

Université de Montréal

**Modulation du système endocannabinoïde dans
des modèles de douleur inflammatoire et neuropathique**

par

Josée Guindon

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en pharmacologie

novembre, 2006

© Josée Guindon, 2006



W

4

U58

2007

V. 033

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Modulation du système endocannabinoïde dans
des modèles de douleur inflammatoire et neuropathique

présentée par :
Josée Guindon

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Denis deBlois, président-rapporteur
Pierre Beaulieu, directeur de recherche
Serge Marchand, membre du jury
Yves De Koninck, examinateur externe

Résumé

La découverte récente du système cannabinoïde endogène et de ses possibilités thérapeutiques dans le traitement des douleurs chroniques constitue une nouvelle avenue de la recherche médicale nécessitant de plus amples études sur le sujet. C'est pourquoi les travaux présentés dans cette thèse se sont intéressés à élucider au niveau périphérique l'interaction entre les endocannabinoïdes et les bloqueurs de leur dégradation dans un modèle de douleur inflammatoire (test au formol) et neuropathique (lésion du nerf sciatique). L'anandamide et le 2-arachidonylglycérol (2-AG) font partie du système endocannabinoïde et constituent les deux cannabinoïdes endogènes les plus étudiés jusqu'à maintenant. Ces derniers sont dégradés par des enzymes telles que l'amidohydrolase des acides gras (FAAH) pour l'anandamide et, par la monoacylglycérol lipase (MGL), pour le 2-AG. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que l'ibuprofène (inhibiteur non-spécifique de la cyclooxygénase (COX)) ou le rofécoxib (inhibiteur spécifique de la COX-2) inhibent la FAAH. Toutefois, l'action de la MGL peut être bloquée par, l'URB602, un composé synthétique. C'est ainsi qu'un effet analgésique dépendant de la dose a été déterminé pour l'anandamide, l'ibuprofène, le rofécoxib, le 2-AG et l'URB602 dans le test au formol. Un effet synergique a été observé lors de la combinaison d'un endocannabinoïde (l'anandamide) avec les AINS (l'ibuprofène ou le rofécoxib) dans le test au formol. De plus, l'effet synergique de l'anandamide combiné avec un AINS passe par les récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ dans le test au formol. Cet effet synergique

génère des quantités supérieures d'amides des acides gras endogènes (anandamide, oléoyléthanolamide, palmitoyléthanolamide) localement au niveau de la patte. Dans ce même modèle de douleur inflammatoire, la combinaison du 2-AG avec l'URB602 produit un effet additif. De plus, en situation neuropathique, la combinaison des AINS avec l'anandamide n'a produit qu'un effet additif et implique seulement le récepteur cannabinoïde CB₁. En conclusion, les endocannabinoïdes ainsi que les bloqueurs de leur dégradation injectés localement diminuent le comportement douloureux dans ces deux modèles de douleur. C'est ainsi que l'administration locale des endocannabinoïdes pour traiter la douleur inflammatoire ou neuropathique semble être une avenue intéressante dépourvue des effets délétères centraux liés à l'administration systémique des cannabinoïdes.

Mots-clés : Anandamide, 2-arachidonylglycérol, anti-inflammatoires non stéroïdiens, ibuprofène, rofécoxib, récepteurs cannabinoïdes, amidohydrolase des acides gras, monoacylglycérol lipase, douleur neuropathique, amides des acides gras endogènes.

Abstract

The endogenous cannabinoid system has been recently discovered and the therapeutic possibilities of treating chronic pain in the clinic has been assessed, which constitute a novel field of interest that needs to be investigated further. The present work was designed to study the peripheral interactions between endocannabinoids and their specific blockers in an inflammatory (formalin test) and neuropathic (sciatic nerve lesion) pain models. Anandamide and 2-arachidonylglycerol (2-AG) are part of the endocannabinoid system and constitute the two most studied endogenous cannabinoids to date. They are degraded by enzymes like fatty-acid amide hydrolase (FAAH) for anandamide and by monoacylglycerol lipase (MGL) for 2-AG. The FAAH can be inhibited by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) like ibuprofen (non-specific cyclooxygenase (COX) inhibitor) or rofecoxib (specific COX-2 inhibitor). The MGL action can be blocked by URB602, a synthetic compound. Indeed, a dose-dependent analgesic effect has been obtained for anandamide, ibuprofen, rofecoxib, 2-AG and URB602 in the formalin test. A synergistic effect has been shown for the combination of anandamide with ibuprofen or rofecoxib in the formalin test, which is mediated by CB₁ and CB₂ cannabinoid receptor in the formalin test. This synergistic effect generates higher amounts of endogenous fatty-acid ethanolamides (anandamide, oleoylethanolamide, palmitoylethanolamide) locally in the paw. In the same inflammatory pain model, the combination of 2-AG with URB602 produces an additive effect. However, in neuropathic pain condition, the combination of

anandamide with either NSAIDs produce only an additive effect that involve the CB₁ cannabinoid receptor. In conclusion, locally injected endocannabinoids and their specific blockers decreased pain behaviour in both pain models. Indeed, local use of endocannabinoids to treat inflammatory or neuropathic pain conditions may be interesting since its avoiding the deleterious central effects of systemic cannabinoids.

Keywords : Anandamide, 2-arachidonylglycerol, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, ibuprofen, rofecoxib, cannabinoid receptors, fatty-acid amide hydrolase, monoacylglycerol lipase, neuropathic pain, fatty-acid ethanolamides.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Liste des tableaux	xv
Liste des figures	xvi
Liste des sigles et abréviations	xviii
Remerciements	xxii
I. Introduction	1
1.1 Historique	1
1.2 Pharmacologie des cannabinoïdes	3
1.2.1 Généralités.....	3
1.2.2 Pharmacologie du récepteur cannabinoïde CB ₁	6
1.2.2.1 Mécanismes de la transduction des signaux.....	7
1.2.2.2 Localisation des récepteurs CB ₁	9
1.2.3 Pharmacologie du récepteur cannabinoïde CB ₂	10
1.2.3.1 Mécanismes de la transduction des signaux.....	11
1.2.3.2 Localisation des récepteurs CB ₂	12
1.2.4 Invalidation des gènes des récepteurs cannabinoïdes	14
1.2.5 Autres récepteurs cannabinoïdes	16
1.2.6 Les endocannabinoïdes	18
1.2.6.1 Anandamide	20
1.2.6.2 2-Arachidonylglycérol	29
1.2.6.3 Oléoyléthanolamide	33
1.2.6.4 Palmitoyléthanolamide.....	35
1.2.6.5 Autres endocannabinoïdes	37
1.2.7 Endocannabinoïdes comme messagers synaptiques agissant de façon rétrograde	39
II. Cannabinoïdes et douleur.....	42

2.1 Généralités	42
2.2 Cannabinoïdes au niveau central et douleur	43
2.3 Cannabinoïdes au niveau spinal et douleur	46
2.4 Cannabinoïdes au niveau périphérique et douleur	48
2.5 Analgésie induite par les cannabinoïdes dans différents modèles animaux	50
2.5.1 Analgésie induite par les cannabinoïdes dans un modèle de douleur inflammatoire: le test au formol.....	51
2.5.2 Analgésie induite par les cannabinoïdes dans un modèle de douleur neuropathique: lésion du nerf sciatique.....	53
III. Anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	57
3.1 Généralités	57
3.2 Effet antinociceptif des AINS dans des modèles inflammatoires.....	60
3.2.1 Effet antinociceptif de la combinaison des endocannabinoïdes avec les AINS dans des modèles inflammatoires.....	61
3.3 Effet antinociceptif des AINS dans des modèles neuropathiques.....	62
3.3.1 Effet antinociceptif de la combinaison des endocannabinoïdes avec les AINS dans des modèles neuropathiques	64
IV. Problématique et hypothèses de recherche	65
V. Objectifs	66
VI. Articles	67
6.1 Article 1 publié dans <i>Pain</i>.....	67
“Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain”	67
6.1.0 Abstract	68
6.1.1 Introduction.....	70
6.1.2 Methods.....	72
6.1.2.1 <i>Animals</i>	72
6.1.2.2 <i>Drug administration</i>	72

6.1.2.3 Formalin test	73
6.1.2.4 Protocol.....	74
6.1.2.5 Paw edema	75
6.1.2.6 Statistical analysis.....	75
6.1.3 Results.....	76
6.1.3.1 Analgesic effects of anandamide and ibuprofen	76
6.1.3.2 Paw edema	77
6.1.3.3 Effects of cannabinoid antagonists on an anandamide-ibuprofen combination	77
6.1.3.3.1 Acute phase	77
6.1.3.3.2 Inflammatory phase.....	78
6.1.3.3.3 Paw edema	79
6.1.4 Discussion	79
6.1.4.1 Antinociceptive effects of the combination of cannabinoids with NSAIDs	80
6.1.4.2 Local (hind paw) antinociceptive effect of cannabinoids and endocannabinoids	81
6.1.4.3 Local (hind paw) antinociceptive effect of NSAIDs	82
6.1.4.4 Miscellaneous.....	83
6.1.5 Acknowledgments.....	84
6.1.6 References	85
6.1.7 Figures legend	95
6.2 Article 2 publié dans <i>European Journal of Pharmacology</i>	104
“Synergistic antinociceptive effects of anandamide, an endocannabinoid, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peripheral tissue: A role for endogenous fatty- acid ethanolamides?”	104
6.2.0 Abstract	105
6.2.1 Introduction.....	107
6.2.2 Methods.....	109

6.2.2.1 <i>Animals</i>	109
6.2.2.2 <i>Drug administration</i>	110
6.2.2.3 <i>Formalin test</i>	110
6.2.2.4 <i>Protocol</i>	111
6.2.2.5 <i>High Performance Liquid Chromatography /Mass Spectrometry analysis</i> ...	113
6.2.2.6 <i>Paw edema</i>	114
6.2.2.7 <i>Statistical analysis</i>	114
6.2.3 <i>Results</i>	116
6.2.3.1 <i>Synergistic analgesic effects of anandamide and rofecoxib</i>	116
6.2.3.2 <i>Paw edema</i>	116
6.2.3.3 <i>Comparison of two COX-2 inhibitors: NS-398 and rofecoxib</i>	117
6.2.3.4 <i>TRPV1 receptors are not implicated in the antinociceptive effect of the anandamide-ibuprofen combination</i>	117
6.2.3.5 <i>TRPV1 receptors are not implicated in the antinociceptive effect of the anandamide-rofecoxib combination</i>	118
6.2.3.6. <i>Higher concentrations of fatty-acid ethanolamides when anandamide is given with NSAIDs</i>	118
6.2.4 <i>Discussion</i>	119
6.2.4.1. <i>Antinociceptive effects of the combination of cannabinoids with NSAIDs</i> ...	120
6.2.4.2. <i>Local antinociceptive effect of cannabinoids and endocannabinoids</i>	121
6.2.4.3 <i>Local antinociceptive effect of NSAIDs</i>	122
6.2.4.4 <i>Paw tissue levels of fatty-acid ethanolamides</i>	124
6.2.5 <i>Acknowledgments</i>	126
6.2.6 <i>References</i>	127
6.2.7 <i>Figures legend</i>	137
6.3 Article 3 publié dans <i>British Journal of Pharmacology</i>	148
“The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB2 receptors”.....	148

6.3.0 Abstract	149
6.3.1 Introduction.....	151
6.3.2 Methods.....	153
6.3.2.1 <i>Animals</i>	153
6.3.2.2 <i>Drug administration</i>	153
6.3.2.3 <i>Formalin test</i>	154
6.3.2.4 <i>Protocol</i>	155
6.3.2.5 <i>Paw edema</i>	156
6.3.2.6 <i>Statistical Analysis</i>	156
6.3.3 Results.....	157
6.3.3.1 <i>Antinociceptive effects of 2-AG and implication of cannabinoid receptors</i> ..	157
6.3.3.2 <i>Paw edema</i>	158
6.3.3.3 <i>Antinociceptive effects of URB602, 2-AG and their combination at ED₅₀ doses</i>	158
6.3.3.4 <i>Paw edema</i>	159
6.3.3.5 <i>Antinociceptive effects of URB602 and implication of cannabinoid receptors</i>	159
6.3.3.6 <i>Paw edema</i>	159
6.3.4 Discussion	160
6.3.5 Acknowledgments.....	165
6.3.6 References.....	166
6.3.7 Figures legend	179
6.4 Article 4 publié dans <i>Neuropharmacology</i>	189
“Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain”	189
6.4.0 Abstract	190
6.4.1 Introduction.....	192
6.4.2 Methods.....	194

6.4.2.1 <i>Animals</i>	194
6.4.2.2 <i>Drug administration</i>	195
6.4.2.3 <i>Neuropathic pain model</i>	195
6.4.2.4 <i>Sensory testing</i>	196
6.4.2.5 <i>Protocol</i>	197
6.4.2.6 <i>Statistical analysis</i>	198
6.4.3 <i>Results</i>	199
6.4.3.1 <i>Mechanical allodynia</i>	199
6.4.3.2 <i>Thermal hyperalgesia</i>	201
6.4.4 <i>Discussion</i>	202
6.4.4.1 <i>Local analgesic effects of cannabinoids and endocannabinoids</i>	203
6.4.4.2 <i>Local analgesic effects of NSAIDs</i>	206
6.4.4.3 <i>Analgesic effects of the combination of endocannabinoid with NSAIDs</i>	208
6.4.5 <i>Acknowledgments</i>	209
6.4.6 <i>References</i>	210
6.4.7 <i>Figures legend</i>	220
VII. Discussion	227
7.1 Modulation des endocannabinoïdes dans un modèle de douleur inflammatoire	228
7.1.1 <i>Modulation de l'action de l'anandamide et effets antinociceptifs dans le test au formol</i>	228
7.1.1.1 <i>Effet antinociceptif local des cannabinoïdes et des endocannabinoïdes</i>	229
7.1.1.2 <i>Effet antinociceptif local des AINS</i>	231
7.1.1.3 <i>Effet antinociceptif de la combinaison des cannabinoïdes avec les AINS</i>	235
7.1.1.4 <i>Niveaux tissulaires d'amides des acides gras endogènes</i>	237
7.1.2 <i>Modulation du 2-AG dans le test au formol</i>	238
7.1.2.1 <i>Effet antinociceptif local des cannabinoïdes et des endocannabinoïdes</i>	239
7.1.2.2 <i>Effet antinociceptif local des inhibiteurs de la MGL</i>	241

7.1.2.3 Effet antinociceptif de la combinaison du 2-AG avec les inhibiteurs de la MGL	243
7.2 Modulation des endocannabinoïdes dans un modèle de douleur neuropathique	245
7.2.1 Modulation de l'anandamide dans le modèle de Seltzer.....	245
7.2.1.1 Effet antinociceptif local des cannabinoïdes et des endocannabinoïdes.....	246
7.2.1.2 Effet antinociceptif local des AINS	248
7.2.1.3 Effet antinociceptif de la combinaison des cannabinoïdes avec les AINS ...	250
VIII. Conclusion et perspectives	252
IX. Bibliographie.....	255
Annexe 1	I
Article 5 publié dans <i>Anesthesia & Analgesia</i>.....	I
“The antinociceptive effects of local injections of propofol in rats are mediated in part by cannabinoid CB ₁ and CB ₂ receptors”.....	I
A.1.0 Abstract	II
A.1.1 Introduction	IV
A.1.2 Methods.....	V
<i>A.1.2.1 Animals</i>	V
<i>A.1.2.2 Drug administration</i>	VI
<i>A.1.2.3 Formalin test</i>	VI
<i>A.1.2.4 Protocol</i>	VII
<i>A.1.2.5 High Performance Liquid Chromatography /Mass Spectrometry analysis</i> ..	VIII
<i>A.1.2.6 Paw edema</i>	IX
<i>A.1.2.7 Statistical analysis</i>	X
A.1.3 Results	X
<i>A.1.3.1 Antinociceptive effect of propofol and implication of cannabinoid receptors</i> ..	X
<i>A.1.3.2 Paw edema</i>	XI

<i>A.1.3.3 Concentration of fatty-acid ethanolamides / endocannabinoids following peripheral administration of propofol</i>	XI
A.1.4 Discussion	XI
A.1.5 Acknowledgments.....	XVI
A.1.6 References	XVII
A.1.7 Figures legend	XXIV
Annexe 2	XXX
Article 6 soumis dans <i>European Journal of Pharmacology</i>	XXX
“Pre-emptive antinociceptive effects of a synthetic cannabinoid in a model of neuropathic pain”	XXX
A.2.0 Abstract	XXXI
A.2.1 Introduction	XXXII
A.2.2 Methods.....	XXXII
<i>A.2.2.1 Animals</i>	XXXII
<i>A.2.2.2 Drug administration</i>	XXXIII
<i>A.2.2.3 Neuropathic pain model</i>	XXXIII
<i>A.2.2.4 Sensory testing</i>	XXXIII
<i>A.2.2.5 Protocol</i>	XXXIV
<i>A.2.2.6 Statistical analysis</i>	XXXV
A.2.3 Results	XXXV
A.2.4 Discussion	XXXVI
A.2.5 References	XXXVIII
A.2.6 Figure legend.....	XL
Annexe 3	XLII
Autorisation des coauteurs selon l’ordre de présentation des articles dans la thèse	XLII

Liste des tableaux

Tableau I	Localisation des récepteurs cannabinoïdes CB ₁ et CB ₂	11
Tableau II	La pharmacologie des récepteurs cannabinoïdes CB ₁ et CB ₂	13
Tableau III	Les comportements observés chez l'animal après l'injection de formol....	53
Tableau IV	Les inhibiteurs sélectifs ou non-sélectifs des cyclooxygénases.....	59
Tableau V	Données obtenues dans un modèle de douleur inflammatoire et neuropathique.....	253

Liste des figures

Figure 1	Les principales découvertes dans l’histoire récente de la recherche faite sur le cannabis, les cannabinoïdes et les endocannabinoïdes.....	5
Figure 2	Voici une simplification des principales voies de signalisation des récepteurs cannabinoïdes CB ₁ et CB ₂ suivant l’activation par leurs agonistes.....	8
Figure 3	Principaux cannabinoïdes endogènes ou endocannabinoïdes.....	19
Figure 4	Formation et inactivation de l’anandamide et du 2-arachidonylglycérol (2-AG).....	25
Figure 5	Fonction hypothétique de l’anandamide comme étant un endocannabinoïde ou un endovanilloïde.....	28
Figure 6	Synthèse et dégradation des amides des acides gras endogènes tel que démontré pour l’OEA.....	35
Figure 7	Les endocannabinoïdes sont des messagers lipidiques synthétisés à la demande au niveau post-synaptique suite à une dépolarisation de la membrane neuronale secondaire à l’entrée de calcium.....	41

Figure 8	Modèle de Seltzer: dans ce modèle, le nerf sciatique est scindé dans le sens longitudinal, puis le tiers ou la moitié des fibres nerveuses sont ligaturées.....	56
Figure 9	Production et action des prostaglandines.....	58
Figure 10	L'effet local de l'administration ou non de substances avant l'injection de formol 2,5 % dans la phase aiguë du test au formol.....	233

Liste des sigles et abréviations

2-AG	2-arachidonyleglycérol
Abn-cbd	cannabidiol-anormal
AM251	antagoniste des récepteurs CB ₁
AM630	antagoniste des récepteurs CB ₂
AM374	fluorure palmitylsulphonyl
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
AINS	anti-inflammatoires non stéroïdiens
ATP	adénosine triphosphate
AUC	<i>area under the curve</i>
CBD	cannabidiol
CBN	cannabinol
CB ₁	récepteur cannabinoïde 1
CB ₂	récepteur cannabinoïde 2
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
COX	cyclooxygénase
CPS-WST _{0,1,2}	<i>composite pain score-weighted scores techniques</i>
Δ ⁹ -THC	delta 9-tétrahydrocannabinol
DAGL	diacylglycérol lipase
DE ₅₀	dose efficace 50
DMSO	diméthylsulfoxyde
DP	récepteur de la prostaglandine D ₂
DRG	<i>dorsal root ganglion</i>
DSE	<i>depolarization-induced suppression of excitation</i>
DSI	<i>depolarization-induced suppression of inhibition</i>
EMT	<i>endocannabinoid membrane transporter</i>

EP	récepteur de la prostaglandine E ₂
FAAH	<i>fatty-acid amide hydrolase</i>
FP	récepteur de la prostaglandine F _{2α}
GABA	acide γ-aminobutyrique
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
g	gramme
IL-1α	interleukine-1α
IL-6	interleukine-6
IP	récepteur de la prostacycline
LPS	lipopolysaccharide
MAFP	fluorophosphonate méthylarachidonyl
MAPK	<i>mitogen-actived protein kinases</i>
Mean	moyenne
MGL	monoacylglycérol lipase
Min	minutes
mN	milliNewton
mm	millimètre
NAAA	N-acyléthanolamine acide amide hydrolase
NAT	N-acyltransférase
NGF	<i>nerve growth factor</i>
nmol	nanomole
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO	monoxyde d'azote
NOPE	N-oléoyl-phosphatidyléthanolamine
NPAA	N-palmitoyléthanolamine acide amidase
NS-398	inhibiteur spécifique de la COX-2
μg	microgramme
μl	microlitre

OA	acide oléique
OEA	oléoyléthanolamide
PAA	N-palmitoyl-phosphatidyléthanolamine
PAG	substance grise périaqueducule
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidyléthanolamine
PEA	palmitoyléthanolamide
PI-3 kinase	phosphoinositol-3 kinase
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PLD	phospholipase D
pmol	picomole
PMSF	fluorure phénylméthylsulfonyl
PPAR α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-alpha</i>
s	secondes
SC236	inhibiteur spécifique de la COX-2
s.e.mean	<i>standard error of the mean</i>
TNF α	<i>tumour necrosis factor alpha</i>
TP	récepteur du thromboxane
TRPV1	<i>transient receptor potential vanilloid 1</i>
URB602	inhibiteur de la MGL
VR1	<i>vanilloid type 1 receptors</i>

À Mathieu,

Remerciements

Je tiens à remercier du fond du cœur mon mari, Mathieu Prichonnet, pour ses mots doux, sa patience, ses encouragements, son amour, sa générosité et d'avoir toujours cru en moi. Je te remercie pour tout mon amour.

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur de recherche, Docteur Pierre Beaulieu, pour son dévouement, ses encouragements, sa patience, sa générosité, son sens de l'humour ainsi que son aide très précieuse tout au long de mon cheminement au cours des quatre dernières années.

Je remercie aussi Docteur André De Léan pour son aide précieuse à l'élaboration de mon premier et deuxième manuscrit ainsi que pour tous ses bons conseils. Merci de m'avoir appris autant sur les statistiques plus précisément sur la régression non linéaire.

Je veux également remercier Dr Robert Élie pour son apprentissage des statistiques, sa générosité et sa confiance absolue en mes capacités.

Je tiens aussi à remercier mon collègue de travail, Jean-Sébastien Walczak, pour son aide et pour ses conseils techniques en tout genre. Je remercie tout particulièrement l'étudiante à la maîtrise dans notre laboratoire, Julie Desroches, qui m'a aidé à réaliser une de mes

études retrouvées dans cette thèse. Je remercie également Mélanie Gabriac pour son aide précieuse et ses encouragements.

Je remercie aussi le personnel de soutien du département de pharmacologie, plus particulièrement, Sylvie Caron, Francine Côté et Élisabeth Pérès pour leur écoute et leur aide constante tout au long de ces quatre dernières années.

Je tiens à remercier tous mes ami(e)s, mais je remercie particulièrement Marie-Hélène Forget pour son écoute, sa tendresse et ses mots d'encouragement dans les moments difficiles. Je remercie aussi Caroline Houlé pour son soutien et sa générosité. Je veux également remercier Valérie Mongrain qui m'a beaucoup encouragé.

Je remercie également toute ma famille, mais plus spécialement ma mère, Manon Marcotte ainsi que mes deux sœurs, Marie-Ève et Julie, pour leur tendresse et leur générosité.

I. Introduction

1.1 Historique

La plante, *Cannabis sativa*, dont l'usage remonte à plus de 12 000 ans est également connue sous l'appellation de chanvre indien ou de marijuana (terme mexicain) (Abel, 1980). Les Anciens de Chine et de Grèce se servaient de la plante pour faire des cordes et des vêtements. En Amérique du Nord, ce n'est qu'en 1608 que Louis Hébert, apothicaire de Champlain, a fait connaître le cannabis aux colons blancs essentiellement comme une fibre servant à faire des vêtements, des cordages, des voiles et des câbles de bateau.

La pharmacopée chinoise (2800 avant J.-C.) constitue une des premières références à l'utilisation thérapeutique du cannabis. L'usage médical du cannabis a également été démontré sur du Papyrus Égyptien au XVI^e siècle avant J.-C. Par ailleurs, des évidences archéologiques provenant d'Israël suggèrent l'emploi thérapeutique du cannabis lors d'accouchements difficiles (Zias et coll., 1996). Le cannabis serait considéré comme le médicament le plus ancien de l'histoire selon certaines données égyptiennes, chinoises (2700 après J.-C.) et assyriennes (800 avant J.-C.) (Adams & Martin, 1996). Au cours des siècles, le cannabis a été recommandé dans le traitement de la douleur, de l'asthme, de la dysenterie, des nausées et des vomissements ainsi que dans les cas de spasmes et de convulsions (Mechoulam, 1986).

La publication d'un traité en 1839 par W.B. O'Shaughnessy, un médecin irlandais au service de l'armée britannique en Inde, a permis de faire connaître, plusieurs millénaires plus tard, les vertus du cannabis à la médecine occidentale (Snyder, 1971). Il favorise son

introduction en Angleterre et dans les autres pays d'Europe en démontrant l'efficacité et l'innocuité du cannabis. Par ailleurs, des évidences suggèrent que la Reine Victoria soulageait ses dysménorrhées à l'aide du cannabis.

Le début du XX^e siècle est marqué par le développement des médicaments de synthèse faisant ainsi décliner l'engouement pour le cannabis en Amérique et en Europe. Dans les années 1920 est apparue, aux États-Unis, la peur de l'usage du produit conduisant à son interdiction en 1937 et à son retrait de la pharmacopée en 1942. Dans les années soixante la libération des esprits est marquée par la consommation accrue de cannabis devenue une des drogues illégales les plus consommées dans ces années-là. Dans la dernière décennie, l'intérêt pour l'usage thérapeutique du cannabis a été reconsidéré, notamment par différents groupes œuvrant dans le domaine médical, conduisant ainsi à l'élaboration de différents rapport sur le sujet (Roques, 1998; Nolin & Kenny, 2003). Le développement plus lent de la recherche faite sur le cannabis, comparativement à celle de l'opium, qui constitue elle aussi une substance aux propriétés thérapeutiques intéressantes, 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. Depuis les dernières années, les données sur la pharmacologie des cannabinoïdes et sur leur mécanisme d'action se sont bousculées en raison de l'intérêt grandissant pour cette substance aux propriétés médicales très intéressantes (Di Marzo & De Petrocellis, 2006; Jonsson et coll., 2006).

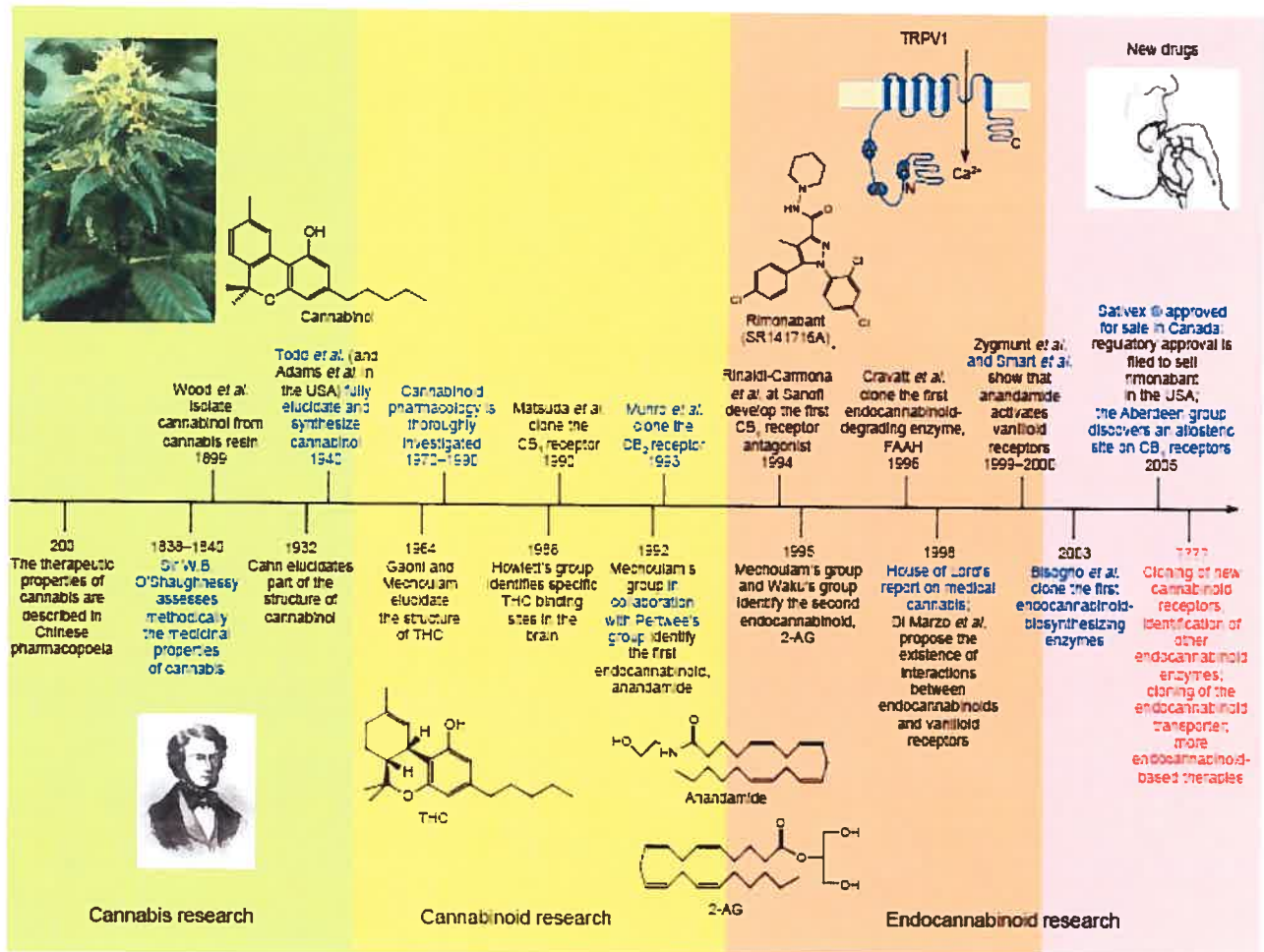
1.2 Pharmacologie des cannabinoïdes

1.2.1 Généralités

La marihuana (marijuana) est le nom usuel du Cannabis. Bien que les feuilles et les sommités fleuries des plants de Cannabis produisent plus de 60 cannabinoïdes, les principales composantes actives sont le delta 9-tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), le Δ^8 -THC, le cannabinoïde (CBN) et le cannabidiol (CBD) (Santé Canada, 2003). Ainsi, la première découverte pharmacologique dans ce domaine a été l'isolation et la synthèse du Δ^9 -THC qui est le constituant psychotrope le plus important du cannabis (Gaoni & Mechoulam, 1964).

Les essais biologiques fonctionnels, nécessaires à l'évaluation des propriétés cannabinoïdes, sont habituellement effectués *in vivo* en utilisant des animaux de laboratoire (rats, souris plus fréquemment) ou *in vitro* à l'aide de tissus isolés possédant des récepteurs cannabinoïdes (Pertwee, 1997). Les critères recherchés chez l'animal pour fins d'évaluation lors d'essais *in vivo* sont : la réduction de l'activité spontanée, l'apparition d'une hypothermie, la catalepsie et la diminution de la nociception. 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). Les récepteurs CB₁ sont principalement localisés au niveau du système nerveux central

mais aussi au niveau des tissus périphériques tandis que les récepteurs CB₂ sont surtout retrouvés au niveau du système immunitaire. Les gènes encodant ces protéines ont été identifiés (Onaivi et coll., 1996), les récepteurs ont été clonés et les souris dont le gène codant pour le récepteur CB₁ (Ledent et coll., 1999; Zimmer et coll., 1999) ainsi que celui codant pour le récepteur CB₂ ont été inactivés et décrits (Buckley et coll., 2000). Par ailleurs, les quarante dernières années, en particulier, ont été le témoin de révolutions et de découvertes importantes dans le développement des connaissances sur la pharmacologie du cannabis et de son utilisation thérapeutique (**Figure 1**). Dans la dernière décennie, l'élucidation des diverses composantes faisant partie du système endocannabinoïde et une meilleure compréhension de son rôle a élargi les possibilités thérapeutiques liées à son utilisation.



D'après Di Marzo, 2006.

