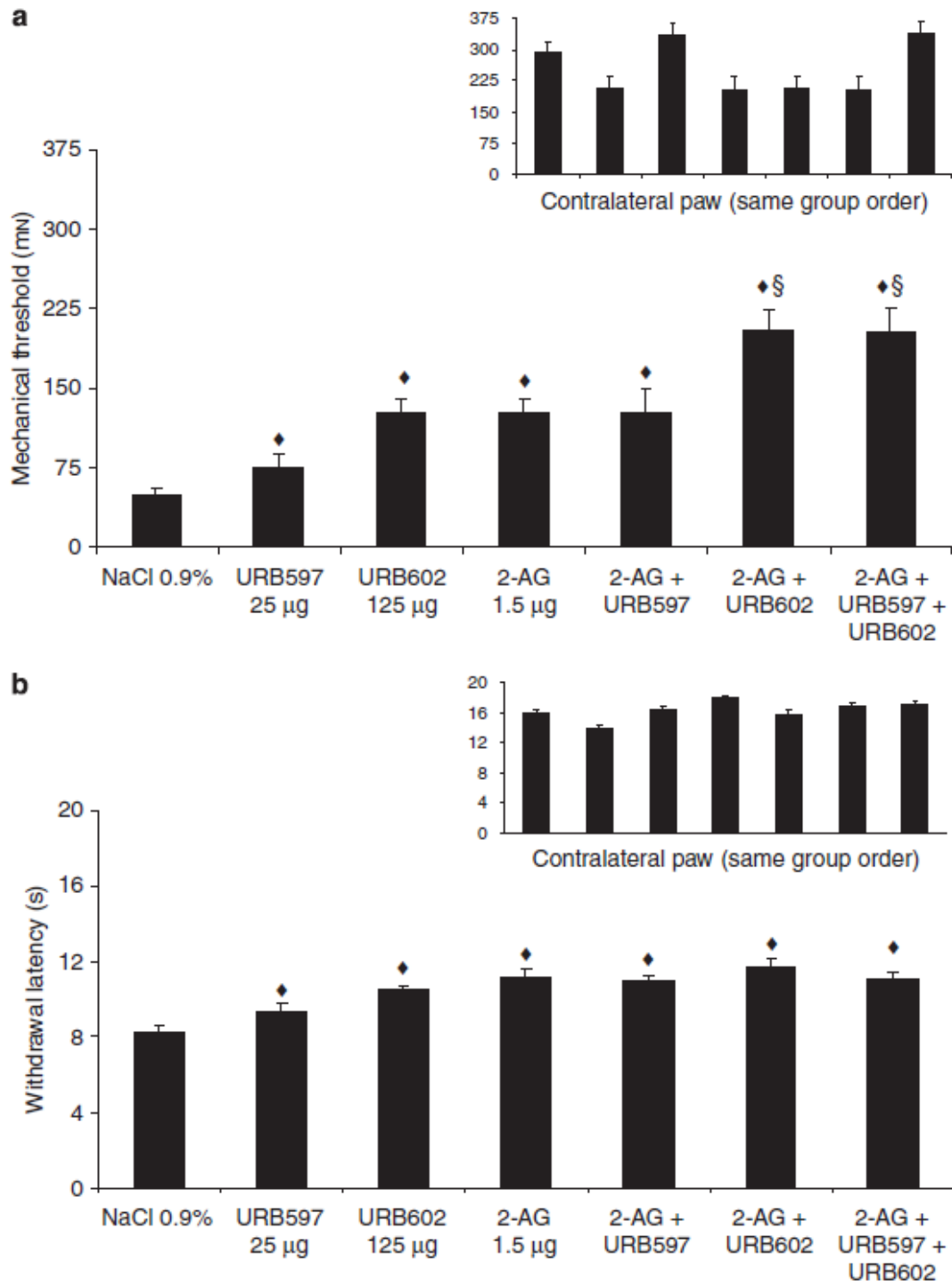


Figure 5

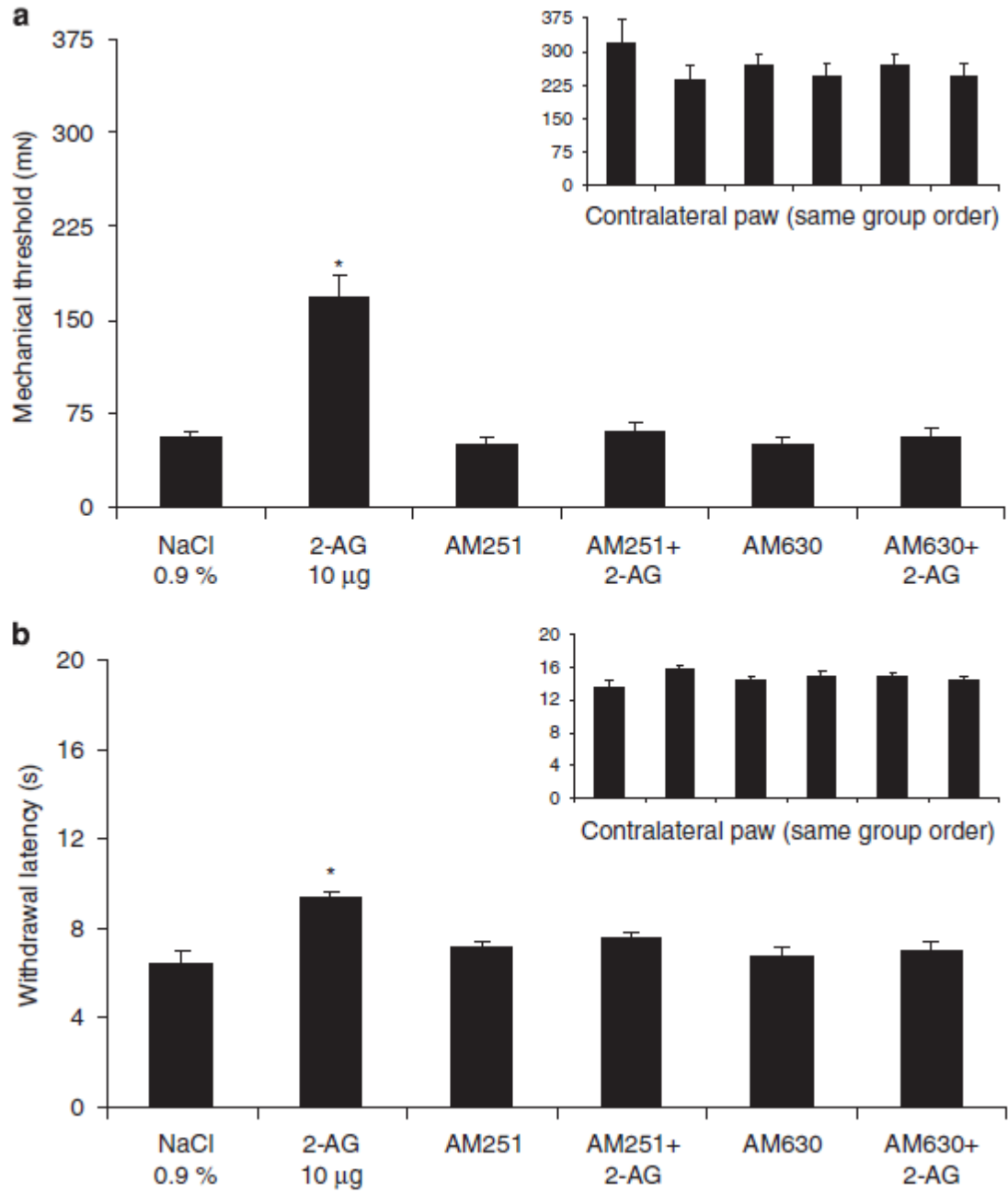


Figure 6

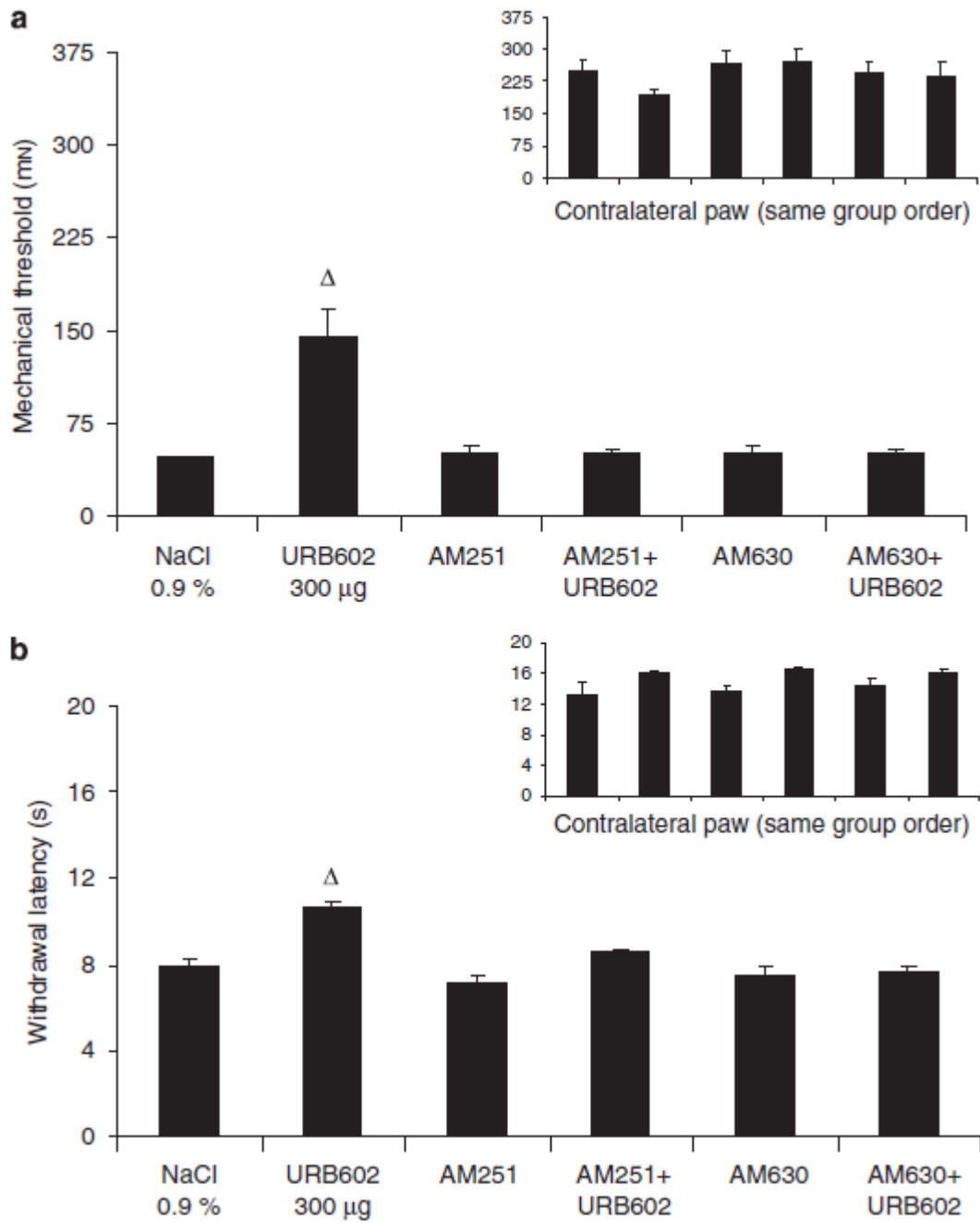


Figure 7

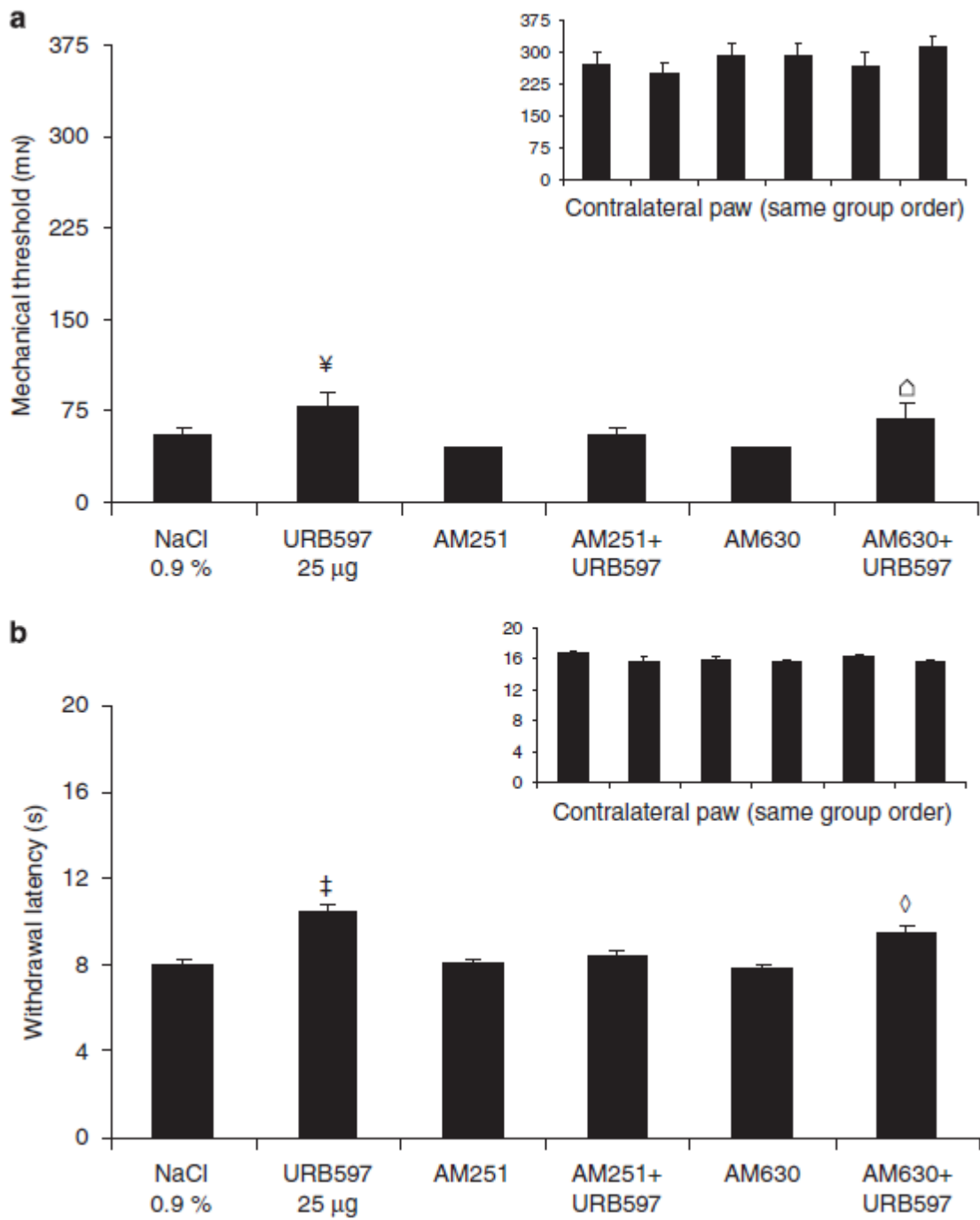
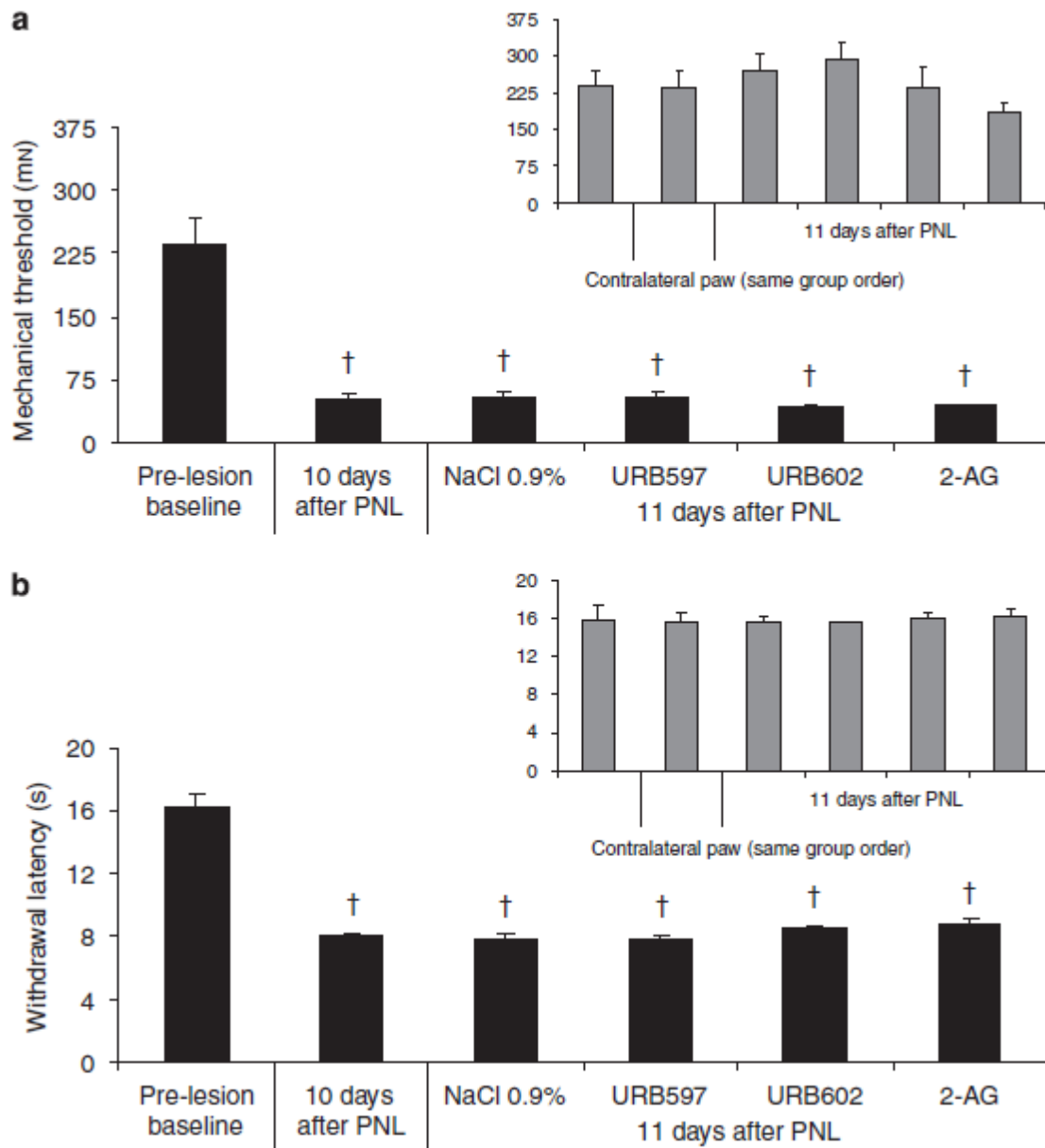


Figure 8



3 ARTICLE 3 PUBLIÉ DANS LA REVUE *NEUROPHARMACOLOGY*

« *Endocannabinoids decrease neuropathic pain-related behavior in mice through the activation of one or both peripheral CB₁ and CB₂ receptors* »

Short running title: Endocannabinoid peripheral antinociceptive effects

Julie Desroches¹, Sophie Charron², Jean-François Bouchard² & Pierre Beaulieu^{1,3}

Department of Pharmacology¹ and Anesthesiology³, Faculty of Medicine, School of Optometry², Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Neuropharmacology. 2013 Oct 19. doi : 10.1016/j.neuropharm.2013.10.006.

Article 3. Contribution des co-auteurs:

JD : Conceptualisation du projet, réalisation de la totalité des expériences, analyses statistiques, écriture du manuscrit, montage des figures

SC : Gestion des colonies de souris *cnr1KO* et *cnr2KO*, réalisation des analyses de génotypage des souris, participation à la révision du manuscrit

JFB : Gestion des colonies de souris *cnr1KO* et *cnr2KO*, révision du manuscrit, recherche des organismes subventionnaires

PB : Conceptualisation du projet, écriture et révision du manuscrit, recherche des organismes subventionnaires

3.1 Abstract

The two most studied endocannabinoids are anandamide (AEA), principally catalyzed by fatty-acid amide hydrolase (FAAH), and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG), mainly hydrolyzed by monoacylglycerol lipase (MGL). Inhibitors targeting these two enzymes have been described, including URB597 and URB602, respectively. Several recent studies examining the contribution of CB₁ and/or CB₂ receptors on the peripheral antinociceptive effects of AEA, 2-AG, URB597 and URB602 in neuropathic pain conditions using either pharmacological tools or transgenic mice separately have been reported, but the exact mechanism is still uncertain. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were evaluated in 436 male C57BL/6, *cnr1*KO and *cnr2*KO mice in the presence or absence of cannabinoid CB₁ (AM251) or CB₂ (AM630) receptor antagonists in a mouse model of neuropathic pain. Peripheral subcutaneous injections of AEA, 2-AG, WIN55,212-2 (WIN; a CB₁/CB₂ synthetic agonist), URB597 and URB602 significantly decreased mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. These effects were inhibited by both cannabinoid antagonists AM251 and AM630 for treatments with 2-AG, WIN and URB602 but only by AM251 for treatments with AEA and URB597 in C57BL/6 mice. Furthermore, the antinociceptive effects for AEA and URB597 were observed in *cnr2*KO mice but absent in *cnr1*KO mice, whereas the effects of 2-AG, WIN and URB602 were altered in both of these transgenic mice. Complementary genetic and pharmacological approaches revealed that the anti-hyperalgesic effects of 2-AG and URB602 required both CB₁ and CB₂ receptors, but only CB₂ receptors mediated its anti-allodynic actions. The antinociceptive properties of AEA and URB597 were mediated only by CB₁ receptors.

Keywords: anandamide, 2-arachidonoyl glycerol, cannabinoid receptors, fatty-acid amide hydrolase, monoacylglycerol lipase, neuropathic pain

Abbreviations: AEA, anandamide, 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol; CB, cannabinoid; DMSO, dimethylsulfoxide; FAAH, fatty-acid amide hydrolase; MGL, monoacylglycerol lipase

Highlights

- AEA, 2-AG, WIN55,212-2, URB597 and URB602 induced local antinociceptive effects
- Cannabinoid receptors contribute to local effects under neuropathic pain conditions
- 2-AG and URB602 require both CB₁ and CB₂ receptors to induce antinociception
- AEA and URB597 require only CB₁ receptors to produce their analgesic effects
- Complementary genetic / pharmacological approaches have resolved this issue

3.2 Introduction

Endocannabinoids, such as arachidonylethanolamide (anandamide, AEA) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG), are endogenous lipid-signaling ligands produced on demand from phospholipid precursors (see (Luchicchi and Pistis, 2012) for a review). These promising pain modulators act through the activation of two distinct G-protein-coupled receptors, CB₁ (Devane et al., 1988) and CB₂ receptors (Munro et al., 1993). CB₁ cannabinoid receptors are present on primary afferent neurons and various peripheral tissues (Agarwal et al., 2007; Hohmann and Herkenham, 1999; Walczak et al., 2005, 2006). The expression of CB₂ cannabinoid receptors is generally limited to cells of the immune and hematopoietic systems, for recent reviews see (Pacher and Mechoulam, 2011; Rom and Persidsky, 2013), although the CB₂ receptor protein has also been identified on brainstem neurons (Van Sickle et al., 2005) and in microglial cultures (Beltramo et al., 2006). The endocannabinoid system also includes enzymes responsible for their synthesis and degradation. AEA is mainly hydrolyzed by fatty-acid amide hydrolase (FAAH) (Cravatt et al., 1996), whereas 2-AG is mainly metabolized by monoacylglycerol lipase (MGL) (Dinh et al., 2002; Goparaju et al., 1999) and to a lesser extent by FAAH (Bisogno et al., 2005), serine hydrolase α - β -hydrolase domain 6 (ABHD6) and 12 (ABHD12) (Blankman et al., 2007; Marrs et al., 2010), among others. The expression of these two main endocannabinoid catabolizing enzymes is found along pain pathways, specifically in the sensory peripheral nervous system, such as dorsal root ganglia (DRG), the sciatic nerve and spinal cord for FAAH (Lever et al., 2009), whereas the precise anatomical localization of MGL in the periphery has not been fully elucidated, although its

activity in peripheral paw tissues has been reported (Guindon et al., 2011) and its expression has been co-localized in superficial dorsal horn microglia (Wilkerson et al., 2012).

Central and spinal cannabinoidergic transmission is well established (for a review see (Walker and Huang, 2002)), and peripheral cannabinoidergic transmission is crucial in pain control (Agarwal et al., 2007; Clapper et al., 2010; Marrs et al., 2010; Yu et al., 2010), involving different mechanisms of action. We have previously reported that the local antinociceptive effects of AEA were selectively blocked by a CB₁ receptor antagonist (Guindon and Beaulieu, 2006), whereas the peripheral effects of 2-AG in the partial sciatic nerve ligation (PNL) rat neuropathic pain model were alleviated by both CB₁ and CB₂ cannabinoid antagonists (Desroches et al., 2008). For pain treatment, an alternative approach to direct exogenous injections of AEA and 2-AG is to indirectly increase their levels in tissues through the injection of pharmacological inhibitors of the enzymatic degradation of endocannabinoids. Accordingly, we have already reported that mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in the PNL neuropathic pain model were alleviated following peripheral administration of FAAH and MGL inhibitors (Desroches et al., 2008) via CB₁ (URB597; (Kathuria et al., 2003) and CB₁/CB₂ (URB602; (Hohmann et al., 2005)) mechanisms.

According to the recent failures of FAAH inhibitors in patients with osteoarthritis pain of the knee (Huggins et al., 2012), it appears important to increase the concentrations of endocannabinoids in a targeted manner only in specific tissues where such an increase would be desirable (Di Marzo, 2008; Pacher and Kunos, 2013). Thus, several studies have demonstrated that the administration of inhibitors of the enzymes involved in the degradation of endocannabinoids attenuates different pain states, including neuropathic pain (see (Roques et al., 2012) for a review). However, some of these studies present intriguing discrepancies between the relative contributions of each cannabinoid receptor following the administration of FAAH and MGL inhibitors, suggesting that distinct cannabinoid receptor mechanisms of action underlie the antinociceptive effects of FAAH and MGL inhibitors (Kinsey et al., 2009).

Therefore, the aim of this study was to understand the exact contribution of each cannabinoid receptor in mediating the peripheral antinociceptive effects of FAAH and MGL inhibitors in a mouse model of neuropathic pain. In contrast to most of the previous studies who used transgenic mice or pharmacological approaches separately to examine the underlying cannabinoid mechanisms of action, the present study used complementary pharmacological and genetic approaches to assess if (1) genetic inactivation of CB₁ or CB₂ receptors impacts on PNL-induced nociception, (2) anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of FAAH inhibition by URB597 are prevented when cannabinoid receptors are inactivated, and, (3) CB₁ and CB₂ receptors are involved in the antinociceptive effects following MGL inhibition using URB602.

3.3 Methods

3.3.1 Animals

The research protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the Université de Montréal and all of the procedures conformed to the directives of the Canadian Council on Animal Care and guidelines of the International Association for the Study of Pain. Four hundred thirty-six male C57BL/6, *cnr1*KO and *cnr2*KO mice (20-25 g at the time of testing) were used in the current study. They were housed in groups of two to four in standard plastic cages with sawdust bedding in a climate-controlled room. The mice were allowed free access to food pellets and water. They were maintained in a 12-h light/dark cycle. All behavioral testing was performed during the light cycle. C57BL/6 mice were purchased from Charles River (St-Constant, Quebec, Canada). *Cnr1* transgenic mice were obtained from Pr. Beat Lutz (Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Mainz, Germany), which were generated and genotyped as previously described (Marsicano et al., 2002). *Cnr2* transgenic mice (005786; MGI 3604531) were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). These colonies were maintained in-house. All of the animal experiments were designed to minimize the number of animals used and their suffering.

3.3.2 Drug administration

Anandamide is an agonist with a 4-fold selectivity for CB₁ ($K_i = 89$ nM) over CB₂ ($K_i = 371$ nM) receptors (Pertwee et al., 1995). It was purchased from Tocris (Ellisville, MO, USA) in a liquid form of a water-dispersible emulsion and dissolved in 0.9% NaCl in water. 2-arachidonoyl glycerol is a full agonist of both the CB₁ and CB₂ receptors, with a 3-fold selectivity for CB₁ ($K_i = 472$ nM) over CB₂ ($K_i = 1400$ nM) receptors (Mechoulam et al., 1995). It was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) as an acetonitrile solution and dissolved in normal saline. WIN 55,212-2 is a synthetic agonist for CB₁ (62 nM) and CB₂ (3 nM) receptors (Felder et al., 1995). It was purchased from Tocris (Ellisville, MO, USA) in a powder form and dissolved in a 1:1:18 mixture of ethanol:cremophor:saline (Costa et al., 2004). AM251 and AM630 are selective CB₁ and CB₂ receptor antagonists, respectively. AM251 exhibits a 306-fold selectivity for CB₁ over CB₂ receptors (Gatley et al., 1996), whereas AM630 exhibits 70-165-fold selectivity for CB₂ over CB₁ receptors (Pertwee et al., 1995; Ross et al., 1999). The doses for each of the substances used in this study were chosen according to previous reports from our lab and others and adjusted for mice. They were purchased from Tocris (Ellisville, MO, USA) and dissolved in normal saline containing 0.1% of dimethyl sulfoxide (DMSO). URB597 and URB602 were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) and dissolved in normal saline containing 2.5% of DMSO for the experimental doses. Preliminary experiments performed in our laboratory with neuropathic rats ($n = 4$) have previously shown that there was no difference in neuropathic testing between 0.9% NaCl and 0.9% NaCl solution with 8% DMSO (Guindon and Beaulieu, 2006). All of the drugs were stored at -20°C and protected from light, and fresh solutions were prepared on the day of the experiment with the appropriate vehicle.

3.3.3 Mouse model of neuropathic pain

The PNL model was used in this study to achieve unilateral hind-limb neuropathy (Seltzer et al., 1990). Briefly, mice were anaesthetized using isoflurane (induction, 3%; maintenance, 1-2%). The left sciatic nerve was isolated under aseptic conditions and exposed

at high-thigh level, and a third to a half of the dorsal thickness of the nerve was then tightly ligated using an 8-0 monofilament nylon suture. After surgery, the wound was closed using 6-0 absorbable sutures for muscles and skin. The mice were allowed nine days to recover, and their posture and behavior were closely monitored for 48 h. Beginning on day 10, the mice were tested to assess the development of mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. On the 11th day, drugs were administered 15 min prior to neuropathic behavioral testing.

3.3.4 Sensory testing

During sensory testing, the mice were placed in elevated Plexiglas boxes (10.5 x 8.5 x 14 cm) with a 0.7-cm-diameter mesh grid floor for mechanical allodynia testing and a dry glass floor for thermal hyperalgesia testing. The animals were allowed to acclimatize for 15 min or until their exploratory behavior ceased before beginning the behavioral testing. The effect of drugs with short half-lives, such as anandamide and 2-AG (Willoughby et al., 1997), may be influenced by the testing order. To minimize this effect, the sequence of testing was alternated between mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. The maximum time to complete one battery of tests was approximately 40 min.

3.3.4.1 Mechanical allodynia

Mechanical sensitivity of the ipsilateral and contralateral hindpaws was assessed using von Frey hairs (Senselab aesthesiometer, Somedic, Sweden). Innocuous mechanical punctuate stimuli were delivered to the plantar surface of the hind paw with a series of individual von Frey filaments of ascending forces (increasing range between 1.90 and 43.54 mN). For each filament, the stimulus was repeated five times with an interval of 1-2 s between each trial. The threshold was determined as the lowest force that evoked a withdrawal response to one of the five stimuli (Tal and Bennett, 1994).

3.3.4.2 Thermal hyperalgesia

The thermal sensitivity of the ipsilateral and contralateral hindpaws was assessed using an infrared noxious heat stimuli of increasing temperature range, from the non-noxious to noxious range (Plantar test, Ugo Basile, Italy). Thermal punctuate stimuli were delivered to the plantar surface of the hind paw with a focused beam of radiant heat, and the withdrawal latency time was recorded. The results of each test are expressed as the mean of three withdrawal latencies in seconds (s). Three minutes was allowed between each test (Hargreaves et al., 1988). A cutoff of 10 s was established to prevent tissue damage.

3.3.5 Experimental design

The experiments were conducted in a randomized manner by the same experimenter. The experimenter was blind to the drug treatment during all of the testing. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were evaluated the day before PNL and on the 10th day after PNL for the ipsilateral and contralateral paws to confirm that the mice were neuropathic.

On the 11th day, 16 different combinations were tested in C57BL/6, *cnr1KO* and *cnr2KO* mice: (1) 0.9% NaCl (control group), (2) AEA (10 µg), (3) 2-AG (10 µg), (4) WIN (10 µg), (5) AM251 (1 µg), (6) AEA + AM251, (7) 2-AG + AM251, (8) AM630 (1 µg), (9) AEA + AM630, (10) 2-AG + AM630, (11) URB597 (100 µg), (12) AEA + URB597, (13) 2-AG + URB597, (14) URB602 (100 µg), (15) AEA + URB602 and (16) 2-AG + URB602. Anandamide (AEA, 10 µg) (Khasabova et al., 2012), 2-arachidonoyl glycerol (2-AG, 10 µg) (Khasabova et al., 2011), WIN 55,212-2 (WIN, 10 µg), URB597 (25 µg) and URB602 (25 µg) (Jhaveri et al., 2006), AM251 (1 µg) and AM630 (1 µg) (Malan et al., 2001) were all dissolved in the same total volume of 10 µL (the injection volume) and administered subcutaneously (s.c.) in the dorsal surface of the operated left hind paw 15 min before the pain tests (n = 6 per group). To exclude any possible systemic effect of the drugs, they were also all administered s.c. on the dorsal surface of the contralateral side (right hind paw, n = 4 per group).

3.3.6 *Statistical analysis*

The mechanical threshold and withdrawal latency for each treatment group are expressed as the mean \pm the Standard Error of the Mean (S.E.M.). Calculations were performed with Excel 2007. Graphs were generated and statistical analysis was performed using Prism 5.01 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Comparisons of the means between the ipsilateral and contralateral paws were performed using either a two-tailed paired *t*-test, a one-way or a two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple-comparison test. The contralateral side was analyzed separately, using a one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. The critical level of significance was set at 5% ($P < 0.05$).

3.4 Results

All of the mice were neuropathic 10 days after PNL, as a statistically significant difference was present in the ipsilateral hind paw in comparison to the pre-lesion baseline values for mechanical allodynia ($P < 0.0001$, $t = 12.86$ and $df = 5$) (Fig. 1A) and thermal hyperalgesia ($P < 0.0001$, $t = 14.13$ and $df = 5$, two-tailed paired *t*-test) (Fig. 1B). However, there were no significant differences in the values for the contralateral hind paw [(Fig. 1A, inset; $P = 0.204$, $t = 1.460$ and $df = 5$) and (Fig. 1B, inset; $P = 0.096$, $t = 2.048$ and $df = 5$), two-tailed paired *t*-test].

3.4.1 *Anti-allodynic effects of AEA, 2-AG and WIN 55,212-2 in the absence or presence of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptor antagonists in C57BL/6, cnr1KO and cnr2KO mice*

Overall, there were no significant differences between the three genotypes in the von Frey values (Table 1). Genetic deletion of either the CB₁ or CB₂ receptor did not impact the pre-lesion baseline values nor did the development of PNL-induced allodynic effects. Furthermore, nociceptive responses after PNL were not affected by treatment with saline,

AM251 or AM630 in all genotypes. Importantly, emerging evidence suggests that AM251 presents direct antagonistic actions at the mu opioid peptide receptors (MOP) (Seely et al., 2012). Therefore, we cannot exclude any opioid off-target effects in our experiments using this compound. However, we did confirm that AM251 does not evoke hypernociceptive effects in naïve C57BL/6 mice, which indicates that the previous findings were not based on the MOP antagonist effects of AM251 (this is also true for results reported in sections 3.3 and 3.4).

In C57BL/6 mice (Fig. 2A), in the absence of cannabinoid antagonists, the local administration of AEA (10 µg) and 2-AG (10 µg) produced significant anti-allodynic effects, equivalent to those of WIN (10 µg) vs. saline [$P < 0.05$, $F_{\text{treatment}}(9,150) = 2.412$, two-way ANOVA]. In the presence of the CB₂ receptor antagonist AM630 (1 µg), AEA produced significant antinociceptive effects vs. saline ($P < 0.05$, two-way ANOVA), whereas it lost its anti-allodynic effect in the presence of AM251. Indeed, the administration of AEA alone produced significant anti-allodynic effects compared with the combination of AEA + AM251 [($P = 0.001$, $F(2,17) = 11.10$), one-way ANOVA]. In addition, the anti-allodynic effects of 2-AG were reversed by both AM251 and AM630 [($P = 0.004$, $F(2,17) = 8.182$), one-way ANOVA]. These results demonstrate that the effects of AEA are likely to be mediated through direct activation of CB₁ receptors, while 2-AG requires both cannabinoid receptors to mediate its anti-allodynic effects. Moreover, the antinociceptive responses following ipsilateral injections were not significantly different from any of the treatments vs. saline in the contralateral paw (Fig. 2A, inset) [$P = 0.062$, $F = 1.976$, one-way ANOVA].

In the *cnr1*KO mice (Fig. 2B), only peripheral 2-AG produced significant anti-allodynic effects vs. saline [$P = 0.049$, $F_{\text{treatments}}(7,120) = 2.099$, two-way ANOVA]. Hence, AEA alone compared with saline did not produce any anti-allodynic effects, confirming that AEA requires the presence of CB₁ receptors, whereas 2-AG is still able to produce antinociceptive effects when CB₁ receptors are absent. Moreover, there was a statistically significant difference between 2-AG + AM630 vs. 2-AG alone [($P < 0.0001$, $F(2,17) = 24.64$), one-way ANOVA], suggesting that CB₂ receptors are involved in the effects of 2-AG. In contrast, when

both receptors were genetically and pharmacologically (*cnr1KO* + AM630) invalidated, 2-AG produced no effect. Indeed, when combining complementary genetic and pharmacological approaches, only CB₂ receptors are essential for the anti-allodynic effects of 2-AG. Again, there were no significant differences in the von Frey values of any of the treatments vs. saline in the contralateral paw (Fig. 2B, inset) [$P = 0.508$, $F = 0.912$, one-way ANOVA].

In the *cnr2KO* mice (Fig. 2C), only peripheral AEA produced significant anti-allodynic effects vs. saline ($P < 0.05$, two-way ANOVA), whereas no other substances reached statistical significance [$P = 0.765$, $F_{\text{treatments}}(7,120) = 0.588$, two-way ANOVA], again demonstrating that CB₂ receptors are necessary for 2-AG to produce antinociception but not mandatory for AEA. However, the involvement of CB₁ receptors in the anti-allodynic effects of both endocannabinoids was confirmed by a statistically significant difference between the combination of AEA + AM251 vs. AEA alone [$(P < 0.0001$, $F(2,17) = 24.17$), one-way ANOVA] and 2-AG + AM251 vs. 2-AG alone [$(P = 0.036$, $F(2,17) = 4.175$), one-way ANOVA]. Notably, the synthetic CB₁/CB₂ receptor agonist WIN55,212-2 lost its antinociceptive efficacy in both transgenic mice, as WIN55,212-2 is a synthetic agonist at both the CB₁ and CB₂ receptors. Once more, the scores between the contralateral paws were not significantly different using any of the treatments vs. saline (Fig. 2C, inset) [$P = 0.960$, $F = 0.276$, one-way ANOVA].

3.4.2 Anti-hyperalgesic effects of AEA, 2-AG and WIN 55,212-2 in the absence or presence of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptor antagonists in C57BL/6, *cnr1KO* and *cnr2KO* mice

There were no significant differences between the three genotypes in their noxious heat stimulus values (Table 1). Genetic deletion of either CB₁ or CB₂ receptors did not impact the pre-lesion baseline values, indicating a lack of endocannabinoid tone following short-term injury to the sciatic nerve or the development of PNL-induced hyperalgesic effects. Furthermore, the nociceptive responses after PNL were not affected by treatment with saline, AM251 or AM630 in all genotypes.

In the C57BL/6 mice (Fig. 3A), in the absence of AM251 and AM630, the local administration of AEA, 2-AG and WIN produced significant anti-hyperalgesic effects vs. saline [$P < 0.001$, $F_{\text{treatments}}(9,150) = 14.46$, two-way ANOVA] as well as the combination of 2-AG + AM630, 2-AG + AM251 and AEA + AM630 when all of the treatments were compared with saline ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, two-way ANOVA, respectively). Moreover, the administration of AEA alone also produced significant anti-hyperalgesic effects vs. AEA + AM251 [$P = 0.007$, $F(2,17) = 7.126$], one-way ANOVA]. These results demonstrate that the antinociceptive effects of AEA are likely to be mediated through direct activation of CB₁ receptors. In addition, the administration of 2-AG alone also produced significant anti-hyperalgesic effects when compared with the combination of 2-AG with both antagonists [$P = 0.006$, $F(2,17) = 7.499$], one-way ANOVA]. These results demonstrate that CB₁ and CB₂ receptors are involved in the anti-hyperalgesic effects of 2-AG. In addition, the antinociceptive responses following the ipsilateral injections were not significantly different for any of the treatments vs. saline in the contralateral paw (Fig. 3A, inset) [$P = 0.327$, $F = 1.183$, one-way ANOVA].

In the *cnr1*KO mice (Fig. 3B), the local injection of 2-AG and WIN in the absence of cannabinoid antagonists produced significant anti-hyperalgesic effects vs. saline [$P < 0.05$, $P < 0.01$, $F_{\text{treatments}}(7,120) = 1.529$, two-way ANOVA, respectively]. A noteworthy observation is that AEA alone compared with saline did not produce any effect, confirming that AEA requires the presence of CB₁ receptors to produce antinociception. Interestingly, 2-AG combined with AM630 lost its anti-hyperalgesic effect vs. 2-AG alone [$P = 0.031$, $F(2,17) = 4.403$], one-way ANOVA], confirming that 2-AG requires CB₂ receptors to produce anti-hyperalgesic effects. Moreover, when both receptors were genetically and pharmacologically (*cnr1*KO + AM630) inhibited, 2-AG did not produce any effect. As expected, there were again no significant differences in the noxious heat stimulus values of any of the treatments compared with saline in the contralateral paw (Fig. 3B, inset) [$P = 0.207$, $F = 1.467$, one-way ANOVA].

In the *cnr2KO* mice (Fig. 3C), peripheral AEA, 2-AG and WIN produced significant anti-hyperalgesic effects vs. saline [$P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $F_{\text{treatments}}(7,120) = 5.786$, two-way ANOVA, respectively]. Once again, the involvement of CB₁ receptors in the anti-hyperalgesic effects of AEA and 2-AG was confirmed by the absence of antinociceptive effects following the administration of AEA + AM251 vs. AEA alone [($P < 0.0001$, $F(2,17) = 33.89$), one-way ANOVA] and 2-AG + AM251 vs. 2-AG alone [($P = 0.001$, $F(2,17) = 10.80$), one-way ANOVA]. Notably, these results confirm that 2-AG also requires CB₁ receptors to produce anti-hyperalgesic effects. However, when both receptors were genetically and pharmacologically (*cnr2KO* + AM251) inhibited, 2-AG produced no effect. On the contralateral side, the scores were not significantly different for any of the treatments compared with saline (Fig. 3C, inset) [$P = 0.580$, $F = 0.816$, one-way ANOVA].

3.4.3 Anti-allodynic effects of AEA and 2-AG in the absence or presence of FAAH and MGL inhibitors in C57BL/6, *cnr1KO* and *cnr2KO* mice

In the C57BL/6 mice, the local administration of AEA, 2-AG, URB597 and URB602 produced significant anti-allodynic effects vs. saline [$P < 0.05$, $F_{\text{treatments}}(8,129) = 1.415$, two-way ANOVA] as well as the combination of AEA + URB597, AEA + URB602, 2-AG + URB597 and 2-AG + URB602 when all of the treatments were compared with saline ($P < 0.05$, $P < 0.01$, two-way ANOVA) (Fig. 4A). However, the combination of either AEA or 2-AG with either an FAAH or MGL inhibitor did not show a greater anti-allodynic effect [($P = 0.471$, $F(2,16) = 0.795$) and ($P = 0.598$, $F(2,16) = 0.534$), respectively, one-way ANOVA]. The antinociceptive responses following ipsilateral injections were not significantly different for any of the treatments vs. saline in the contralateral paw (Fig. 4A, inset) [$P = 0.754$, $F = 0.623$, one-way ANOVA].

In the *cnr1KO* mice, peripheral 2-AG and URB602 produced significant anti-allodynic effects vs. saline [$P < 0.05$, $F_{\text{treatments}}(8,135) = 1.902$, two-way ANOVA] as well as the combination AEA + URB602, 2-AG + URB597 and 2-AG + URB602 when all of the treatments were compared with saline ($P < 0.05$, $P < 0.01$, two-way ANOVA) (Fig. 4B). Hence, AEA and

URB597 did not produce any effects, confirming that AEA and URB597 both require the presence of CB₁ receptors. In contrast, the combination of AEA + URB602 produced significant anti-allodynic effects vs. AEA alone [($P = 0.0009$, $F(2,17) = 11.70$), one-way ANOVA] indicating that URB602 may produce its effects through indirect activation of CB₂ receptors. Interestingly, the combination of either an FAAH or MGL inhibitor with 2-AG did not show a greater anti-allodynic effect than 2-AG alone [($P = 0.616$, $F(2,17) = 0.501$), one-way ANOVA]. Moreover, there were no significant differences between the von Frey values of any of the treatments compared with saline in the contralateral paw (Fig. 4B, inset) [$P = 0.586$, $F = 0.825$, one-way ANOVA].

In the *cnr2KO* mice, peripheral AEA and URB597 produced significant anti-allodynic effects vs. saline [$P < 0.05$, $F_{\text{treatments}}(8,135) = 1.501$, two-way ANOVA] as well as the combination of AEA + URB597, 2-AG + URB597 and AEA + URB602 when all of the treatments were compared with saline ($P < 0.05$, $P < 0.01$, two-way ANOVA) (Fig. 4C). Because no effect was observed in the *cnr2KO* animals, 2-AG and URB602 seem to require the presence of CB₂ receptors to produce any effect. However, the combination of either AEA or 2-AG with either an FAAH or MGL inhibitor did not show any greater anti-allodynic effect, respectively; [($P = 0.768$, $F(2,17) = 0.269$) and ($P = 0.598$, $F(2,17) = 0.534$), one-way ANOVA]. Moreover, the anti-allodynic scores between contralateral paws were not significantly different in any of the treatments vs. saline (Fig. 4C, inset) [$P = 0.889$, $F = 0.443$, one-way ANOVA].

3.4.4 Anti-hyperalgesic effects of AEA and 2-AG in the absence or presence of FAAH and MGL inhibitors in C57BL/6, cnr1KO and cnr2KO mice

In the C57BL/6 mice, the local administration of AEA, 2-AG, URB597 and URB602 produced significant anti-hyperalgesic effects vs. saline [$P < 0.001$, $F_{\text{treatments}}(8,129) = 5.192$, two-way ANOVA] as well as the combination of AEA + URB597, 2-AG + URB597, AEA + URB602 and 2-AG + URB602 when all of the treatments were compared with saline ($P < 0.001$, two-way ANOVA) (Fig. 5A). Moreover, the administration of AEA + URB597 and AEA + URB602 revealed superior anti-hyperalgesic effects of these combinations vs. AEA alone [($P =$

0.006, $F(2,16) = 7.538$), one-way ANOVA]. Similarly, the administration of 2-AG + URB597 and 2-AG + URB602 produce significant anti-hyperalgesic effects vs. 2-AG alone [($P = 0.0002$, $F(2,16) = 16.43$), one-way ANOVA]. Hence, the combination of AEA or 2-AG with both inhibitors produced significantly greater anti-hyperalgesic effects. On the contralateral side, the antinociceptive responses following ipsilateral injections were not significantly different using any of the treatments vs. saline (Fig. 5A, inset) [$P = 0.144$, $F = 1.632$, one-way ANOVA].

In the *cnr1KO* mice, the local injection of 2-AG and URB602 produced significant anti-hyperalgesic effects vs. saline [$P < 0.01$, $P < 0.001$, $F_{\text{treatments}}(8,135) = 6.930$, two-way ANOVA] as well as the combination of 2-AG + URB597, AEA + URB602 and 2-AG + URB602 ($P < 0.001$, two-way ANOVA) (Fig. 5B). However, AEA alone vs. saline did not produce any effect, confirming that AEA requires the presence of CB₁ receptors to produce its anti-hyperalgesic effects. Moreover, the administration of AEA + URB602 and 2-AG + URB602 produced significant antinociceptive effects when compared with AEA and 2-AG alone, respectively; [($P = 0.0004$, $F(2,17) = 13.54$) and ($P = 0.001$, $F(2,17) = 11.13$), one-way ANOVA], whereas the combination of either AEA or 2-AG with URB597 did not produce a greater effect in the *cnr1KO* mice. These results further confirm that the analgesic effect of URB597 was likely to be mediated through the indirect activation of CB₁ receptors. Again, there were no significant differences between the noxious heat stimulus values of any of the treatments vs. saline in the contralateral paw (Fig. 5B, inset) [$P = 0.270$, $F = 1.295$, one-way ANOVA].

In the *cnr2KO* mice, peripheral AEA, 2-AG, URB597 and URB602 produced significant anti-hyperalgesic effects vs. saline [$P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $F_{\text{treatments}}(8,135) = 5.667$, two-way ANOVA] as well as the combination of AEA + URB597, 2-AG + URB597, AEA + URB602 and 2-AG + URB602 ($P < 0.05$, $P < 0.001$, two-way ANOVA) (Fig. 5C). Moreover, the administration of AEA + URB597 produced significant anti-hyperalgesic effects when compared with AEA alone [($P = 0.005$, $F(2,17) = 7.851$), one-way ANOVA], whereas the combination of 2-AG with both of the inhibitors did not produce a greater effect [($P = 0.057$, $F(2,17) = 3.483$), one-way ANOVA]. Overall, these results confirm that the antinociceptive effects of URB602 were likely to be mainly mediated through an indirect activation of CB₂

receptors, although CB₁ receptors are certainly also involved because URB602 can still lead to antinociception in *cnr2KO* mice. Again, the anti-hyperalgesic scores between the contralateral paws were not significantly different using any of the treatments vs. saline (Fig. 5C, inset) [$P = 0.762$, $F = 0.613$, one-way ANOVA].

3.4.5 Anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of drugs are mediated locally in C57BL/6 mice

Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were assessed following injections of the drugs into the contralateral hind paw to confirm that the antinociceptive effects observed after the drug injections were mediated by a local site of action. When the drugs were administered on the contralateral side to mice 11 days after PNL, there was a significant difference in the anti-allodynic effects observed during the days after surgery (days 10 and 11) compared to the day before surgery (pre-lesion baseline) [$P < 0.0001$, $F(7,31) = 46.91$, one-way ANOVA]. However, there was no significant difference in the anti-allodynic effects between days 10 and 11 [$P = 0.986$, $F(6,27) = 0.157$, one-way ANOVA] on the ipsilateral side (Fig. 6A), confirming that the previously observed anti-allodynic effects of the drugs were locally rather than systemically mediated. On the contralateral side, there was no difference in the antinociceptive effects observed at the pre-lesion baseline compared to days 10 and 11 (Fig. 6A, inset) [$P = 0.982$, $F(7,31) = 0.202$, one-way ANOVA], and no difference was observed between days 10 and 11 [$P = 0.969$, $F(6,27) = 0.211$, one-way ANOVA].

When the drugs were given on the contralateral side to mice 11 days after PNL, there was a significant difference in the anti-hyperalgesic effects between days 10 and 11 compared to the pre-lesion baseline [$P < 0.0001$, $F(7,31) = 93.62$, one-way ANOVA]. Although, there was no significant difference in the anti-hyperalgesic effects between days 10 and 11 [$P = 0.943$, $F(6,27) = 0.275$, one-way ANOVA] on the ipsilateral side (Fig. 6B), confirming that the previously observed anti-hyperalgesic effects of the drugs were locally mediated. On the contralateral side, there was no difference in the antinociceptive effects

observed at the pre-lesion baseline compared to days 10 and 11 (Fig. 6B, inset) [$P = 0.255$, $F(7,31) = 1.390$, one-way ANOVA], and no difference was observed between days 10 and 11 [$P = 0.200$, $F(6,27) = 1.588$, one-way ANOVA].

3.5 Discussion

The present study was designed to address the contrasting cannabinoid receptor mechanisms through which either direct (exogenous endocannabinoids) or indirect (FAAH and MGL inhibitors) approaches mediate their peripheral antinociceptive effects. Using a local route of administration and a combination of complementary pharmacological and genetic tools, we sought to determine the exact involvement of CB₁ and CB₂ receptors in the local antinociceptive effects of endocannabinoids in Seltzer's mouse model of neuropathic pain. Our results indicate that exogenous AEA and URB597 inhibited mechanical allodynia and thermal hyperalgesia through a local CB₁-receptor-mediated mechanism. On the other hand, our results demonstrated that both peripheral CB₁ and CB₂ receptors contribute to the anti-hyperalgesic properties of exogenous 2-AG and URB602, whereas only CB₂ receptors were involved in the anti-allodynic effects of 2-AG and URB602.

The current literature indicates that FAAH and MGL inhibitors reduce nerve-injury-related nociceptive states through distinct cannabinoid receptor mechanisms of action. Intriguingly, most of the experiments are actually not conclusive on the exact contribution of both of the cannabinoid receptors on the antinociceptive effects of endogenous cannabinoids. Both of the cannabinoid receptors seem to be necessary for FAAH inhibitors to have an effect, while the actions of MGL inhibitors are only mediated *via* a CB₁ mechanism of action, suggesting that in these studies, CB₂ receptors are not necessary for 2-AG antinociceptive effects (Caprioli et al., 2012; Chang et al., 2006; Gattinoni et al., 2010; Kinsey et al., 2009; Russo et al., 2007). For example, the inhibition of FAAH using the new, peripherally acting inhibitor URB937 was lost in the FAAH KO and *cnr1*KO mice in the chronic constriction injury (CCI) model of neuropathic pain (Clapper et al., 2010). In addition, a recent study using transgenic mice has demonstrated that i.p. PF-3845, a FAAH selective inhibitor,

lacked anti-allodynic efficacy in both cannabinoid knockout lines, whereas i.p. JZL184, a MGL inhibitor, did not produce anti-allodynic effects in *cnr1*KO mice, but retained its anti-allodynic effects in *cnr2*KO mice using the CCI model (Kinsey et al., 2010). Interestingly, our results do not agree with the results described in some previous studies. From this perspective, we examined the results based on the apparent complexity of the two endocannabinoid-hydrolyzing enzyme inhibitors presented by previous studies by combining transgenic mice and pharmacological approaches. Therefore, we aimed at mimicking CB₁/CB₂ double KO mice (Jarai et al., 1999); *cnr1*KO mice were administered AM630, a CB₂ receptor antagonist, whereas *cnr2*KO mice were given AM251, a CB₁ receptor antagonist, assuming that both cannabinoid receptors were thus invalidated under these conditions.