Figure 1 : Les principales découvertes dans l'histoire récente de la recherche faite sur le cannabis, les cannabinoïdes et les endocannabinoïdes. Le cannabis est utilisé depuis le 3^e Millénaire après J.-C. pour ses propriétés médicales et récréatives dans les pays asiatiques. Le cannabis a été étudié de façon exhaustive en occident depuis le 19^e Siècle. La recherche a porté sur la plante et ses différentes composantes, ses récepteurs et ses ligands endogènes chez les mammifères. Le développement des premiers médicaments (dronabinol ou Marinol® et nabilone ou Cesamet®) dérivés des cannabinoïdes et utilisés en clinique pour traiter les nausées et la perte de poids chez des patients atteints du SIDA (Howlett et coll.,

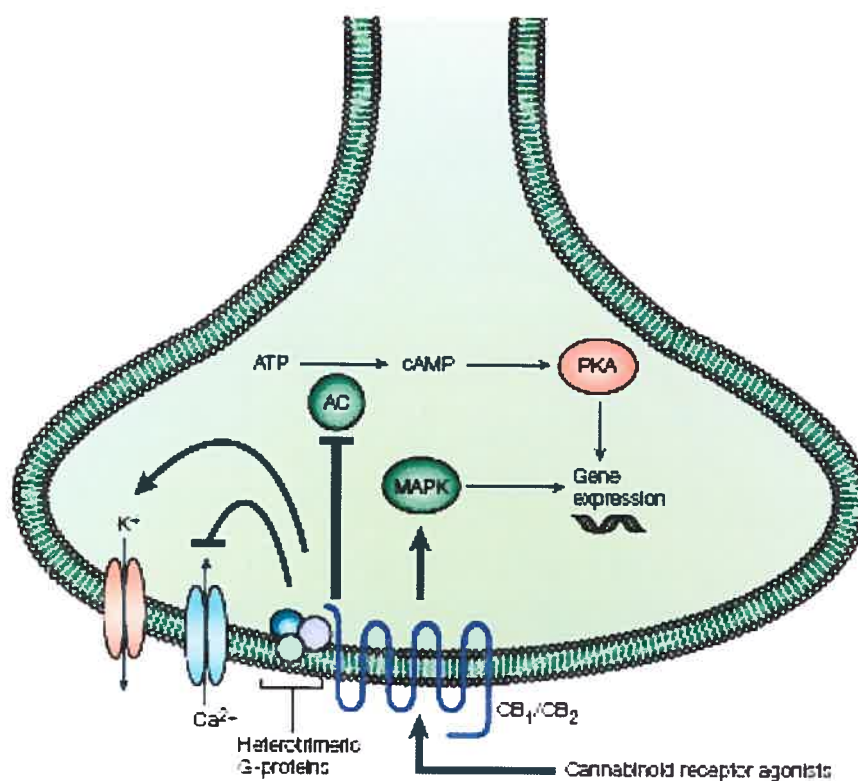
2004) ont précédé la découverte du Sativex® (mélange 1 pour 1 de THC: CBD) et du rimonabant (antagoniste du récepteur CB₁). La structure chimique du cannabinoïde (première structure cannabinoïde qui a été découverte) (Adams et coll., 1940; Jacob & Todd, 1940), le delta 9-tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (le principal constituant psychotrope du cannabis) (Gaoni & Mechoulam, 1964; 1971), le rimonabant (premier antagoniste/agoniste inverse du récepteur cannabinoïde CB₁ à être développé) (Rinaldi-Carmona et coll., 1994; Carai et coll., 2005), les deux endocannabinoïdes: anandamide et 2-arachidonyleglycérol (2-AG) (Devane et coll., 1992; Mechoulam et coll., 1995; Sugiura et coll., 1995) et la structure à deux dimensions du récepteur TRPV1 (Caterina et coll., 1997) sont indiqués. Le récepteur TRPV1 fait partie du système endocannabinoïde (Di Marzo et coll., 1998a; 2001; Ross, 2003). Les développements futurs sont prédits en rouge. Abréviations: FAAH, « fatty acid amide hydrolase »; TRPV1, « transient receptor potential vanilloid 1 ».

1.2.2 Pharmacologie du récepteur cannabinoïde CB₁

Le gène codant pour le récepteur humain CB₁ a été identifié au niveau de la région q14-q15 du chromosome 6 (Hoehe et coll., 1991; Pertwee, 1997). Les différentes espèces étudiées jusqu'à maintenant (humains, rats et souris) possèdent une séquence qui semble très similaire lorsqu'on les compare (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 % d'homologie pour la région transmembranaire (Gérard et coll., 1991). Les récepteurs CB₁ sont parmi les récepteurs couplés aux protéines G les plus abondants au niveau du cerveau avec des niveaux de densité similaires à ceux du GABA (acide γ -aminobutyrique) et du glutamate (Howlett et coll., 2004).

1.2.2.1 Mécanismes de la transduction des signaux

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). Certains auteurs ont rapporté que le couplage des récepteurs CB₁ aux protéines G_{i/o} sensibles à la toxine pertussique permettait le blocage des canaux calciques de type L, N et P/Q ainsi que des canaux potassiques de type D (Mackie & Hille, 1992; Mackie et coll., 1995), l'activation des canaux potassiques de la rectification entrante (K_{IR}) (Felder et coll., 1995) ainsi que des courants potassiques sortant de type A (Deadwyler et coll., 1995), l'activation de la phospholipase C (via les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G) et de la PI-3 kinase (Howlett et coll., 2004; Di Marzo & De Petrocellis, 2006), puis finalement l'activation des MAPK (« mitogen-activated protein kinases ») (**Figure 2**) (Bouaboula et coll., 1995; Bouaboula et coll., 1996; Di Marzo et coll., 2004). Les agonistes des récepteurs cannabinoïdes stimuleraient 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; Di Marzo & De Petrocellis, 2006).



D'après Di Marzo et coll., 2004.

Figure 2 : Voici une simplification des principales voies de signalisation des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ suivant l'activation par leurs agonistes. Abréviations: ATP, adénosine triphosphate; AMPc, adénosine monophosphate cyclique; PKA, protéine kinase A; MAPK, « mitogen-actived protein kinases ».

Les récepteurs CB₁ peuvent aussi inhiber les canaux ioniques de type 5-HT₃ (Barann et coll., 2002), moduler la production de monoxyde d'azote (NO) et mobiliser l'acide arachidonique lorsqu'ils sont activés (Pertwee, 1997; Howlett & Mukhopadhyay, 2000). La modulation de certains canaux sodiques a également été démontrée récemment (Nicholson et coll., 2003). Les récepteurs CB₁ mobilisent les réserves intracellulaires de

calcium dans les neurones (Felder et coll., 1995) et dans les cellules musculaires lisses (Begg et coll., 2001) ainsi qu'au niveau des astrocytes corticaux chez le rat (Sanchez et coll., 2001).

1.2.2.2 Localisation des récepteurs CB₁

Comme déjà indiqué, les récepteurs CB₁ sont situés au niveau du système nerveux central et au niveau des tissus périphériques (**Tableau I**). Dans les tissus périphériques, ils sont situés au niveau des neurones, des leucocytes, des cellules endothéliales, de quelques glandes endocrines (glande pituitaire et surrénales), du cœur, des appareils reproducteur, urinaire et digestif ainsi qu'au niveau des terminaisons nerveuses présynaptiques (Pertwee, 1997; Pertwee & Ross, 2002). Au niveau du cerveau, la distribution des récepteurs CB₁ est hétérogène expliquant les propriétés pharmacologiques de certains agonistes des récepteurs CB₁. Le cortex cérébral (plus particulièrement la région frontale), les ganglions de la base, le cervelet, l'hypothalamus, le cortex cingulaire antérieur ainsi que l'hippocampe contiennent des concentrations élevées de récepteurs CB₁ qui confèrent une distribution en relation avec l'habileté des cannabinoïdes à altérer l'activité locomotrice et à produire une catalepsie plus particulièrement chez les rongeurs ainsi qu'une altération de l'apprentissage et de la mémoire (Pertwee, 1997; 1998; Iversen, 2003).

Les récepteurs CB₁ sont également situés sur les voies de la douleur au niveau cérébral, de la moelle épinière ainsi qu'en périphérie sur les terminaisons nerveuses des neurones afférents primaires synthétisés à partir des ganglions de la racine dorsale (Hohmann &

Herkenham, 1999a; Pertwee, 2001; Witting et coll., 2004). Ces différentes localisations expliquent l'analgésie produite par les cannabinoïdes (Pertwee, 2001; Hohmann, 2002). La fonction des récepteurs CB₁ présynaptiques au niveau de certaines régions du cerveau ou sur des neurones en périphérie est d'inhiber la libération des neurotransmetteurs par l'inhibition des canaux calciques entrant et par l'activation des courants potassiques sortant (Pertwee & Ross, 2002). La localisation présynaptique des récepteurs CB₁ suggère que les cannabinoïdes ont un rôle à jouer dans la modulation de la libération des neurotransmetteurs au niveau des terminaisons axonales (Iversen, 2003). Nonobstant leur localisation présynaptique plus fréquente, les récepteurs CB₁ sont également situés au niveau post-synaptique (Di Marzo, 2006).

1.2.3 Pharmacologie du récepteur cannabinoïde 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 similarité 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).

Tableau I : Localisation des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂.

Récepteur	Distribution centrale	Distribution périphérique
CB ₁	<ul style="list-style-type: none"> ➤ ganglions de la base ➤ cervelet ➤ cortex cérébral ➤ noyau entopédonculaire ➤ globus pallidus ➤ hippocampe ➤ substance grise périaqueducale ➤ putamen ➤ moelle rostrale ventrolatérale ➤ corne dorsale de la moelle épinière ➤ substance noire pars réticulata 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ glande surrénale ➤ moelle osseuse ➤ endothélium ➤ cœur ➤ reins ➤ poumons ➤ lymphocytes ➤ neurones périphériques ➤ phagocytes ➤ prostate ➤ muscles lisses ➤ testicules - sperme ➤ amygdales ➤ utérus
CB ₂		<ul style="list-style-type: none"> ➤ leucocytes ➤ lymphocytes B ➤ monocytes ➤ cellules tueuses "Natural killer" ➤ leucocytes polymorphonucléaires ➤ lymphocytes T4 ➤ lymphocytes T8

Modifié d'après Burns & Ineck, 2006.

1.2.3.1 Mécanismes de la transduction des signaux

Le récepteur CB₂ inhibe lui aussi l'activité de l'adénylate cyclase par l'intermédiaire de la sous-unité α de la protéine G_{i/o} sensible à la toxine pertussique (Slipetz et coll., 1995; Di Marzo & De Petrocellis, 2006). À la différence des récepteurs CB₁, les récepteurs CB₂ ne

modulent pas l'activité des ions calciques ni celle des canaux potassiques de la rectification entrante (Felder et coll., 1995). Il a été démontré que l'activation du récepteur cannabinoïde CB₂, plus particulièrement la sous-unité α de la protéine G, entraîne une stimulation de la MAPK en fonction de la dose (Bouaboula et coll., 1996; Di Marzo & De Petrocellis, 2006) indépendamment de l'inhibition de l'adénylate cyclase (Pertwee, 1997). Par ailleurs, les récepteurs CB₂ entraînent également la biosynthèse de céramide qui est un second messenger impliqué de façon importante dans l'apoptose (Kolesnick & Kronke, 1998; McAllister & Glass, 2002; Howlett et coll., 2004) (**Figure 2**).

1.2.3.2 Localisation des récepteurs CB₂

Les récepteurs CB₂ sont exprimés en grande quantité chez l'homme dans la rate, les amygdales ainsi que, dans une moindre mesure, au niveau de la moelle osseuse, du thymus et du pancréas (Galiègue et coll., 1995) (**Tableau I**). Ils sont aussi principalement exprimés par les lymphocytes B et T, les cellules « tueuses » (« natural killer »), les macrophages, les cellules microgliales et les mastocytes, en quantité plus modérée dans les monocytes et pour une part infime dans les leucocytes polynucléaires (Facci et coll., 1995; Pertwee, 1997; Pertwee & Ross, 2002; Howlett et coll., 2004; Maresz et coll., 2005).

Un résumé comparatif des mécanismes de transduction des récepteurs CB₁ et CB₂ ainsi que les principaux agonistes et antagonistes des récepteurs cannabinoïdes sont présentés dans le **Tableau II**. Les récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ reconnaissent trois classes de ligands agonistes: (1) les cannabinoïdes (les analogues synthétiques bicycliques et

tricycliques ressemblant au Δ^9 -THC comme le CP 55,940 et le HU210), les analogues des aminoalkylindoles comme le WIN 55,212-2 et les composés eicosanoïdes comme l'arachidonyl éthanolamine (anandamide) et le 2-arachidonylglycérol (Pertwee, 1997; Howlett, 1998).

Tableau II : La pharmacologie des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂.

	Récepteur CB ₁	Récepteur CB ₂
Localisation	Principalement au niveau du système nerveux central (SNC) et en périphérie	Cellules immunitaires périphériques, les cellules microgliales activées dans la moelle épinière et SNC
Fonction dans le système nerveux central (SNC)	↓ la libération de neurotransmetteurs	rôle dans la neuroinflammation
Mécanismes de transduction des signaux	↓ AMPc, ↑ K ⁺ et ↓ Ca ²⁺ ainsi que l'activation des MAPK	↓ AMPc ainsi que l'activation des MAPK
Agonistes naturels	Δ^9 -THC	Δ^9 -THC
Agonistes naturels non psychoactifs	Cannabinol	Cannabidiol (±)
Agonistes synthétiques	Δ^9 -THC/Cannabidiol (Sativex [®]) Dronabinol (Marinol [®]) Nabilone(Cesamet [®]) Lévonantradol HU210 WIN 55,212-2 CP 55,940	Δ^9 -THC/Cannabidiol (Sativex [®]) Dronabinol (Marinol [®]) Nabilone(Cesamet [®]) Lévonantradol HU210 WIN 55,212-2 CP 55,940 // HU308 // AM1241
Antagonistes	SR141716A (Rimonabant) LY-320135 AM251 AM281	SR144528 AM630

Adapté de Jonsson et coll., 2006.

1.2.4 Invalidation des gènes des récepteurs cannabinoïdes

Pour savoir si tous les effets du Δ^9 -THC et des autres cannabinoïdes sur le système nerveux central sont transmis par le récepteur CB₁ (Iversen, 1999), deux approches expérimentales ont été utilisées: l'utilisation d'antagonistes cannabinoïdes sélectifs du récepteur CB₁ et aussi le développement de lignées de souris génétiquement modifiées chez lesquelles l'expression du récepteur CB₁ a été éliminée. Cette dernière approche a été mise en évidence dans deux études (Ledent et coll., 1999; Zimmer et coll., 1999). Une de ces deux équipes a trouvé que les souris mutantes ne répondaient pas aux composés cannabinoïdes, démontrant donc le rôle exclusif du récepteur CB₁ au niveau de l'analgésie, du conditionnement positif, de l'hypothermie, du ralentissement locomoteur et de l'hypotension (Ledent et coll., 1999). Par ailleurs, les effets aigus des opioïdes sont restés inchangés alors que les propriétés de renforcement de la morphine et l'importance du syndrome de manque étaient considérablement réduites. L'autre équipe a démontré que les souris pour lesquelles le gène du récepteur CB₁ était absent semblaient fécondes et en bonne santé (Zimmer et coll., 1999). Cependant, leur taux de mortalité était augmenté de façon significative et, de plus, les résultats obtenus montraient une activité motrice réduite (également démontré par Steiner et coll., 1999), une catalepsie accrue ainsi qu'une hypoalgésie lors des tests de la plaque chauffante et du test au formol. Finalement, les auteurs ont retrouvé une analgésie induite par le Δ^9 -THC au cours du test de retrait de la queue (« tail-flick test ») chez la souris KO ainsi que d'autres réponses physiologiques et

comportementales suivant l'injection de Δ^9 -THC, ce qui est en faveur de la thèse selon laquelle la majorité, mais non tous les effets du Δ^9 -THC au niveau du système nerveux central, sont transmis par le récepteur CB₁ (Zimmer et coll., 1999).

Le récepteur cannabinoïde CB₂ est le médiateur de l'action immunomodulatrice des cannabinoïdes. Pour vérifier cette hypothèse, la première souche de souris présentant une mutation ciblée du gène pour le récepteur CB₂ a été créée (Buckley et coll., 2000). Les souris mutantes apparaissaient saines, fécondes et attentives à leur portée. Des tests sur les effets immunomodulateurs des cannabinoïdes ont été réalisés chez des souris ne possédant pas le récepteur CB₂ à l'aide de techniques de co-stimulation de la cellule T. Le Δ^9 -THC inhibait l'activation des cellules T par l'intermédiaire des macrophages chez les souris normales, mais non chez les souris dont le gène pour le récepteur CB₂ était invalidé, démontrant ainsi le rôle immunomodulateur du récepteur CB₂. Par contre, les effets centraux des cannabinoïdes étaient préservés chez ces souris-là (Buckley et coll., 2000).

L'invalidation des gènes des récepteurs cannabinoïdes chez des lignées de souris différentes révèlent l'entière complexité de ce système modulateur. En effet, les résultats contradictoires concernant l'analgésie et la locomotion entre les deux lignées de souris dont le gène codant pour le récepteur CB₁ a été invalidé soulignent cette complexité. Il est donc important de bien comprendre et d'élucider ces différences dans ces deux lignées de souris afin de savoir si ces incongruités sont causées par les antécédents génétiques ou par les procédures expérimentales (Lutz, 2002).

1.2.5 Autres récepteurs cannabinoïdes

Comme indiqué dans le paragraphe précédent, l'invalidation du gène du récepteur CB₁ chez des souris ou l'administration d'antagonistes pour ces récepteurs montre une activité pharmacologique résiduelle qui laisse croire que d'autres récepteurs cannabinoïdes sont à découvrir (Di Marzo et coll., 2000); ceci est également retrouvé dans l'étude de Zimmer qui a démontré un seuil de douleur plus élevé chez les souris dont le gène codant pour le récepteur CB₁ a été invalidé (Zimmer et coll., 1999). Des données, obtenues à partir d'expériences faites chez le rat ou la souris au niveau d'artères mésentériques précontractées, ont démontré une vasodilatation mésentérique impliquant un cannabinoïde endogène (l'anandamide) ainsi qu'un cannabidiol-anormal (abn-cbd) qui serait dépendante d'un récepteur autre que les récepteurs CB₁, CB₂ ou des récepteurs de la capsaïcine c'est-à-dire TRPV1 (« transient receptor potential vanilloid 1 ») ou anciennement VR1 (« vanilloid type 1 receptors ») (Jarai et coll., 1999; Wagner et coll., 1999; Kunos et coll., 2000). Par conséquent, l'utilisation de souris dont les gènes pour les récepteurs CB₁ et CB₂ ont été invalidés, l'utilisation d'antagonistes TRPV1 ainsi que leur désensibilisation par la capsaïcine n'ont pas atténué l'effet vasorelaxant de l'anandamide et du abn-cbd (Jarai et coll., 1999; Wagner et coll., 1999; Kunos et coll., 2000; Ho & Hiley, 2003). Ce nouveau récepteur serait dépendant de l'endothélium, puisque le SR141716A (un antagoniste des récepteurs CB₁) atténue l'effet vasorelaxant de l'anandamide seulement en présence de l'endothélium (Jarai et coll., 1999). De plus, l'effet vasodilatateur dépendant de l'endothélium causé par l'abn-cbd est sensible à la toxine pertussique (Jarai et coll., 1999;

Offertaler et coll., 2003) et engendre une augmentation de la production de GMPcyclique (Begg et coll., 2003). Ces données suggèrent donc que ce nouveau récepteur cannabinoïde serait couplé à une protéine $G_{i/o}$ et activerait la guanylate cyclase pour augmenter le GMPcyclique intracellulaire lorsqu'il est activé par l'abn-cbd (Begg et coll., 2005).

L'existence d'un autre récepteur cannabinoïde situé au niveau de l'hippocampe est envisagée par l'inhibition de courants post-synaptiques excitateurs des cellules pyramidales par le WIN 55,212-2 chez des souris dont le gène pour le récepteur CB_1 a été invalidé (Hajos et coll., 2001). Par ailleurs, le récepteur CB_1 est indétectable par immunohistochimie ainsi que par microscopie électronique et optique au niveau des terminaisons glutamatergiques de l'hippocampe de souris (Hajos et coll., 2001; Rouach & Nicoll, 2003). D'autres études sont nécessaires afin d'identifier la structure moléculaire de ces récepteurs permettant ainsi de répertorier leur distribution tissulaire. Par ailleurs, des ligands endogènes non-cannabinoïdes pourraient aussi, de façon additionnelle, interagir avec ces récepteurs (Begg et coll., 2005).

1.2.6 Les endocannabinoïdes

Par définition, les endocannabinoïdes sont définis comme des substances endogènes capables de lier et d'activer de façon fonctionnelle soit l'un, soit les deux sous-types de récepteurs cannabinoïdes, donc possédant des propriétés cannabinoïdiques (Di Marzo, 1998; Di Marzo et coll., 2002b). Plusieurs eicosanoïdes conformes aux critères de classification ont été identifiés : l'anandamide, 2 congénères de l'anandamide : le N-docosatétrénoyl-éthanolamine et le N-di-homo- γ -linolénoyl-éthanolamine, le 2-arachidonylglycérol ainsi que son analogue le 2-arachidonylglycéryl éther mieux connu sous le nom de noladin éther, l'oléoyléthanolamide, le N-arachidonyldopamine, l'oléamide et la virodhamine (**Figure 3**). Le palmitoyléthanolamide (PEA) représente quant à lui, un autre acide gras composé d'une longue chaîne aux propriétés cannabinoïdiques qui, cependant, ne se lie pas avec grande affinité aux récepteurs cannabinoïdes connus.

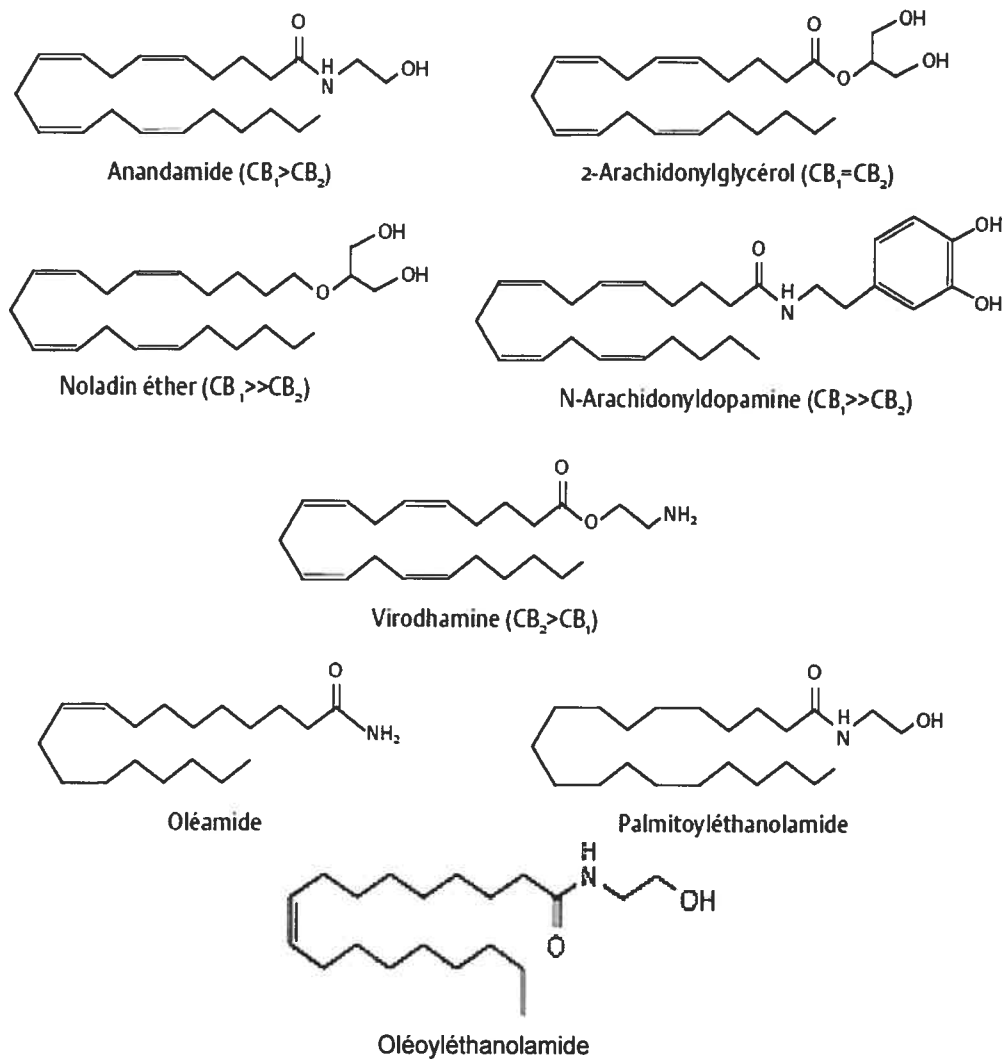


Figure 3 : Principaux cannabinoïdes endogènes ou endocannabinoïdes. Ces substances font partie de la classe des acides gras de type amide. L'anandamide et le 2-arachidonylglycérol (2-AG) sont les mieux connus et caractérisés. Trois nouveaux acteurs ont été proposés récemment : le noladin éther, la N-arachidonyldopamine et la virodhamine. Il y a également l'oléamide, le palmitoylethanolamide (PEA) et l'oléoyléthanolamide (OEA) qui se retrouvent dans ce schéma.

1.2.6.1 Anandamide

L'anandamide a été isolé à partir du cerveau porcin (Devane et coll., 1992) et constitue le premier ligand endogène aux propriétés cannabinoïdiques à avoir été découvert. Ces propriétés sont démontrées par une série de tests: champ ouvert, cercle d'immobilité, plaque chauffante et production d'hypothermie. L'anandamide possède également la capacité d'inhiber la contraction du canal déférent de souris stimulé électriquement (un effet typique mais non sélectif du Δ^9 -THC) et, enfin, il peut se lier sélectivement et activer fonctionnellement les récepteurs cannabinoïdes (Zygmunt et coll., 1999; Smart et coll., 2000; Di Marzo et coll., 2001). L'anandamide possède une faible affinité pour les récepteurs CB₁ ($k_i = 89$ nM) (Di Marzo et coll., 2001; Palmer et coll., 2002). Par ailleurs, des arguments sont 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 ce récepteur (Zygmunt et coll., 1999; Smart et coll., 2000; Di Marzo et coll., 2001).

1.2.6.1.1 Synthèse de l'anandamide

L'anandamide est formé à partir de phospholipides membranaires (phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine). Sous l'action de l'enzyme N-acyltransférase (associée à la membrane, requérant une concentration de Ca²⁺ supérieure à 500 μ M pour être active et constituant le facteur limitant de la production d'anandamide), l'acide arachidonique en position sn-1 sur la phosphatidylcholine est transféré sur la phosphatidyléthanolamine pour

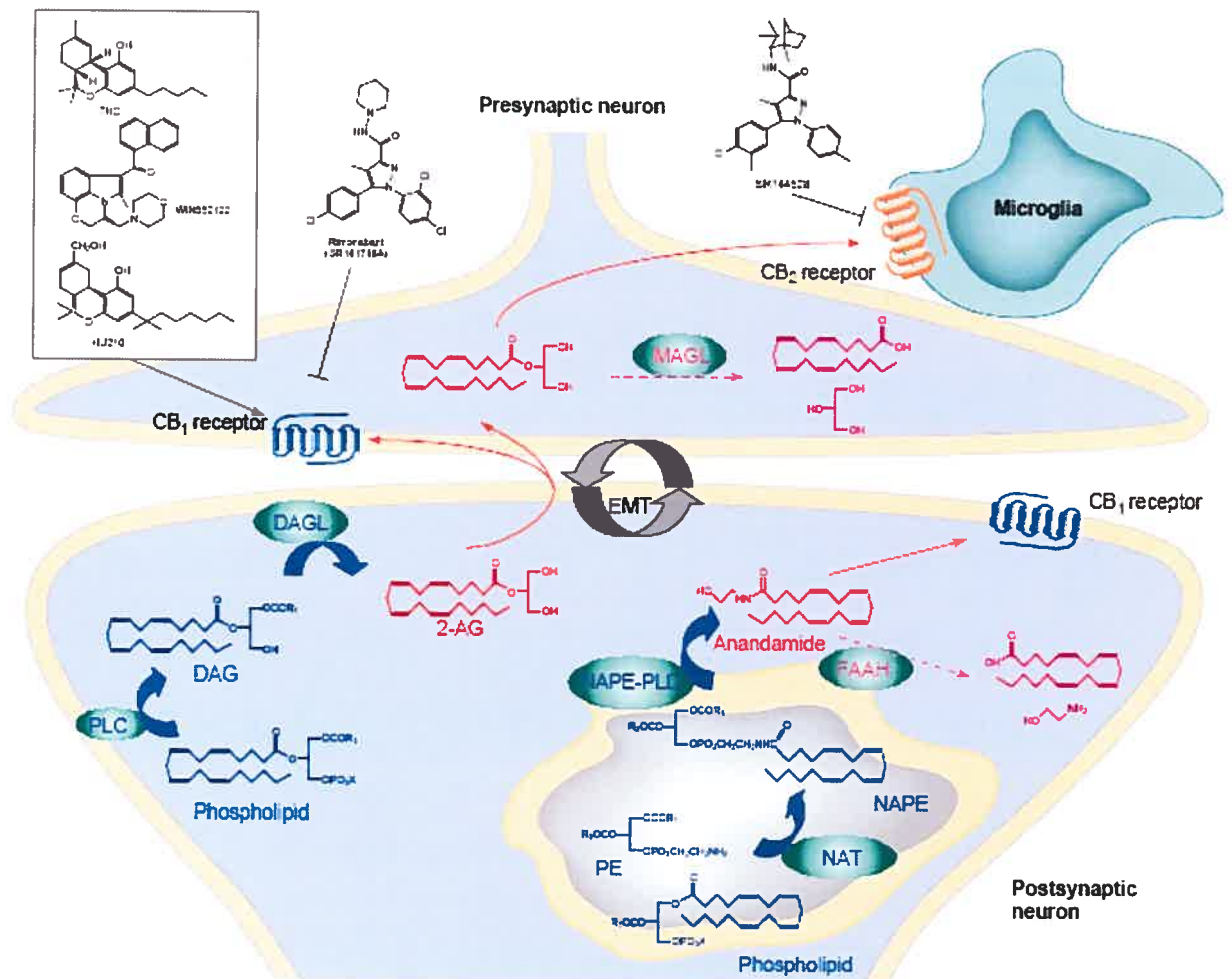
donner le précurseur N-arachidonyl phosphatidyléthanolamine. Ce composé est ensuite hydrolysé par une phosphodiesterase de type phospholipase D dont la caractérisation moléculaire et son expression ont été découvertes par Okamoto et collaborateurs en 2004. Cette enzyme fait partie de la famille des métallohydrolases de zinc et agit spécifiquement sur la N-acylphosphatidyléthanolamine (NAPE) afin de former l'anandamide et l'acide phosphatidique (**Figure 4**). Dans des conditions physiologiques, la formation d'anandamide ainsi que la resynthèse du précurseur peuvent être initiées au même moment quand les neurones sont dépolarisés et que les niveaux de calcium sont élevés (Di Marzo et coll., 1994; Hirst et coll., 1998; Piomelli et coll., 1998). L'anandamide est donc synthétisé à la demande plutôt que stocké dans des vésicules synaptiques (Hirst et coll., 1998; Piomelli et coll., 1998; Di Marzo et coll., 2001). L'anandamide est aussi synthétisé par un autre mécanisme nécessitant toutefois des concentrations élevées d'acide arachidonique et d'éthanolamine qui constituent les produits de dégradation de l'anandamide. La condensation d'acide arachidonique et d'éthanolamine avec la participation d'une enzyme (anandamide amidohydrolase) conduit à la formation d'anandamide (Di Marzo et coll., 1994; Di Marzo, 1998; Di Marzo & Deutsch, 1998; Ueda & Yamamoto, 2000). Ce mécanisme est cependant physiologiquement moins rencontré (Di Marzo, 1998). La figure 4 illustre la synthèse de l'anandamide ainsi que sa recapture et sa dégradation.

1.2.6.1.2 Dégradation de l'anandamide par la FAAH

Les neurones et les astrocytes, suite à un phénomène de recapture, hydrolysent rapidement l'anandamide pour aboutir à la formation d'acide arachidonique et d'éthanolamine (Di Marzo et coll., 1994). Le métabolisme rapide de l'anandamide joue un rôle important dans la durée d'activité pharmacologique de ce composé naturel liant les récepteurs cannabinoïdes et fait en sorte que l'anandamide exogène est éliminé en moins d'une demi-heure au niveau cérébral et plasmatique murin (Willoughby et coll., 1997). L'hydrolyse de l'anandamide est catalysée par une amidohydrolase liée à la membrane (nommée anandamide amidohydrolase ou encore amide hydrolase des acides gras ou FAAH pour « fatty-acid amide hydrolase ») qui a été clonée par Cravatt et collaborateurs en 1996 et qui possède une activité optimale pour un pH entre 8,5 et 10 (Di Marzo, 1998; Sugiura et coll., 2002). Cette enzyme associée à la membrane est localisée au niveau de sites intracellulaires de différents tissus dont le cerveau, le foie, les reins, l'intestin ainsi qu'au niveau des cellules immunitaires, mais c'est au niveau du cerveau que son expression a été la mieux caractérisée (Di Marzo & Deutsch, 1998). Au niveau du foie et du cerveau, elle est située de façon prédominante au niveau des microsomes et des mitochondries (Deutsch et coll., 2002). Par ailleurs, les souris dont le gène codant pour la FAAH a été invalidé ne peuvent pas dégrader l'anandamide et lorsqu'elles reçoivent de l'anandamide elles démontrent des comportements typiquement associés aux cannabinoïdes tels que: l'hypomotilité, la catalepsie, l'analgésie et l'hypothermie (Cravatt et coll., 2001). De plus, elles possèdent des niveaux endogènes 15 fois plus importants d'anandamide cérébral et

elles réagissent moins fortement à la douleur ce qui implique les récepteurs CB₁ (Cravatt et coll., 2001). 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 et coll., 2001; Cravatt & Lichtman, 2003). Cette enzyme peut aussi agir de façon inverse en synthétisant de l'anandamide, cependant, cette fonction particulière de l'enzyme se produit rarement dans des conditions physiologiques (Di Marzo et coll., 1994; Di Marzo, 1998; Di Marzo & Deutsch, 1998; Ueda & Yamamoto, 2000; Deutsch et coll., 2002). L'action de la FAAH est inhibée par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Fowler et coll., 1997; 1999), par le propofol (un agent anesthésique intraveineux) (Patel et coll., 2003), par les inhibiteurs des sérines-protéases tel que le fluorure phénylméthylsulfonyl (PMSF) qui se lie de façon covalente à la sérine 241 de la FAAH (Deutsch et coll., 2002), par les inhibiteurs de la phospholipase A₂ cytosolique comme le fluorophosphonate méthylarachidonoyl (MAFP) (Sugiura et coll., 2002), par le fluorophosphate diisopropyl (Ueda & Yamamoto, 2000), par l'URB597 qui est très sélectif ne se liant pas au transporteur de l'anandamide ni aux récepteurs cannabinoïdes (Kathuria et coll., 2003; Jayamanne et coll., 2006; Paylor et coll., 2006) ainsi que par le fluorure palmitylsulphonyl (AM374) qui s'avère plus spécifique comparativement aux inhibiteurs des sérines-protéases (Deutsch et coll., 1997). De plus, il semblerait que l'inhibition de la FAAH par l'URB597, un composé carbamate qui forme une liaison covalente avec un résidu sérine de l'enzyme, serait sélectivement dépendante du pH, ce qui vient d'être démontré au niveau cellulaire

(Paylor et coll. 2006). L'analyse séquentielle de la FAAH a démontré une protéine conservant 579 acides aminés dans toutes les espèces dont une région hydrophobe transmembranaire, une région catalytique (sérine 241, sérine 217 et lysine 142) participant à l'hydrolyse (Deutsch et coll., 2002; Cravatt & Lichtman, 2003), en plus d'une séquence possédant un domaine SH3, ce qui suggère que d'autres protéines peuvent interagir avec la FAAH, et ainsi, contrôler son activité et/ou sa localisation sous-cellulaire (Cravatt et coll., 1996). Il est possible que des cellules autres que les neurones tels que les leucocytes participent au catabolisme des endocannabinoïdes, notamment lors du processus inflammatoire (Bisogno et coll., 1997; De Petrocellis et coll., 2000b).



D'après Di Marzo, 2006.

Figure 4 : Formation et inactivation de l'anandamide et du 2-arachidonylglycérol (2-AG). Les deux endocannabinoïdes sont formés à partir de phospholipides membranaires suite à l'action d'enzymes spécifiques, une N-acyltransférase (NAT) puis une phospholipase D (PLD) pour l'anandamide, et une phospholipase C (PLC) puis une diacylglycérol lipase (DAGL) pour le 2-AG. Ces enzymes sont situées au niveau des membranes intracellulaires. Un transporteur membranaire (EMT pour « endocannabinoïde membrane transporter ») faciliterait le passage des endocannabinoïdes, synthétisés au niveau du neurone post-synaptique, vers la fente synaptique ou le neurone présynaptique. La

dégradation de l'anandamide s'effectue par une amidohydrolase des acides gras ou FAAH (« fatty-acid amide hydrolase ») qui est présente en grande concentration au niveau post-synaptique tandis que le 2-AG est inactivé par une monoacylglycérol lipase (MGL) retrouvée principalement au niveau du neurone présynaptique. Ainsi, le 2-AG constituerait le principal endocannabinoïde agissant comme messager rétrograde sur les récepteurs cannabinoïdes présynaptiques.

1.2.6.1.3 Transporteur de l'anandamide

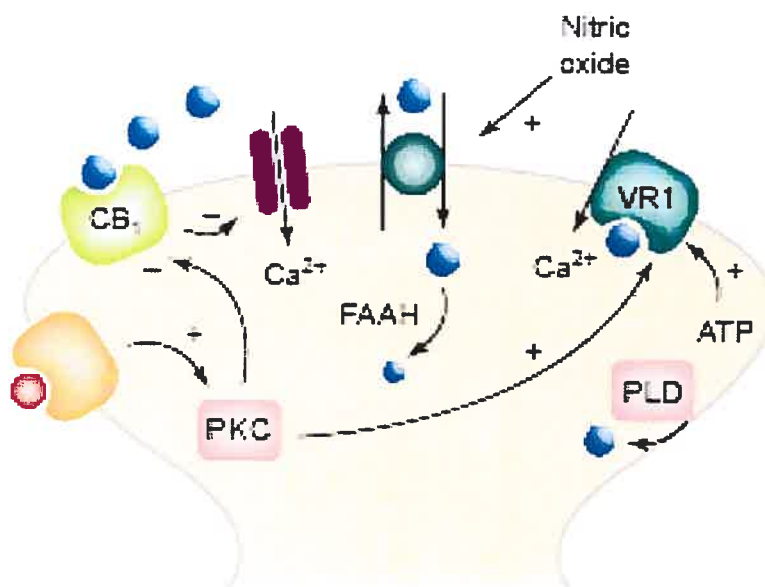
Il a été proposé que la libération de l'anandamide (et d'autres endocannabinoïdes) dans la fente synaptique ainsi que sa recapture soient facilitées par un transporteur localisé sur les neurones pré- et post-synaptiques. Ce mécanisme de recapture est pris en charge par un transporteur saturable, sélectif, thermo-dépendant, indépendant des ions sodiques et pouvant être stimulé par le NO (Beltramo et coll., 1997; Hillard et coll., 1997; Di Marzo et coll., 2001; 2004; Di Marzo, 2006) dont le site de liaison au niveau de ce transporteur aurait été identifié (Moore et coll., 2005). Ce phénomène de recapture de l'anandamide, correspondant à un processus de diffusion facilitée, peut être bloqué par différents inhibiteurs dont l'AM404, l'arvanil, l'olvanil, le UCM707 ainsi que le SKM-4-45-1 (Palmer et coll., 2002). Toutefois, il est important de mentionner que l'AM404, l'arvanil et l'olvanil inhibent la FAAH et donc l'hydrolyse de l'anandamide (Jarrahian et coll., 2000; Glaser et coll., 2003; Hillard & Jarrahian, 2003), ce qui suggère que le métabolisme par la FAAH constitue la force régulatrice du transport de l'anandamide. De nouvelles évidences suggèrent que l'anandamide pourrait être transporté par simple diffusion, car

l'accumulation d'anandamide serait insaturable; certains inhibiteurs du transporteur inhiberaient aussi la FAAH et la spécificité de l'anandamide pour le transporteur ne serait pas certaine, selon les expériences faites sur des cellules de neuroblastome et d'astrocytome (Glaser et coll., 2003). Une autre étude a émis l'hypothèse que l'anandamide pourrait diffuser librement à travers les membranes dans toutes les cellules, mais certaines cellules exprimeraient aussi un transporteur qui faciliterait ce mouvement (Hillard & Jarrahian, 2003). Ainsi, à l'heure actuelle, l'existence d'un transporteur spécifique des endocannabinoïdes reste controversée et de nouvelles découvertes seront nécessaires pour répondre à cette interrogation (Hillard & Jarrahian, 2003; McFarland & Barker, 2004 pour une synthèse).

1.2.6.1.4 L'anandamide comme endovanilloïde

Par ailleurs, l'anandamide considéré principalement comme un endocannabinoïde, est aussi un endovanilloïde, car il peut agir au niveau des récepteurs vanilloïdes de type TRPV1 qui sont des récepteurs sensibles à la capsaïcine, aux protons, à la chaleur (**Figure 5**) (Caterina et coll., 1997; Di Marzo et coll., 2001; Piomelli, 2001). La capsaïcine et l'anandamide partagent le même site de liaison (Di Marzo et coll., 2002a) mais ce n'est qu'à des concentrations élevées d'anandamide que ce dernier est capable d'activer le récepteur vanilloïde. L'activation de ces récepteurs engendre l'entrée de Ca^{2+} et la dépolarisation de la cellule qui libère le CGRP (« calcitonin gene-related peptide ») et la substance P qui causent une vasodilatation locale et une extravasation plasmatique (Di Marzo et coll., 2001). Ainsi l'anandamide à fortes concentrations peut avoir des effets inverses de ceux

obtenus lors de l'activation des récepteurs CB_1 . De plus, il a été démontré qu'il existerait une relation fonctionnelle entre les récepteurs TRPV1 et CB_1 au niveau des ganglions de la racine dorsale, de la moelle épinière et du système nerveux central lorsque ces derniers sont exprimés dans la même cellule (Cristino et coll., 2006).



D'après Di Marzo et coll., 2004.

Figure 5 : Fonction hypothétique de l'anandamide comme étant un endocannabinoïde ou un endovanilloïde. Les cercles bleus correspondent à l'anandamide et le cercle rouge correspond à la bradykinine ou un autre agoniste. Abréviations: VR1 ou TRPV1, « transient receptor potential vanilloid 1 »; FAAH, « fatty-acid amide hydrolase »; CB_1 , récepteur cannabinoïde 1; PKC, protéine kinase C; PLD, phospholipase D; ATP, adénosine triphosphate.

1.2.6.2 2-Arachidonylglycérol

Le 2-arachidonylglycérol (2-AG) constitue le deuxième ligand endogène aux propriétés cannabino-mimétiques qui a été découvert et isolé, en premier lieu, au niveau de l'intestin de chien (Mechoulam et coll., 1995) et plus tard au niveau du cerveau de rat (Sugiura et coll., 1995). L'administration systémique du 2-AG produit une hypomotilité, de l'hypothermie, une antinociception et une catalepsie, ce qui constitue la même tétrade de tests que celle produite par l'administration d'anandamide ou de THC (Mechoulam et coll., 1995; Stella et coll., 1997). Comme l'anandamide, le 2-AG a une relativement faible affinité pour le récepteur CB₁ ($K_i = 472$ nM) ainsi que pour le récepteur CB₂ ($K_i = 1400$ nM) (Lee et coll., 1995; Mechoulam et coll., 1995; Sugiura et coll., 1996). Toutefois, des expériences faites au niveau cellulaire démontrent que le 2-AG est le ligand de choix pour le récepteur CB₁ et CB₂ comparativement à l'anandamide agissant comme agoniste partiel (Sugiura et coll., 1999; 2000). Le 2-AG a été retrouvé dans le cerveau à des concentrations 170 fois supérieures à celle de l'anandamide (Stella et coll., 1997). Le 2-AG peut moduler le système immunitaire en agissant entre autres sur les splénocytes, les lymphocytes, les macrophages, les cellules microgliales (Lee et coll., 1995; Maccarrone et coll., 2002a; Howlett et coll., 2004; Di Marzo, 2006). Il a été démontré que les macrophages peuvent stimuler la synthèse du 2-AG suite à leur activation par le lipopolysaccharide (LPS) et possèdent aussi les mécanismes pour sa dégradation suivi de sa récupération en phosphoglycérides membranaires (Di Marzo et coll., 1999).

1.2.6.2.1 Synthèse du 2-arachidonyleglycérol

La synthèse du 2-AG se fait par deux mécanismes. Le premier, et principal, mécanisme est dépendant du calcium et se trouve sous le contrôle d'une phospholipase C qui permet d'obtenir le 1,2-diacyleglycérol qui sous l'action de l'enzyme diacylglycérol lipase (sn1-DAG lipase) donnera le 2-AG (Di Marzo, 1998; Sugiura et coll., 2002; Bisogno et coll., 2003). L'activité de la DAG lipase est nécessaire pour la croissance axonale chez l'embryon durant son développement et au niveau des dendrites du cervelet chez l'adulte. Cette dernière se déplace donc du niveau présynaptique au niveau post-synaptique selon les besoins développementaux engendrés par la croissance cérébrale (Bisogno et coll., 2003; Di Marzo, 2006). La DAG lipase peut être inhibée par le RHC80267 et la tétrahydrolipstatine (Bisogno et coll., 2003). Ces deux inhibiteurs peuvent s'avérer utiles pour une meilleure compréhension de la fonction cellulaire de cette enzyme. Le deuxième mécanisme consiste sous l'action d'une phospholipase A1 en la synthèse du 2-arachidonylelysophospholipide qui sera ensuite hydrolysé en 2-AG par l'activité d'une lysophospholipase C (Di Marzo, 1998; Piomelli et coll., 1998; Piomelli, 2003).

1.2.6.2.2 Dégradation du 2-arachidonyleglycérol par la MGL

Le 2-AG aussi bien que l'anandamide sont métabolisés rapidement en raison de la présence d'enzymes de dégradation très efficaces (Jarai et coll., 2000). Il a été démontré antérieurement que l'enzyme FAAH hydrolyse l'anandamide, mais cette dernière peut également dégrader le 2-AG (Di Marzo et coll., 1998b; Goparaju et coll., 1998).

Cependant, le 2-AG est dégradé principalement par la monoacylglycérol lipase (MGL) qui est une protéine localisée aussi bien au niveau du cytosol que de la membrane (Ghafouri et coll., 2004). Elle est présente au niveau présynaptique, possède une activité optimale à un pH situé entre 7 et 8 et a conservé une homologie de séquence entre les différentes espèces (rats, souris et humains) (Goparaju et coll., 1999; Ghafouri et coll., 2004; Di Marzo, 2006). Différentes analyses ont révélé que la MGL est exprimée de façon hétérogène au niveau du cerveau avec les niveaux les plus élevés dans les régions exprimant aussi les récepteurs CB₁ tels que l'hippocampe, le cortex, le thalamus antérieur et le cervelet (Dinh et coll., 2002). De plus, la présence de MGL a également été démontrée au niveau des macrophages (Di Marzo et coll., 1999). Cette enzyme est inhibée faiblement par l'arachidonoyl sérinol, le O-2203 et le O-2204 (Ghafouri et coll., 2004) mais de façon sélective par l'URB602 (Hohmann et coll., 2005) et l'URB574 (Makara et coll., 2005). De plus, le palmitoyltrifluorométhylcétone (PTMK) inhibe l'activité de la MGL avec toutefois moins de puissance que celle de la FAAH (Ghafouri et coll., 2004). L'analyse séquentielle de la MGL, une sérine hydrolase, démontre une protéine possédant 303 acides aminés (Dinh et coll., 2002). Par ailleurs, le 2-AG diffuse rapidement dans les cellules sans toutefois qu'il n'y ait d'évidences actuelles attestant que le 2-AG puisse diffuser à l'aide d'un transporteur (Di Marzo, 1998; Di Marzo et coll., 1998b).

Il est important de noter que l'anandamide ainsi que le 2-AG peuvent aussi être métabolisés par la cyclooxygénase et la lipooxygénase donnant, dans le cas de l'anandamide respectivement, la prostaglandine E₂-éthanolamine et l'acide hydroxy-eicosatétraénoïque-

éthanolamine (Burstein et coll., 2000). Par ailleurs, les dérivés de l'anandamide provenant de l'action de la lipooxygénase sont des inhibiteurs compétitifs de la FAAH (Maccarrone et coll., 1998).

Les effets différents du 2-AG et de l'anandamide peuvent résulter de rôles divers leurs étant attribués durant la modulation rétrograde de la neurotransmission excitatrice ou inhibitrice, puisque, par exemple, le 2-AG n'active pas efficacement les récepteurs TRPV1 (Di Marzo et coll., 2002a). En effet, le 2-AG agit pleinement en tant qu'agoniste des récepteurs CB₁ produisant une inhibition fonctionnelle de la potentialisation à long terme au niveau de l'hippocampe (Stella et coll., 1997; Hirst et coll., 1998), par opposition à l'anandamide qui cause une augmentation dépendante de la dose en raison de son action sur les récepteurs TRPV1 (Al-Hayani et coll., 2001; Di Marzo et coll., 2002a,b). Par ailleurs, il a aussi été démontré que le 2-AG diminue la perméabilité au niveau de la barrière hémato-encéphalique, diminue l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6) et augmente les niveaux endogènes d'antioxydants (Panikashvili et coll., 2005).

1.2.6.2.3 Transporteur du 2-arachidonyleglycérol

Le 2-AG diffuse rapidement dans les cellules sans toutefois qu'il n'y ait de consensus quant aux évidences actuelles attestant que le 2-AG diffuse à l'aide d'un transporteur (Di Marzo, 1998; Di Marzo et coll., 1998b). Cependant, quelques études ont étudié le transport du 2-AG, un agoniste naturel des récepteurs cannabinoïdes. Elles se sont basées sur les cinétiques de saturation et les rapports récents proposent que le 2-AG entre dans la cellule

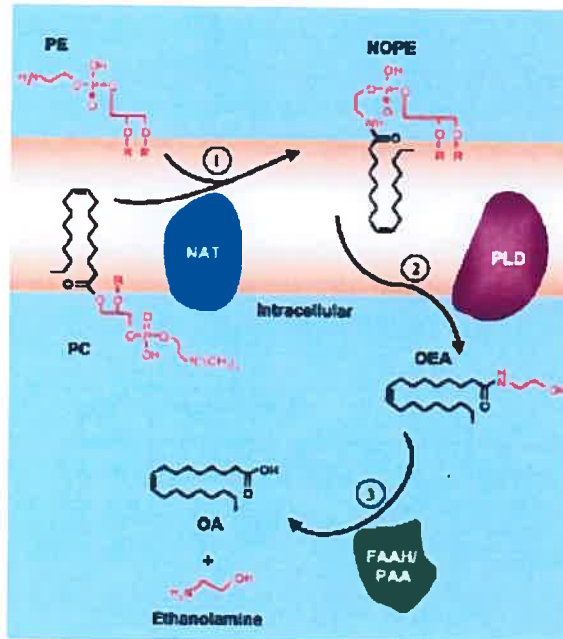
par un transporteur qui lui est spécifique ou tout simplement par diffusion simple (Hermann et coll., 2006). Selon ces nouvelles données, la recapture du 2-AG ressemblerait étrangement à celle de l'anandamide faisant en sorte que le mécanisme de diffusion à travers la membrane serait limité par les taux de 2-AG (Hermann et coll., 2006). Ces résultats suggèrent donc que les endocannabinoïdes sont une classe distincte d'agonistes étant donné qu'ils sont hydrophobes et neutres et qu'ils démontrent des propriétés biophysiques semblables à certains anesthésiques qui diffusent librement à travers la membrane.

1.2.6.3 Oléoyléthanolamide

L'oléoyléthanolamide (OEA), constitué à partir d'éthanolamine et d'acide oléique, est un analogue structurel de l'anandamide, un cannabinoïde endogène décrit précédemment, qui n'active pas les récepteurs cannabinoïdes (Gaetani et coll., 2003). Sa biosynthèse dans les intestins de rat est augmentée par la prise de nourriture et diminuée par le jeûne, ce qui lui confère une participation dans la régulation de la satiété (Gaetani et coll., 2003). Ce lipide endogène module la prise de nourriture, la masse corporelle et le métabolisme des lipides par sa grande affinité pour le facteur de transcription PPAR- α (« peroxisome proliferator-activated receptor- α ») (Guzman et coll., 2004; Lo Verme et coll., 2005b). L'OEA est présent dans tous les tissus exprimant le PPAR- α comme, par exemple, dans les intestins et le cerveau. Toutefois, la régulation de sa biosynthèse dans certains tissus reste encore inconnue (Lo Verme et coll., 2005b). Des études ont aussi démontré que l'OEA pourrait

interagir avec le récepteur TRPV1 afin de réguler la satiété (Ahern, 2003; Wang et coll., 2005) ce qui a été démenti par une expérience faite chez des souris dont le gène codant pour le récepteur TRPV1 a été inactivé (Lo Verme et coll., 2005b). L'inactivation du gène TRPV1 chez ces souris n'a pas affecté l'induction par l'OEA de la baisse de prise de nourriture (Lo Verme et coll., 2005b). La contribution du récepteur TRPV1 à la régulation de la satiété reste controversée à l'heure actuelle.

L'OEA est formé à la demande à partir des précurseurs phospholipidiques trouvés dans la membrane cellulaire. La première étape est produite à l'aide de la N-acyltransférase qui catalyse le transfert de l'acide oléique de la phosphatidylcholine sur le groupement amine de la phosphatidyléthanolamine, ce qui forme le n-oléoyl-phosphatidyléthanolamine qui sera clivé, ensuite, par une phospholipase D spécifique afin de libérer l'OEA (Lo Verme et coll., 2005b). L'OEA est éliminé par l'hydrolyse enzymatique conduisant à la formation d'acide oléique et d'éthanolamine. Il y a deux enzymes qui ont été identifiées comme catalysant cette réaction: la FAAH retrouvée abondamment au niveau du cerveau et du foie (enzyme qui catalyse l'hydrolyse des éthanolamides des acides gras (« fatty-acid ethanolamides »)) et la N-palmitoyl-phosphatidyléthanolamine qui est présente en grande quantité dans les poumons, la rate et les intestins (enzyme qui catalyse préférentiellement le palmitoyléthanolamide) (**Figure 6**) (Lo Verme et coll., 2005b).



D'après Lo Verme et coll., 2005b.

Figure 6 : Synthèse et dégradation des amides des acides gras endogènes tel que démontré pour l'OEA. Abréviations: NAT, N-acyltransférase; PE, phosphatidyléthanolamine; PC, phosphatidylcholine; NOPE, N-oléoyl-phosphatidyléthanolamine; PLD, phospholipase D; OA, acide oléique; PAA, N-palmitoyl-phosphatidyléthanolamine.

1.2.6.4 Palmitoyléthanolamide

Le palmitoyléthanolamide (PEA) a été identifié au niveau de différents tissus (cerveau, foie, muscles) chez le rat et le cochon d'Inde ainsi qu'il a été démontré avoir des propriétés anti-inflammatoires et anti-anaphylactiques (Bachur et coll., 1965). Le PEA pourrait être un agoniste endogène des récepteurs cannabinoïdes CB₂ (Facci et coll., 1995). Cependant,

cette dernière étude n'a pas été reproduite dans d'autres laboratoires. Par ailleurs, d'autres études affirment que le PEA ne se lie pas aux récepteurs CB₁ ou CB₂ (Devane et coll., 1992; Griffin et coll., 2000). De plus, le PEA ne déplace que 10 % de la liaison du [³H] CP 55,940 aux récepteurs cannabinoïdes CB₂ humains clonés, et cela à des concentrations allant jusqu'à 10 nM (Showalter et coll., 1996). C'est pourquoi il a été suggéré que le PEA pourrait activer les récepteurs CB₂ indirectement en initiant une chaîne d'événements (Malan et coll., 2002). Par exemple, il a été proposé que le PEA pourrait augmenter les effets des autres endocannabinoïdes en prévenant leur métabolisme et ainsi en devenant une substance agissant positivement sur son entourage (Lambert & Di Marzo, 1999; Jonsson et coll., 2001; De Petrocellis et coll., 2002). Il est possible aussi que le PEA agisse sur un récepteur cannabinoïde non découvert jusqu'à maintenant (Calignano et coll., 1998; 2001; Conti et coll., 2002). La reconnaissance du PEA en tant que ligand endogène des récepteurs CB₂ reste donc controversée. Par opposition, il a été démontré que le PEA produit son effet anti-inflammatoire en agissant sur le récepteur nucléaire PPAR- α , cette action n'est pas inhibée par le SR144528 (antagoniste spécifique du récepteur CB₂) (Lo Verme et coll., 2005a). De plus, l'application topique du PEA n'a pas augmenté les niveaux d'anandamide dans la peau, ce qui contredit l'hypothèse précédente suggérant que le PEA bloquerait l'hydrolyse de l'anandamide. Il s'agirait plutôt du blocage de la synthèse de l'anandamide (Lo Verme et coll., 2005a).

Le PEA est synthétisé à la demande, comme pour l'anandamide, et, à partir des phospholipides membranaires et de l'activité catalytique d'une N-acyltransférase dépendant du calcium, il y a formation du N-palmitoyl-phosphatidyléthanolamine qui sous l'action de l'hydrolyse catalytique d'une phospholipase D produit le PEA (Cadas et coll., 1997; Calignano et coll., 2001). Par ailleurs, une enzyme différente de la FAAH a été définie de façon moléculaire et démontrée comme étant une N-palmitoyléthanolamine acide amidase (NPAA) ou une N-acyléthanolamine acide amide hydrolase (NAAA), selon les auteurs, possédant une activité optimale à un pH de 5 et hydrolysant le PEA (en acide palmitique et en éthanolamine) beaucoup plus rapidement (13 fois) que l'anandamide (Ueda et coll., 2001; Deutsch et coll., 2002; Tsuboi et coll., 2005). Cette enzyme est distribuée de façon abondante dans les poumons, la rate, les intestins, le thymus et le caecum, ce qui témoigne d'une distribution importante au niveau du système immunitaire confirmant les effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs du PEA (Ueda et coll., 2001). De plus, la N-palmitoyléthanolamine acide amidase est presque insensible à l'effet du fluorophosphonate méthylarachidonoyl (MAFP) bloquant efficacement toutefois l'activité de la FAAH (Ueda et coll., 2001).

1.2.6.5 Autres endocannabinoïdes

Les deux congénères de l'anandamide, le N-docosatétrénoyl-éthanolamine et le N-di-homo- γ -linolénoyl-éthanolamine ont été isolés du cerveau de porc (Hanus et coll., 1993; Di Marzo, 1998), ont démontré une activité cannabinoïdique (Hanus et coll., 1993;

Pertwee et coll., 1994; Barg et coll., 1995) ainsi qu'une liaison fonctionnelle au niveau du récepteur cannabinoïde CB₁ (Hanus et coll., 1993; Di Marzo, 1998).

Le 2-arachidonylglycéril éther (noladin éther) est un analogue éther du 2-AG qui se lie et qui active les récepteurs CB₁ (Hanus et coll., 2001). Le mécanisme définissant sa synthèse n'a pas encore été caractérisé et sa présence dans le tissu cérébral normal a été questionnée (Oka et coll., 2003; Parkkari et coll., 2006).

Le N-arachidonyldopamine est un agoniste endogène des récepteurs vanilloïdes (TRPV1) ainsi qu'un agoniste des récepteurs CB₁ (Huang et coll., 2002; Iversen & Chapman, 2002).

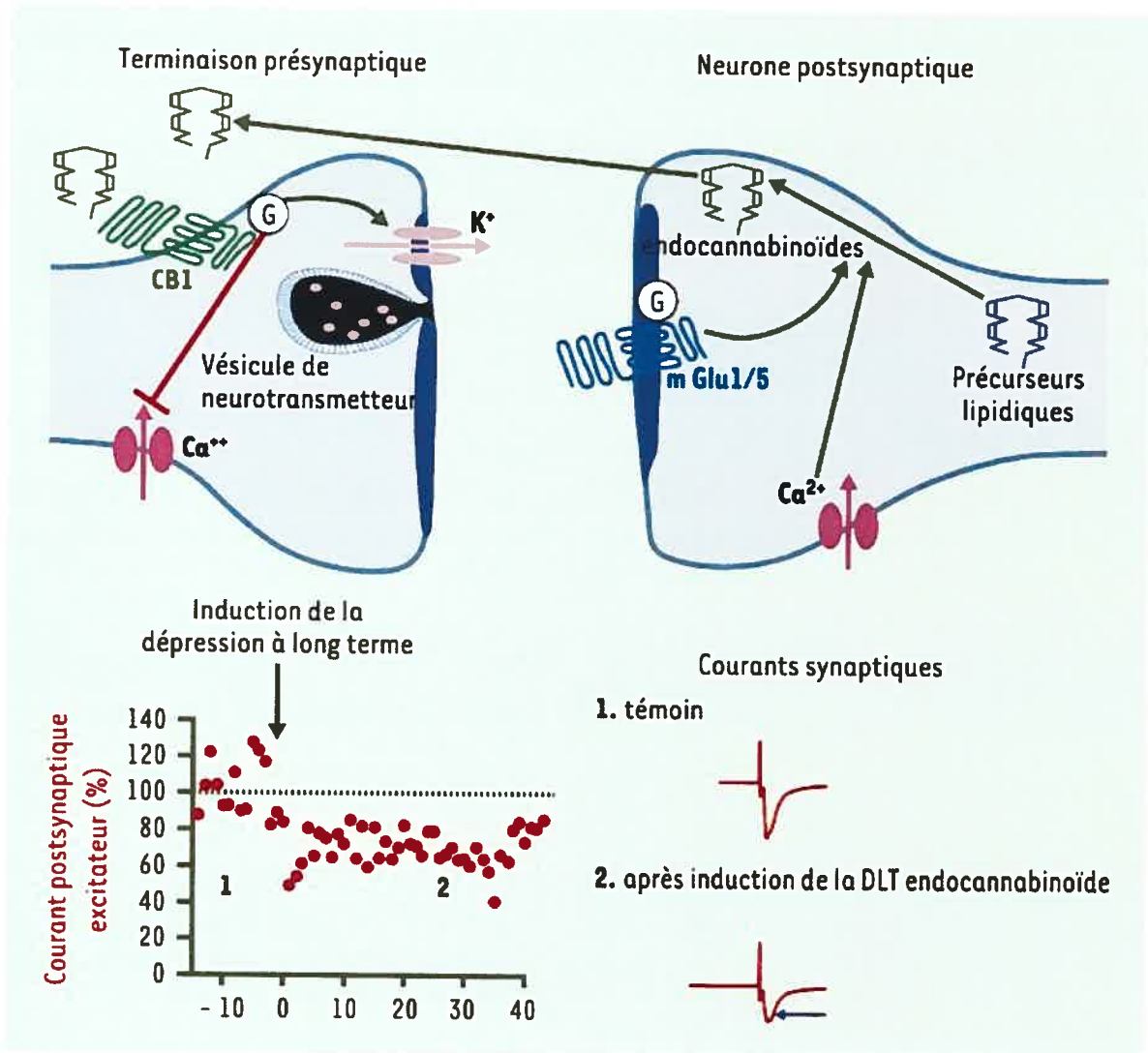
L'oléamide est un agoniste endogène sélectif des récepteurs cannabinoïdes CB₁ murins et humains qui a la propriété d'induire le sommeil (Fowler, 2004; Leggett et coll., 2004).

Par ailleurs, la virodhamine, qui constitue l'ester de l'acide arachidonique et de l'éthanolamine, pourrait agir comme un antagoniste endogène du récepteur CB₁ (Porter et coll., 2002). Sa présence au niveau des tissus cérébraux a été documentée (Porter et coll., 2002), mais ceci est intrigant puisque cette molécule instable est rapidement convertie en anandamide dans un environnement aqueux. Le mécanisme de sa synthèse est inconnu et sa désactivation pourrait correspondre à un phénomène de recapture et d'hydrolyse ressemblant à ceux de l'anandamide (Porter et coll., 2002).

1.2.7 Endocannabinoïdes comme messagers synaptiques agissant de façon rétrograde

Une des découvertes les plus importantes concernant les endocannabinoïdes au niveau du système nerveux central proviendrait du travail de Wilson & Nicoll en 2001 liant les récepteurs cannabinoïdes à un phénomène de dépolarisation qui induit la suppression de l'inhibition ou DSI (« depolarization-induced suppression of inhibition ») et caractérisé précédemment par Alger et ses collaborateurs (Pitler & Alger, 1994; Alger et coll., 1996; Alger, 2002). Des études électrophysiologiques récentes appuient fortement l'hypothèse selon laquelle l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire causerait une forte dépolarisation des cellules post-synaptiques (pyramidales de l'hippocampe, Purkinje du cervelet ou autres), ce qui engendrerait la synthèse rapide et non-vésiculaire des endocannabinoïdes (Kreitzer & Regehr, 2001; Ohno-Shosaku et coll., 2001; Wilson & Nicoll, 2001). Ces derniers agiraient au niveau des récepteurs CB₁ présynaptiques afin d'inhiber la libération des neurotransmetteurs. Les endocannabinoïdes sont donc capables, du fait de leur mode de production « à la demande » et de leurs propriétés chimiques particulières, d'intervenir « à contre-courant » de la transmission synaptique pour moduler de manière transitoire ou durable la libération de neurotransmetteurs inhibiteurs ou excitateurs (**Figure 7**) (Venance et coll., 2004). Ainsi, les endocannabinoïdes participeraient au phénomène de suppression de l'inhibition induite par une dépolarisation ou DSI tel qu'observé au niveau des neurones de l'hippocampe qui entraînait une

diminution des événements post-synaptiques spontanés inhibiteurs GABAergiques (Ohno-Shosaku et coll., 2001; Wilson & Nicoll, 2001). Parallèlement, le rôle des endocannabinoïdes a été découvert dans le phénomène de suppression de l'excitation induite par une dépolarisation ou DSE (« depolarization-induced suppression of excitation ») au niveau des fibres ascendantes du cervelet où la signalisation rétrograde des endocannabinoïdes module des synapses excitatrices glutamatergiques (Kreitzer & Regehr, 2001; Venance et coll., 2004). Il faut noter que si l'activation des récepteurs CB₁ entraîne une inhibition de l'activité de certains neurones, cela ne signifie pas pour autant que les cannabinoïdes soient inhibiteurs des fonctions cérébrales en raison des effets de circuit qui peuvent faire, par exemple, que l'inhibition d'une inhibition peut produire une excitation neuronale (Venance et coll., 2004). Les endocannabinoïdes peuvent aussi moduler la plasticité synaptique à long terme, comme cela a été démontré au niveau du noyau accumbens, qui est une structure centrale de la voie corticomésolimbique (Robbe et coll., 2001) (**Figure 7**). Ainsi, le système endocannabinoïde contrôle la libération de nombreux neurotransmetteurs comme le glutamate, le GABA, la glycine, la noradrénaline, la sérotonine, la dopamine, l'acétylcholine et de nombreux neuropeptides (Baker et coll., 2003).