As some authors have reported, the variability in the observations is most likely dependent on several factors such as the sensory modality, the level of endocannabinoid tone produced by the injury, the compound used, the strain and gender of mice and rats, etc. (Ahmed et al., 2010; Guindon et al., 2011; Khasabova et al., 2011). The discrepancies cannot only be based on differences related to the pharmacological tools because we were using transgenic mice; therefore, the differences could also be caused by the route of administration or the animal model used. Indeed, in contrast to most of the studies presented above, our experiments focused on the peripheral level. Accordingly, studies using a local route of administration present similar conclusions (Guindon et al., 2011; Spradley et al., 2010), indicating possible region-specific elevation of endocannabinoids. However, the specificity of either URB597 or URB602 for inhibiting FAAH or MGL, respectively, at the concentrations used in the present study cannot be determined without measuring endocannabinoid levels in peripheral paw tissues. Therefore, we cannot confirm that URB597 and URB602 did indeed elevate endocannabinoid levels in our study; however, it is reasonable to assume that this was the mechanism of action because a number of studies have shown specific elevation of the endocannabinoid levels after the administration of these inhibitors (Guindon et al., 2011; Kathuria et al., 2003; Lichtman et al., 2002).

Additionally, the differences may reside in the pathophysiology of the models of peripheral injury. For example, a recent study using paired genetic and pharmacological approaches has revealed that the anti-allodynic effects of i.p. JZL184 in the carrageenan model required both CB₁ and CB₂ receptors (Ghosh et al., 2012). Indeed, in some models involving inflammation, such as carrageenan (Ghosh et al., 2012), capsaicin-induced thermal hyperalgesia (Spradley et al., 2010) and formalin (Guindon et al., 2011), CB₁ and CB₂ receptors are both involved in MGL inhibition, while FAAH inhibition requires only CB₁ receptors. One possible hypothesis related to this issue is the degree to which inflammatory responses contribute to nociception, which explains the existing discrepancies between the studies depending on the nociceptive model. It is important to note that there is also a significant inflammatory component in the development of painful neuropathy. Under inflammatory conditions, the endocannabinoid system has been shown to function differently compared to its physiological state (Rani Sagar et al., 2012). Therefore, models or surgical techniques producing more inflammation may have a role in these inconsistencies. However, some authors have reported that the PNL neuropathic pain model involves minimal inflammatory processes compared with the most commonly used CCI model (Bridges et al., 2001); thus, the level of inflammation may not explain all of the discrepancies.

Several studies have questioned the selectivity of the first reversible MGL inhibitor URB602 and concluded that this compound cannot be used systemically as a selective MGL inhibitor because it can suppress FAAH *in vitro* (Saario et al., 2005; Vandevoorde et al., 2007). However, following site-specific injection in the brain, this MGL-preferring inhibitor increased 2-AG levels with no impact on AEA levels *in vivo* (Hohmann et al., 2005) and *in vitro* (King et al., 2007). Accordingly, a recent study confirmed this previous finding and demonstrated that peripheral injection of URB602 increased hind paw 2-AG levels without altering AEA levels (Guindon et al., 2011), validating URB602 as an effective *in vivo* research tool for the inhibition of 2-AG hydrolysis. More recently, novel, selective MGL inhibitors have been generated, such as OMDM169 (Bisogno et al., 2009) and JZL184 (Long et al., 2009). Nevertheless, in regards to these discrepancies, future studies should concentrate on

improved FAAH and MGL inhibitors, such as KML29 (Chang et al., 2012), or the use of either FAAH KO (Cravatt et al., 2001) or MGL KO mice (Schlosburg et al., 2010).

3.6 Conclusions

We have demonstrated that the local administration of AEA, 2-AG, WIN, URB597 and URB602 induced anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain. These antinociceptive effects were locally mediated. Although potential discrepancies exist, the use of complementary pharmacological and genetic tools revealed that both CB₁ and CB₂ receptors are necessary for the peripheral anti-hyperalgesic effects of 2-AG and URB602, whereas only CB₂ receptors are required for the anti-allodynic effects. The peripheral antinociceptive effects of AEA and URB597 are mediated through CB₁ receptors in the mouse PNL model. Targeted modulation of AEA and 2-AG levels in peripheral tissues through interference with their degrading enzymes represents a promising approach to the treatment of neuropathic pain.

3.7 References

Agarwal, N., Pacher, P., Tegeder, I., et al., 2007. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci* 10, 870-879.

Ahmed, M. M., Rajpal, S., Sweeney, C., et al., 2010. Cannabinoid subtype-2 receptors modulate the antihyperalgesic effect of WIN 55,212-2 in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *Spine J* 10, 1049-1054.

Beltramo, M., Bernardini, N., Bertorelli, R., et al., 2006. CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *Eur J Neurosci* 23, 1530-1538.

Bisogno, T., Ligresti, A., Di Marzo, V., 2005. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 81, 224-238.

Bisogno, T., Ortar, G., Petrosino, S., et al., 2009. Development of a potent inhibitor of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis with antinociceptive activity in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1791, 53-60.

Blankman, J. L., Simon, G. M., Cravatt, B. F., 2007. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol* 14, 1347-1356.

Bridges, D., Thompson, S. W., Rice, A. S., 2001. Mechanisms of neuropathic pain. *Br J Anaesth* 87, 12-26.

Caprioli, A., Coccorello, R., Rapino, C., et al., 2012. The novel reversible fatty acid amide hydrolase inhibitor ST4070 increases endocannabinoid brain levels and counteracts neuropathic pain in different animal models. *J Pharmacol Exp Ther* 342, 188-195.

Chang, J. W., Niphakis, M. J., Lum, K. M., et al., 2012. Highly selective inhibitors of monoacylglycerol lipase bearing a reactive group that is bioisosteric with endocannabinoid substrates. *Chem Biol* 19, 579-588.

- Chang, L., Luo, L., Palmer, J. A., et al., 2006. Inhibition of fatty acid amide hydrolase produces analgesia by multiple mechanisms. *Br J Pharmacol* 148, 102-113.
- Clapper, J. R., Moreno-Sanz, G., Russo, R., et al., 2010. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat Neurosci* 13, 1265-1270.
- Costa, B., Colleoni, M., Conti, S., et al., 2004. Repeated treatment with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 reduces both hyperalgesia and production of pronociceptive mediators in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 141, 4-8.
- Cravatt, B. F., Demarest, K., Patricelli, M. P., et al., 2001. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9371-9376.
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., et al., 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384, 83-87.
- Desroches, J., Guindon, J., Lambert, C., et al., 2008. Modulation of the anti-nociceptive effects of 2-arachidonoyl glycerol by peripherally administered FAAH and MGL inhibitors in a neuropathic pain model. *Br J Pharmacol* 155, 913-924.
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., 3rd, Johnson, M. R., et al., 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34, 605-613.
- Di Marzo, V., 2008. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 7, 438-455.
- Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., et al., 2002. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10819-10824.
- Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., et al., 1995. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 48, 443-450.

- Gatley, S. J., Gifford, A. N., Volkow, N. D., et al., 1996. ¹²³I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 307, 331-338.
- Gattinoni, S., Simone, C. D., Dallavalle, S., et al., 2010. A new group of oxime carbamates as reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Bioorg Med Chem Lett* 20, 4406-4411.
- Ghosh, S., Wise, L. E., Chen, Y., et al., 2012. The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 suppresses inflammatory pain in the mouse carrageenan model. *Life Sci*.
- Goparaju, S. K., Ueda, N., Taniguchi, K., et al., 1999. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 57, 417-423.
- Guindon, J., Beaulieu, P., 2006. Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 50, 814-823.
- Guindon, J., Guijarro, A., Piomelli, D., et al., 2011. Peripheral antinociceptive effects of inhibitors of monoacylglycerol lipase in a rat model of inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 163, 1464-1478.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., et al., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32, 77-88.
- Hohmann, A. G., Herkenham, M., 1999. Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. *Neuroscience* 90, 923-931.
- Hohmann, A. G., Suplita, R. L., Bolton, N. M., et al., 2005. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435, 1108-1112.
- Huggins, J. P., Smart, T. S., Langman, S., et al., 2012. An efficient randomised, placebo-controlled clinical trial with the irreversible fatty acid amide hydrolase-1 inhibitor PF-

04457845, which modulates endocannabinoids but fails to induce effective analgesia in patients with pain due to osteoarthritis of the knee. *Pain* 153, 1837-1846.

Jarai, Z., Wagner, J. A., Varga, K., et al., 1999. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14136-14141.

Jhaveri, M. D., Richardson, D., Kendall, D. A., et al., 2006. Analgesic effects of fatty acid amide hydrolase inhibition in a rat model of neuropathic pain. *J Neurosci* 26, 13318-13327.

Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., et al., 2003. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 9, 76-81.

Khasabova, I. A., Chandiramani, A., Harding-Rose, C., et al., 2011. Increasing 2-arachidonoyl glycerol signaling in the periphery attenuates mechanical hyperalgesia in a model of bone cancer pain. *Pharmacol Res* 64, 60-67.

Khasabova, I. A., Khasabov, S., Paz, J., et al., 2012. Cannabinoid type-1 receptor reduces pain and neurotoxicity produced by chemotherapy. *J Neurosci* 32, 7091-7101.

King, A. R., Duranti, A., Tontini, A., et al., 2007. URB602 inhibits monoacylglycerol lipase and selectively blocks 2-arachidonoylglycerol degradation in intact brain slices. *Chem Biol* 14, 1357-1365.

Kinsey, S. G., Long, J. Z., Cravatt, B. F., et al., 2010. Fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase inhibitors produce anti-allodynic effects in mice through distinct cannabinoid receptor mechanisms. *J Pain* 11, 1420-1428.

Kinsey, S. G., Long, J. Z., O'Neal, S. T., et al., 2009. Blockade of endocannabinoid-degrading enzymes attenuates neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 330, 902-910.

Lever, I. J., Robinson, M., Cibelli, M., et al., 2009. Localization of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase in rat dorsal root ganglion cells and its regulation after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 29, 3766-3780.

- Lichtman, A. H., Hawkins, E. G., Griffin, G., et al., 2002. Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 73-79.
- Long, J. Z., Li, W., Booker, L., et al., 2009. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol* 5, 37-44.
- Luchicchi, A., Pistis, M., 2012. Anandamide and 2-arachidonoylglycerol: Pharmacological Properties, Functional Features, and Emerging Specificities of the Two Major Endocannabinoids. *Mol Neurobiol* 46, 374-392.
- Malan, T. P., Jr., Ibrahim, M. M., Deng, H., et al., 2001. CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 93, 239-245.
- Marrs, W. R., Blankman, J. L., Horne, E. A., et al., 2010. The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat Neurosci* 13, 951-957.
- Marsicano, G., Wotjak, C. T., Azad, S. C., et al., 2002. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418, 530-534.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., et al., 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50, 83-90.
- Munro, S., Thomas, K. L., Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-65.
- Pacher, P., Kunos, G., 2013. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease - successes and failures. *FEBS J* 280, 1918-1943.
- Pacher, P., Mechoulam, R., 2011. Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog Lipid Res* 50, 193-211.
- Pertwee, R., Griffin, G., Fernando, S., et al., 1995. AM630, a competitive cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci* 56, 1949-1955.

- Rani Sagar, D., Burston, J. J., Woodhams, S. G., et al., 2012. Dynamic changes to the endocannabinoid system in models of chronic pain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 3300-3311.
- Rom, S., Persidsky, Y., 2013. Cannabinoid Receptor 2: Potential Role in Immunomodulation and Neuroinflammation. *J Neuroimmune Pharmacol*.
- Roques, B. P., Fournie-Zaluski, M. C., Wurm, M., 2012. Inhibiting the breakdown of endogenous opioids and cannabinoids to alleviate pain. *Nat Rev Drug Discov* 11, 292-310.
- Ross, R. A., Brockie, H. C., Stevenson, L. A., et al., 1999. Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br J Pharmacol* 126, 665-672.
- Russo, R., Loverme, J., La Rana, G., et al., 2007. The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 (cyclohexylcarbamic acid 3'-carbamoylbiphenyl-3-yl ester) reduces neuropathic pain after oral administration in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 322, 236-242.
- Saario, S. M., Salo, O. M., Nevalainen, T., et al., 2005. Characterization of the sulfhydryl-sensitive site in the enzyme responsible for hydrolysis of 2-arachidonoyl-glycerol in rat cerebellar membranes. *Chem Biol* 12, 649-656.
- Schlosburg, J. E., Blankman, J. L., Long, J. Z., et al., 2010. Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 13, 1113-1119.
- Seely, K. A., Brents, L. K., Franks, L. N., et al., 2012. AM-251 and rimonabant act as direct antagonists at mu-opioid receptors: implications for opioid/cannabinoid interaction studies. *Neuropharmacology* 63, 905-915.
- Seltzer, Z., Dubner, R., Shir, Y., 1990. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43, 205-218.
- Spradley, J. M., Guindon, J., Hohmann, A. G., 2010. Inhibitors of monoacylglycerol lipase, fatty-acid amide hydrolase and endocannabinoid transport differentially suppress capsaicin-

induced behavioral sensitization through peripheral endocannabinoid mechanisms. *Pharmacol Res* 62, 249-258.

Tal, M., Bennett, G. J., 1994. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 57, 375-382.

Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., et al., 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310, 329-332.

Vandevorde, S., Jonsson, K. O., Labar, G., et al., 2007. Lack of selectivity of URB602 for 2-oleoylglycerol compared to anandamide hydrolysis in vitro. *Br J Pharmacol* 150, 186-191.

Walczak, J. S., Pichette, V., Leblond, F., et al., 2005. Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain. *Neuroscience* 132, 1093-1102.

Walczak, J. S., Pichette, V., Leblond, F., et al., 2006. Characterization of chronic constriction of the saphenous nerve, a model of neuropathic pain in mice showing rapid molecular and electrophysiological changes. *J Neurosci Res* 83, 1310-1322.

Walker, J. M., Huang, S. M., 2002. Cannabinoid analgesia. *Pharmacol Ther* 95, 127-135.

Wilkerson, J. L., Gentry, K. R., Dengler, E. C., et al., 2012. Intrathecal cannabidiol CB(2)R agonist, AM1710, controls pathological pain and restores basal cytokine levels. *Pain* 153, 1091-1106.

Willoughby, K. A., Moore, S. F., Martin, B. R., et al., 1997. The biodisposition and metabolism of anandamide in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 282, 243-247.

Yu, X. H., Cao, C. Q., Martino, G., et al., 2010. A peripherally restricted cannabinoid receptor agonist produces robust anti-nociceptive effects in rodent models of inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 151, 337-344.

3.8 Legends to Figures

Table 1

On the 11th day after partial sciatic nerve ligation (PNL) surgery, the C57BL/6, *cnr1*KO and *cnr2*KO mice received saline, AM251 (cannabinoid CB₁ antagonist; 1 µg) and AM630 (cannabinoid CB₂ antagonist; 1 µg) on the ipsilateral side. The data are expressed as the means ± SEM (n = 6 per group).

Figure 1

Mechanical allodynia using von Frey hair (A) and thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimulus (B) before (pre-lesion baseline) and 10 days after surgery, for the ipsilateral and contralateral sides (inset) in C57BL/6 mice. The data are expressed as the means ± SEM (n = 6 per group). (***) $P < 0.0001$ vs. pre-lesion baseline, two-tailed unpaired t -test).

Figure 2

Mechanical allodynia using von Frey hair 11 days after surgery for the ipsilateral and contralateral sides (inset) in (A) C57BL/6, (B) *cnr1*KO and (C) *cnr2*KO mice. On that day, the mice received either 0.9% NaCl, AEA (10 µg), 2-AG (10 µg) or WIN (10 µg), in the absence or presence of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptor antagonists, AM251 (1 µg) and AM630 (1 µg). The data are expressed as the means ± SEM (n = 6 per group). (* $P < 0.05$ vs. saline, two-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test); (A) (§ $P < 0.01$ AEA + AM251 vs. AEA alone; β $P < 0.05$ 2-AG + AM251 vs. 2-AG alone; α $P < 0.01$ 2-AG + AM630 vs. 2-AG alone); (B) (δ $P < 0.001$ 2-AG + AM630 vs. 2-AG alone); (C) (γ $P < 0.001$ AEA + AM251 vs. AEA alone; μ $P < 0.05$ 2-AG + AM251 vs. 2-AG alone, one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test). Identification of the substances has been voluntarily omitted in the inset of all of the figures to simplify the presentation. The data in the contralateral graph are presented following the same order as the data in the ipsilateral graph.

Figure 3

Thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimuli 11 days after surgery for the ipsilateral and contralateral sides (inset) in (A) C57BL/6, (B) *cnr1*KO and (C) *cnr2*KO mice. The animals received either 0.9% NaCl, AEA (10 µg), 2-AG (10 µg) or WIN (10 µg), in absence or presence of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptor antagonists, AM251 (1 µg) and AM630 (1 µg). The data are expressed as the means ± SEM (n = 6 per group). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. saline, two-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test); (A) (¥ $P < 0.05$ AEA + AM251 vs. AEA alone; # $P < 0.05$ 2-AG + AM251 vs. 2-AG alone; £ $P < 0.01$ 2-AG + AM630 vs. 2-AG alone); (B) (♦ $P < 0.05$ 2-AG + AM630 vs. 2-AG alone); (C) (Δ $P < 0.001$ AEA + AM251 vs. AEA; & $P < 0.01$ 2-AG + AM251 vs. 2-AG alone, one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test).

Figure 4

Mechanical allodynia using von Frey hair 11 days after surgery for the ipsilateral and contralateral sides (inset) in (A) C57BL/6, (B) *cnr1*KO and (C) *cnr2*KO mice. On that day, the mice received either 0.9% NaCl, AEA (10 µg) or 2-AG (10 µg), in absence or presence of FAAH and MGL inhibitors, URB597 (100 µg) and URB602 (100 µg). The data are expressed as the means ± SEM (n = 5-6 per group). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. saline, two-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test); (B) (▼ $P < 0.01$ AEA + URB602 vs. AEA alone, one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test).

Figure 5

Thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimuli 11 days after surgery for the ipsilateral and contralateral sides (inset) in (A) C57BL/6, (B) *cnr1*KO and (C) *cnr2*KO mice. The animals received either 0.9% NaCl, AEA (10 µg) or 2-AG (10 µg), in absence or presence of FAAH and MGL inhibitors, URB597 (100 µg) and URB602 (100 µg). The data are expressed as

the means \pm SEM (n = 5-6 per group). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. saline, two-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test); (A) ($\diamond P < 0.05$ AEA + URB597 vs. AEA alone; $\triangle P < 0.01$ AEA + URB602 vs. AEA alone; $\delta P < 0.01$ 2-AG + URB597 vs. 2-AG alone; $\Omega P < 0.001$ 2-AG + URB602 vs. 2-AG alone); (B) ($\phi P < 0.01$ AEA + URB602 vs. AEA alone; $\pi P < 0.01$ 2-AG + URB602 vs. 2-AG alone); (C) ($\infty P < 0.01$ AEA + URB597 vs. AEA alone, one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test).

Figure 6

Mechanical allodynia using von Frey hair (A) and thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimuli (B) before (pre-lesion baseline), 10 and 11 days after partial sciatic nerve ligation (PNL) surgery for the ipsilateral and contralateral sides (inset) in C57BL/6 mice. On the 11th day, the mice received either 0.9% NaCl, AEA (10 μ g), 2-AG (10 μ g), WIN (10 μ g), URB597 (100 μ g) or URB602 (100 μ g) on the contralateral side. The data are expressed as the means \pm SEM (n = 4 per group). (*** $P < 0.0001$ vs. pre-lesion baseline, one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test).

Table 1

Mechanical allodynia using von Frey and thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimulus before (pre-lesion baseline), 10 and 11 days after surgery in C57BL/6, *cnr1*KO and *cnr2*KO mice

		Mechanical threshold (mN)		Withdrawal latency (s)	
		Mean	± SEM	Mean	± SEM
C57BL/6	Pre-lesion baseline	26.062	1.656	7.857	0.151
	10 Days after PNL	2.661	0.244	3.907	0.224
	11 Days after PNL – NaCl	2.543	0.240	3.417	0.298
	11 Days after PNL – AM251	2.955	0.240	3.278	0.084
	11 Days after PNL – AM630	3.160	0.161	3.493	0.369
<i>cnr1</i>KO	Pre-lesion baseline	19.950	1.569	7.678	0.296
	10 Days after PNL	2.856	0.220	3.833	0.304
	11 Days after PNL – NaCl	2.656	0.210	3.170	0.244
	11 Days after PNL – AM251	2.747	0.288	3.395	0.107
	11 Days after PNL – AM630	2.744	0.248	3.217	0.085
<i>cnr2</i>KO	Pre-lesion baseline	23.970	2.090	7.695	0.210
	10 Days after PNL	2.919	0.291	3.877	0.306
	11 Days after PNL – NaCl	2.477	0.224	3.433	0.179
	11 Days after PNL – AM251	2.754	0.250	3.067	0.097
	11 Days after PNL – AM630	2.903	0.300	3.495	0.210

Figure 1

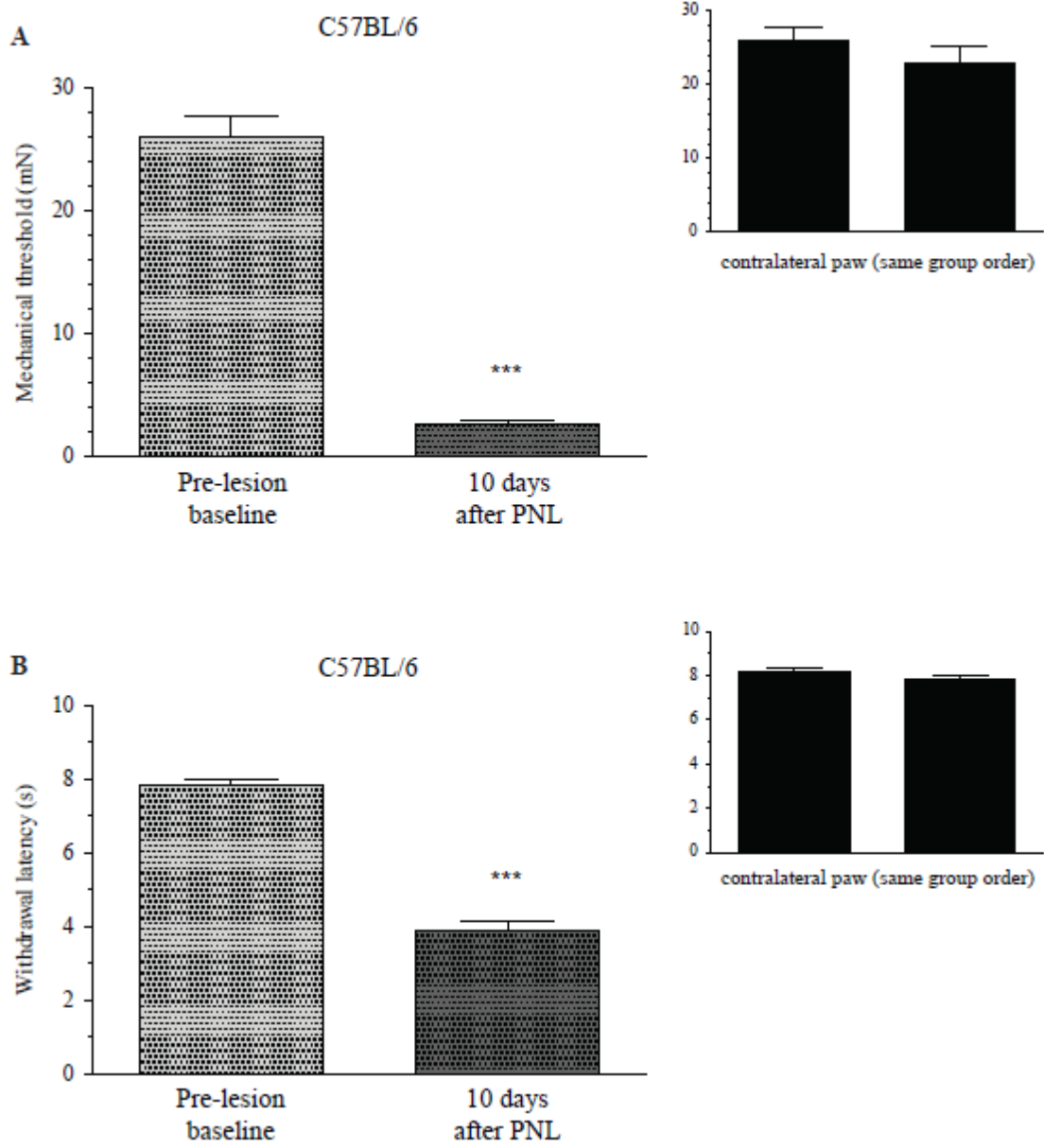


Figure 2

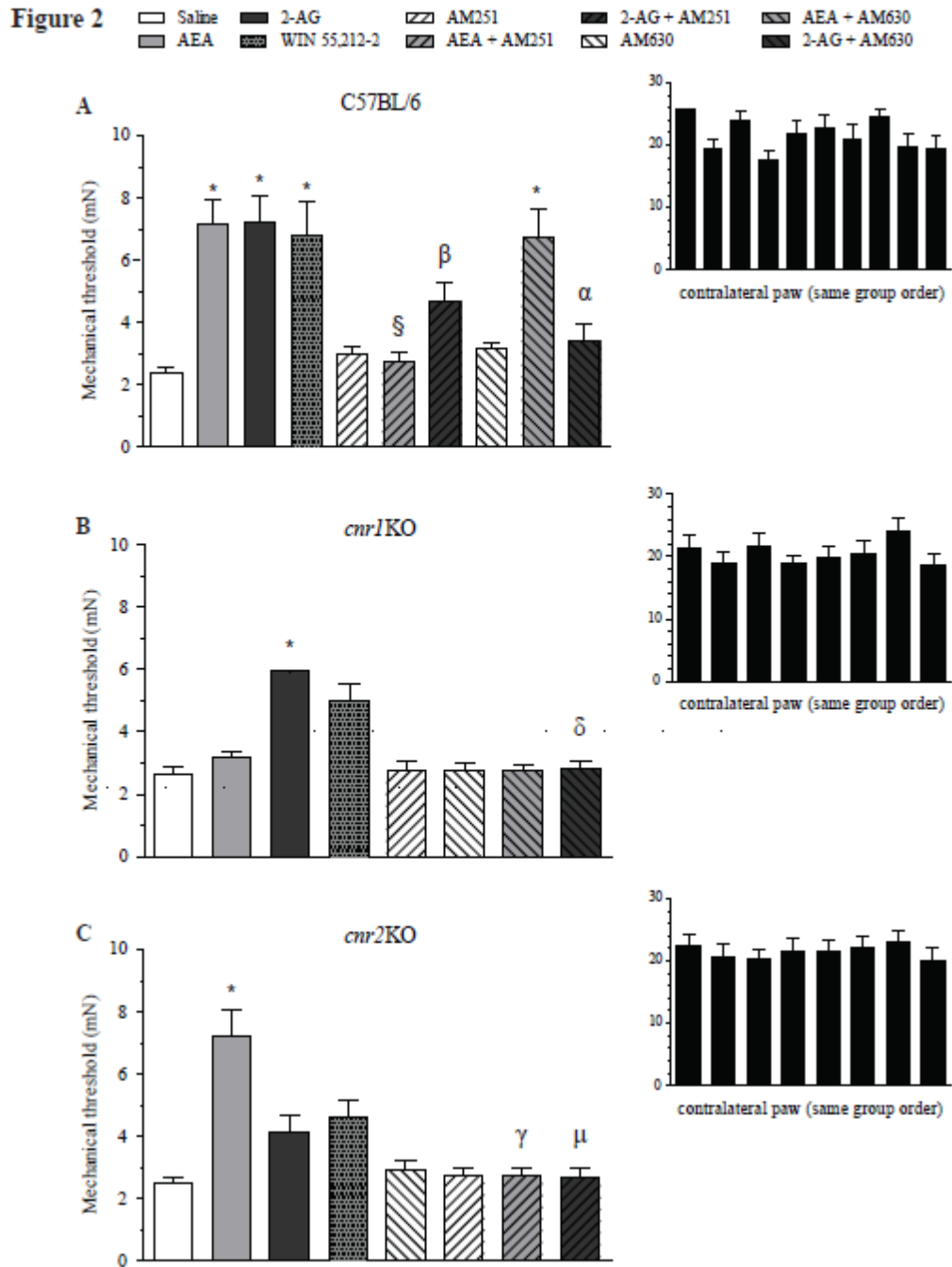


Figure 3

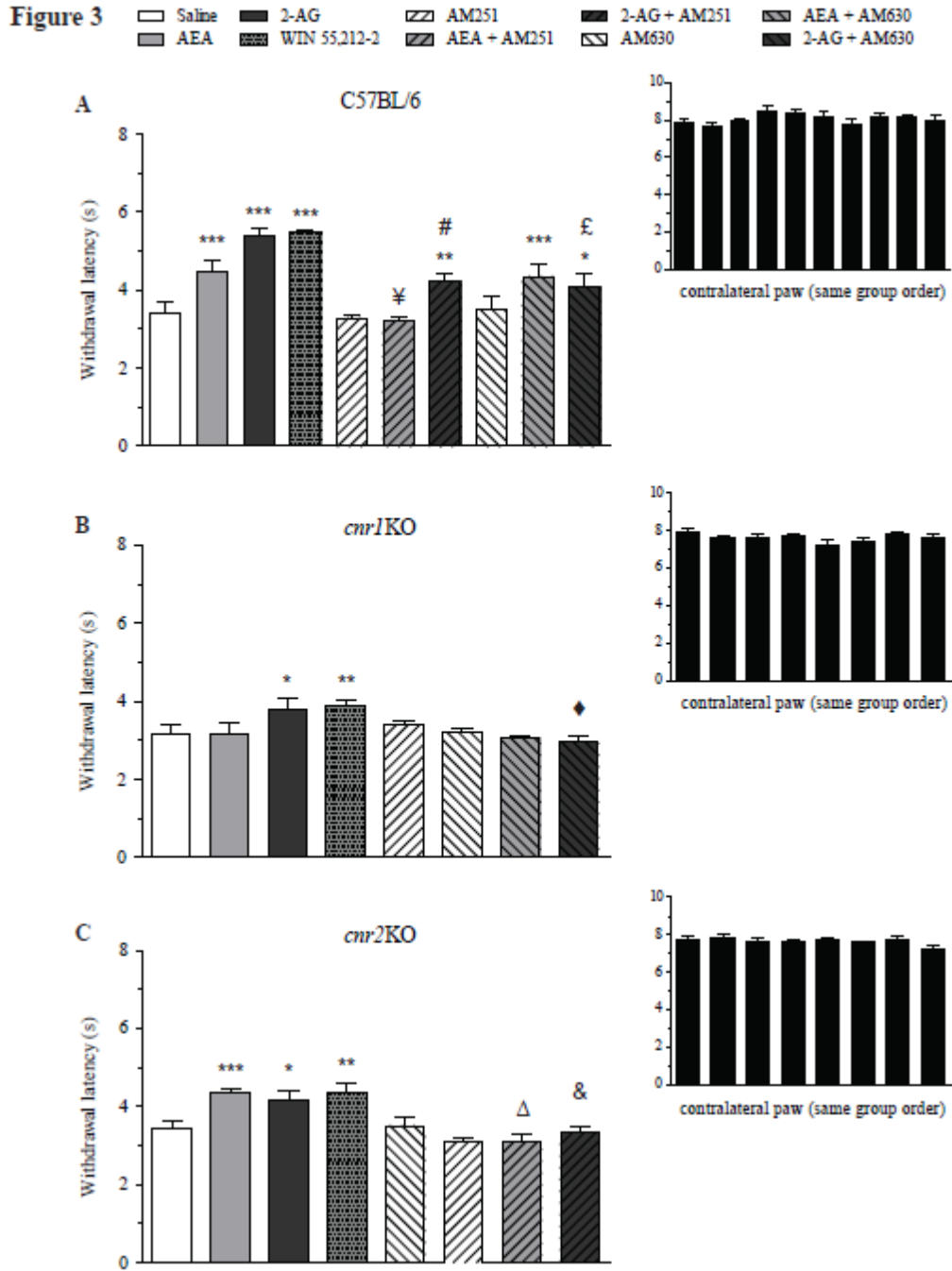


Figure 4

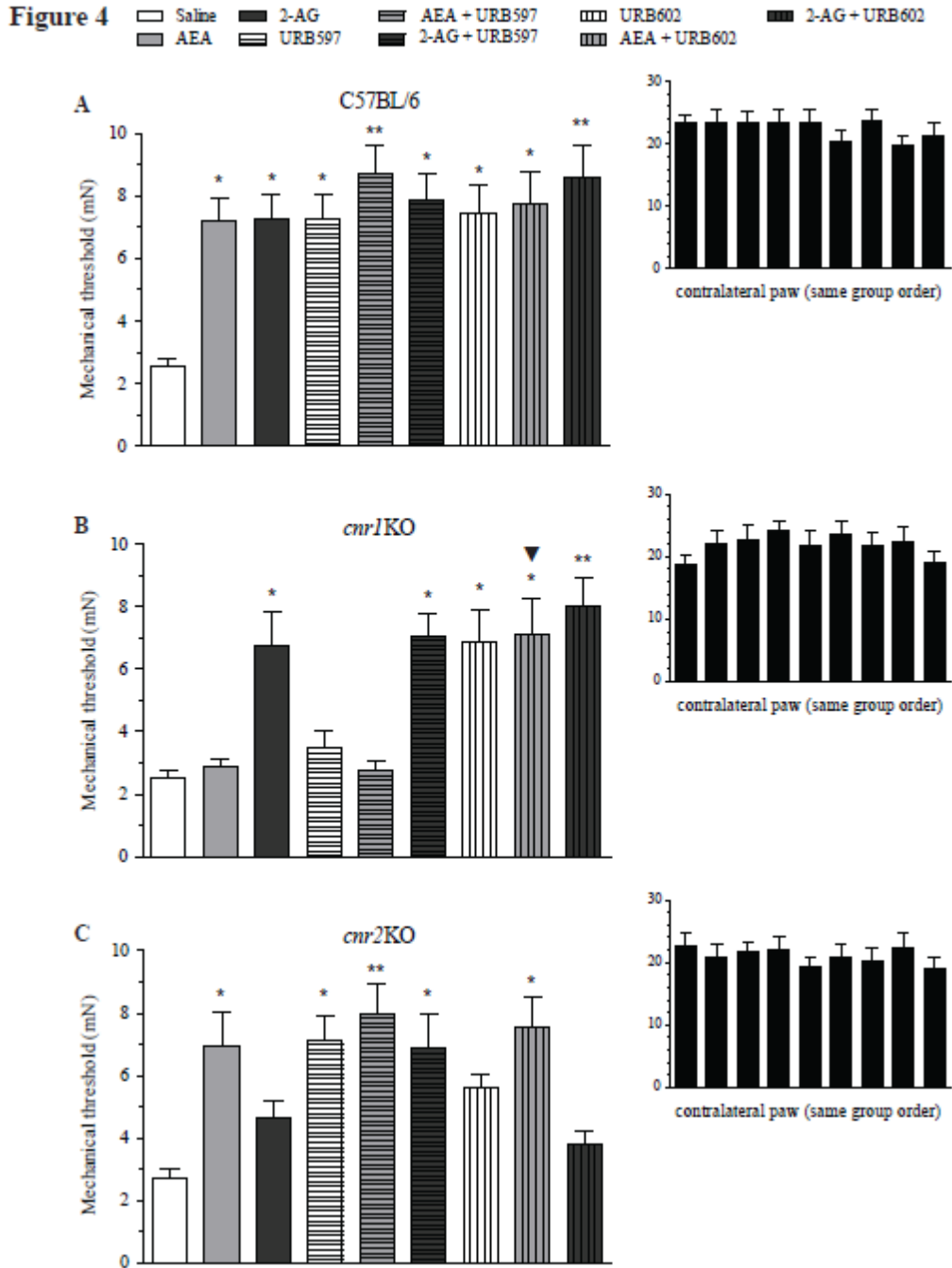


Figure 5

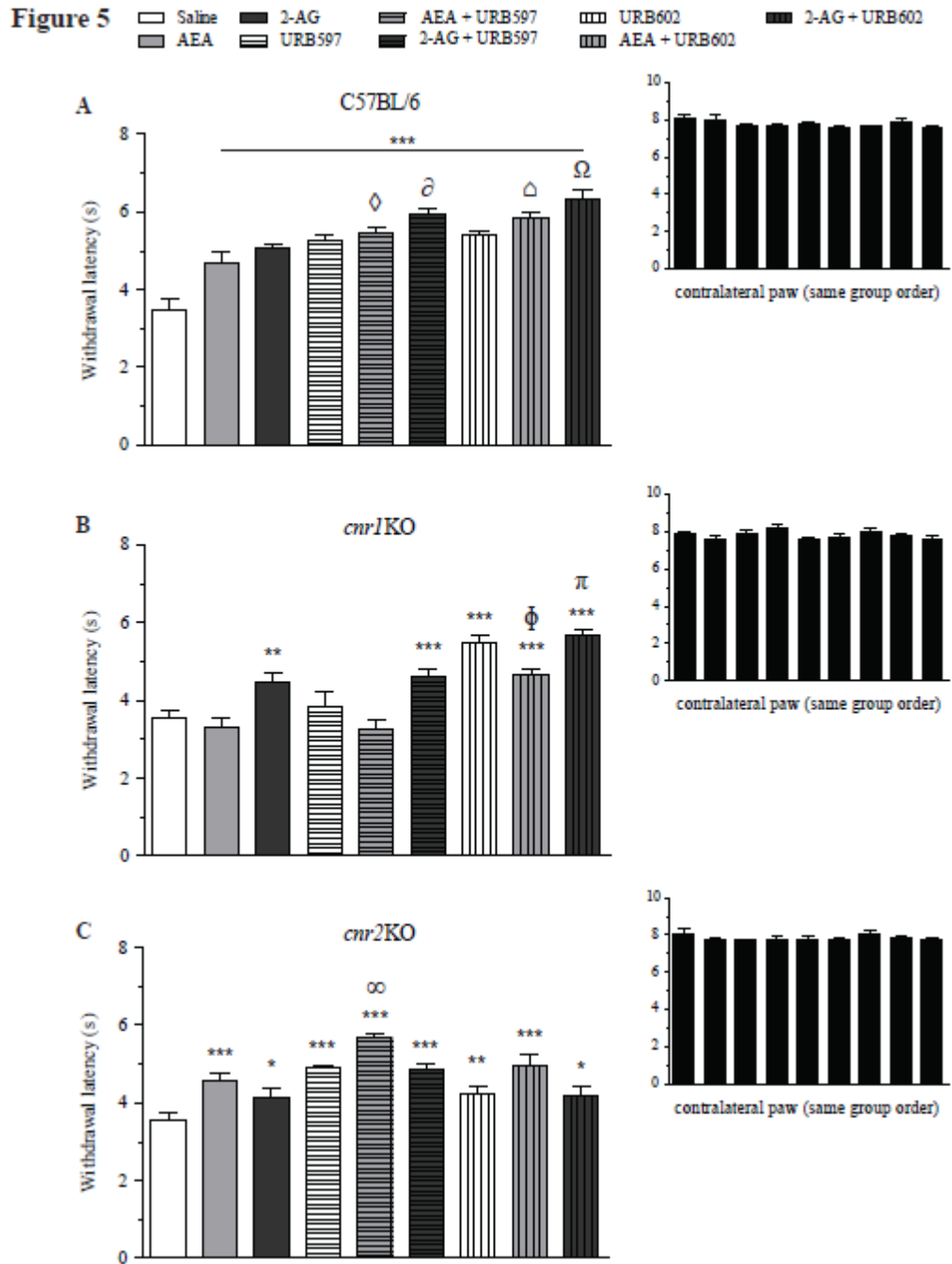
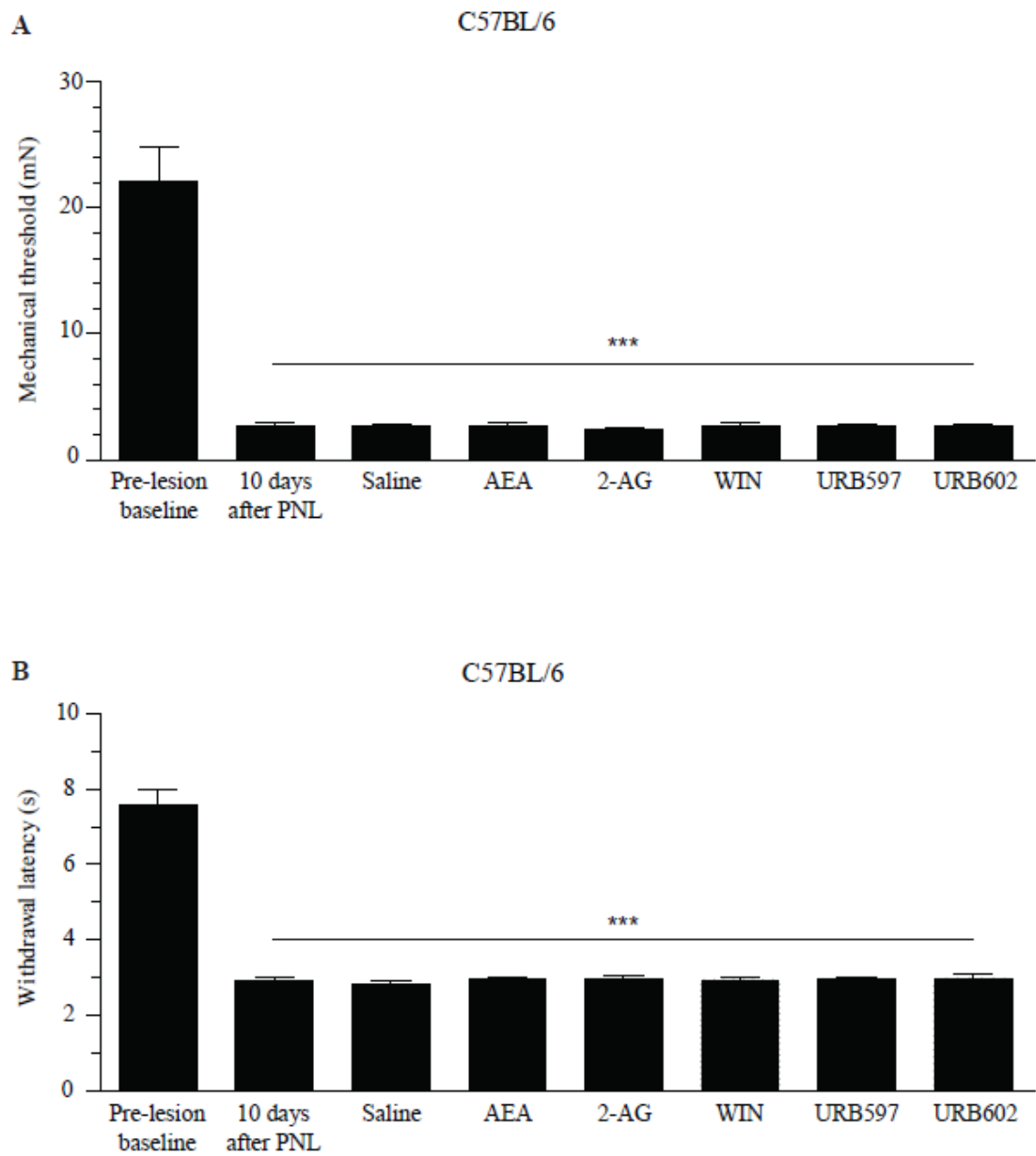


Figure 6

Figure 6



4 ARTICLE 4 ACCEPTÉ, EN RÉVISION À LA REVUE *NEUROSCIENCE*

« *Involvement of cannabinoid receptors in peripheral and spinal morphine analgesia* »

Short running title: Opioid and cannabinoid interactions

Julie Desroches¹, Jean-François Bouchard², Louis Gendron^{3,4,5} & Pierre Beaulieu^{1,6}

Departments of Pharmacology¹ and Anesthesiology⁶, Faculty of Medicine and School of Optometry², Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine and Health Sciences³, Centre de recherche clinique Etienne-Le bel⁴ and Institut de pharmacologie de Sherbrooke⁵, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

Article 4. Contribution des co-auteurs:

JD : Conceptualisation du projet, réalisation de la majorité des expériences, analyses statistiques, écriture du manuscrit, montage des figures

JFB : Conceptualisation du projet, gestion des colonies de souris *cnr1KO* et *cnr2KO*, révision du manuscrit, recherche des organismes subventionnaires

LG : Conceptualisation du projet, participation à certaines expériences, analyses statistiques, écriture et révision du manuscrit, recherche des organismes subventionnaires

PB : Conceptualisation du projet, écriture et révision du manuscrit, recherche des organismes subventionnaires

4.1 Abstract

The interactions between the cannabinoid and opioid systems for pain modulation are reciprocal. However, the role and the importance of the cannabinoid system in the antinociceptive effects of opioids remain uncertain. We studied these interactions with the goal of highlighting the involvement of the cannabinoid system in morphine-induced analgesia. In both phases of the formalin test, intra paw and intrathecal morphine produced similar antinociceptive effects in C57BL/6, cannabinoid type 1 and type 2 receptor wildtype (respectively *cnr1*WT and *cnr2*WT) mice.

In *cnr1* and *cnr2* knockout (KO) mice, at the dose used the antinociceptive effect of intra paw morphine in the inflammatory phase of the formalin test was decreased by 87% and 76%, respectively. Similarly, the antinociceptive effect of 0.1 µg spinal morphine in the inflammatory phase was abolished in *cnr1*KO mice and decreased by 90% in *cnr2*KO mice. Interestingly, the antinociceptive effect of morphine in the acute phase of the formalin test was only reduced in *cnr1*KO mice. Notably, systemic morphine administration produced similar analgesia in all genotypes, in both the formalin and the hot water immersion tail flick tests.

Because the pattern of expression of the mu opioid receptor (MOP), its binding properties and its G protein coupling remained unchanged across genotypes, it is unlikely that the loss of morphine analgesia in the *cnr1*KO and *cnr2*KO mice is the consequence of MOP malfunction or downregulation due to the absence of its heterodimerization with either the CB₁ or the CB₂ receptors, at least at the level of the spinal cord.

Keywords: Cannabinoid receptors, mu opioid receptors (MOP), morphine, pain, tail flick test, formalin test

Highlights

- Analgesia is the most common feature shared by the cannabinoid and opioid systems
- The role of the cannabinoid system in the morphine-induced analgesia is uncertain
- Peripheral and intrathecal morphine analgesia is altered in *cnr1*KO and *cnr2*KO mice
- This attenuation is neither caused by a MOP malfunction nor by its downregulation

4.2 Introduction

Among several pharmacological properties, analgesia is the most common feature shared by the cannabinoid and opioid systems (Manzanares et al., 1999; Massi et al., 2001). The cannabinoid and opioid receptors display similar properties. They both belong to the $G_{i/o}$ protein-coupled receptor family and are coupled to similar intracellular signaling mechanisms (Bidaut-Russell et al., 1990; Childers et al., 1992; Howlett, 1995). Indeed, the cannabinoids mediate their pharmacological effects through at least two types of receptors, namely CB_1 (Matsuda et al., 1990) and CB_2 (Munro et al., 1993). The anatomical distribution of the CB_1 receptor is consequent with its functions, including the modulation of pain perception at the central, spinal and peripheral levels (Agarwal et al., 2007; Hohmann, 2002; Lever and Rice, 2007; Walczak et al., 2005, 2006). By contrast, CB_2 receptor expression seems to be found predominantly in peripheral tissues (Galiegue et al., 1995; Jhaveri et al., 2007; Munro et al., 1993; Schatz et al., 1997). However, the expression of this receptor has also been described in brainstem neurons (Van Sickle et al., 2005) and in microglial cultures (Beltramo et al., 2006). Opioids mediate their pharmacological effects mainly through three types of receptors: μ (MOP) (Yasuda et al., 1993), δ (DOP) (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992) and κ (KOP) (Chen et al., 1993). Although they are found throughout the central nervous system and in the peripheral tissues, opioid receptors are primarily expressed at high levels in several brain areas involved in pain perception (Bodnar, 2012; Pol and Puig, 2004).

Interactions between the two systems for pain modulation are reciprocal. Although the role of opioids in cannabinoid antinociceptive effects has been documented (Cichewicz, 2004; Maldonado and Valverde, 2003), there is little information regarding the involvement of the cannabinoid system in the antinociceptive mechanisms of opioids. Indeed, it was recently demonstrated that the CB₁ antagonist AM251 counteracts morphine-induced antinociception in an inflammatory pain model (da Fonseca Pacheco et al., 2008; Pacheco Dda et al., 2009) and in the tail-flick test in mice (Pacheco Dda et al., 2009). These observations led to the hypothesis that MOP activation could induce local release of endocannabinoids and that the subsequent peripheral (da Fonseca Pacheco et al., 2008) or central (Pacheco Dda et al., 2009) activation of the cannabinoid receptors CB₁ and/or CB₂ could contribute to the antinociceptive effects of morphine. A role for the endocannabinoid system in the inhibition of MOP mRNA expression and signaling was also recently described (Paldyova et al., 2008), demonstrating that intraperitoneal administration of the CB₂ antagonist SR144528 attenuates MOP activity through CB₂ cannabinoid receptors (Paldy et al., 2008; Paldyova et al., 2008).

While experiments using pharmacological tools to modify cannabinoid signaling suggested that endocannabinoids are clearly involved in the antinociceptive effects of opioids, studies using transgenic mice are not conclusive. Thus, the role and the importance of the cannabinoid system in the antinociceptive effects of opioids remain uncertain. The aim of this study was therefore to investigate whether opioid and cannabinoid systems can interact at various levels of the neuraxis. We evaluated the role of the cannabinoid system in peripheral (i.e. local injection), spinal and systemic antinociception induced by the activation of MOP following morphine administration in C57BL/6, *cnr1*WT, *cnr1*KO, *cnr2*WT and *cnr2*KO mice.

4.3 Material and methods

4.3.1 Animals

Male C57BL/6, *cnr1*WT, *cnr1*KO, *cnr2*WT and *cnr2*KO mice (25-30 g at the time of testing) were used in the current study. They were housed in groups of two to four in standard plastic cages with sawdust bedding in a climate-controlled room. The mice were maintained under a 14 h light/dark cycle (light period 06:00-20:00 h). All experiments were conducted between 07:00 and 12:00 h. The mice were allowed free access to food pellets and water. The C57BL/6 mice were purchased from Charles River, St-Constant, Quebec, Canada, whereas the *cnr1* and *cnr2* transgenic mice were obtained from Pr. Beat Lutz (Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Mainz, Germany) and Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), respectively. These colonies were maintained in-house. This research protocol was approved by the Local Animal Care Committees at the Université de Montréal and Université de Sherbrooke and all procedures conformed to the directives of the Canadian Council on Animal Care and guidelines of the International Association for the Study of Pain. All animal experiments were designed to minimize the number of animals used and their suffering.

4.3.2 Drugs

Morphine sulfate (Morphine HP[®] 50, lot #151034; Sandoz, Boucherville, QC, Canada) was diluted in a sterile saline solution (0.9% NaCl). Drugs were administered into the dorsal surface of the left hind paw (i.paw), intrathecally (i.t.) or subcutaneously (s.c.) before intradermal (i.d.) formalin injection into the plantar surface of the left hind paw. Morphine was administered i.paw (1 µg/10 µL), i.t. (0.1 µg/5 µL), and s.c. (3 mg/kg for the formalin test or 1, 3 and 10 mg/kg for the tail-flick test). Intrathecal injections were performed in non-anesthetized mice as described previously (Fairbanks, 2003; Gendron et al., 2007). Briefly, a 30G ½ needle mounted on a 10 µL Luer-tip Hamilton syringe (VWR)

was inserted into the L5-L6 intervertebral space, and 5 μ L morphine was injected. Saline was used as vehicle control. The appropriate placement of the needle was confirmed by the observation of a light flick of the tail.

4.3.3 Behavioral studies

4.3.3.1 Formalin test

The formalin test is a well-established model of tonic pain that is characterized by a transient, biphasic nociceptive response (Tjolsen et al., 1992). The first phase is characterized by the acute activation of sensory receptors. The second phase involves an inflammatory reaction in the peripheral tissue and the development of CNS sensitization. The mice were acclimatized to the testing environment (a clear Plexiglas box 30 X 30 X 30 cm) for 15 to 20 min or until the cessation of explorative behavior. Thereafter, drugs were injected i.paw, i.t., or s.c. with saline or morphine 5 or 10 min before a 10 μ L intradermal (i.d.) injection of a 2% formaldehyde solution (i.e., 5.4% formalin, Fisher Scientific, Montreal, QC, Canada) into the plantar surface of the left hind paw. The experimenter was blind to the drug treatments during testing. Following each injection, the mice were immediately placed in the observation chamber. Nociceptive behaviors were observed for 60 min with the help of a mirror angled at 45° below the observation chamber to allow for an unobstructed view of the hind paws.

The nocifensive behaviors were assessed using a weighted score, as described previously (Coderre et al., 1993; Dubuisson and Dennis, 1977). Following an injection of formalin into the left hind paw, the nociceptive mean score was determined for each 3-min block during the 60 min recording period. In each 3-min bin, the total time the animal spent in four different behavioral categories was recorded: (0), the injected paw is comparable to the contralateral paw and is used normally by the animal; (1), the injected paw has little or no weight placed on it; (2), the injected paw is elevated and is not in

contact with any surface; and (3), the injected paw is licked, bitten or shaken. The weighted nociceptive score ranged from 0 to 3 and was calculated by multiplying the time (in seconds) spent in each category by its assigned category weight, summing these products and dividing by the total time for each 3 min block of time. Nociceptive behavior was thus rated using this formula $(1T1 + 2T2 + 3T3)/180$.

The area under the curve (A.U.C.) of “pain score-time” above the weighted pain score of 1 was calculated for the acute phase (0–9 min; Phase I) and the inflammatory phase (21–60 min; Phase II) by the trapezoidal rule using Prism 5.0.

4.3.3.2 *Hot-water immersion tail-flick test*

To test the antinociceptive effects of s.c. morphine, tail flick latencies were measured in C57BL/6, *cnr1*WT, *cnr1*KO, *cnr2*WT and *cnr2*KO mice. The experimenter was blind to the genotype during all testing. Briefly, two centimeters of the tail was immersed in a water bath apparatus (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA) maintained at $52 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Latency to response was determined by a vigorous tail flick. Baseline measurements were obtained for each mouse before s.c. morphine injection (zero time) and determined from the average of three consecutive trials on the day of the experiment. Subsequently, s.c. injection of morphine (1, 3 and 10 mg/kg) was carried out, and latencies to tail withdrawal were measured every 10 minutes for a 60-minute period. A cut-off time of 10 seconds was imposed to avoid tissue damage. If an animal reached the cut-off, the tail was removed from the water, and the animal was assigned the maximum score. The percentage of the Maximal Possible Effect (MPE) of s.c. morphine was calculated according to the formula: $\%MPE = 100 \times [(test\ latency) - (baseline\ latency)] / [(cut-off\ time) - (baseline\ latency)]$.

4.3.4 *Peripheral hindpaw oedema*

At the end of the formalin test, maximal paw thickness was measured at the base of the ipsilateral left hind paw (i.e., formalin-injected hind paw) using a digital micrometer (Mitutoyo Corporation, Aurora, IL, USA) with a resolution of 1 μm (Guindon et al., 2007; Petricevic et al., 1978). The level of inflammation induced by formalin injection in all genotypes was also evaluated by measuring the volume of the hind paw with a plethysmometer (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA). The hind paw was placed in a small water bath and the volume displacement was measured. Two measurements were carried out for both the ipsi- and the contralateral hind paw, 60 min after formalin injection. The data are expressed as the percentage (%) of paw volume relative to the total body weight of the animal.

4.3.5 *Saturation binding assays*

Saturation binding assays using mouse spinal cord were performed to determine the affinity (K_d) and the number (B_{max}) of spinal MOP binding sites for each genotype ($n = 3$ independent experiments per genotype). First, naive mice were briefly anesthetized with isoflurane 5% and euthanized. The spinal cord was then rapidly dissected by laminectomy and pooled ($n = 5$ spinal cords per assay) in tubes containing 15 mL ice-cold 50 mM Tris buffer at pH 7.4 with protease inhibitors (buffer A) until homogenization. Afterwards, freshly isolated mouse spinal cords were homogenized using a Polytron PT-10-35 (Kinematica, Inc., Bohemia, NY, USA) at 20,000 rpm on ice for 40 s. The homogenates were centrifuged at 15,000 rpm (JA 25.50 rotor; Beckman Coulter) for 15 min, the supernatant was discarded, and the pellets were then stored at -80°C until they were used. On the day of the experiment, the pellets were thawed on ice, re-suspended in 15 mL Tris buffer and centrifuged at 15,000 rpm for 15 min. The supernatant was discarded, and the pellets obtained were re-suspended in 35 mL Tris buffer. A last centrifugation was performed at 15,000 rpm for 15 min; the supernatant was discarded,

and the pellets obtained were finally suspended in 10 mL ice-cold 50 mM potassium phosphate buffer at pH 7.2.

Saturation binding assays using [^3H] DAMGO (range: 0.02 – 16 nM) (MOP ligand; PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada) were performed in duplicate on aliquots of membrane homogenate using a membrane concentration of 2 mg protein/mL. Protein concentrations were determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951) using reagents from Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). The saturation binding experiments were performed in potassium phosphate buffer, in 5-mL polypropylene tubes (final volume of 500 μL). Non-specific binding was determined in the presence of 1 μM DAMGO. The tubes were incubated for 90 min at 25°C. The incubation was terminated by filtration using ice-cold potassium phosphate buffer (3 x 2 ml) on a Whatman GF/C filter (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA). The filters were then placed in vials containing scintillation cocktail. The radioactivity present on the disks was determined by liquid scintillation counting using a Beckman Coulter LS-6500 scintillation counter (Beckman Coulter Canada, Inc., Mississauga, ON, Canada). The counts per minute (cpm) were converted into disintegrations per minute (dpm) using the external standard method, and finally, the B_{max} was converted into fmol/mg, whereas the K_d was expressed in nM.

4.3.6 Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed to visualize the expression of MOP in spinal cord of *cnr1*WT, *cnr1*KO, *cnr2*WT and *cnr2*KO mice. First, naive mice were briefly anesthetized with 5% isoflurane and perfusion-fixed with ice-cold 4% paraformaldehyde (PFA; Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) in 0.2 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) at 4°C (500 mL). The spinal cord was then isolated by laminectomy, post-fixed in ice-cold 4% PFA for 2 h and cryoprotected in 30% sucrose in 0.2 M PB for 48 h. The lumbar segment L4-L6 was then snap-frozen in -50°C isopentane and stored at -80°C until sectioning.

Afterwards, transverse sections were cut on a microtome (Leica SM2000R; Toronto, Ontario, Canada) at a thickness of 30 μm and placed in phosphate-buffered saline (PBS). The floating sections were then incubated in 1% sodium borohydride in PBS for 30 min, rinsed twice with PBS, and incubated for 30 min at room temperature in a blocking solution containing 3% normal goat serum (NGS) and 0.3% Triton X-100 in PBS. The sections were then incubated overnight at 4°C with the guinea pig anti-MOP primary antibody (cat# GP10106; Neuromics, Minneapolis, MN, USA) diluted 1:1000 in the blocking solution. The floating sections were then washed in PBS and incubated with a goat anti-guinea pig secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at a concentration of 1:1000 in PBS for 2 h at room temperature.

Images were collected using an epifluorescence microscope (Leica DM4000B; Leica Microsystems, Toronto, Ontario, Canada) to visualize MOP expression in laminae I-II of the dorsal horn of the mouse spinal cord (n = 3 animals per genotype). The pictures were taken with a 5X objective.

4.3.7 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding assay

$[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding assays using mouse spinal cords were performed to determine the potency (EC_{50}) and the efficacy (E_{max}) of spinal MOP binding sites for each of the genotypes. First, naive mice were briefly anesthetized with isoflurane 5% and euthanized. The spinal cords were then rapidly collected and pooled (n = 4-6 spinal cords per assay) in tubes containing 3 mL ice-cold buffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA and protease inhibitors, pH 7.4) until homogenization. The freshly isolated mouse spinal cords were then homogenized using a Wheaton Potter-Elvehjem tissue grinder combined with a Teflon pestle inserted in a Wheaton electric overhead stirrer (Fischer Scientific) at approximately 600 rpm on ice, 3 times 5-6 passages. The homogenates were centrifuged at 13,000 rpm (JA 25.15 rotor; Beckman Coulter) for 20 min, the supernatant

was discarded, and the pellets were then stored at -80°C until use. On the day of the experiment, the pellets were thawed on ice, re-suspended in 3 mL HEPES buffer and centrifuged at 13,000 rpm for 20 min; subsequently, the supernatant was discarded, and the pellets obtained were suspended in 4 mL ice-cold Tris-HCl buffer.

Protein concentrations were determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951) using reagents from Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Aliquots of spinal cord membrane homogenates were incubated (20 μg of proteins) in duplicate for 2 h at 30°C in incubation buffer containing 0.1% bovine serum albumin, 1 mM dithiothreitol (DTT), 10 μM guanosine 5'-diphosphate sodium salt (GDP; Sigma, Oakville, ON, Canada), 0.1 nM guanosine 5'(γ - ^{35}S -thio) triphosphate tetralithium salt ($[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$, 1250 Ci/mmol, Perkin Elmer, Montreal, QC, Canada) and protease inhibitors in the absence or presence of the MOP agonist morphine (0.01 nM – 10 μM), in a total volume of 500 μL . Basal $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding was assessed in the absence of morphine. Nonspecific binding was measured in the presence of 10 μM unlabeled GTP γS . The reaction was terminated by rapid filtration through a Whatman GF/C filter (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA), followed by two washes with 2 mL ice-cold assay buffer. The filters were placed in vials containing scintillation cocktail. Bound radioactivity on the filters was determined by liquid scintillation counting using a Beckman Coulter LS-6500 scintillation counter (Beckman Coulter Canada, Inc., Mississauga, ON, Canada). Counts per minute (cpm) were converted to the percentage of increase of the agonist-stimulated $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding over the basal binding. The efficacy (E_{max}) was determined by the maximum increase in $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding induced by morphine, whereas the potency (EC_{50}) was obtained from a nonlinear regression analysis (Prism 5.01).

4.3.8 Calculation and statistical analysis

The data are expressed as the means \pm standard error of the mean (S.E.M.). Calculations were performed with Excel 2007, and graphs and statistical analysis were

performed using Prism 5.01 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Comparisons of means were performed using either a two-tailed unpaired *t*-test, a one-way ANOVA or a two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple-comparison test. The binding data from saturation studies were analyzed using nonlinear regression to determine B_{\max} and K_d (Prism 5.01). All binding data were best fit by a one-site model. The morphine-stimulated [^{35}S]GTP γ S binding data were fit with a sigmoidal 3-parameter function (Prism 5.01) to determine the EC_{50} . The comparison of differences between basal vs. stimulated [^{35}S]GTP γ S binding, as well as differences between EC_{50} within the different genotypes was determined by a one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple-comparison test. The critical level of significance was set at 5% ($P < 0.05$).

4.4 Results

4.4.1 *Intradermal formalin injection induces a similar biphasic nociceptive profile within all genotypes*

Intradermal (i.d.) injection of formalin into the left hind paw induces the release of diverse neurotransmitters from primary afferent endings located in the dorsal horn of the lumbar spinal cord (Bucsic and Lembeck, 1981). In the present study, we observed that for all genotypes, formalin injection produced a similar biphasic nociceptive response (acute and inflammatory phases) that is typical of this tonic pain model (Fig. 1). Indeed, nociceptive responses following i.d. formalin injection were not different within genotypes for both phases of the formalin test (Fig. 1A; $P = 0.8949$, $F_{\text{genotypes}} = 0.2738$, two-way ANOVA). These nociceptive effects were also compared by separate analyses of the acute and inflammatory phases. There were no differences in the nociceptive effects of i.d. formalin in the acute phase (Fig. 1B; A.U.C., $F = 2.013$, one-way ANOVA) or the inflammatory phase of the formalin test (Fig. 1C; A.U.C., $F = 0.1949$, one-way ANOVA). These results demonstrate that all genotypes present a similar nociceptive profile following i.d. formalin injection into the hind paw in both phases of the formalin test.

4.4.2 Involvement of CB₁ cannabinoid receptors in the antinociceptive effects of i.paw morphine in the formalin test

As expected, local (i.paw) morphine (1 μ g) induced an inhibition of pain behaviors in the C57BL/6 mice (Fig. 2 vs. Fig. 1). Similarly, i.paw morphine reduced formalin-induced nocifensive behaviors in the *cnr1*WT mice. However, at the same dose, i.paw morphine had no analgesic effects in the *cnr1*KO mice. Thus, compared to the C57BL/6 and the *cnr1*WT mice, the pain scores measured for the *cnr1*KO mice following i.paw morphine injection were significantly higher in both the acute and inflammatory phases of the formalin test (Fig. 2A; $P < 0.0001$, $F_{\text{genotypes}} = 81.37$, two-way ANOVA). These differences observed in the antinociceptive effects were also confirmed by separate analyses of the acute and inflammatory phases. We observed a significant increase in the A.U.C. for the acute phase (Fig. 2B; A.U.C., 7.2 ± 0.9 for *cnr1*KO vs. 3.1 ± 0.3 for C57BL/6 and 4.5 ± 0.6 for *cnr1*WT; $F = 11.02$, one-way ANOVA) and for the inflammatory phase (Fig. 2C; A.U.C., 27.5 ± 3.8 for *cnr1*KO vs. 7.1 ± 0.8 for C57BL/6 and 9.2 ± 1.6 for *cnr1*WT; $F = 21.54$, one-way ANOVA). These results demonstrate that the i.paw morphine effectiveness is impeded in the *cnr1*KO vs. the *cnr1*WT mice in both phases of the formalin test. More precisely, the analgesic effects of morphine were completely abolished in the acute phase and reduced by 87% in the inflammatory phase (Fig. 2B and C). Such a decrease suggests that CB₁ receptors are important for the complete expression of the analgesic effects of i.paw morphine in both phases of the formalin test.

4.4.3 Involvement of CB₂ cannabinoid receptors in the antinociceptive effects of i.paw morphine in the formalin test

The administration of i.paw morphine (1 μ g) induced a decrease in pain behaviors in C57BL/6 mice (Fig. 3 vs. Fig. 1) (for comparative purposes, the results presented for C57BL/6 mice are the same as in Fig. 2). Similarly, i.paw morphine reduced the formalin-induced pain behaviors in the *cnr2*WT mice. However, at the same dose, i.paw morphine

lost its antinociceptive properties in the *cnr2KO* mice in the late phase. Indeed, compared to the C57BL/6 and the *cnr2WT* mice, the pain score measured for the *cnr2KO* mice following i.paw morphine injection was significantly higher only in the inflammatory phase of the formalin test (Fig. 3A; $P < 0.0001$, $F_{\text{genotypes}} = 40.42$, two-way ANOVA). There were no differences in the antinociceptive effects of i.paw morphine within genotypes when the acute phase of the formalin test was analyzed (Fig. 3B; A.U.C., $F = 1.29$, one-way ANOVA). Conversely, the loss of antinociceptive effects of i.paw morphine in the *cnr2KO* mice over the entire inflammatory phase was confirmed by a significant increase in the A.U.C. compared to the C57BL/6 and the *cnr2WT* mice (Fig. 3C; A.U.C., 26.3 ± 3.9 for *cnr2KO* vs. 7.1 ± 0.8 for C57BL/6 and 11.1 ± 2.8 for *cnr2WT*; $F = 13.23$, one-way ANOVA). These results demonstrate a loss of i.paw morphine effectiveness of 76% in the *cnr2KO* vs. the *cnr2WT* mice, but only in the inflammatory phase of the formalin test (Fig. 3B and C). Such a decrease suggests that CB₂ receptors are involved in the analgesic effects of i.paw morphine in the inflammatory phase of the formalin test.

4.4.4 Locally mediated antinociceptive effects of i.paw morphine in the formalin test

To confirm that the previously observed antinociceptive effects of i.paw morphine were induced by a local effect of morphine, rather than by a systemic effect, we further injected morphine contralaterally to the formalin injection. In the C57BL/6 mice, i.paw morphine (1 μg) had no analgesic effect when injected in the contralateral hind paw. Thus, pain scores for contralateral i.paw morphine were not different from pain scores measured for animals injected with i.paw saline, but they did differ from pain scores obtained with ipsilateral i.paw morphine injection in both the acute and the inflammatory phases of the formalin test (Fig. 4A; $P < 0.0001$, $F_{\text{treatments}} = 98.36$, two-way ANOVA). These differences were also observed when the acute and the inflammatory phases were analyzed separately, as confirmed by the analysis of the acute phase A.U.C. (Fig. 4A, upper

inset; A.U.C., 6.7 ± 0.5 for contralateral i.paw morphine vs. 6.3 ± 0.4 for i.paw saline and 3.1 ± 0.3 for i.paw morphine; $F = 25.68$, one-way ANOVA) and the inflammatory phase A.U.C. (Fig. 4A, lower inset; A.U.C., 30.6 ± 1.5 for contralateral i.paw morphine vs. 28.2 ± 2.0 for i.paw saline and 7.1 ± 0.8 for i.paw morphine; $F = 72.09$, one-way ANOVA).

In the *cnr1*WT mice, i.paw morphine (1 μ g) had no analgesic effect when injected into the contralateral hind paw. Hence, the pain scores for contralateral i.paw morphine were not different from the pain scores measured for animals injected with i.paw saline, but they did differ from the pain scores obtained with ipsilateral i.paw morphine injection in both the acute and the inflammatory phases of the formalin test (Fig. 4B; $P < 0.0001$, $F_{\text{treatments}} = 83.51$, two-way ANOVA). These differences were also observed when the acute and the inflammatory phases were analyzed separately, as confirmed by the analysis of the acute phase A.U.C. (Fig. 4B, upper inset; A.U.C., 6.7 ± 0.3 for contralateral i.paw morphine vs. 7.1 ± 0.5 for i.paw saline and 4.5 ± 0.6 for i.paw morphine; $F = 8.60$, one-way ANOVA) and the inflammatory phase A.U.C. (Fig. 4B, lower inset; A.U.C., 31.4 ± 2.6 for contralateral i.paw morphine vs. 30.2 ± 2.8 for i.paw saline and 9.2 ± 1.6 for i.paw morphine; $F = 26.74$, one-way ANOVA).

In the *cnr2*WT mice, i.paw morphine (1 μ g) had no analgesic effect when injected into the contralateral hind paw. Actually, the pain scores for contralateral i.paw morphine were not different from the pain scores measured for animals injected with i.paw saline, but they did differ from the pain scores obtained with ipsilateral i.paw morphine injection in both the acute and the inflammatory phases of the formalin test (Fig. 4C; $P < 0.0001$, $F_{\text{treatments}} = 48.85$, two-way ANOVA). These differences were also observed when the acute and the inflammatory phases were analyzed, as confirmed by the analysis of the acute phase A.U.C. (Fig. 4C, upper inset; A.U.C., 6.3 ± 0.4 for contralateral i.paw morphine vs. 6.7 ± 0.3 for i.paw saline and 4.3 ± 0.7 for i.paw morphine; $F = 7.18$, one-way ANOVA) and the inflammatory phase A.U.C. (Fig. 4C, lower inset; A.U.C., 29.5 ± 1.3 for contralateral i.paw morphine vs. 31.1 ± 3.6 for i.paw saline and 11.1 ± 2.8 for i.paw morphine; $F = 16.50$, one-

way ANOVA). These observations reveal that the effects of i.paw morphine described in Fig. 2 and 3 are due to its local as opposed to systemic action in the formalin test.

4.4.5 Involvement of CB₁ cannabinoid receptors in the antinociceptive effects of i.t. morphine in the formalin test

Because the analgesic effects of morphine are also mediated by receptors located in the spinal cord, we also studied whether cannabinoid receptors are involved in the effects of i.t. morphine. We observed that i.t. morphine (0.1 µg) induced an inhibition of the nocifensive behaviors in C57BL/6 mice (Fig. 5). Similarly, i.t. morphine reduced the formalin-induced behaviors in the *cnr1*WT mice. However, at the same dose, i.t. morphine had no analgesic effects in the *cnr1*KO mice. In fact, compared to the C57BL/6 and the *cnr1*WT mice, the pain score measured for the *cnr1*KO mice following i.t. morphine injection was significantly higher both in the acute and the inflammatory phases of the formalin test (Fig. 5A; $P < 0.0001$, $F_{\text{genotypes}} = 186.90$, two-way ANOVA). These differences observed in the antinociceptive effects were also confirmed by separate analyses of the acute and the inflammatory phases. We observed a significant increase in the acute phase A.U.C. (Fig. 5B; A.U.C., 7.5 ± 0.5 for *cnr1*KO vs. 4.7 ± 0.5 for C57BL/6 and 5.1 ± 0.6 for *cnr1*WT; $F = 8.07$, one-way ANOVA) and the inflammatory phase (Fig. 5C; A.U.C., 35.5 ± 2.5 for *cnr1*KO vs. 7.5 ± 0.9 for C57BL/6 and 9.5 ± 1.6 for *cnr1*WT; $F = 78.42$, one-way ANOVA). These results demonstrate that i.t. morphine analgesia was greatly impaired in the *cnr1*KO mice for both phases of the formalin test. Indeed, at this dose of i.t. morphine, its analgesic effect was almost completely abolished in both phases of the formalin test, thus supporting a major role for CB₁ receptors in the analgesic effects of morphine in this tonic pain context.

4.4.6 Involvement of CB₂ cannabinoid receptors in the antinociceptive effects of i.t. morphine in the formalin test

The injection of i.t. morphine (0.1 µg) induced a robust inhibition of pain behaviors in C57BL/6 mice (Fig. 6) (for comparative purposes, the results presented for C57BL/6 mice are the same as in Fig. 5). Similarly, i.t. morphine reduced the formalin-induced pain behaviors in the *cnr2*WT mice. However, at the same dose, i.t. morphine had no analgesic effects in the *cnr2*KO mice in the late phase. Thus, compared to the C57BL/6 and the *cnr2*WT mice, the pain score measured for the *cnr2*KO mice following i.t. morphine injection was significantly different only in the inflammatory phase of the formalin test (Fig. 6A; $P < 0.0001$, $F_{\text{genotypes}} = 91.94$, two-way ANOVA). Indeed, the loss of the antinociceptive effects of i.t. morphine in the *cnr2*KO mice over the entire inflammatory phase was confirmed by a significant increase in the A.U.C. compared to C57BL/6 and *cnr2*WT mice (Fig. 6C; A.U.C., 30.8 ± 2.7 for *cnr2*KO vs. 7.5 ± 0.9 for C57BL/6 and 11.8 ± 0.9 for *cnr2*WT; $F = 50.72$, one-way ANOVA). The effect of morphine in the acute phase of the formalin test was similar for all genotypes (Fig. 6B; A.U.C., $F = 0.37$, one-way ANOVA). These results therefore revealed a 90% loss of i.t. morphine effectiveness in the *cnr2*KO vs. the *cnr2*WT mice specifically in the inflammatory phase of the formalin test. Such a decrease suggests that CB₂ receptors have an important role in the analgesic effects of i.t. morphine in the inflammatory phase of the formalin test.

4.4.7 Effect of formalin on thickness and edema of the hind paw

To verify whether the absence of CB₁ or CB₂ receptors impacts the development of formalin-induced inflammation, which in turn might affect the analgesic properties of morphine, we measured the maximal paw thickness and edema following the injection of formalin for various treatments and genotypes.

Both the thickness and the edema (volume) significantly increased in the formalin-injected hind paw vs. the contralateral side 60 min after formalin injection (data not

shown). As shown in Table 1, the maximal thickness of the formalin-injected hind paw for each genotype did not differ between treatments (Table 1; $P = 0.9036$, $F_{\text{treatments}} = 0.1875$ for C57BL/6; $P = 0.7126$, $F_{\text{treatments}} = 0.4611$ for *cnr1*WT; $P = 0.1249$, $F_{\text{treatments}} = 2.157$ for *cnr1*KO; $P = 0.3699$, $F_{\text{treatments}} = 1.106$ for *cnr2*WT; $P = 0.1217$, $F_{\text{treatments}} = 2.183$ for *cnr2*KO, one-way ANOVA). Similarly, the edema induced by formalin did not differ across treatments within each genotype (Table 1; $P = 0.3631$, $F_{\text{treatments}} = 1.124$ for C57BL/6; $P = 0.2454$, $F_{\text{treatments}} = 1.498$ for *cnr1*WT; $P = 0.1312$, $F_{\text{treatments}} = 2.108$ for *cnr1*KO; $P = 0.1443$, $F_{\text{treatments}} = 2.015$ for *cnr2*WT; $P = 0.0821$, $F_{\text{treatments}} = 2.581$ for *cnr2*KO, one-way ANOVA). These results demonstrated that treatments did not influence the maximal thickness or the edema in the formalin test.

Finally, the maximal thickness and the volume of the ipsilateral hind paw were analyzed to observe whether genotype affected the development of inflammation. As shown in Table 1, the maximal thickness of the formalin-injected hind paw did not differ between genotypes (Table 1; $P = 0.2765$, $F_{\text{genotypes}} = 1.359$ for saline i.paw; $P = 0.3497$, $F_{\text{genotypes}} = 1.165$ for morphine i.paw; $P = 0.9809$, $F_{\text{genotypes}} = 0.1017$ for saline i.t.; $P = 0.3068$, $F_{\text{genotypes}} = 1.273$ for morphine i.t., one-way ANOVA). Moreover, the edema of the formalin-injected hind paw also did not differ between genotypes (Table 1; $P = 0.4067$, $F_{\text{genotypes}} = 1.039$ for saline i.paw; $P = 0.1450$, $F_{\text{genotypes}} = 1.882$ for morphine i.paw; $P = 0.3496$, $F_{\text{genotypes}} = 1.166$ for saline i.t.; $P = 0.2178$, $F_{\text{genotypes}} = 1.552$ for morphine i.t., one-way ANOVA). These results demonstrated that genotype did not influence the maximal thickness or the edema in the formalin test.

4.4.8 Cannabinoid receptors are not involved in the antinociceptive effects of s.c. morphine in the formalin test

Because a significant contribution of the analgesic effects of morphine is mediated by receptors located in the brain (periaqueductal grey, rostroventral medulla), we also evaluated the contribution of CB₁ and CB₂ receptors following systemic morphine

administration. As anticipated, subcutaneous (s.c.) morphine (3 mg/kg) induced an inhibition of pain behaviors in the C57BL/6 mice, but only in the late phase of the formalin test (Fig. 7). Surprisingly, in contrast to what we observed following i.paw and i.t. morphine (Fig. 2, 3, 5 and 6), s.c. morphine significantly reduced the formalin-induced nocifensive behaviors in the inflammatory phase in the *cnr1KO* and the *cnr2KO* mice (Fig. 7). Hence, pain behaviors following the injection of s.c. morphine were not different within genotypes in both phases of the formalin test (Fig. 7A; $P = 0.9622$, $F_{\text{genotypes}} = 0.04$, two-way ANOVA). There were no statistically significant differences in the antinociceptive effects of s.c. morphine when the acute phase of the formalin test was analyzed (Fig. 7B; A.U.C., $F = 0.55$, one-way ANOVA) nor when the inflammatory phase of the formalin test was analyzed (Fig. 7C; A.U.C., $F = 0.01$, one-way ANOVA). Notably, s.c. morphine had no antinociceptive effects in the acute phase: there were no differences in the A.U.C. of s.c. morphine 3 mg/kg compared to saline i.paw (Fig. 7B vs. Fig. 1B; A.U.C., $P = 0.1266$, $t = 1.667$ and $df = 10$, two-tailed unpaired t-test). Together, our results demonstrate that in contrast to i.paw and i.t. morphine, s.c. morphine preserved its antinociceptive properties in the *cnr1KO* and the *cnr2KO* mice in the inflammatory phase of the formalin test and, therefore, suggest that cannabinoid receptors do not significantly contribute to the analgesic effects of s.c. morphine.

4.4.9 Cannabinoid receptors are not involved in the antinociceptive effects of s.c. morphine in the hot-water immersion tail-flick test

To test whether cannabinoid receptors are involved in the antinociceptive effects of s.c. morphine in acute pain relief, we used the hot-water immersion tail-flick test (tail immersion test in a water bath at 52°C) to measure the antinociceptive effects of 1, 3 and 10 mg/kg s.c. morphine. As shown in Fig. 8A-C, genotype did not produce any significant difference in the baseline latency to tail withdrawal compared to C57BL/6 mice ($P = 0.1904$, $F_{\text{genotypes}} = 1.572$, two-way ANOVA). In all genotypes, s.c. morphine produced a

time- and dose-dependent analgesia that peaked at 20 minutes post-injection ($P < 0.0001$, $F_{\text{time}} = 64.57$ for 1 mg/kg s.c. morphine; $P < 0.0001$, $F_{\text{time}} = 163.7$ for 3 mg/kg s.c. morphine; $P < 0.0001$, $F_{\text{time}} = 583.2$ for 10 mg/kg s.c. morphine, two-way ANOVA). Latency to tail withdrawal returned to baseline by 40 to 60 min after the s.c. morphine injection. The %MPE values of s.c. morphine were calculated from the latencies to tail withdrawal that were obtained 20 min post-injection (Fig. 8D). At any dose, the analgesic effect of s.c. morphine did not differ between genotypes; %MPE_{1 mg/kg} ($16.0 \pm 2.3\%$ for C57BL/6, $18.3 \pm 1.1\%$ for *cnr1*WT, $12.3 \pm 2.5\%$ for *cnr1*KO, $19.9 \pm 2.4\%$ for *cnr2*WT and $18.3 \pm 1.0\%$ for *cnr2*KO; $F = 2.26$), %MPE_{3 mg/kg} ($37.7 \pm 2.6\%$ for C57BL/6, $37.5 \pm 2.3\%$ for *cnr1*WT, $33.6 \pm 1.8\%$ for *cnr1*KO, $40.1 \pm 2.5\%$ for *cnr2*WT and $39.9 \pm 2.2\%$ for *cnr2*KO; $F = 1.30$) and %MPE_{10 mg/kg} ($93.7 \pm 2.9\%$ for C57BL/6, $86.7 \pm 1.2\%$ for *cnr1*WT, $91.2 \pm 3.0\%$ for *cnr1*KO, $95.0 \pm 2.2\%$ for *cnr2*WT and $87.8 \pm 3.6\%$ for *cnr2*KO; $F = 1.80$, one-way ANOVA).

4.4.10 No differences were detected in spinal MOP expression between the wild type and the knockout mice using immunofluorescence against spinal MOP

In an effort to determine whether the inactivation of CB₁ or CB₂ receptors affects the expression pattern of MOP, we first compared the MOP-like immunofluorescence staining in spinal cords of the *cnr1*WT (Fig. 9A), *cnr1*KO (Fig. 9B), *cnr2*WT (Fig. 9C), and *cnr2*KO mice (Fig. 9D). Although qualitative, the immunofluorescence labeling revealed similar expression patterns of MOP in laminae I and II of the dorsal horn of the spinal cord in all genotypes.

4.4.11 No differences detected in spinal MOP expression and binding properties between wild type and knockout mice using saturation binding assays

To verify if the loss of the antinociceptive effects of morphine in the *cnr1*KO and the *cnr2*KO mice could be the consequence of a lower level of MOP expression or of

altered binding capacities, we performed saturation binding assays in spinal cord membrane extracts from these mice. As shown in Table 2, [³H]-DAMGO saturation binding assays revealed that the level of spinal MOP (B_{\max}) did not significantly differ between the *cnr1*WT and the *cnr1*KO mice ($P = 0.8759$, $t = 0.1664$ and $df = 4$) or between the *cnr2*WT and the *cnr2*KO mice ($P = 0.8916$, $t = 0.1452$ and $df = 4$). We further found that the affinity (K_d) of DAMGO for spinal MOP remained unchanged between the *cnr1*WT and the *cnr1*KO mice ($P = 0.5616$, $t = 0.6322$ and $df = 4$) and between the *cnr2*WT and the *cnr2*KO mice ($P = 0.2424$, $t = 1.370$ and $df = 4$, two-tailed unpaired t-test). Thus, differences observed in i.paw and i.t. morphine analgesic effectiveness are apparently not caused by decreases in the levels of expression or reduced binding affinity of MOP in *cnr1*KO and *cnr2*KO mice, at least at the level of the spinal cord.

4.4.12 No differences were detected in spinal MOP activity between wild type and knockout mice using [³⁵S]GTPγS binding assay on mice spinal cord

To assess if the inactivation of CB₁ or CB₂ receptors might alter the G protein coupling of MOP in the spinal cords of transgenic mice, we performed [³⁵S]GTPγS binding assays using spinal cord extracts. As shown in Table 3, the stimulation of [³⁵S]GTPγS binding by morphine was used as a functional measure of the status of G protein coupling to the receptor. We found that morphine increased the binding of [³⁵S]GTPγS in spinal cord extracts with similar potency (EC_{50}) and efficacy (E_{\max}) in the C57BL/6 compared to the *cnr1*WT and the *cnr1*KO mice ($P = 0.7558$, $F_{\text{potency}} = 0.2935$ and $P = 0.1841$, $F_{\text{efficacy}} = 2.273$, one-way ANOVA) and to the *cnr2*WT and the *cnr2*KO mice ($P = 0.6386$, $F_{\text{potency}} = 0.4837$ and $P = 0.1638$, $F_{\text{efficacy}} = 2.483$, one-way ANOVA). Thus, differences observed in the i.paw and the i.t. morphine analgesic effectiveness are apparently not caused by a decrease in the functional activity of spinal MOP within the different genotypes, as the ability of morphine to activate G protein is not modified. Along with previous results,

these data provide direct evidence of apparently normal functional activity of spinal MOP in wildtype and knockout mice.

4.5 Discussion

In the present study, we demonstrated that the inactivation of either CB₁ or CB₂ receptors in mice impairs the analgesic effects of i.paw and i.t. morphine when assessed with the formalin test. By contrast, the analgesic effectiveness of s.c. morphine was preserved in these transgenic mice, both in the formalin test and in the hot water immersion tail flick test. We found that the loss of analgesic effectiveness of morphine was neither the consequence of impaired expression and binding properties of MOP, nor of its G protein coupling efficiency. Although we have not identified the exact mechanisms by which cannabinoid receptors influence morphine-induced analgesia, our findings further support the existence of a functional interaction between the cannabinoid and opioid systems, at least in the periphery and in the spinal cord.

It is now well recognized that the endocannabinoid and opioid systems share similar distributions in several brain areas as well as in the spinal cord and in the peripheral sites of pain processing (Bodnar, 2012; Di Marzo, 2008). Even if the molecular and cellular mechanisms involved in this process are not clearly established, cannabinoids and opioids are known to produce analgesic synergy in various animal models of pain (Parolaro et al., 2010; Welch, 2009). Indeed, previous studies using selective cannabinoid receptor antagonists have suggested that CB₁ receptors are involved in peripheral (da Fonseca Pacheco et al., 2008) and central morphine antinociception (Pacheco Dda et al., 2009) and that CB₂ receptors are partially involved in these effects (da Fonseca Pacheco et al., 2008). By contrast, the antinociceptive effects of systemic morphine remained unaffected by CB₁ receptor ablation in response to both chemical (Miller et al., 2011) and thermal noxious stimuli (Ledent et al., 1999; Miller et al., 2011; Valverde et al., 2000). In fact, the roles of CB₁ receptors described by pharmacological studies performed in

wildtype mice were often not confirmed by studies using *cnr1*KO mice (Miller et al., 2011; Raffa and Ward, 2012). Notably, most studies using pharmacological tools have employed the high-affinity CB₁ antagonist/inverse agonist AM251 to investigate potential interactions between MOP and CB₁ receptors (da Fonseca Pacheco et al., 2008; Haghparast et al., 2009; Pacheco Dda et al., 2009; Trang et al., 2007). However, AM251 was recently found to display direct antagonist properties with respect to MOP (Seely et al., 2012). Therefore, some of the reported effects of this antagonist on MOP functions may not be mediated by the CB₁ receptors but rather by a direct action on MOP (Seely et al., 2012), which might explain the discrepancies between pharmacological and genetic approaches (Miller et al., 2011).

To better characterize the roles of the CB₁ and CB₂ receptors in modulating the opioid system, we studied the impact of disrupting these receptors on morphine-induced analgesia in mice. While our experiments, performed in knockout animals, exclude potential confounding effects of cannabinoid receptor antagonists, one could still argue that genetically modified mice may develop unidentified adaptations that could mask the role of cannabinoid receptors (Miller et al., 2011). However, it was shown that disruption of CB₁ receptors did not alter the mRNA levels of MOP in mouse dorsal root ganglia and spinal cord (Hojo et al., 2008). By contrast, *cnr1*KO mice were shown to have increased brain levels of substance P, enkephalin, and dynorphin (Zimmer et al., 1999). Regarding opioids, this observation might indicate a role for CB₁ in the tonic regulation of these peptides rather than a consequence of developmental adaptation. Although there is still no information regarding putative developmental changes in response to CB₂ receptor inactivation, there are no reasons to believe that the loss of morphine analgesia observed in our study is the result of compensatory modifications occurring in *cnr1*KO and *cnr2*KO mice. Indeed, in our experiments, the mice were found to behave normally and to be equally sensitive to i.d. formalin and to tail immersion in hot water.

Aside from adaptation, direct receptor-receptor interaction and interaction between intracellular pathways are other putative mechanisms able to impede morphine-

induced analgesia in *cnr1KO* and *cnr2KO* mice. Indeed, MOP and CB₁ receptors were shown to physically interact when co-expressed in the same cells (Rios et al., 2006). Physical interaction between the MOP and the CB₁ receptors was also evidenced by another group that used electrophysiological approaches to demonstrate the existence of a functional heterodimer (Hojo et al., 2008). *In vivo*, heterodimer formation requires that both receptors co-localize in the same neuron. Hence, it has been demonstrated that MOP and CB₁ receptors co-localize in dendritic spines in the caudate putamen, periaqueductal gray, dorsal horn of the spinal cord and presynaptic terminals (Hohmann et al., 1999; Pickel et al., 2004; Rodriguez et al., 2001; Salio et al., 2001; Vigano et al., 2005; Wilson-Poe et al., 2012). Another study has recently described functional interactions between forebrain MOP and CB₂ receptors and the impact of this interaction on agonist-mediated signaling (Paldyova et al., 2008). There is growing evidence that heterodimerization can generate receptors with novel pharmacological properties (Bouvier, 2001; Devi, 2001; Jordan and Devi, 1999). Indeed, the attenuation of CB₁ receptor-mediated signaling following MOP activation (Rios et al., 2006) or a decrease in the functions of MOP induced by the constitutive activity of CB₁ receptors (Canals and Milligan, 2008) have been shown. A recent study demonstrated that there is a decrease in DOP activity associated to its interaction with CB₁ receptors (Bushlin et al., 2012), therefore suggesting that cannabinoid receptors may have important impacts on opioid receptor functions. In the present study, we have demonstrated that there were no significant differences in the pattern of spinal MOP expression nor in its binding properties in wild type mice compared to *cnr1KO* and *cnr2KO* mice. Moreover, we found that both the efficacy and the potency of spinal MOP's G protein coupling remained unaffected by CB₁ or CB₂ inactivation. It is therefore unlikely that the loss of morphine analgesia in *cnr1KO* and *cnr2KO* mice is the consequence of spinal MOP malfunction or downregulation due to the absence of MOP's heterodimerization with either the CB₁ or the CB₂ receptor. Admittedly however, our experimental design cannot exclude the possibility that cannabinoid receptors interfered with intracellular pathways of MOP, downstream of G proteins.

One could argue that the loss of morphine analgesia in *cnr1KO* and *cnr2KO* mice can be the consequence of a direct effect of morphine on cannabinoid receptors. However, the analgesic effects of morphine were often shown to be completely abolished in MOP KO animals demonstrating that the effects of morphine is mainly mediated by this receptor, at least *in vivo* (Matthes et al., 1996; Mizoguchi et al., 2003; Sora et al., 2001). Another mechanism that may explain our observations is the possibility that transgenic mice have a disrupted basal endocannabinoid tone that impairs the ability of i.paw and i.t. morphine to produce antinociception. Endocannabinoids were in fact shown to be involved in the regulation of antinociception following i.paw (da Fonseca Pacheco et al., 2008) and intracerebroventricular (i.c.v.) (Pacheco Dda et al., 2009) injections of morphine. Indeed, although brain levels of endocannabinoids remained unchanged after the acute administration of morphine, chronic treatment with morphine produced a widespread decrease in brain 2-arachidonoylglycerol (2-AG) without significantly changing anandamide levels (both of these compounds are endocannabinoids) (Vigano et al., 2003). In support of a role of endocannabinoids in i.paw and i.t. morphine-induced analgesia, we observed different consequences of CB₁ and CB₂ invalidation in the antinociceptive effects of morphine on the two phases of the formalin test. While we found that morphine analgesia was attenuated in both phases of the formalin test in the *cnr1KO* mice, the *cnr2KO* mice only showed different effects of morphine-induced analgesia in the inflammatory phase. A possible interpretation of these results is that following i.paw and i.t. morphine administration, anandamide may be rapidly released to act at CB₁ receptors, thus participating in the attenuation of the early stages of nociception of the formalin test. By contrast, the release of endogenous 2-AG may produce a more sustained modulatory effect on inflammatory pain *via* both CB₁ and CB₂ receptors.

At first glance, it might appear puzzling that s.c. morphine-induced analgesia remained unaffected in both the formalin test and the tail flick test. Indeed, previous studies have demonstrated that morphine analgesic efficacy requires activity at both spinal and supraspinal sites (Kolesnikov et al., 1996; Miaskowski et al., 1993; Rossi et al.,

1993; Siuciak and Advokat, 1989). Analgesic synergy between MOP and CB₁ receptor agonists was also shown to play an important role in morphine analgesia (Tham et al., 2005). Based on these studies, it would have been logical to observe an attenuation of the analgesic efficacy of systemic morphine due to a lack/reduction of a spinal contribution. However, we found that the analgesic potency of s.c. morphine was preserved in both the formalin and the hot water immersion tail flick tests. Our observations rather suggest that systemic morphine principally act *via* a neuronal network independent of cannabinoid receptors which therefore remain unaffected in *cnr1KO* and *cnr2KO* mice. Consequently, the participation of spinal MOP in the analgesic effects of systemic morphine would be minimal since i.t. morphine analgesia is impaired in the same mice. In support of this hypothesis, a series of studies have shown that systemic morphine produces antinociception principally *via* the activation of descending inhibitory projections releasing serotonin in the dorsal horn of the spinal cord (Dogrul et al., 2009; Dogrul and Seyrek, 2006; Giordano and Barr, 1988; Kuraishi et al., 1983). The latter studies in fact revealed that blockade of spinal serotonin receptors or pharmacological depletion of serotonin in the spinal cord attenuates the analgesic effects of systemic and intracranial morphine (Dogrul et al., 2009; Dogrul and Seyrek, 2006; Giordano and Barr, 1988; Kuraishi et al., 1983) as well as other opioid receptor agonists such as tramadol (Yanarates et al., 2010).

In conclusion, we have demonstrated that peripheral and spinal antinociceptive effects of morphine were decreased in the inflammatory phase of the formalin test in *cnr1KO* and *cnr2KO* mice, whereas its systemic effects were preserved. These observations further support the existence of interactions between the cannabinoid and opioid systems. The loss of peripheral and spinal morphine analgesia is apparently caused neither by a decrease in MOP spinal expression nor by altered binding properties or G protein coupling of this receptor in *cnr1KO* and *cnr2KO* mice. The mechanisms underlying the loss of morphine analgesia are not clear but could include the release of endogenous cannabinoids in structures along the pain pathway or a disrupted endocannabinoid tone.

4.6 Acknowledgments

The authors are thankful to Hélène Beaudry, Kristina Rochon, Sophie Charron, and Florence Dotigny for providing technical assistance with immunofluorescence experiments, saturation binding assays, and transgenic animals. We would also like to thank Dr Michael Bruchas for its advice with the GTP γ S assay. This work was supported by a grant from the Fonds de Recherche Québec – Santé (FRQS)-funded Quebec Pain Research Network (QPRN) to PB-LG-JFB and by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to JFB and LG. JD is supported by a Vanier Canada Graduate Scholarships from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) 204685. LG and JFB are recipients of FRQS Junior 2 salary support. We would also like to thank Dr Beat Lutz for providing the *cnr1*KO mice. The authors report no conflict of interest.

Conflict of interest statement

The authors report no conflict of interest

4.7 References

- Agarwal, N., Pacher, P., Tegeder, I., et al., 2007. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci* 10, 870-879.
- Beltramo, M., Bernardini, N., Bertorelli, R., et al., 2006. CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *Eur J Neurosci* 23, 1530-1538.
- Bidaut-Russell, M., Devane, W. A., Howlett, A. C., 1990. Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain. *J Neurochem* 55, 21-26.
- Bodnar, R. J., 2012. Endogenous opiates and behavior: 2011. *Peptides* 38, 463-522.
- Bouvier, M., 2001. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2, 274-286.
- Bucsic, A., Lembeck, F., 1981. In vitro release of substance P from spinal cord slices by capsaicin congeners. *Eur J Pharmacol* 71, 71-77.
- Bushlin, I., Gupta, A., Stockton, S. D., Jr., et al., 2012. Dimerization with cannabinoid receptors allosterically modulates delta opioid receptor activity during neuropathic pain. *PLoS One* 7, e49789.
- Canals, M., Milligan, G., 2008. Constitutive activity of the cannabinoid CB1 receptor regulates the function of co-expressed Mu opioid receptors. *J Biol Chem* 283, 11424-11434.

Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., et al., 1993. Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem J* 295 (Pt 3), 625-628.

Childers, S. R., Fleming, L., Konkoy, C., et al., 1992. Opioid and cannabinoid receptor inhibition of adenylyl cyclase in brain. *Ann N Y Acad Sci* 654, 33-51.

Cichewicz, D. L., 2004. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. *Life Sci* 74, 1317-1324.

Coderre, T. J., Fundytus, M. E., McKenna, J. E., et al., 1993. The formalin test: a validation of the weighted-scores method of behavioural pain rating. *Pain* 54, 43-50.

da Fonseca Pacheco, D., Klein, A., de Castro Perez, A., et al., 2008. The mu-opioid receptor agonist morphine, but not agonists at delta- or kappa-opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 154, 1143-1149.

Devi, L. A., 2001. Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sci* 22, 532-537.

Di Marzo, V., 2008. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 7, 438-455.

Dogrul, A., Ossipov, M. H., Porreca, F., 2009. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. *Brain Res* 1280, 52-59.

Dogrul, A., Seyrek, M., 2006. Systemic morphine produce antinociception mediated by spinal 5-HT₇, but not 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the spinal cord. *Br J Pharmacol* 149, 498-505.

Dubuisson, D., Dennis, S. G., 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4, 161-174.

Evans, C. J., Keith, D. E., Jr., Morrison, H., et al., 1992. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258, 1952-1955.

Fairbanks, C. A., 2003. Spinal delivery of analgesics in experimental models of pain and analgesia. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1007-1041.

Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., et al., 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232, 54-61.

Gendron, L., Pintar, J. E., Chavkin, C., 2007. Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia. *Neuroscience* 150, 807-817.

Giordano, J., Barr, G. A., 1988. Effects of neonatal spinal cord serotonin depletion on opiate-induced analgesia in tests of thermal and mechanical pain. *Brain Res* 469, 121-127.

Guindon, J., Desroches, J., Beaulieu, P., 2007. The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB₂ receptors. *Br J Pharmacol* 150, 693-701.

Haghparast, A., Azizi, P., Hassanpour-Ezatti, M., et al., 2009. Sub-chronic administration of AM251, CB1 receptor antagonist, within the nucleus accumbens induced sensitization to morphine in the rat. *Neurosci Lett* 467, 43-47.

Hohmann, A. G., 2002. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem Phys Lipids* 121, 173-190.

Hohmann, A. G., Briley, E. M., Herkenham, M., 1999. Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord. *Brain Res* 822, 17-25.

Hojo, M., Sudo, Y., Ando, Y., et al., 2008. mu-Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. *J Pharmacol Sci* 108, 308-319.

Howlett, A. C., 1995. Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 607-634.

Jhaveri, M. D., Sagar, D. R., Elmes, S. J., et al., 2007. Cannabinoid CB2 receptor-mediated anti-nociception in models of acute and chronic pain. *Mol Neurobiol* 36, 26-35.

Jordan, B. A., Devi, L. A., 1999. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399, 697-700.

Kieffer, B. L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C., et al., 1992. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 12048-12052.

Kolesnikov, Y. A., Jain, S., Wilson, R., et al., 1996. Peripheral morphine analgesia: synergy with central sites and a target of morphine tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 279, 502-506.

Kuraishi, Y., Harada, Y., Aratani, S., et al., 1983. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. *Brain Res* 273, 245-252.

Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., et al., 1999. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283, 401-404.

Lever, I. J., Rice, A. S., 2007. Cannabinoids and pain. *Handb Exp Pharmacol*, 265-306.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., et al., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Maldonado, R., Valverde, O., 2003. Participation of the opioid system in cannabinoid-induced antinociception and emotional-like responses. *Eur Neuropsychopharmacol* 13, 401-410.

Manzanares, J., Corchero, J., Romero, J., et al., 1999. Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends Pharmacol Sci* 20, 287-294.

Massi, P., Vaccani, A., Romorini, S., et al., 2001. Comparative characterization in the rat of the interaction between cannabinoids and opiates for their immunosuppressive and analgesic effects. *J Neuroimmunol* 117, 116-124.

Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., et al., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564.

Matthes, H. W., Maldonado, R., Simonin, F., et al., 1996. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383, 819-823.

Miaskowski, C., Taiwo, Y. O., Levine, J. D., 1993. Antinociception produced by receptor selective opioids. Modulation of supraspinal antinociceptive effects by spinal opioids. *Brain Res* 608, 87-94.

Miller, L. L., Picker, M. J., Schmidt, K. T., et al., 2011. Effects of morphine on pain-elicited and pain-suppressed behavior in CB1 knockout and wildtype mice. *Psychopharmacology (Berl)* 215, 455-465.

Mizoguchi, H., Wu, H. E., Narita, M., et al., 2003. Lack of mu-opioid receptor-mediated G-protein activation in the spinal cord of mice lacking Exon 1 or Exons 2 and 3 of the MOR-1 gene. *J Pharmacol Sci* 93, 423-429.

Munro, S., Thomas, K. L., Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-65.

Pacheco Dda, F., Klein, A., Perez, A. C., et al., 2009. Central antinociception induced by mu-opioid receptor agonist morphine, but not delta- or kappa-, is mediated by cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol* 158, 225-231.

Paldy, E., Bereczki, E., Santha, M., et al., 2008. CB(2) cannabinoid receptor antagonist SR144528 decreases mu-opioid receptor expression and activation in mouse brainstem: role of CB(2) receptor in pain. *Neurochem Int* 53, 309-316.

Paldyova, E., Bereczki, E., Santha, M., et al., 2008. Noladin ether, a putative endocannabinoid, inhibits mu-opioid receptor activation via CB2 cannabinoid receptors. *Neurochem Int* 52, 321-328.

Parolaro, D., Rubino, T., Vigano, D., et al., 2010. Cellular mechanisms underlying the interaction between cannabinoid and opioid system. *Curr Drug Targets* 11, 393-405.

Petricevic, M., Wanek, K., Denko, C. W., 1978. A new mechanical method for measuring rat paw edema. *Pharmacology* 16, 153-158.

Pickel, V. M., Chan, J., Kash, T. L., et al., 2004. Compartment-specific localization of cannabinoid 1 (CB1) and mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens. *Neuroscience* 127, 101-112.

Pol, O., Puig, M. M., 2004. Expression of opioid receptors during peripheral inflammation. *Curr Top Med Chem* 4, 51-61.

Raffa, R. B., Ward, S. J., 2012. CB(1)-independent mechanisms of Delta(9)-THCV, AM251 and SR141716 (rimonabant). *J Clin Pharm Ther* 37, 260-265.

Rios, C., Gomes, I., Devi, L. A., 2006. mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *Br J Pharmacol* 148, 387-395.

Rodriguez, J. J., Mackie, K., Pickel, V. M., 2001. Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J Neurosci* 21, 823-833.

Rossi, G. C., Pasternak, G. W., Bodnar, R. J., 1993. Synergistic brainstem interactions for morphine analgesia. *Brain Res* 624, 171-180.

Salio, C., Fischer, J., Franzoni, M. F., et al., 2001. CB1-cannabinoid and mu-opioid receptor co-localization on postsynaptic target in the rat dorsal horn. *Neuroreport* 12, 3689-3692.

Schatz, A. R., Lee, M., Condie, R. B., et al., 1997. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol* 142, 278-287.

Seely, K. A., Brents, L. K., Franks, L. N., et al., 2012. AM-251 and rimonabant act as direct antagonists at mu-opioid receptors: implications for opioid/cannabinoid interaction studies. *Neuropharmacology* 63, 905-915.

Siuciak, J. A., Advokat, C., 1989. The synergistic effect of concurrent spinal and supraspinal opiate agonisms is reduced by both nociceptive and morphine pretreatment. *Pharmacol Biochem Behav* 34, 265-273.

Sora, I., Elmer, G., Funada, M., et al., 2001. Mu opiate receptor gene dose effects on different morphine actions: evidence for differential in vivo mu receptor reserve. *Neuropsychopharmacology* 25, 41-54.

Tham, S. M., Angus, J. A., Tudor, E. M., et al., 2005. Synergistic and additive interactions of the cannabinoid agonist CP55,940 with mu opioid receptor and alpha2-adrenoceptor agonists in acute pain models in mice. *Br J Pharmacol* 144, 875-884.

Tjolsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., et al., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5-17.

- Trang, T., Sutak, M., Jhamandas, K., 2007. Involvement of cannabinoid (CB1)-receptors in the development and maintenance of opioid tolerance. *Neuroscience* 146, 1275-1288.
- Valverde, O., Ledent, C., Beslot, F., et al., 2000. Reduction of stress-induced analgesia but not of exogenous opioid effects in mice lacking CB1 receptors. *Eur J Neurosci* 12, 533-539.
- Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., et al., 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310, 329-332.
- Vigano, D., Grazia Cascio, M., Rubino, T., et al., 2003. Chronic morphine modulates the contents of the endocannabinoid, 2-arachidonoyl glycerol, in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 28, 1160-1167.
- Vigano, D., Rubino, T., Parolaro, D., 2005. Molecular and cellular basis of cannabinoid and opioid interactions. *Pharmacol Biochem Behav* 81, 360-368.
- Walczak, J. S., Pichette, V., Leblond, F., et al., 2005. Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain. *Neuroscience* 132, 1093-1102.
- Walczak, J. S., Pichette, V., Leblond, F., et al., 2006. Characterization of chronic constriction of the saphenous nerve, a model of neuropathic pain in mice showing rapid molecular and electrophysiological changes. *J Neurosci Res* 83, 1310-1322.
- Welch, S. P., 2009. Interaction of the cannabinoid and opioid systems in the modulation of nociception. *Int Rev Psychiatry* 21, 143-151.

Wilson-Poe, A. R., Morgan, M. M., Aicher, S. A., et al., 2012. Distribution of CB1 cannabinoid receptors and their relationship with mu-opioid receptors in the rat periaqueductal gray. *Neuroscience* 213, 191-200.

Yanarates, O., Dogrul, A., Yildirim, V., et al., 2010. Spinal 5-HT7 receptors play an important role in the antinociceptive and antihyperalgesic effects of tramadol and its metabolite, O-Desmethyltramadol, via activation of descending serotonergic pathways. *Anesthesiology* 112, 696-710.

Yasuda, K., Raynor, K., Kong, H., et al., 1993. Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6736-6740.

Zimmer, A., Zimmer, A. M., Hohmann, A. G., et al., 1999. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5780-5785.

4.8 Tables

Table 1. Effects of formalin on paw thickness and edema

	¹ Maximal thickness (mm)			
	Saline i.paw	Morphine i.paw	Saline i.t.	Morphine i.t.
C57BL/6	1.96 ± 0.05	1.93 ± 0.08	1.94 ± 0.06	1.90 ± 0.05
<i>cnr1</i> WT	1.99 ± 0.02	1.95 ± 0.05	1.93 ± 0.08	2.01 ± 0.05
<i>cnr1</i> KO	2.15 ± 0.01	1.95 ± 0.09	1.91 ± 0.05	1.99 ± 0.03
<i>cnr2</i> WT	2.04 ± 0.06	2.07 ± 0.05	1.95 ± 0.05	2.00 ± 0.04
<i>cnr2</i> KO	2.16 ± 0.12	2.06 ± 0.04	1.96 ± 0.03	1.96 ± 0.03
	² Volume (mL/g) %			
	Saline i.paw	Morphine i.paw	Saline i.t.	Morphine i.t.
C57BL/6	0.88 ± 0.03	0.90 ± 0.03	0.85 ± 0.02	0.83 ± 0.04
<i>cnr1</i> WT	0.82 ± 0.04	0.87 ± 0.05	0.81 ± 0.06	0.72 ± 0.03
<i>cnr1</i> KO	0.83 ± 0.02	0.85 ± 0.04	0.76 ± 0.04	0.76 ± 0.03
<i>cnr2</i> WT	0.88 ± 0.03	0.79 ± 0.04	0.77 ± 0.04	0.76 ± 0.05
<i>cnr2</i> KO	0.83 ± 0.02	0.79 ± 0.03	0.73 ± 0.04	0.72 ± 0.03

Maximal thickness and edema were evaluated 60 min after formalin injection into the left hind paw.