D'après Venance et coll., 2004.

Figure 7 : Les endocannabinoïdes sont des messagers lipidiques synthétisés à la demande au niveau post-synaptique suite à une dépolarisation de la membrane neuronale secondaire à l'entrée de calcium. Ils sont ainsi relâchés dans la fente synaptique et vont agir sur des récepteurs cannabinoïdes CB_1 localisés sur le neurone présynaptique. Ils peuvent alors inhiber la libération de neurotransmetteurs inhibiteurs ou excitateurs en fonction de la localisation neuronale considérée. Ainsi, les endocannabinoïdes peuvent agir sur la plasticité synaptique à court et à long terme (exemple présenté ici à partir d'enregistrements

effectués au niveau de fibres nerveuses prélimbiques) par action rétrograde sur l'élément présynaptique. (**en haut**)

Enregistrement d'un courant synaptique excitateur au niveau du noyau accumbens chez la souris. L'administration d'un endocannabinoïde inhibe les courants synaptiques excitateurs et induit une dépression à long terme. (**en bas**)

II. Cannabinoïdes et douleur

2.1 Généralités

Le 19^e siècle a été marqué par l'usage médical du cannabis afin de soulager différentes douleurs; un regain d'intérêt pour l'utilisation de cette substance comme outil thérapeutique dans le traitement de la douleur est survenu vers la fin du 20^e siècle et de façon plus prononcée en ce début de 21^e siècle (Joy et coll., 1999; Nolin & Kenny, 2003). Les cannabinoïdes endogènes ainsi que les récepteurs cannabinoïdes sont présents à différents niveaux des voies de la douleur, de la périphérie jusqu'au système nerveux central (Martin et coll., 1995; Hohmann & Herkenham, 2000; Hohmann, 2002). La découverte du système cannabinoïde endogène, la disponibilité d'antagonistes pour les récepteurs cannabinoïdes ainsi que la génération de souris dont le gène pour le récepteur CB₁ et/ou le récepteur CB₂ a été invalidé ont facilité les recherches dans ce domaine (Iversen & Chapman, 2002). L'administration systémique des agonistes cannabinoïdes a produit des effets antinociceptifs et antihyperalgésiques dans des études comportementales (Lichtman & Martin, 1991b; Farquhar-Smith & Rice, 2001; Fox et coll., 2001) et électrophysiologiques

(Hohmann et coll., 1995; 1999). Les sites d'action des cannabinoïdes ont été étudiés de façon exhaustive et l'effet antinociceptif des cannabinoïdes a été identifié au niveau périphérique, spinal et central suite à l'administration de différentes classes d'agonistes pour les récepteurs cannabinoïdes (Pertwee, 2001).

2.2 Cannabinoïdes au niveau central et douleur

La mise en évidence directe de l'intervention d'un site analgésique central vient de l'observation selon laquelle l'administration par voie intracérébroventriculaire d'agonistes des récepteurs cannabinoïdes tels que le WIN 55,212-2, le CP 55,940 ou le Δ^9 -THC au niveau de régions spécifiques du cerveau impliquées dans le contrôle de la douleur telles que le noyau basolatéral de l'amygdale (Connell et coll., 2005), la substance grise périaqueducale (Martin et coll., 1995; 1999a; Lichtman et coll., 1996; Welch et coll., 1998) et la moelle rostroventromédiale (RVM) (Meng et coll., 1998) entraîne une antinociception, alors que les injections faites en dehors des zones de régulation de la douleur n'ont aucun effet. De plus, l'inactivation de la moelle rostroventromédiale supprime l'analgésie (mais non les effets moteurs) produite par l'injection systémique de WIN 55,212-2. En particulier, des recherches ont confirmé que les cannabinoïdes agissaient directement sur des cellules spécialisées du RVM pour moduler la douleur en augmentant l'activité spontanée de cellules dénommées « off-cells » qui inhibent ainsi le message nociceptif (Meng & Johansen, 2004). C'est pourquoi l'injection d'URB597 et de WIN 55,212-2 au niveau de la substance grise périaqueducale provoque la stimulation des cellules « OFF »

du RVM causant une analgésie expliquée par une action sur les récepteurs CB₁ (Maione et coll., 2006). L'importance de la modulation des processus douloureux par les cannabinoïdes au niveau supraspinal a été rehaussée par la démonstration qu'une stimulation douloureuse périphérique entraîne une augmentation de la libération d'anandamide et de 2-AG au niveau de la substance grise périaqueducale (Walker et coll., 1999; Hohmann et coll., 2005; Suplita et coll., 2005) qui constitue l'un des sites supraspinaux les plus importants de la modulation de l'information nociceptive. C'est ainsi que la synthèse et l'utilisation par Hohmann et ses collaborateurs (2005) de l'URB602, un inhibiteur de la MGL, a permis d'augmenter les concentrations de 2-AG et d'anandamide au niveau de la substance grise périaqueducale par l'utilisation d'un modèle de stress induisant l'analgésie. Cette étude est donc la première à démontrer que la MGL constitue une nouvelle cible thérapeutique qui n'avait jamais été étudiée auparavant (Hohmann et coll., 2005). Par ailleurs, les niveaux cérébraux de 2-AG et d'anandamide sont augmentés dans des modèles animaux de lésions cérébrales chez la souris et le rat (Hansen et coll., 2001; Panikashvili et coll., 2001). Les niveaux d'anandamide et l'expression du récepteur CB₁ sont également augmentés suite à l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez le rat (Jin et coll., 2000; Berger et coll., 2004; Fowler et coll., 2005). De plus, le 2-AG protège la barrière hémato-encéphalique et inhibe l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 α et IL-6) après une atteinte cérébrale (Panikashvili et coll., 2005). Tous ces résultats montrent que les cannabinoïdes inhibent le déclenchement de la douleur par action sur les nocicepteurs à l'intérieur de circuits de modulation et de transmission de la douleur

bien distincts. En effet, les caractéristiques de l'antinociception impliquant les cannabinoïdes sont semblables à celles rencontrées par les opioïdes puisque tous les deux agissent au niveau spinal et supraspinal (Lichtman & Martin, 1991b; Lichtman et coll., 1996). Malgré ces ressemblances, les effets antinociceptifs des cannabinoïdes sont bien distincts de ceux produits par la morphine.

Enfin, le fait que l'administration intrathécale ou intracérébroventriculaire d'un antagoniste des récepteurs opioïdes- κ bloque les effets antinociceptifs du THC donné lui aussi par voie intrathécale suggère que les récepteurs opioïdes κ au niveau de la moelle épinière contribuent à l'antinociception induite par les cannabinoïdes (Smith et coll., 1994).

De plus, l'antinociception induite par les cannabinoïdes est due en partie à l'activation d'un mécanisme spinal noradrénergique descendant (Lichtman & Martin 1991a; Khodayar et coll., 2006). En effet, l'administration intrathécale de la yohimbine, un antagoniste α_2 -adrénergique, bloque les effets antinociceptifs du THC lorsqu'injecté de façon intraveineuse (Lichtman & Martin 1991a). L'échec de la yohimbine pour bloquer soit les effets cataleptiques soit l'hypothermie, tous deux induits par le THC, prouve que l'implication du système noradrénergique est relativement spécifique à l'antinociception. À l'inverse, il est peu probable dans ce contexte, que les récepteurs α_1 -adrénergique et la sérotonine jouent un rôle significatif (Lichtman & Martin 1991a). Ces résultats valident l'hypothèse, selon laquelle, la composante supraspinale impliquée dans l'antinociception induite par les cannabinoïdes fait intervenir un système spinal noradrénergique descendant.

2.3 Cannabinoïdes au niveau spinal et douleur

L'antinociception induite par l'administration spinale des cannabinoïdes exogènes a été étudiée de façon exhaustive. Des données supportent l'hypothèse selon laquelle l'analgésie induite par l'administration intrathécale de cannabinoïdes passe, en partie, par l'activation des récepteurs localisés au niveau de la moelle épinière (Martin & Lichtman, 1998; Richardson et coll., 1998b). Des études autoradiographiques ont identifiées des récepteurs cannabinoïdes au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière dans des régions recevant des informations nociceptives (Herkenham et coll., 1991). L'administration de cannabinoïdes prévient l'expression de c-fos (facteur de transcription utilisé comme marqueur de l'activité neuronale suite à un processus douloureux (Buritova & Besson, 1999)) dans la corne dorsale de la moelle épinière (Tsou et coll., 1996) et inhibe la décharge des neurones à large gamme réceptive «wide dynamic range neurons» (Hohmann et coll., 1995) en réponse à un stimulus douloureux. L'antinociception produite par l'administration intraveineuse ou intrathécale du CP 55,940, un cannabinoïde synthétique, persiste après la section de la moelle épinière (Lichtman & Martin, 1991b), ce qui indique une implication spinale importante et non une action exclusive des voies inhibitrices descendantes. Ces études démontrent collectivement l'implication spinale de l'analgésie produite par les cannabinoïdes. En effet, des études comportementales (Lichtman & Martin, 1991b; Smith & Martin, 1992), électrophysiologiques (Hohmann et coll., 1998; Hohmann et coll., 1999; Strangman & Walker, 1999) et neurochimiques (Tsou et coll.,

1996; Richardson et coll., 1998b) ont montré que les cannabinoïdes agissaient au niveau médullaire pour réguler la douleur. Par ailleurs, l'administration intrathécale de cannabinoïdes chez la souris entraîne de façon fiable une action antinociceptive (Lichtman et coll., 1992). Il a également été démontré que les endocannabinoïdes (anandamide et 2-AG) s'accumulent au niveau spinal chez des souris ayant subi une mutation neurodégénérative (Witting et coll., 2004). Des travaux de biodisponibilité montrent que les cannabinoïdes administrés par voie spinale ont tendance à rester au niveau du site d'action et ne sont pas rapidement redistribués vers le cerveau (Martin & Lichtman, 1998). Il est également possible que les endocannabinoïdes modulent l'effet de la sensibilisation centrale induite par le glutamate par l'intermédiaire des récepteurs NMDA (Richardson et coll., 1998a). Ainsi, il a été montré que l'administration intrathécale d'un antagoniste des récepteurs CB₁, le SR141716A, provoque une hyperalgésie thermique qui est bloquée par l'administration d'antagonistes des récepteurs NMDA (Richardson et coll., 1998a). L'administration de WIN 55,212-2 a inversé le mécanisme de l'allodynie et prévient l'apparition d'une immunoréactivité de type fos dans les neurones médullaires faisant suite à l'injection sous-cutanée de l'adjuvant de Freund (Martin et coll., 1999b). De plus, l'injection spinale de CP 55,940 est capable d'induire un effet antinociceptif dans les deux phases du test au formol (Khodayar et coll., 2006). De la même façon, l'administration intrathécale de WIN 55,212-2 a atténué l'hyperalgésie mécanique associée au modèle de douleur neuropathique par ligature partielle du nerf sciatique (Fox et coll., 2001) ou par ligature au niveau de la racine L5 (Bridges et coll., 2001). Finalement, une étude récente a

démonstré que l'analgésie spinale induite par le stress causé par des chocs continus (durée 3 minutes) au niveau de la patte des rats est régulée par les endocannabinoïdes (l'anandamide et le 2-AG) (Suplita et coll., 2006).

2.4 Cannabinoïdes au niveau périphérique et douleur

Des études ont démontré, d'un point de vue anatomique, la présence de récepteurs cannabinoïdes fonctionnels au niveau des ganglions de la racine dorsale (Millns et coll., 2001; Ross et coll., 2001; Walczak et coll., 2005). Ainsi, l'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* suggère que les cellules des ganglions de la racine dorsale peuvent synthétiser des récepteurs cannabinoïdes (Hohmann & Herkenham, 1999a) dont les évidences fonctionnelles démontrent que les récepteurs CB₁ sont transportés de façon axonale à partir de cet endroit jusqu'à la périphérie des terminaisons des neurones afférents primaires (Hohmann & Herkenham, 1999b). Le rôle des récepteurs cannabinoïdes impliqués dans l'analgésie périphérique a été étudié dans différents modèles animaux. Dans des modèles inflammatoires (injection de carragénine ou de formol) l'injection locale d'anandamide à des doses exemptes d'action systémique atténue l'hyperalgésie thermique et le comportement douloureux chez les rats (Calignano et coll., 1998; Richardson et coll., 1998c). Par ailleurs, l'anandamide et le PEA sont retrouvés en quantité suffisante dans la peau pour causer une activation locale des récepteurs cannabinoïdes (Calignano et coll., 1998). C'est ainsi que l'effet analgésique du PEA administré avant l'injection intraplantaire de formol (Calignano et coll., 1998; 2001) ou de carragénine (Conti et coll.,

2002) est inhibé par le SR144528 (antagoniste des récepteurs CB₂). De plus, l'injection locale de WIN 55,212-2 dans le modèle d'injection locale de carragénine (Nackley et coll., 2003b), de capsaïcine (Li et coll., 1999) et dans un modèle de douleur neuropathique (Fox et coll., 2001) produit un effet antihyperalgésique. Cet effet antihyperalgésique du WIN 55,212-2 est inhibé par les antagonistes des récepteurs CB₁ (SR141716A) et CB₂ (SR144528) (Nackley et coll., 2003b). Ces dernières données suggèrent donc l'implication des récepteurs cannabinoïdes (CB₁ et CB₂) dans la modulation de la douleur inflammatoire et neuropathique. L'administration d'agonistes spécifiques (HU-308, AM1241) pour les récepteurs CB₂ dans différents modèles de douleurs inflammatoires (carragénine ou capsaïcine) (Hanus et coll., 1999; Nackley et coll., 2003a; Hohmann et coll., 2004) ou thermique (laser chauffant) (Malan et coll., 2001) démontre que les récepteurs périphériques CB₂ peuvent moduler les processus nociceptifs. Ceci avait été constaté par l'administration du PEA lors d'études antérieures (Calignano et coll., 1998; 2001; Jaggar et coll., 1998). C'est pourquoi l'action analgésique périphérique des cannabinoïdes dans différents modèles animaux de douleur a été démontrée (Hohmann, 2002; Malan et coll., 2002 pour une revue de la littérature). Cette approche est très intéressante en soi, puisqu'elle permet le développement d'analgésiques de type cannabinoïde agissant localement et étant dépourvus des effets psychotropes centraux (Malan et coll., 2003).

2.5 Analgésie induite par les cannabinoïdes dans différents modèles animaux

Les cannabinoïdes se sont révélés efficaces dans pratiquement l'ensemble des modèles animaux utilisés jusqu'à présent. Plusieurs études comportementales ont démontré que les cannabinoïdes sont antinociceptifs dans des modèles animaux de douleur aiguë comme dans le test de la plaque chauffante, du test de retrait de la queue et de la pression appliquée sur une patte (Lichtman & Martin, 1991b; Martin et coll., 1996; Welch et coll., 1998), dans le test au formol (Tsou et coll., 1996; Calignano et coll., 1998; 2001) ainsi que dans le test à la carragénine (Richardson et coll., 1998c; Conti et coll., 2002; Nackley et coll., 2003a,b). Les cannabinoïdes produisent aussi de l'analgésie dans des modèles de douleurs inflammatoire et viscérale. Le modèle d'inflammation de la vessie (par la turpentine ou le NGF « Nerve Growth Factor ») révèle que l'anandamide ainsi que le PEA bloquent l'hyperalgésie associée à l'inflammation de la vessie chez le rat (Jagggar et coll., 1998; Farquhar-Smith et coll. 2002). La régulation à la hausse du récepteur CB₁ ainsi que le tonus de base des endocannabinoïdes inhibent la motilité intestinale dans les problèmes d'hypermotilité (Izzo et coll., 2001). Une hyperalgésie musculaire est provoquée par l'injection de carragénine dans le muscle triceps et cette hyperalgésie est renversée par le WIN 55,212-2 (Kehl et coll., 2003). Par ailleurs, le Δ^9 -THC produit une antinociception dans un modèle de douleur arthritique caractérisé par l'injection de l'adjuvant de Freund (Smith et coll., 1998). Les modèles de douleur neuropathique sont aussi soulagés par les





cannabinoïdes (Herzberg et coll., 1997; Bridges et coll., 2001; Fox et coll., 2001; Hohmann, 2002; Ibrahim et coll., 2003; Walczak et coll., 2005; 2006) ainsi que les modèles de douleur cancéreuse (Kehl et coll., 2003). Les cannabinoïdes sont donc efficaces dans les modèles de douleur aiguë, inflammatoire, viscérale, arthritique, neuropathique et cancéreuse, et ce, quelle que soit la voie d'administration utilisée.

2.5.1 Analgésie induite par les cannabinoïdes dans un modèle de douleur inflammatoire: le test au formol

Le test au formol est un modèle bien établi de douleur persistante à court terme caractérisée par deux phases. Une première phase est décrite comme l'activation aiguë des fibres A δ et C, puis la seconde phase est caractérisée par la réaction inflammatoire au niveau des tissus périphériques (Tjølsen et coll., 1992). Le comportement douloureux de l'animal suite à l'injection de formol est observé toutes les cinq minutes pour une période de soixante minutes. Pour chaque période de cinq minutes, le temps total que l'animal passe 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 III**). Le comportement douloureux est ensuite quantifié 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). Différentes études, utilisant le test au formol, ont démontré l'effet antinociceptif de l'anandamide et du

PEA (Calignano et coll., 1998; 2001; Jaggar et coll., 1998) ainsi que du WIN 55,212-2 (Tsou et coll., 1996) dans ce modèle de douleur inflammatoire. Ces résultats confirment le potentiel analgésique des ligands endogènes aux niveaux des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ situés en périphérie. Toutefois, il est intéressant de noter que l'injection périphérique d'anandamide et de PEA est retrouvée seulement dans les études de Calignano et collaborateurs en 1998 et en 2001. Ce dernier a démontré que l'injection locale d'anandamide est cent fois plus puissante pour prévenir le comportement douloureux lié au formol comparativement à son injection intraveineuse (Calignano et coll., 1998). Cette observation est très intéressante puisqu'elle permet de séparer les effets psychotropes centraux de l'action analgésique des cannabinoïdes agissant en périphérie lors de conditions inflammatoires. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier l'effet produit par l'injection locale d'anandamide et de 2-AG au niveau de la surface dorsale de la patte et de déterminer si cet effet possède des propriétés antinociceptives dans le test au formol. L'effet analgésique de l'administration locale d'anandamide et de 2-AG dans un modèle de douleur inflammatoire comporte sûrement un potentiel thérapeutique innovateur et laisse envisager des possibilités intéressantes quant à la modulation du système endocannabinoïde par des inhibiteurs de la FAAH ou de la MGL.

Tableau III : Les comportements observés chez l'animal après l'injection de formol. On caractérise les comportements observés à l'aide d'une cote de douleur standardisée.

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

Modifié d'après Watson et coll., 1997.

2.5.2 Analgésie induite par les cannabinoïdes dans un modèle de douleur neuropathique: lésion du nerf sciatique

Le modèle de douleur neuropathique de Seltzer consiste en la ligature partielle du nerf sciatique causant une neuropathie unilatérale (Seltzer et coll., 1990). Le nerf sciatique est

exposé proximal à la tête fémorale et 1/3 à 1/2 de la surface dorsale du nerf est ligaturé (**Figure 8**) (Seltzer et coll., 1990). 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. L'allodynie mécanique est évaluée au niveau de la surface plantaire de la patte avec des monofilaments de von Frey en utilisant des forces ascendantes pour ces derniers (Tal & Bennett, 1994). L'hyperalgésie thermique est déterminée en utilisant une source de chaleur radiante appliquée au niveau de la surface plantaire de la patte dont le temps de retrait de la patte est mesuré par un détecteur de mouvements (Hargreaves et coll., 1988). Dans des conditions de douleurs neuropathiques, le WIN 55,212-2 reverse l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie (Herzberg et coll., 1997; Bridges et coll., 2001; Lim et coll., 2003; Walczak et coll., 2005; 2006). D'autres expériences ont évalué l'effet antinociceptif de l'anandamide (Helyes et coll., 2003), de l'AM1241 qui est un agoniste des récepteurs CB₂ (Ibrahim et coll., 2003) et du CP 55,940 (Scott et coll., 2004), un agoniste des récepteurs CB₁ et CB₂ dans différents modèles de douleurs neuropathiques. Ces agonistes des récepteurs cannabinoïdes étaient donnés de façon intrathécale (Lim et coll., 2003; Scott et coll., 2004) ou de façon systémique (intrapéritonéale) (Herzberg et coll., 1997; Bridges et coll., 2001; Helyes et coll., 2003; Ibrahim et coll., 2003). Par ailleurs, dans les études neuropathiques décrites précédemment, il n'y a que dans l'étude d'Helyes et ses collaborateurs en 2003 que l'on a administré l'anandamide de façon systémique dans le modèle de Seltzer. L'emphase sera donc mise, plus particulièrement, sur les études

utilisant l'administration locale des agonistes des récepteurs cannabinoïdes et, de préférence, utilisant la ligature partielle du nerf sciatique. C'est ainsi que l'administration intraplantaire de WIN 55,212-2 renverse l'hyperalgésie mécanique du côté ipsilatéral (Fox et coll., 2001) dans le modèle de Seltzer. De plus, le JWH-133, qui est un agoniste des récepteurs cannabinoïdes CB₂, diminue la réponse mécanique des neurones à large gamme réceptive lorsqu'il est donné au niveau intraplantaire dans la ligature du nerf spinal (Elmes et coll., 2004). Par ailleurs, l'administration locale d'anandamide dans un modèle de douleur neuropathique comme celui de Seltzer pourrait possiblement renverser l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique. Ces différentes études démontrent que le soulagement de la douleur est produit par l'activation des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ situés en périphérie. Cependant, aucune étude n'a évalué l'effet antinociceptif d'un endocannabinoïde comme l'anandamide dans un modèle de douleur neuropathique. Une augmentation des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ au niveau de la périphérie (patte) ainsi que des ganglions de la racine dorsale a été observée dans un modèle de douleur neuropathique impliquant le nerf saphène (Walczak et coll., 2005). Cette implication des récepteurs cannabinoïdes au niveau de la douleur neuropathique a également été corroborée par Sagar et collaborateurs en 2005. De plus, une étude récente a démontré que l'induction d'une neuropathie (utilisant la ligature du nerf spinal) engendre une augmentation des récepteurs cannabinoïdes et de leurs ligands endogènes (anandamide et 2-AG) du côté ipsilatéral au niveau des ganglions de la racine dorsale (Mitrirattanakul et coll., 2006). Ces résultats sont en accord avec l'effet analgésique des cannabinoïdes observé dans les

différents modèles de douleurs neuropathiques décrits précédemment et permettent d'envisager le développement de nouvelles possibilités thérapeutiques concernant l'administration périphérique des endocannabinoïdes afin de soulager les douleurs neuropathiques. La modulation du système endocannabinoïde par l'inhibition de son catabolisme en utilisant une approche périphérique optimiserait le soulagement des douleurs neuropathiques en évitant les effets délétères centraux liés à l'administration centrale ou systémique.

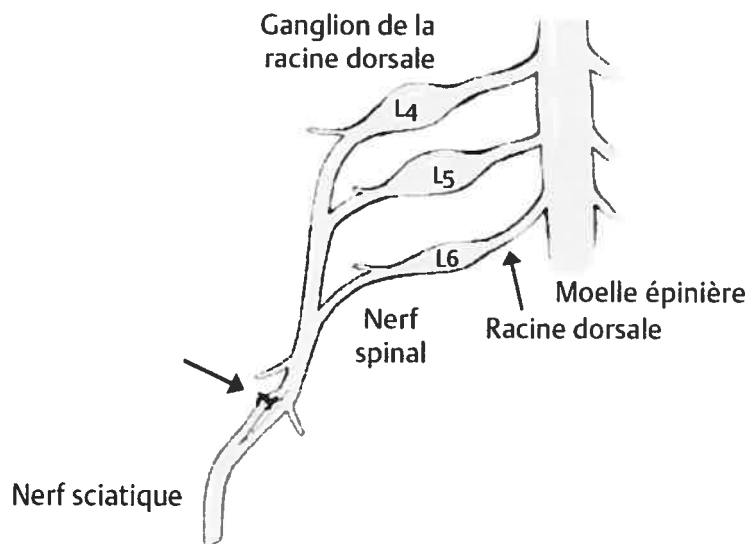
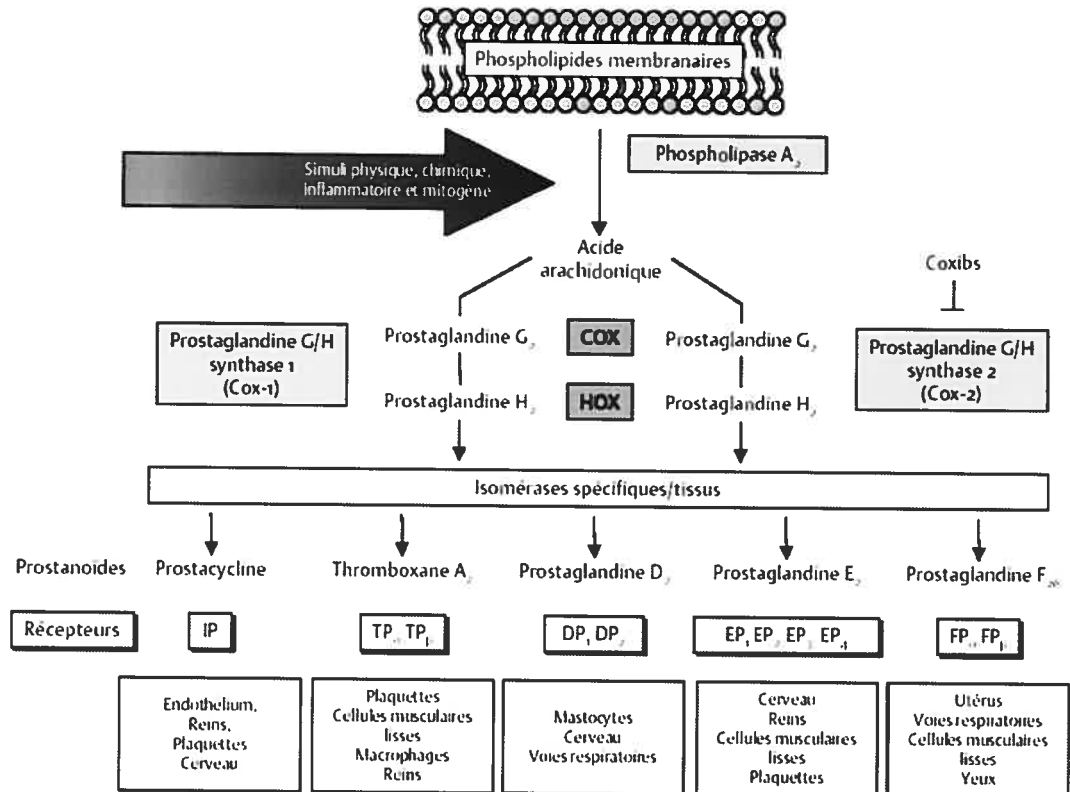


Figure 8 : Modèle de Seltzer: dans ce modèle, le nerf sciatique est scindé dans le sens longitudinal, puis le tiers ou la moitié des fibres nerveuses sont ligaturées.

III. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

3.1 Généralités

La synthèse des prostaglandines par l'action des cyclooxygénases (COX) sur l'acide arachidonique provenant des phospholipides membranaires est inhibée par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (**Figure 9**). Cette synthèse a longtemps été associée à l'inflammation périphérique et à la douleur (Vane, 1971). Il existe deux iso-enzymes des COX: la COX-1 qui est exprimée de façon constitutive et assure l'homéostasie des fonctions physiologiques, ainsi que la COX-2 qui est induite par différents stimuli de l'inflammation (Picot et coll., 1994; Dirig et coll., 1997). Cependant, l'expression constitutive de la COX-2 a également été démontrée au niveau du cerveau (Breder et coll., 1995) et de la moelle épinière (Beiche et coll., 1996). Par ailleurs, l'existence possible d'une troisième enzyme inhibant les COX a été suggérée, mais il n'y a pas eu de consensus sur le sujet à l'heure actuelle (Chandrasekharan et coll., 2002).



Modifié d'après FitzGerald & Patrono, 2001.

Figure 9 : Production et action des prostaglandines. L'acide arachidonique, un acide gras de 20 atomes de carbone et possédant quatre double liaisons, est libéré à partir de l'action de la phospholipase A₂ sur les phospholipides membranaires à la suite de divers stimuli. L'acide arachidonique est alors converti par des prostaglandines G et H synthases. Les synthases sont appelées classiquement cyclooxygénases et existent sous deux formes, la cyclooxygénase-1 (COX-1) et la cyclooxygénase-2 (COX-2). Abréviations: IP, récepteur de la prostacycline; TP, récepteur du thromboxane; DP, récepteur de la prostaglandine D₂; EP, récepteur de la prostaglandine E₂; FP, récepteur de la prostaglandine F_{2α}.

Plus récemment, l'action spinale des prostaglandines a été établie à la suite de trois observations: l'administration spinale des inhibiteurs des COX (voir **tableau IV** pour une présentation des inhibiteurs non-spécifiques et spécifiques pour les COX-1 ou les COX-2) engendre un effet antinociceptif dans un modèle de douleur inflammatoire (Malmberg & Yaksh, 1992), l'administration de prostaglandines au niveau spinal provoque de l'hyperalgésie (Uda et coll., 1990) et l'inflammation périphérique augmente la libération spinale de prostaglandines (Malmberg & Yaksh, 1995).

Tableau IV : Les inhibiteurs sélectifs ou non-sélectifs des cyclooxygénases.

Inhibiteurs non-sélectifs des COX	Inhibiteurs des COX-1	Inhibiteurs des COX-2
>diclofénac >indométhacine >piroxicam >ibuprofène >aspirine* >naproxène	>resvératrol >kétorolac >flurbiprofène >kétoprofène	>lumiracoxib >nimésulide >méloxicam >rofécoxib >célécoxib >SC-236 >NS-398 >étodolac
*L'aspirine cause une inactivation irréversible des COX.		

3.2 Effet antinociceptif des AINS dans des modèles inflammatoires

Les AINS exercent leur action antinociceptive par un mécanisme bien connu d'inhibition de la synthèse des prostaglandines au niveau du site périphérique d'inflammation (Taiwo & Levine, 1990). En effet, il a été démontré que l'administration locale d'un inhibiteur non-sélectif des COX (diclofénac) (Torres-Lopez et coll., 2002), d'un inhibiteur spécifique de la COX-1 (resvératrol) (Torres-Lopez et coll., 2002) ou d'inhibiteurs spécifiques de la COX-2 (lumiracoxib, nimésulide, méloxicam) (Islas-Cadena et coll., 1999; Aguirre-Banuelos & Granados-Soto, 2000; Lozano-Cuenza et coll., 2005) produit un effet antinociceptif dans le test au formol. Il a également été observé que l'administration locale d'inhibiteurs non-spécifiques des COX (indométhacine, piroxicam), de kétorolac (inhibiteur spécifique de la COX-1) (Francischi et coll., 2002; Ma & Eisenach, 2003b) ou d'inhibiteurs spécifiques pour la COX-2 (rofécoxib, célécoxib, SC236) (Francischi et coll., 2002) reverse l'hyperalgésie causée par la carragénine. Par ailleurs, l'administration orale ou intrathécale d'indométhacine ou de célécoxib diminue le comportement douloureux lors du test au formol (Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 2002). De plus, le rofécoxib et le NS-398, tous deux des inhibiteurs spécifiques de la COX-2, ainsi que l'indométhacine et le diclofénac diminuent le comportement douloureux dans le test au formol (Euchenhofer et coll., 1998; Sandrini et coll., 2002; Choi et coll., 2003). En effet, la COX-2, exprimée de façon constitutive au niveau spinal, causerait une augmentation de la synthèse de prostaglandines

donc initierait l'hyperalgésie suivant l'inflammation périphérique (Ghilardi et coll., 2004). Toutefois, il est important de noter que l'effet antinociceptif produit par les inhibiteurs spécifiques pour la COX-2 reste controversé comparativement à celui produit par les inhibiteurs non-spécifiques des COX (Dirig et coll., 1997; Veiga et coll., 2004).