¹Maximal thickness was measured with a digital micrometer and expressed in mm.

²The volume of the inflamed hind paw was determined by water displacement using a plethysmometer and expressed as the percentage of paw volume relative to the total body weight of the animal (mL/g).

The data are expressed as the means ± SEM (n = 6 per group).

Table 2. Binding properties of spinal MOP

	$^1B_{\max}$ (fmol/mg)	2K_d (nM)
<i>cnr1</i> WT	44.50 ± 2.34	1.75 ± 0.27
<i>cnr1</i> KO	43.43 ± 5.99	2.32 ± 0.86
<i>cnr2</i> WT	34.32 ± 5.82	2.21 ± 1.03
<i>cnr2</i> KO	33.23 ± 4.74	4.70 ± 1.50

[³H]DAMGO saturation binding assays were performed in mouse spinal cord preparations.

$^1B_{\max}$ represents the amount of MOP binding sites in spinal cord of mice expressed as fmol/mg of protein.

2K_d represents the affinity of [³H]DAMGO for MOP in the spinal cord extracts and is expressed in nM.

The data are expressed as the means ± SEM (n = 3 per group).

Table 3. G protein coupling of spinal MOP

	¹ EC ₅₀ (nM)	² E _{max} (Percentage increase over basal binding; %)
C57BL/6	87.50 ± 26.80	29.73 ± 2.93
<i>cnr1</i> WT	121.20 ± 38.25	31.86 ± 1.09
<i>cnr1</i> KO	105.50 ± 26.93	38.01 ± 3.82
<i>cnr2</i> WT	127.60 ± 43.76	37.99 ± 6.97
<i>cnr2</i> KO	93.81 ± 15.82	46.83 ± 5.58

[³⁵S]GTPγS binding assays were performed in mouse spinal cord membrane preparations.

¹The potency (EC₅₀) of morphine was determined as the concentration (nM) required to reach 50% of the maximal possible effect (i.e., 50% of the maximal [³⁵S]GTPγS binding).

²The efficacy (E_{max}) represents the maximum functional response induced by morphine, i.e., maximal [³⁵S]GTPγS binding, and is expressed as the percentage increase over basal binding (%).

The data are expressed as the means ± SEM (n = 3 per group).

4.9 Legends to Figure

Figure 1

Nociceptive biphasic profile of intradermal (i.d.) formalin in different genotypes.

C57BL/6, *cnr1*WT, *cnr1*KO, *cnr2*WT and *cnr2*KO male mice were injected with 5.4% intradermal formalin (10 μ L) in the plantar surface of the left hind paw, and pain behaviors were recorded for 60 min. (A) In the early (0-9 min) (highlighted by a grey area) and late phase (21-60 min) of the formalin test, all genotypes present similar biphasic nociceptive behavioral profiles following formalin injection. (B) The A.U.C. analysis indicates that i.d. formalin injection produces a comparative nociceptive response within all genotypes in the early phase of the formalin test. (C) The A.U.C. analysis of the late phase also reveals that i.d. formalin injection produces a similar nociceptive profile within all genotypes in the late phase. The numbers in parentheses represent the number of animals per group. The data are expressed as the means \pm SEM.

Figure 2

Loss of antinociceptive effects of i.paw morphine in the *cnr1*KO mice.

(A) In the early (highlighted by a grey area) and late phases of the formalin test, the analgesic effects of i.paw morphine (1 μ g/10 μ L, 5 min prior formalin injection) are decreased in *cnr1*KO mice compared to *cnr1*WT mice (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) (two-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test). (B) The A.U.C. analysis of the early phase reveals a loss of the analgesic effectiveness of i.paw morphine (\blacktriangle $P < 0.001$ for *cnr1*KO vs. C57BL/6 mice; \pounds $P < 0.05$ for *cnr1*KO vs. *cnr1*WT mice). (C) The A.U.C. analysis of the late phase also reveals a loss of the analgesic effectiveness of i.paw morphine (Δ $P < 0.001$ for *cnr1*KO vs. C57BL/6 mice; \S $P < 0.001$ for *cnr1*KO vs. *cnr1*WT mice) (one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test). The horizontal dashed lines (panels B and C) represent the A.U.C of the C57BL/6 mice, which received NaCl 0.9% for reference purposes (*cf.* Fig. 1B and C). The numbers in

parentheses represent the number of animals per group. The data are expressed as the means \pm SEM.

Figure 3

Loss of antinociceptive effects of i.paw morphine in *cnr2KO* mice. (A) In the late phase of the formalin test, the analgesic effects of i.paw morphine (1 μ g/10 μ L, 5 min prior formalin injection) are decreased in *cnr2KO* mice compared to *cnr2WT* mice (** $P < 0.001$) (two-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test). (B) The A.U.C. analysis reveals that i.paw morphine preserves its analgesic effectiveness in the early phase of the formalin test. (C) The A.U.C. analysis of the late phase reveals a loss of analgesic effectiveness for i.paw morphine ($\diamond P < 0.001$ for *cnr2KO* vs. C57BL/6 mice (for reference purposes, the results presented for the C57BL/6 mice are the same as in Fig. 2); & $P < 0.01$ for *cnr2KO* vs. *cnr2WT* mice) (one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test). The horizontal dashed lines (panels B and C) represent the A.U.C of the C57BL/6 mice, which received NaCl 0.9% for reference purposes (*cf.* Fig. 1B and C). The numbers in parentheses represent the number of animals per group. The data are expressed as the means \pm SEM.

Figure 4

Contralateral i.paw morphine injection did not inhibit formalin-induced pain behavior.

(A) In the early and the late phases of the formalin test in C57BL/6 mice, ipsilateral i.paw morphine (1 μ g/10 μ L, 5 min prior formalin injection) produced a decrease in formalin-induced pain behaviors compared to contralateral i.paw morphine (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) (two-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test) (for analysis purpose, the results presented for i.paw saline and ipsilateral i.paw morphine were taken from Fig. 1-3). These data show that the antinociceptive effects of i.paw morphine were local rather than systemic. The A.U.C. analyses of the early and late phases of the formalin test

validate the absence of antinociceptive effects for contralateral i.paw morphine (Phase I; ▼ $P < 0.001$ vs. ipsilateral i.paw morphine; Phase II; ∂ $P < 0.001$ vs. ipsilateral i.paw morphine) (one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test). **(B)** In the early and late phases of the formalin test in the *cnr1*WT mice, ipsilateral i.paw morphine (1 µg/10 µL, 5 min prior formalin injection) produced a decrease in the formalin-induced pain behaviors compared to contralateral i.paw morphine (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) (two-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test). The A.U.C. analyses of the early and late phases of the formalin test validate the absence of antinociceptive effects for contralateral i.paw morphine (Phase I; □ $P < 0.05$ vs. ipsilateral i.paw morphine; Phase II; Ω $P < 0.001$ vs. ipsilateral i.paw morphine) (one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test). **(C)** In the early and the late phases of the formalin test in the *cnr2*WT mice, i.paw morphine (1 µg/10 µL, 5 min prior formalin injection) produced a decrease in formalin-induced pain behaviors compared to contralateral i.paw morphine (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) (two-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test). The A.U.C. analyses of the early and late phases of the formalin test validate the absence of antinociceptive effects for contralateral i.paw morphine (Phase I; Σ $P < 0.05$ vs. ipsilateral i.paw morphine; Phase II; β $P < 0.001$ vs. ipsilateral i.paw morphine) (one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test). The numbers in parentheses represent the number of animals per group. The data are expressed as the means ± SEM.

Figure 5

Loss of antinociceptive effects of i.t. morphine in *cnr1*KO mice. **(A)** In the early and late phases of the formalin test, the analgesic effects of i.t. morphine (0.1 µg/5 µL, 5 min prior formalin injection) are decreased in *cnr1*KO mice compared to *cnr1*WT mice (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) (two-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test). **(B)** The A.U.C. analysis of the early phase reveals a loss of the analgesic effectiveness of i.t. morphine (€ $P < 0.01$ for *cnr1*KO vs. C57BL/6 mice; † $P < 0.05$ for *cnr1*KO vs. *cnr1*WT mice). **(C)** The A.U.C.

analysis of the late phase also reveals a loss of the analgesic effectiveness of i.t. morphine ($\neq P < 0.001$ for *cnr1KO* vs. C57BL/6 mice; $\infty P < 0.001$ for *cnr1KO* vs. *cnr1WT* mice) (one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test). The numbers in parentheses represent the number of animals per group. The data are expressed as the means \pm SEM.

Figure 6

Loss of antinociceptive effects of i.t. morphine in *cnr2KO* mice. (A) In the late phase of the formalin test, the analgesic effects of i.t. morphine (0.1 μ g/5 μ L, 5 min prior formalin injection) are decreased in *cnr2KO* mice compared to *cnr2WT* mice (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) (two-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test). (B) The A.U.C. analysis indicates that i.t. morphine preserves its analgesic effectiveness in the early phase of the formalin test. (C) The A.U.C. analysis of the late phase reveals a loss of analgesic effectiveness for i.t. morphine in the late phase (# $P < 0.001$ for *cnr2KO* vs. C57BL/6 mice (for reference purposes, the results presented for C57BL/6 mice are the same as in Fig. 5); $\hat{=}$ $P < 0.001$ for *cnr2KO* vs. *cnr2WT* mice) (one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test). The numbers in parentheses represent the number of animals per group. The data are expressed as the means \pm SEM.

Figure 7

Antinociceptive effects of s.c. morphine are maintained in the mouse formalin test. All three genotypes (C57BL/6, *cnr1KO* and *cnr2KO*) present similar biphasic nociceptive behavioral profiles following morphine 3 mg/kg s.c. injection (10 min prior formalin injection). (A) In the late phase of the formalin test, the analgesic effects of s.c. morphine are preserved in *cnr1KO* and *cnr2KO* mice. (B) The A.U.C. analysis indicates that s.c. morphine preserves its analgesic effectiveness in the early phase of the formalin test. (C) The A.U.C. analysis of the late phase also reveals that s.c. morphine preserves its analgesic

properties. The numbers in parentheses represent the number of animals per group. The data are expressed as the means \pm SEM.

Figure 8

Antinociceptive effects of s.c. morphine are maintained in the mice tail-flick test. Tail-flick latencies (s) to noxious heat (tail immersion in water at 52°C) were recorded every 10 min (from 0 to 60 min) following the s.c. injection of morphine 1, 3 and 10 mg/kg in C57BL/6, *cnr1*WT, *cnr1*KO, *cnr2*WT and *cnr2*KO male mice. (A, B, C) Morphine at 1, 3 and 10 mg/kg produced significant time-dependent antinociception with no difference between genotypes. (D) The %MPE of s.c. morphine at 20 min (peak antinociceptive effects) was calculated for each dose tested. There were no significant differences between genotypes compared to C57BL/6 for each dose tested; thus, genotype did not modify the antinociceptive effects of morphine (one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test). The numbers in parentheses represent the number of animals per group. The data are expressed as the means \pm SEM.

Figure 9

Deletion of the CB₁ or CB₂ receptors has no effect on the expression of MOP in the spinal cord. Immunofluorescence of spinal MOP revealed that the expression of MOP in laminae I and II of the dorsal horn of the spinal cord did not differ between *cnr1*WT (A) and *cnr1*KO (B) mice or between *cnr2*WT (C) and *cnr2*KO mice (D).

Figure 1

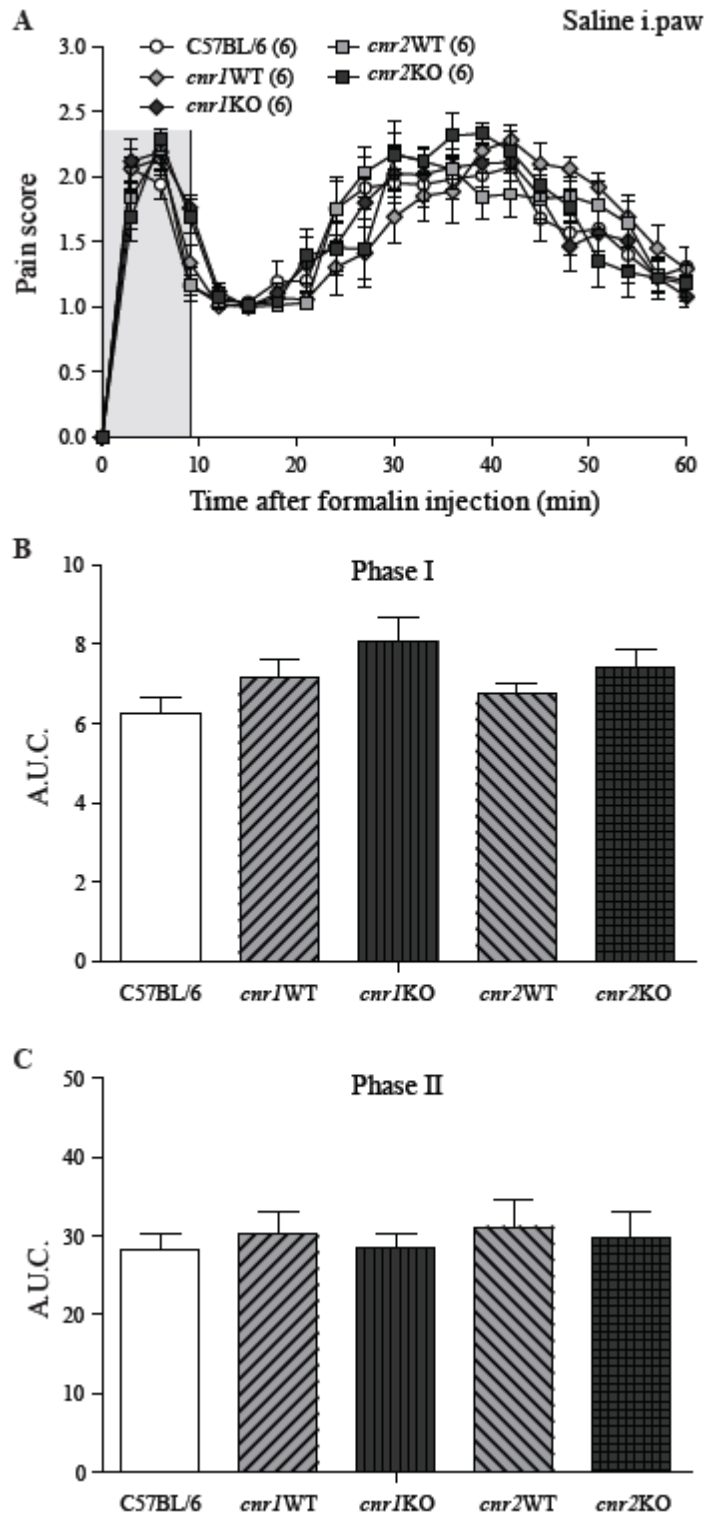


Figure 2

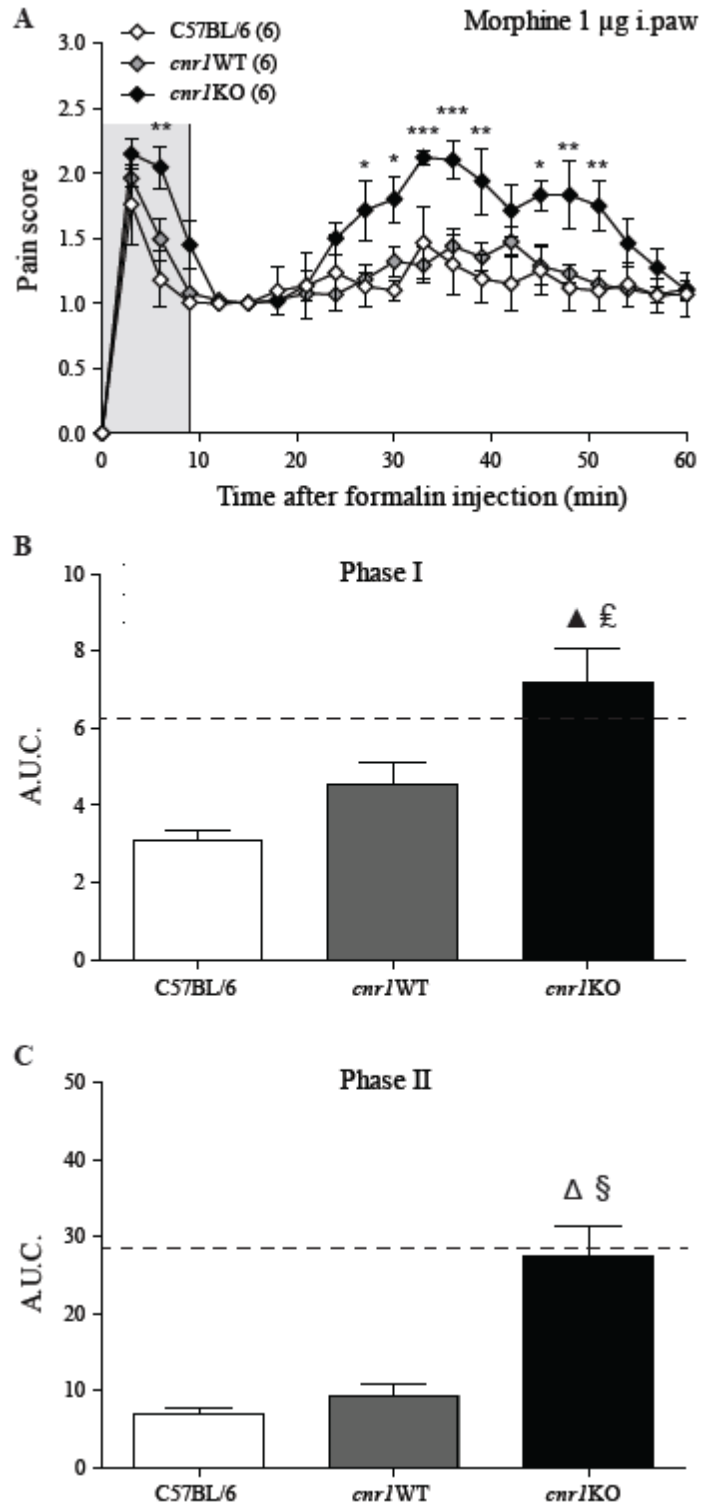


Figure 3

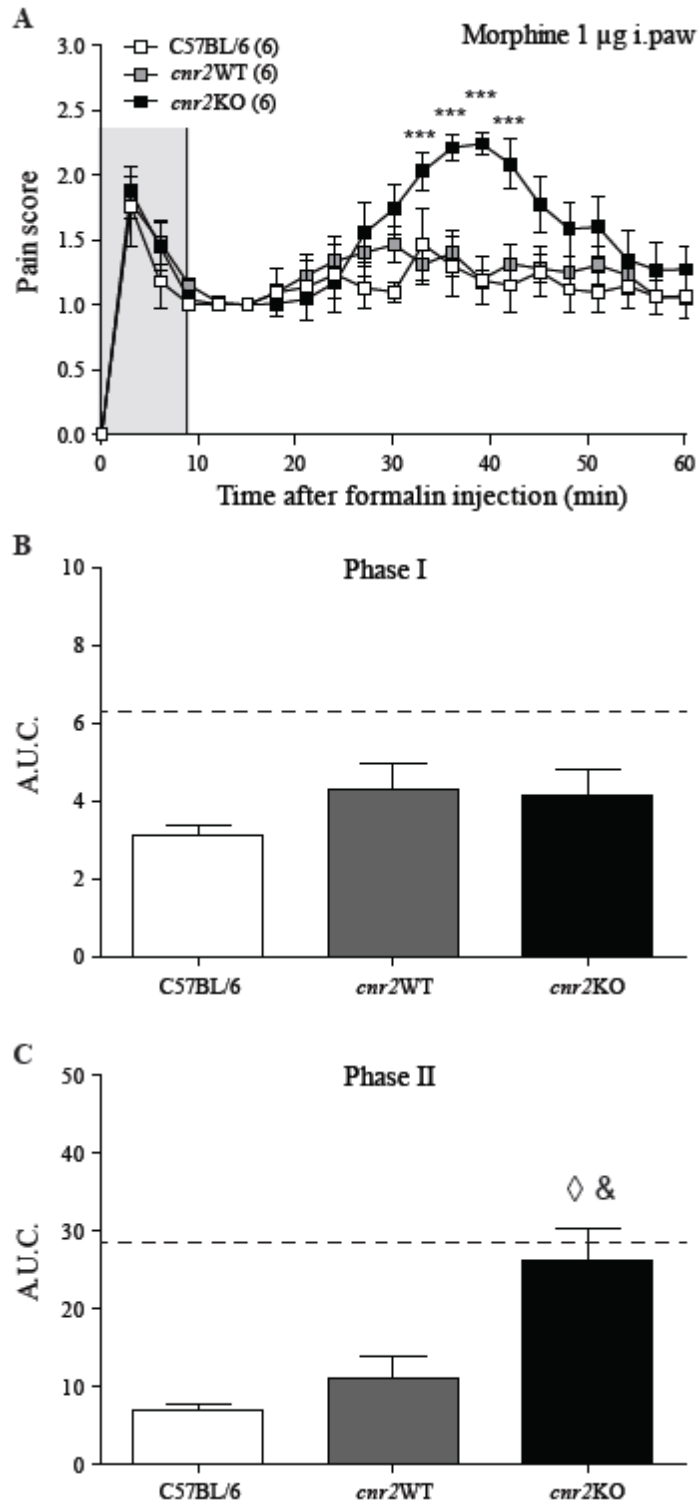


Figure 4

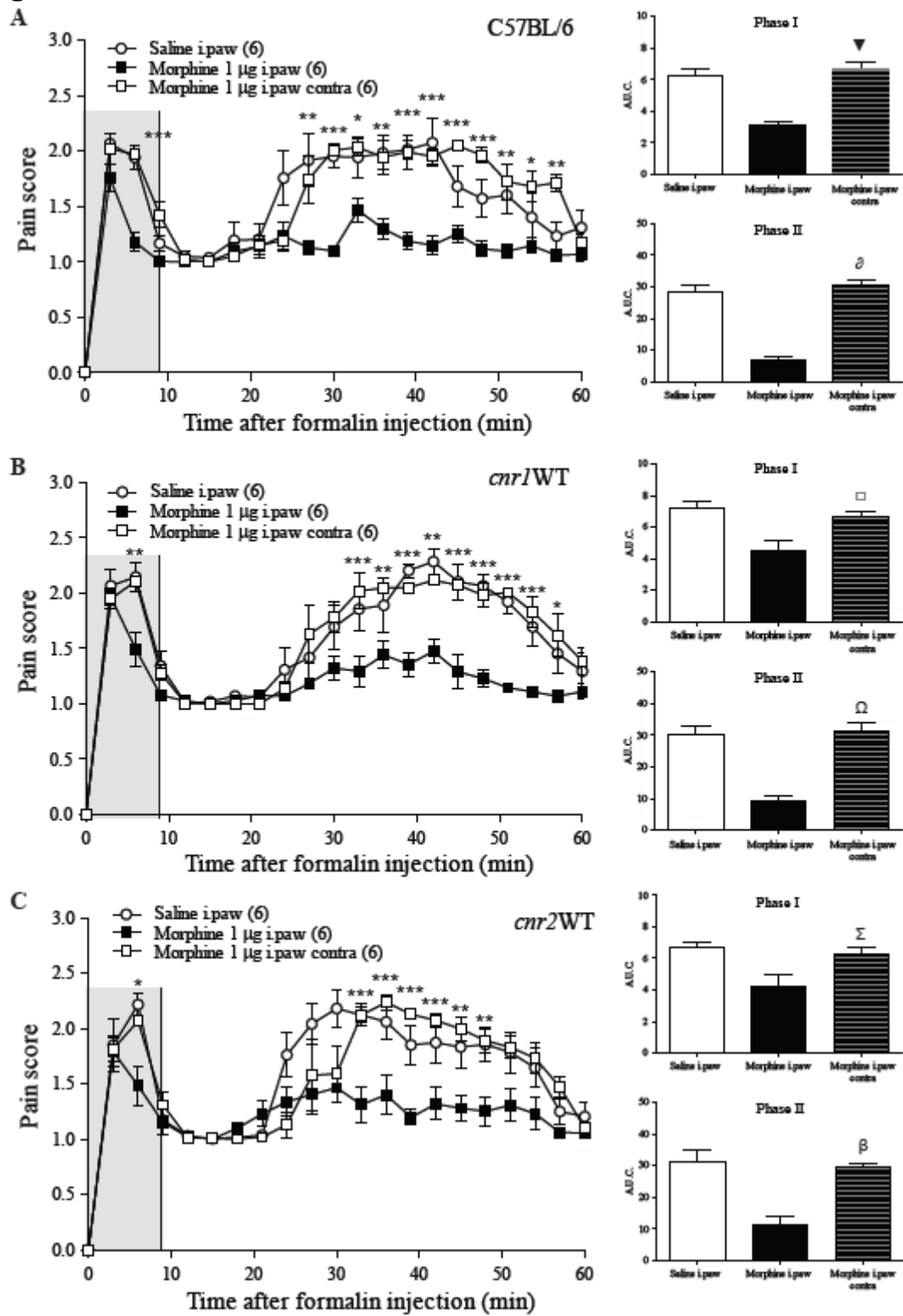


Figure 5

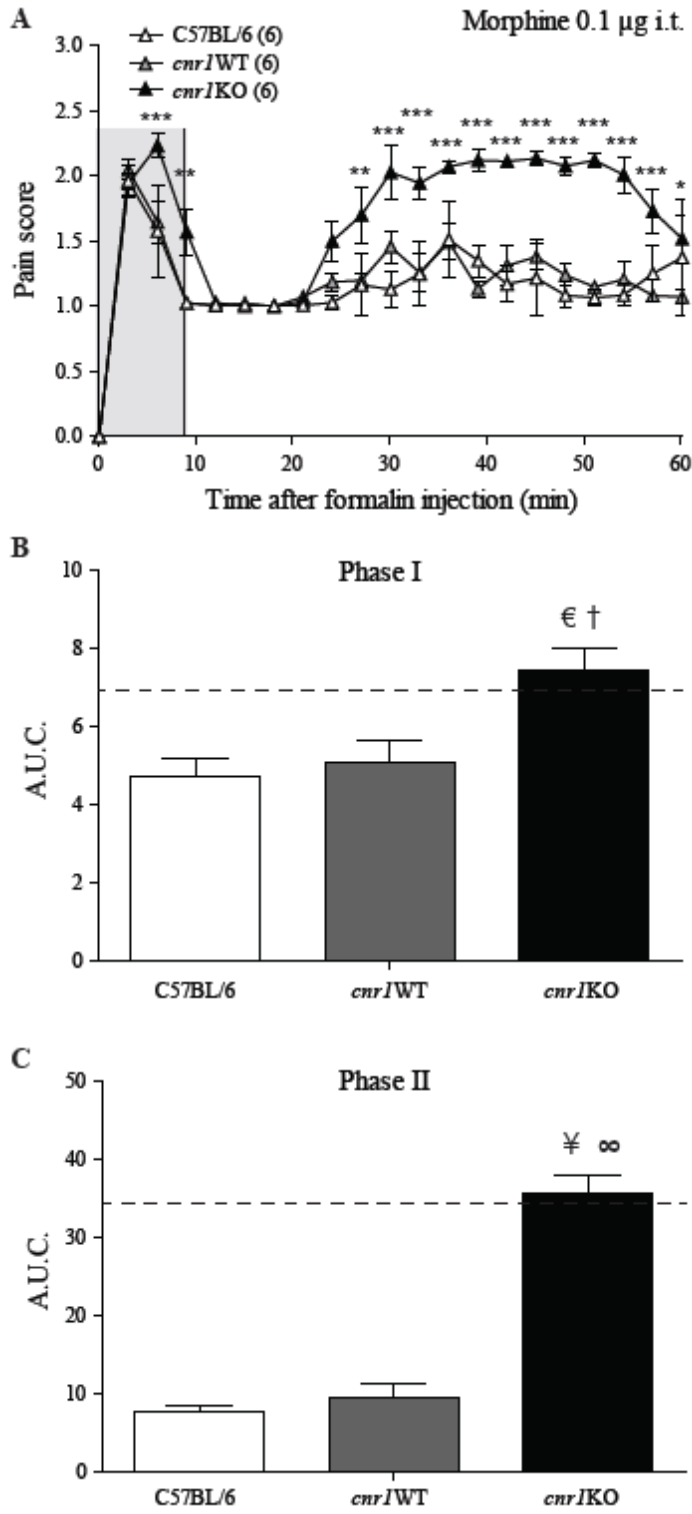


Figure 6

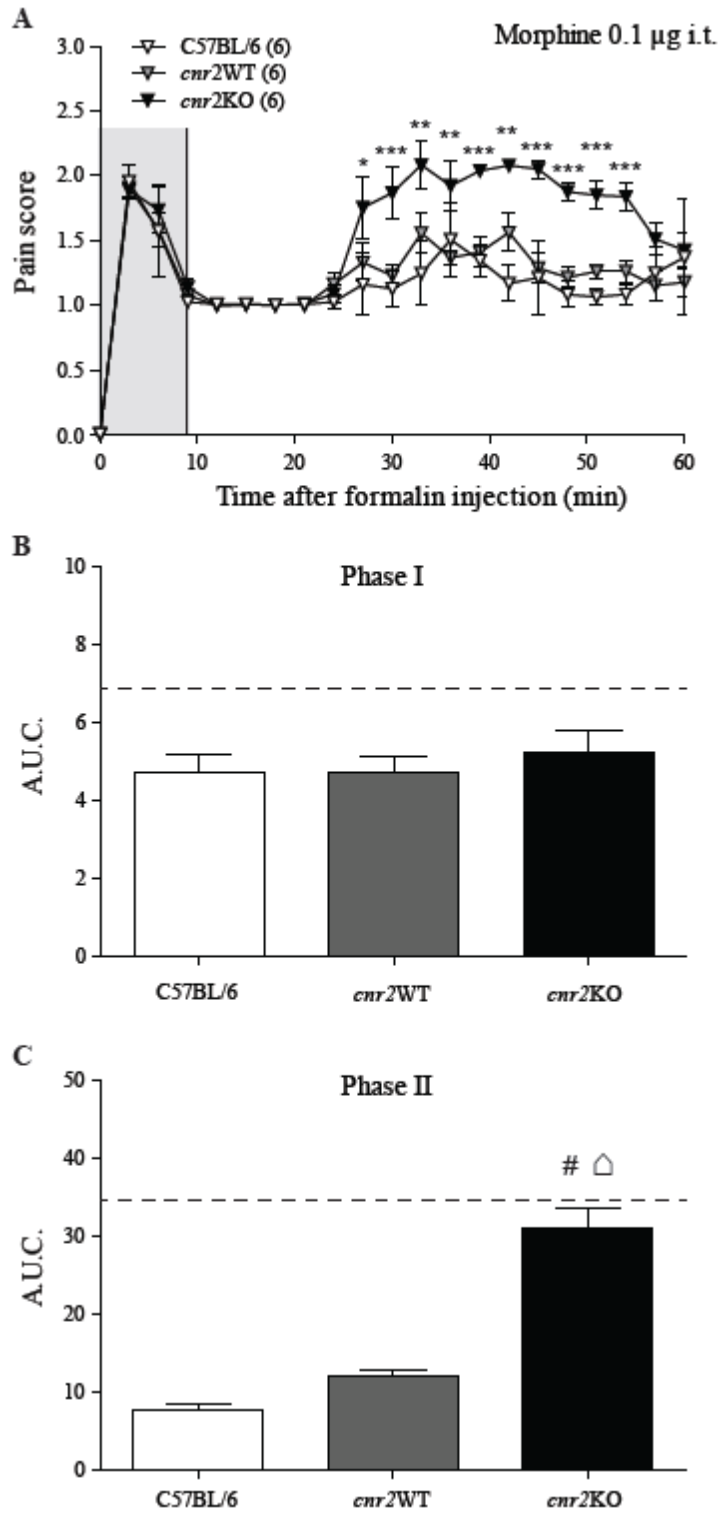


Figure 7

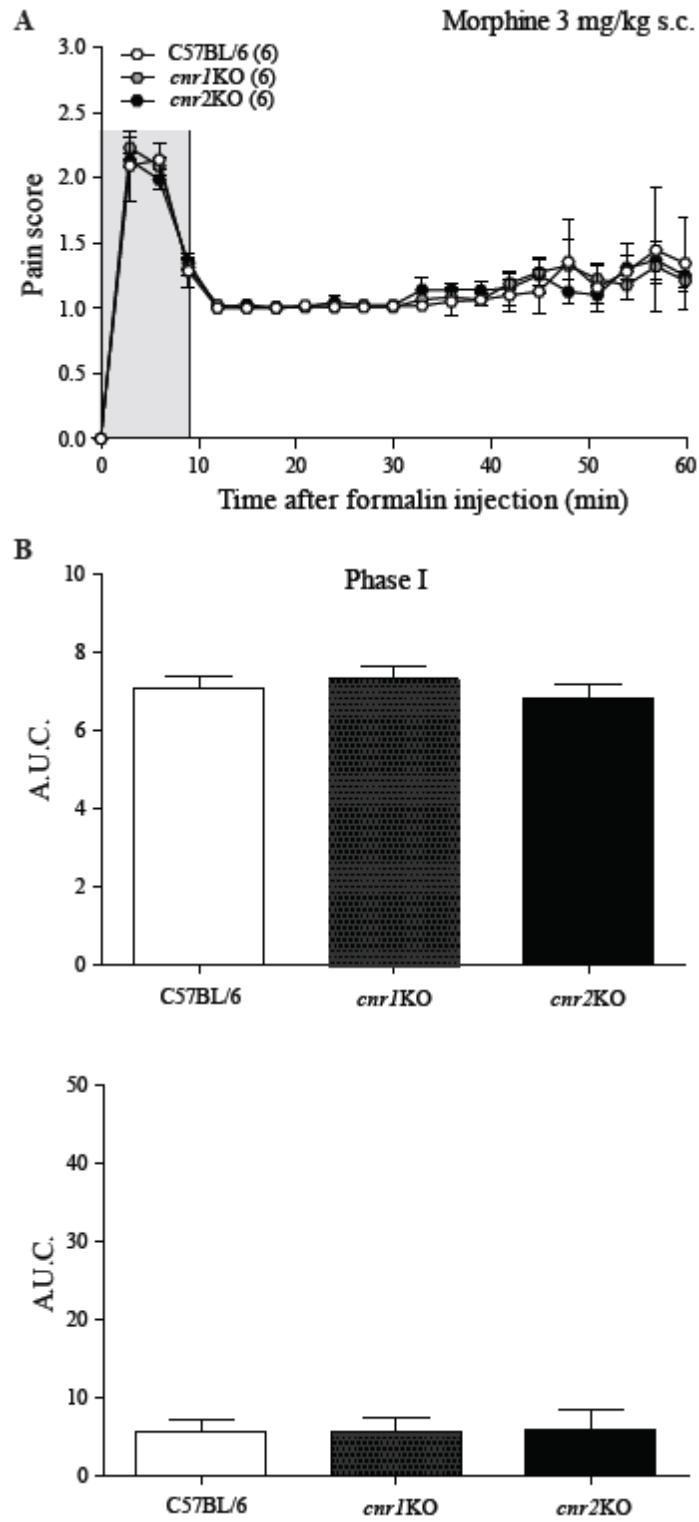


Figure 8

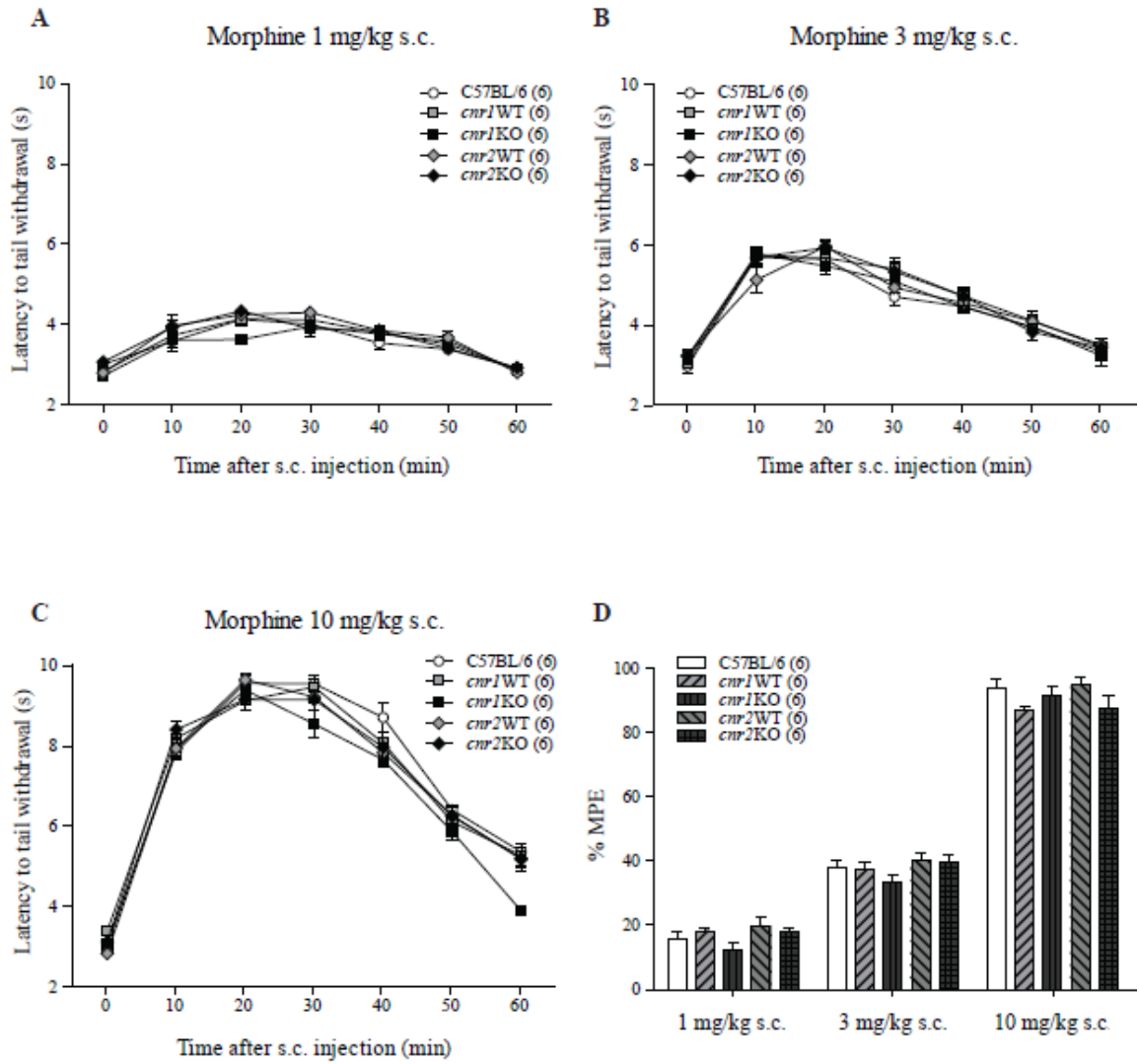
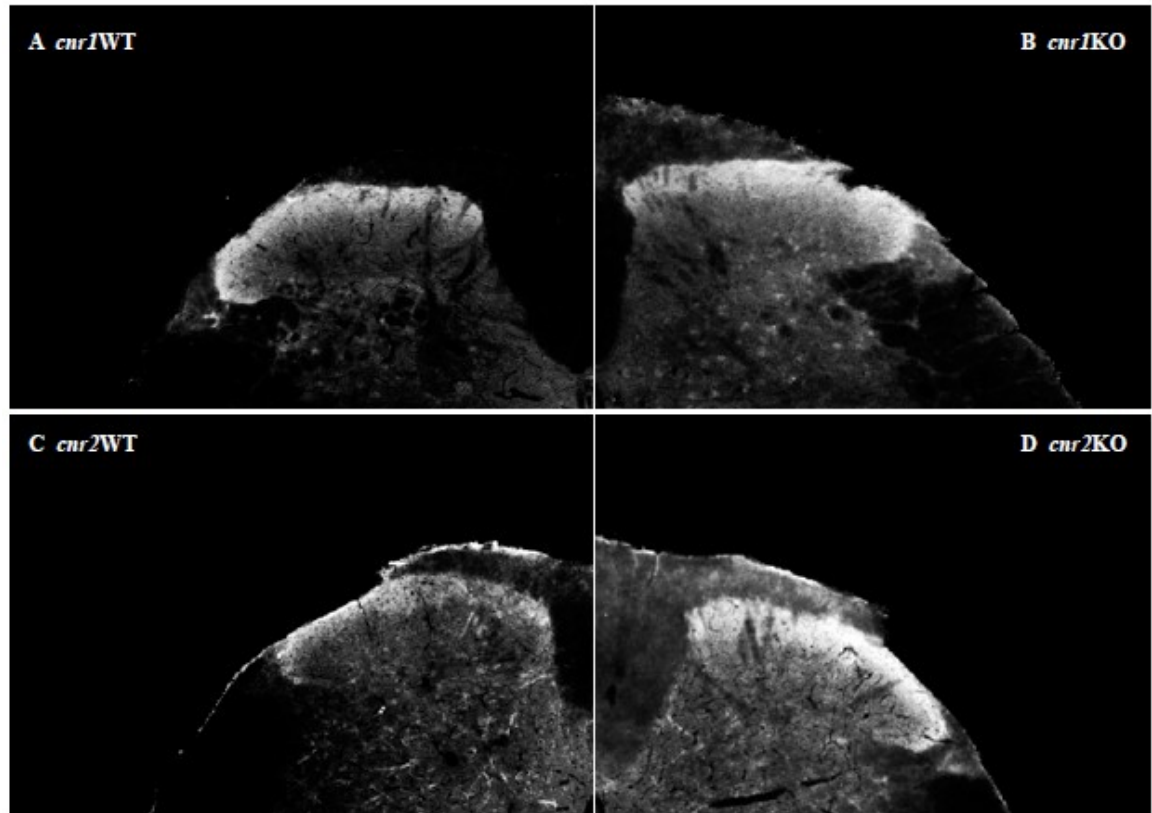


Figure 9



Section VIII. Discussion

L'objectif général de cette thèse était d'approfondir les connaissances actuelles quant au rôle et à l'implication du système cannabinoïde dans la modulation périphérique de la douleur inflammatoire et neuropathique. La première partie de la discussion vise à évaluer si la modulation périphérique du système endocannabinoïde peut représenter une cible thérapeutique intéressante dans un modèle de douleur inflammatoire (Article 1). Par la suite, la deuxième partie de la discussion se concentre sur l'évaluation de la modulation périphérique du système endocannabinoïde en tant que cible thérapeutique dans un modèle de douleur neuropathique (Articles 2 & 3) alors que la dernière partie porte sur les interactions entre les systèmes opioïde et cannabinoïde à différents niveaux du névraxe pour contrôler la douleur (Article 4).

1 RÔLE DU SYSTÈME ENDOCANNABINOÏDE DANS LA MODULATION PÉRIPHÉRIQUE DE LA DOULEUR INFLAMMATOIRE

Tout d'abord, il faut souligner que, comme nous avons vu dans la section III de l'introduction, les cannabinoïdes peuvent moduler la transmission de la douleur au niveau central et spinal, par l'intermédiaire de nombreux mécanismes d'action. Par exemple, des composés cannabinoïdes administrés par voie systémique à des doses sous le seuil d'efficacité thérapeutique (inactives) ont diminué l'allodynie et l'hyperalgésie induites par l'injection locale de carraghénine, et ont supprimé l'expression de la protéine *Fos* induite par la carraghénine dans la corne dorsale de la moelle épinière chez le rat (Nackley et coll., 2003). Il faut donc être conscient que les effets antinociceptifs périphériques présentés dans les études incluses dans cette thèse doivent être contrebalancés par les nombreuses études démontrant les propriétés thérapeutiques des cannabinoïdes administrés par voie centrale et spinale (pour une revue de la littérature voir (Walker & Huang, 2002; Hohmann

et coll., 2005; Lever & Rice, 2007); les cannabinoïdes ne modulent donc pas leurs propriétés analgésiques uniquement au niveau périphérique.

Les cannabinoïdes produisent des effets antinociceptifs au niveau périphérique dans divers modèles animaux de douleur (Hohmann, 2002; Guindon & Hohmann, 2008a; Anand et coll., 2009; Kress & Kuner, 2009) pour une revue de la littérature). Cette approche est très pertinente, puisqu'elle permet aux cannabinoïdes d'agir localement et elle prévient les effets psychotropes indésirables liés à leur administration systémique (Malan et coll., 2003).

Dans cette première partie, il est question de la modulation locale du système endocannabinoïde par l'inhibition de l'enzyme MAGL, enzyme de dégradation principale du 2-AG. Nous avons démontré que l'administration locale d'un endocannabinoïde (2-AG) et d'un inhibiteur de la MAGL (URB602) produisent des effets antinociceptifs, et même additifs lors de leur injection simultanée dans un modèle de douleur inflammatoire chez le rat. Dans ce contexte, les effets antinociceptifs locaux du 2-AG sont produits par l'intermédiaire des récepteurs CB₂, alors que ceux de l'URB602 et de la combinaison 2-AG + URB602 impliquent les récepteurs CB₁ et CB₂. Les disparités entre les mécanismes d'action qui sous-tendent les effets antinociceptifs du 2-AG et de l'URB602 seront abordées dans cette section de la discussion (Article 1) ainsi que dans la prochaine section (Articles 2 & 3).

1.1 Effets antinociceptifs périphériques du 2-AG

Dans cette première étude, des effets antinociceptifs dépendants de la dose sont démontrés suite à l'administration périphérique du 2-AG dans le test à la formaline (Article 1). Ces effets sont produits localement et non au niveau systémique puisque l'administration de doses supérieures à sa dose efficace 50 du côté controlatéral (côté opposé à l'injection de la formaline) n'entraîne pas d'effets antinociceptifs. Dans ce

contexte inflammatoire, les effets antinociceptifs locaux du 2-AG sont produits par l'intermédiaire des récepteurs CB₂.

L'activation des récepteurs cannabinoïdes CB₁ supprime la transmission nociceptive et les comportements douloureux dans divers modèles animaux (pour revue, voir (Walker & Hohmann, 2005)). Néanmoins, des effets psychotropes indésirables accompagnent généralement l'activation directe de ces récepteurs au niveau central, ce qui augmente l'intérêt de cibler les récepteurs cannabinoïdes localisés en périphérie pour diminuer les comportements douloureux. Précédemment, notre laboratoire a d'ailleurs démontré que le fait de cibler les récepteurs cannabinoïdes en périphérie s'avérait être une avenue très prometteuse. Il a été démontré que l'injection locale d'anandamide ainsi que d'ibuprofène et de rofécoxib, des AINS qui inhibent également la FAAH, produit des effets analgésiques dépendants de la dose dans le test à la formaline (Guindon et coll., 2006a; Guindon et coll., 2006b). Les effets antinociceptifs induits par l'injection locale d'anandamide dans ce contexte inflammatoire impliquaient l'activation des récepteurs CB₁, en accord avec des études précédentes (Calignano et coll., 1998; Richardson et coll., 1998c). Par contre, le rôle du 2-AG administré de façon locale dans un contexte de douleur inflammatoire n'avait pas encore été évalué. De ce fait, nous avons démontré que le 2-AG pouvait produire des effets antinociceptifs périphériques, et ce *via* les récepteurs CB₂.

Les récepteurs CB₂ sont impliqués dans les effets antinociceptifs produits dans des modèles de douleurs aiguë et inflammatoire (Hanus et coll., 1999; Clayton et coll., 2002; Quartilho et coll., 2003; Hohmann et coll., 2004; Ibrahim et coll., 2006; Vincenzi et coll., 2013). Ils représentent une cible thérapeutique potentielle puisqu'ils sont considérés comme étant les récepteurs cannabinoïdes «périphériques» (Munro et coll., 1993; Griffin et coll., 1997; Zimmer et coll., 1999; Buckley et coll., 2000). Leur activation ne produit généralement pas les effets indésirables retrouvés chez l'animal (hypoactivité, hypothermie et catalepsie), causés par l'activation des récepteurs cannabinoïdes du système nerveux central (Hanus et coll., 1999; Malan et coll., 2001; Vincenzi et coll.,

2013). Cependant, alors que les récepteurs CB₂ semblaient restreints à la périphérie, des études récentes montrent néanmoins qu'ils sont également exprimés dans le système nerveux central (Van Sickle et coll., 2005; Wotherspoon et coll., 2005; Ashton et coll., 2006; Beltramo et coll., 2006). Il est donc souhaitable d'adopter une approche circonspecte et de cibler les récepteurs CB₂ en périphérie *via* une administration locale. Il a d'ailleurs été montré que l'administration locale d'AM1241, un agoniste sélectif pour les récepteurs CB₂, atténue la nociception (Malan et coll., 2001) ainsi que l'hyperalgésie thermique (Nackley et coll., 2003; Quartilho et coll., 2003), pour une revue de la littérature voir (Guindon & Hohmann, 2008a; Atwood et coll., 2012b).

Dans notre étude, le 2-AG a produit des effets antinociceptifs dépendants de la dose impliquant les récepteurs CB₂ (Article 1). D'autres études suggèrent également que le 2-AG agit comme un agoniste spécifique des récepteurs CB₂ (Gonsiorek et coll., 2000; Sugiura et coll., 2000; Maresz et coll., 2005). Ainsi, lors de son administration intraplantaire, cet endocannabinoïde pourrait activer directement des récepteurs CB₂ exprimés localement afin d'induire ses effets antinociceptifs par l'intermédiaire d'une action directe sur la libération de neurotransmetteurs excitateurs. Dans les tissus périphériques, les récepteurs CB₂ sont notamment localisés dans les ganglions de la racine dorsale, la moelle épinière et les neurones sensitifs (Galiegue et coll., 1995; Griffin et coll., 1997). Ils sont également retrouvés sur les terminaisons périphériques des neurones afférents primaires (Malan et coll., 2002) ainsi que sur les terminaisons nerveuses périphériques (Griffin et coll., 1997; Pertwee, 1999). Une étude plus récente a permis de localiser plus précisément des récepteurs CB₂ sur les neurones de petit diamètre dans des ganglions de la racine dorsale humains (Anand et coll., 2008). De plus, les récepteurs CB₂ ont été identifiés dans les tissus de la patte de souris et de rats (Walczak et coll., 2005, 2006) et le 2-AG est présent dans les tissus périphériques (Beaulieu et coll., 2000). Ainsi, on peut supposer que les effets antinociceptifs locaux du 2-AG observés dans cette étude sont produits par une activation directe des récepteurs CB₂ en périphérie.

Plusieurs études sont en faveur de ce mécanisme d'action. Il a été récemment démontré qu'un agoniste sélectif pour les récepteurs CB₂, le MT178, permet de réduire la libération de [³H]-D-aspartate dans les ganglions de la racine dorsale, suggérant qu'un des mécanismes d'action impliqués dans l'activation des récepteurs CB₂ passe par l'inhibition de la libération de glutamate (Vincenzi et coll., 2013). Cette même étude a également démontré que le MT178 pouvait également inhiber la libération de substance P induite par la capsaïcine ainsi que l'activation de la voie de signalisation NF-κB. Une autre étude a démontré que l'administration locale ou systémique d'AM1241, un agoniste sélectif pour les récepteurs CB₂, permet de réduire l'activité des neurones à large gamme réceptive de la moelle épinière en réponse à un stimulus douloureux (Nackley et coll., 2004). Ces auteurs ont proposé que cet effet était probablement induit *via* une activation directe des récepteurs CB₂ sur l'activité des fibres C (Nackley et coll., 2004). D'autres études corroborent cette hypothèse suggérant que les effets induits par l'activation des récepteurs CB₂ impliquent une action directe sur les fibres afférentes primaires, par opposition à une action indirecte suite à l'activation du système immunitaire (Elmes et coll., 2004). Par ailleurs, l'AM1241 et le L768242 (agonistes CB₂) peuvent aussi diminuer la libération de CGRP induite par la capsaïcine à partir de tranches de neurones de la moelle épinière, ce qui peut être bloqué par un antagoniste CB₂ (Beltramo et coll., 2006).

Un autre mécanisme suggère que l'activation des récepteurs CB₂ en périphérie peut inhiber la sensibilisation des neurones afférents primaires *via* une libération de ligands opioïdes endogènes. En effet, il a été démontré que l'activation des récepteurs CB₂ par l'AM1241 (agoniste CB₂) stimulait la libération de β-endorphines provenant des kératinocytes qui agissent localement sur les récepteurs opioïdes MOP afin d'inhiber la douleur (Ibrahim et coll., 2005). Le marquage immunologique a démontré la présence de récepteurs CB₂ et de β-endorphines dans les kératinocytes situés dans la couche granuleuse de l'épiderme de la patte (Ibrahim et coll., 2005). Les voies de signalisation intracellulaires reliant l'activation des récepteurs CB₂ à la synthèse de β-endorphines demeurent inexplicées. Ce mécanisme d'action semble même être uniquement associé à

l'AM1241 puisque d'autres agonistes sélectifs pour les récepteurs CB₂ ont montré des effets antinociceptifs indépendants des récepteurs opioïdes MOP (Whiteside et coll., 2005; Anand et coll., 2008; Yao et coll., 2008; Yao et coll., 2009).

Les récepteurs CB₂ sont fort probablement impliqués dans les réponses inflammatoires en raison de leur forte expression dans les cellules immunitaires telles que les lymphocytes B, les macrophages, les mastocytes, les cellules tueuses NK, les cellules microgliales et, dans une moindre mesure, les monocytes et les neutrophiles polynucléaires (Facci et coll., 1995; Galiegue et coll., 1995; Schatz et coll., 1997; Maresz et coll., 2005). En outre, il existe également des études montrant que la présence de l'ARNm des récepteurs CB₂ dans les cellules inflammatoires et immunitaires est 10 à 100 fois supérieure à celle des récepteurs CB₁ (Facci et coll., 1995; Galiegue et coll., 1995). Des études ont d'ailleurs suggéré que l'activation des récepteurs CB₂ sur des cellules non neuronales inhibe la libération de médiateurs pro-inflammatoires qui sensibilisent les nocicepteurs (Facci et coll., 1995; Mazzari et coll., 1996). Ainsi, on peut supposer que les effets antinociceptifs locaux du 2-AG observés dans cette étude soient produits par une activation directe de récepteurs CB₂ localisés sur ces cellules immunitaires ; une diminution de la libération de médiateurs pro-inflammatoires pourrait ainsi participer aux effets antinociceptifs produits en réduisant la sensibilité des neurones afférents primaires (Malan et coll., 2002). En accord avec cette hypothèse, des études ont rapporté que les cannabinoïdes peuvent réduire la production et la libération de molécules pro-inflammatoires telles que le TNF α , le NO et l'IL-1 et même potentialiser la libération de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 et l'IL-10 (Walter & Stella, 2004). Il a même été avancé que les récepteurs CB₂ non neuronaux pourraient contribuer aux effets plus prononcés des agonistes CB₂-sélectifs dans les tissus enflammés par rapport aux tissus non enflammés (Nackley et coll., 2004). Il convient de souligner cependant que quelques études ont décrit des effets pro-inflammatoires des cannabinoïdes (Smith et coll., 2000; Sacerdote et coll., 2005), appuyant leur rôle de neuromodulateurs pouvant agir de façon spécifique (pro- ou anti-inflammatoires) dans certains tissus. À la lumière des études

précédentes et de cette étude (Article 1), il est évident qu'il est encore difficile de déterminer quels sont les mécanismes d'action exacts impliqués dans les effets antinociceptifs induits par l'activation des récepteurs CB₂.

Les données actuelles démontrent néanmoins que les effets antinociceptifs produits par le 2-AG et d'autres endocannabinoïdes ne peuvent pas être expliqués uniquement par une action exclusive *via* les récepteurs CB₁ et CB₂ (Begg et coll., 2005; Ryberg et coll., 2007; De Petrocellis & Di Marzo, 2010). Ces effets impliqueraient vraisemblablement d'autres voies de signalisation ainsi qu'une interaction avec d'autres récepteurs, tels que les récepteurs GPR55, PPARs et TRPV1 (voir Introduction, Section I, 2.8).

Dans notre première étude (Article 1), le 2-AG, administré localement dans la patte arrière des rats, inhibe les comportements douloureux suite à l'injection intraplantaire de formaline pendant les deux phases du test. Le 2-AG pourrait induire des effets antinociceptifs périphériques *via* l'inhibition spécifique de la sensibilisation des fibres afférentes primaires causée par la formaline ou *via* la suppression de la sensibilisation subséquente du système nerveux central. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires afin de démontrer que le 2-AG endogène, en conditions physiologiques, peut être mobilisé en périphérie afin de moduler la douleur inflammatoire.

1.2 Effets antinociceptifs périphériques induits par la modulation du système endocannabinoïde

Afin de moduler localement les concentrations de 2-AG endogène et de pouvoir comparer ces effets antinociceptifs avec ceux du 2-AG exogène, nous avons utilisé l'URB602, un inhibiteur sélectif pour la MAGL (Hohmann et coll., 2005). Nos travaux suggèrent pour la première fois qu'un inhibiteur de la MAGL possède un potentiel thérapeutique prometteur pour le traitement de la douleur inflammatoire. Nous avons démontré que l'URB602 produit des effets antinociceptifs dépendants de la dose suite à

son administration au niveau périphérique dans le test à la formaline (Article 1). Ces effets sont produits localement et non au niveau systémique, et ne sont pas secondaires à une suppression de l'œdème causée par l'injection de formaline. Dans ce contexte inflammatoire, les effets antinociceptifs locaux de l'URB602 impliquent la participation des récepteurs CB₁ et CB₂.

Une limitation importante des études évaluant les effets antinociceptifs des endocannabinoïdes administrés de façon exogène est leur incapacité à démontrer que leurs homologues au niveau endogène produisent des effets similaires à des doses équivalentes, et dans des conditions similaires (Hohmann, 2007). De ce fait, les inhibiteurs des enzymes de dégradation des endocannabinoïdes, par exemple l'URB602, représentent des outils thérapeutiques intéressants pour augmenter localement les niveaux d'endocannabinoïdes dans les sites où ces composés sont mobilisés et dégradés, et ce dans des conditions physiologiques précises (Hohmann, 2007). Cette stratégie offre ainsi une chance unique d'améliorer la compréhension actuelle des rôles fonctionnels des endocannabinoïdes dans la modulation de la douleur dans différentes conditions physiologiques et pathologiques, telles que dans un contexte inflammatoire dans ce cas précis (Article 1).

La MAGL est la principale enzyme de dégradation du 2-AG, contrôlant la plasticité synaptique induite par ce dernier (Szabo et coll., 2006; Hashimoto et coll., 2007; Schlosburg et coll., 2010; Pan et coll., 2011). D'autres enzymes cataboliques sont néanmoins impliquées dans la dégradation du 2-AG, telles que la FAAH (Di Marzo et coll., 1998; Goparaju et coll., 1998; Lang et coll., 1999). Des études récentes ont également noté l'implication de deux sérines hydrolases localisées au niveau postsynaptique, nommées ABHD6 (Marrs et coll., 2010) et ABHD12 (Blankman et coll., 2007), qui catalysent une petite fraction du 2-AG en acide arachidonique et en glycérol (voir (Savinainen et coll., 2012) pour une revue récente). Récemment, des souris MAGLKO ont été générées et elles ont confirmé le rôle primordial joué par la MAGL dans la régulation de la signalisation du 2-AG *in vivo* (Schlosburg et coll., 2010).

L'URB602 est le premier inhibiteur non-compétitif de la MAGL à avoir été développé (Hohmann et coll., 2005). Ce nouvel outil était très intéressant puisqu'il nous permettait de moduler les concentrations de 2-AG au niveau local. Nous avons donc voulu évaluer son potentiel dans un modèle de douleur inflammatoire chez le rat. Parallèlement, une autre étude a également examiné ses effets antinociceptifs suite à son administration systémique dans un test inflammatoire à la carraghénine chez la souris (Comelli et coll., 2007). Ces auteurs ont montré que les effets induits par l'URB602 impliquaient exclusivement les récepteurs CB₂ (Comelli et coll., 2007), alors que dans notre étude les deux récepteurs participaient aux effets antinociceptifs périphériques de l'URB602 (Article 1). Il est difficile de comparer ces deux études et d'émettre des hypothèses précises pour expliquer cette disparité puisque malgré le fait que les deux études utilisent le même inhibiteur, presque tous les autres paramètres sont différents : voie d'administration, modèle de douleur inflammatoire, espèce de rongeurs étudiée et antagonistes des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂.

Parallèlement à la publication de cet article, des études ont remis en question la sélectivité de l'URB602 pour la MAGL (Muccioli et coll., 2007; Vandevorde et coll., 2007). Dans leurs études *in vitro*, l'URB602 était aussi efficace pour inhiber la MAGL que la FAAH. Ces auteurs ont conclu que cet inhibiteur réversible ne pouvait pas être administré au niveau systémique en tant que composé sélectif pour la MAGL. Néanmoins, une autre étude a clairement montré que l'URB602 inhibe, bien que faiblement, la MAGL et bloque de façon sélective l'hydrolyse du 2-AG dans des tranches de cerveau (King et coll., 2007). Il est donc prudent à ce stade de qualifier cet inhibiteur de «préférentiel» plutôt que de «sélectif» pour la MAGL.

Dans notre étude, la sélectivité de l'inhibition de la MAGL par l'URB602 aux concentrations utilisées ne peut pas être déterminée sans mesurer au préalable les niveaux d'endocannabinoïdes présents dans les tissus périphériques suite aux différents traitements pharmacologiques. Ainsi, étant donné que la sélectivité de l'URB602 a été questionnée, il est possible que dans nos conditions expérimentales l'URB602 ait

également inhibé la FAAH. Cette possibilité suggère que l'URB602 peut avoir augmenté les concentrations locales d'autres endocannabinoïdes tels que l'anandamide, mais également celles de l'oléoyéthanolamide et du palmitoylethanolamide. Cette possibilité doit être considérée puisque dans notre étude on observe des différences dans les mécanismes par lesquels le 2-AG (CB₂) et l'URB602 (CB₁/CB₂) produisent leurs effets antinociceptifs. On ne peut donc pas exclure la possibilité d'effets «hors cibles» de l'URB602 et par conséquent l'activation possible d'autres récepteurs tels que les récepteurs GPR55, TRPV1 et PPAR α . Il aurait donc été souhaitable de mesurer les concentrations locales de ces endocannabinoïdes suite à l'injection d'URB602 au niveau local dans un contexte de douleur inflammatoire afin de s'assurer que les effets antinociceptifs présents sont entièrement imputables à une augmentation exclusive du 2-AG.

Néanmoins, les résultats de quelques études jouent en notre faveur car elles ont démontré que des injections d'URB602 dans certaines zones spécifiques du cerveau ont provoqué une augmentation des niveaux de 2-AG sans modifier ceux de l'anandamide *in vivo* (Hohmann et coll., 2005), *in vitro* (King et coll., 2007) et tout récemment dans des études de microdialyse *in vivo* (Wiskerke et coll., 2012). De plus, une étude récente a confirmé que l'injection périphérique d'URB602 dans le test à la formaline augmente les niveaux de 2-AG dans la patte arrière des animaux, sans changer ceux de l'anandamide (Guindon et coll., 2011). Ces études valident donc l'utilisation de l'URB602 comme un inhibiteur sélectif, bien que peu puissant, pour étudier les conséquences reliées à l'inhibition de l'hydrolyse du 2-AG *in vivo*.

Plus récemment, de nouveaux inhibiteurs sélectifs pour la MAGL ont été générés, tels que l'OMDM169 (Bisogno et coll., 2009) et le JZL184 (Long et coll., 2009a). Il a d'ailleurs été démontré que l'injection intrapéritonéale de l'OMDM169 (Bisogno et coll., 2009) et locale du JZL184 (Guindon et coll., 2011) ont permis de diminuer les comportements douloureux dans le test à la formaline. Tel qu'observé avec l'URB602 dans notre étude, les effets antinociceptifs de ces deux inhibiteurs impliquaient les deux

récepteurs cannabinoïdes : leurs effets étaient diminués par un antagoniste CB₁ (AM251) ainsi que par un antagoniste CB₂ (AM630). Ces deux inhibiteurs sélectifs pour la MAGL ont entraîné une augmentation des niveaux de 2-AG dans la patte ipsilatérale à l'injection de formaline, sans altérer ceux de l'anandamide (Bisogno et coll., 2009; Guindon et coll., 2011). À la lumière de ces résultats, il est donc plausible que le 2-AG présent localement en plus grande quantité activerait les récepteurs CB₁ et CB₂, et pas uniquement les récepteurs CB₂ afin de produire ses effets antinociceptifs au niveau périphérique. Une autre hypothèse suppose simplement que la participation des récepteurs CB₁ dans les effets antinociceptifs induits par le 2-AG exogène n'a pas été détectée en raison du nombre limité d'animaux par groupe expérimental dans notre étude comportementale (Hohmann, 2007).

Des études futures devraient se concentrer sur l'amélioration de la sélectivité des inhibiteurs de la MAGL, comme le nouvel inhibiteur KML29 (Chang et coll., 2012), ainsi que l'utilisation des souris FAAHKO (Cravatt et coll., 2001) et MAGLKO (Schlosburg et coll., 2010) au lieu des inhibiteurs des enzymes de dégradation.

Au final, ces résultats confirment l'existence d'un rôle physiologique pour le 2-AG dans l'inhibition de la douleur et soulèvent la possibilité que de nouvelles thérapies puissent inhiber la MAGL pour soulager la douleur en augmentant la biodisponibilité du 2-AG au niveau endogène.

1.3 Effets antinociceptifs de la combinaison de 2-AG et d'URB602

Dans cette étude, l'administration simultanée de 2-AG et d'URB602 localement sur la surface dorsale de la patte du rat a diminué les comportements douloureux dans les deux phases du test à la formaline (Article 1). Dans la phase inflammatoire, un effet analgésique additif est observé. Par ailleurs, il a été démontré dans notre laboratoire que la combinaison de l'anandamide avec l'ibuprofène produit un effet antinociceptif synergique dépendant des récepteurs CB₁ et CB₂ (Guindon et coll., 2006b). Cette synergie,

déterminée à l'aide d'analyses isobolographiques, est également retrouvée lors de l'administration simultanée d'anandamide avec le rofécoxib causant une augmentation significative des niveaux d'anandamide, d'OEA et de PEA comparativement à leur administration individuelle (Guindon et coll., 2006b).

Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si les doses d'URB602 utilisées dans cette étude ont réussi à inhiber la douleur inflammatoire *via* l'augmentation des niveaux locaux de 2-AG dans la patte des animaux dans ces conditions inflammatoires. Les effets additifs observés concordent avec l'hypothèse selon laquelle les concentrations locales de 2-AG sont plus élevées lors de la combinaison de 2-AG exogène et d'un inhibiteur de sa dégradation, l'URB602.

Une étude récente souligne l'importance de cibler la modulation périphérique des niveaux de 2-AG endogène puisque les conséquences associées à de trop grandes concentrations de 2-AG au niveau central, par exemple suite à l'administration du JZL184 (inhibiteur de la MAGL), seraient associées à des effets centraux indésirables telles qu'une hypothermie et une hypolocomotion (Long et coll., 2009a).

En résumé, cette première étude confirme l'existence d'un rôle physiologique pour le 2-AG au niveau périphérique dans l'inhibition de la douleur inflammatoire. Nos résultats sont en accord avec la possibilité de développer de nouvelles thérapies basées sur l'inhibition de la MAGL afin de soulager la douleur inflammatoire en modulant la biodisponibilité du 2-AG au niveau endogène. Aucune donnée n'était cependant disponible à ce moment quant au potentiel thérapeutique associé à l'inhibition de la MAGL dans des conditions de douleurs neuropathiques.

2 RÔLE DU SYSTÈME ENDOCANNABINOÏDE DANS LA MODULATION PÉRIPHÉRIQUE DE LA DOULEUR NEUROPATHIQUE

La deuxième partie de la discussion vise à évaluer si la modulation périphérique du système endocannabinoïde peut représenter une cible thérapeutique intéressante dans un modèle de douleur neuropathique (Articles 2 & 3). Les travaux de ces deux articles avaient comme objectif principal d'étudier les effets antinociceptifs périphériques induits par l'administration exogène de deux endocannabinoïdes (anandamide et 2-AG) ainsi que leur modulation locale par des inhibiteurs de la FAAH (URB597) et de la MAGL (URB602) chez le rat (Article 2) et la souris (Article 3) en conditions neuropathiques. Nous avons évalué deux symptômes en particulier, soit l'allodynie mécanique (à l'aide des monofilaments de von Frey) ainsi que l'hyperalgésie thermique (par exposition à une source de chaleur radiante). Nous voulions également comprendre la contribution exacte de chaque récepteur cannabinoïde dans les effets anti-allodyniques et anti-hyperalgésiques périphériques de ces composés cannabinoïdes grâce à des outils pharmacologiques, génétiques ou une combinaison des deux approches.

2.1 Effets antinociceptifs périphériques des endocannabinoïdes

Dans ce contexte impliquant une lésion nerveuse, nous avons démontré que l'administration locale d'anandamide et de 2-AG induit des effets anti-allodyniques et anti-hyperalgésiques. Ces effets sont produits localement et non au niveau systémique puisque l'administration des substances dans la patte controlatérale (côté opposé à la chirurgie) n'entraîne pas d'effets antinociceptifs. Ainsi, nous avons observé que les effets antinociceptifs locaux du 2-AG sont généralement [sauf les effets anti-allodyniques] produits par l'intermédiaire des récepteurs CB₁ et CB₂, alors que ceux de l'anandamide impliquent les récepteurs CB₁. En général, nos résultats montrent donc que les

endocannabinoïdes administrés de façon exogène peuvent produire des effets antinociceptifs périphériques dans ce modèle de ligature partielle du nerf sciatique.

En conditions de douleur neuropathique, le système endocannabinoïdes peut être modifié, par exemple par une hausse de l'expression des récepteurs cannabinoïdes (Di Marzo, 2008; Spigelman, 2010; Miller & Devi, 2011). Cette augmentation est habituellement interprétée comme une tentative physiologique de rétablir l'homéostasie, c'est-à-dire que cette réponse est transitoire et implique une réponse compensatoire de l'organisme à une insulte précise, réduisant ainsi les symptômes et/ou ralentissant la progression de la maladie, comme dans le cas de la douleur neuropathique (Pacher & Kunos, 2013). Cette régulation à la hausse a été montrée au niveau des voies périphérique et centrale dans plusieurs modèles animaux de douleur neuropathique (Siegling et coll., 2001; Lim et coll., 2003; Zhang et coll., 2003; Walczak et coll., 2005; Wotherspoon et coll., 2005; Beltramo et coll., 2006; Mitirattanakul et coll., 2006; Walczak et coll., 2006; Racz et coll., 2008).

À la lumière de ces études, il semble clair que les endocannabinoïdes agissent de façon spécifique à certains moments clés, et ce dans certains tissus ciblés afin de minimiser les conséquences reliées à de telles pathologies. À la périphérie, l'activation de ces récepteurs produit des effets antinociceptifs bénéfiques tout en minimisant les effets indésirables souvent associés à l'activation centrale des récepteurs cannabinoïdes. De ce fait, cette régulation à la hausse de l'expression des récepteurs cannabinoïdes confirme qu'une administration exogène d'endocannabinoïdes serait bénéfique (Lim et coll., 2003; Wang et coll., 2007).

2.1.1 Anandamide

Dans des conditions de douleur neuropathique, plusieurs études ont montré que les récepteurs CB₁ (Agarwal et coll., 2007) et CB₂ (pour une revue de la littérature, voir (Guindon & Hohmann, 2008a)) sont impliqués dans les effets antinociceptifs

périphériques des cannabinoïdes. Au cours des dernières années, plusieurs avancées ont permis de mettre en lumière le rôle crucial de la transmission cannabiniergique périphérique dans le contrôle de la douleur (Agarwal et coll., 2007; Clapper et coll., 2010; Marrs et coll., 2010; Yu et coll., 2010).

Dans cette étude, nous avons démontré que les effets anti-allodyniques et anti-hyperalgésiques de l'anandamide administré au niveau intraplantaire impliquent les récepteurs CB₁ et non les récepteurs CB₂, autant lors de l'évaluation *via* des outils pharmacologiques que génétiques (Article 3). Précédemment, notre laboratoire a démontré que l'injection locale d'anandamide diminue significativement l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique dans le modèle de ligature partielle du nerf sciatique chez le rat (Guindon & Beaulieu, 2006). D'autres études corroborent ce mécanisme d'action. Par exemple, un groupe a étudié les mécanismes d'action de l'anandamide administrée par voie intrapéritonéale chez des souris génétiquement modifiées chez lesquelles les gènes encodant la FAAH et les récepteurs CB₁ ont été invalidés. Chez ces souris double *knock-out*, l'anandamide ne produit plus d'effets analgésiques, alors que ses effets sont préservés chez la souris FAAHKO (Wise et coll., 2007). Ces résultats indiquent que les récepteurs CB₁ sont la cible prédominante des effets comportementaux de l'anandamide. Par contre, d'autres études ont montré que le SR141716A (antagoniste CB₁) ne bloque pas les effets antinociceptifs de l'anandamide dans certains modèles de douleur thermique (Adams et coll., 1998) ou mécanique (Smith et coll., 1998b). Les effets antinociceptifs de l'anandamide ne sont pas non plus altérés chez les souris *cnr1KO* puisqu'il stimule toujours la liaison du GTPγS par un mécanisme indépendant des récepteurs CB₁ et CB₂ (Di Marzo et coll., 2000).

En effet, cet endocannabinoïde est généralement considéré comme un ligand faible des récepteurs CB₁, alors qu'il est un agoniste des récepteurs vanilloïdes TRPV1 (Zygmunt et coll., 1999; Smart & Jerman, 2000). L'activation des récepteurs TRPV1 par l'anandamide entraîne toutefois des effets pronociceptifs (Maccarrone, 2008), principalement *via* une entrée de calcium et une dépolarisation de la cellule qui libère

alors le CGRP et la substance P, provoquant une vasodilatation locale ainsi qu'une extravasation plasmatique (Di Marzo et coll., 2001). De ce fait, de fortes concentrations d'anandamide peuvent produire des effets inverses de ceux obtenus lors de l'activation des récepteurs CB₁. Il est peu probable que dans notre étude l'anandamide se soit lié et ait activé les récepteurs TRPV1 pour produire ses effets, puisque suite à son administration nous avons observé des effets antinociceptifs et non pas pronociceptifs tel qu'attendus suite à l'activation des récepteurs TRPV1. De plus, notre laboratoire a précédemment montré que l'association de capsazépine (antagoniste TRPV1) avec l'anandamide n'a pas modifié ses effets antinociceptifs locaux (Guindon et coll., 2006b). Outre l'anandamide, nous avons également examiné les mécanismes d'action qui sous-tendent les effets périphériques du 2-AG.

2.1.2 2-arachidonyl glycérol

Il existe des données suggérant que le 2-AG peut agir comme un agoniste complet pour les récepteurs CB₁ et CB₂ (Mechoulam et coll., 1995; Sugiura & Waku, 2000), sans liaison directe avec le récepteur TRPV1 (Pertwee, 2006). Le 2-AG produit d'ailleurs ses effets *via* les récepteurs CB₁ et CB₂ afin de moduler la transmission de la douleur dans un modèle de douleur neuropathique (Sugiura et coll., 1999; Gonsiorek et coll., 2000). De façon similaire, nous avons montré dans nos études que les effets anti-hyperalgésiques du 2-AG administré par voie locale impliquent les récepteurs CB₁ et CB₂, alors que ses effets anti-allodyniques semblent nécessiter uniquement la présence des récepteurs CB₂. En effet, les effets anti-allodyniques du 2-AG sont inhibés par l'AM251 (antagoniste CB₁) (Articles 2 & 3) alors qu'ils sont présents chez les souris *cnr1*KO (Article 3). Par contre, lorsque l'on évalue les mécanismes d'action du 2-AG chez des souris *cnr1*KO auxquelles on a administré de l'AM630 (antagoniste CB₂), le 2-AG ne produit plus d'effets anti-allodyniques, suggérant donc la participation exclusive des récepteurs CB₂ dans ces effets (Article 3). Cette différence a été notée suite à l'évaluation par des outils génétiques

(Article 3), alors que l'utilisation unique des antagonistes ne nous permettait pas d'observer cette différence (Articles 2 & 3). Nous discuterons de cette différence notée pour les effets anti-allodyniques de façon plus détaillée dans la section 2.2.2.

Dans nos résultats, l'anandamide et le 2-AG produisent leurs effets antinociceptifs *via* différents mécanismes d'action. Ces différences pourraient avoir des conséquences importantes pour la modulation de l'excitabilité neuronale endogène, dépendamment de quel endocannabinoïde est libéré dans un contexte précis. L'efficacité des agonistes cannabinoïdes dépend de leur interaction avec les protéines G et de leurs seconds messagers intracellulaires, dont l'expression et le recrutement peut varier dans des types cellulaires distincts. En conséquence, les effets de l'activation des récepteurs cannabinoïdes diffèrent en fonction de l'endocannabinoïde et du type de tissu ou de cellules dans lequel les récepteurs sont exprimés (Glass & Northup, 1999). La capacité des récepteurs cannabinoïdes de produire des actions quantitativement ou qualitativement distinctes pour des ligands distincts a été appelée «sélectivité fonctionnelle» (Urban et coll., 2007; Atwood & Mackie, 2010; Pamplona & Takahashi, 2012). Ce phénomène peut être expliqué par l'induction de changements conformationnels distincts dans la structure des récepteurs ou la «sélection» de conformations distinctes par un sous-groupe de récepteurs hétérogènes (Howlett, 2005; Mackie, 2008; Pamplona & Takahashi, 2012). L'idée de base demeure que les différents ligands endocannabinoïdes activent vraisemblablement des voies de signalisation distinctes, en fonction de leur affinité pour l'un des nombreux états conformationnels des récepteurs cannabinoïdes. L'impact de la sélectivité fonctionnelle sur le système endocannabinoïde a été examiné (Bosier et coll., 2010; Atwood et coll., 2012c).

Globalement, ces nouvelles données qui sous-tendent les mécanismes d'action des endocannabinoïdes *via* l'activation distincte des récepteurs CB₁ et CB₂ suggèrent que le système cannabinoïde est beaucoup plus complexe qu'on ne le croyait. Pour ajouter à cette complexité, il a également été démontré que le récepteur GPR55 peut être activé par des composés cannabinoïdes endogènes (anandamide, 2-AG, noladin éther) (Di Marzo

et coll., 2000). Il est donc difficile de prétendre que les mécanismes d'action qui sous-tendent les effets antinociceptifs de l'anandamide et du 2-AG dans nos études ne sont reliés qu'à l'activation ciblée des récepteurs CB₁ et CB₂, et pas des récepteurs GPR55. Nous avons cependant utilisé le WIN55,212-2 (agoniste non sélectif) comme contrôle positif pour comparer nos résultats puisque cet agoniste synthétique active les récepteurs CB₁ et CB₂ mais il ne se lie pas aux récepteurs GPR55 (Article 3). Nous avons observé que l'anandamide et le 2-AG produisent des effets analgésiques similaires au WIN55,212-2.

Nos résultats s'intègrent dans la remarquable complexité du système cannabinoïde. Des études montrent des différences dans le profil thérapeutique d'activation et/ou d'inhibition du même récepteur dans le système nerveux central ou périphérique, des redondances dans la signalisation des endocannabinoïdes, des récepteurs cannabinoïdes ayant plus d'un ligand endogène, ainsi que des effets opposés produits par l'activation des récepteurs CB₁ et CB₂ dans divers modèles animaux (Pacher et coll., 2006; Di Marzo, 2008; Pacher & Mechoulam, 2011; Di Marzo & De Petrocellis, 2012; Horvath et coll., 2012; Piscitelli & Di Marzo, 2012).

En plus des altérations de l'expression des récepteurs cannabinoïdes, des modifications des concentrations des endocannabinoïdes ont également été rapportées dans des conditions de douleur neuropathique (Walczak et coll., 2005; Mitrirattanakul et coll., 2006; Petrosino et coll., 2007; Spigelman, 2010). Cette augmentation des niveaux d'anandamide et de 2-AG est habituellement interprétée comme une réponse physiologique adaptative visant à activer de façon ciblée les récepteurs cannabinoïdes afin de contrecarrer les processus physiopathologiques impliqués dans le développement de la douleur neuropathique. Par conséquent, le système endocannabinoïde peut devenir chroniquement activé visant à lutter contre la transmission de la douleur (Petrosino et coll., 2007). Ce phénomène expliquerait pourquoi les inhibiteurs de l'inactivation des endocannabinoïdes peuvent exercer des effets analgésiques dans ce contexte de douleur neuropathique.

De ce fait, nous avons évalué la possibilité de cibler les enzymes de dégradation de l'anandamide ou du 2-AG au niveau périphérique dans le but d'augmenter les concentrations locales d'un ou des deux composés et de prolonger leur action neuromodulatrice. En périphérie, l'activation des récepteurs cannabinoïdes produit des effets antinociceptifs bénéfiques tout en minimisant les effets indésirables souvent associés à l'activation centrale de ces récepteurs.

2.2 Effets antinociceptifs périphériques produits par la modulation du système endocannabinoïde

Dans les études présentées dans les Articles 2 & 3, nous avons observé que les effets antinociceptifs (anti-hyperalgésiques) locaux de l'URB602 (inhibiteur de la MAGL) sont produits par l'intermédiaire des récepteurs CB₁ et CB₂, alors que ceux de l'URB597 (inhibiteur de la FAAH) impliquent les récepteurs CB₁. Ces effets sont produits localement et non au niveau systémique puisque l'administration des substances dans la patte controlatérale n'entraîne pas d'effets antinociceptifs. Nos résultats montrent que la modulation locale du système endocannabinoïde produit des effets anti-allodyniques et anti-hyperalgésiques périphériques dans un modèle de douleur neuropathique.

L'expression de ces deux principales enzymes catabolisant les endocannabinoïdes est retrouvée le long des voies de la douleur. La FAAH a notamment été localisée dans le système nerveux périphérique, plus précisément dans les ganglions de la racine dorsale, du nerf sciatique et de la moelle épinière (Lever et coll., 2009). La MAGL se retrouve au niveau présynaptique (Gulyas et coll., 2004; Ludanyi et coll., 2011) et son expression semble être hétérogène à travers les synapses (Uchigashima et coll., 2011; Yoshida et coll., 2011; Tanimura et coll., 2012). Elle est colocalisée avec les récepteurs CB₁ dans les terminaisons axonales, elle est ainsi idéalement localisée pour inactiver la voie de signalisation induite par le 2-AG (Savinainen et coll., 2012). Son activité dans les tissus périphériques de la patte a été rapportée (Guindon et coll., 2011). Plusieurs études ont

démontré que l'administration d'inhibiteurs des enzymes impliquées dans la dégradation des endocannabinoïdes atténue la nociception, notamment la douleur neuropathique (Roques et coll., 2012a; Bisogno & Maccarrone, 2013; Mulvihill & Nomura, 2013). Toutefois, certaines études présentent des divergences entre les contributions relatives de chaque récepteur cannabinoïde suite à l'administration d'inhibiteurs de la FAAH et de la MAGL, suggérant que des mécanismes d'action distincts sous-tendent les effets antinociceptifs de l'inactivation de ces enzymes (Kinsey et coll., 2009).

En raison de la complexité apparente des mécanismes d'action de tous ces inhibiteurs, nous avons opté pour une approche complémentaire en combinant l'utilisation des souris *knock-out* avec des antagonistes des récepteurs cannabinoïdes. Par conséquent, nous avons cherché à imiter les conditions présentes chez les souris double *knock-out* *cnr1cnr2KO* (Jarai et coll., 1999). Nous avons donc administré un antagoniste des récepteurs CB₂ (AM630) aux souris *cnr1KO* ou un antagoniste des récepteurs CB₁ (AM251) aux souris *cnr2KO*, en supposant ainsi que dans les deux cas les deux récepteurs cannabinoïdes seraient invalidés et/ou non fonctionnels.

2.2.1 Modulation de l'anandamide avec un inhibiteur de la FAAH (URB597)

Les inhibiteurs de la FAAH, une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'anandamide (Cravatt et coll., 1996), ont été évalués pour leur potentiel thérapeutique pour soulager la douleur (Kathuria et coll., 2003; Petrosino & Di Marzo, 2010). Ces inhibiteurs produisent des effets pharmacologiques *via* l'augmentation des niveaux d'anandamide (ainsi que d'autres amides d'acides gras), activant ainsi indirectement les récepteurs cannabinoïdes et produisant un spectre d'effets biologiques plus limité par rapport à une action directe des agonistes CB₁ (Cravatt & Lichtman, 2003; Piomelli, 2005).

Dans cette étude, nous avons démontré que les effets anti-allodyniques et anti-hyperalgésiques induits par l'URB597 administré au niveau intraplantaire impliquent les récepteurs CB₁ et non les récepteurs CB₂, autant lors de l'évaluation *via* des outils

pharmacologiques (Articles 2 & 3) que génétiques (Article 3). Ces mécanismes sont cohérents avec ceux obtenus suite à l'administration d'anandamide exogène, donc nous pouvons supposer que dans nos conditions expérimentales l'URB597 élève les concentrations locales d'anandamide, et que cet endocannabinoïde va activer les récepteurs CB₁ pour produire ses effets.

D'autres études ont cependant montré que les deux récepteurs cannabinoïdes étaient impliqués dans les effets antinociceptifs de l'URB597 dans le modèle de la constriction chronique du nerf sciatique chez la souris suite à son administration par voie orale (Russo et coll., 2007) ou systémique (Kinsey et coll., 2009). Ces effets différentiels de l'URB597 entre le modèle utilisé dans ces dernières études (constriction chronique du nerf sciatique) par rapport à celui utilisé dans nos études (ligature partielle du nerf sciatique) sont vraisemblablement causés par une régulation négative des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ ou à une régulation positive des récepteurs TRPV1. Ainsi, au cours de la douleur neuropathique, les actions pronociceptives de l'anandamide induites *via* l'activation des récepteurs TRPV1 pourraient réduire ses propriétés anti-allodyniques et anti-hyperalgésiques impliquant l'activation des récepteurs cannabinoïdes. Dans l'étude de Kinsey et collaborateurs, les effets anti-allodyniques induits par l'URB597 n'étaient toutefois pas bloqués par un prétraitement avec un antagoniste des récepteurs TRPV1, la capsazépine, ou avec un antagoniste des récepteurs opioïdes, la naltrexone (Kinsey et coll., 2009). Il faut également considérer que l'URB597 ne fait pas seulement qu'augmenter les niveaux d'anandamide en inhibant la FAAH, mais augmente aussi les concentrations d'autres endocannabinoïdes tels que l'oléoyléthanolamide (OEA) et le palmitoyléthanolamide (PEA).

En somme, le développement d'inhibiteurs sélectifs de la FAAH ainsi que de souris *knock-out* dépourvues du gène encodant la FAAH a considérablement élargi notre compréhension des rôles physiologiques de l'anandamide dans le système nerveux central et périphérique.

2.2.2 Modulation du 2-AG avec un inhibiteur de la MAGL (URB602)

Le 2-AG est principalement hydrolysé en acide arachidonique et en glycérol par la MAGL (Goparaju et coll., 1999; Dinh et coll., 2004). Dans cette étude, nous avons démontré que les effets anti-hyperalgésiques de l'URB602 administré par voie locale impliquent les récepteurs CB₁ et CB₂, alors que ses effets anti-allodyniques semblent nécessiter uniquement la présence des récepteurs CB₂. Nous avons démontré que les effets anti-allodyniques de l'URB602 sont inhibés par l'AM251 (antagoniste CB₁) (Articles 2 & 3), d'où l'hypothèse que les récepteurs CB₁ sont vraisemblablement impliqués dans les effets anti-allodyniques de l'URB602. De façon contradictoire, ces effets anti-allodyniques sont présents chez les souris *cnr1KO* (Article 3), d'où l'hypothèse que les récepteurs CB₁, bien qu'ils soient impliqués, ne sont pas nécessaires puisque l'absence des récepteurs CB₁ (souris *cnr1KO*) ne modifie pas les comportements anti-allodyniques de l'URB602. Les effets de l'URB602 semblent donc majoritairement produits suite à l'activation des récepteurs CB₂, le 2-AG étant un agoniste des récepteurs CB₁ et CB₂ (voir Introduction, Section II, 2.9.2). Par contre, lorsque l'on évalue les mécanismes d'action de l'URB602 chez des souris *cnr1KO* auxquelles on a administré de l'AM630 (antagoniste CB₂), alors cet inhibiteur ne produit plus d'effets anti-allodyniques, suggérant donc la participation exclusive des récepteurs CB₂ dans ces effets (Article 3). Cette différence a été notée suite à l'évaluation par des outils génétiques (Article 3), alors que l'utilisation unique des antagonistes ne nous permettait pas d'observer cette différence (Articles 2 & 3). Ces mécanismes sont partiellement cohérents avec ceux obtenus suite à l'administration périphérique de 2-AG exogène, donc nous pouvons supposer que dans nos conditions expérimentales l'URB602 augmente les concentrations locales de 2-AG, et que cet endocannabinoïde va activer les récepteurs CB₁ et CB₂ pour produire ses effets.

Étant donné que les effets anti-allodyniques locaux du 2-AG et de l'URB602 sont préservés chez les souris *cnr1KO* mais absents chez les souris *cnr1KO* + AM630 (Article 3), les récepteurs CB₂ semblent jouer un rôle prédominant dans le contrôle de l'allodynie dans nos conditions expérimentales. Des données récentes suggèrent que l'activation des

récepteurs CB₂ dans des conditions de douleur neuropathique limite l'activation de la microglie induite par l'interféron- γ , ainsi que la stimulation consécutive de voies inflammatoires (Racz et coll., 2008). D'ailleurs, les manifestations comportementales et histologiques de la douleur neuropathique ont été atténuées chez les souris transgéniques surexprimant les récepteurs CB₂ dans le système nerveux central (Racz et coll., 2008) et les effets anti-allodyniques du JWH133 (agoniste CB₂) ont été abolis dans un modèle de douleur neuropathique de ligature des nerfs rachidiens chez les souris *cnr2KO* (Yamamoto et coll., 2008). Cependant, ces observations ne semblent pas généralisées puisque les effets anti-allodyniques produits par divers composés cannabinoïdes étaient similaires chez les souris *cnr2KO* et *cnr2WT* dans les modèles de ligature des nerfs rachidiens (Sain et coll., 2009) et de constriction chronique du nerf sciatique (Kinsey et coll., 2010).

2.2.3 Modulation du 2-AG avec un inhibiteur de la FAAH (URB597)

En plus de sa dégradation *via* la MAGL, il semble que le 2-AG soit également métabolisé par la FAAH (Cravatt et coll., 1996; Goparaju et coll., 1998; Maione et coll., 2007). Son hydrolyse est toutefois préservée chez les souris FAAHKO, mais pas celle de l'anandamide (Lichtman et coll., 2004). Une interprétation prudente soutient que la FAAH et la MAGL participent à l'inactivation du 2-AG en fonction du type de tissus ou de cellules (Di Marzo & Petrosino, 2007). De ce fait, nous avons évalué si la dégradation du 2-AG peut être affectée par l'URB602 (inhibiteur de la MAGL) et l'URB597 (inhibiteur de la FAAH). Nous avons émis l'hypothèse que si le 2-AG était métabolisé par la FAAH dans nos conditions expérimentales, alors en théorie l'ajout de l'URB597 pourrait augmenter les niveaux d'anandamide et de 2-AG, donc probablement produire des effets analgésiques supérieurs en comparaison avec le 2-AG administré seul.

Nous avons observé en fait que l'ajout d'URB597 avec le 2-AG ou avec la combinaison de 2-AG + URB602 n'a pas produit d'effets antinociceptifs additifs (Articles 2 & 3). Ceci suggère qu'une augmentation des niveaux d'anandamide en plus des niveaux de

2-AG ne produit pas d'effets analgésiques supérieurs. Par ailleurs, nos résultats ne nous permettent pas d'évaluer l'implication des deux enzymes ABHD6 et ABHD12 dans le métabolisme du 2-AG (Blankman et coll., 2007) ; le manque d'effets additifs de la combinaison 2-AG + URB602 + URB597 peut donc être dû à une hydrolyse du 2-AG par ces deux enzymes suite à l'inhibition de la MAGL et de la FAAH (Article 2). Il aurait été intéressant de comparer ces résultats avec des inhibiteurs doubles de la FAAH et de la MAGL, tels que le JZL195 (Long et coll., 2009b) ou le SA-57 (Niphakis et coll., 2012), afin d'observer si les résultats seraient restés les mêmes.

Le problème majeur de nos études est que les niveaux d'endocannabinoïdes n'ont pas été mesurés, donc sans ces données nous basons nos hypothèses uniquement sur le fait que les inhibiteurs de la MAGL (URB602) et de la FAAH (URB597) sont sélectifs, alors que cette sélectivité est questionnée dans le cas de l'URB602. De ce fait, sans la preuve que dans nos conditions expérimentales l'URB602 et l'URB597 entraînent une augmentation des niveaux d'endocannabinoïdes, l'interprétation de nos données doit demeurer nuancée. Malgré les limites de nos études, nos résultats démontrent clairement que la modulation périphérique des endocannabinoïdes dans les tissus périphériques par l'inhibition de leurs enzymes de dégradation respectives représente une approche prometteuse pour le traitement de la douleur neuropathique (Articles 2 & 3).

2.2.4 Disparités dans les mécanismes d'action sous-jacents à la modulation du système endocannabinoïde

Une revue de la littérature permet de constater que les études actuelles ne sont pas concluantes quant à la contribution exacte des deux récepteurs cannabinoïdes dans les effets antinociceptifs associés à la modulation du système endocannabinoïde. La plupart des études indiquent que les inhibiteurs de la FAAH et de la MAGL peuvent réduire les comportements douloureux résultant d'une lésion nerveuse périphérique par l'intermédiaire d'une activation distincte des deux récepteurs cannabinoïdes. Les

inhibiteurs de la FAAH semblent produire leurs effets *via* les récepteurs CB₁ et CB₂, tandis que ceux des inhibiteurs de la MAGL sont produits suite à l'activation des récepteurs CB₁, ce qui suggère que, dans ces études, les récepteurs CB₂ ne sont pas nécessaires pour les effets antinociceptifs du 2-AG (Chang et coll., 2006; Russo et coll., 2007; Kinsey et coll., 2009; Gattinoni et coll., 2010; Caprioli et coll., 2012). Par exemple, l'inhibition de la FAAH utilisant le nouvel inhibiteur à action périphérique URB937 a été abolie chez les souris dont le gène encodant la FAAH a été invalidé (FAAHKO) et chez les souris *cnr1*KO dans le modèle de constriction chronique du nerf sciatique (Clapper et coll., 2010). Une autre étude utilisant des souris *knock-out* a également montré que les récepteurs CB₁ et CB₂ étaient impliqués dans les effets anti-allodyniques du PF-3845 (inhibiteur sélectif de la FAAH), alors que seuls les récepteurs CB₁ étaient nécessaires pour les effets du JZL184 (inhibiteur sélectif de la MAGL) dans le modèle de constriction chronique du nerf sciatique (Kinsey et coll., 2010). Tout comme les nôtres, ces études présentent des résultats basés sur l'utilisation des souris *knock-out* et pourtant nos résultats ne vont pas dans le même sens.

Plusieurs auteurs ont tenté d'expliquer les disparités entre les mécanismes d'action qui sous-tendent les effets antinociceptifs des inhibiteurs de la FAAH et de la MAGL dans la littérature actuelle. Certains rapportent que ces disparités résultent probablement de plusieurs facteurs tels que la modalité sensorielle évaluée, le tonus endocannabinoïde basal produit par la lésion, le composé cannabinoïde testé, l'âge et le genre des rongeurs, etc. (Ahmed et coll., 2010; Spigelman, 2010; Guindon et coll., 2011; Khasabova et coll., 2011). Les divergences dans la littérature ne peuvent cependant pas être simplement expliquées par les différents outils pharmacologiques utilisés. Par conséquent, ces disparités sont probablement causées par les différentes voies d'administration, la physiopathologie des modèles de douleur neuropathique utilisés, l'arrière-plan génétique des souris *knock-out* ainsi que les différences interspèces.

Contrairement à la plupart des études présentées ci-dessus, nos expériences ont ciblé la modulation périphérique du système endocannabinoïde. Les études utilisant une

voie d'administration locale présentent d'ailleurs des conclusions similaires aux nôtres (Guindon et coll., 2011; Spradley et coll., 2012), indiquant une possible élévation des niveaux d'endocannabinoïdes spécifique aux tissus périphériques, bien que des mesures de ces concentrations n'aient pas été réalisées. Par conséquent, nos résultats ne nous permettent pas de confirmer que l'URB597 et l'URB602 ont pu élever les taux d'anandamide et de 2-AG dans nos conditions expérimentales. Il est cependant raisonnable d'assumer que ces deux inhibiteurs ont produit leurs effets antinociceptifs *via* ces mécanismes d'action. Quelques études ont d'ailleurs montré une élévation des niveaux d'endocannabinoïdes suite à l'administration de l'URB597 (Lichtman et coll., 2002; Kathuria et coll., 2003) ou de l'URB602 (Guindon et coll., 2011).

Tel que déjà évoqué, les différences peuvent être associées à la physiopathologie des modèles de lésion nerveuse périphérique. Une étude récente utilisant des approches génétiques et pharmacologiques a révélé que les récepteurs CB₁ et CB₂ étaient impliqués dans les effets anti-allodyniques du JZL184 dans le test à la carraghénine (Ghosh et coll., 2013). Par exemple, dans certains modèles de douleur inflammatoire tels que les tests à la carraghénine (Ghosh et coll., 2013), capsaïcine (Spradley et coll., 2012) et formaline (Guindon et coll., 2011), les récepteurs CB₁ et CB₂ sont tous les deux impliqués dans les effets antinociceptifs induits par l'inhibition de la MAGL, tandis que l'inhibition de la FAAH ne nécessite pas la présence des récepteurs CB₂. Une hypothèse possible concernant ces divergences est basée sur la participation d'une composante inflammatoire plus ou moins forte dans le développement des comportements douloureux entre les différents modèles expérimentaux. Il est important de noter que, outre les modèles de douleur inflammatoire présentés ci-dessus, il existe également une composante inflammatoire importante dans le développement des neuropathies périphériques. Fait intéressant, il a récemment été montré que, dans des conditions inflammatoires, le système endocannabinoïde peut fonctionner différemment que dans son état physiologique, impliquant plusieurs modifications dynamiques (Rani Sagar et coll., 2012). Par conséquent, les modèles de douleur ou les techniques chirurgicales ayant une plus grande composante inflammatoire

peuvent potentiellement expliquer ces incohérences. Cependant, certains auteurs ont rapporté que le modèle de la ligature partielle du nerf sciatique implique des processus inflammatoires minimes par rapport au modèle de constriction chronique du nerf sciatique (Bridges et coll., 2001b) ; cette hypothèse ne peut donc pas éclaircir tous les écarts présentés entre nos résultats et certaines études retrouvées dans la littérature actuelle.

Les différences observées entre les mécanismes d'action des inhibiteurs de la FAAH et de la MAGL entre les différentes études peuvent également être basées sur des différences dans l'arrière-plan génétique des souris utilisées. Pourtant, si l'on compare l'arrière-plan génétique de nos souris avec celui des souris utilisées dans l'étude de Kinsey et collaborateurs, les deux lignées de souris *cnr2KO* sont issues des souris C57BL/6J (Kinsey et coll., 2010).

Les récepteurs CB₂ exprimés chez différentes espèces présentent souvent différentes réponses pharmacologiques face à des substances identiques, ce qui complique le processus de découverte de nouvelles thérapies (Mukherjee et coll., 2004; Yao et coll., 2006; Bingham et coll., 2007). Par exemple, il a été démontré que l'AM1241 (agoniste CB₂) produit des effets très différents selon les différentes espèces (Bingham et coll., 2007). Des résultats différents ont récemment été également notés suite à l'administration du JZL184 (inhibiteurs de la MAGL) chez des rats ou des souris (Wiskerke et coll., 2012). Étant donné que les récepteurs CB₂ présentent quelques divergences entre les espèces, les mécanismes de régulation de ces récepteurs ne peuvent pas vraiment être extrapolés d'une espèce à l'autre.

En résumé, l'inhibition de la dégradation des endocannabinoïdes permet généralement d'éviter les nombreux effets indésirables retrouvés chez l'animal qui sont associés à l'activation des récepteurs cannabinoïdes CB₁ au niveau central, tels que la catalepsie et la diminution de l'activité locomotrice (Cravatt et coll., 2001; Moore et coll., 2005; Russo et coll., 2007). Cependant, il faut s'assurer d'augmenter les concentrations

d'endocannabinoïdes de façon ciblée uniquement dans des tissus spécifiques où une telle augmentation est souhaitable (Bisogno et coll., 2009; Pacher & Kunos, 2013). D'ailleurs une étude récente a montré que le JZL184 (inhibiteur de la MAGL) produit des effets cannabinoïdes indésirables suite à son injection au niveau systémique (Long et coll., 2009a).

2.3 Approches pharmacologiques et génétiques utilisées pour élucider les mécanismes d'action des endocannabinoïdes

Un des objectifs de cette thèse était d'élucider les mécanismes par lesquels les cannabinoïdes endogènes (anandamide et 2-AG) et les inhibiteurs de leur dégradation (URB597 [FAAH] et URB602 [MGL]) produisent leurs effets antinociceptifs dans un modèle de douleur neuropathique. Nous avons opté pour deux approches distinctes pour évaluer ces mécanismes : dans un premier temps nous avons utilisé des antagonistes sélectifs pour chacun des récepteurs cannabinoïdes chez le rat (Article 2), puis nous avons opté pour deux lignées de souris génétiquement modifiées chez lesquelles le gène encodant les récepteurs CB₁ (*cnr1*) ou CB₂ (*cnr2*) a été invalidé (Article 3). Finalement, nous avons uni ces deux méthodes grâce à la combinaison complémentaire d'outils pharmacologiques et génétiques, ce qui offre les avantages des deux méthodes afin d'élucider de manière plus précise les mécanismes d'action (Article 3).

2.3.1 Approches pharmacologiques

Avant de pouvoir utiliser les antagonistes AM251 (CB₁) et AM630 (CB₂) dans notre étude et d'analyser les résultats obtenus, nous devons préalablement vérifier si l'administration de ces antagonistes avait un impact sur les mesures de l'allodynie et de l'hyperalgésie dans notre modèle de douleur neuropathique, autant chez le rat que la souris. Nous avons ainsi observé que l'administration d'AM251 et d'AM630 n'a entraîné

aucune modification dans les comportements allodyniques et hyperalgésiques, ce qui suggère l'absence relative de tonus basal endocannabinoïde dans nos conditions expérimentales (Articles 2 & 3).

Nous devons prendre ces précautions puisque de nouvelles données suggèrent que l'AM251 (CB₁) peut se comporter comme un antagoniste direct des récepteurs opioïdes mu (MOP) (Seely et coll., 2012). Par conséquent, nous ne pouvons pas exclure la présence d'effets hors-cible associés aux opioïdes dans nos expériences. Toutefois, l'administration d'AM251 chez le rat et la souris n'évoque pas d'effets pronociceptifs dans nos études, ce qui indique que nos résultats ne peuvent pas être expliqués par un effet antagoniste des récepteurs MOP. Par ailleurs, il a déjà été montré que l'AM251 ainsi que le SR141716A, deux antagonistes considérés sélectifs pour les récepteurs CB₁, peuvent également agir à titre d'agonistes des récepteurs GPR55 (Henstridge et coll., 2009; Kapur et coll., 2009). De plus, il a été montré que l'AM630 (antagoniste CB₂) pouvait se comporter comme un antagoniste neutre, un agoniste inverse ou même un agoniste tout dépendant des conditions dans lesquelles il est utilisé (Bolognini et coll., 2012). Ces nouvelles observations, souvent contradictoires entre les différentes études, accentuent l'importance d'utiliser une approche complémentaire basée sur des combinaisons d'outils pharmacologiques et génétiques. De ce fait, il est encore une fois important de considérer le concept de *sélectivité fonctionnelle*, c'est-à-dire que des agonistes et antagonistes sélectifs pour un récepteur particulier peuvent altérer de façon différente le couplage à des voies de signalisation distinctes (Urban et coll., 2007). Ce concept doit être considéré lorsque l'on compare les études pharmacologiques qui utilisent différents agonistes et antagonistes, par exemple pour les récepteurs CB₂, puisqu'il peut y avoir activation de différentes voies de signalisation, présence de réponses physiologiques différentes voire opposées et implication d'autres cibles dans les effets de ces composés (Urban et coll., 2007; Atwood & Mackie, 2010).

2.3.2 Approches génétiques

Avant de pouvoir utiliser les souris *cnr1KO* et *cnr2KO* dans notre étude et d'analyser les résultats obtenus, nous devons préalablement vérifier si l'inactivation génétique des récepteurs CB₁ ou CB₂ avaient un impact sur le développement de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie thermique dans notre modèle de douleur neuropathique. Nous avons ainsi observé que ces souris *knock-out* ne présentent aucune modification quant aux valeurs de base mesurées avant et après la procédure chirurgicale, ce qui suggère qu'elles présentent un développement normal de la douleur neuropathique dans notre modèle de ligature partielle du nerf sciatique (Article 3).

Ces observations initiales étaient très importantes puisque des différences dans les comportements allodyniques ont été démontrées chez la souris *cnr1KO* dans le modèle de ligature partielle du nerf sciatique (Castane et coll., 2006). Chez les souris *cnr1KO*, l'allodynie mécanique était significativement différente au jour 6 suivant la chirurgie par rapport aux souris *cnr1WT*, bien qu'aucune autre différence n'ait été détectée à d'autres moments au cours de l'étude. De ce fait, même si dans nos études l'évaluation de l'allodynie mécanique était réalisée aux 10^e et 11^e jours suite à la ligature partielle du nerf sciatique, nous voulions tout de même contrevérifier ces résultats. Ces différences sont probablement dues à l'arrière-plan génétique propre à chacune des lignées génétiques de souris utilisées. Ces auteurs utilisaient des souris *cnr1KO* provenant de souris CD1, alors que les nôtres proviennent de souris C57BL/6N (Marsicano et coll., 2002). Par ailleurs, des différences ont également été observées dans une étude utilisant des souris génétiquement modifiées possédant une délétion conditionnelle du gène du récepteur CB₁ exclusivement dans les nocicepteurs périphériques (*SNS-cnr1KO*). Ces souris *SNS-cnr1KO* présentent des comportements douloureux augmentés par rapport aux *cnr1WT*, ce qui suggère la présence d'une modulation endogène de la douleur *via* un tonus endocannabinoïde localisé dans certains tissus périphériques.

Autre point important à considérer, les souris *knock-out* peuvent présenter des modifications compensatoires au cours de leur développement, c'est-à-dire que par le biais de l'invalidation d'un gène, un autre peut être surexprimé, des concentrations de certaines substances endogènes peuvent être altérées ou augmentées, le couplage à certaines voies de signalisation peut être modifié, les seuils de douleur peuvent être différents, etc. Tous ces changements ont des répercussions sur les conditions physiologiques et physiopathologiques qui sont difficiles à définir et ne représentent plus les conditions retrouvées *in vivo*. Par exemple, une étude a montré que les souris double *knock-out cnr1cnr2KO* ne présentent pas de réponse inflammatoire exagérée dans un modèle inflammatoire de colite expérimentale, alors qu'une exagération encore plus accrue à la colite a été confirmée non seulement chez les souris *cnr1KO* mais également chez les souris *cnr2KO* (Engel et coll., 2010). Ces observations suggèrent que les deux récepteurs cannabinoïdes jouent des rôles complémentaires dans l'homéostasie intestinale. Il est possible que, chez les souris *cnr1cnr2KO*, il y ait des mécanismes de compensation, ou une action des endocannabinoïdes sur d'autres récepteurs, expliquant l'absence d'une réponse inflammatoire encore plus exagérée (Alhouayek & Muccioli, 2012). D'autres exemples de modifications compensatoires sont présentées actuellement dans la littérature, nous aborderons notamment ce concept dans le contexte des interactions entre les systèmes opioïde et cannabinoïde dans la section III de cette discussion.

En résumé, si l'on compare les résultats obtenus dans nos deux études, nous observons des divergences quant à la contribution exacte des deux récepteurs cannabinoïdes dans la modulation périphérique du système endocannabinoïde selon les outils utilisés. En effet, lorsque nous utilisons des antagonistes pour les récepteurs cannabinoïdes, les récepteurs CB₁ et CB₂ semblent impliqués dans les effets anti-allodymiques du 2-AG et de l'URB602 (Articles 2 & 3). Par contre, les effets anti-allodymiques du 2-AG et de l'URB602 sont absents chez les souris *cnr2KO*, mais préservés chez les souris *cnr1KO* (Article 3). La présence des récepteurs CB₂ semble donc

indispensable pour la production des effets anti-allodyniques, alors que celle des récepteurs CB₁ n'est pas nécessaire.