3.2.1 Effet antinociceptif de la combinaison des endocannabinoïdes avec les AINS dans des modèles inflammatoires

La modulation du système endocannabinoïde par différents composés provoque un intérêt grandissant (Piomelli et coll., 2000). En effet, il a été suggéré que l'activité de la FAAH est inhibée par les AINS tels que l'ibuprofène, le kétorolac et le flurbiprofène (Fowler et coll., 1997; 1999). Cependant, la littérature concernant l'effet antinociceptif de la combinaison d'un cannabinoïde avec un AINS est très peu documentée. Il a été démontré que l'injection intrathécale d'indométhacine (Gühring et coll., 2002) ou de flurbiprofène (Ates et coll., 2003) produit un effet antinociceptif dans le test au formol. Cet effet est inhibé par un antagoniste des récepteurs CB₁ et absent chez des souris dont le gène pour le récepteur CB₁ a été invalidé. Il a également été montré que l'indométhacine administrée de façon systémique engendre un effet anti-inflammatoire (test à la carragénine) (Holt et coll., 2005) et que l'acétaminophène donné per os produit un effet analgésique (test de la plaque chauffante) (Ottani et coll., 2006). L'effet anti-inflammatoire est dépendant des récepteurs CB₂ (enrayé par SR144528) (Holt et coll., 2005) et l'effet analgésique est lié au récepteur CB₁ (renversé par AM281 et SR141716A) (Ottani et coll., 2006). En plus, le flurbiprofène

inhibe la libération de CGRP induite par la capsaïcine au niveau spinal et cette inhibition est renversée par un antagoniste des récepteurs CB₁ (AM251) (Seidel et coll., 2003). De plus, l'administration orale de palmitoylethanolamide (Lo Verme et coll., 2005a) et d'indométhacine (Conti et coll., 2002) a montré des propriétés anti-œdémateuses et anti-inflammatoires dans un modèle d'inflammation aiguë. Par ailleurs, aucune des études précédentes n'a étudié l'effet produit suite à la combinaison d'un endocannabinoïde avec les AINS (spécifiques ou non) dans un modèle de douleur inflammatoire. Ainsi, il serait pertinent de connaître les effets engendrés par cette combinaison et de définir l'implication possible des récepteurs cannabinoïdes et/ou d'autres récepteurs.

3.3 Effet antinociceptif des AINS dans des modèles neuropathiques

Il a été montré que l'injection locale (intraplantaire) de kétorolac du côté ipsilatéral suite à la ligature partielle du nerf sciatique (Seltzer et coll., 1990) renverse l'allodynie tactile (Ma & Eisenach, 2002). Les auteurs ont aussi observé que les effets anti-allodyniques produits par l'injection locale de kétorolac sont associés à une abondance de cellules réagissant à la COX-2 du côté des nerfs lésés donc causant une régulation à la hausse des COX-2 (Ma & Eisenach, 2003b). Cet effet anti-allodynique du kétorolac injecté localement est retrouvé dans différents modèles de douleurs neuropathiques (ligature partielle du nerf sciatique, constriction du nerf sciatique (Bennett & Xie, 1988), ligature du nerf spinal (Kim & Chung, 1992)) et semble durer plus longtemps lorsqu'administré dans les premières semaines

suivant la lésion (Ma & Eisenach, 2003a). Une autre étude a prouvé que l'injection sous-cutanée d'indométhacine au niveau de la patte opérée réduit l'hypersensibilité mécanique de façon prolongée pour une période de dix jours dans un modèle de douleur neuropathique (Syriatowicz et coll., 1999). De plus, l'injection unique de kétorolac au niveau intrathécal réduit de façon significative l'allodynie mécanique pendant six jours (Ma et coll., 2002) dans le modèle de Seltzer et réduit l'hypersensibilité thermique dans le modèle de Bennett (Parris et coll., 1996). Par ailleurs, le NS-398 renverse significativement l'allodynie tactile lors d'administration intrathécale (Ma et coll., 2002). Ces résultats sont corroborés par l'administration orale d'étodolac (inhibiteur spécifique de la COX-2) qui diminue l'hyperalgésie thermique également dans un modèle de douleur neuropathique (Suyama et coll., 2004). De façon contradictoire, une étude utilisant le rofécoxib a suggéré que ce dernier ne modifie pas le développement de l'allodynie et de l'hyperalgésie suite à son injection systémique dans la douleur neuropathique (Broom et coll., 2004). Ces différentes études démontrent l'importance de la synthèse de prostaglandines au niveau local et spinal dans le maintien de l'hypersensibilité suivant une insulte nerveuse sans toutefois arriver à un consensus quant à l'implication de la COX-2 dans le développement de l'allodynie et de l'hyperalgésie (Broom et coll., 2004; Suyama et coll., 2004). Il serait donc intéressant d'étudier les effets de l'administration locale d'inhibiteurs non-spécifiques des COX et sélectifs des COX-2, dans un modèle de douleur neuropathique, afin de confirmer ou d'infirmes les études précédentes sur le sujet.

3.3.1 Effet antinociceptif de la combinaison des endocannabinoïdes avec les AINS dans des modèles neuropathiques

L'effet analgésique de la combinaison d'un cannabinoïde avec un AINS est très peu décrit dans la littérature tel qu'il a été mentionné précédemment (Conti et coll., 2002; Gühring et coll., 2002; Ates et coll., 2003) dans des conditions inflammatoires. Aucune étude n'a évalué les effets engendrés par la combinaison d'un endocannabinoïde avec les AINS dans un modèle de douleur neuropathique. Les effets de cette combinaison pourraient renverser l'allodynie et/ou l'hyperalgésie et impliqueraient possiblement les récepteurs cannabinoïdes. Toutefois, aucun laboratoire n'a encore étudié l'effet antinociceptif probable de la combinaison d'un endocannabinoïde avec les AINS dans un modèle de lésion nerveuse.

IV. Problématique et hypothèses de recherche

La modulation du système endocannabinoïde constitue une voie thérapeutique très intéressante. D'ailleurs, très peu d'études, jusqu'à maintenant, ont étudié cette avenue comportant des possibilités innovatrices pour la recherche médicale quant à l'amélioration et le traitement des douleurs chroniques. La problématique de cette thèse est d'étudier au niveau périphérique la modulation du système cannabinoïde endogène par l'inhibition des enzymes (FAAH et MGL) dégradant les endocannabinoïdes tels que l'anandamide et le 2-AG en utilisant, respectivement, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (ibuprofène et rofécoxib) et un bloqueur spécifique de la MGL (URB602) dans un modèle de douleur inflammatoire (le test au formol) et neuropathique (lésion du nerf sciatique (modèle de Seltzer)). L'inhibition de la dégradation des endocannabinoïdes par les AINS ou l'URB602 augmenterait les niveaux d'endocannabinoïdes causant une analgésie secondaire à cette augmentation. Cet effet antinociceptif pourrait s'expliquer par une action au niveau des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et/ou CB₂ ou bien des récepteurs TRPV1.

V. Objectifs

La modulation du système endocannabinoïde par l'inhibition des enzymes dégradant les cannabinoïdes endogènes (anandamide et 2-AG) en utilisant les AINS ou un bloqueur synthétique de la MGL constitue l'objectif principal de cette thèse. Il s'agit donc de:

- ❖ Déterminer si cette modulation augmenterait les niveaux d'endocannabinoïdes et produirait un effet analgésique dans des modèles de douleurs: inflammatoire (test au formol) et neuropathique (lésion du nerf sciatique);
- ❖ Étudier les interactions entre les endocannabinoïdes et les AINS afin d'établir une éventuelle potentialisation en terme d'addition ou de synergie d'effet;
- ❖ Établir l'existence ou non d'une différence entre les AINS non-spécifiques pour les COX (ibuprofène) de ceux spécifiques pour la COX-2 (rofécoxib) interagissant avec les endocannabinoïdes;
- ❖ Confirmer que cette modulation du système endocannabinoïde est bien périphérique par l'évaluation de l'analgésie controlatérale et, aussi, par la détermination des concentrations locales des cannabinoïdes endogènes dans un modèle de douleur inflammatoire (test au formol);
- ❖ Définir les mécanismes par lesquels l'inhibition de la dégradation du système endocannabinoïde produit son action c'est-à-dire par l'activation des récepteurs CB₁ et/ou CB₂ ou des récepteurs TRPV1.

Les résultats sont retrouvés dans les trois premiers articles traitant de la douleur inflammatoire et, dans le quatrième article discutant de la douleur neuropathique.

VI. Articles

6.1 Article 1 publié dans *Pain*

“Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain”

Short running title: Local interaction between anandamide and ibuprofen

Josée Guindon¹, André De Léan¹ & 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

*Author for Correspondence: Pierre Beaulieu, Department of Anesthesiology, CHUM – Hôtel-Dieu, 3840 rue St-Urbain, Montréal, H2W 1T8, Québec, Canada

Tel: (1) 514-890-8000 ext. 14570

Fax: (1) 514-412-7222

E-mail: pierre.beaulieu@umontreal.ca

6.1.0 Abstract

Anandamide, an endocannabinoid, is degraded by the enzyme fatty acid amide hydrolase which can be inhibited by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). The present work was designed to study the peripheral interactions between anandamide and ibuprofen (a non-specific cyclooxygenase inhibitor) in the rat formalin test. We first determined the ED_{50} for anandamide ($0.018 \mu\text{g} \pm 0.009$), ibuprofen ($0.18 \mu\text{g} \pm 0.09$) and their combination ($0.006 \mu\text{g} \pm 0.002$). Drugs were given 15 min before a 2.5% formalin injection into the dorsal surface of the right hind paw. Results were analyzed using isobolographic analysis. The antinociceptive interaction between anandamide and ibuprofen was synergistic. To further investigate the mechanisms by which the combination of anandamide with ibuprofen produced their antinociceptive effects, we used specific antagonists for the cannabinoid CB_1 (AM251; $80 \mu\text{g}$) and CB_2 (AM630; $25 \mu\text{g}$) receptors. We demonstrated that the antinociceptive effects of ibuprofen were not antagonized by either AM251 or AM630 and that those of anandamide were antagonized by AM251 but not by AM630. The synergistic antinociceptive effects of the combination of anandamide with ibuprofen were completely antagonized by AM251 but only partially inhibited by AM630. In conclusion, locally (hind paw) injected anandamide, ibuprofen or combination thereof, decreased pain behavior in the formalin test. The combination of anandamide with ibuprofen produced synergistic antinociceptive effects involving both cannabinoid CB_1 and CB_2 receptors. Comprehension of the mechanisms involved needs further investigation.

Key words: anandamide; ibuprofen; endocannabinoids; cannabinoid receptors; fatty acid amide hydrolase; nonsteroidal anti-inflammatory drugs; cyclooxygenase inhibitors; formalin test; inflammatory pain.

6.1.1 Introduction

Δ^9 -tetrahydrocannabinol, the principal active ingredient of cannabis, produces its effect by binding to G protein-coupled receptors, identified as the cannabinoid CB₁ (Matsuda et al., 1990) and CB₂ receptors (Munro et al., 1993). Cannabinoid CB₁ receptors are localized primarily in the central nervous system including the spinal cord and dorsal root ganglia and in the periphery (Rice et al., 2002 for review). Cannabinoid CB₂ receptors are mainly expressed in immune tissues (Galiègue et al., 1995). Endogenous cannabinoid ligands (or endocannabinoids) such as anandamide (arachidonylethanolamide), a cannabinoid CB₁ receptor agonist, were also identified (Devane et al., 1992). Anandamide is produced following intracellular cleavage of N-arachidonylphosphatidylethanolamine by phospholipase D, which indicates that anandamide is synthesized on demand instead of being stored in synaptic vesicles (Piomelli et al., 1998). Furthermore, anandamide is hydrolyzed into arachidonic acid and ethanolamine by a membrane-bound enzyme named fatty acid amide hydrolase (FAAH) (Cravatt et al., 1996).

Anandamide can act in the periphery to attenuate pain behavior. Indeed, when injected into the ipsilateral hind paw of the rat, anandamide reduced hyperalgesia induced by carrageenan (Richardson et al., 1998) or pain induced by formalin injection (Calignano et al., 1998). Those studies showed that pain relief was produced by the activation of peripheral CB₁ and CB₂ receptors. Other authors have demonstrated the peripheral mechanisms involved against persistent somatic inflammatory pain (Ko & Woods, 1999; Johanek et al., 2001; Malan et al., 2001; Nackley et al., 2003). For a review of the role of

CB₁ and CB₂ receptors in mediating peripheral analgesia, see Hohmann (2002) and Malan (2002), respectively.

The therapeutic utility of using compounds that would modulate the endocannabinoid system is beginning to attract more interest (Piomelli et al., 2000). For example, FAAH activity is inhibited by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as ibuprofen, ketorolac and flurbiprofen (Fowler et al., 1997; 1999). Furthermore, NSAIDs may also act locally to decrease pain perception (Islas-Cadena et al., 1999; Aguirre-Banuelos & Granados-Soto, 2000; Torres-Lopez et al., 2002).

Very little is available in the literature concerning the antinociceptive effects of the combination of a cannabinoid with an NSAID. A group of researchers has shown that intrathecal indomethacin (Gühring et al., 2002) or flurbiprofen (Ates et al., 2003) was antinociceptive in the formalin test in the rat. This effect was antagonized by a cannabinoid CB₁ antagonist and was also not present in CB₁ knockout mice. Furthermore, orally administered palmitoylethanolamide (a putative endocannabinoid) and indomethacin have demonstrated anti-edema and anti-inflammatory properties in a rat model of acute inflammation (Conti et al., 2002).

Therefore, the present study was designed to investigate the local (hind paw) antinociceptive effects of anandamide, ibuprofen (non-specific cyclooxygenase (COX) inhibitor) and their association in a test of acute and inflammatory pain. The mechanisms by which the combination of anandamide with an NSAID was able to produce its

antinociceptive effect were also investigated by using specific antagonists for the cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors.

6.1.2 Methods

6.1.2.1 Animals

This research protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the Université de Montréal and all procedures conformed to the guidelines of the Canadian Council for Animal Care. Male Wistar rats (Charles River, St-Constant, Québec, Canada), 180-220 g at the time of testing were housed in standard plastic cages with sawdust bedding in a climate-controlled room on a 12-h light/dark cycle. Animals were allowed free access to food pellets and water.

6.1.2.2 Drug administration

Anandamide, an endogenous cannabinoid, is an agonist with a four-fold selectivity for the CB₁ receptor ($K_i = 89\text{nM}$) over the CB₂ receptor ($K_i = 371\text{nM}$) and was purchased already in a liquid form in water-dispersible emulsion and further dissolved in normal saline (0.9% NaCl in water) (Pertwee et al., 1999; Ross et al., 2001). 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% dimethyl sulfoxide (DMSO), respectively. Anandamide, AM251 and AM630 were

purchased from Tocris (Ellisville, MO, USA). Ibuprofen (Sigma, St-Louis, USA) a non-specific COX inhibitor was dissolved in normal saline.

6.1.2.3 Formalin test

The formalin test is a well-established model of persistent pain characterized by two phases. The first phase is described as an acute activation of C and A δ fibres and the second phase as an inflammatory reaction in peripheral tissue (Tjølsen et al., 1992). Rats were acclimatized to the testing environment (clear Plexiglass box 29 x 29 x 25 cm) during 15 min or until cessation of explorative behavior. Anandamide (0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 1 or 5 μ g in 50 μ L), ibuprofen (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 2 or 10 μ g in 50 μ L), AM251 (80 μ g in 50 μ L) and AM630 (25 μ g in 50 μ L) were injected subcutaneously (s.c.) on the dorsal surface of the right hind paw 15 min before the injection of 2.5% formalin (50 μ L) next to the previous injection. Following each injection, the rat was immediately put back in the observation chamber. Nociceptive behavior was observed with the help of a mirror angled at 45° below the observation chamber. Observation of the animal's behavior was made in consecutive 5-min periods for 60 min following formalin administration. In each 5-min period, the total time the animal spent in three different behavioral 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 behavior 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 behavioral 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 acute phase (0-15 min) and the inflammatory phase (15-50 min) using the trapezoidal rule.

6.1.2.4 Protocol

The experiments were conducted in a randomized and blinded manner by the same experimenter. In a first study, the dose-response curves for anandamide, ibuprofen and the combination of these two drugs at a fixed 1 to 10 observed ratio given as a total dose and further diluted 3, 10, 30 and 100 times were determined using the data from the inflammatory phase. In a second study, the antinociceptive effects of anandamide were compared under two conditions: absence (0.9% NaCl in water) and presence of ibuprofen at their ED₅₀ doses. In a third experiment, the effects of ibuprofen, anandamide and their combination (at ED₅₀ doses) were studied in absence of cannabinoid antagonists (saline condition), in presence of AM251 (80 µg; Malan et al., 2001) and in presence of AM630 (25 µg; Malan et al., 2001). For the first two studies (n = 6 for each group) and in the third study (n = 4 per group), the tested drugs were dissolved in the same total volume (50 µL) and administered in the right hind paw. Preliminary experiments in the formalin test (n = 4) have shown that there was no difference in pain behavior between 0.9% NaCl in water and 0.9% NaCl in water with 8% DMSO (data not shown). Therefore, normal saline was used as the control solution.

Finally, in order to exclude any possible systemic effect of the drugs, 0.1 µg of anandamide and 2 µg of ibuprofen were administered s.c. on the dorsal surface of the contralateral (left hind paw) or ipsilateral paws (n = 6 per group).

6.1.2.5 Paw edema

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

6.1.2.6 Statistical analysis

Pain behavior for each treatment group was expressed as mean \pm s.e.mean. The dose-response curves for anandamide, ibuprofen and their combination were determined by simultaneous analysis using ALLFIT software (De Léan et al., 1978). Interactions between anandamide and ibuprofen were performed using isobolographic analysis as described by Tallarida et al. (1997) and Grabovsky & Tallarida (2004). The theoretical additive ED_{50} was calculated for the combination of drugs based on the individual ED_{50} and the fixed dose ratio (1:10). For the statistical estimation of the difference between the experimentally derived potency and the theoretical additive counterpart, a *t*-test was used based on known ED_{50} s and standard errors. In the second study, the antinociceptive effects of anandamide in absence or presence of ibuprofen were assessed for significance using a 2 x 2 factorial ANOVA (Figure 1A). In the third study, the antinociceptive effects of ibuprofen, anandamide and their combination under three experimental conditions (saline, AM251 and AM630) were assessed for significance using a 2 x 2 x 3 factorial ANOVA for parallel groups (Winer, 1971) (Figure 1B). To compare ipsi- vs. contralateral paw injections of the

drugs, an ANOVA adapted for factorial experimental design was used. The different components of the total variation were settled *a priori* using the multiple regression analysis described by Draper and Smith (1998). The critical level of significance was set at 5% ($P < 0.05$).

6.1.3 Results

6.1.3.1 Analgesic effects of anandamide and ibuprofen

Anandamide, ibuprofen and their combination decreased pain behavior in the formalin test with ED_{50} of $0.018 \mu\text{g} \pm 0.009$, $0.18 \mu\text{g} \pm 0.09$ and $0.006 \mu\text{g} \pm 0.002$, respectively (Figure 2A), and the theoretical additive ED_{50} point was 0.098 ± 0.033 (Figure 2B). Pain behavior following injection of the drugs in the contralateral hind paw was not statistically different when compared with the control group [$F(1,15) = 0.79$ and 0.15 for the acute and inflammatory phases, respectively] (Figure 3).

The dose-response curve for anandamide-ibuprofen combination was shifted to the left, away from the anandamide and ibuprofen curves. Isobolographic analysis showed an overall synergistic effect of the combination (t -test = 5.68, $P < 0.001$) (Figure 2A and 2B). When given locally (dorsal surface of the paw) at ED_{50} doses, anandamide and ibuprofen produced a significant antinociceptive effect either in the acute (Figure 4A, 4B) [$F(1,20) = 14.49$, $P < 0.01$ and 7.08 , $P < 0.05$] or the inflammatory (Figure 4A, 4C) phase [$F(1,20) = 44.38$ and 37.26 , $P < 0.001$] of the formalin test.

6.1.3.2 Paw edema

Edema of the injected paw did not differ significantly among the groups [$F(3,20) = 1.23$]: neither anandamide [$F(1,20) = 0.99$] nor ibuprofen [$F(1,20) = 2.70$] influenced paw oedema (Figure 4D).

6.1.3.3 Effects of cannabinoid antagonists on an anandamide-ibuprofen combination

6.1.3.3.1 Acute phase

The effects of anandamide, ibuprofen and their combination differed significantly [$F(2,36) = 13.32, P < 0.001$] between saline, AM251 and AM630 conditions (Figure 5).

In saline condition, antinociceptive effects of anandamide [$F(1,36) = 17.72, P < 0.001$] and ibuprofen [$F(1,36) = 14.57, P < 0.001$], administered at ED_{50} doses, were found and their combination encompassed the addition of their individual antinociceptive effects [$F(1,36) = 3.16$, non-significant].

In the AM251 condition, no antinociceptive effect of anandamide was observed [$F(1,36) = 0.02$, non-significant]. However, an antinociceptive effect of ibuprofen was found [$F(1,36) = 8.52, P < 0.01$] but complete inhibition of the ibuprofen antinociception was observed with the anandamide-ibuprofen combination [$F(1,36) = 20.66, P < 0.001$].

In the AM630 condition, antinociceptive effects of anandamide [$F(1,36) = 13.63, P < 0.001$] and ibuprofen [$F(1,36) = 13.97, P < 0.001$] were determined but partial inhibition of

these antinociceptive effects was observed with the combination of anandamide with ibuprofen [$F(1,36) = 4.33, P < 0.05$].

6.1.3.3.2 Inflammatory phase

The effects of anandamide, ibuprofen and their combination differed significantly [$F(2,36) = 5.13, P < 0.05$] between saline, AM251 and AM630 conditions (Figure 6).

In saline condition, antinociceptive effects of anandamide [$F(1,36) = 39.15, P < 0.001$] and ibuprofen [$F(1,36) = 36.85, P < 0.001$], administered at ED_{50} doses, were found and their combination encompassed the addition of their individual antinociceptive effects [$F(1,36) = 0.1$; non-significant].

In the AM251 condition, no antinociceptive effect of anandamide was observed [$F(1,36) = 0.67$, non-significant]. However, the antinociceptive effect of ibuprofen [$F(1,36) = 5.09, P < 0.05$] was still present but a complete inhibition of the ibuprofen effect was observed with the anandamide-ibuprofen combination [$F(1,36) = 14.77, P < 0.001$].

In the AM630 condition, antinociceptive effects of anandamide [$F(1,36) = 25.22, P < 0.001$] and ibuprofen [$F(1,36) = 12.62, P < 0.01$] were found but partial inhibition of these antinociceptive effects was observed with the combination of anandamide with ibuprofen [$F(1,36) = 7.74, P < 0.01$].

6.1.3.3.3 Paw edema

Edema of the injected paw did not differ significantly among the groups [$F(11,36) = 1.39$]: neither ibuprofen [$F(1,36) = 0.22$], nor anandamide [$F(1,36) = 0.59$], nor the condition [$F(2,36) = 2.47$] factors (cannabinoid antagonists) influenced paw edema.

6.1.4 Discussion

We hypothesized that the peripheral antinociceptive effects of anandamide are potentiated by its administration with an NSAID. Indeed, the enzymatic hydrolysis of anandamide by FAAH is blocked by ibuprofen, ketorolac and flurbiprofen (but not by others such as ketoprofen or naproxen) so that anandamide is not hydrolyzed, and thus, present in greater amounts (Fowler et al., 1997; 1999). Another mechanism that would also explain the higher concentration of anandamide is the possibility of a shift of arachidonic acid metabolism towards endocannabinoid synthesis in response to COX inhibition (Malmberg & Yaksh, 1992; Gühring et al., 2002; Ates et al., 2003; Seidel et al., 2003). A third alternative, given the fact that COX-2 can metabolize anandamide at least *in vitro* (Kozak et al., 2003), is that NSAIDs can also act by preventing COX-2 removal of anandamide and thereby allow its build-up. Therefore, we used ibuprofen to test its analgesic interaction with anandamide.

We report that anandamide and ibuprofen displayed antinociceptive effects in the formalin test when injected in the paw of rats and that their combination was synergistic. These effects were locally mediated and not systemic as anandamide and ibuprofen given in the

contralateral paw were not antinociceptive at doses higher than the ED₅₀ doses used in the ipsilateral paw. Finally, it is suggested that the combination of anandamide and ibuprofen produces an antinociceptive effect for which cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors may be involved.

6.1.4.1 Antinociceptive effects of the combination of cannabinoids with NSAIDs

The putative endocannabinoid, palmitoylethanolamide, and indomethacin given orally have demonstrated anti-edema and anti-inflammatory properties in a rat model of acute inflammation (Conti et al., 2002). The authors demonstrated that a cannabinoid CB₂ antagonist (SR144528) inhibited the anti-edema and anti-hyperalgesic effects of palmitoylethanolamide but also those of nabilone, a synthetic analog of Δ^9 -THC which has the same affinity for CB₁ and CB₂ receptors. Furthermore, Gühring et al. (2002) have shown that intrathecal indomethacin was antinociceptive in the formalin test in the rat and that this effect was antagonized by AM251. In the same study, the authors showed that intrathecal indomethacin was ineffective in CB₁ knockout mice. The same team showed similar results using intrathecal flurbiprofen, the antinociceptive effect of which was also antagonized by AM251 (Ates et al., 2003). Furthermore, Gühring et al. (2002) reported that pain-related behavior in the formalin test was similar in COX wild type, COX1^{-/-} and COX2^{-/-} mice suggesting that COX inhibition is not the only mechanism that could explain the effects of NSAIDs. They concluded that endocannabinoids play a major role in mediating NSAIDs-induced antinociception at the spinal level.

These findings seem at first in contradiction with our results in the periphery because the antinociceptive effects of ibuprofen given alone were not reversed by AM251 or by AM630. However, in the presence of anandamide, ibuprofen antinociceptive effects were lost in the presence of CB₁ or CB₂ receptor antagonists. Thus, we cannot explain the antinociceptive properties of ibuprofen solely by its inhibition of COX and an interaction with the cannabinoid system is likely. However, the exact mechanism of this interaction is not clear at present.

Our hypothesis on the presence of anandamide locally in greater amounts after NSAIDs inhibition of FAAH (and COX-2) activity seems valid as we obtained a synergistic analgesic effect from the combination of anandamide with an NSAID as defined in the isobolographic analysis.

6.1.4.2 Local (hind paw) antinociceptive effect of cannabinoids and endocannabinoids

In this study, local administration of anandamide produced a significant reduction in pain behavior which was abolished by a CB₁ but not a CB₂ cannabinoid receptor antagonist. These findings are consistent with the ability of endocannabinoids to reduce hyperalgesia in rodent models of acute inflammation (Mazzari et al., 1996; Jaggar et al., 1998; Richardson et al., 1998; Hanus et al., 1999; Calignano et al., 1998; 2001). Anandamide was reported to be 100 times more potent in preventing formalin-evoked pain behavior when injected locally into the receptive field, compared to when it was administered intravenously (Calignano et al., 1998). Furthermore, it is now clear that CB₁ and CB₂ receptors modulate inflammatory pain states as intraplantar administration of WIN 55,212-2 (a synthetic CB₁

and CB₂ agonist) attenuated the development of carrageenan-evoked mechanical hyperalgesia, allodynia and Fos protein expression (Nackley et al., 2003); these actions were completely blocked by co-administration of either a CB₁ or CB₂ antagonist. However, for some authors, the inhibitory effects of local injection of anandamide on mechanically-evoked responses of spinal neurons in rats with hind paw carrageenan-induced inflammation are mediated predominantly by peripheral CB₂ but not CB₁ receptors (Sokal et al., 2003). Finally, Lichtman et al. (2004) reported that FAAH^{-/-} mice showed reduced pain behavior in both phases of the formalin test which was blocked by a CB₁ but not by a CB₂ receptor antagonist.

In the present study, anandamide was antinociceptive during the two phases of the formalin test (60 min) despite the fact that the point of its maximum inhibitory effect is usually reported to be at 10 min post-injection. The fact that anandamide was administered locally in peripheral tissue may explain its longer duration of action, whereas significant hydrolysis may account for its shortened antinociceptive effects when given systemically.

6.1.4.3 Local (hind paw) antinociceptive effect of NSAIDs

At the site of inflammation in the periphery, inhibition of prostaglandin synthesis is a well-established mechanism by which NSAIDs exert their antinociceptive action (Taiwo & Levine, 1990). Indeed, the antinociceptive effect of NSAIDs administered locally has already been reported (Islas-Cadena et al., 1999; Aguirre-Banuelos & Granados-Soto, 2000; Francischi et al., 2002; Torres-Lopez et al., 2002; Ma & Eisenach, 2003) but the antinociceptive efficacy of selective COX-2 inhibitors compared to standard NSAIDs is

controversial. In our study, ibuprofen displayed antinociceptive effects at very low concentrations during the two phases of the formalin test but did not influence paw edema formation.

6.1.4.4 Miscellaneous

The cannabinoid CB₂ receptor antagonist AM630 used in the present study can produce antagonism on cannabinoid CB₁ receptors at high doses. However, AM630 was probably not used in excessively high doses in our study as it did not antagonize the antinociceptive effects of anandamide. Furthermore, cannabinoid antagonists can also act as inverse agonists, producing effects opposite in direction from those produced by cannabinoid receptor agonists (see Pertwee, 2005 for review). However, neither AM251 nor AM630 produced an increase in pain behavior when given alone in the formalin test.

It is interesting to note that the dose-response curve obtained by the combination of anandamide and ibuprofen was shifted to the left (indicating a synergistic effect in terms of potency) but also produced an antinociceptive effect which was greater than each drug given alone (lowest point on the X-axis referring to greater efficacy).

In conclusion, peripheral (hind paw) administration of anandamide or ibuprofen is associated with a decrease in pain behavior in animals submitted to acute and inflammatory pain. The association of an endocannabinoid with an NSAID (non-specific COX inhibitor) produced a synergistic antinociceptive effect mediated in part by cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. The contribution of these receptors and of other mediators needs to be further investigated. This approach is interesting because peripheral administration of drugs should

avoid troublesome psychotropic and other systemic effects by delivering lower doses locally.

6.1.5 Acknowledgments

We wish to thank Dr Robert Élie for his kind help with statistical factorial design analyses.

This work was supported by a research grant from the Research Centre of the CHUM – Montréal, by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and by a grant from Organon Canada.

6.1.6 References

Aguirre-Banuelos P, Granados-Soto V. Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxicam in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 2000;395:9-13.

Ates M, Hamza M, Seidel K, Kotalla CE, Ledent C, Guhring H. Intrathecally applied flurbiprofen produces an endocannabinoid-dependent antinociception in the rat formalin test. *Eur J Neurosci* 2003;17:597-604.

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

Calignano A, La Rana G, Piomelli D. Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. *Eur J Pharmacol* 2001;419 :191-198.

Conti S, Costa B, Colleoni M, Parolaro D, Giagnoni G. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br J Pharmacol* 2002;135:181-187.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 1996;384:83-87.

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

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992;258:1946-1949.

Draper NR, Smith H. *Applied regression analysis*. New York: Wiley, 1998.

Fowler CJ, Janson U, Johnson RM, Wahlstrom G, Stenstrom A, Norstrom K, Tiger G. Inhibition of anandamide hydrolysis by the enantiomers of ibuprofen, ketorolac and flurbiprofen. *Arch Biochem Biophys* 1999;362:191-196.

Fowler CJ, Stenstrom A, Tiger G. Ibuprofen inhibits the metabolism of the endogenous cannabimimetic agent anandamide. *Pharmacol Toxicol* 1997;80:103-107.

Francischi JN, Chaves CT, Moura ACL, Lima AS, Rocha OA, Ferreira-Alves DL, Bakhle YS. Selective inhibitors of cyclo-oxygenase (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. *Br J Pharmacol* 2002;137:837-844.

Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 1995;232:54-61.

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

Gatley SJ, Lan R, Pyatt B, Gifford AN, Volkow ND, Makriyannis A. Binding of the non-classical cannabinoid CP55,940, and the diarylpyrazole AM251 to rodent brain cannabinoid receptors. *Life Sci* 1997;61:PL191-PL197.

Ghilardi JR, Svensson CI, Rogers SD, Yaksh TL, Mantyh PW. Constitutive spinal cyclooxygenase-2 participates in the initiation of tissue injury-induced hyperalgesia. *J Neurosci* 2004; 24: 2727-32.

Grabovsky Y, Tallarida RJ. Isobolographic analysis for combinations of a full and partial agonist: curves isoboles. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310:981-986.

Gühring H, Hamza M, Sergejeva M, Ates M, Kotalla CE, Ledent C, Brune K. A role for endocannabinoids in indomethacin-induced spinal antinociception. *Eur J Pharmacol* 2002;454:153-163.

Hanus L, Breuer A, Tchilibon S, Shiloah S, Goldenberg D, Horowitz M, Pertwee RG, Ross RA, Mechoulam R, Fride E. HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:14228-14233.

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

Hosohata Y, Quock RM, Hosohata K, Makriyannis A, Consroe P, Roeske WR, Yamamura HI. AM630 antagonism of cannabinoid-stimulated [³⁵S]GTPγS binding in the mouse brain. *Eur J Pharmacol* 1997;321:R1-R3.

Islas-Cadena M, Aguirre-Banuelos P, Granados-Soto V. Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive effect of nimesulide. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1999;42:87-92.

Jaggari SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS. The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain* 1998;76:189-199.

Johanek LM, Heitmiller DR, Turner M, Nader N, Hodges J, Simone DA. Cannabinoids attenuate capsaicin-evoked hyperalgesia through spinal and peripheral mechanisms. *Pain* 2001;93:303-315.

Ko MC, Woods JH. Local administration of delta9-tetrahydrocannabinol attenuates capsaicin-induced thermal nociception in rhesus monkeys: a peripheral cannabinoid action. *Psychopharmacology* 1999;143:322-326.

Kozak KR, Prusakiewicz JJ, Rowlinson SW, Prudhomme DR, Marnett LJ. Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid anandamide. *Biochemistry* 2003;42:9041-9049.

Lichtman AH, Shelton CC, Advani T, Cravatt BF. Mice lacking fatty acid amide hydrolase exhibit a cannabinoid receptor-mediated phenotypic hypoalgesia. *Pain* 2004;109:319-327.

Ma W, Eisenach JC. Intraplantar injection of a cyclooxygenase inhibitor ketorolac reduces immunoreactivities of substance P, calcitonin gene-related peptide, and dynorphin in the dorsal horn of rats with nerve injury or inflammation. *Neuroscience* 2003;121:681-690.

Malan TP, Ibrahim MM, Deng H, Liu Q, Mata HP, Vanderah T, Porreca F, Makriyannis A. CB₂ cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 2001;93:239-245.

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

Malmberg AB, Yaksh TL. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263:136-146.

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

Mazzari S, Canella R, Petrelli L, Marcolongo G, Leon A. N-(2-hydroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur J Pharmacol* 1996;300:227-236.

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

Nackley AG, Suplita RL 2nd, Hohmann AG. A peripheral cannabinoid mechanism suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience* 2003;117:659-670.

Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 1999;6:635-664.

Pertwee RG. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB₁ receptors. *Life Sci* 2005;76:1307-1324.

Pertwee RG, Griffin G, Fernando S, Li X, Hill A, Makriyannis A. AM630, a competitive cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci* 1995;56:1949-1955.

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

Piomelli D, Beltramo M, Giuffrida A, Stella N. Endogenous cannabinoid signaling. *Neurobiol Dis* 1998;5:462-473.

Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodriguez de Fonseca F. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:218-224.

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

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

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

Ross RA, Gibson TM, Brockie HC, Leslie M, Pashmi G, Craib SJ, Di Marzo V, Pertwee RG. Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens. *Br J Pharmacol.* 2001;132:631-640.

Seidel K, Hamza M, Ates M, Gühring H. Flurbiprofen inhibits capsaicin induced calcitonin gene related peptide release from rat spinal cord via an endocannabinoid dependent mechanism. *Neurosci Lett* 2003;338:99-102.

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

Taiwo YO, Levine JD. Effects of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism on cutaneous nociceptive threshold in the rat. *Brain Res* 1990;537:372-374.

Tallarida RJ, Stone DJ Jr, Raffa RB. Efficient designs for studying synergistic drug combinations. *Life Sci* 1997;61:417-425.

Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51:5-17.

Torres-Lopez JE, Ortiz MI, Castaneda-Hernandez G, Alonso-Lopez R, Asomoza-Espinosa R, Granados-Soto V. Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test. *Life Sci* 2002;70:1669-1676.

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

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

6.1.7 Figures legend

Figure 1

(A) Factorial analysis of variance (ANOVA) using a 2X2 factorial design to assess the antinociceptive effects of anandamide in absence and presence of ibuprofen. The anandamide and ibuprofen factors are at two levels, absence (-) or presence (+).

(B) Factorial ANOVA using a 2X2X3 factorial design to study the antinociceptive effects of anandamide, ibuprofen and their combination in saline, AM251 (cannabinoid CB₁ receptor antagonist) and AM630 (cannabinoid CB₂ receptor antagonist) conditions.

Figure 2

(A) Dose-response curves for anandamide (full circle), ibuprofen (open square) and their combination (full triangle) in the inflammatory phase of the formalin test. Data are expressed as means \pm s.e. mean (n = 6).

(B) Isobolographic analysis of anandamide/ibuprofen interaction in the inflammatory phase of the formalin test. Drug interactions may be suggested by constructing an isobologram. The ED₅₀s of the two drugs are respectively plotted on the x and y axes. The straight line connecting these two points is the theoretical additive line. If the experimental derived isobole (a point representing x, y coordinates for ED₅₀) is plotted significantly below the theoretically additive isobole, the interactive effect is identified to be synergistic. Mix 1:10 = equieffective dose of the fixed 1:10 drug mixture; Add 1:10 = expected additive 1:10

combination. The difference between experimental and theoretical points was significant ($P < 0.001$) indicating synergistic effect.

Figure 3

Effects of anandamide and ibuprofen given on the dorsal surface of the ipsilateral (A) and contralateral (B) hind paws 15 min before 2.5% formalin (50 μ L). Data are expressed as means \pm s.e. mean ($n = 6$). † AUC = Area Under the Curve for the acute phase, $P < 0.01$ for analgesics vs. 0.9% NaCl; # AUC for the inflammatory phase, $P < 0.001$ for analgesics vs. 0.9% NaCl.

Figure 4

Effects of anandamide and ibuprofen at ED_{50} doses or their combination given into the hind paws 15 min before 2.5% formalin (50 μ L). (A) Analgesic effects of the drugs compared to control. (B) Additive effect of anandamide combined with ibuprofen for the acute phase of the test (0-15 min). (C) Additive effect of anandamide combined with ibuprofen for the inflammatory phase of the test (15-50 min). (D) Paw edema. Data are expressed as means \pm s.e. mean ($n = 6$). Anan = anandamide, Ibu = ibuprofen. † Area Under the Curve (AUC) for the acute phase, $P < 0.005$ for analgesics vs. NaCl 0.9 %; # AUC for the inflammatory phase, $P < 0.001$ for analgesics vs. NaCl 0.9 %; * anandamide vs. without anandamide, $P < 0.01$; ‡ ibuprofen vs. without ibuprofen, $P < 0.05$.

Figure 5

Effects of AM251 and AM630 on ibuprofen, anandamide and their combination. Acute phase (0-15 min). Data are expressed as means \pm s.e. mean (n=4). Anan = anandamide (ED₅₀ dose), Ibu = ibuprofen (ED₅₀ dose), AM251 (80 μ g) and AM630 (25 μ g). ‡ anandamide vs. without anandamide, $P < 0.001$; * ibuprofen vs. without ibuprofen, $P < 0.001$; † ibu + AM251 vs. AM251, $P < 0.01$; Δ ibu + AM251 vs. ibu + anan + AM251, $P < 0.001$; § anan + AM630 vs. AM630, $P < 0.001$; # ibu + AM630 vs AM630, $P < 0.001$; ns = non significant difference between those two groups.

Figure 6

Effects of AM251 and AM630 on ibuprofen, anandamide and their combination. Inflammatory phase (15-50 min). Data are expressed as means \pm s.e. mean (n=4). Anan = anandamide (ED₅₀ dose), Ibu = ibuprofen (ED₅₀ dose), AM251 (80 μ g) and AM630 (25 μ g). ‡ anandamide vs. without anandamide, $P < 0.001$; * ibuprofen vs. without ibuprofen, $P < 0.001$; † ibu + AM251 vs. AM251, $P < 0.05$; Δ ibu + AM251 vs. ibu + anan + AM251, $P < 0.001$; § anan + AM630 vs. AM630, $P < 0.001$; # ibu + AM630 vs AM630, $P < 0.01$; ns = non significant difference between those two groups.

Figure 1

A)

		Anandamide	
		-	+
Ibuprofen	-	Control group	Anandamide group
	+	Ibuprofen group	Anan+Ibu group

B)

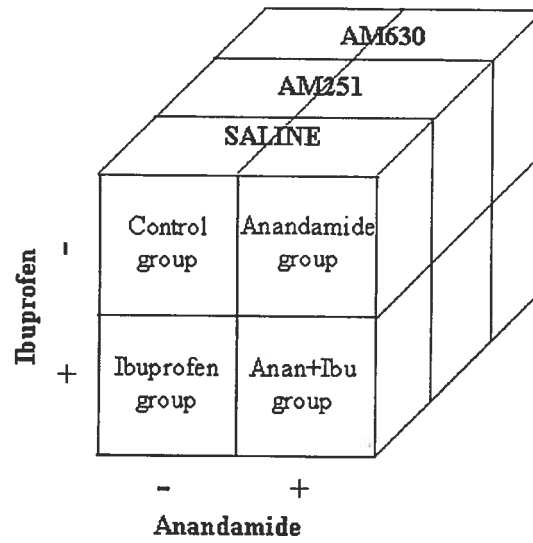
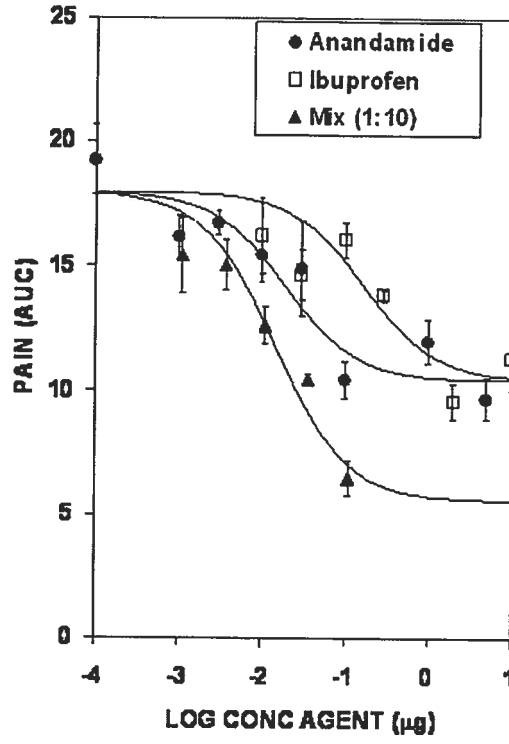


Figure 2

A)



B)

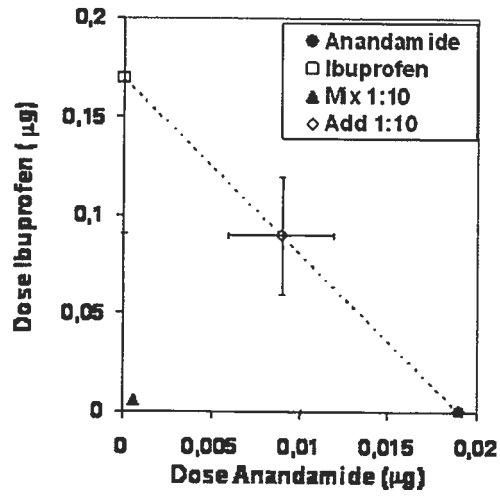
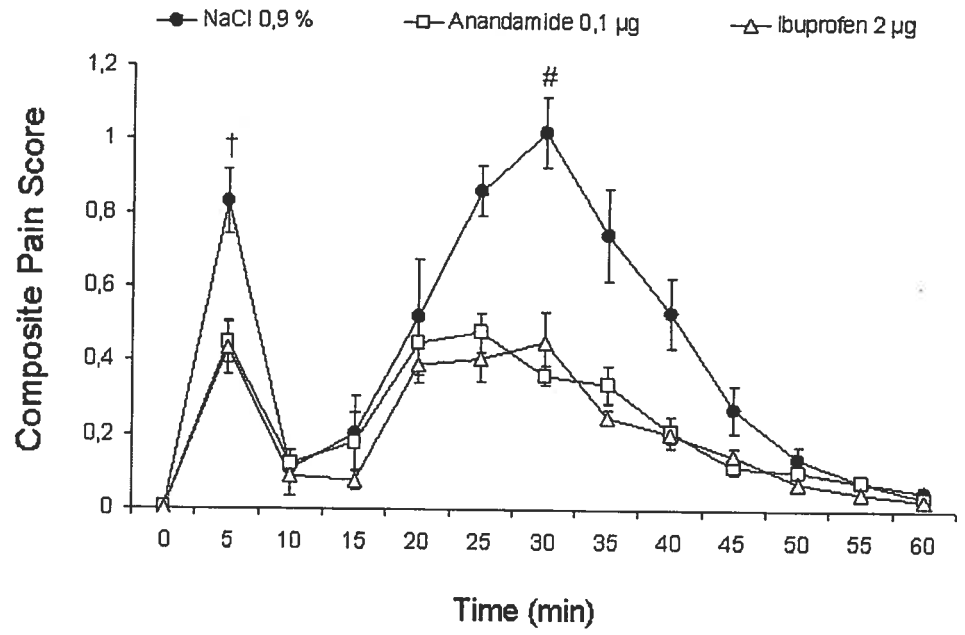


Figure 3

A)



B)

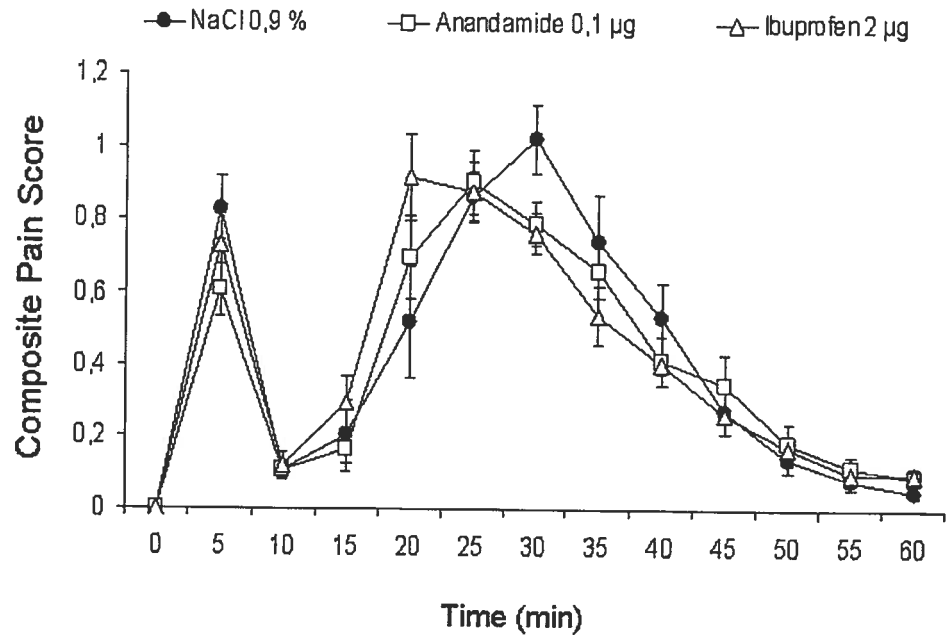
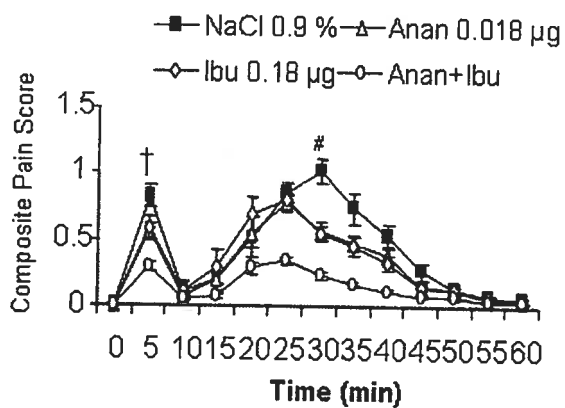
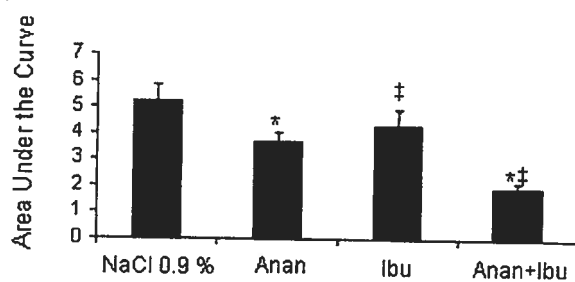


Figure 4

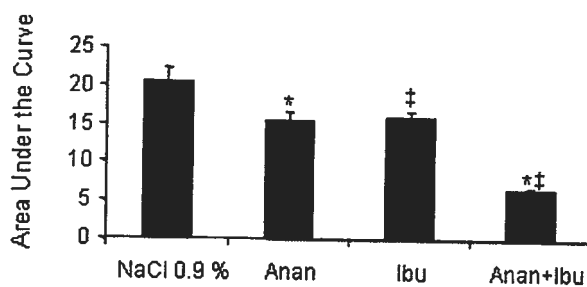
A)



B)



C)



D)

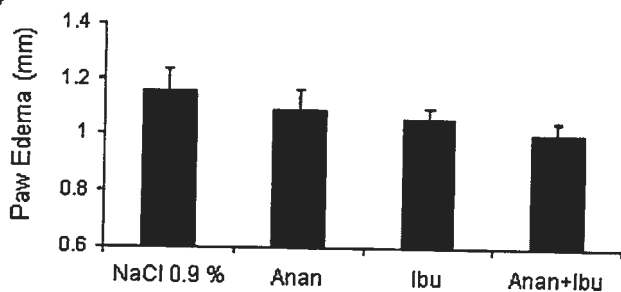


Figure 5

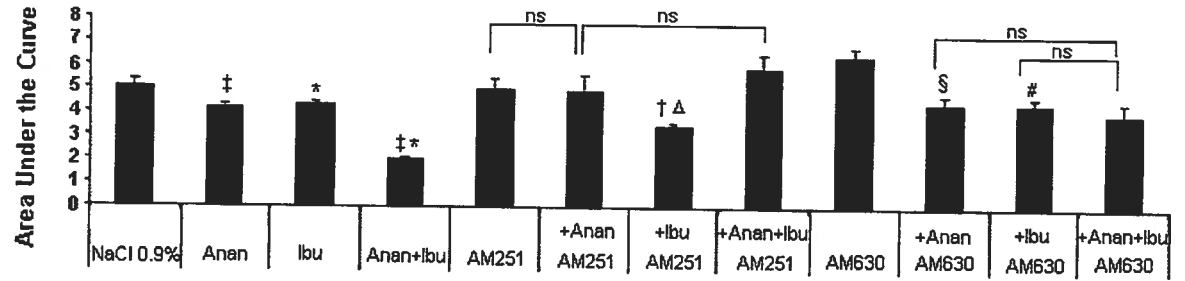
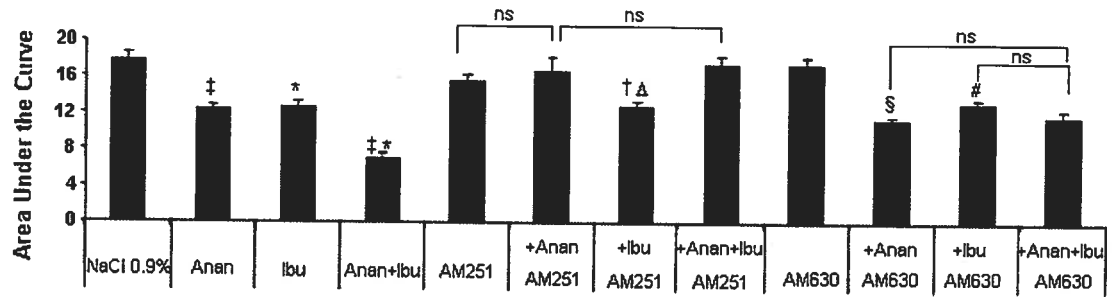


Figure 6



6.2 Article 2 publié dans *European Journal of Pharmacology*

**“Synergistic antinociceptive effects of anandamide, an endocannabinoid,
and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peripheral tissue: A role for
endogenous fatty-acid ethanolamides?”**

Josée Guindon¹, Jesse LoVerme³, André De Léan¹, Daniele Piomelli⁴

& Pierre Beaulieu^{1,2*}

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

Departments of Psychiatry³ and Pharmacology⁴, University of California, Irvine, California
92697-4260.

*Author for Correspondence: Pierre Beaulieu, Department of Anesthesiology, CHUM –
Hôtel-Dieu, 3840 rue St-Urbain, Montréal, H2W 1T8, Québec, Canada

Tel: (1) 514-343-6338

Fax: (1) 514-412-7222

E-mail: 

6.2.0 Abstract

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit fatty-acid amide hydrolase (FAAH), the enzyme responsible for the metabolism of anandamide, an endocannabinoid. It has been suggested that the mechanisms of action of NSAIDs could be due to inhibition of cyclooxygenase (COX) and also to an increase in endocannabinoid concentrations. In a previous study we have demonstrated that the local analgesic interaction between anandamide and ibuprofen (a non-specific COX inhibitor) was synergistic for the acute and inflammatory phases of the formalin test. To test this hypothesis further, we repeated similar experiments with rofecoxib (a selective COX-2 inhibitor) and also measured the local concentrations of anandamide, and of two fatty-acid amides, oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide. We established the ED₅₀ for anandamide (34.52 pmol ± 17.26) and rofecoxib (381.72 pmol ± 190.86) and showed that the analgesic effect of the combination was synergistic. We also found that paw tissue levels of anandamide, oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide were significantly higher when anandamide was combined with NSAIDs and that this effect was greater with rofecoxib. In conclusion, local injection of anandamide or rofecoxib was antinociceptive in a test of acute and inflammatory pain and the combination of anandamide with rofecoxib was synergistic. Finally, locally injected anandamide with either NSAID (ibuprofen or rofecoxib) generates higher amount of fatty-acid ethanolamides. The exact comprehension of the mechanisms involved needs further investigation.

Key words: anandamide; endocannabinoids; fatty-acid ethanolamides; oleoylethanolamide; palmitoylethanolamide; cannabinoid receptors; rofecoxib; ibuprofen; fatty-acid amide hydrolase; nonsteroidal anti-inflammatory drugs; capsazepine; formalin test; inflammatory pain.

6.2.1 Introduction

The principal active ingredient of Cannabis, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, produces its effect by binding to G protein-coupled receptors, identified as the cannabinoid CB₁ receptor (Matsuda et al., 1990) localised primarily in the central nervous system (including the spinal cord and dorsal root ganglia) and in the periphery (Rice et al., 2002 for review), and the cannabinoid CB₂ receptor (Munro et al., 1993) mainly expressed in immune tissues (Galiègue et al., 1995). Endogenous cannabinoids (or endocannabinoids) such as anandamide (arachidonylethanolamide), a cannabinoid CB₁ receptor agonist, were also identified (Devane et al., 1992). The therapeutic utility of using compounds that would modulate the endocannabinoid system is beginning to attract more interest (Piomelli et al., 2000). Anandamide can act in the periphery to attenuate pain behaviour. Indeed, when injected into the ipsilateral hind paw of the rat, anandamide reduced hyperalgesia induced by carrageenan (Richardson et al., 1998) or pain induced by formalin injection (Calignano et al., 1998). Those studies showed that pain relief was produced by the activation of peripheral cannabinoid receptors. Other authors have demonstrated the peripheral mechanisms involved against persistent somatic inflammatory pain (Malan et al., 2001; Nackley et al., 2003).

Anandamide is hydrolysed into arachidonic acid and ethanolamine by a membrane-bound enzyme named fatty-acid amide hydrolase (FAAH) (Cravatt et al., 1996). Anandamide can also be oxygenated by cyclooxygenase 2 (COX-2) to form prostamides, a new class of prostaglandin analogs (Weber et al., 2004; Yang et al., 2005). Other endogenous lipid

compounds called fatty-acid ethanolamides also exist such as palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide. The former has both anti-inflammatory and antinociceptive properties (Calignano, 1998); it does not bind to cannabinoid receptors (Showalter et al., 1996) although its effects are antagonised by cannabinoid CB₂ antagonists (Calignano et al., 1998). The latter is a naturally occurring lipid that regulates feeding and body weight (Fu et al., 2003; Lo Verme et al., 2005b).

The standard hypothesis for the mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is by inhibiting COX enzymes responsible for the production of prostaglandins. However, other mechanisms have been proposed, such as interactions with endocannabinoids (Fowler et al., 1997). Indeed, FAAH activity, responsible for the degradation of anandamide, is inhibited by NSAIDs such as ibuprofen, ketorolac and flurbiprofen (Fowler et al., 1997, 1999). However, very little information is available in the literature on the antinociceptive effects of the combination of a cannabinoid with an NSAID. It has been shown that intrathecal indomethacin (Gühring et al., 2002) or flurbiprofen (Ates et al., 2003) is antinociceptive in the formalin test in the rat. This effect was antagonised by a cannabinoid CB₁ antagonist and was absent in cannabinoid CB₁ knockout mice. Furthermore, orally administered palmitoylethanolamide, an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α agonist with anti-inflammatory properties (LoVerme et al., 2005a) and indomethacin have demonstrated anti-oedema and anti-inflammatory properties in a rat model of acute inflammation (Conti et al., 2002). Finally in a previous study, we have shown that locally injected anandamide, ibuprofen (a

non-specific COX inhibitor) or combination thereof, decreased pain behaviour in the formalin test (Guindon et al., 2006). The combination of anandamide with ibuprofen produced synergistic antinociceptive effects involving both cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. However, the mechanism of this interaction was not explained and the interaction of anandamide with a specific COX-2 inhibitor has not been studied yet. Furthermore, there is evidence of cellular colocalisation of FAAH and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptors in primary sensory neurons (Price et al., 2005). Therefore, the role of TRPV1 receptors in the context of anandamide / rofecoxib (a selective COX-2 inhibitor) interactions was also evaluated by using a specific antagonist of TRPV1 receptors.

The present study was thus designed to further investigate the antinociceptive interactions between endocannabinoids and NSAIDs. Anandamide and rofecoxib were studied in a test of acute and inflammatory pain. Finally, paw tissue concentrations of fatty-acid ethanolamides were also determined.

6.2.2 Methods

6.2.2.1 Animals

This research protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the Université de Montréal and all procedures conformed to the guidelines of the Canadian Council for Animal Care. Male Wistar rats (Charles River, St-Constant, Québec, Canada), 180-220 g at the time of testing were housed in standard plastic cages with sawdust bedding in a climate-

controlled room on a 12-h light/dark cycle. Animals were allowed free access to food pellets and water.

6.2.2.2 Drug administration

Anandamide, an endogenous cannabinoid, is a receptor agonist with a four-fold selectivity for the cannabinoid CB₁ receptor (K_i = 89 nM) over the cannabinoid CB₂ receptor (K_i = 371 nM) and was purchased already in a liquid form in water-dispersible emulsion and further dissolved in 0.9% NaCl (Pertwee et al., 1999). Capsazepine, a TRPV1 receptor antagonist, was dissolved in 0.9% NaCl solution containing 50% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Kwak et al., 1998). Anandamide and capsazepine were purchased from Tocris (Ellisville, MO, USA). Ibuprofen (Sigma, St-Louis, USA), a non-specific COX inhibitor, and rofecoxib, a specific COX-2 inhibitor, were dissolved in 0.9% NaCl solution. For rofecoxib, the compressed tablet from commercial preparations (VIOXX[®], 25 mg) was weighed and crushed (using a mortar) into a fine suspension with physiological saline (Francischi et al., 2002). Finally, NS-398 (another specific COX-2 inhibitor) was dissolved in 0.9% NaCl solution containing 4% DMSO and was purchased from Cayman Chemicals (MI, USA).

6.2.2.3 Formalin test

The formalin test is a well-established model of inflammatory pain (Tjølsen et al., 1992). Rats were acclimatised to the testing environment (clear Plexiglass box 29 x 29 x 25 cm) during 15 min or until cessation of explorative behaviour. Anandamide (2.88, 8.63, 28.77,

86.31, 288, 2 877 or 14 385 pmol in 50 μ l), rofecoxib (31.81, 95.43, 318, 954, 6 362 or 31 810 pmol in 50 μ l), NS-398 (159 nmol in 50 μ l; Choi et al., 2003), ibuprofen (438 pmol in 50 μ l) and capsazepine (2.65 μ mol in 50 μ l; Kwak et al., 1998) were injected subcutaneously (s.c.) on the dorsal surface of the right hind paw 15 min before the injection (28G needle) of 2.5% formalin (50 μ l) 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 in consecutive 5-min periods for 60 min following formalin administration. In each 5-min period, the total time the animal spent in three 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} where category 1 score was discarded) calculated for the first (0-15 min) and second (15-50 min) phases 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 acute phase (0-15 min) and the inflammatory phase (15-50 min) using the trapezoidal rule.

6.2.2.4 Protocol

The experiments were conducted in a randomised and blinded manner by the same experimenter. In a first study, the dose-response curves for anandamide, rofecoxib and the combination of these two drugs at the fixed 1 to 11 observed ratio given as a total dose and

further diluted 10, 30 and 100 times were determined using the data from the inflammatory phase. In a second study, the antinociceptive effects of anandamide were compared under two conditions: absence (0.9% NaCl) and presence of rofecoxib at their ED₅₀ doses. In a third experiment, the comparison between two COX-2 inhibitors, NS-398 (159 nmol) and rofecoxib (31.81 nmol) was established. In the fourth experiment, the effects of ibuprofen, anandamide and their combination (at ED₅₀ doses taken from our previous study by Guindon et al., 2006) were studied in absence or in presence of capsazepine. In the fifth experiment, the effects of rofecoxib, anandamide and their combination (at ED₅₀ doses) were also evaluated in absence or presence of capsazepine. For the first two studies (n = 6 for each group), in the third study (n = 7 per group) and in the fourth and fifth studies (n = 4 per group), the tested drugs were dissolved in the same total volume of 50 µl and administered in the right hind paw. Preliminary experiments in the formalin test (n = 8 per group) have shown that there was no difference in pain behaviour between 0.9% NaCl and 0.9% NaCl solution with 50% DMSO (data not shown). Therefore, 0.9% NaCl was used as the control solution.

Finally, in order to exclude any possible systemic effect of the drugs, 288 pmol of anandamide, 6.36 nmol of rofecoxib and capsazepine 2.65 µmol (data not shown) were administered s.c. on the dorsal surface of the contralateral (left hind paw) or ipsilateral paws (n = 4 per group).

At the end of the test (i.e., 60 min after formalin injection), the skin and tissues of the dorsal surface of the right hind paw were removed, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used for measurement of fatty-acid ethanolamides as described as followed.

6.2.2.5 High Performance Liquid Chromatography /Mass Spectrometry analysis

6.2.2.5.1 Synthesis of [$^2\text{H}_4$]-labelled standards

Standard [$^2\text{H}_4$]-labelled fatty-acid ethanolamides were synthesised by the reaction of the corresponding fatty acyl chlorides with [$^2\text{H}_4$]-labelled ethanolamine. Fatty acyl chlorides (purchased from Nu-Check Prep, Elysian, MN) were dissolved in dichloromethane (10 mg/ml) and allowed to react with 1 equivalent of [$^2\text{H}_4$]-labelled ethanolamine (purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) for 15 min at $0-4^{\circ}\text{C}$. The reaction was stopped by adding purified water. After vigorous stirring and phase separation, the upper aqueous phase was discarded and the organic phase was washed twice with water to remove unreacted ethanolamine. The reaction resulted in quantitative formation of [$^2\text{H}_4$]-labelled fatty-acid ethanolamides, which were concentrated to dryness under a stream of N_2 and reconstituted in chloroform at a concentration of 20 mM. Fatty-acid ethanolamide solutions were stored at -20°C until use. Identity and chemical purity ($> 99.9\%$) of the synthesised fatty-acid ethanolamides were determined by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry (HPLC/MS).

6.2.2.5.2 Tissue preparation

Skin tissue was diced with scissors and incubated in 2 ml of chloroform containing 500 pmol of [²H₄]-labelled-palmitoylethanolamide, 500 pmol of [²H₄]-oleoylethanolamide and 25 pmol of [²H₄] -anandamide overnight at + 4°C with shaking. The tissue was then homogenised and lipids were extracted with 2 ml of methanol and 2.25 ml of saturated sodium chloride solution (1 M). The organic layer was removed, evaporated to dryness under N₂, reconstituted in a mixture of chloroform/methanol (1:1, 100 µl) and transferred to 2.0 ml screw top vials with 0.1 ml glass inserts to be injected into the HPLC/MS.

6.2.2.5.3 HPLC/MS analysis

Fatty-acid ethanolamides were quantified using an isotope dilution HPLC/MS assay in positive ionisation mode (Giuffrida et al., 2000).

6.2.2.6 Paw edema

At the end of the formalin test, paw edema 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 (Nackley et al., 2003; Ghilardi et al., 2004).

6.2.2.7 Statistical analysis

Pain behaviour for each treatment group was expressed as mean ± S.E.M. The dose-response curves for anandamide, rofecoxib and their combination were determined by

simultaneous analysis using ALLFIT software (De Léan et al., 1978). Interactions between anandamide and rofecoxib were performed using isobolographic analysis as described by Tallarida et al. (1997) and Grabovsky and Tallarida, (2004). The theoretical additive ED₅₀ was calculated for the combination of drugs based on the individual ED₅₀ and the fixed dose ratio (1:11). For the statistical estimation of the difference between the experimentally derived potency and the theoretical additive counterpart, a *t*-test was used based on known ED₅₀s and standard errors. In the second study, the antinociceptive effects of anandamide in absence or presence of rofecoxib were assessed for significance using a 2 x 2 factorial analysis of variance (ANOVA). The comparison of the two COX-2 inhibitors was assessed for significance using factorial ANOVA. The antinociceptive effects of ibuprofen, anandamide and their combination were assessed for significance in 0.9% NaCl and capsazepine conditions using a factorial ANOVA (Winer, 1971). The same analysis was used for rofecoxib, anandamide and its combination in absence or presence of capsazepine. The differences in the amount of anandamide, oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide following the different treatment groups were assessed for significance using factorial ANOVA. To compare ipsi- vs. contralateral paw injections of the drugs, an ANOVA adapted for factorial experimental design was used. The different components of the total variation were settled *a priori* using the multiple regression analysis described by Draper and Smith (1998). The critical level of significance was set at 5% ($P < 0.05$).