À la lumière de ces résultats contradictoires, nous avons opté pour une combinaison complémentaire de ces approches pharmacologique et génétique.

2.3.3 Combinaison complémentaire des approches pharmacologiques et génétiques

Désormais, il devient de plus en plus évident que plusieurs approches doivent être utilisées afin de conclure qu'une réponse particulière est induite par un ligand agissant *via* les récepteurs CB₂. L'application rigoureuse de ces critères au cours des études évaluant l'implication des récepteurs CB₂ aidera à établir de façon précise le rôle physiologique et physiopathologique de ce système de signalisation et de résoudre certaines divergences retrouvées actuellement dans la littérature (Atwood & Mackie, 2010; Atwood et coll., 2012b).

Contrairement à la plupart des études antérieures qui ont utilisé des souris *knock-out* ou des approches pharmacologiques séparément pour examiner les mécanismes d'action des endocannabinoïdes, les travaux présentés dans l'Article 3 sont basés sur une combinaison complémentaire de ces deux approches afin d'évaluer de façon précise la participation des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂, bien que d'autres récepteurs puissent également participer à ces effets.

Ainsi, l'utilisation combinée des approches génétiques et pharmacologiques dans l'article 3 a révélé que les effets anti-hyperalgésiques du 2-AG et de l'URB602 impliquaient les récepteurs CB₁ et CB₂, alors que seule la présence des récepteurs CB₂ était essentielle pour leurs effets anti-allodyniques. Ainsi, lorsque l'on module les concentrations de 2-AG de façon endogène (URB602) ou exogène chez les souris *cnr1KO*, les effets anti-allodyniques de ces composés sont préservés. Par contre, lorsque les deux récepteurs sont

génétiqumment et pharmacologiquement invalidés (souris *cnr1KO* + AM630), les effets anti-allodyniqummes sont complètement inhibés. Cette combinaison complémentaire permet de mimer les souris double *knock-out* pour les récepteurs CB₁ et CB₂, mais avec l'avantage de déterminer de façon précise que les récepteurs CB₂ sont essentiels pour les effets anti-allodyniqummes du 2-AG et de l'URB602.

Malheureusement, notre étude ne permet pas de déterminer pourquoi les effets anti-allodyniqummes et anti-hyperalgésiques du 2-AG sont induits par l'intermédiaire de différents mécanismes d'action, ni si les effets observés résultent de l'activation ou l'inhibition d'autres cibles.

2.4 Conclusions préliminaires

Les résultats présentés dans les trois premiers articles de cette thèse démontrent que la modulation périphérique des endocannabinoïdes *via* l'inhibition de leur dégradation s'avère une cible thérapeutique fort intéressante dans le but d'améliorer les symptômes associés à la douleur inflammatoire (Article 1) et neuropathique (Articles 2 & 3). En effet, nos résultats suggèrent que l'augmentation des concentrations d'endocannabinoïdes de façon ciblée dans certains tissus et à certains moments précis peut minimiser les conséquences reliées à de telles pathologies. Cette observation est très intéressante puisqu'elle offre la possibilité de cibler les enzymes de dégradation des endocannabinoïdes en périphérie dans le but d'augmenter les concentrations locales de ces composés et d'activer les récepteurs cannabinoïdes localisés à ce niveau.

Bien que les inhibiteurs de la dégradation des endocannabinoïdes permettent d'augmenter leurs concentrations et d'induire des effets antinociceptifs, il est important de considérer que cette option n'est pas exclusive. En effet, la manipulation pharmacologique des endocannabinoïdes peut se faire à cinq niveaux: la synthèse, la libération, l'interaction avec les récepteurs, la recapture et le métabolisme (Fowler et coll., 2005). Ainsi, ces cinq étapes peuvent être combinées afin de mieux soulager les

symptômes associés aux douleurs inflammatoire et neuropathique. Les autres niveaux devront également être étudiés et considérés plus en détails afin d'améliorer les traitements concernant les douleurs inflammatoire et neuropathique.

Il est toutefois important de se rappeler que les endocannabinoïdes, plus particulièrement l'anandamide, interagissent avec d'autres cibles, et produisent quelquefois des effets pronociceptifs, notamment lors de l'activation des récepteurs TRPV1 par l'anandamide. De plus, même si nos travaux n'ont pas évalué la participation directe des récepteurs GPR55 dans la modulation périphérique du système endocannabinoïde, sa contribution ne doit pas être négligée. Il faut demeurer prudent et considérer qu'il existe de multiples voies de synthèse et de dégradation des endocannabinoïdes. Cette multiplicité peut alors minimiser l'impact de cette stratégie visant à élever les niveaux d'endocannabinoïdes et à activer les récepteurs cannabinoïdes, puisqu'en inhibant une voie de dégradation enzymatique d'autres voies alternatives peuvent s'activer (Starowicz & Di Marzo, 2013). Par conséquent, cette stratégie peut favoriser la formation d'autres molécules actives sur différentes cibles moléculaires, entraînant potentiellement des effets opposés aux effets souhaités (Petrosino & Di Marzo, 2010).

À la lumière de ces complications possibles, une approche intéressante pour bénéficier des effets antinociceptifs produits suite à la modulation périphérique du système endocannabinoïde repose sur le développement de modulateurs multi-cibles. En effet, une approche «polypharmacologique», ciblant à la fois les mécanismes de dégradation et de recapture des endocannabinoïdes par exemple, pourrait augmenter les concentrations d'endocannabinoïdes de façon plus ciblée, et être associée à peu ou pas d'effets indésirables (Starowicz & Di Marzo, 2013).

Le système cannabinoïde peut interagir avec plusieurs autres systèmes tels que les systèmes opioïde, GABAergique, glycinergique, dopaminergique, noradrénergique, sérotoninergique, cholinergique ou avec d'autres médiateurs (prostaglandines, etc.). Ainsi,

bien que l'inhibition des enzymes de dégradation offre des avantages certains au niveau périphérique, il serait encore plus intéressant de développer des substances multi-cibles qui modulent simultanément le système endocannabinoïde et certains autres de ses partenaires, tels que le système opioïde qui possède un système et des composés endogènes tels que les enképhalines, les dynorphines et les β -endorphines. Une meilleure connaissance des interactions bidirectionnelles entre ces deux systèmes pourrait donc être utile d'un point de vue thérapeutique.

3 IMPLICATION DU SYSTÈME ENDOCANNABINOÏDE DANS LES EFFETS ANTINOCICEPTIFS DE LA MORPHINE

La dernière partie de la discussion vise à déterminer si les systèmes opioïde et cannabinoïde peuvent interagir à différents niveaux du névraxe pour contrôler la douleur. Il existe actuellement plusieurs contradictions entre les études utilisant des outils pharmacologiques ou des approches génétiques. Bien que les expériences utilisant des outils pharmacologiques pour modifier la signalisation des cannabinoïdes aient suggéré que les endocannabinoïdes sont clairement impliqués dans les effets antinociceptifs des opioïdes (Maldonado & Valverde, 2003; Cichewicz, 2004), les études utilisant des souris dont les gènes encodant les récepteurs cannabinoïdes ont été invalidés ne confirment pas l'implication de ce système dans les effets induits par la morphine. Ainsi, le rôle et l'importance du système cannabinoïde dans les effets antinociceptifs des opioïdes demeurent incertains.

Des études antérieures utilisant des antagonistes sélectifs des récepteurs cannabinoïdes ont suggéré que les récepteurs CB₁ sont impliqués dans l'antinociception de la morphine au niveau périphérique (da Fonseca Pacheco et coll., 2008) et central (Pacheco Dda et coll., 2009) et que les récepteurs CB₂ sont partiellement impliqués dans ces effets au niveau local (da Fonseca Pacheco et coll., 2008). En revanche, les effets

antinociceptifs de la morphine administrée par voie systémique n'ont pas été affectés par l'invalidation des récepteurs CB₁ autant dans des modèles utilisant des stimuli nociceptifs chimiques (Miller et coll., 2011) que thermiques (Ledent et coll., 1999; Valverde et coll., 2000a; Miller et coll., 2011). En fait, les données sur le rôle des récepteurs CB₁ décrits dans les études pharmacologiques réalisées à l'aide de souris de type sauvage ne sont pratiquement jamais corroborées par des études utilisant des souris *cnr1KO* (Miller et coll., 2011; Raffa & Ward, 2012).

Fait important, de nombreuses études ont utilisé l'AM251, un antagoniste «sélectif» des récepteurs CB₁ pour étudier les interactions potentielles entre les récepteurs MOP et CB₁ (Trang et coll., 2007; da Fonseca Pacheco et coll., 2008; Haghparast et coll., 2009; Pacheco Dda et coll., 2009). Cependant, comme déjà indiqué, des publications récentes suggèrent que l'AM251 possède des actions antagonistes directes sur les récepteurs MOP (Seely et coll., 2012). En effet, la possibilité que les effets rapportés sur la fonction des récepteurs MOP dans les études précédentes ne soient pas entièrement induits par une action indirecte sur les récepteurs CB₁, mais aussi *via* une liaison directe sur les récepteurs MOP a été soulevée (Seely et coll., 2012). Ainsi, cette hypothèse permettrait de clarifier les divergences entre les approches pharmacologiques et génétiques (Miller et coll., 2011; Raffa & Ward, 2012). Par conséquent, il convient de demeurer prudent lors de l'interprétation des études antérieures utilisant des antagonistes cannabinoïdes pour étudier les interactions entre les systèmes opioïdes et cannabinoïdes (Raffa & Ward, 2012; Seely et coll., 2012; Zador et coll., 2012).

Nous avons donc évalué le rôle du système cannabinoïde dans les effets antinociceptifs du système opioïde suite à l'administration de morphine au niveau périphérique, spinal et systémique chez des souris dont les gènes encodant les récepteurs cannabinoïdes ont été invalidés (souris *cnr1KO* et *cnr2KO*) (Article 4). De ce fait, nos expériences réalisées chez les souris *knock-out* ne sont pas compliquées par les effets potentiellement confondants des antagonistes des récepteurs cannabinoïdes.

3.1 Au niveau périphérique et spinal

Dans notre étude, nous avons mis en évidence la participation du système cannabinoïde dans la modulation de la douleur inflammatoire lors de l'activation périphérique et spinale des récepteurs MOP par la morphine. Nos résultats montrent que l'inactivation des récepteurs CB₁ ou CB₂ diminue les effets analgésiques induits par la morphine administrée au niveau intraplantaire ou intrathécale dans le test à la formaline (Article 4). Nos résultats sont d'une grande importance car ils renforcent l'hypothèse que le système cannabinoïde est impliqué dans l'analgésie induite par les opioïdes et, par conséquent, que ces systèmes interagissent.

Il est possible de présumer que la perte d'efficacité de la morphine chez les souris *cnr1KO* et *cnr2KO* pourrait être la conséquence d'un effet direct de la morphine sur les récepteurs cannabinoïdes; dans notre cas les récepteurs sont invalidés donc les effets de la morphine seraient ainsi réduits. Ceci est cependant peu probable étant donné que les effets analgésiques de la morphine sont complètement abolis chez les souris MOPKO, démontrant que les effets de la morphine sont principalement produits suite à l'activation des récepteurs MOP *in vivo* (Matthes et coll., 1996; Sora et coll., 2001; Mizoguchi et coll., 2003).

Bien que nos expériences, effectuées à l'aide de souris *knock-out*, permettent d'exclure tout effet potentiellement confondant associé aux antagonistes des récepteurs cannabinoïdes, on ne peut pas prétendre que les souris génétiquement modifiées n'ont pas développé des modifications compensatoires (non identifiées) qui pourraient venir masquer le rôle des récepteurs cannabinoïdes (Miller et coll., 2011). L'implication réelle du système cannabinoïde dans les effets antinociceptifs de la morphine serait donc potentiellement masquée chez les souris *cnr1KO* par des modifications adaptatives (Miller et coll., 2011). Une diminution des niveaux des récepteurs MOP réduirait la capacité de ses ligands à inhiber la transmission de la douleur. De ce fait, nous avons également évalué si les souris *cnr1KO* et *cnr2KO* présentaient des altérations du profil d'expression

des récepteurs MOP, des modifications des propriétés de liaison ainsi que de l'efficacité du couplage des récepteurs MOP aux protéines G. Nos résultats ont permis de constater que la perte d'efficacité analgésique de la morphine n'était ni la conséquence d'une altération des niveaux et des profils d'expression des récepteurs MOP, ni des altérations des propriétés de liaison (B_{\max} et K_d similaires) et enfin non liée à la perte d'efficacité du couplage récepteurs/protéine G des récepteurs MOP (CE_{50} et E_{\max} similaires) au niveau spinal. Bien que nous n'ayons pas identifié les mécanismes exacts par lesquels les récepteurs cannabinoïdes influencent les effets antinociceptifs de la morphine, nos résultats soutiennent l'existence d'interactions fonctionnelles entre les systèmes cannabinoïde et opioïde, à tout le moins à la périphérie et dans la moelle épinière. D'autres modifications non identifiées sont peut-être présentes et ne peuvent pas être exclues, telles que des changements de l'activité des récepteurs MOP.

3.2 Au niveau systémique

3.2.1 Test à la formaline

Nous avons évalué la contribution des récepteurs CB_1 et CB_2 dans les effets antinociceptifs induits par l'administration systémique (sous-cutanée) de morphine puisque les récepteurs localisés au niveau du système nerveux central (substance grise périaqueducule, moelle rostrale ventromédiale) contribuent de manière significative aux effets analgésiques de la morphine (Fields, 2004) (voir l'introduction Section IV, 1.3.1). Nous avons observé que, contrairement à la morphine administrée au niveau périphérique et spinal, les effets antinociceptifs de la morphine administrée au niveau systémique sont préservés chez les souris *cnr1KO* et *cnr2KO* dans la phase inflammatoire du test à la formaline (Article 4). Ceci suggère par conséquent que les récepteurs cannabinoïdes ne contribuent pas de manière significative aux effets analgésiques de la morphine suite à son administration par voie systémique dans nos conditions expérimentales. Nos résultats diffèrent de l'étude de Pacheco et collaborateurs qui

montre que le système cannabinoïde est impliqué dans les effets induits par la morphine au niveau central (Pacheco Dda et coll., 2009), alors que nos résultats montrent une implication du système cannabinoïde uniquement au niveau périphérique et spinal. Toutefois, dans cette dernière étude la morphine était administrée par voie intracérébroventriculaire, ce qui peut expliquer cette différence. En effet, il est difficile d'interpréter ces résultats à l'heure actuelle. D'autres études sont nécessaires afin de déterminer avec précision les structures anatomiques responsables des effets de la morphine dans ces conditions expérimentales.

3.2.2 Test de retrait de la queue

Dans le but de confirmer les résultats obtenus avec le test à la formaline, nous avons utilisé le test de retrait de la queue suite à son immersion dans l'eau chaude (bain d'eau à 52°C) afin de mesurer les effets antinociceptifs de la morphine administrée de façon systémique à différentes doses. Encore une fois, nous avons observé que les effets antinociceptifs de la morphine administrée au niveau systémique sont préservés chez les souris *cnr1KO* et *cnr2KO* (Article 4). Nous avons utilisé ce test de douleur puisque les réponses comportementales observées suite à l'immersion de la queue dans l'eau chaude sont considérées comme un réflexe spinal, tandis que le test à la formaline implique un traitement au niveau supraspinal (Franklin & Abbott, 1990). Une étude a montré que les souris *cnr1KO* présentent une hypoalgésie dans le test à la formaline, alors que les comportements douloureux étaient normaux dans le test du retrait de la queue (Zimmer et coll., 1999). Ainsi, dans cette étude les souris *cnr1KO* semblaient être moins sensibles à la douleur (hypoalgésie) dans un test où les réponses nociceptives étaient intégrées au niveau supraspinal, donc nous voulions nous assurer que les différences observées dans notre étude n'étaient pas dues à une différence dans le traitement de la douleur par les animaux. Dans nos études, la morphine a été administrée par voie systémique, il est donc impossible de savoir avec précision où se situe le site de l'action analgésique.

3.3 Hypothèses concernant les différences

3.3.1 *Implication des voies sérotoninergiques et noradrénergiques dans les effets systémiques de la morphine*

À première vue, il peut sembler curieux que dans notre étude les effets analgésiques induits par l'injection de morphine au niveau systémique n'aient pas été affectés à la fois dans le test à la formaline et dans le test de retrait de la queue, alors qu'ils sont altérés suite à l'injection de morphine par voie périphérique ou spinale. Des études antérieures ont démontré que l'efficacité analgésique de la morphine requiert une activité à la fois au niveau des sites spinaux et supraspinaux (Siuciak & Advokat, 1989; Miaskowski et coll., 1993; Rossi et coll., 1993; Kolesnikov et coll., 1996). Une synergie analgésique entre des agonistes des récepteurs MOP et CB₁ a également été démontrée, contribuant aux effets antinociceptifs de la morphine (Tham et coll., 2005). Sur la base de ces études, il aurait été logique d'observer une atténuation de l'efficacité analgésique de la morphine administrée de façon systémique due à un manque et/ou une réduction de la contribution spinale. Nos observations suggèrent plutôt que la morphine administrée par voie systémique agit principalement par l'intermédiaire d'un réseau de neurones indépendants des récepteurs cannabinoïdes qui, par conséquent, ne sont pas altérés chez les souris *cnr1KO* et *cnr2KO*. Ainsi, la participation des récepteurs MOP spinaux dans les effets analgésiques de la morphine systémique serait minime, étant donné que les effets spinaux de la morphine sont altérés chez ces mêmes souris.

Afin d'appuyer cette hypothèse, une série d'études a montré que l'analgésie induite par l'administration de morphine au niveau systémique est principalement produite suite à l'activation de projections inhibitrices descendantes qui libèrent de la sérotonine dans la corne dorsale de la moelle épinière (Kuraishi et coll., 1983; Giordano & Barr, 1988; Dogrul & Seyrek, 2006; Dogrul et coll., 2009). Ces dernières études ont révélé que l'inhibition des récepteurs de la sérotonine au niveau spinal ou la déplétion pharmacologique de la sérotonine dans la moelle épinière atténue les effets analgésiques

de la morphine administrée de façon systémique et par voie intracérébroventriculaire, ainsi que l'analgésie induite par d'autres agonistes des récepteurs opioïdes tel que le tramadol (Yanarates et coll., 2010). Une autre étude a observé que la morphine administrée par voie systémique produit des effets antinociceptifs *via* l'activation des récepteurs 5-HT₇ par la sérotonine (Dogrul & Seyrek, 2006). Enfin, le rôle des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A} et 5-HT_{3/4} devrait également être évalué pour mieux comprendre nos résultats car ils sont d'importants modulateurs de l'analgésie spinale impliquant le système endocannabinoïde (Mallet et coll., 2008). Par ailleurs, une étude récente a démontré que des agonistes opioïdes administrés localement, soit le DAMGO (MOP), le SNC80 (DOP) ou la brémazocine (KOP) induisent une antinociception périphérique dans un modèle d'hyperalgésie suite à l'injection de prostaglandine E₂ dans la patte chez le rat. Ces effets antinociceptifs seraient induits suite à une libération de noradrénaline et d'une interaction avec les récepteurs adrénergiques (Romero et coll., 2012), ce qui vient renforcer le concept d'une participation distincte au niveau spinal pour la noradrénaline et la sérotonine dans les effets de la morphine. Par ailleurs, des études récentes ont révélé que les effets antinociceptifs périphériques de la morphine et du DAMGO sont réduits chez les souris déficientes en NO (Leanez et coll., 2009; Cunha et coll., 2010; Hervera et coll., 2011), suggérant que, outre le système opioïde, plusieurs autres systèmes sont probablement impliqués dans les effets de la morphine.

D'autres hypothèses ont également été avancées pour tenter d'expliquer les divergences entre les approches pharmacologiques et génétiques quant à l'implication du système endocannabinoïde dans les effets antinociceptifs induits par la morphine.

3.3.2 Modifications compensatoires chez les souris knock-out

Bien que nos résultats aient permis de constater que la perte d'efficacité analgésique de la morphine n'était ni la conséquence d'une altération des niveaux et des profils d'expression des récepteurs MOP, ni des propriétés de liaison et ni de l'efficacité

du couplage récepteurs/protéine G des récepteurs MOP au niveau spinal, les souris *cnr1KO* et *cnr2KO* peuvent présenter d'autres modifications compensatoires non identifiées (Miller et coll., 2011). Il a été montré que l'inactivation des récepteurs CB₁ ne modifie pas les niveaux d'ARNm des récepteurs MOP dans les ganglions de la racine dorsale et dans la moelle épinière de souris (Hojo et coll., 2008). En revanche, les souris *cnr1KO* présentent des concentrations cérébrales plus élevées de substance P, d'enképhalines et de dynorphines (Zimmer et coll., 1999). En ce qui concerne les opioïdes, cette observation pourrait indiquer un rôle potentiel pour les récepteurs CB₁ dans la régulation tonique de ces peptides plutôt qu'une conséquence d'un phénomène d'adaptation développementale.

Néanmoins, des changements adaptatifs dans l'expression des récepteurs opioïdes ont récemment été décrits chez des souris *cnr1KO* et *cnr2KO* dans des conditions de douleurs physiologiques et pathologiques (La Porta et coll., 2013). Ces auteurs ont noté une diminution des niveaux d'expression basale du gène des récepteurs DOP et KOP dans la moelle épinière chez les souris *cnr1KO*. Ces résultats pourraient être importants pour l'interprétation de nos données considérant les interactions entre les récepteurs MOP et DOP, et la formation d'hétérodimères (Gomes et coll., 2000). Ainsi, la perte d'efficacité analgésique de la morphine au niveau périphérique et spinal pourrait être due à l'absence des partenaires de MOP pour produire ses effets analgésiques. Par ailleurs, les interactions fonctionnelles entre les récepteurs CB₂ et le système opioïde endogène ont également été évaluées chez les souris *cnr2KO*. Chez ces souris, le niveau d'expression basal du gène des récepteurs MOP dans la moelle épinière était diminué (La Porta et coll., 2013). De plus, l'administration d'un antagoniste des récepteurs CB₂ a altéré les propriétés de liaison du DAMGO (Paldy et coll., 2008). Cette implication des récepteurs CB₂ sur la fonction des récepteurs MOP suggère un rôle dans le contrôle de la douleur dans les régions où les deux récepteurs CB₂ et MOP sont exprimés, telles que la substance grise périaqueducule (Gong et coll., 2006; Gray et coll., 2006). Cependant, les effets antinociceptifs de la morphine administrée par voie intrapéritonéale n'étaient pas

modifiés chez les souris *cnr2KO* (Ibrahim et coll., 2006). En accord avec nos résultats, ceci suggère que l'absence des récepteurs CB₂ ne produit pas une perturbation générale des effets antinociceptifs induits par la morphine.

3.3.3 Interactions directes entre récepteurs opioïdes et cannabinoïdes

À part les mécanismes d'adaptation, les interactions directes entre les récepteurs opioïde et cannabinoïde ainsi que celles entre leurs voies de signalisation intracellulaires sont d'autres mécanismes possibles qui pourraient perturber l'analgésie induite par la morphine chez les souris *cnr1KO* et *cnr2KO*. Une possibilité est que les systèmes cannabinoïde et opioïde interagissent *via* la formation d'hétérodimères, étant donné que les deux récepteurs appartiennent à la même famille des récepteurs couplés aux protéines G et qu'ils sont tous deux couplés à des mécanismes de signalisation intracellulaires similaires (Bidaut-Russell et coll., 1990; Childers et coll., 1992; Howlett, 1995). En théorie, la formation d'hétérodimères nécessite que les deux récepteurs soient colocalisés dans le même neurone *in vivo*. Ces deux systèmes partagent une distribution similaire dans plusieurs régions du cerveau et de la moelle épinière ainsi que dans les sites périphériques impliqués dans la modulation de la douleur (Di Marzo, 2008; Bodnar, 2012). Plus précisément, il a été démontré que les récepteurs CB₁ et MOP sont colocalisés dans les épines dendritiques du putamen caudé, la substance grise périaqueducale, la corne dorsale de la moelle épinière, les terminaisons présynaptiques ainsi que les lymphocytes T (Hohmann et coll., 1999a; Rodriguez et coll., 2001; Salio et coll., 2001; Pickel et coll., 2004; Vigano et coll., 2005; Kraus, 2012; Wilson-Poe et coll., 2012). Les récepteurs CB₁ et MOP peuvent interagir physiquement lorsqu'ils sont coexprimés dans les mêmes cellules, probablement *via* la formation d'hétérodimères (Rios et coll., 2006). Cette interaction physique a également été mise en évidence par un autre groupe qui a utilisé des approches électrophysiologiques afin de démontrer l'existence d'un hétérodimère MOP-CB₁ fonctionnel (Hojo et coll., 2008). Une autre étude a récemment décrit les interactions

fonctionnelles entre les récepteurs MOP et CB₂ situés au niveau du cerveau antérieur ainsi que l'impact de cette interaction sur la signalisation induite par un agoniste non sélectif pour les récepteurs cannabinoïdes, le noladin éther (Paldyova et coll., 2008).

Il y a des données appuyant l'idée que l'hétérodimérisation peut générer des récepteurs possédant de nouvelles propriétés pharmacologiques (Jordan & Devi, 1999; Bouvier, 2001; Devi, 2001). En effet, une altération de la signalisation induite par les récepteurs CB₁ à la suite de l'activation des récepteurs MOP (Rios et coll., 2006) ou une diminution de la fonction des récepteurs MOP induite par l'activité constitutive des récepteurs CB₁ (Canals & Milligan, 2008) ont été observées. De plus, une étude récente a démontré qu'il y a une diminution de l'activité des récepteurs DOP suite à leur interaction avec les récepteurs CB₁ (Bushlin et coll., 2012), suggérant ainsi que les récepteurs cannabinoïdes peuvent jouer un rôle important dans la régulation de la fonction des récepteurs opioïdes. De ce fait, l'impossibilité pour les récepteurs MOP de former des hétérodimères fonctionnels, par exemple chez les souris *cnr1KO* et *cnr2KO*, induirait une absence d'interactions directes entre récepteurs, conduisant à une diminution de l'activation des protéines G et une atténuation du signal intracellulaire. Ceci se traduirait par un manque d'efficacité analgésique de la morphine, tel qu'observé au niveau périphérique et spinal dans notre étude (Article 4).

Les récepteurs CB₁ et DOP peuvent également former des hétérodimères. Une étude récente a suggéré que l'hétérodimérisation affectait la signalisation des récepteurs CB₁ puisque la puissance du HU-210, un agoniste des récepteurs CB₁, à stimuler l'activité des protéines G était augmentée chez les souris DOPKO, suggérant que l'hétérodimérisation était responsable, du moins en partie, de la diminution de l'activité des récepteurs CB₁ en présence des récepteurs DOP (Rozenfeld et coll., 2012). Ces résultats suggèrent que les récepteurs DOP sont impliqués dans l'activation des récepteurs CB₁. Dans notre étude, la situation inverse aurait pu être observée: la signalisation des récepteurs MOP suite à l'injection périphérique ou spinale de morphine pourrait être diminuée ou perturbée en l'absence des récepteurs CB₁ et/ou CB₂ et, par

conséquent, les effets antinociceptifs de la morphine seraient diminués. Enfin, une étude récente très pertinente pour l'interprétation de nos résultats a montré que le KDN21, un ligand bivalent pour les hétérodimères DOP-KOP, a induit des effets antinociceptifs suite à son administration dans la moelle épinière, mais pas dans le cerveau, supportant l'hypothèse selon laquelle les niveaux relatifs d'hétérodimères varient dans différentes régions (Xie et coll., 2005). Par conséquent, d'autres études devront déterminer l'existence probable d'hétérodimères MOP-CB₁ et/ou MOP-CB₂ ainsi que leur localisation chez la souris pour évaluer si les récepteurs MOP et les deux récepteurs cannabinoïdes forment des hétérodimères au niveau périphérique et/ou spinal.

Dans la présente étude, nous avons toutefois démontré qu'il n'y avait pas de différences significatives dans le profil d'expression des récepteurs MOP au niveau spinal, ni dans ses propriétés de liaison chez les souris *cnr1KO* et *cnr2KO*. De plus, nous avons constaté que l'efficacité et la puissance de couplage des récepteurs spinaux MOP avec les protéines G est demeurée inchangée suite à l'inactivation des récepteurs CB₁ ou CB₂ (Article 4). Il est donc peu probable que la perte d'analgésie induite par la morphine chez les souris *cnr1KO* et *cnr2KO* soit une conséquence d'un dysfonctionnement des récepteurs spinaux MOP ou d'une régulation à la baisse en raison de l'absence d'hétérodimérisation des récepteurs MOP avec l'un ou l'autre des deux récepteurs cannabinoïdes. Cependant, notre modèle expérimental ne peut certes pas exclure la possibilité que les récepteurs cannabinoïdes peuvent interférer avec les voies de signalisation intracellulaires des récepteurs MOP, en aval des protéines G.

3.3.4 Libération d'endocannabinoïdes suite à l'activation du système opioïde

L'activation prolongée des récepteurs opioïdes altère le système cannabinoïde, en termes de fonctionnalité des récepteurs, de niveaux d'endocannabinoïdes (Gonzalez et coll., 2003; Vigano et coll., 2003), de densité des récepteurs cannabinoïdes et de

transduction des signaux (Rubino et coll., 1997; Gonzalez et coll., 2002), suggérant l'existence d'interactions entre ces deux systèmes.

Il a été démontré plus récemment que l'inverse est également possible, c'est-à-dire que des altérations du système opioïde pouvaient être observées suite à une exposition aux cannabinoïdes. En effet, une équipe a noté qu'un traitement aigu avec des cannabinoïdes provoque des modifications de l'expression de l'ARNm des récepteurs MOP et DOP ainsi que de l'activité fonctionnelle dans le cervelet de souris *cnr1WT* et *cnr1KO* (Paldyova et coll., 2007). De plus, une régulation à la hausse des récepteurs MOP et CB₁ a été observée suite à une exposition chronique aux cannabinoïdes et aux opioïdes (Fattore et coll., 2007). Un autre groupe a montré que l'activité constitutive des récepteurs CB₁ induit une diminution de la capacité des récepteurs MOP coexprimés à fonctionner (Canals & Milligan, 2008). Ces résultats suggèrent la présence d'interactions indirectes entre ces deux systèmes de signalisation et renforcent la présence d'interactions bidirectionnelles.

L'administration de cannabinoïdes influence l'expression et la libération de peptides opioïdes endogènes dans différentes structures du système nerveux central, ce qui contribuerait à certains effets pharmacologiques des cannabinoïdes. En outre, des études ont montré que l'administration intrathécale de Δ^9 -THC et d'autres agonistes cannabinoïdes augmente les niveaux extracellulaires de dynorphines *in vivo* dans la moelle épinière (Pugh et coll., 1996; Pugh et coll., 1997; Mason et coll., 1999a, b; Welch & Eads, 1999). Une étude a cependant observé que l'anandamide n'est pas capable d'induire une libération de dynorphines dans le système nerveux central (Houser et coll., 2000).

Il a été démontré que les kératinocytes expriment les récepteurs CB₂ (Casanova et coll., 2003) et contiennent les peptides endogènes opioïdes (Kausser et coll., 2003). L'activation périphérique des récepteurs CB₂ stimule la relâche locale de peptides opioïdes endogènes (β -endorphines) à partir de cellules telles que les kératinocytes (Ibrahim et coll., 2005). Ces auteurs ont montré que l'activation des récepteurs CB₂ situés sur les

kératinocytes par l'AM1241 (agoniste CB₂) entraîne la relâche de β -endorphines, qui stimulent les récepteurs opioïdes MOP localisés sur les neurones afférents primaires. Cependant, d'autres agonistes sélectifs pour les récepteurs CB₂ tels que l'A-796260 et le GW405833 ont montré une efficacité analgésique dans une série de modèles de douleur sans la participation des récepteurs opioïdes (Whiteside et coll., 2005; Yao et coll., 2008).

À l'inverse, l'administration d'opioïdes pourrait influencer l'expression et la libération de cannabinoïdes endogènes. Il a été démontré qu'un antagoniste des récepteurs CB₁ (AM251) peut inhiber les effets antinociceptifs induits par la morphine dans des modèles de douleur inflammatoire (da Fonseca Pacheco et coll., 2008; Pacheco Dda et coll., 2009) ainsi que dans un test de retrait de la queue chez la souris (Pacheco Dda et coll., 2009). Ces observations ont conduit à l'hypothèse que l'activation des récepteurs opioïdes MOP par la morphine induirait une libération locale d'endocannabinoïdes et que l'activation subséquente des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et/ou CB₂ au niveau périphérique ou central contribuerait aux effets antinociceptifs de la morphine. Cette même équipe a également montré que l'administration de méthyl arachidonoyl fluorophosphate (MAFP), un inhibiteur irréversible de la FAAH, a augmenté les effets antinociceptifs périphériques et centraux produits par une faible dose de morphine (da Fonseca Pacheco et coll., 2008; Pacheco Dda et coll., 2009).

Dans notre étude, le manque d'efficacité de la morphine au niveau périphérique et spinal pourrait être relié à la libération d'endocannabinoïde, qui en l'absence des récepteurs CB₁ et CB₂ ne pourraient plus participer aux effets antinociceptifs de la morphine.

3.3.5 Altérations du tonus endocannabinoïde chez les souris knock-out

Des changements du système endocannabinoïde sont fréquemment notés au cours de différents processus physiopathologiques. Nos observations pourraient être expliquées par le fait que les souris *knock-out* présentent des perturbations de leur tonus

endocannabinoïde, entravant la capacité de la morphine à produire ses effets analgésiques au niveau périphérique et spinal. Il a en fait été suggéré que les endocannabinoïdes sont impliqués dans les effets antinociceptifs induits par des injections de morphine au niveau local (da Fonseca Pacheco et coll., 2008) et intracérébroventriculaire (Pacheco Dda et coll., 2009). De plus, bien que les concentrations cérébrales d'endocannabinoïdes demeurent inchangées suite à une administration aiguë de morphine, un traitement chronique avec de la morphine produit une baisse généralisée des niveaux de 2-AG dans le cerveau, sans altérer les concentrations d'anandamide (Vigano et coll., 2003).

En accord avec l'hypothèse que les endocannabinoïdes jouent un rôle dans les effets antinociceptifs de la morphine au niveau périphérique et spinal, nous avons noté des différences dans les deux phases du test à la formaline entre les souris *cnr1KO* et *cnr2KO*. Dans notre étude, l'efficacité analgésique de la morphine administrée par voie périphérique ou spinale a été diminuée chez les souris *cnr1KO* dans les deux phases du test à la formaline, alors que nous avons noté une perte d'efficacité de la morphine uniquement dans la phase inflammatoire chez les souris *cnr2KO*. Au cours de la seconde phase du test à la formaline, l'activité des fibres afférentes primaires est accompagnée d'un phénomène d'inflammation et d'une sensibilisation centrale des circuits nociceptifs dans la moelle épinière (Coderre & Melzack, 1992; Puig & Sorkin, 1996). De ce fait, une interprétation possible de nos résultats est que suite à l'administration périphérique et spinale de morphine, l'anandamide est rapidement libérée pour activer les récepteurs CB₁, participant ainsi à l'atténuation des premiers stades de la nociception dans le test à la formaline. En revanche, une libération endogène plus tardive de 2-AG produirait un effet modulateur plus soutenu sur la douleur inflammatoire *via* l'activation des récepteurs CB₁ et CB₂ au cours de la seconde phase du test à la formaline.

Section IX. Conclusion et perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse démontrent que la modulation périphérique du système endocannabinoïde *via* l'inhibition des enzymes de dégradation telles que la FAAH et la MAGL s'avère une cible prometteuse dans le traitement des douleurs inflammatoire et neuropathique. À l'aide d'approches pharmacologiques et génétiques, nous avons démontré que ces effets antinociceptifs sont produits suite à l'activation locale des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂. Cette action ciblée en périphérie permet de dissocier les effets thérapeutiques des cannabinoïdes de leurs effets indésirables au niveau du système nerveux central. Par ailleurs, nous avons démontré une partie de l'importance du système cannabinoïde dans la modulation des effets antinociceptifs produits par l'activation des récepteurs opioïdes MOP. En effet, nous avons démontré que les effets antinociceptifs de la morphine administrée par voie intraplantaire et spinale sont diminués chez les souris *cnr1KO* et *cnr2KO*, alors que les effets systémiques sont préservés. Ces résultats sont d'un grand intérêt car ils supportent l'hypothèse que le système cannabinoïde est impliqué dans l'analgésie induite par les opioïdes et, par conséquent, que ces systèmes interagissent entre eux.

Les endocannabinoïdes sont des médiateurs produits à la demande, ce qui leur permet en théorie d'agir spécifiquement dans les tissus impliqués dans des processus physiologiques et pathologiques (Ligresti et coll., 2009; Pacher & Kunos, 2013). Suite à l'inhibition de leur métabolisme, les effets produits suite à l'activation des récepteurs CB₁ et CB₂ se prolongent sur certains tissus ciblés (Bisogno & Maccarrone, 2013; Mulvihill & Nomura, 2013). Cependant, des complications peuvent être associées à l'inhibition de ces enzymes, telles qu'une activation indirecte de récepteurs impliqués dans la modulation du processus nociceptif et en particuliers les récepteurs TRPV1, ce qui peut interférer avec l'action analgésique souhaitée des endocannabinoïdes (Maione et coll., 2013). De plus, des données récentes indiquent que l'anandamide et le 2-AG sont métabolisés par la COX-2 en dérivés oxygénés des prostaglandines (Glaser & Kaczocha, 2010; Gatta et coll., 2012).

Ces composés exercent généralement des effets pronociceptifs et pro-inflammatoires *via* d'autres récepteurs non cannabinoïdes. De ce fait, l'inhibition de la FAAH et de la MAGL pourraient causer un métabolisme des endocannabinoïdes vers ces voies de dégradation, contrecarrant ainsi l'activation indirecte des récepteurs cannabinoïdes et leurs effets bénéfiques attendus (Di Marzo, 2012; Piscitelli & Di Marzo, 2012).

Désormais, il est clair que le concept initial du «système endocannabinoïde» incluant les endocannabinoïdes, leurs enzymes de dégradation ainsi que les récepteurs CB₁ et CB₂ a évolué vers un système beaucoup plus complexe, comprenant les endocannabinoïdes mais également des médiateurs similaires aux endocannabinoïdes ou *endocannabinoid-like mediators* (ELM), leurs enzymes de dégradation souvent redondantes (Piscitelli & Di Marzo, 2012) ainsi que des cibles moléculaires communes (Maione et coll., 2013). Compte tenu de ces récents développements, il est évident que la manipulation pharmacologique des niveaux d'endocannabinoïdes à des fins thérapeutiques, initialement considérée comme une alternative plus sûre pour cibler directement les récepteurs CB₁ et CB₂ (Di Marzo, 2008), pose désormais de nouveaux défis. Cette complexité suggère de nouvelles possibilités pour le développement de nouveaux analgésiques modulant de façon simultanée plusieurs cibles thérapeutiques. Récemment, une étude clinique de phase II utilisant le PF-04457845, un inhibiteur irréversible de la FAAH, n'a pas montré d'effets analgésiques chez des patient souffrant de douleurs ostéoarthritiques (Huggins et coll., 2012). Par ailleurs, le développement de l'OMDM198 (Morera et coll., 2009), un inhibiteur des récepteurs TRPV1 et de la FAAH, montre qu'un composé basé sur le concept de thérapie multi-cibles peut être efficace pour soulager la douleur tout en présentant moins d'effets indésirables.

Des études supplémentaires doivent être réalisées afin de mieux comprendre quels sont les mécanismes impliqués dans les effets des cannabinoïdes, d'étudier l'administration chronique de ces composés et de développer des composés restreints à la périphérie dans le but ultime de traduire toutes ces connaissances vers le développement de nouveaux analgésiques présentant de meilleurs profils d'effets bénéfiques. Les études

sur les endocannabinoïdes ont démontré qu'ils sont présents dans la plupart des tissus et que dans certains états douloureux, comme la douleur neuropathique, les niveaux d'endocannabinoïdes sont élevés dans des sites clés impliqués dans le traitement de la douleur. D'un point de vue thérapeutique, il sera également important d'identifier les tissus où une augmentation des niveaux d'endocannabinoïdes est souhaitable (Miller 2011; Pertwee 2012) et de comprendre les mécanismes qui sous-tendent ces modifications, par exemple, si l'augmentation des niveaux d'endocannabinoïdes dans certains tissus précis est due à une augmentation de leur biosynthèse ou au contraire à une diminution de leur dégradation enzymatique (Pacher & Kunos, 2013). Les connaissances des mécanismes qui permettent la régulation à la hausse des récepteurs seraient également utilisées pour concevoir des thérapies spécialisées afin d'accroître l'expression locale des récepteurs et ainsi potentiellement augmenter l'efficacité des agonistes ciblant ces récepteurs.

Les perspectives de recherche découlant de nos travaux afin de moduler les différentes composantes du système endocannabinoïde sont multiples. D'une part, il serait intéressant d'identifier quelles cibles pourraient être combinées avec des inhibiteurs de la dégradation des endocannabinoïdes afin de produire des effets analgésiques optimaux. D'autre part, il serait intéressant d'approfondir les connaissances quant aux mécanismes par lesquels les systèmes opioïde et cannabinoïde interagissent entre eux afin de créer des ligands présentant de meilleures propriétés analgésiques :

- Nous avons vu que le système endocannabinoïde interagit avec d'autres partenaires, tels que le système opioïde qui possède aussi un système endogène incluant, entre autres, les enképhalines, les dynorphines et les β -endorphines. Il serait donc intéressant de développer des substances multi-cibles qui moduleraient simultanément les systèmes endocannabinoïde et opioïde endogène. Récemment, un groupe a développé des inhibiteurs doubles (DENK) des enképhalines, permettant d'élever les

concentrations locales d'enképhalines et ainsi produire des effets antinociceptifs très intéressants dans différents modèles de douleur (Roques et coll., 2012b). Étant donné que les systèmes cannabinoïde et opioïde peuvent interagir à plusieurs niveaux et produire des effets additifs et synergiques, il serait fort intéressant d'administrer en combinaison des inhibiteurs des enképhalinases et des inhibiteurs de la FAAH ou de la MAGL afin de produire des effets antinociceptifs ciblés et potentiellement synergiques dans des tissus cibles.

- Nous avons vu que les interactions bidirectionnelles entre les systèmes opioïde et cannabinoïde ainsi que les complexes formés par leurs récepteurs créent de nouvelles propriétés pharmacologiques qui doivent être étudiées plus attentivement. Il serait donc intéressant d'étudier la localisation précise des hétérodimères des récepteurs MOP avec les récepteurs cannabinoïdes, notamment à l'aide d'anticorps dirigés contre des dimères de récepteurs couplés aux protéines G, afin de localiser *in vivo* des hétérodimères spécifiques dans certains tissus (Hipsler et coll., 2010; Gomes et coll., 2013). Il serait également intéressant de développer des ligands bivalents aux hétérodimères MOP-CB₁ et MOP-CB₂ afin de créer de nouveaux analgésiques présentant une meilleure sélectivité tissulaire et un meilleur profil d'effets indésirables.

Actuellement, les possibilités sont multiples puisque l'étude du système cannabinoïde est en plein essor et que les études actuelles commencent à peine à le caractériser en raison de sa complexité évidente. Les prochaines années permettront de mieux définir le rôle et l'importance de ce système et d'évaluer son potentiel thérapeutique dans diverses pathologies.

Section X. Bibliographie

Abel EL (1980). *Marijuana : The first twelve thousand years*. New York: Plenum Press.

Abrams DI, Couey P, Shade SB, Kelly ME, Benowitz NL. (2011). Cannabinoid-opioid interaction in chronic pain. *Clin Pharmacol Ther* 90: 844-851.

Acosta CG, Lopez HS. (1999). delta opioid receptor modulation of several voltage-dependent Ca(2+) currents in rat sensory neurons. *J Neurosci* 19: 8337-8348.

Adams IB, Compton DR, Martin BR. (1998). Assessment of anandamide interaction with the cannabinoid brain receptor: SR 141716A antagonism studies in mice and autoradiographic analysis of receptor binding in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 284: 1209-1217.

Adams IB, Martin BR. (1996). Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* 91: 1585-1614.

Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, Amaya F, Constantin CE, Brenner GJ, *et al.* (2007). Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci* 10: 870-879.

Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S, Nagy I. (2000). Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience* 100: 685-688.

Ahmed MM, Rajpal S, Sweeney C, Gerovac TA, Allcock B, McChesney S, *et al.* (2010). Cannabinoid subtype-2 receptors modulate the antihyperalgesic effect of WIN 55,212-2 in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *Spine J* 10: 1049-1054.

Ahn K, McKinney MK, Cravatt BF. (2008). Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem Rev* 108: 1687-1707.

Akil H, Owens C, Gutstein H, Taylor L, Curran E, Watson S. (1998). Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend* 51: 127-140.

Akopian AN, Ruparel NB, Patwardhan A, Hargreaves KM. (2008). Cannabinoids desensitize capsaicin and mustard oil responses in sensory neurons via TRPA1 activation. *J Neurosci* 28: 1064-1075.

Alger BE. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol* 68: 247-286.

Alhouayek M, Muccioli GG. (2012). The endocannabinoid system in inflammatory bowel diseases: from pathophysiology to therapeutic opportunity. *Trends Mol Med* 18: 615-625.

Alsasua del Valle A. (2006). Implication of cannabinoids in neurological diseases. *Cell Mol Neurobiol* 26: 579-591.

Amaya F, Shimosato G, Kawasaki Y, Hashimoto S, Tanaka Y, Ji RR, *et al.* (2006). Induction of CB1 cannabinoid receptor by inflammation in primary afferent neurons facilitates antihyperalgesic effect of peripheral CB1 agonist. *Pain* 124: 175-183.

- Ambrosino P, Soldovieri MV, Russo C, Tagliatela M. (2013). Activation and desensitization of TRPV1 channels in sensory neurons by the PPARalpha agonist palmitoylethanolamide. *Br J Pharmacol* 168: 1430-1444.
- Amir R, Devor M. (1992). Axonal cross-excitation in nerve-end neuromas: comparison of A- and C-fibers. *J Neurophysiol* 68: 1160-1166.
- Amir R, Kocsis JD, Devor M. (2005). Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons. *J Neurosci* 25: 2576-2585.
- Anand P, Whiteside G, Fowler CJ, Hohmann AG. (2009). Targeting CB2 receptors and the endocannabinoid system for the treatment of pain. *Brain Res Rev* 60: 255-266.
- Anand U, Otto WR, Sanchez-Herrera D, Facer P, Yiangou Y, Korchev Y, *et al.* (2008). Cannabinoid receptor CB2 localisation and agonist-mediated inhibition of capsaicin responses in human sensory neurons. *Pain* 138: 667-680.
- Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK. (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* 9: 463-484.
- Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S, Lee JH, Nakano AH, Dado RJ, *et al.* (1995). Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J Neurosci* 15: 3328-3341.
- Ashton CH. (2001). Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *Br J Psychiatry* 178: 101-106.
- Ashton JC, Friberg D, Darlington CL, Smith PF. (2006). Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci Lett* 396: 113-116.
- Atwood BK, Mackie K. (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol* 160: 467-479.
- Atwood BK, Straiker A, Mackie K. (2012a). CB(2) cannabinoid receptors inhibit synaptic transmission when expressed in cultured autaptic neurons. *Neuropharmacology* 63: 514-523.
- Atwood BK, Straiker A, Mackie K. (2012b). CB(2): therapeutic target-in-waiting. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 38: 16-20.
- Atwood BK, Wager-Miller J, Haskins C, Straiker A, Mackie K. (2012c). Functional selectivity in CB(2) cannabinoid receptor signaling and regulation: implications for the therapeutic potential of CB(2) ligands. *Mol Pharmacol* 81: 250-263.
- Bachur NR, Masek K, Melmon KL, Udenfriend S. (1965). Fatty Acid Amides of Ethanolamine in Mammalian Tissues. *J Biol Chem* 240: 1019-1024.
- Bahia PK, Suzuki R, Benton DC, Jowett AJ, Chen MX, Trezise DJ, *et al.* (2005). A functional role for small-conductance calcium-activated potassium channels in sensory pathways including nociceptive processes. *J Neurosci* 25: 3489-3498.
- Bailey PL, Egan TD, Stanley TH (2000). Intravenous opioid anesthetics. Dans: Miller RD, (éd). *Anesthesia*, 5th edition. New York: Churchill Livingstone: 273-376.

- Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Makriyannis A, *et al.* (2001). Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J* 15: 300-302.
- Balducci C, Nervegna G, Cecinato A. (2009). Evaluation of principal cannabinoids in airborne particulates. *Anal Chim Acta* 641: 89-94.
- Barann M, Molderings G, Bruss M, Bonisch H, Urban BW, Gothert M. (2002). Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT_{3A} receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *Br J Pharmacol* 137: 589-596.
- Baron R, Binder A, Wasner G. (2010). Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol* 9: 807-819.
- Basavarajappa BS. (2007). Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Lett* 14: 237-246.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139: 267-284.
- Basbaum AI, Fields HL. (1978). Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Ann Neurol* 4: 451-462.
- Basbaum AI, Fields HL. (1984). Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 7: 309-338.
- Beaudry H, Dubois D, Gendron L. (2011). Activation of spinal mu- and delta-opioid receptors potently inhibits substance P release induced by peripheral noxious stimuli. *J Neurosci* 31: 13068-13077.
- Beaulieu P. (2006). Effects of nabilone, a synthetic cannabinoid, on postoperative pain. *Can J Anaesth* 53: 769-775.
- Beaulieu P (2013). *La Douleur : Guide pharmacologique et thérapeutique*. Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal.
- Beaulieu P, Bisogno T, Punwar S, Farquhar-Smith WP, Ambrosino G, Di Marzo V, *et al.* (2000). Role of the endogenous cannabinoid system in the formalin test of persistent pain in the rat. *Eur J Pharmacol* 396: 85-92.
- Beedle AM, McRory JE, Poirot O, Doering CJ, Altier C, Barrere C, *et al.* (2004). Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nat Neurosci* 7: 118-125.
- Begg M, Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Mo FM, *et al.* (2005). Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* 106: 133-145.
- Beltramo M, Bernardini N, Bertorelli R, Campanella M, Nicolussi E, Fredduzzi S, *et al.* (2006). CB₂ receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *Eur J Neurosci* 23: 1530-1538.
- Beltramo M, Piomelli D. (2000). Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylethanolamide. *Neuroreport* 11: 1231-1235.

- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277: 1094-1097.
- 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.
- Berdyshev E, Boichot E, Corbel M, Germain N, Lagente V. (1998). Effects of cannabinoid receptor ligands on LPS-induced pulmonary inflammation in mice. *Life Sci* 63: PL125-129.
- Berdyshev EV. (2000). Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem Phys Lipids* 108: 169-190.
- Berg KA, Patwardhan AM, Sanchez TA, Silva YM, Hargreaves KM, Clarke WP. (2007). Rapid modulation of micro-opioid receptor signaling in primary sensory neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 839-847.
- Besse D, Lombard MC, Perrot S, Besson JM. (1992). Regulation of opioid binding sites in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord following loose ligation of the sciatic nerve: comparison with sciatic nerve section and lumbar dorsal rhizotomy. *Neuroscience* 50: 921-933.
- Bidaut-Russell M, Devane WA, Howlett AC. (1990). Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain. *J Neurochem* 55: 21-26.
- Bingham B, Jones PG, Uveges AJ, Kotnis S, Lu P, Smith VA, *et al.* (2007). Species-specific in vitro pharmacological effects of the cannabinoid receptor 2 (CB2) selective ligand AM1241 and its resolved enantiomers. *Br J Pharmacol* 151: 1061-1070.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, *et al.* (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163: 463-468.
- Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. (2005). The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 224-238.
- Bisogno T, Maccarrone M. (2013). Latest advances in the discovery of fatty acid amide hydrolase inhibitors. *Expert Opin Drug Discov*
- Bisogno T, MacCarrone M, De Petrocellis L, Jarraghan A, Finazzi-Agro A, Hillard C, *et al.* (2001). The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem* 268: 1982-1989.
- Bisogno T, Ortar G, Petrosino S, Morera E, Palazzo E, Nalli M, *et al.* (2009). Development of a potent inhibitor of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis with antinociceptive activity in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1791: 53-60.
- Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol* 14: 1347-1356.
- Bloom AS, Dewey WL. (1978). A comparison of some pharmacological actions of morphine and delta9-tetrahydrocannabinol in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 57: 243-248.
- Bodnar RJ. (2012). Endogenous opiates and behavior: 2011. *Peptides* 38: 463-522.

Boger DL, Miyauchi H, Du W, Hardouin C, Fecik RA, Cheng H, *et al.* (2005). Discovery of a potent, selective, and efficacious class of reversible alpha-ketoheterocycle inhibitors of fatty acid amide hydrolase effective as analgesics. *J Med Chem* 48: 1849-1856.

Bolognini D, Cascio MG, Parolaro D, Pertwee RG. (2012). AM630 behaves as a protean ligand at the human cannabinoid CB2 receptor. *Br J Pharmacol* 165: 2561-2574.

Bosier B, Muccioli GG, Hermans E, Lambert DM. (2010). Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities. *Biochem Pharmacol* 80: 1-12.

Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, *et al.* (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 312 (Pt 2): 637-641.

Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, *et al.* (1996). Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem* 237: 704-711.

Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D, *et al.* (1993). Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur J Biochem* 214: 173-180.

Bouhassira D (2009). Mécanismes physiopathologiques des douleurs neuropathiques. Dans: Bouhassira D, Calvino B, (éd). *Douleurs: physiologie, physiopathologie et pharmacologie*. France: Arnette: 145-161.

Boulanger A (2005). Approche et traitement de la douleur neuropathique. Dans: Beaulieu P, (éd). *Pharmacologie de la douleur*. Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal: 405-437.

Boulanger A, Arsenault P, Béland A, Bélanger A, Cloutier C, Dion D, *et al.* (2008). Algorithme de traitement de la douleur neuropathique: recommandations d'un forum québécois sur la douleur neuropathique. *L'Actualité médicale* 29: 1-12.

Boulanger A, Beaulieu P (2010). Pharmacologie des analgésiques. Dans: Beaulieu P, Lambert C, (éd). *Précis de Pharmacologie*. Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal: 373-401.

Bouvier M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2: 274-286.

Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR. (2001). Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* 60: 155-163.

Bridges D, Ahmad K, Rice AS. (2001a). The synthetic cannabinoid WIN55,212-2 attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 133: 586-594.

Bridges D, Thompson SW, Rice AS. (2001b). Mechanisms of neuropathic pain. *Br J Anaesth* 87: 12-26.

Brown AJ. (2007). Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 152: 567-575.

Buckley NE. (2008). The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update. *Br J Pharmacol* 153: 309-318.

- Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, *et al.* (2000). Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur J Pharmacol* 396: 141-149.
- Burns TL, Ineck JR. (2006). Cannabinoid analgesia as a potential new therapeutic option in the treatment of chronic pain. *Ann Pharmacother* 40: 251-260.
- Burstein S. (2005). PPAR-gamma: a nuclear receptor with affinity for cannabinoids. *Life Sci* 77: 1674-1684.
- Burstein SH, Rossetti RG, Yagen B, Zurier RB. (2000). Oxidative metabolism of anandamide. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 61: 29-41.
- Bushlin I, Gupta A, Stockton SD, Jr., Miller LK, Devi LA. (2012). Dimerization with cannabinoid receptors allosterically modulates delta opioid receptor activity during neuropathic pain. *PLoS One* 7: e49789.
- Bushlin I, Rozenfeld R, Devi LA. (2010). Cannabinoid-opioid interactions during neuropathic pain and analgesia. *Curr Opin Pharmacol* 10: 80-86.
- Cabral GA, Griffin-Thomas L. (2008). Cannabinoids as therapeutic agents for ablating neuroinflammatory disease. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8: 159-172.
- Cabral GA, Griffin-Thomas L. (2009). Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev Mol Med* 11: e3.
- Cabral GA, Harmon KN, Carlisle SJ. (2001). Cannabinoid-mediated inhibition of inducible nitric oxide production by rat microglial cells: evidence for CB1 receptor participation. *Adv Exp Med Biol* 493: 207-214.
- Cabral GA, Raborn ES, Griffin L, Dennis J, Marciano-Cabral F. (2008). CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol* 153: 240-251.
- Cadas H, di Tomaso E, Piomelli D. (1997). Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci* 17: 1226-1242.
- Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci* 16: 3934-3942.
- Cain DM, Wacnik PW, Turner M, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Wilcox GL, *et al.* (2001). Functional interactions between tumor and peripheral nerve: changes in excitability and morphology of primary afferent fibers in a murine model of cancer pain. *J Neurosci* 21: 9367-9376.
- Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394: 277-281.
- Calvino B (2009). Physiopathologie des douleurs inflammatoires. Dans: Bouhassira D, Calvino B, (éd). *Douleurs: physiologie, physiopathologie et pharmacologie*. France: Arnette: 135-144.
- Calvino B, Grilo RM. (2006). Central pain control. *Joint Bone Spine* 73: 10-16.
- Calvo CF, Cesselin F, Gelman M, Glowinski J. (2000). Identification of an opioid peptide secreted by rat embryonic mixed brain cells as a promoter of macrophage migration. *Eur J Neurosci* 12: 2676-2684.

- Calvo M, Dawes JM, Bennett DL. (2012). The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *Lancet Neurol* 11: 629-642.
- Campbell FA, Tramer MR, Carroll D, Reynolds DJ, Moore RA, McQuay HJ. (2001). Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review. *BMJ* 323: 13-16.
- Canals M, Milligan G. (2008). Constitutive activity of the cannabinoid CB1 receptor regulates the function of co-expressed Mu opioid receptors. *J Biol Chem* 283: 11424-11434.
- Cantarella G, Scollo M, Lempereur L, Sacconi-Jotti G, Basile F, Bernardini R. (2011). Endocannabinoids inhibit release of nerve growth factor by inflammation-activated mast cells. *Biochem Pharmacol* 82: 380-388.
- Caprioli A, Coccorello R, Rapino C, Di Serio S, Di Tommaso M, Vertechy M, *et al.* (2012). The novel reversible fatty acid amide hydrolase inhibitor ST4070 increases endocannabinoid brain levels and counteracts neuropathic pain in different animal models. *J Pharmacol Exp Ther* 342: 188-195.
- Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, *et al.* (2004). Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 65: 999-1007.
- Casanova ML, Blazquez C, Martinez-Palacio J, Villanueva C, Fernandez-Acenero MJ, Huffman JW, *et al.* (2003). Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest* 111: 43-50.
- Castane A, Celerier E, Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, *et al.* (2006). Development and expression of neuropathic pain in CB1 knockout mice. *Neuropharmacology* 50: 111-122.
- Castane A, Robledo P, Matifas A, Kieffer BL, Maldonado R. (2003). Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in double mu and delta opioid receptor knockout mice. *Eur J Neurosci* 17: 155-159.
- Castillo PE, Younts TJ, Chavez AE, Hashimoto Y. (2012). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron* 76: 70-81.
- Caterina MJ, Julius D. (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 24: 487-517.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824.
- Cavanaugh DJ, Chesler AT, Braz JM, Shah NM, Julius D, Basbaum AI. (2011). Restriction of transient receptor potential vanilloid-1 to the peptidergic subset of primary afferent neurons follows its developmental downregulation in nonpeptidergic neurons. *J Neurosci* 31: 10119-10127.
- Chang JW, Niphakis MJ, Lum KM, Cognetta AB, 3rd, Wang C, Matthews ML, *et al.* (2012). Highly selective inhibitors of monoacylglycerol lipase bearing a reactive group that is bioisosteric with endocannabinoid substrates. *Chem Biol* 19: 579-588.
- Chang L, Luo L, Palmer JA, Sutton S, Wilson SJ, Barbier AJ, *et al.* (2006). Inhibition of fatty acid amide hydrolase produces analgesia by multiple mechanisms. *Br J Pharmacol* 148: 102-113.

Chauvin M, Beaulieu P (2005). Pharmacologie des opioïdes. Dans: Beaulieu P, (éd). *Pharmacologie de la douleur*. Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal: 39-77.

Chen BC, Hoffman RS. (2012). The role of cannabinoids in chronic pain patients remains hazy. *Clin Pharmacol Ther* 91: 972; author reply 972-973.

Chen SR, Sweigart KL, Lakoski JM, Pan HL. (2002). Functional mu opioid receptors are reduced in the spinal cord dorsal horn of diabetic rats. *Anesthesiology* 97: 1602-1608.

Chen Y, Mestek A, Liu J, Yu L. (1993). Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem J* 295 (Pt 3): 625-628.

Cheng PY, Liu-Chen LY, Pickel VM. (1997). Dual ultrastructural immunocytochemical labeling of mu and delta opioid receptors in the superficial layers of the rat cervical spinal cord. *Brain Res* 778: 367-380.

Chevalyere V, Takahashi KA, Castillo PE. (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 29: 37-76.

Chicca A, Marazzi J, Nicolussi S, Gertsch J. (2012). Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. *J Biol Chem* 287: 34660-34682.

Childers SR, Fleming L, Konkoy C, Marckel D, Pacheco M, Sexton T, *et al.* (1992). Opioid and cannabinoid receptor inhibition of adenylyl cyclase in brain. *Ann N Y Acad Sci* 654: 33-51.

Choi S, Lovinger DM. (1996). Metabotropic glutamate receptor modulation of voltage-gated Ca²⁺ channels involves multiple receptor subtypes in cortical neurons. *J Neurosci* 16: 36-45.

Cichewicz DL. (2004). Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. *Life Sci* 74: 1317-1324.

Cichewicz DL, Martin ZL, Smith FL, Welch SP. (1999). Enhancement mu opioid antinociception by oral delta9-tetrahydrocannabinol: dose-response analysis and receptor identification. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 859-867.

Cichewicz DL, McCarthy EA. (2003). Antinociceptive synergy between delta(9)-tetrahydrocannabinol and opioids after oral administration. *J Pharmacol Exp Ther* 304: 1010-1015.

Cichewicz DL, Welch SP. (2003). Modulation of oral morphine antinociceptive tolerance and naloxone-precipitated withdrawal signs by oral Delta 9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 812-817.

Cichewicz DL, Welch SP, Smith FL. (2005). Enhancement of transdermal fentanyl and buprenorphine antinociception by transdermal delta9-tetrahydrocannabinol. *Eur J Pharmacol* 525: 74-82.

Clapper JR, Moreno-Sanz G, Russo R, Guijarro A, Vacondio F, Duranti A, *et al.* (2010). Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat Neurosci* 13: 1265-1270.

Clarke RW, Harris J, Jenkins S, Witton SK. (2001). Cannabinoidergic and opioidergic inhibition of spinal reflexes in the decerebrated, spinalized rabbit. *Neuropharmacology* 40: 570-577.

Clayton N, Marshall FH, Bountra C, O'Shaughnessy CT. (2002). CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. *Pain* 96: 253-260.

- Clement AB, Hawkins EG, Lichtman AH, Cravatt BF. (2003). Increased seizure susceptibility and proconvulsant activity of anandamide in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *J Neurosci* 23: 3916-3923.
- Coderre TJ, Fundytus ME, McKenna JE, Dalal S, Melzack R. (1993). The formalin test: a validation of the weighted-scores method of behavioural pain rating. *Pain* 54: 43-50.
- Coderre TJ, Katz J. (1997). Peripheral and central hyperexcitability: differential signs and symptoms in persistent pain. *Behav Brain Sci* 20: 404-419; discussion 435-513.
- Coderre TJ, Melzack R. (1992). The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci* 12: 3665-3670.
- Comelli F, Giagnoni G, Bettoni I, Colleoni M, Costa B. (2007). The inhibition of monoacylglycerol lipase by URB602 showed an anti-inflammatory and anti-nociceptive effect in a murine model of acute inflammation. *Br J Pharmacol* 152: 787-794.
- Connell K, Bolton N, Olsen D, Piomelli D, Hohmann AG. (2006). Role of the basolateral nucleus of the amygdala in endocannabinoid-mediated stress-induced analgesia. *Neurosci Lett* 397: 180-184.
- Corchero J, Avila MA, Fuentes JA, Manzanares J. (1997). delta-9-Tetrahydrocannabinol increases prodynorphin and proenkephalin gene expression in the spinal cord of the rat. *Life Sci* 61: PL 39-43.
- Corchero J, Manzanares J, Fuentes JA. (2004). Cannabinoid/opioid crosstalk in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol* 16: 159-172.
- Corchero J, Manzanares J, Fuentes JA. (1999a). Repeated administration of delta9-tetrahydrocannabinol produces a differential time related responsiveness on proenkephalin, proopiomelanocortin and corticotropin releasing factor gene expression in the hypothalamus and pituitary gland of the rat. *Neuropharmacology* 38: 433-439.
- Corchero J, Romero J, Berrendero F, Fernandez-Ruiz J, Ramos JA, Fuentes JA, *et al.* (1999b). Time-dependent differences of repeated administration with Delta9-tetrahydrocannabinol in proenkephalin and cannabinoid receptor gene expression and G-protein activation by mu-opioid and CB1-cannabinoid receptors in the caudate-putamen. *Brain Res Mol Brain Res* 67: 148-157.
- Costigan M, Befort K, Karchewski L, Griffin RS, D'Urso D, Allchorne A, *et al.* (2002). Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *BMC Neurosci* 3: 16.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 32: 1-32.
- Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, *et al.* (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424: 938-942.
- Cox ML, Haller VL, Welch SP. (2007). Synergy between delta9-tetrahydrocannabinol and morphine in the arthritic rat. *Eur J Pharmacol* 567: 125-130.
- Craig AD. (1998). A new version of the thalamic disinhibition hypothesis of central pain. *Pain Forum* 7: 1-14.

Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, *et al.* (2001). Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9371-9376.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384: 83-87.

Cravatt BF, Lichtman AH. (2004). The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. *J Neurobiol* 61: 149-160.

Cravatt BF, Lichtman AH. (2003). Fatty acid amide hydrolase: an emerging therapeutic target in the endocannabinoid system. *Curr Opin Chem Biol* 7: 469-475.

Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139: 1405-1415.

Cristino L, Starowicz K, De Petrocellis L, Morishita J, Ueda N, Guglielmotti V, *et al.* (2008). Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. *Neuroscience* 151: 955-968.

Croxford JL, Yamamura T. (2005). Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *J Neuroimmunol* 166: 3-18.

Cummins TR, Dib-Hajj SD, Black JA, Waxman SG. (2000). Sodium channels and the molecular pathophysiology of pain. *Prog Brain Res* 129: 3-19.

Cunha TM, Roman-Campos D, Lotufo CM, Duarte HL, Souza GR, Verri WA, Jr., *et al.* (2010). Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 4442-4447.

Curto-Reyes V, Boto T, Hidalgo A, Menendez L, Baamonde A. (2011). Antinociceptive effects induced through the stimulation of spinal cannabinoid type 2 receptors in chronically inflamed mice. *Eur J Pharmacol* 668: 184-189.

Curto-Reyes V, Llamas S, Hidalgo A, Menendez L, Baamonde A. (2010). Spinal and peripheral analgesic effects of the CB2 cannabinoid receptor agonist AM1241 in two models of bone cancer-induced pain. *Br J Pharmacol* 160: 561-573.

D'Mello R, Dickenson AH. (2008). Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* 101: 8-16.

da Fonseca Pacheco D, Klein A, de Castro Perez A, da Fonseca Pacheco CM, de Francischi JN, Duarte ID. (2008). The mu-opioid receptor agonist morphine, but not agonists at delta- or kappa-opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 154: 1143-1149.

Dado RJ, Law PY, Loh HH, Elde R. (1993). Immunofluorescent identification of a delta (delta)-opioid receptor on primary afferent nerve terminals. *Neuroreport* 5: 341-344.

De Petrocellis L, Di Marzo V. (2010). Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *J Neuroimmune Pharmacol* 5: 103-121.

- De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allara M, Bisogno T, Petrosino S, *et al.* (2011). Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol* 163: 1479-1494.
- Deadwyler SA, Hampson RE, Mu J, Whyte A, Childers S. (1995). Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J Pharmacol Exp Ther* 273: 734-743.
- Decosterd I, Woolf CJ. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87: 149-158.
- Desroches J, Beaulieu P. (2008). [The cannabinoid system and pain: a new therapeutic avenue?]. *Rev Med Suisse* 4: 1505-1506, 1508-1510, 1512-1503.
- Desroches J, Beaulieu P. (2010). Opioids and cannabinoids interactions: involvement in pain management. *Curr Drug Targets* 11: 462-473.
- Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34: 605-613.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, *et al.* (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946-1949.
- Devi LA. (2001). Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sci* 22: 532-537.
- Devulder J, Richarz U, Nataraja SH. (2005). Impact of long-term use of opioids on quality of life in patients with chronic, non-malignant pain. *Curr Med Res Opin* 21: 1555-1568.
- Di Marzo V. (2010). Anandamide serves two masters in the brain. *Nat Neurosci* 13: 1446-1448.
- Di Marzo V. (2011). Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nat Neurosci* 14: 9-15.
- Di Marzo V. (1998). 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta* 1392: 153-175.
- Di Marzo V. (2012). Inhibitors of endocannabinoid breakdown for pain: not so FA(AH)cile, after all. *Pain* 153: 1785-1786.
- Di Marzo V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 7: 438-455.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3: 771-784.
- Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L. (2001). Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol Sci* 22: 346-349.
- Di Marzo V, Bisogno T, Sugiura T, Melck D, De Petrocellis L. (1998). The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide. *Biochem J* 331 (Pt 1): 15-19.

Di Marzo V, Blumberg PM, Szallasi A. (2002a). Endovanilloid signaling in pain. *Curr Opin Neurobiol* 12: 372-379.

Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, *et al.* (2000). Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem* 75: 2434-2444.

Di Marzo V, De Petrocellis L. (2012). Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367: 3216-3228.

Di Marzo V, De Petrocellis L, Fezza F, Ligresti A, Bisogno T. (2002b). Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 377-391.

Di Marzo V, Deutsch DG. (1998). Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis* 5: 386-404.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, *et al.* (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372: 686-691.

Di Marzo V, Petrocellis LD. (2006). Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu Rev Med* 57: 553-574.

Di Marzo V, Petrosino S. (2007). Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol* 18: 129-140.

Dickenson AH, Sullivan AF. (1987). Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. *Neurosci Lett* 83: 207-211.

Dinh TP, Kathuria S, Piomelli D. (2004). RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Mol Pharmacol* 66: 1260-1264.

Djoughri L, Lawson SN. (2004). Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 46: 131-145.

Dogrul A, Gardell LR, Ma S, Ossipov MH, Porreca F, Lai J. (2002). 'Knock-down' of spinal CB1 receptors produces abnormal pain and elevates spinal dynorphin content in mice. *Pain* 100: 203-209.

Dogrul A, Ossipov MH, Porreca F. (2009). Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. *Brain Res* 1280: 52-59.

Dogrul A, Seyrek M. (2006). Systemic morphine produce antinociception mediated by spinal 5-HT7, but not 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the spinal cord. *Br J Pharmacol* 149: 498-505.

Dogrul A, Seyrek M, Yalcin B, Ulugol A. (2012). Involvement of descending serotonergic and noradrenergic pathways in CB1 receptor-mediated antinociception. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 38: 97-105.

Donnerer J, Schuligoi R, Stein C. (1992). Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience* 49: 693-698.

Drew LJ, Harris J, Millns PJ, Kendall DA, Chapman V. (2000). Activation of spinal cannabinoid 1 receptors inhibits C-fibre driven hyperexcitable neuronal responses and increases [35S]GTPgammaS binding in the dorsal horn of the spinal cord of noninflamed and inflamed rats. *Eur J Neurosci* 12: 2079-2086.

Dubuisson D, Dennis SG. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4: 161-174.

Dussy FE, Hamberg C, Luginbuhl M, Schwerzmann T, Briellmann TA. (2005). Isolation of Delta9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Delta9-THC in cannabis products. *Forensic Sci Int* 149: 3-10.

Egertova M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR. (1998). A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci* 265: 2081-2085.

Eguchi M. (2004). Recent advances in selective opioid receptor agonists and antagonists. *Med Res Rev* 24: 182-212.

Elmes SJ, Jhaveri MD, Smart D, Kendall DA, Chapman V. (2004). Cannabinoid CB2 receptor activation inhibits mechanically evoked responses of wide dynamic range dorsal horn neurons in naive rats and in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 20: 2311-2320.

Elsohly MA, Slade D. (2005). Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci* 78: 539-548.

Engel MA, Kellermann CA, Burnat G, Hahn EG, Rau T, Konturek PC. (2010). Mice lacking cannabinoid CB1-, CB2-receptors or both receptors show increased susceptibility to trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis. *J Physiol Pharmacol* 61: 89-97.

Evans CJ, Keith DE, Jr., Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. (1992). Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258: 1952-1955.

Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A. (1995). Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3376-3380.

Fan SF, Yazulla S. (2003). Biphasic modulation of voltage-dependent currents of retinal cones by cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55212-2. *Vis Neurosci* 20: 177-188.

Farquhar-Smith WP, Egertova M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice AS, Elphick MR. (2000). Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci* 15: 510-521.

Fattore L, Vigano D, Fadda P, Rubino T, Fratta W, Parolaro D. (2007). Bidirectional regulation of mu-opioid and CB1-cannabinoid receptor in rats self-administering heroin or WIN 55,212-2. *Eur J Neurosci* 25: 2191-2200.

Fegley D, Gaetani S, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, *et al.* (2005). Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. *J Pharmacol Exp Ther* 313: 352-358.

- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, *et al.* (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 48: 443-450.
- Fields H. (2004). State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 5: 565-575.
- Fields HL (1987). *Pain*. New York: McGraw-Hill Book Company: 354 p.
- Fields HL, Basbaum AI, Heinricher MM (2006). Central nervous system mechanisms of pain modulation. Dans: Mc Mahon SB, Koltzenburg M, (éd). *Textbook of pain*. London: Elsevier Churchill Livingstone: 125-142.
- Fields HL, Heinricher MM, Mason P. (1991). Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci* 14: 219-245.
- Finn DP, Beckett SR, Roe CH, Madjd A, Fone KC, Kendall DA, *et al.* (2004). Effects of coadministration of cannabinoids and morphine on nociceptive behaviour, brain monoamines and HPA axis activity in a rat model of persistent pain. *Eur J Neurosci* 19: 678-686.
- Fowler CJ. (2012). Anandamide uptake explained? *Trends Pharmacol Sci* 33: 181-185.
- Fowler CJ, Jonsson KO, Tiger G. (2001). Fatty acid amide hydrolase: biochemistry, pharmacology, and therapeutic possibilities for an enzyme hydrolyzing anandamide, 2-arachidonoylglycerol, palmitoylethanolamide, and oleamide. *Biochem Pharmacol* 62: 517-526.
- Fox A, Kesingland A, Gentry C, McNair K, Patel S, Urban L, *et al.* (2001). The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain* 92: 91-100.
- Frank B, Serpell MG, Hughes J, Matthews JN, Kapur D. (2008). Comparison of analgesic effects and patient tolerability of nabilone and dihydrocodeine for chronic neuropathic pain: randomised, crossover, double blind study. *BMJ* 336: 199-201.
- Franklin KBJ, Abbott FV (1990). Techniques for Assessing the Effects of Drugs on Nociceptive Responses. Dans: Boulton AA, Baker GB, Greenshaw AJ, (éd). *Psychopharmacology*, Vol. 13. New Jersey: Humana Press: 145-216.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83: 1017-1066.
- Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, *et al.* (2012). A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci* 15: 64-69.
- Fuentes JA, Ruiz-Gayo M, Manzanera J, Vela G, Reche I, Corchero J. (1999). Cannabinoids as potential new analgesics. *Life Sci* 65: 675-685.
- Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M, Takeshima H. (1993). Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor delta- and mu-subtypes. *FEBS Lett* 327: 311-314.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, *et al.* (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232: 54-61.

- Gao Y, Vasilyev DV, Goncalves MB, Howell FV, Hobbs C, Reisenberg M, *et al.* (2010). Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci* 30: 2017-2024.
- Gaoni Y, Mechoulam R. (1964). Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86: 1646-1647.
- Gardell LR, Ossipov MH, Vanderah TW, Lai J, Porreca F. (2002). Dynorphin-independent spinal cannabinoid antinociception. *Pain* 100: 243-248.
- Garrison DW, Foreman RD. (1994). Decreased activity of spontaneous and noxiously evoked dorsal horn cells during transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). *Pain* 58: 309-315.
- Gatta L, Piscitelli F, Giordano C, Boccella S, Lichtman A, Maione S, *et al.* (2012). Discovery of prostamide F2alpha and its role in inflammatory pain and dorsal horn nociceptive neuron hyperexcitability. *PLoS One* 7: e31111.
- Gattinoni S, Simone CD, Dallavalle S, Fezza F, Nannei R, Battista N, *et al.* (2010). A new group of oxime carbamates as reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 4406-4411.
- Gaveriaux-Ruff C, Filliol D, Simonin F, Matthes HW, Kieffer BL. (2001). Immunosuppression by delta-opioid antagonist naltrindole: delta- and triple mu/delta/kappa-opioid receptor knockout mice reveal a nonopioid activity. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 1193-1198.
- Gerard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 279 (Pt 1): 129-134.
- Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM. (2002). Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* 5: 446-451.
- Ghosh P, Bhattacharya SK. (1979). Cannabis-induced potentiation of morphine analgesia in rat--role of brain monoamines. *Indian J Med Res* 70: 275-280.
- Ghosh S, Wise LE, Chen Y, Gujjar R, Mahadevan A, Cravatt BF, *et al.* (2013). The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 suppresses inflammatory pain in the mouse carrageenan model. *Life Sci* 92: 498-505.
- Ghozland S, Matthes HW, Simonin F, Filliol D, Kieffer BL, Maldonado R. (2002). Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors. *J Neurosci* 22: 1146-1154.
- Gilbert PE. (1981). A comparison of THC, nantradol, nabilone, and morphine in the chronic spinal dog. *J Clin Pharmacol* 21: 311S-319S.
- Gilchrist HD, Allard BL, Simone DA. (1996). Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. *Pain* 67: 179-188.
- Giordano J, Barr GA. (1988). Effects of neonatal spinal cord serotonin depletion on opiate-induced analgesia in tests of thermal and mechanical pain. *Brain Res* 469: 121-127.
- Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D. (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 2: 358-363.

Glaser ST, Kaczocha M. (2010). Cyclooxygenase-2 mediates anandamide metabolism in the mouse brain. *J Pharmacol Exp Ther* 335: 380-388.

Glass M, Felder CC. (1997). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 17: 5327-5333.

Glass M, Northup JK. (1999). Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol Pharmacol* 56: 1362-1369.

Golech SA, McCarron RM, Chen Y, Bembry J, Lenz F, Mechoulam R, *et al.* (2004). Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 132: 87-92.

Gomes I, Gupta A, Devi LA. (2013). G-protein-coupled heteromers: regulation in disease. *Methods Enzymol* 521: 219-238.

Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V, Devi LA. (2000). Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* 20: RC110.

Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, *et al.* (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071: 10-23.

Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW. (2000). Endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol* 57: 1045-1050.

Gonzalez B, Paz F, Floran L, Aceves J, Erlij D, Floran B. (2009). Cannabinoid agonists stimulate [3H]GABA release in the globus pallidus of the rat when G(i) protein-receptor coupling is restricted: role of dopamine D2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 328: 822-828.

Gonzalez S, Fernandez-Ruiz J, Sparpaglione V, Parolaro D, Ramos JA. (2002). Chronic exposure to morphine, cocaine or ethanol in rats produced different effects in brain cannabinoid CB(1) receptor binding and mRNA levels. *Drug Alcohol Depend* 66: 77-84.

Gonzalez S, Schmid PC, Fernandez-Ruiz J, Krebsbach R, Schmid HH, Ramos JA. (2003). Region-dependent changes in endocannabinoid transmission in the brain of morphine-dependent rats. *Addict Biol* 8: 159-166.

Goparaju SK, Kurahashi Y, Suzuki H, Ueda N, Yamamoto S. (1999). Anandamide amidohydrolase of porcine brain: cDNA cloning, functional expression and site-directed mutagenesis(1). *Biochim Biophys Acta* 1441: 77-84.

Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H, Yamamoto S. (1998). Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett* 422: 69-73.

Gouarderes C, Beaudet A, Zajac JM, Cros J, Quirion R. (1991). High resolution radioautographic localization of [125I]FK-33-824-labelled mu opioid receptors in the spinal cord of normal and deafferented rats. *Neuroscience* 43: 197-209.

Gouarderes C, Cros J, Quirion R. (1985). Autoradiographic localization of mu, delta and kappa opioid receptor binding sites in rat and guinea pig spinal cord. *Neuropeptides* 6: 331-342.

Gray AC, Coupar IM, White PJ. (2006). Comparison of opioid receptor distributions in the rat central nervous system. *Life Sci* 79: 674-685.

Griffin G, Fernando SR, Ross RA, McKay NG, Ashford ML, Shire D, *et al.* (1997). Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur J Pharmacol* 339: 53-61.

Griffin G, Tao Q, Abood ME. (2000). Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 886-894.

Griffin G, Wray EJ, Tao Q, McAllister SD, Rorrer WK, Aung MM, *et al.* (1999). Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur J Pharmacol* 377: 117-125.

Griffin RS, Woolf CJ (2007). Pharmacology of analgesia. Dans: Golan DE, Tashjian AH, Armstrong E, Armstrong AW, (éd). *Principles of Pharmacology: The Pathophysiological Basis of Drug Therapy*, Vol. 2. Baltimore: Lippincott, Williams, and Wilkins: 263-282.

Gu X, Mei F, Liu Y, Zhang R, Zhang J, Ma Z. (2011). Intrathecal administration of the cannabinoid 2 receptor agonist JWH015 can attenuate cancer pain and decrease mRNA expression of the 2B subunit of N-methyl-D-aspartic acid. *Anesth Analg* 113: 405-411.

Guindon J, Beaulieu P. (2006). Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 50: 814-823.

Guindon J, Beaulieu P (2005). Pharmacologie des cannabinoïdes. Dans: Beaulieu P, (éd). *Pharmacologie de la douleur*. Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal: 129-169.

Guindon J, Beaulieu P. (2009). The role of the endogenous cannabinoid system in peripheral analgesia. *Curr Mol Pharmacol* 2: 134-139.

Guindon J, De Lean A, Beaulieu P. (2006a). Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. *Pain* 121: 85-93.

Guindon J, Desroches J, Beaulieu P. (2007). The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB2 receptors. *Br J Pharmacol* 150: 693-701.

Guindon J, Guijarro A, Piomelli D, Hohmann AG. (2011). Peripheral antinociceptive effects of inhibitors of monoacylglycerol lipase in a rat model of inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 163: 1464-1478.

Guindon J, Hohmann AG. (2008a). Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 153: 319-334.

Guindon J, Hohmann AG. (2009). The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8: 403-421.

Guindon J, Hohmann AG. (2008b). A physiological role for endocannabinoid-derived products of cyclooxygenase-2-mediated oxidative metabolism. *Br J Pharmacol* 153: 1341-1343.

Guindon J, LoVerme J, De Lean A, Piomelli D, Beaulieu P. (2006b). Synergistic antinociceptive effects of anandamide, an endocannabinoid, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peripheral tissue: a role for endogenous fatty-acid ethanolamides? *Eur J Pharmacol* 550: 68-77.

Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, *et al.* (2004). Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci* 20: 441-458.

Guzman M, Lo Verme J, Fu J, Oveisi F, Blazquez C, Piomelli D. (2004). Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *J Biol Chem* 279: 27849-27854.

Haghparast A, Azizi P, Hassanpour-Ezatti M, Khorrami H, Naderi N. (2009). Sub-chronic administration of AM251, CB1 receptor antagonist, within the nucleus accumbens induced sensitization to morphine in the rat. *Neurosci Lett* 467: 43-47.

Haller VL, Cichewicz DL, Welch SP. (2006). Non-cannabinoid CB1, non-cannabinoid CB2 antinociceptive effects of several novel compounds in the PPQ stretch test in mice. *Eur J Pharmacol* 546: 60-68.

Haller VL, Stevens DL, Welch SP. (2008). Modulation of opioids via protection of anandamide degradation by fatty acid amide hydrolase. *Eur J Pharmacol* 600: 50-58.

Hansen HH, Schmid PC, Bittigau P, Lastres-Becker I, Berrendero F, Manzanares J, *et al.* (2001). Anandamide, but not 2-arachidonoylglycerol, accumulates during in vivo neurodegeneration. *J Neurochem* 78: 1415-1427.

Hanus L, Breuer A, Tchilibon S, Shiloah S, Goldenberg D, Horowitz M, *et al.* (1999). HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14228-14233.

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32: 77-88.

Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M. (2007). Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J Neurosci* 27: 1211-1219.

Hedo G, Laird JM, Lopez-Garcia JA. (1999). Time-course of spinal sensitization following carrageenan-induced inflammation in the young rat: a comparative electrophysiological and behavioural study in vitro and in vivo. *Neuroscience* 92: 309-318.

Helyes Z, Nemeth J, Than M, Bolcskei K, Pinter E, Szolcsanyi J. (2003). Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat. *Life Sci* 73: 2345-2353.

Henstridge CM, Balenga NA, Ford LA, Ross RA, Waldhoer M, Irving AJ. (2009). The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *FASEB J* 23: 183-193.

Héon H (2005). Les modèles animaux de douleur. Dans: Beaulieu P, (éd). *Pharmacologie de la douleur*. Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal: 283-322.

Herkenham M. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in brain: an in vitro technique using slide-mounted tissue sections. *NIDA Res Monogr* 112: 129-145.

- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11: 563-583.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, *et al.* (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1932-1936.
- Herrero JF, Laird JM, Lopez-Garcia JA. (2000). Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol* 61: 169-203.
- Hervera A, Negrete R, Leanez S, Martin-Campos JM, Pol O. (2011). Peripheral effects of morphine and expression of mu-opioid receptors in the dorsal root ganglia during neuropathic pain: nitric oxide signaling. *Mol Pain* 7: 25.
- Herzberg U, Eliav E, Bennett GJ, Kopin IJ. (1997). The analgesic effects of R(+)-WIN 55,212-2 mesylate, a high affinity cannabinoid agonist, in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 221: 157-160.
- Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrahan A, Campbell WB. (1997). Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem* 69: 631-638.
- Hipser C, Bushlin I, Gupta A, Gomes I, Devi LA. (2010). Role of antibodies in developing drugs that target G-protein-coupled receptor dimers. *Mt Sinai J Med* 77: 374-380.
- Ho WS, Barrett DA, Randall MD. (2008). 'Entourage' effects of N-palmitoylethanolamide and N-oleoylethanolamide on vasorelaxation to anandamide occur through TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 155: 837-846.
- Hoehe MR, Caenazzo L, Martinez MM, Hsieh WT, Modi WS, Gershon ES, *et al.* (1991). Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *New Biol* 3: 880-885.
- Hohmann AG. (2007). Inhibitors of monoacylglycerol lipase as novel analgesics. *Br J Pharmacol* 150: 673-675.
- Hohmann AG. (2002). Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem Phys Lipids* 121: 173-190.
- Hohmann AG, Briley EM, Herkenham M. (1999a). Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord. *Brain Res* 822: 17-25.
- Hohmann AG, Farthing JN, Zvonok AM, Makriyannis A. (2004). Selective activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses hyperalgesia evoked by intradermal capsaicin. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 446-453.
- Hohmann AG, Herkenham M. (1999a). Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience* 92: 1171-1175.
- Hohmann AG, Herkenham M. (1999b). Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. *Neuroscience* 90: 923-931.
- Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, *et al.* (2005). An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435: 1108-1112.

Hohmann AG, Tsou K, Walker JM. (1999b). Cannabinoid suppression of noxious heat-evoked activity in wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat. *J Neurophysiol* 81: 575-583.

Hojo M, Sudo Y, Ando Y, Minami K, Takada M, Matsubara T, *et al.* (2008). μ -Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. *J Pharmacol Sci* 108: 308-319.

Hökfelt TGM, Zhang X, Xu X, Wiesenfeld-Halin Z (2006). Central consequences of peripheral nerve damage. Dans: Mc Mahon SB, Koltzenburg M, (éd). *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. London: Churchill Livingstone: 947-949.

Holt S, Comelli F, Costa B, Fowler CJ. (2005). Inhibitors of fatty acid amide hydrolase reduce carrageenan-induced hind paw inflammation in pentobarbital-treated mice: comparison with indomethacin and possible involvement of cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 146: 467-476.

Holtman JR, Crooks PA (2008). Novel synergistic opioid-cannabinoid codrug for pain management, Organization WIP (ed) Vol. WO/2008/045556. New York.

Honda CN, Arvidsson U. (1995). Immunohistochemical localization of delta- and mu-opioid receptors in primate spinal cord. *Neuroreport* 6: 1025-1028.

Honore P, Chapman V, Buritova J, Besson JM. (1995). When is the maximal effect of pre-administered systemic morphine on carrageenin evoked spinal c-Fos expression in the rat? *Brain Res* 705: 91-96.

Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, *et al.* (2000). Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience* 98: 585-598.

Horvath B, Mukhopadhyay P, Hasko G, Pacher P. (2012). The endocannabinoid system and plant-derived cannabinoids in diabetes and diabetic complications. *Am J Pathol* 180: 432-442.

Houser SJ, Eads M, Embrey JP, Welch SP. (2000). Dynorphin B and spinal analgesia: induction of antinociception by the cannabinoids CP55,940, Delta(9)-THC and anandamide. *Brain Res* 857: 337-342.

Howlett AC. (2005). Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol* 53-79.

Howlett AC. (1995). Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 607-634.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, *et al.* (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54: 161-202.

Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ. (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1: 345-358.

Howlett AC, Mukhopadhyay S. (2000). Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids* 108: 53-70.

Hsieh GC, Pai M, Chandran P, Hooker BA, Zhu CZ, Salyers AK, *et al.* (2011). Central and peripheral sites of action for CB(2) receptor mediated analgesic activity in chronic inflammatory and neuropathic pain models in rats. *Br J Pharmacol* 162: 428-440.

Huestis MA. (2007). Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers* 4: 1770-1804.

Huestis MA, Gorelick DA, Heishman SJ, Preston KL, Nelson RA, Moolchan ET, *et al.* (2001). Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. *Arch Gen Psychiatry* 58: 322-328.

Huggins JP, Smart TS, Langman S, Taylor L, Young T. (2012). An efficient randomised, placebo-controlled clinical trial with the irreversible fatty acid amide hydrolase-1 inhibitor PF-04457845, which modulates endocannabinoids but fails to induce effective analgesia in patients with pain due to osteoarthritis of the knee. *Pain* 153: 1837-1846.

Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577-580.

Hunt SP, Mantyh PW. (2001). The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2: 83-91.

Hutchinson MR, Bland ST, Johnson KW, Rice KC, Maier SF, Watkins LR. (2007). Opioid-induced glial activation: mechanisms of activation and implications for opioid analgesia, dependence, and reward. *ScientificWorldJournal* 7: 98-111.

Hutchinson MR, Northcutt AL, Chao LW, Kearney JJ, Zhang Y, Berkelhammer DL, *et al.* (2008). Minocycline suppresses morphine-induced respiratory depression, suppresses morphine-induced reward, and enhances systemic morphine-induced analgesia. *Brain Behav Immun* 22: 1248-1256.

Hylden JL, Thomas DA, Iadarola MJ, Nahin RL, Dubner R. (1991). Spinal opioid analgesic effects are enhanced in a model of unilateral inflammation/hyperalgesia: possible involvement of noradrenergic mechanisms. *Eur J Pharmacol* 194: 135-143.

Iadarola MJ, Brady LS, Draisci G, Dubner R. (1988). Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. *Pain* 35: 313-326.

Ibrahim MM, Deng H, Zvonok A, Cockayne DA, Kwan J, Mata HP, *et al.* (2003). Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10529-10533.

Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, *et al.* (2005). CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3093-3098.

Ibrahim MM, Rude ML, Stagg NJ, Mata HP, Lai J, Vanderah TW, *et al.* (2006). CB2 cannabinoid receptor mediation of antinociception. *Pain* 122: 36-42.

Inglis JJ, McNamee KE, Chia SL, Essex D, Feldmann M, Williams RO, *et al.* (2008). Regulation of pain sensitivity in experimental osteoarthritis by the endogenous peripheral opioid system. *Arthritis Rheum* 58: 3110-3119.

Iversen L. (2003). Cannabis and the brain. *Brain* 126: 1252-1270.

Izzo AA, Camilleri M. (2008). Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects. *Gut* 57: 1140-1155.

Jacobsson SO, Rongard E, Stridh M, Tiger G, Fowler CJ. (2000). Serum-dependent effects of tamoxifen and cannabinoids upon C6 glioma cell viability. *Biochem Pharmacol* 60: 1807-1813.

Jaggari SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS. (1998). The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain* 76: 189-199.

Jarai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, *et al.* (1999). Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14136-14141.

Jessop DS. (2006). Endomorphins as agents for the treatment of chronic inflammatory disease. *BioDrugs* 20: 161-166.

Johnson JR, Burnell-Nugent M, Lossignol D, Ganae-Motan ED, Potts R, Fallon MT. (2010). Multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of the efficacy, safety, and tolerability of THC:CBD extract and THC extract in patients with intractable cancer-related pain. *J Pain Symptom Manage* 39: 167-179.

Johnson JR, Lossignol D, Burnell-Nugent M, Fallon MT. (2012). An Open-Label Extension Study to Investigate the Long-Term Safety and Tolerability of THC/CBD Oromucosal Spray and Oromucosal THC Spray in Patients With Terminal Cancer-Related Pain Refractory to Strong Opioid Analgesics. *J Pain Symptom Manage*

Jordan BA, Devi LA. (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399: 697-700.

Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, *et al.* (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427: 260-265.

Julius D, Basbaum AI. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-210.

Kaczocha M, Glaser ST, Deutsch DG. (2009). Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6375-6380.

Kane BE, Svensson B, Ferguson DM. (2006). Molecular recognition of opioid receptor ligands. *AAPS J* 8: E126-137.

Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 89: 309-380.

Kapur A, Zhao P, Sharir H, Bai Y, Caron MG, Barak LS, *et al.* (2009). Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J Biol Chem* 284: 29817-29827.

Karbarz MJ, Luo L, Chang L, Tham CS, Palmer JA, Wilson SJ, *et al.* (2009). Biochemical and biological properties of 4-(3-phenyl-[1,2,4] thiadiazol-5-yl)-piperazine-1-carboxylic acid phenylamide, a mechanism-based inhibitor of fatty acid amide hydrolase. *Anesth Analg* 108: 316-329.

Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valino F, Duranti A, Tontini A, *et al.* (2003). Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 9: 76-81.

Katona I, Freund TF. (2008). Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med* 14: 923-930.

- Katona I, Freund TF. (2012). Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci* 35: 529-558.
- Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kafalvi A, Vizi ES, Mackie K, *et al.* (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19: 4544-4558.
- Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, *et al.* (2006). Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 26: 5628-5637.
- Kauser S, Schallreuter KU, Thody AJ, Gummer C, Tobin DJ. (2003). Regulation of human epidermal melanocyte biology by beta-endorphin. *J Invest Dermatol* 120: 1073-1080.
- Kawahara H, Drew GM, Christie MJ, Vaughan CW. (2011). Inhibition of fatty acid amide hydrolase unmasks CB1 receptor and TRPV1 channel-mediated modulation of glutamatergic synaptic transmission in midbrain periaqueductal grey. *Br J Pharmacol* 163: 1214-1222.
- Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, *et al.* (2006). The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci* 26: 2991-3001.
- Khasabova IA, Chandiramani A, Harding-Rose C, Simone DA, Seybold VS. (2011). Increasing 2-arachidonoyl glycerol signaling in the periphery attenuates mechanical hyperalgesia in a model of bone cancer pain. *Pharmacol Res* 64: 60-67.
- Khasabova IA, Khasabov SG, Harding-Rose C, Coicou LG, Seybold BA, Lindberg AE, *et al.* (2008). A decrease in anandamide signaling contributes to the maintenance of cutaneous mechanical hyperalgesia in a model of bone cancer pain. *J Neurosci* 28: 11141-11152.
- Khasabova IA, Stucky CL, Harding-Rose C, Eikmeier L, Beitz AJ, Coicou LG, *et al.* (2007). Chemical interactions between fibrosarcoma cancer cells and sensory neurons contribute to cancer pain. *J Neurosci* 27: 10289-10298.
- Khodayar MJ, Shafaghi B, Naderi N, Zarrindast MR. (2006). Antinociceptive effect of spinally administered cannabinergic and 2-adrenoceptor drugs on the formalin test in rat: possible interactions. *J Psychopharmacol* 20: 67-74.
- Kidd BL, Urban LA. (2001). Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth* 87: 3-11.
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. (1992). The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 12048-12052.
- Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C. (2002). Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol* 66: 285-306.
- Kim J, Alger BE. (2004). Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat Neurosci* 7: 697-698.
- Kim J, Alger BE. (2010). Reduction in endocannabinoid tone is a homeostatic mechanism for specific inhibitory synapses. *Nat Neurosci* 13: 592-600.

- Kim J, Isokawa M, Ledent C, Alger BE. (2002). Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J Neurosci* 22: 10182-10191.
- Kim KJ, Yoon YW, Chung JM. (1997). Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Exp Brain Res* 113: 200-206.
- Kim SH, Chung JM. (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50: 355-363.
- King AR, Duranti A, Tontini A, Rivara S, Rosengarth A, Clapper JR, *et al.* (2007). URB602 inhibits monoacylglycerol lipase and selectively blocks 2-arachidonoylglycerol degradation in intact brain slices. *Chem Biol* 14: 1357-1365.
- Kinsey SG, Long JZ, Cravatt BF, Lichtman AH. (2010). Fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase inhibitors produce anti-allodynic effects in mice through distinct cannabinoid receptor mechanisms. *J Pain* 11: 1420-1428.
- Kinsey SG, Long JZ, O'Neal ST, Abdullah RA, Poklis JL, Boger DL, *et al.* (2009). Blockade of endocannabinoid-degrading enzymes attenuates neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 330: 902-910.
- Kinsey SG, Wise LE, Ramesh D, Abdullah R, Selley DE, Cravatt BF, *et al.* (2013). Repeated Low Dose Administration of the Monoacylglycerol Lipase Inhibitor JZL184 Retains CB1 Receptor Mediated Antinociceptive and Gastroprotective Effects. *J Pharmacol Exp Ther*
- Kolesnikov YA, Jain S, Wilson R, Pasternak GW. (1996). Peripheral morphine analgesia: synergy with central sites and a target of morphine tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 279: 502-506.
- Kozak KR, Marnett LJ. (2002). Oxidative metabolism of endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 211-220.
- Krames ES, Wilkie DJ, Gershow J. (1986). Intrathecal D-Ala²-D-Leu⁵-enkephalin (DADL) restores analgesia in a patient analgetically tolerant to intrathecal morphine sulfate. *Pain* 24: 205-209.
- Kraus J. (2012). Expression and functions of mu-opioid receptors and cannabinoid receptors type 1 in T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1261: 1-6.
- Kreitzer AC, Regehr WG. (2001). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29: 717-727.
- Kress M, Kuner R. (2009). Mode of action of cannabinoids on nociceptive nerve endings. *Exp Brain Res* 196: 79-88.
- Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427-1429.
- Kumar A, Qiao Z, Kumar P, Song ZH. (2012). Effects of palmitoylethanolamide on aqueous humor outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53: 4416-4425.
- Kuraishi Y, Harada Y, Aratani S, Satoh M, Takagi H. (1983). Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. *Brain Res* 273: 245-252.

- La Porta C, Bura SA, Aracil-Fernandez A, Manzanares J, Maldonado R. (2013). Role of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in the development of joint pain induced by monosodium iodoacetate. *Pain* 154: 160-174.
- Labuz D, Schmidt Y, Schreiter A, Rittner HL, Mousa SA, Machelska H. (2009). Immune cell-derived opioids protect against neuropathic pain in mice. *J Clin Invest* 119: 278-286.
- Lai J, Porreca F, Hunter JC, Gold MS. (2004). Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 371-397.
- Lambert DM, Di Marzo V. (1999). The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas : are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr Med Chem* 6: 757-773.
- Lang W, Qin C, Lin S, Khanolkar AD, Goutopoulos A, Fan P, *et al.* (1999). Substrate Specificity and Stereoselectivity of Rat Brain Microsomal Anandamide Amidohydrolase. *J Med Chem* 42: 1682.
- Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. (2008). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2699-2704.
- Lawlor PG, Bruera E. (1998). Side-effects of opioids in chronic pain treatment. *Curr Opin Anaesthesiol* 11: 539-545.
- Le Bars D, Adam F. (2002). [Nociceptors and mediators in acute inflammatory pain]. *Ann Fr Anesth Reanim* 21: 315-335.
- Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. (1979a). Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* 6: 283-304.
- Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. (1979b). Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications. *Pain* 6: 305-327.
- Leanez S, Hervera A, Pol O. (2009). Peripheral antinociceptive effects of mu- and delta-opioid receptor agonists in NOS2 and NOS1 knockout mice during chronic inflammatory pain. *Eur J Pharmacol* 602: 41-49.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, *et al.* (1999). Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283: 401-404.
- Lever IJ, Rice AS. (2007). Cannabinoids and pain. *Handb Exp Pharmacol* 265-306.
- Lever IJ, Robinson M, Cibelli M, Paule C, Santha P, Yee L, *et al.* (2009). Localization of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase in rat dorsal root ganglion cells and its regulation after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 29: 3766-3780.
- Lichtman AH, Cook SA, Martin BR. (1996). Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 585-593.
- Lichtman AH, Hawkins EG, Griffin G, Cravatt BF. (2002). Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 73-79.

- Lichtman AH, Martin BR. (1991a). Cannabinoid-induced antinociception is mediated by a spinal alpha 2-noradrenergic mechanism. *Brain Res* 559: 309-314.
- Lichtman AH, Martin BR. (1991b). Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception. *J Pharmacol Exp Ther* 258: 517-523.
- Lichtman AH, Shelton CC, Advani T, Cravatt BF. (2004). Mice lacking fatty acid amide hydrolase exhibit a cannabinoid receptor-mediated phenotypic hypoalgesia. *Pain* 109: 319-327.
- Ligresti A, Petrosino S, Di Marzo V. (2009). From endocannabinoid profiling to 'endocannabinoid therapeutics'. *Curr Opin Chem Biol* 13: 321-331.
- Lim G, Sung B, Ji RR, Mao J. (2003). Upregulation of spinal cannabinoid-1-receptors following nerve injury enhances the effects of Win 55,212-2 on neuropathic pain behaviors in rats. *Pain* 105: 275-283.
- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Huang BX, Kim HY, Luquet S, *et al.* (2008). Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* 54: 1-7.
- Llano I, Leresche N, Marty A. (1991). Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* 6: 565-574.
- Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, *et al.* (2005a). The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol* 67: 15-19.
- Lo Verme J, Gaetani S, Fu J, Oveisi F, Burton K, Piomelli D. (2005b). Regulation of food intake by oleoylethanolamide. *Cell Mol Life Sci* 62: 708-716.
- Lombard C, Nagarkatti M, Nagarkatti P. (2007). CB2 cannabinoid receptor agonist, JWH-015, triggers apoptosis in immune cells: potential role for CB2-selective ligands as immunosuppressive agents. *Clin Immunol* 122: 259-270.
- Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, *et al.* (2009a). Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol* 5: 37-44.
- Long JZ, Nomura DK, Vann RE, Walentiny DM, Booker L, Jin X, *et al.* (2009b). Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20270-20275.
- Lovinger DM, Mathur BN. (2012). Endocannabinoids in striatal plasticity. *Parkinsonism Relat Disord* 18 Suppl 1: S132-134.
- Lovinger DM, Tyler EC, Merritt A. (1993). Short- and long-term synaptic depression in rat neostriatum. *J Neurophysiol* 70: 1937-1949.
- Luchicchi A, Pistis M. (2012). Anandamide and 2-arachidonoylglycerol: pharmacological properties, functional features, and emerging specificities of the two major endocannabinoids. *Mol Neurobiol* 46: 374-392.

- Ludanyi A, Hu SS, Yamazaki M, Tanimura A, Piomelli D, Watanabe M, *et al.* (2011). Complementary synaptic distribution of enzymes responsible for synthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the human hippocampus. *Neuroscience* 174: 50-63.
- Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, Sorkin LS, Stauderman KA, Williams ME, *et al.* (2001). Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J Neurosci* 21: 1868-1875.
- Lynch ME, Campbell F. (2011). Cannabinoids for treatment of chronic non-cancer pain; a systematic review of randomized trials. *Br J Clin Pharmacol* 72: 735-744.
- Maccarrone M. (2008). Endocannabinoid signaling and neuroinflammatory diseases. *Curr Pharm Des* 14: 2252-2253.
- Mackie K. (2006). Cannabinoid receptors as therapeutic targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 101-122.
- Mackie K. (2008). Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J Neuroendocrinol* 20 Suppl 1: 10-14.
- Mackie K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol* 299-325.
- Mackie K, Hille B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3825-3829.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 15: 6552-6561.
- Mackie K, Stella N. (2006). Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J* 8: E298-306.
- Maekawa K, Minami M, Yabuuchi K, Toya T, Katao Y, Hosoi Y, *et al.* (1994). In situ hybridization study of mu- and kappa-opioid receptor mRNAs in the rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Neurosci Lett* 168: 97-100.
- Maione S, Bisogno T, de Novellis V, Palazzo E, Cristino L, Valenti M, *et al.* (2006). Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 969-982.
- Maione S, Costa B, Di Marzo V. (2013). Endocannabinoids: A unique opportunity to develop multitarget analgesics. *Pain*
- Maione S, Cristino L, Migliozi AL, Georgiou AL, Starowicz K, Salt TE, *et al.* (2009). TRPV1 channels control synaptic plasticity in the developing superior colliculus. *J Physiol* 587: 2521-2535.
- Maione S, De Petrocellis L, de Novellis V, Moriello AS, Petrosino S, Palazzo E, *et al.* (2007). Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 150: 766-781.

- Makara JK, Mor M, Fegley D, Szabo SI, Kathuria S, Astarita G, *et al.* (2005). Selective inhibition of 2-AG hydrolysis enhances endocannabinoid signaling in hippocampus. *Nat Neurosci* 8: 1139-1141.
- Malan TP, Jr., Ibrahim MM, Deng H, Liu Q, Mata HP, Vanderah T, *et al.* (2001). CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 93: 239-245.
- Malan TP, Jr., Ibrahim MM, Lai J, Vanderah TW, Makriyannis A, Porreca F. (2003). CB2 cannabinoid receptor agonists: pain relief without psychoactive effects? *Curr Opin Pharmacol* 3: 62-67.
- Malan TP, Jr., Ibrahim MM, Vanderah TW, Makriyannis A, Porreca F. (2002). Inhibition of pain responses by activation of CB(2) cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 121: 191-200.
- Maldonado R. (2010). [The endogenous opioid system and drug addiction]. *Ann Pharm Fr* 68: 3-11.
- Maldonado R, Valverde O. (2003). Participation of the opioid system in cannabinoid-induced antinociception and emotional-like responses. *Eur Neuropsychopharmacol* 13: 401-410.
- Maldonado R, Valverde O, Turcaud S, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. (1994). Antinociceptive response induced by mixed inhibitors of enkephalin catabolism in peripheral inflammation. *Pain* 58: 77-83.
- Mallet C, Daulhac L, Bonnefont J, Ledent C, Etienne M, Chapuy E, *et al.* (2008). Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain* 139: 190-200.
- Manning BH, Martin WJ, Meng ID. (2003). The rodent amygdala contributes to the production of cannabinoid-induced antinociception. *Neuroscience* 120: 1157-1170.
- Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. (1995). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 18: 22-29.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, *et al.* (1994). Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 350: 412-438.
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. (1988). Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci* 11: 308-314.
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. (1987). Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J Neurosci* 7: 2445-2464.
- Manzanares J, Corchero J, Romero J, Fernandez-Ruiz JJ, Ramos JA, Fuentes JA. (1998). Chronic administration of cannabinoids regulates proenkephalin mRNA levels in selected regions of the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 55: 126-132.
- Manzanares J, Corchero J, Romero J, Fernandez-Ruiz JJ, Ramos JA, Fuentes JA. (1999). Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends Pharmacol Sci* 20: 287-294.
- Mao J, Price DD, Mayer DJ. (1995). Experimental mononeuropathy reduces the antinociceptive effects of morphine: implications for common intracellular mechanisms involved in morphine tolerance and neuropathic pain. *Pain* 61: 353-364.
- Marchand F, Perretti M, McMahon SB. (2005). Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6: 521-532.