6.2.3 Results

6.2.3.1 Synergistic analgesic effects of anandamide and rofecoxib

Anandamide, rofecoxib and their combination decreased pain behaviour in the formalin test with ED₅₀ of 34.52 pmol ± 17.26 (0.012 µg ± 0.006), 381.72 pmol ± 190.86 (0.12 µg ± 0.06) and 11.04 pmol ± 4.73 (0.0035 µg ± 0.0015), respectively, and the theoretical additive ED₅₀ point was 204.95 pmol ± 72.52 (0.065 µg ± 0.023) (Fig. 1). The dose-response curve for anandamide-rofecoxib combination was shifted to the left, away from the anandamide and rofecoxib curves. Isobolographic analysis showed an overall synergistic effect of the combination ($P < 0.001$) (Fig. 1A and 1B).

Pain behaviour following injection of the drugs in the contralateral hind paw was not statistically different when compared with the control group for the acute and inflammatory phases (Fig. 2).

When given locally at ED₅₀ doses, anandamide and rofecoxib produced a significant antinociceptive effect both in the acute ($P < 0.001$ and $P < 0.025$) and the inflammatory phases ($P < 0.001$ for both) of the formalin test (Fig. 3).

6.2.3.2 Paw edema

Edema of the injected paw did not differ significantly among the groups: neither anandamide nor rofecoxib influenced paw edema (Fig. 3).

6.2.3.3 Comparison of two COX-2 inhibitors: NS-398 and rofecoxib

Local administration of NS-398 was associated with a significant antinociceptive effect. Indeed, when given locally, NS-398 (159 nmol) and rofecoxib (31.81 nmol) produced significant antinociceptive effects compared to the control group in the acute ($P < 0.005$) and the inflammatory phases ($P < 0.001$) of the test (Fig. 4). However, NS-398 and rofecoxib were not different one from each other for the acute and inflammatory phase, respectively (Fig. 4).

6.2.3.4 TRPV1 receptors are not implicated in the antinociceptive effect of the anandamide-ibuprofen combination

Local administration of capsazepine was associated with a significant antinociceptive effect. Furthermore, when given locally at ED₅₀ doses, anandamide (51.79 pmol \pm 25.89), ibuprofen (788.44 pmol \pm 394.22), and their combination (25.46 pmol \pm 8.49) (Guindon et al., 2006) alone or in association with capsazepine produced a significant antinociceptive effect compared to the control group in the acute ($P < 0.001$) and the inflammatory phases ($P < 0.001$) (Fig. 5). The combination of anandamide with ibuprofen produced lower pain behaviour values compared to the anandamide group ($P < 0.005$ and $P < 0.001$ for the acute and inflammatory phases, respectively) (Fig. 5). The association of capsazepine with anandamide and ibuprofen produced lower pain behaviour values in comparison to the capsazepine group ($P < 0.01$ and $P < 0.005$ for the acute and inflammatory phases, respectively) (Fig. 5).

6.2.3.5 TRPV1 receptors are not implicated in the antinociceptive effect of the anandamide-rofecoxib combination

Local administration of capsazepine was associated with a significant antinociceptive effect. Furthermore, when given locally at ED₅₀ doses, anandamide, rofecoxib and their combination alone or in association with capsazepine produced a significant antinociceptive effect compared to the control group in the acute ($P < 0.001$) and the inflammatory phases ($P < 0.001$) (Fig. 6). The combination of anandamide with rofecoxib generated lower pain behaviour values compared to the anandamide group ($P < 0.01$ and $P < 0.001$ for the acute and inflammatory phases, respectively) (Fig. 6). The association of capsazepine with anandamide and rofecoxib produced lower pain behaviour values in comparison to the capsazepine group ($P < 0.001$ and $P < 0.005$ for the acute and inflammatory phases, respectively) (Fig. 6).

6.2.3.6. Higher concentrations of fatty-acid ethanolamides when anandamide is given with NSAIDs

The amount of anandamide, oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide in paw tissues were significantly higher when anandamide was given locally with NSAIDs compared to the drugs given alone (Fig. 7A, B, C) ($P < 0.001$). The increase in the quantity of anandamide, oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide in the paws was significantly higher when anandamide was combined with rofecoxib compared to its combination with ibuprofen (Fig. 7A, B, C) ($P < 0.005$, $P < 0.025$ and $P < 0.001$, respectively).

6.2.4 Discussion

We report that anandamide and rofecoxib displayed antinociceptive effects in the formalin test when injected in the paw of rats and that their combination was synergistic and did not involve TRPV1 receptors. These effects were locally mediated and not systemic as anandamide and rofecoxib given in the contralateral paw were not antinociceptive at doses higher than the ED₅₀ doses used in the ipsilateral paw. Finally, exogenous administration of anandamide with NSAIDs (ibuprofen or rofecoxib) increased the levels of anandamide, oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide in inflamed paw tissues.

We hypothesised that the peripheral antinociceptive effects of endocannabinoids such as anandamide are potentiated by concomitant administration with an NSAID. Indeed, the enzymatic hydrolysis of anandamide by FAAH is blocked by ibuprofen, ketorolac and flurbiprofen (Fowler et al., 1997, 1999) so that anandamide is not degraded, and thus, present locally in greater amounts to decrease pain behaviour. We have shown in a previous study that the combination of anandamide with ibuprofen produced synergistic antinociceptive effects but the mechanism of this interaction, although mediated in part by cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors, was not clear (Guindon et al., 2006). In the present study, we have also demonstrated that the same is true for the combination of anandamide with rofecoxib and, furthermore, that it was associated with a higher quantity of anandamide and other fatty-acid ethanolamides in the paw of rats injected with formalin. There is not an obvious explanation for this finding. However, we can suggest that COX-2 is involved in the oxidative metabolism of endocannabinoids and therefore, in the presence

of rofecoxib, there may be a decrease in this metabolic pathway, increasing then the local levels of fatty-acid ethanolamides compared with the use of ibuprofen. Despite the higher concentration of anandamide in paw tissues, and therefore the possibility that anandamide activated TRPV1 receptors, it is suggested that this was not the case as the interaction of anandamide with ibuprofen gave the same antinociceptive effects in the presence or absence of a TRPV1 receptor antagonist. Finally, the local antinociceptive effects of capsazepine, a TRPV1 receptor antagonist, in the two phases of the formalin test suggest the existence of a pronociceptive tone of vanilloid receptors in peripheral tissues.

6.2.4.1. Antinociceptive effects of the combination of cannabinoids with NSAIDs

The endogenous PPAR- α receptor agonist, palmitoylethanolamide (LoVerme et al., 2005a), and indomethacin given orally have demonstrated anti-oedema and anti-inflammatory properties in a rat model of acute inflammation (Conti et al., 2002). Furthermore, Gühring et al. (2002) have shown that intrathecal indomethacin was antinociceptive in the formalin test in the rat and that this effect was antagonised by AM251, a cannabinoid CB₁ receptor antagonist. In the same study, the authors showed that intrathecal indomethacin was ineffective in cannabinoid CB₁ knockout mice. Moreover, Gühring et al. (2002) reported that pain-related behaviour in the formalin test was similar in COX wild type, COX1^{-/-} and COX2^{-/-} mice suggesting that COX inhibition is not the only mechanism that could explain the effects of NSAIDs. They concluded that endocannabinoids play a major role in mediating NSAIDs-induced antinociception at the spinal level. However, there is growing evidence that the antinociceptive effect of rofecoxib involves the activation of GMP-K⁺

channel pathway (Déciga-Campos and Lopez-Munoz, 2004) and serotonergic pathway (Sandrini et al., 2002). Recent studies suggest that diclofenac and lumiracoxib induced peripheral antinociception through the activation of the NO-cyclic GMP pathway (Lozano-Cuenca et al., 2005).

6.2.4.2. Local antinociceptive effect of cannabinoids and endocannabinoids

In this study, local administration of anandamide produced a significant reduction in pain behaviour. These findings are consistent with the ability of endocannabinoids to reduce hyperalgesia in rodent models of acute inflammation (Calignano et al., 1998; Richardson et al., 1998). Anandamide was reported to be 100 times more potent in preventing formalin-evoked pain behaviour when injected locally into the receptive field, compared to when it was administered intravenously (Calignano et al., 1998).

In the present study, anandamide was antinociceptive during the two phases of the formalin test (60 min) despite the fact that the point of its maximum inhibitory effect is usually reported to be at 10 min post-injection. The fact that anandamide was administered locally in peripheral tissue and therefore present in greater amount, as we have shown in this study, may explain its longer duration of action, whereas significant hydrolysis may account for its shortened antinociceptive effects when given systemically. Furthermore, another mechanism that would also explain the higher concentration of anandamide is the possibility of a shift of arachidonic acid metabolism towards endocannabinoid synthesis in response to COX inhibition (Gühring et al., 2002; Ates et al., 2003; Seidel et al., 2003). A third alternative, given the fact that COX-2 can metabolise anandamide *in vivo* in FAAH

knock out mice (Weber et al., 2004), is that NSAIDs can also act by preventing COX-2 removal of anandamide and thereby allow its build-up. This is why rofecoxib was used to test its analgesic interaction with anandamide.

Palmitoylethanolamide has anti-inflammatory and antinociceptive properties (Calignano et al., 1998) and the anti-inflammatory effects of this compound have been shown to depend on PPAR- α receptor activation (LoVerme et al., 2005a). In the present study, the increase in palmitoylethanolamide was greater when anandamide was given with rofecoxib compared with ibuprofen. This significant difference needs further investigation, as it suggests that rofecoxib may be able to elevate, through an as yet uncharacterised mechanism, tissue levels of this endogenous PPAR- α ligand.

6.2.4.3 Local antinociceptive effect of NSAIDs

At the site of inflammation in the periphery, inhibition of prostaglandin synthesis is a well-established mechanism by which NSAIDs exert their antinociceptive action (Taiwo and Levine, 1990). Indeed, the antinociceptive effect of NSAIDs administered locally has already been reported (Islas-Cadena et al., 1999; Aguirre-Banuelos and Granados-Soto, 2000; Francischi et al., 2002; Torres-Lopez et al., 2002; Ma and Eisenach, 2003), but the antinociceptive efficacy of selective COX-2 inhibitors compared to standard NSAIDs is controversial. In the present study, rofecoxib displayed antinociceptive effects at very low concentrations during the two phases of the formalin test but did not influence paw edema formation. To corroborate these findings another COX-2 inhibitor, NS-398, was tested and confirmed the data obtained with rofecoxib. It is quite surprising to see that rofecoxib was

analgesic in the first phase (acute) of the formalin test since COX-2 is expressed at very low levels in the periphery. However, induction of COX-2 expression may be increased by peripheral injury, leading to the development of COX-2 inhibitor sensitivity that may or may not be observed within the one hour window of the formalin test (Dirig et al., 1997). Furthermore, the same authors have already demonstrated that an acute stimulus, such as intraplantar injection of formalin, could lead to an immediate increase in prostaglandin (PG) release (Dirig et al., 1997). It is suggested that this increased PGE₂ release is mediated by COX-2 and not COX-1 pharmacology, and because the effects are observed acutely, this COX-2 must by definition be constitutively expressed (Ghilardi et al., 2004). Indeed, in many peripheral tissues COX-2 is normally expressed at very low levels but is dramatically upregulated after tissue injury (Ghilardi et al., 2004). Other authors have suggested that products of COX-2 can be released in the injected paw immediately after formalin injection and that intraplantar injection of celecoxib completely inhibited development of secondary hyperalgesia (Veiga et al., 2004). Finally, in a study by Yamamoto & Nozaki-Taguchi (2002), intrathecal administration of celecoxib and indomethacin was associated with a significant decrease in the number of flinching in both phase 1 and 2 of the formalin test compared to vehicle-treated rats, although it was not significant for the first phase when the two drugs were administered orally. Considering suggestions from Dirig et al. (1997) and Ghilardi et al. (2004) mentioned above, it is possible that intraplantar injection of NaCl 0.9% and rofecoxib or NS-398 15 min prior to injection of formalin may have induced COX-2 expression locally.

6.2.4.4 Paw tissue levels of fatty-acid ethanolamides

Other authors have already measured endocannabinoid concentrations or FAAH activity in rodent skin paw tissue (Beaulieu et al., 2000; Holt et al. 2005). However, in the study by Beaulieu et al. where levels of anandamide, palmitoylethanolamide and 2-AG were measured in rat paw skin during control and formalin-induced inflammation conditions results were expressed in pmol/mg of extracted lipids, whereas in the present study the results are expressed in pmol/g of tissues. Furthermore, we did not measure levels of endocannabinoids in control levels but after injection of saline and then formalin into the paw. Therefore direct comparisons between the two studies are difficult. However, Beaulieu et al. (2000) did not find any increase in endocannabinoid levels after the injection of formalin. FAAH activity was also not different between the two conditions. On the contrary, Holt et al. (2005) showed that FAAH activity in the paws of the inflamed vehicle-treated mice was significantly lower than the corresponding activity in the non-inflamed mice.

We have observed that there was a marked difference between the 50% increase in anandamide levels when given alone vs. anandamide + rofecoxib compared with levels of oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide (100% increase). The explanation for such a difference is not obvious but we can suggest, at least for palmitoylethanolamide, that FAAH is also involved in its metabolism, therefore in presence of an inhibitor of FAAH activity like an NSAID, it is logical to observe such an increase. A reason could be the local pH values of the tested substances, however, the pH of ibuprofen and rofecoxib were found

to be similar and not different from normal saline (data not shown). Finally, it could be that in the presence of a COX-2 inhibitor, less anandamide can be converted into its COX-2 metabolite, PGF_{2α} ethanolamide (Woodward et al., 2000).

One limitation of the study would be the use of DMSO in behavioural experiments. Indeed, DMSO should be avoided when possible in *in vivo* experiments due to a possible analgesic / sedative effect. However, experiments comparing saline and saline with 50% DMSO in a significant number of animals showed that no difference could be found between the two groups.

In conclusion, peripheral administration of anandamide or rofecoxib is associated with a decrease in pain behaviour in animals submitted to acute and inflammatory pain. The association of an endocannabinoid with an NSAID (specific COX-2 inhibitor) produced a synergistic antinociceptive effect. This antinociceptive effect is mediated in part by cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors (Guindon et al., 2006) but not by TRPV1 receptors. Furthermore, fatty-acid amide concentrations in paw tissues are increased when anandamide is administered with an NSAID. The contribution of the cannabinoid receptors and of other mechanisms possibly involved, such as PPAR-α receptors, needs to be further investigated.

6.2.5 Acknowledgments

We wish to thank Dr Robert Élie for his kind help with some of the statistical analyses. This work was supported by a research grant from the Research Centre of the CHUM – Montréal and by a grant from Organon Canada (P.B.), and by grants from the National Institute on Drug Abuse (NIDA) 12447 and 3412 (D.P.). A.D.L. is recipient of a Merck Frosst Canada Research Chair in Pharmacology.

6.2.6 References

Aguirre-Banuelos, P., Granados-Soto, V., 2000. Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxicam in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.* 395, 9-13.

Ates, M., Hamza, M., Seidel, K., Kotalla, C.E., Ledent, C., Guhring, H., 2003. Intrathecally applied flurbiprofen produces an endocannabinoid-dependent antinociception in the rat formalin test. *Eur. J. Neurosci.* 17, 597-604.

Beaulieu, P., Bisogno, T., Punwar, S., Farquhar-Smith, W.P., Ambrosino, G., Di Marzo, V., Rice, A.S., 2000. Role of the endogenous cannabinoid system in the formalin test of persistent pain in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 396, 85-92.

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

Choi, H.S., Lee, H.J., Jung, C.Y., Ju, J.S., Park, J.S., Ahn, D.K., 2003. Central cyclooxygenase-2 participates in interleukin-1 beta-induced hyperalgesia in the orofacial formalin test of freely moving rats. *Neurosci. Lett.* 352, 187-190.

Conti, S., Costa, B., Colleoni, M., Parolaro, D., Giagnoni, G., 2002. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 135, 181-187.

Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B., 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384, 83-87.

Deciga-Campos, M., Lopez-Munoz, F.J., 2004. Participation of the L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K⁺ channel cascade in the antinociceptive effect of rofecoxib. *Eur. J. Pharmacol.* 484, 193-199.

De Léan, A., Munson, P.J., 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.

Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-1949.

Dirig, D.M., Konin, G.P., Isakson, P.C., Yaksh, T.L., 1997. Effect of spinal cyclooxygenase inhibitors in rat using the formalin test and in vitro prostaglandin E2 release. *Eur. J. Pharmacol.* 331, 155-160.

Draper, N.R., Smith, H., 1998. *Applied regression analysis*. Wiley, New York, NY.

Fowler, C.J., Janson, U., Johnson, R.M., Wahlstrom, G., Stenstrom, A., Norstrom, K., Tiger, G., 1999. Inhibition of anandamide hydrolysis by the enantiomers of ibuprofen, ketorolac and flurbiprofen. *Arch. Biochem. Biophys.* 362, 191-196.

Fowler, C.J., Stenstrom, A., Tiger, G., 1997. Ibuprofen inhibits the metabolism of the endogenous cannabimimetic agent anandamide. *Pharmacol. Toxicol.* 80, 103-107.

Francischi, J.N., Chaves, C.T., Moura, A.C., Lima, A.S., Rocha, O.A., Ferreira-Alves, D.L., Bakhle, Y.S., 2002. Selective inhibitors of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 137, 837-844.

Fu, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Lo Verme, J., Serrano, A., Rodriguez De Fonseca, F., Rosengarth, A., Luecke, H., Di Giacomo, B., Tarzia, G., Piomelli, D., 2003. Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature* 425, 90-93.

Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., Casellas, P., 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* 232, 54-61.

Ghilardi, J.R., Svensson, C.I., Rogers, S.D., Yaksh, T.L., Mantyh, P.W., 2004. Constitutive spinal cyclooxygenase-2 participates in the initiation of tissue injury-induced hyperalgesia. *J. Neurosci.* 24, 2727-2732.

Giuffrida, A., Rodriguez de Fonseca, F., Piomelli, D., 2000. Quantification of bioactive acylethanolamides in rat plasma by electrospray mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 280, 87-93.

Grabovsky, Y., Tallarida, R.J., 2004. Isobolographic analysis for combinations of a full and partial agonist: curves isoboles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310, 981-986.

Gühring, H., Hamza, M., Sergejeva, M., Ates, M., Kotalla, C.E., Ledent, C., Brune, K., 2002. A role for endocannabinoids in indomethacin-induced spinal antinociception. *Eur. J. Pharmacol.* 454, 153-163.

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

Holt, S., Comelli, F., Costa, B., Fowler, C.J., 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.

Islas-Cadena, M., Aguirre-Banuelos, P., Granados-Soto, V., 1999. Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive effect of nimesulide. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 42, 87-92.

Kwak, J.Y., Jung, J.Y., Hwang, S.W., Lee, W.T., Oh, U., 1998. A capsaicin-receptor antagonist, capsazepine, reduces inflammation-induced hyperalgesic responses in the rat: evidence for an endogenous capsaicin-like substance. *Neuroscience* 86, 619-626.

Lo Verme, J., Fu, J., Astarita, G., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., Piomelli, D., 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.
- Lozano-Cuenca, J., Castaneda-Hernandez, G., Granados-Soto, V., 2005. Peripheral and spinal mechanisms of antinociceptive action of lumiracoxib. *Eur. J. Pharmacol.* 513, 81-91.
- Ma, W., Eisenach, J.C., 2003. Intraplantar injection of a cyclooxygenase inhibitor ketorolac reduces immunoreactivities of substance P, calcitonin gene-related peptide, and dynorphin in the dorsal horn of rats with nerve injury or inflammation. *Neuroscience* 121, 681-690.
- Malan, T.P., Ibrahim, M.M., Deng, H., Liu, Q., Mata, H.P., Vanderah, T., Porreca, F., Makriyannis, A., 2001. CB₂ cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 93, 239-245.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564.
- Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-65.

Nackley, A.G., Suplita, R.L. 2nd, Hohmann, A.G., 2003. A peripheral cannabinoid mechanism suppresses spinal fos protein expression and pain behaviour in a rat model of inflammation. *Neuroscience* 117, 659-670.

Pertwee, R.G., 1999. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem.* 6, 635-664.

Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A., Rodriguez de Fonseca, F., 2000. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 218-224.

Price, T.J., Patwardhan, A.M., Flores, C.M., Hargreaves, K.M., 2005. A role for the anandamide membrane transporter in TRPV1-mediated neurosecretion from trigeminal sensory neurons. *Neuropharmacology* 49, 25-39.

Rice, A.S., Farquhar-Smith, W.P., Nagy, I., 2002. Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66, 243-256.

Richardson, J.D., Kilo, S., Hargreaves, K.M., 1998. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB₁ receptors. *Pain* 75, 111-119.

Sandrini, M., Vitale, G., Pini, L.A., 2002. Effect of rofecoxib on nociception and the serotonin system in the rat brain. *Inflamm. Res.* 51, 154-159.

Seidel, K., Hamza, M., Ates, M., Gühring, H., 2003. Flurbiprofen inhibits capsaicin induced calcitonin gene related peptide release from rat spinal cord via an endocannabinoid dependent mechanism. *Neurosci. Lett.* 338, 99-102.

Showalter, V.M., Compton, D.R., Martin, B.R., Abood, M.E., 1996. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 989-999.

Taiwo, Y.O., Levine, J.D., 1990. Effects of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism on cutaneous nociceptive threshold in the rat. *Brain Res.* 537, 372-374.

Tallarida, R.J., Stone, D.J. Jr., Raffa, R.B., 1997. Efficient designs for studying synergistic drug combinations. *Life Sci.* 61, 417-425.

Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5-17.

Torres-Lopez, J.E., Ortiz, M.I., Castaneda-Hernandez, G., Alonso-Lopez, R., Asomoza-Espinosa, R., Granados-Soto, V., 2002. Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test. *Life Sci.* 70, 1669-1676.

Veiga, A.P., Duarte, I.D., Avila, M.N., da Motta, P.G., Tatsuo, M.A., Francischi, J.N., 2004. Prevention by celecoxib of secondary hyperalgesia induced by formalin in rats. *Life Sci.* 75, 2807-2817.

Watson, G.S., Sufka, K.J., Coderre, T.J., 1997. Optimal scoring strategies and weights for the formalin test in rats. *Pain* 70, 53-58.

Weber, A., Ni, J., Ling, K.H., Acheampong, A., Tang-Liu, D.D., Burk, R., Cravatt, B.F., Woodward, D., 2004. Formation of prostamides from anandamide in FAAH knockout mice analyzed by HPLC with tandem mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 45, 757-763.

Winer, B.J., 1971. *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw-Hill, New York, NY.

Woodward, D.F., Krauss, A.H., Chen, J., Gil, D.W., Kedzie, K.M., Protzman, C.E., Shi, L., Chen, R., Krauss, H.A., Bogardus, A., Dinh, H.T., Wheeler, L.A., Andrews, S.W., Burk, R.M., Gac, T., Roof, M.B., Garst, M.E., Kaplan, L.J., Sachs, G., Pierce, K.L., Regan, J.W.,

Ross, R.A., Chan, M.F., 2000. Replacement of the carboxylic acid group of prostaglandin F_{2α} with a hydroxyl or methoxy substituent provides biologically unique compounds. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1933-1943.

Yamamoto, T., Nozaki-Taguchi, N., 2002. The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. *Anesth. Analg.* 94, 962-967.

Yang, W., Ni, J., Woodward, D.F., Tang-Liu, D.D., Ling, K.H., 2005. Enzymatic formation of prostamide F_{2α} from anandamide involves a newly identified intermediate metabolite, prostamide H₂. *J. Lipid Res.* 46, 2745-2751.

6.2.7 Figures legend

Figure 1

(A) Dose-response curves for anandamide (full circle), rofecoxib (open squares) and their combination (full triangles) in the inflammatory phase of the formalin test. Data is expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 6$).

(B) Isobolographic analysis of anandamide/rofecoxib interaction in the inflammatory phase of the formalin test. Drug interactions may be suggested by constructing an isobologram. The ED_{50} s of the two drugs are respectively plotted on the x and y axes. The straight line connecting these two points is the theoretical additive line. If the experimental derived isobole (a point representing x, y coordinates for ED_{50}) is plotted significantly below the theoretically additive isobole, the interactive effect is identified to be synergistic. Mix 1:11 = equieffective dose of the fixed 1:11 drug mixture; Add 1:11 = expected additive 1:11 combination. The difference between experimental and theoretical points was significant ($P < 0.001$) indicating synergistic effect.

Figure 2

Effects of anandamide and rofecoxib given on the dorsal surface of the ipsilateral (A) and contralateral (B) hind paws 15 min before 2.5% formalin (50 μ l). Data is expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 4$). † AUC = Area Under the Curve for the acute phase, $P < 0.01$ for

analgesics vs. 0.9% NaCl; # AUC for the inflammatory phase, $P < 0.001$ for analgesics vs. 0.9% NaCl.

Figure 3

Effects of anandamide and rofecoxib at ED_{50} doses or their combination given into the hind paws 15 min before 2.5% formalin (50 μ l). The upper part of the figure displays the analgesic effects of the drugs compared to control. Phase 1: Additive effect of anandamide combined with rofecoxib for the acute phase of the test (0-15 min). Phase 2: Additive effect of anandamide combined with rofecoxib for the inflammatory phase of the test (15-50 min). Paw edema. Data is expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 6$). Anan = anandamide, Rofe = rofecoxib. † Area Under the Curve (AUC) for the acute phase, $P < 0.01$ for analgesics vs. NaCl 0.9 %; # AUC for the inflammatory phase, $P < 0.001$ for analgesics vs. NaCl 0.9 %; * anandamide vs. without anandamide, $P < 0.001$; ‡ rofecoxib vs. without rofecoxib, $P < 0.025$.

Figure 4

Effects of NS-398 (159 nmol) and rofecoxib (31.81 nmol) given into the hind paws 15 min before 2.5 % formalin (50 μ l). The upper part of the figure displays the analgesic effects of the drugs compared to control. Phase 1: Analgesic effect of NS-398 and rofecoxib for the acute phase of the test (0-15 min). Phase 2: Analgesic effect of NS-398 and rofecoxib for the inflammatory phase of the test (15-50 min). Data is expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 7$).

† Area Under the Curve (AUC) for the acute phase, $P < 0.005$ for analgesics vs. NaCl 0.9 %; # AUC for the inflammatory phase, $P < 0.001$ for analgesics vs. NaCl 0.9 %; * NS-398 or Rofecoxib vs. NaCl 0.9 %, $P < 0.005$.

Figure 5

Effect of capsazepine on ibuprofen, anandamide and their combination. Acute phase (0-15 min) (Phase 1). Inflammatory phase (15-50 min) (Phase 2). Data is expressed as mean \pm S.E.M. (n=4). Anan = anandamide (ED₅₀ dose), Ibu = ibuprofen (ED₅₀ dose), Capsa = capsazepine (2.65 μ mol). * drugs vs. control group, $P < 0.001$; † anan + ibu vs. anandamide, $P < 0.005$; # capsa + anan + ibu vs capsa, $P < 0.01$.

Figure 6

Effects of capsazepine on rofecoxib, anandamide and their combination. Acute phase (0-15 min) (Phase 1). Inflammatory phase (15-50 min) (Phase 2). Data is expressed as mean \pm S.E.M. (n=4). Anan = anandamide (ED₅₀ dose), Rofe = rofecoxib (ED₅₀ dose), Capsa = capsazepine (2.65 μ mol). * drugs vs. control group, $P < 0.001$; † anan + rofe vs. anandamide, $P < 0.01$; # capsa + anan + rofe vs capsa, $P < 0.005$.

Figure 7

Amount in pmol/g of tissue of anandamide (A), oleoylethanolamide (B) and palmitoylethanolamide (C) following local administration of anandamide, ibuprofen, rofecoxib or their combinations. Data is expressed as mean \pm S.E.M. (n=4). Anan = anandamide (ED₅₀ dose), Ibu = ibuprofen (ED₅₀ dose), Rofe = rofecoxib (ED₅₀ dose). * anandamide + NSAIDs vs. drugs given alone, $P < 0.001$; ‡ anandamide + rofecoxib vs. anandamide + ibuprofen, $P < 0.025$.

Figure 1

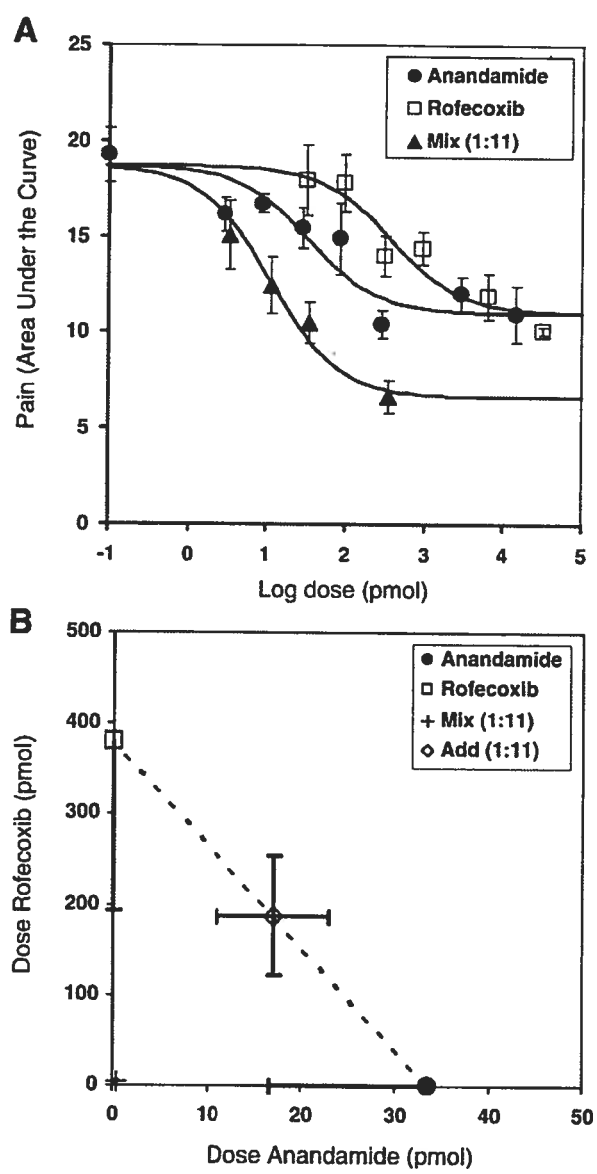


Figure 2

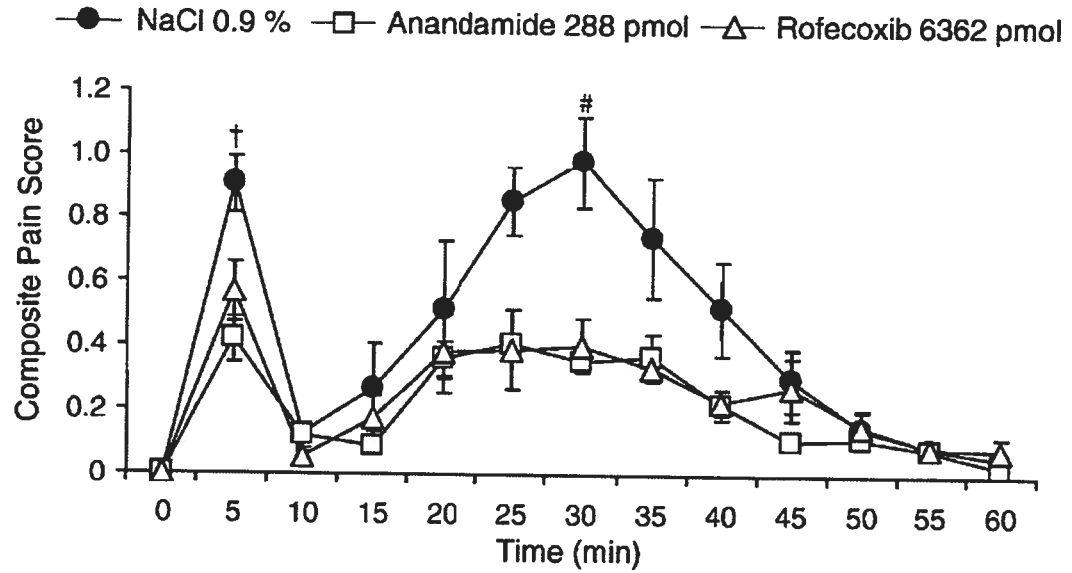
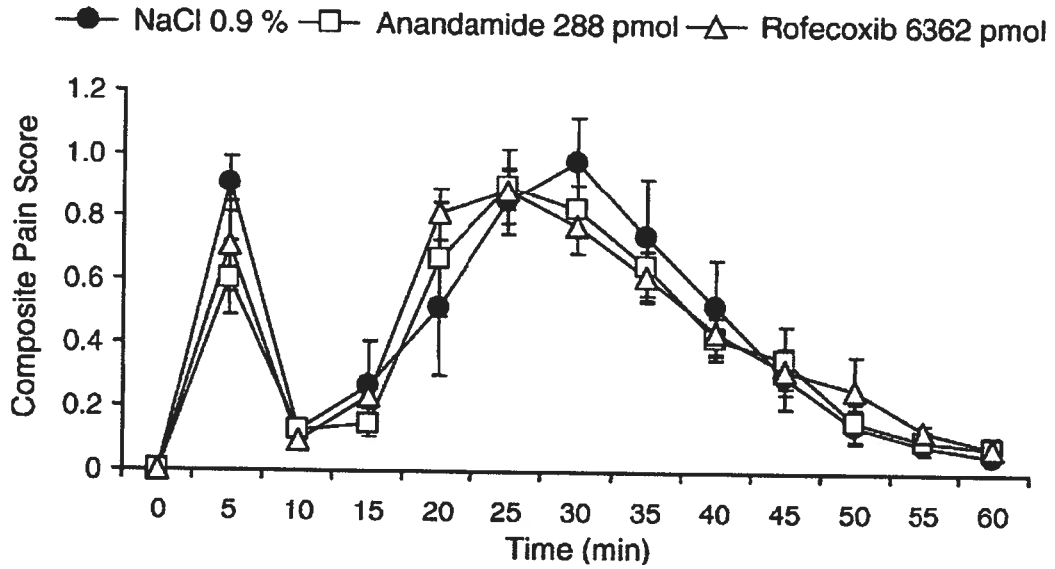
A**B**