- Marchand S (2009). Neurophysiologie de la douleur. Dans: Marchand S, (éd). *Le phénomène de la douleur*. Montréal: Chenelière Éducation inc: 65-108.
- Marchand S (2005). Neurophysiologie de la douleur. Dans: Beaulieu P, (éd). *Pharmacologie de la douleur*. Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal: 3-37.
- Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN. (2005). Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem* 95: 437-445.
- Maresz K, Pryce G, Ponomarev ED, Marsicano G, Croxford JL, Shriver LP, *et al.* (2007). Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. *Nat Med* 13: 492-497.
- Marker CL, Lujan R, Colon J, Wickman K. (2006). Distinct populations of spinal cord lamina II interneurons expressing G-protein-gated potassium channels. *J Neurosci* 26: 12251-12259.
- Marrs WR, Blankman JL, Horne EA, Thomazeau A, Lin YH, Coy J, *et al.* (2010). The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat Neurosci* 13: 951-957.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, *et al.* (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418: 530-534.
- Martin BR (1985a). Characterization of the antinociceptive activity of delta-9 tetrahydrocannabinol in mice. Dans: Harvey DJ, (éd). *Marihuana*. Oxford: IRL Press: 685-692.
- Martin BR. (1985b). Structural requirements for cannabinoid-induced antinociceptive activity in mice. *Life Sci* 36: 1523-1530.
- Martin BR, Lichtman AH. (1998). Cannabinoid transmission and pain perception. *Neurobiol Dis* 5: 447-461.
- Martin WJ, Coffin PO, Attias E, Balinsky M, Tsou K, Walker JM. (1999). Anatomical basis for cannabinoid-induced antinociception as revealed by intracerebral microinjections. *Brain Res* 822: 237-242.
- Martin WJ, Patrick SL, Coffin PO, Tsou K, Walker JM. (1995). An examination of the central sites of action of cannabinoid-induced antinociception in the rat. *Life Sci* 56: 2103-2109.
- Martin WJ, Tsou K, Walker JM. (1998). Cannabinoid receptor-mediated inhibition of the rat tail-flick reflex after microinjection into the rostral ventromedial medulla. *Neurosci Lett* 242: 33-36.
- Mason DJ, Jr., Lowe J, Welch SP. (1999a). Cannabinoid modulation of dynorphin A: correlation to cannabinoid-induced antinociception. *Eur J Pharmacol* 378: 237-248.
- Mason DJ, Jr., Lowe J, Welch SP. (1999b). A diminution of delta9-tetrahydrocannabinol modulation of dynorphin A-(1-17) in conjunction with tolerance development. *Eur J Pharmacol* 381: 105-111.
- Mason P. (1999). Central mechanisms of pain modulation. *Curr Opin Neurobiol* 9: 436-441.
- Massi P, Vaccani A, Romorini S, Parolaro D. (2001). Comparative characterization in the rat of the interaction between cannabinoids and opiates for their immunosuppressive and analgesic effects. *J Neuroimmunol* 117: 116-124.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561-564.

Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, *et al.* (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383: 819-823.

Matyas F, Yanovsky Y, Mackie K, Kelsch W, Misgeld U, Freund TF. (2006). Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 137: 337-361.

Mazzari S, Canella R, Petrelli L, Marcolongo G, Leon A. (1996). N-(2-hydroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur J Pharmacol* 300: 227-236.

McDougall JJ. (2011). Peripheral analgesia: Hitting pain where it hurts. *Biochim Biophys Acta* 1812: 459-467.

Mechoulam R (1986). The pharmacohistory of cannabis sativa. Dans: Mechoulam R, (éd). *Cannabinoids as therapeutic agents*. Boca Raton, FL: CRC Press: 1-19.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, *et al.* (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50: 83-90.

Mechoulam R, Lander N, Srebnik M, Zamir I, Breuer A, Shalita B (1984). *The Cannabinoids: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects*. New York: Academic Press: 777-793.

Melzack R, Wall PD. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150: 971-979.

Meng ID, Johansen JP. (2004). Antinociception and modulation of rostral ventromedial medulla neuronal activity by local microinfusion of a cannabinoid receptor agonist. *Neuroscience* 124: 685-693.

Meng ID, Manning BH, Martin WJ, Fields HL. (1998). An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature* 395: 381-383.

Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, *et al.* (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377: 532-535.

Meyer RA, Campbell JN, Raja SN (1994). Peripheral neural mechanisms of nociception. Dans: Wall PD, Melzack R, (éd). *Textbook of pain*, 3rd edition. New York: Churchill Livingstone: 13-44.

Miaskowski C, Taiwo YO, Levine JD. (1993). Antinociception produced by receptor selective opioids. Modulation of supraspinal antinociceptive effects by spinal opioids. *Brain Res* 608: 87-94.

Mika J. (2008). Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness. *Pharmacol Rep* 60: 297-307.

Mileni M, Johnson DS, Wang Z, Everdeen DS, Liimatta M, Pabst B, *et al.* (2008). Structure-guided inhibitor design for human FAAH by interspecies active site conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 12820-12824.

Mileni M, Kamtekar S, Wood DC, Benson TE, Cravatt BF, Stevens RC. (2010). Crystal structure of fatty acid amide hydrolase bound to the carbamate inhibitor URB597: discovery of a deacylating water molecule and insight into enzyme inactivation. *J Mol Biol* 400: 743-754.

Miller LK, Devi LA. (2011). The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: mechanisms and their therapeutic implications. *Pharmacol Rev* 63: 461-470.

Miller LL, Picker MJ, Schmidt KT, Dykstra LA. (2011). Effects of morphine on pain-elicited and pain-suppressed behavior in CB1 knockout and wildtype mice. *Psychopharmacology (Berl)* 215: 455-465.

Mitirattanakul S, Ramakul N, Guerrero AV, Matsuka Y, Ono T, Iwase H, *et al.* (2006). Site-specific increases in peripheral cannabinoid receptors and their endogenous ligands in a model of neuropathic pain. *Pain* 126: 102-114.

Mizoguchi H, Wu HE, Narita M, Sora I, Hall SF, Uhl GR, *et al.* (2003). Lack of mu-opioid receptor-mediated G-protein activation in the spinal cord of mice lacking Exon 1 or Exons 2 and 3 of the MOR-1 gene. *J Pharmacol Sci* 93: 423-429.

Moises HC, Rusin KI, Macdonald RL. (1994). Mu- and kappa-opioid receptors selectively reduce the same transient components of high-threshold calcium current in rat dorsal root ganglion sensory neurons. *J Neurosci* 14: 5903-5916.

Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, *et al.* (1994). ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341: 33-38.

Monory K, Blaudzun H, Massa F, Kaiser N, Lemberger T, Schutz G, *et al.* (2007). Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *PLoS Biol* 5: e269.

Monory K, Tzavara ET, Lexime J, Ledent C, Parmentier M, Borsodi A, *et al.* (2002). Novel, not adenylyl cyclase-coupled cannabinoid binding site in cerebellum of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 292: 231-235.

Moore SA, Nomikos GG, Dickason-Chesterfield AK, Schober DA, Schaus JM, Ying BP, *et al.* (2005). Identification of a high-affinity binding site involved in the transport of endocannabinoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17852-17857.

Morera E, De Petrocellis L, Morera L, Moriello AS, Ligresti A, Nalli M, *et al.* (2009). Synthesis and biological evaluation of piperazinyl carbamates and ureas as fatty acid amide hydrolase (FAAH) and transient receptor potential (TRP) channel dual ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 6806-6809.

Morisset V, Ahluwalia J, Nagy I, Urban L. (2001). Possible mechanisms of cannabinoid-induced antinociception in the spinal cord. *Eur J Pharmacol* 429: 93-100.

Moulin DE, Clark AJ, Gilron I, Ware MA, Watson CP, Sessle BJ, *et al.* (2007). Pharmacological management of chronic neuropathic pain - consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. *Pain Res Manag* 12: 13-21.

Muccioli GG, Xu C, Odah E, Cudaback E, Cisneros JA, Lambert DM, *et al.* (2007). Identification of a novel endocannabinoid-hydrolyzing enzyme expressed by microglial cells. *J Neurosci* 27: 2883-2889.

- Mukherjee S, Adams M, Whiteaker K, Daza A, Kage K, Cassar S, *et al.* (2004). Species comparison and pharmacological characterization of rat and human CB2 cannabinoid receptors. *Eur J Pharmacol* 505: 1-9.
- Mulvihill MM, Nomura DK. (2013). Therapeutic potential of monoacylglycerol lipase inhibitors. *Life Sci* 92: 492-497.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61-65.
- Nackley AG, Suplita RL, 2nd, Hohmann AG. (2003). A peripheral cannabinoid mechanism suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience* 117: 659-670.
- Nackley AG, Zvonok AM, Makriyannis A, Hohmann AG. (2004). Activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses C-fiber responses and windup in spinal wide dynamic range neurons in the absence and presence of inflammation. *J Neurophysiol* 92: 3562-3574.
- Nadal X, La Porta C, Andreea Bura S, Maldonado R. (2013). Involvement of the opioid and cannabinoid systems in pain control: New insights from knockout studies. *Eur J Pharmacol*
- Naef M, Curatolo M, Petersen-Felix S, Arendt-Nielsen L, Zbinden A, Brenneisen R. (2003). The analgesic effect of oral delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), morphine, and a THC-morphine combination in healthy subjects under experimental pain conditions. *Pain* 105: 79-88.
- Narang S, Gibson D, Wasan AD, Ross EL, Michna E, Nedeljkovic SS, *et al.* (2008). Efficacy of dronabinol as an adjuvant treatment for chronic pain patients on opioid therapy. *J Pain* 9: 254-264.
- Narita M, Kuzumaki N, Suzuki M, Oe K, Yamazaki M, Yajima Y, *et al.* (2004). Increased phosphorylated-mu-opioid receptor immunoreactivity in the mouse spinal cord following sciatic nerve ligation. *Neurosci Lett* 354: 148-152.
- Natarajan V, Schmid PC, Reddy PV, Zuzarte-Augustin ML, Schmid HH. (1983). Biosynthesis of N-acylethanolamine phospholipids by dog brain preparations. *J Neurochem* 41: 1303-1312.
- Navarro M, Carrera MR, Fratta W, Valverde O, Cossu G, Fattore L, *et al.* (2001). Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration. *J Neurosci* 21: 5344-5350.
- Neumann S, Doubell TP, Leslie T, Woolf CJ. (1996). Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature* 384: 360-364.
- Nicholson RA, Liao C, Zheng J, David LS, Coyne L, Errington AC, *et al.* (2003). Sodium channel inhibition by anandamide and synthetic cannabimimetics in brain. *Brain Res* 978: 194-204.
- Niiyama Y, Kawamata T, Yamamoto J, Omote K, Namiki A. (2007). Bone cancer increases transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expression within distinct subpopulations of dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 148: 560-572.
- Niphakis MJ, Johnson DS, Ballard TE, Stiff C, Cravatt BF. (2012). O-hydroxyacetamide carbamates as a highly potent and selective class of endocannabinoid hydrolase inhibitors. *ACS Chem Neurosci* 3: 418-426.
- Nolin P-C, Kenny C (2003). *Le Cannabis : Rapport du comité spécial du Sénat sur les drogues illicites*. Montréal.

Nomura DK, Morrison BE, Blankman JL, Long JZ, Kinsey SG, Marcondes MC, *et al.* (2011). Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation. *Science* 334: 809-813.

Noyes R, Jr., Brunk SF, Avery DA, Canter AC. (1975). The analgesic properties of delta-9-tetrahydrocannabinol and codeine. *Clin Pharmacol Ther* 18: 84-89.

Nyilas R, Dudok B, Urban GM, Mackie K, Watanabe M, Cravatt BF, *et al.* (2008). Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals. *J Neurosci* 28: 1058-1063.

Nyilas R, Gregg LC, Mackie K, Watanabe M, Zimmer A, Hohmann AG, *et al.* (2009). Molecular architecture of endocannabinoid signaling at nociceptive synapses mediating analgesia. *Eur J Neurosci* 29: 1964-1978.

O'Sullivan SE. (2007). Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol* 152: 576-582.

O'Sullivan SE, Kendall DA. (2010). Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology* 215: 611-616.

Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29: 729-738.

Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* 279: 5298-5305.

Olango WM, Roche M, Ford GK, Harhen B, Finn DP. (2012). The endocannabinoid system in the rat dorsolateral periaqueductal grey mediates fear-conditioned analgesia and controls fear expression in the presence of nociceptive tone. *Br J Pharmacol* 165: 2549-2560.

Onaivi ES, Chakrabarti A, Chaudhuri G. (1996). Cannabinoid receptor genes. *Prog Neurobiol* 48: 275-305.

Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, *et al.* (2006). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci* 1074: 514-536.

Ong WY, Mackie K. (1999). A light and electron microscopic study of the CB1 cannabinoid receptor in the primate spinal cord. *J Neurocytol* 28: 39-45.

Onofrio BM, Yaksh TL. (1983). Intrathecal delta-receptor ligand produces analgesia in man. *Lancet* 1: 1386-1387.

Ossipov MH, Lopez Y, Nichols ML, Bian D, Porreca F. (1995). 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.

Pacheco Dda F, Klein A, Perez AC, Pacheco CM, de Francischi JN, Reis GM, *et al.* (2009). Central antinociception induced by mu-opioid receptor agonist morphine, but not delta- or kappa-, is mediated by cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol* 158: 225-231.

Pacher P, Batkai S, Kunos G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 58: 389-462.

- Pacher P, Kunos G. (2013). Modulating the endocannabinoid system in human health and disease - successes and failures. *FEBS J*
- Pacher P, Mechoulam R. (2011). Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog Lipid Res* 50: 193-211.
- Paldy E, Bereczki E, Santha M, Wenger T, Borsodi A, Zimmer A, *et al.* (2008). CB(2) cannabinoid receptor antagonist SR144528 decreases mu-opioid receptor expression and activation in mouse brainstem: role of CB(2) receptor in pain. *Neurochem Int* 53: 309-316.
- Paldyova E, Bereczki E, Santha M, Wenger T, Borsodi A, Benyhe S. (2007). Altered gene expression and functional activity of opioid receptors in the cerebellum of CB1 cannabinoid receptor knockout mice after acute treatments with cannabinoids. *Acta Biol Hung* 58 Suppl: 113-129.
- Paldyova E, Bereczki E, Santha M, Wenger T, Borsodi A, Benyhe S. (2008). Noladin ether, a putative endocannabinoid, inhibits mu-opioid receptor activation via CB2 cannabinoid receptors. *Neurochem Int* 52: 321-328.
- Palmer SL, Thakur GA, Makriyannis A. (2002). Cannabinergic ligands. *Chem Phys Lipids* 121: 3-19.
- Pamplona FA, Takahashi RN. (2012). Psychopharmacology of the endocannabinoids: far beyond anandamide. *J Psychopharmacol* 26: 7-22.
- Pan B, Wang W, Zhong P, Blankman JL, Cravatt BF, Liu QS. (2011). Alterations of endocannabinoid signaling, synaptic plasticity, learning, and memory in monoacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci* 31: 13420-13430.
- Panikashvili D, Mechoulam R, Beni SM, Alexandrovich A, Shohami E. (2005). CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-kappa B inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 477-484.
- Parolaro D, Rubino T, Vigano D, Massi P, Guidali C, Realini N. (2010). Cellular mechanisms underlying the interaction between cannabinoid and opioid system. *Curr Drug Targets* 11: 393-405.
- Parsons CG, Czlonkowski A, Stein C, Herz A. (1990). Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Activation by endogenous opioids and role of the pituitary-adrenal axis. *Pain* 41: 81-93.
- Pert CB, Snyder SH. (1973). Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179: 1011-1014.
- Pertwee RG. (2001). Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* 63: 569-611.
- Pertwee RG. (2009). Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br J Pharmacol* 156: 397-411.
- Pertwee RG. (2007). GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol* 152: 984-986.
- Pertwee RG. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 74: 129-180.
- Pertwee RG. (1999). Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 6: 635-664.
- Pertwee RG. (2006). The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int J Obes (Lond)* 30 Suppl 1: S13-18.

Pertwee RG. (2005). The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *AAPS J* 7: E625-654.

Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, *et al.* (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacol Rev* 62: 588-631.

Petho G, Reeh PW. (2012). Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. *Physiol Rev* 92: 1699-1775.

Petrosino S, Di Marzo V. (2010). FAAH and MAGL inhibitors: therapeutic opportunities from regulating endocannabinoid levels. *Curr Opin Investig Drugs* 11: 51-62.

Petrosino S, Palazzo E, de Novellis V, Bisogno T, Rossi F, Maione S, *et al.* (2007). Changes in spinal and supraspinal endocannabinoid levels in neuropathic rats. *Neuropharmacology* 52: 415-422.

Pettersson LM, Sundler F, Danielsen N. (2002). Expression of orphanin FQ/nociceptin and its receptor in rat peripheral ganglia and spinal cord. *Brain Res* 945: 266-275.

Pickel VM, Chan J, Kash TL, Rodriguez JJ, MacKie K. (2004). Compartment-specific localization of cannabinoid 1 (CB1) and mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens. *Neuroscience* 127: 101-112.

Piomelli D. (2005). The endocannabinoid system: a drug discovery perspective. *Curr Opin Investig Drugs* 6: 672-679.

Piomelli D. (2001). The ligand that came from within. *Trends Pharmacol Sci* 22: 17-19.

Piomelli D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4: 873-884.

Piscitelli F, Di Marzo V. (2012). "Redundancy" of endocannabinoid inactivation: new challenges and opportunities for pain control. *ACS Chem Neurosci* 3: 356-363.

Pistis M, Melis M. (2010). From surface to nuclear receptors: the endocannabinoid family extends its assets. *Curr Med Chem* 17: 1450-1467.

Pitler TA, Alger BE. (1992). Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA_A responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 12: 4122-4132.

Price DD (1999). Primary afferent and dorsal horn mechanisms of pain. Dans: Price DD, (éd). *Psychological mechanisms of pain and analgesia*. New York: Raven Press.

Price TJ, Helesic G, Parghi D, Hargreaves KM, Flores CM. (2003). The neuronal distribution of cannabinoid receptor type 1 in the trigeminal ganglion of the rat. *Neuroscience* 120: 155-162.

Przewlocka B, Mika J, Labuz D, Toth G, Przewlocki R. (1999). Spinal analgesic action of endomorphins in acute, inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol* 367: 189-196.

Pugh G, Jr., Abood ME, Welch SP. (1995). Antisense oligodeoxynucleotides to the kappa-1 receptor block the antinociceptive effects of delta 9-THC in the spinal cord. *Brain Res* 689: 157-158.

- Pugh G, Jr., Mason DJ, Jr., Combs V, Welch SP. (1997). Involvement of dynorphin B in the antinociceptive effects of the cannabinoid CP55,940 in the spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther* 281: 730-737.
- Pugh G, Jr., Smith PB, Dombrowski DS, Welch SP. (1996). The role of endogenous opioids in enhancing the antinociception produced by the combination of delta 9-tetrahydrocannabinol and morphine in the spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther* 279: 608-616.
- Puig S, Sorkin LS. (1996). Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* 64: 345-355.
- Quartilho A, Mata HP, Ibrahim MM, Vanderah TW, Porreca F, Makriyannis A, *et al.* (2003). Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology* 99: 955-960.
- Racz I, Nadal X, Alferink J, Banos JE, Rehnelt J, Martin M, *et al.* (2008). Crucial role of CB(2) cannabinoid receptor in the regulation of central immune responses during neuropathic pain. *J Neurosci* 28: 12125-12135.
- Raffa RB, Ward SJ. (2012). CB(1)-independent mechanisms of Delta(9)-THCV, AM251 and SR141716 (rimonabant). *J Clin Pharm Ther* 37: 260-265.
- Rani Sagar D, Burston JJ, Woodhams SG, Chapman V. (2012). Dynamic changes to the endocannabinoid system in models of chronic pain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367: 3300-3311.
- Re G, Barbero R, Miolo A, Di Marzo V. (2007). Palmitoylethanolamide, endocannabinoids and related cannabimimetic compounds in protection against tissue inflammation and pain: potential use in companion animals. *Vet J* 173: 21-30.
- Reche I, Fuentes JA, Ruiz-Gayo M. (1996a). Potentiation of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced analgesia by morphine in mice: involvement of mu- and kappa-opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 318: 11-16.
- Reche I, Fuentes JA, Ruiz-Gayo M. (1996b). A role for central cannabinoid and opioid systems in peripheral delta 9-tetrahydrocannabinol-induced analgesia in mice. *Eur J Pharmacol* 301: 75-81.
- Ren K, Dubner R. (1999). Inflammatory Models of Pain and Hyperalgesia. *ILAR J* 40: 111-118.
- Rexed B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96: 414-495.
- Reynolds DV. (1969). Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 164: 444-445.
- Rhee MH, Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z. (1998). Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem* 71: 1525-1534.
- Rice AS, Farquhar-Smith WP, Nagy I. (2002). Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 243-256.
- Richardson JD, Aanonsen L, Hargreaves KM. (1998a). Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids. *Eur J Pharmacol* 345: 145-153.

- Richardson JD, Aanonsen L, Hargreaves KM. (1998b). Hypoactivity of the spinal cannabinoid system results in NMDA-dependent hyperalgesia. *J Neurosci* 18: 451-457.
- Richardson JD, Kilo S, Hargreaves KM. (1998c). Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain* 75: 111-119.
- Rios C, Gomes I, Devi LA. (2006). μ opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *Br J Pharmacol* 148: 387-395.
- Robbe D, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni OJ. (2001). Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci* 21: 109-116.
- Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ. (2002). Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8384-8388.
- Roberts JD, Gennings C, Shih M. (2006). Synergistic affective analgesic interaction between delta-9-tetrahydrocannabinol and morphine. *Eur J Pharmacol* 530: 54-58.
- Robertson B, Schulte G, Elde R, Grant G. (1999). Effects of sciatic nerve injuries on delta -opioid receptor and substance P immunoreactivities in the superficial dorsal horn of the rat. *Eur J Pain* 3: 115-129.
- Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM. (2001). Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in μ -opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J Neurosci* 21: 823-833.
- Rom S, Persidsky Y. (2013). Cannabinoid Receptor 2: Potential Role in Immunomodulation and Neuroinflammation. *J Neuroimmune Pharmacol*
- Romero-Sandoval A, Eisenach JC. (2007). Spinal cannabinoid receptor type 2 activation reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision. *Anesthesiology* 106: 787-794.
- Romero-Sandoval A, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA. (2008). Spinal microglial and perivascular cell cannabinoid receptor type 2 activation reduces behavioral hypersensitivity without tolerance after peripheral nerve injury. *Anesthesiology* 108: 722-734.
- Romero TR, Guzzo LS, Duarte ID. (2012). μ , δ , and κ opioid receptor agonists induce peripheral antinociception by activation of endogenous noradrenergic system. *J Neurosci Res* 90: 1654-1661.
- Ronesi J, Gerdeman GL, Lovinger DM. (2004). Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport. *J Neurosci* 24: 1673-1679.
- Roques B (1998). *Problèmes posés par la dangerosité des « drogues »*. Paris.
- Roques BP, Fournie-Zaluski MC, Wurm M. (2012a). Inhibiting the breakdown of endogenous opioids and cannabinoids to alleviate pain. *Nat Rev Drug Discov* 11: 292-310.
- Roques BP, Fournie-Zaluski MC, Wurm M. (2012b). [New painkillers inhibiting the physiological breakdown of endogenous opioids]. *Med Sci (Paris)* 28: 476-478.
- Roques BP, Noble F, Dauge V, Fournie-Zaluski MC, Beaumont A. (1993). Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 45: 87-146.

- Rosland JH, Tjolsen A, Maehle B, Hole K. (1990). The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain* 42: 235-242.
- Ross RA. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 140: 790-801.
- Ross RA, Coutts AA, McFarlane SM, Anavi-Goffer S, Irving AJ, Pertwee RG, *et al.* (2001). Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology* 40: 221-232.
- Rossi GC, Pasternak GW, Bodnar RJ. (1993). Synergistic brainstem interactions for morphine analgesia. *Brain Res* 624: 171-180.
- Roth-Deri I, Green-Sadan T, Yadid G. (2008). Beta-endorphin and drug-induced reward and reinforcement. *Prog Neurobiol* 86: 1-21.
- Rotthier A, Baets J, Timmerman V, Janssens K. (2012). Mechanisms of disease in hereditary sensory and autonomic neuropathies. *Nat Rev Neurol* 8: 73-85.
- Rowen DW, Embrey JP, Moore CH, Welch SP. (1998). Antisense oligodeoxynucleotides to the kappa1 receptor enhance delta9-THC-induced antinociceptive tolerance. *Pharmacol Biochem Behav* 59: 399-404.
- Rozenfeld R, Bushlin I, Gomes I, Tzavaras N, Gupta A, Neves S, *et al.* (2012). Receptor heteromerization expands the repertoire of cannabinoid signaling in rodent neurons. *PLoS One* 7: e29239.
- Rubino T, Tizzoni L, Vigano D, Massi P, Parolaro D. (1997). Modulation of rat brain cannabinoid receptors after chronic morphine treatment. *Neuroreport* 8: 3219-3223.
- Rubovitch V, Gafni M, Sarne Y. (2002). The cannabinoid agonist DALN positively modulates L-type voltage-dependent calcium-channels in N18TG2 neuroblastoma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 101: 93-102.
- Russo R, Loverme J, La Rana G, Compton TR, Parrott J, Duranti A, *et al.* (2007). The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 (cyclohexylcarbamic acid 3'-carbamoylbiphenyl-3-yl ester) reduces neuropathic pain after oral administration in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 322: 236-242.
- Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, *et al.* (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152: 1092-1101.
- Sacerdote P, Martucci C, Vaccani A, Bariselli F, Panerai AE, Colombo A, *et al.* (2005). The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both in vivo and in vitro. *J Neuroimmunol* 159: 97-105.
- Sagan S, Venance L, Torrens Y, Cordier J, Glowinski J, Giaume C. (1999). Anandamide and WIN 55212-2 inhibit cyclic AMP formation through G-protein-coupled receptors distinct from CB1 cannabinoid receptors in cultured astrocytes. *Eur J Neurosci* 11: 691-699.
- Sagar DR, Kelly S, Millns PJ, O'Shaughnessey CT, Kendall DA, Chapman V. (2005). Inhibitory effects of CB1 and CB2 receptor agonists on responses of DRG neurons and dorsal horn neurons in neuropathic rats. *Eur J Neurosci* 22: 371-379.

- Sagredo O, Gonzalez S, Aroyo I, Pazos MR, Benito C, Lastres-Becker I, *et al.* (2009). Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. *Glia* 57: 1154-1167.
- Sain NM, Liang A, Kane SA, Urban MO. (2009). Antinociceptive effects of the non-selective cannabinoid receptor agonist CP 55,940 are absent in CB1(-/-) and not CB2(-/-) mice in models of acute and persistent pain. *Neuropharmacology* 57: 235-241.
- Salio C, Doly S, Fischer J, Franzoni MF, Conrath M. (2002). Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 329: 13-16.
- Salio C, Fischer J, Franzoni MF, Mackie K, Kaneko T, Conrath M. (2001). CB1-cannabinoid and mu-opioid receptor co-localization on postsynaptic target in the rat dorsal horn. *Neuroreport* 12: 3689-3692.
- Savinainen JR, Saario SM, Laitinen JT. (2012). The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta Physiol (Oxf)* 204: 267-276.
- Sawynok J. (2003). Topical and peripherally acting analgesics. *Pharmacol Rev* 55: 1-20.
- Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE. (1997). Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol* 142: 278-287.
- Schlicker E, Kathmann M. (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22: 565-572.
- Schlosburg JE, Blankman JL, Long JZ, Nomura DK, Pan B, Kinsey SG, *et al.* (2010). Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 13: 1113-1119.
- Schneider SP, Eckert WA, 3rd, Light AR. (1998). Opioid-activated postsynaptic, inward rectifying potassium currents in whole cell recordings in substantia gelatinosa neurons. *J Neurophysiol* 80: 2954-2962.
- Schreiber AK, Neufeld M, Jesus CH, Cunha JM. (2012). Peripheral antinociceptive effect of anandamide and drugs that affect the endocannabinoid system on the formalin test in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Neuropharmacology* 63: 1286-1297.
- Seely KA, Brents LK, Franks LN, Rajasekaran M, Zimmerman SM, Fantegrossi WE, *et al.* (2012). AM-251 and rimonabant act as direct antagonists at mu-opioid receptors: implications for opioid/cannabinoid interaction studies. *Neuropharmacology* 63: 905-915.
- Seltzer Z, Devor M. (1979). Ephaptic transmission in chronically damaged peripheral nerves. *Neurology* 29: 1061-1064.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43: 205-218.
- Seyrek M, Kahraman S, Deveci MS, Yesilyurt O, Dogrul A. (2010). Systemic cannabinoids produce CB(1)-mediated antinociception by activation of descending serotonergic pathways that act upon spinal 5-HT(7) and 5-HT(2A) receptors. *Eur J Pharmacol* 649: 183-194.

- Sharir H, Abood ME. (2010). Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacol Ther* 126: 301-313.
- Sheng WS, Hu S, Min X, Cabral GA, Lokensgard JR, Peterson PK. (2005). Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Glia* 49: 211-219.
- Sherrington CS. (1906). Observations on the scratch-reflex in the spinal dog. *J Physiol* 34: 1-50.
- Shohami E, Beit-Yannai E, Horowitz M, Kohen R. (1997a). Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 1007-1019.
- Shohami E, Gallily R, Mechoulam R, Bass R, Ben-Hur T. (1997b). Cytokine production in the brain following closed head injury: dexamibinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant. *J Neuroimmunol* 72: 169-177.
- Siegling A, Hofmann HA, Denzer D, Mauler F, De Vry J. (2001). Cannabinoid CB(1) receptor upregulation in a rat model of chronic neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 415: R5-7.
- Simon EJ, Hiller JM, Edelman I. (1973). Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 1947-1949.
- Simon GM, Cravatt BF. (2008). Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *J Biol Chem* 283: 9341-9349.
- Simone DA, Ngeow JY, Putterman GJ, LaMotte RH. (1987). Hyperalgesia to heat after intradermal injection of capsaicin. *Brain Res* 418: 201-203.
- Simonin F, Slowe S, Becker JA, Matthes HW, Filliol D, Chluba J, *et al.* (2001). Analysis of [3H]bremazocine binding in single and combinatorial opioid receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* 414: 189-195.
- Siuciak JA, Advokat C. (1989). The synergistic effect of concurrent spinal and supraspinal opiate agonisms is reduced by both nociceptive and morphine pretreatment. *Pharmacol Biochem Behav* 34: 265-273.
- Slipetz DM, O'Neill GP, Favreau L, Dufresne C, Gallant M, Gareau Y, *et al.* (1995). Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 48: 352-361.
- Smart D, Jerman JC. (2000). Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 21: 134.
- Smith FL, Cichewicz D, Martin ZL, Welch SP. (1998a). The enhancement of morphine antinociception in mice by delta9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacol Biochem Behav* 60: 559-566.
- Smith FL, Fujimori K, Lowe J, Welch SP. (1998b). Characterization of delta9-tetrahydrocannabinol and anandamide antinociception in nonarthritic and arthritic rats. *Pharmacol Biochem Behav* 60: 183-191.
- Smith PA, Selley DE, Sim-Selley LJ, Welch SP. (2007). Low dose combination of morphine and delta9-tetrahydrocannabinol circumvents antinociceptive tolerance and apparent desensitization of receptors. *Eur J Pharmacol* 571: 129-137.
- Smith PB, Compton DR, Welch SP, Razdan RK, Mechoulam R, Martin BR. (1994a). The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 219-227.

Smith PB, Martin BR. (1992). Spinal mechanisms of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced analgesia. *Brain Res* 578: 8-12.

Smith PB, Welch SP, Martin BR. (1994b). Interactions between delta 9-tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 1381-1387.

Smith SR, Terminelli C, Denhardt G. (2000). Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 136-150.

Snyder SH (1971). *The uses of marijuana* New York: Oxford University Press.

Sora I, Elmer G, Funada M, Pieper J, Li XF, Hall FS, *et al.* (2001). Mu opiate receptor gene dose effects on different morphine actions: evidence for differential in vivo mu receptor reserve. *Neuropsychopharmacology* 25: 41-54.

Spicer L (2002). UTILISATIONS HISTORIQUES ET CULTURELLES DU CANNABIS ET LE « DÉBAT SUR LA MARIJUANA » AU CANADA, Division du droit et du gouvernement edn. Bibliothèque du Parlement du Canada.

Spigelman I (2010). *Therapeutic Targeting of Peripheral Cannabinoid Receptors in Inflammatory and Neuropathic Pain State Translational Pain Research: From Mouse to Man*. Boca Raton, FL: LLC.

Spradley JM, Davoodi A, Gee LB, Carstens MI, Carstens E. (2012). Differences in peripheral endocannabinoid modulation of scratching behavior in facial vs. spinally-innervated skin. *Neuropharmacology* 63: 743-749.

Stander S, Schmelz M, Metze D, Luger T, Rukwied R. (2005). Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *J Dermatol Sci* 38: 177-188.

Starowicz K, Di Marzo V. (2013). Non-psychotropic analgesic drugs from the endocannabinoid system: "Magic bullet" or "multiple-target" strategies? *Eur J Pharmacol*

Staton PC, Hatcher JP, Walker DJ, Morrison AD, Shapland EM, Hughes JP, *et al.* (2008). The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 139: 225-236.

Stein C, Hassan AH, Przewlocki R, Gramsch C, Peter K, Herz A. (1990). Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5935-5939.

Stein C, Machelska H, Schafer M. (2001). Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids. *Z Rheumatol* 60: 416-424.

Stein C, Millan MJ, Herz A. (1988). Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacol Biochem Behav* 31: 445-451.

Stein C, Millan MJ, Shippenberg TS, Peter K, Herz A. (1989). Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 248: 1269-1275.

- Stein C, Zollner C. (2009). Opioids and sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol* 495-518.
- Steiner H, Bonner TI, Zimmer AM, Kitai ST, Zimmer A. (1999). Altered gene expression in striatal projection neurons in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5786-5790.
- Stella N, Piomelli D. (2001). Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 425: 189-196.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388: 773-778.
- Stevens CW, Seybold VS. (1995). Changes of opioid binding density in the rat spinal cord following unilateral dorsal rhizotomy. *Brain Res* 687: 53-62.
- Strangman NM, Patrick SL, Hohmann AG, Tsou K, Walker JM. (1998). Evidence for a role of endogenous cannabinoids in the modulation of acute and tonic pain sensitivity. *Brain Res* 813: 323-328.
- Strangman NM, Walker JM. (1999). Cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits the activity-dependent facilitation of spinal nociceptive responses. *J Neurophysiol* 82: 472-477.
- Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Tonegawa T, Nakane S, Kishimoto S, *et al.* (1996). 2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of intracellular free Ca²⁺ in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 58-64.
- Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, Miyashita T, Kondo S, Suhara Y, *et al.* (1999). Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *J Biol Chem* 274: 2794-2801.
- Sugiura T, Kondo S, Kishimoto S, Miyashita T, Nakane S, Kodaka T, *et al.* (2000). Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *J Biol Chem* 275: 605-612.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, *et al.* (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 89-97.
- Sugiura T, Waku K. (2000). 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 108: 89-106.
- Sun Y, Alexander SP, Kendall DA, Bennett AJ. (2006). Cannabinoids and PPARalpha signalling. *Biochem Soc Trans* 34: 1095-1097.
- Sun Y, Bennett A. (2007). Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR Res* 2007: 23513.
- Suplita RL, 2nd, Farthing JN, Gutierrez T, Hohmann AG. (2005). Inhibition of fatty-acid amide hydrolase enhances cannabinoid stress-induced analgesia: sites of action in the dorsolateral periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Neuropharmacology* 49: 1201-1209.
- Sutters KA, Miaskowski C, Taiwo YO, Levine JD. (1990). Analgesic synergy and improved motor function produced by combinations of mu-delta- and mu-kappa-opioids. *Brain Res* 530: 290-294.

- Szabo B, Urbanski MJ, Bisogno T, Di Marzo V, Mendiguren A, Baer WU, *et al.* (2006). Depolarization-induced retrograde synaptic inhibition in the mouse cerebellar cortex is mediated by 2-arachidonoylglycerol. *J Physiol* 577: 263-280.
- Szoke E, Balla Z, Csernoch L, Czeh G, Szolcsanyi J. (2000). Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurones. *Neuroreport* 11: 1949-1952.
- Tal M, Bennett GJ. (1994). Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 57: 375-382.
- Tanimura A, Uchigashima M, Yamazaki M, Uesaka N, Mikuni T, Abe M, *et al.* (2012). Synapse type-independent degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol after retrograde synaptic suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 12195-12200.
- Tanimura A, Yamazaki M, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, *et al.* (2010). The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron* 65: 320-327.
- Taylor F, Dickenson A. (1998). Nociceptin/orphanin FQ. A new opioid, a new analgesic? *Neuroreport* 9: R65-70.
- Terenius L. (1973). Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 33: 377-384.
- Tham SM, Angus JA, Tudor EM, Wright CE. (2005). Synergistic and additive interactions of the cannabinoid agonist CP55,940 with mu opioid receptor and alpha2-adrenoceptor agonists in acute pain models in mice. *Br J Pharmacol* 144: 875-884.
- Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51: 5-17.
- Tognetto M, Amadesi S, Harrison S, Creminon C, Trevisani M, Carreras M, *et al.* (2001). Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. *J Neurosci* 21: 1104-1109.
- Tracey I, Mantyh PW. (2007). The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron* 55: 377-391.
- Trang T, Sutak M, Jhamandas K. (2007). Involvement of cannabinoid (CB1)-receptors in the development and maintenance of opioid tolerance. *Neuroscience* 146: 1275-1288.
- Treede RD, Meyer RA, Campbell JN. (1998). Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: heat-response properties. *J Neurophysiol* 80: 1082-1093.
- Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. (2008). Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11: S133-153.
- Tsou K, Lowitz KA, Hohmann AG, Martin WJ, Hathaway CB, Bereiter DA, *et al.* (1996). Suppression of noxious stimulus-evoked expression of Fos protein-like immunoreactivity in rat spinal cord by a selective cannabinoid agonist. *Neuroscience* 70: 791-798.

- Tuboly G, Mecs L, Benedek G, Horvath G. (2009). Antinociceptive interactions between anandamide and endomorphin-1 at the spinal level. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36: 400-405.
- Turchan-Cholewo J, Dimayuga FO, Ding Q, Keller JN, Hauser KF, Knapp PE, *et al.* (2008). Cell-specific actions of HIV-Tat and morphine on opioid receptor expression in glia. *J Neurosci Res* 86: 2100-2110.
- Twitchell W, Brown S, Mackie K. (1997). Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 78: 43-50.
- Uchigashima M, Yamazaki M, Yamasaki M, Tanimura A, Sakimura K, Kano M, *et al.* (2011). Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J Neurosci* 31: 7700-7714.
- Ueda H. (2006). Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacol Ther* 109: 57-77.
- Ueda N, Tsuboi K, Uyama T. (2010). N-acylethanolamine metabolism with special reference to N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). *Prog Lipid Res* 49: 299-315.
- Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, *et al.* (2007). Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 1-13.
- Valverde O, Ledent C, Beslot F, Parmentier M, Roques BP. (2000a). Reduction of stress-induced analgesia but not of exogenous opioid effects in mice lacking CB1 receptors. *Eur J Neurosci* 12: 533-539.
- Valverde O, Maldonado R, Valjent E, Zimmer AM, Zimmer A. (2000b). Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in pre-proenkephalin knock-out mice. *J Neurosci* 20: 9284-9289.
- Valverde O, Noble F, Beslot F, Dauge V, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. (2001). Delta9-tetrahydrocannabinol releases and facilitates the effects of endogenous enkephalins: reduction in morphine withdrawal syndrome without change in rewarding effect. *Eur J Neurosci* 13: 1816-1824.
- van der Stelt M, van Kuik JA, Bari M, van Zadelhoff G, Leeflang BR, Veldink GA, *et al.* (2002). Oxygenated metabolites of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: conformational analysis and interaction with cannabinoid receptors, membrane transporter, and fatty acid amide hydrolase. *J Med Chem* 45: 3709-3720.
- van Rijn RM, Whistler JL, Waldhoer M. (2010). Opioid-receptor-heteromer-specific trafficking and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 10: 73-79.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, *et al.* (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310: 329-332.
- Vandevoorde S, Jonsson KO, Labar G, Persson E, Lambert DM, Fowler CJ. (2007). Lack of selectivity of URB602 for 2-oleoylglycerol compared to anandamide hydrolysis in vitro. *Br J Pharmacol* 150: 186-191.
- Vandevoorde S, Lambert DM. (2007). The multiple pathways of endocannabinoid metabolism: a zoom out. *Chem Biodivers* 4: 1858-1881.
- Varma N, Carlson GC, Ledent C, Alger BE. (2001). Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J Neurosci* 21: RC188.

- Vaughan CW, Connor M, Bagley EE, Christie MJ. (2000). Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Mol Pharmacol* 57: 288-295.
- Vaughan CW, McGregor IS, Christie MJ. (1999). Cannabinoid receptor activation inhibits GABAergic neurotransmission in rostral ventromedial medulla neurons in vitro. *Br J Pharmacol* 127: 935-940.
- Venance L, Piomelli D, Glowinski J, Giaume C. (1995). Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes. *Nature* 376: 590-594.
- Vigano D, Grazia Cascio M, Rubino T, Fezza F, Vaccani A, Di Marzo V, *et al.* (2003). Chronic morphine modulates the contents of the endocannabinoid, 2-arachidonoyl glycerol, in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 28: 1160-1167.
- Vigano D, Rubino T, Parolaro D. (2005). Molecular and cellular basis of cannabinoid and opioid interactions. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 360-368.
- Vincenzi F, Targa M, Corciulo C, Tabrizi MA, Merighi S, Gessi S, *et al.* (2013). Antinociceptive effects of the selective CB agonist MT178 in inflammatory and chronic rodent pain models. *Pain*
- Walczak JS, Pichette V, Leblond F, Desbiens K, Beaulieu P. (2005). Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain. *Neuroscience* 132: 1093-1102.
- Walczak JS, Pichette V, Leblond F, Desbiens K, Beaulieu P. (2006). Characterization of chronic constriction of the saphenous nerve, a model of neuropathic pain in mice showing rapid molecular and electrophysiological changes. *J Neurosci Res* 83: 1310-1322.
- Walker JM, Hohmann AG. (2005). Cannabinoid mechanisms of pain suppression. *Handb Exp Pharmacol* 509-554.
- Walker JM, Hohmann AG, Martin WJ, Strangman NM, Huang SM, Tsou K. (1999a). The neurobiology of cannabinoid analgesia. *Life Sci* 65: 665-673.
- Walker JM, Huang SM. (2002). Cannabinoid analgesia. *Pharmacol Ther* 95: 127-135.
- Walker JM, Huang SM, Strangman NM, Tsou K, Sanudo-Pena MC. (1999b). Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12198-12203.
- Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ, *et al.* (2003). The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 304: 56-62.
- Wall PD. (1978). The gate control theory of pain mechanisms. A re-examination and re-statement. *Brain* 101: 1-18.
- Walter L, Stella N. (2004). Cannabinoids and neuroinflammation. *Br J Pharmacol* 141: 775-785.
- Wang H, Wessendorf MW. (2001). Equal proportions of small and large DRG neurons express opioid receptor mRNAs. *J Comp Neurol* 429: 590-600.
- Wang H, Woolf CJ. (2005). Pain TRPs. *Neuron* 46: 9-12.

- Wang H, Xie H, Dey SK. (2008). Loss of cannabinoid receptor CB1 induces preterm birth. *PLoS One* 3: e3320.
- Wang JB, Imai Y, Eppler CM, Gregor P, Spivak CE, Uhl GR. (1993). μ opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10230-10234.
- Wang LX, Wang ZJ. (2003). Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 949-965.
- Wang S, Lim G, Mao J, Sung B, Yang L, Mao J. (2007). Central glucocorticoid receptors regulate the upregulation of spinal cannabinoid-1 receptors after peripheral nerve injury in rats. *Pain* 131: 96-105.
- Ware MA. (2011). Clearing the smoke around medical marijuana. *Clin Pharmacol Ther* 90: 769-771.
- Watson GS, Sufka KJ, Coderre TJ. (1997). Optimal scoring strategies and weights for the formalin test in rats. *Pain* 70: 53-58.
- Waxman SG, Dib-Hajj S, Cummins TR, Black JA. (1999). Sodium channels and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7635-7639.
- Wegert S, Ossipov MH, Nichols ML, Bian D, Vanderah TW, Malan TP, Jr., *et al.* (1997). Differential activities of intrathecal MK-801 or morphine to alter responses to thermal and mechanical stimuli in normal or nerve-injured rats. *Pain* 71: 57-64.
- Welch SP. (1994). Blockade of cannabinoid-induced antinociception by naloxone benzoylhydrazone (NalBZH). *Pharmacol Biochem Behav* 49: 929-934.
- Welch SP. (1993). Blockade of cannabinoid-induced antinociception by norbinaltorphimine, but not N,N-diallyl-tyrosine-Aib-phenylalanine-leucine, ICI 174,864 or naloxone in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 265: 633-640.
- Welch SP. (1997). Characterization of anandamide-induced tolerance: comparison to delta 9-THC-induced interactions with dynorphinergic systems. *Drug Alcohol Depend* 45: 39-45.
- Welch SP. (2009). Interaction of the cannabinoid and opioid systems in the modulation of nociception. *Int Rev Psychiatry* 21: 143-151.
- Welch SP, Dunlow LD, Patrick GS, Razdan RK. (1995a). Characterization of anandamide- and fluoroanandamide-induced antinociception and cross-tolerance to delta 9-THC after intrathecal administration to mice: blockade of delta 9-THC-induced antinociception. *J Pharmacol Exp Ther* 273: 1235-1244.
- Welch SP, Eads M. (1999). Synergistic interactions of endogenous opioids and cannabinoid systems. *Brain Res* 848: 183-190.
- Welch SP, Huffman JW, Lowe J. (1998). Differential blockade of the antinociceptive effects of centrally administered cannabinoids by SR141716A. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 1301-1308.
- Welch SP, Stevens DL. (1992). Antinociceptive activity of intrathecally administered cannabinoids alone, and in combination with morphine, in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 10-18.

Welch SP, Thomas C, Patrick GS. (1995b). Modulation of cannabinoid-induced antinociception after intracerebroventricular versus intrathecal administration to mice: possible mechanisms for interaction with morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 310-321.

Whiteside GT, Gottshall SL, Boulet JM, Chaffer SM, Harrison JE, Pearson MS, *et al.* (2005). A role for cannabinoid receptors, but not endogenous opioids, in the antinociceptive activity of the CB2-selective agonist, GW405833. *Eur J Pharmacol* 528: 65-72.

Whittle BA, Guy GW (2004). Development of cannabis-based medicines: risk, benefit and serendipity. Dans: Guy GW, Whittle BA, Robson PJ, (éd). *The Medicinal Uses of Cannabis and Cannabinoids*. London: Pharmaceutical Press.

Williams J, Haller VL, Stevens DL, Welch SP. (2008). Decreased basal endogenous opioid levels in diabetic rodents: effects on morphine and delta-9-tetrahydrocannabinoid-induced antinociception. *Eur J Pharmacol* 584: 78-86.

Willis WD. (1985). Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 308: 253-270.

Willoughby KA, Moore SF, Martin BR, Ellis EF. (1997). The biodisposition and metabolism of anandamide in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 243-247.

Wilson-Poe AR, Morgan MM, Aicher SA, Hegarty DM. (2012). Distribution of CB1 cannabinoid receptors and their relationship with mu-opioid receptors in the rat periaqueductal gray. *Neuroscience* 213: 191-200.

Wilson-Poe AR, Pocius E, Herschbach M, Morgan MM. (2013). The periaqueductal gray contributes to bidirectional enhancement of antinociception between morphine and cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav* 103: 444-449.

Wilson AR, Maher L, Morgan MM. (2008). Repeated cannabinoid injections into the rat periaqueductal gray enhance subsequent morphine antinociception. *Neuropharmacology* 55: 1219-1225.

Wilson RI, Kunos G, Nicoll RA. (2001). Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron* 31: 453-462.

Wilson RI, Nicoll RA. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296: 678-682.

Wilson RI, Nicoll RA. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410: 588-592.

Wilson RS, May EL. (1975). Analgesic properties of the tetrahydrocannabinols, their metabolites, and analogs. *J Med Chem* 18: 700-703.

Wise LE, Shelton CC, Cravatt BF, Martin BR, Lichtman AH. (2007). Assessment of anandamide's pharmacological effects in mice deficient of both fatty acid amide hydrolase and cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 557: 44-48.

Wiskerke J, Irimia C, Cravatt BF, De Vries TJ, Schoffelmeer AN, Pattij T, *et al.* (2012). Characterization of the effects of reuptake and hydrolysis inhibition on interstitial endocannabinoid levels in the brain: an in vivo microdialysis study. *ACS Chem Neurosci* 3: 407-417.

- Wood JN, Akopian AN, Baker M, Ding Y, Geoghegan F, Nassar M, *et al.* (2002). Sodium channels in primary sensory neurons: relationship to pain states. *Novartis Found Symp* 241: 159-168; discussion 168-172, 226-132.
- Wood JN, Boorman JP, Okuse K, Baker MD. (2004). Voltage-gated sodium channels and pain pathways. *J Neurobiol* 61: 55-71.
- Woodward DF, Carling RW, Cornell CL, Fliri HG, Martos JL, Pettit SN, *et al.* (2008). The pharmacology and therapeutic relevance of endocannabinoid derived cyclo-oxygenase (COX)-2 products. *Pharmacol Ther* 120: 71-80.
- Woolf CJ. (2011). Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* 152: S2-15.
- Woolf CJ, Ma Q. (2007). Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* 55: 353-364.
- Woolf CJ, Salter MW. (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288: 1765-1769.
- Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. (1992). Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355: 75-78.
- Wotherspoon G, Fox A, McIntyre P, Colley S, Bevan S, Winter J. (2005). Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. *Neuroscience* 135: 235-245.
- Wu G, Ringkamp M, Murinson BB, Pogatzki EM, Hartke TV, Weerahandi HM, *et al.* (2002). Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents. *J Neurosci* 22: 7746-7753.
- Wu ZZ, Chen SR, Pan HL. (2008). Distinct inhibition of voltage-activated Ca²⁺ channels by delta-opioid agonists in dorsal root ganglion neurons devoid of functional T-type Ca²⁺ currents. *Neuroscience* 153: 1256-1267.
- Xie Z, Bhushan RG, Daniels DJ, Portoghese PS. (2005). Interaction of bivalent ligand KDN21 with heterodimeric delta-kappa opioid receptors in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* 68: 1079-1086.
- Yamamoto W, Mikami T, Iwamura H. (2008). Involvement of central cannabinoid CB2 receptor in reducing mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 583: 56-61.
- Yamaori S, Kushihara M, Yamamoto I, Watanabe K. (2010). Characterization of major phytocannabinoids, cannabidiol and cannabiol, as isoform-selective and potent inhibitors of human CYP1 enzymes. *Biochem Pharmacol* 79: 1691-1698.
- Yanarates O, Dogrul A, Yildirim V, Sahin A, Sizlan A, Seyrek M, *et al.* (2010). Spinal 5-HT₇ receptors play an important role in the antinociceptive and antihyperalgesic effects of tramadol and its metabolite, O-Desmethyltramadol, via activation of descending serotonergic pathways. *Anesthesiology* 112: 696-710.
- Yao BB, Hsieh G, Daza AV, Fan Y, Grayson GK, Garrison TR, *et al.* (2009). Characterization of a cannabinoid CB2 receptor-selective agonist, A-836339 [2,2,3,3-tetramethyl-cyclopropanecarboxylic acid [3-(2-methoxy-ethyl)-4,5-dimethyl-3H-thiazol-(2Z)-ylidene]-amide], using in vitro pharmacological assays, in vivo pain models, and pharmacological magnetic resonance imaging. *J Pharmacol Exp Ther* 328: 141-151.

- Yao BB, Hsieh GC, Frost JM, Fan Y, Garrison TR, Daza AV, *et al.* (2008). In vitro and in vivo characterization of A-796260: a selective cannabinoid CB2 receptor agonist exhibiting analgesic activity in rodent pain models. *Br J Pharmacol* 153: 390-401.
- Yao BB, Mukherjee S, Fan Y, Garrison TR, Daza AV, Grayson GK, *et al.* (2006). In vitro pharmacological characterization of AM1241: a protean agonist at the cannabinoid CB2 receptor? *Br J Pharmacol* 149: 145-154.
- Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, *et al.* (1993). Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6736-6740.
- Yates ML, Barker EL. (2009). Inactivation and biotransformation of the endogenous cannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Mol Pharmacol* 76: 11-17.
- Yesilyurt O, Dogrul A, Gul H, Seyrek M, Kusmez O, Ozkan Y, *et al.* (2003). Topical cannabinoid enhances topical morphine antinociception. *Pain* 105: 303-308.
- Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell IP, Naylor A, Bountra C, *et al.* (2006). COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol* 6: 12.
- Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Miura E, Kamiya H, Kano M, *et al.* (2006). Localization of diacylglycerol lipase-alpha around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci* 26: 4740-4751.
- Yoshida T, Uchigashima M, Yamasaki M, Katona I, Yamazaki M, Sakimura K, *et al.* (2011). Unique inhibitory synapse with particularly rich endocannabinoid signaling machinery on pyramidal neurons in basal amygdaloid nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 3059-3064.
- Youssef FF, Irving AJ. (2012). From cannabis to the endocannabinoid system: refocussing attention on potential clinical benefits. *West Indian Med J* 61: 264-270.
- Yu XH, Cao CQ, Martino G, Puma C, Morinville A, St-Onge S, *et al.* (2010). A peripherally restricted cannabinoid receptor agonist produces robust anti-nociceptive effects in rodent models of inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 151: 337-344.
- Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. (1997). A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386: 499-502.
- Zador F, Otvos F, Benyhe S, Zimmer A, Paldy E. (2012). Inhibition of forebrain mu-opioid receptor signaling by low concentrations of rimonabant does not require cannabinoid receptors and directly involves mu-opioid receptors. *Neurochem Int* 61: 378-388.
- Zajac JM, Lombard MC, Peschanski M, Besson JM, Roques BP. (1989). Autoradiographic study of mu and delta opioid binding sites and neutral endopeptidase-24.11 in rat after dorsal root rhizotomy. *Brain Res* 477: 400-403.
- Zeilhofer HU, Calo G. (2003). Nociceptin/orphanin FQ and its receptor--potential targets for pain therapy? *J Pharmacol Exp Ther* 306: 423-429.

Zhang J, Hoffert C, Vu HK, Groblewski T, Ahmad S, O'Donnell D. (2003). Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. *Eur J Neurosci* 17: 2750-2754.

Zhang L, Wang M, Bisogno T, Di Marzo V, Alger BE. (2011). Endocannabinoids generated by Ca²⁺ or by metabotropic glutamate receptors appear to arise from different pools of diacylglycerol lipase. *PLoS One* 6: e16305.

Zhao P, Abood ME. (2013). GPR55 and GPR35 and their relationship to cannabinoid and lysophospholipid receptors. *Life Sci* 92: 453-457.

Zhu HJ, Wang JS, Markowitz JS, Donovan JL, Gibson BB, Gefroh HA, *et al.* (2006). Characterization of P-glycoprotein inhibition by major cannabinoids from marijuana. *J Pharmacol Exp Ther* 317: 850-857.

Zimmer A, Valjent E, Konig M, Zimmer AM, Robledo P, Hahn H, *et al.* (2001). Absence of delta -9-tetrahydrocannabinol dysphoric effects in dynorphin-deficient mice. *J Neurosci* 21: 9499-9505.

Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI. (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5780-5785.

Zogopoulos P, Vasileiou I, Patsouris E, Theocharis SE. (2013). The role of endocannabinoids in pain modulation. *Fundam Clin Pharmacol* 27: 64-80.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, *et al.* (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400: 452-457.