Figure 3

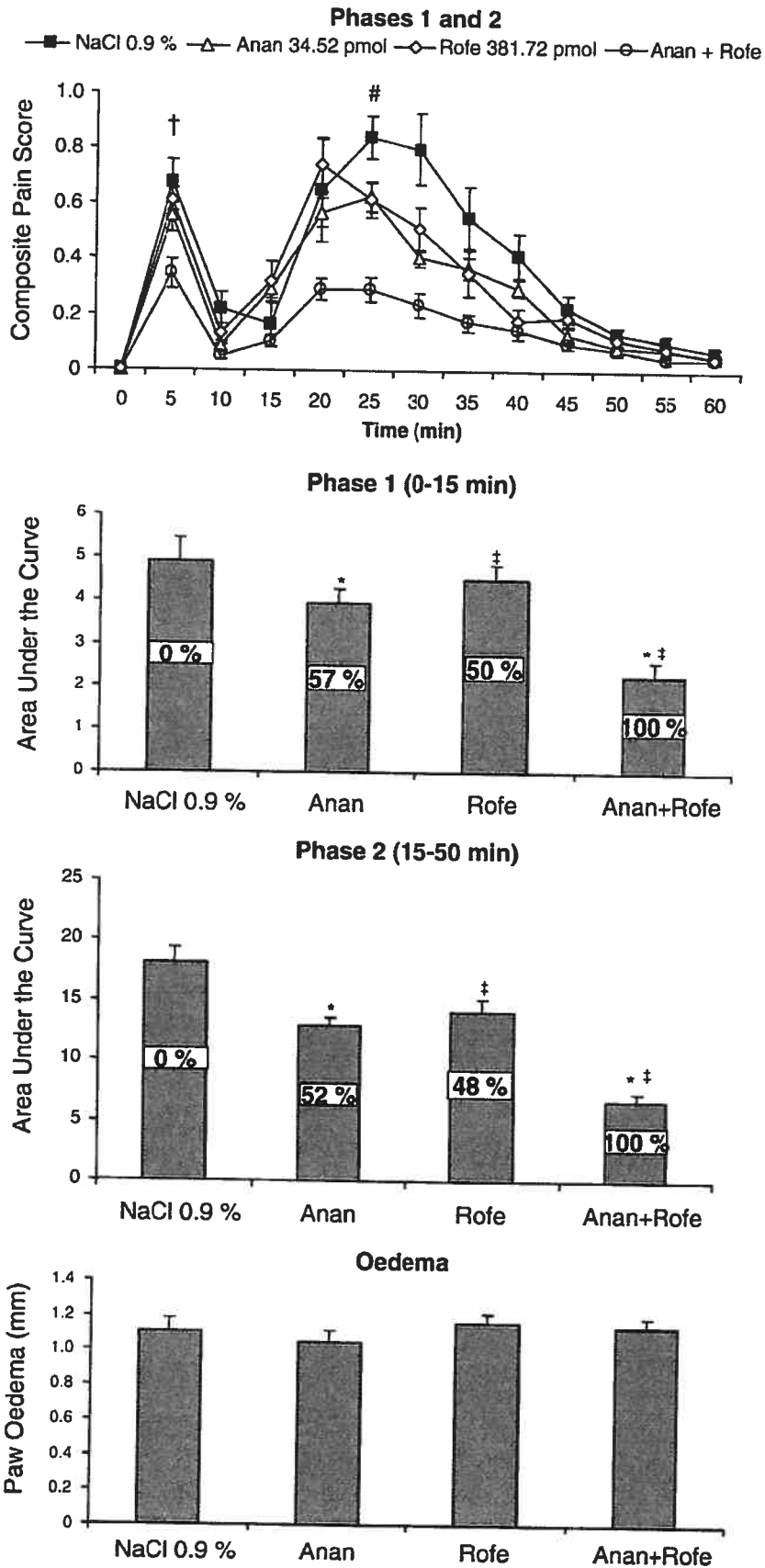
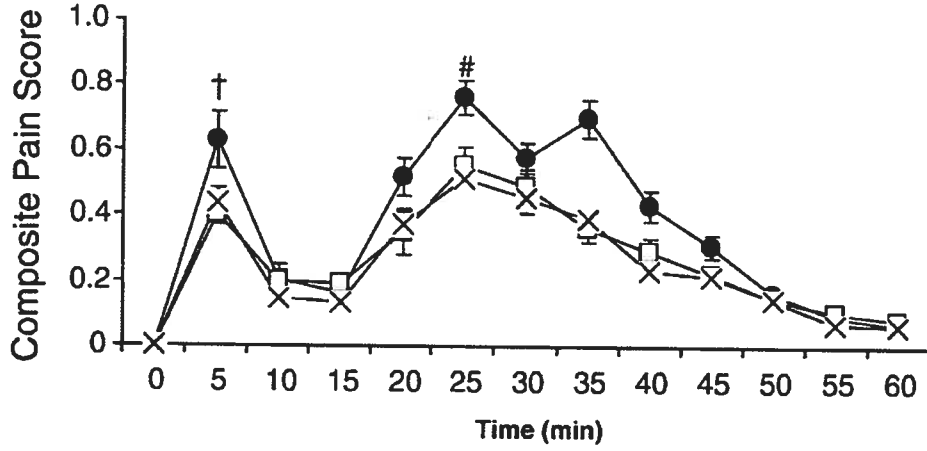


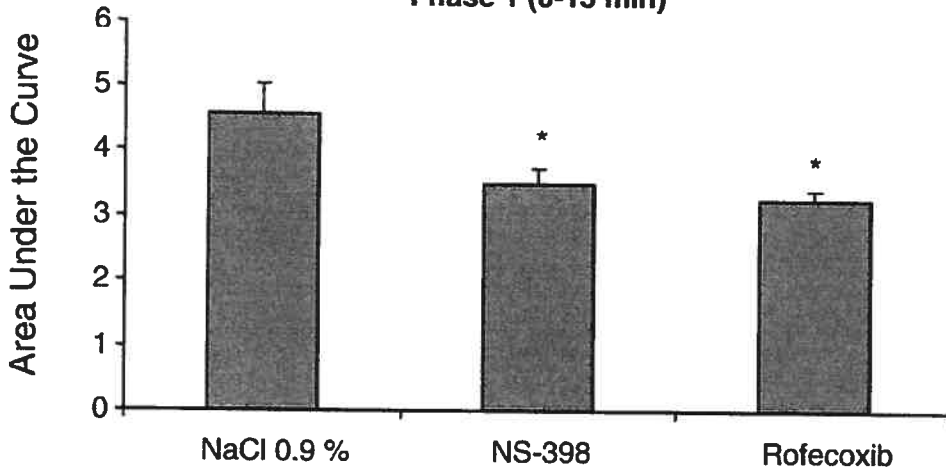
Figure 4

Phases 1 and 2

● NaCl 0.9 % □ NS-398 159 nmol × Rofecoxib 31.81 nmol



Phase 1 (0-15 min)



Phase 2 (15-50 min)

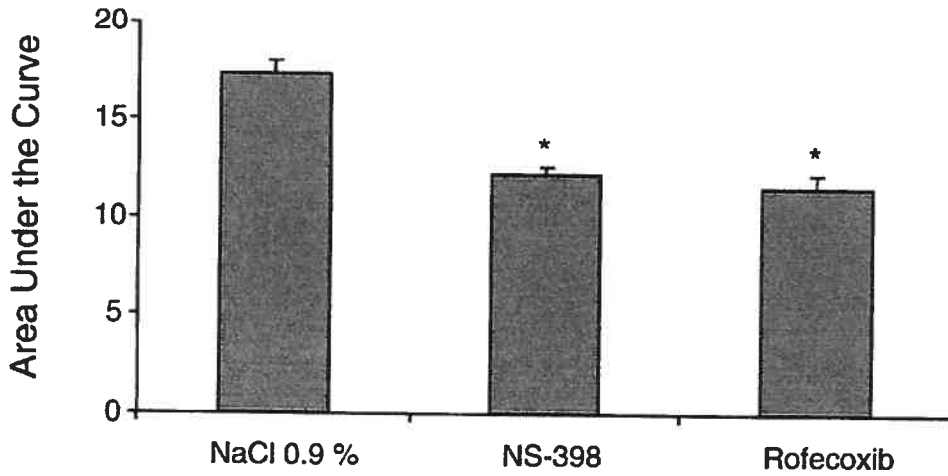


Figure 5

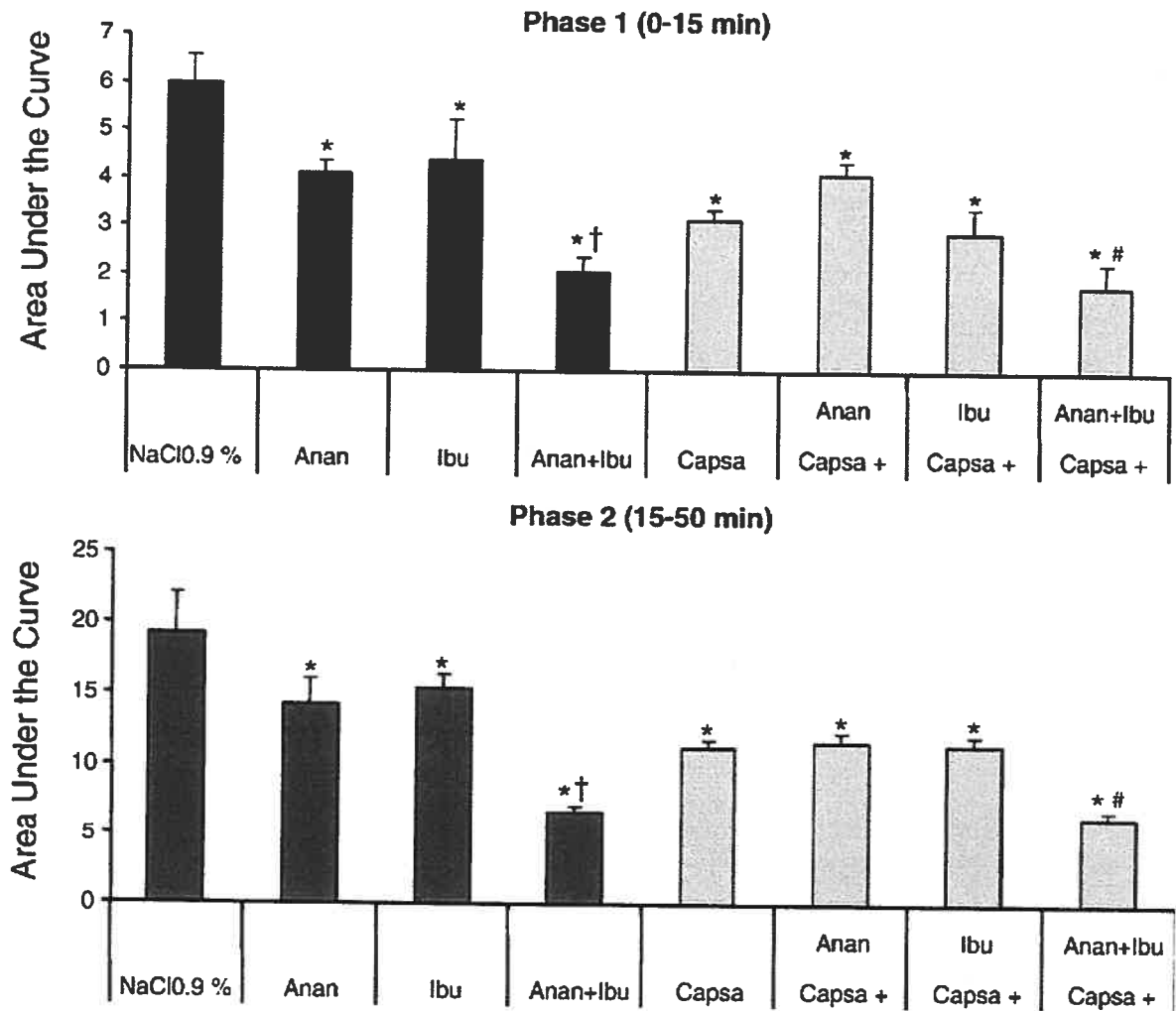


Figure 6

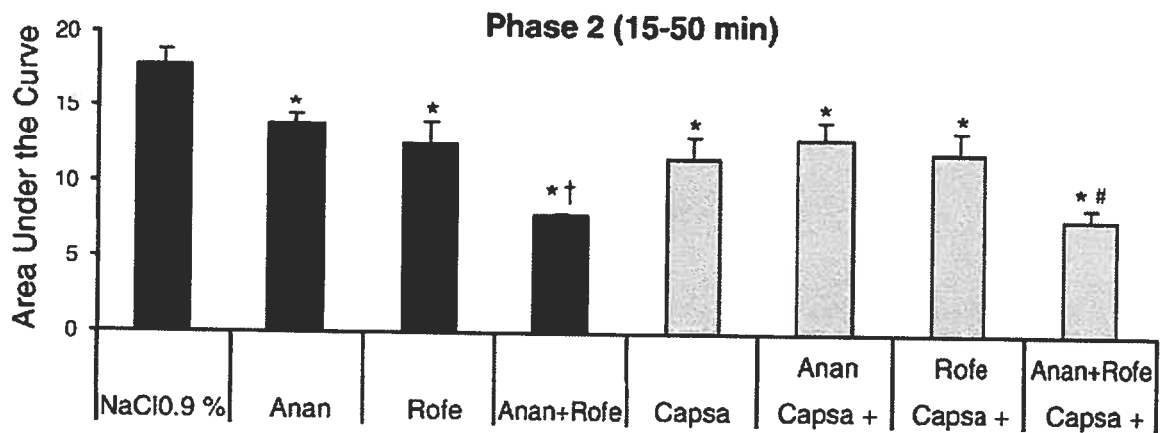
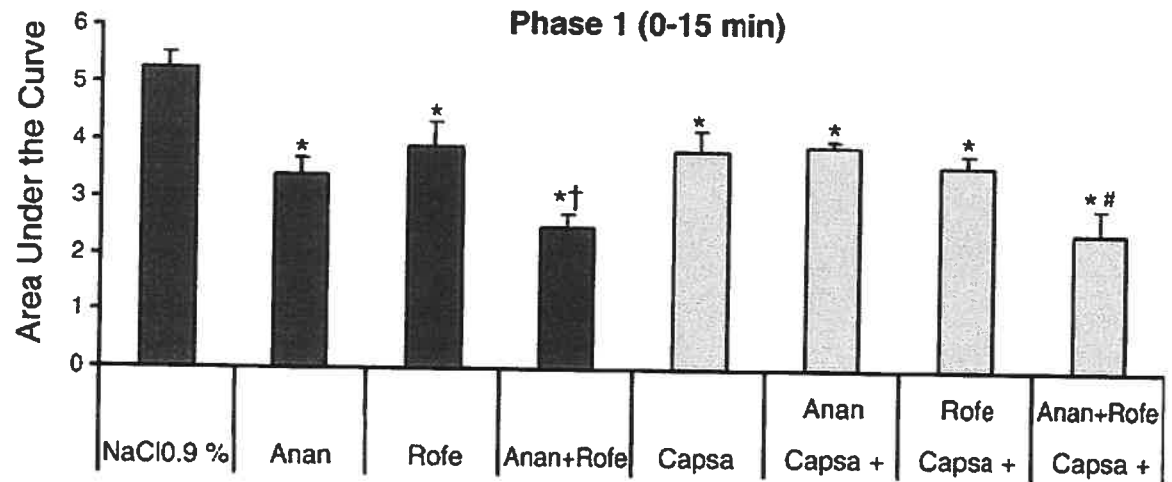
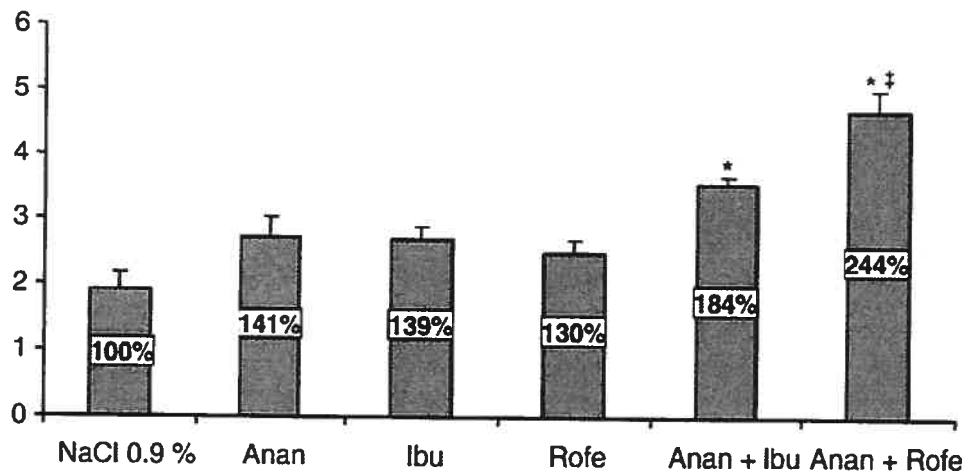
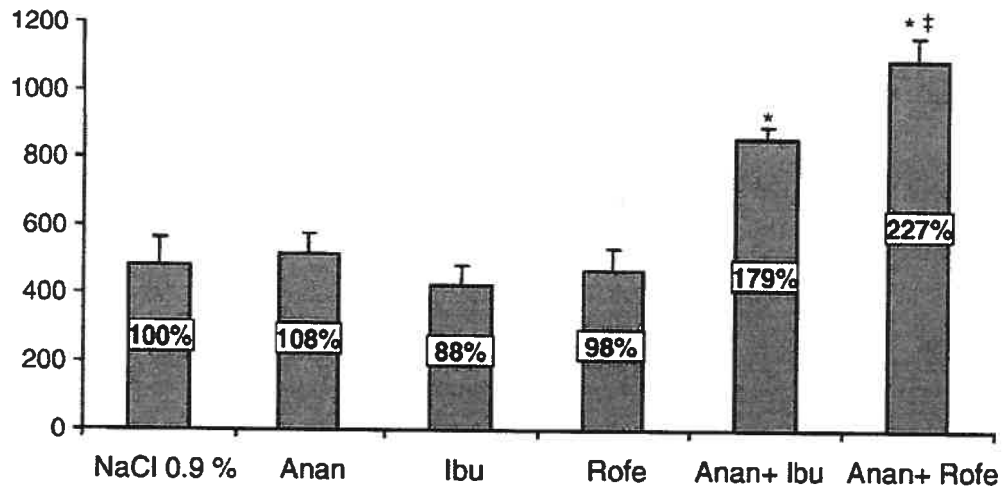
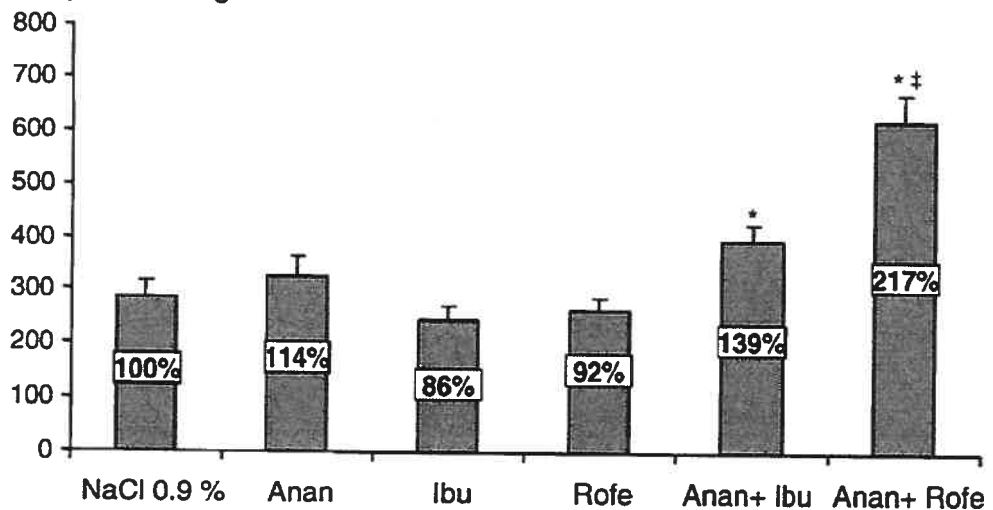


Figure 7

A pmol AEA/g of tissue**B** pmol OEA/g of tissue**C** pmol PEA/g of tissue

6.3 Article 3 publié dans *British Journal of Pharmacology*

“The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB2 receptors”

Short running title: 2-AG peripheral antinociceptive effects

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

Departments of Pharmacology¹ and Anesthesiology²-, Faculty of Medicine,

Université de Montréal


[#] These authors contributed equally to the work

* Author for correspondence: Pierre Beaulieu M.D., Ph.D. CHUM – Hôtel-Dieu

Department of Anesthesiology - 3840 rue St-Urbain, Montréal H2W 1T8 Québec - Canada

Tel: (1) 514-481-8414

Fax: (1) 514-412-7222

E-mail: 

6.3.0 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

6.3.1 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, accumulating evidence has suggested 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. 2006) 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

Jaggari et al. (1998) both demonstrated that palmitoylethanolamide (PEA), a peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) agonist (Lo Verme et al., 2005) whose anti-inflammatory effects are antagonised by a CB₂ receptor antagonist, produces antinociception in the formalin test (late-phase). In addition, AM1241, a CB₂ selective agonist, attenuated thermal nociception and hyperalgesia (Malan et al., 2001; Malan et al., 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.

Thereby, there is 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 into arachidonic acid and glycerol by an enzyme named monoacylglycerol lipase (MGL) (Dinh et al., 2002; Dinh et al., 2004; Saario et al., 2004). Nevertheless, some data suggest that 2-AG might also be metabolised 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, Hohmann et al. developed URB602, a non-competitive MGL inhibitor that blocks 2-AG hydrolysis (Hohmann et al., 2005; Makara et

al., 2005), and which is more potent than URB597 to enhance 2-AG levels and stress antinociception.

Therefore, the present study was designed to investigate the peripherally (intraplantar) mediated antinociceptive effects of 2-AG, URB602 and their association in a test of inflammatory pain. The mechanism by which 2-AG would be able to produce its antinociceptive effect was also investigated by using specific antagonists for the cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors.

6.3.2 Methods

6.3.2.1 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.

6.3.2.2 Drug administration

2-AG, an endogenous cannabinoid, is an agonist with a 3-fold selectivity for the CB₁ receptor ($K_i = 0.47$ mM) over the CB₂ receptor ($K_i = 1.4$ mM) (Mechoulam et al., 1995;

Lee et al., 1995; Sugiura et al., 1996). It was purchased from Sigma (St-Louis, MO, USA) already in a liquid form in acetonitrile solution and further dissolved in normal saline (0.9% NaCl in water). 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% dimethylsulphoxide (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 to 33 % DMSO. Both 2-AG and URB602 were stored at -20°C, protected from light and were prepared fresh on the day of the experiment.

6.3.2.3 Formalin test

Rats were acclimatised to the testing environment (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.

6.3.2.4 Protocol

The experiments were conducted in a randomised and blinded manner by the same experimenter. In a first study, the dose-response curves for 2-AG were determined using the data from the early and late phases. In a second study, the antinociceptive effects of 2-AG (at 10 µg, an analgesic dose) 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 et al., 2006; Guindon & Beaulieu, 2006) and AM630 (25 µg; Malan et al., 2001; Guindon et al., 2006; Guindon & Beaulieu, 2006) were co-injected with the 2-AG. In a third study, the dose-response curves for URB602 were determined using the data from the acute and the 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) 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.

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).

6.3.2.5 Paw edema

At the end of the formalin test, paw edema 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., 2006).

6.3.2.6 Statistical Analysis

Pain behaviour for each treatment group was expressed as mean ± s.e.mean. 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 ANOVA adapted for factorial experimental design was used. The different components of the total variation were settled *a priori* using multiple regression analysis (Draper & Smith, 1998). The critical level of significance was set at 5 % ($P < 0.05$).

6.3.3 Results

6.3.3.1 Antinociceptive effects of 2-AG and implication of cannabinoid receptors

2-AG decreased pain behaviour in the formalin test with an ED_{50} of $0.12 \mu\text{g} \pm 0.224$ and $0.65 \mu\text{g} \pm 0.455$ for the early and late phases, respectively (**Figure 1A, 1B**). 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 [$F(1,6) = 11,78$, $P < 0,025$] 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 [$F(1,6) = 0.05$ and 4.50 for the early and late phases, respectively] of the formalin test (**Figure 2B**).

When given locally (dorsal surface of the paw) at $10 \mu\text{g}$, 2-AG produced an antinociceptive effect when compared with the control group reaching significance only for the late phase [$F(1,36) = 35.61$, $P < 0.001$] of the formalin test (**Figure 3A, 3C**). This antinociceptive effect was inhibited only by AM630 since there was no statistical difference between this

antagonist given alone compared with its combination with 2-AG for the early and late phases, respectively [$F(1,36) = 0.04$ and 0.18] (**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.

6.3.3.2 Paw edema

Edema of the injected paw did not differ among the groups [$F(5,36) = 0.58$]: neither 2-AG [$F(1,36) = 0.79$] nor AM251 [$F(1,36) = 0.38$] or AM630 [$F(1,36) = 0.10$] influenced paw edema (**Figure 3D**).

6.3.3.3 Antinociceptive effects of URB602, 2-AG and their combination at ED_{50} doses

URB602 decreased pain behaviour in the formalin test with an ED_{50} of $128.3 \mu\text{g} \pm 110.5$ and $67.93 \mu\text{g} \pm 14.31$ for the early and late phases, respectively (**Figure 4A, 4B**). 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 [$F(1,4) = 98,19$, $P < 0,001$] or the late phase [$F(1,4) = 257,99$, $P < 0,001$] 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 [$F(1,4) = 5.25$ and 1.96 for the early and late phases, respectively] of the formalin test (**Figure 5B**).

When given locally (dorsal surface of the paw) at ED_{50} dose, 2-AG, URB602 and their combination produced a significant antinociceptive effect when compared with the control group either for the first (**Figure 6A, 6B**) [$F(1,12) = 16.15$, $P < 0.005$] or the second phase

(**Figure 6A, 6C**) [$F(1,12) = 56.46, P < 0.001$] of the formalin test. The combination of 2-AG with URB602 is significantly different when compared with each drug given alone [$F(1,12) = 7.91, P < 0.025$] for the late phase (**Figure 6A, 6C**), revealing an additive antinociceptive effect of this combination.

6.3.3.4 Paw edema

Edema of the injected paw did not differ among the groups [$F(3,12) = 0.17$]: 2-AG and URB602 [$F(1,12) = 0.22$] did not influence paw edema when given alone, neither did their combination [$F(1,12) = 0.15$] (**Figure 6D**).

6.3.3.5 Antinociceptive effects of URB602 and implication 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 [$F(1,18) = 33.94, P < 0.001$] of the formalin test (**Figure 7A, 7C**). This antinociceptive effect was inhibited by AM251 and AM630 since there was no statistical difference between those antagonists given alone compared with their combination with URB602 for the early and late phases, respectively [$F(1,18) = 0.07$ and 0.11 ; $F(1,18) = 0.05$ and 0.10] (**Figure 7A, 7B, 7C**).

6.3.3.6 Paw edema

Edema of the injected paw did not differ among the groups [$F(5,18) = 0.70$]: neither URB602 [$F(1,18) = 0.10$] nor AM251 [$F(1,18) = 1.92$] nor AM630 [$F(1,18) = 0.01$] influenced paw edema (**Figure 7D**).

6.3.4 Discussion

In this study, it has been demonstrated 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. 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), the contribution of peripheral nociceptive activity to phase 2 of the behavioural response to formalin has been determined. Indeed, primary afferent activity is required for the expression of phase 2 nociceptive behaviours, and central sensitisation alone does not underlie phase 2 (Puig & Sorkin, 1995; McCall et al., 1996). 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 & Henry (2002) have provided evidence for an essential role of afferent input during the second phase of the formalin test in generating and maintaining second phase elevated discharge of spinal nociceptive dorsal horn neurones. Taken together, these

findings on the second phase of the formalin test may favoured pharmacological approach, not only of inhibitors of synaptic transmission from nociceptive afferents but also treatments targeted at inhibiting primary afferent activity at a peripheral site (Pitcher & 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 postdischarge 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; Nackley et al., 2003a; Quartilho et al., 2003; Ibrahim et al., 2006). 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 mRNA was not detected in the brain, supporting the evidence that CB₂ receptors are absent in neurons of the central nervous system (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 unwanted central nervous system effects usually 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 (Galiègue et al., 1995; Facci et al., 1995) and on peripheral nerve terminals (Griffin et al., 1997; Pertwee, 1999). 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 which mean 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., 2006). 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 is

looking at 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. A 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 conflicting. 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 sensitising molecules acting on the peripheral nociceptor (e.g. nerve growth factor (NGF), 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 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 selective inhibitor of 2-AG-deactivating enzyme MGL may selectively elevate 2-AG concentrations in the periphery and thereby decrease pain behaviour. Thus, Hohmann et al. (2005) have developed URB602, a non-competitive MGL inhibitor that blocks 2-AG hydrolysis in rat brain slices without affecting FAAH-catalyzed 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 periphery. Moreover, the ability of both MGL and FAAH inhibitors to magnify endocannabinoid-dependent stress induced analgesia also highlights the significance of these enzymes as previously undescribed 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 not completely expected. Indeed, if URB602 inhibited MGL and therefore 2-AG degradation, we would have thought that AM251 would not interfere with URB602 antinociceptive effects as it did not when 2-AG was administered together with AM251. 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 in the presence of an inhibitor of MGL 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 increase concentration of anandamide, which is present in peripheral tissue, may explain the antinociceptive effects observed.

Furthermore, although URB602 is a selective inhibitor of MGL, it has a low potency (Hohmann et al., 2005). Therefore, the use of a more potent and selective agent could be considered. URB574 is such an agent which also inhibits MGL activity but with a half-maximal concentration (IC_{50}) 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 CB_1 and CB_2 . In fact, 2-AG may possibly exerts its antinociceptive effects at uncharacterised CB_2 -like receptors possibly activated by 2-AG and inhibited by AM630, a selective CB_2 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 CB_2 mechanism in the periphery is sufficient to decrease nociception in animals submitted to 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 should avoid troublesome psychotropic and other systemic effects.

6.3.5 Acknowledgments

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

6.3.6 References

- Beaulieu P, Bisogno T, Punwar S, Farquhar-Smith WP, Ambrosino G, Di Marzo V, Rice AS (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, Liu J, Kunos G (2005). Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* 106: 133-145.
- Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, Glass M, Zimmer A (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]GTPγS 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, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (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: PL191-197.

- 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-arachidonyl 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, Huffman JW, Yu S, Lainton JA, Pertwee RG (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, De Léan A, Beaulieu P (2006). 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, Pertwee RG, Ross RA, Mechoulam R, Fride E (1999). HU-308: a specific agonist for CB₂, a peripheral cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14228-14233.

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, Krey JF, Walker JM, Holmes PV, Crystal JD, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D (2005). An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435: 1108-1112.

Hosohata Y, Quock RM, Hosohata K, Makriyannis A, Consroe P, Roeske WR, Yamamura HI (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, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Makriyannis A, Malan TP Jr (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, Rude ML, Stagg NJ, Mata HP, Lai J, Vanderah TW, Porreca F, Buckley NE, Makriyannis A, Malan TP Jr (2006). CB₂ cannabinoid receptor mediation of antinociception. *Pain* 122: 36-42.

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.

Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valino F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D (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, Abouzid K, Meng Z, Biegel D, Makriyannis A (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, Piomelli D (2005). The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol* 67: 15-19.

Makara JK, Mor M, Fegley D, Szabo SI, Kathuria S, Astarita G, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Rivara S, Freund TF, Piomelli D (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, Porreca F, Makriyannis A (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, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (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 RL 2nd, 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 RG. (1999) Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 6: 635-664.

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, Malan TP Jr (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, Pertwee RG (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, Yamashita A, Waku K (1996). 2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand,

induces rapid, transient elevation of intracellular free Ca^{2+} 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, Suhara Y, Takayama H, Waku K (2000). Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB_2 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, Hunskaar 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, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB_2 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.

6.3.7 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. mean (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). Figure 2A **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. mean (n = 4 per group). AUC = Area Under the Curve for the inflammatory phase, # $P < 0.025$ for 2-AG 100 μ g vs. control (NaCl 0.9 %) group.

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 2-AG antinociceptive effect for the acute (B) and inflammatory (C) phases of the test. (D) Paw

edema. Data is expressed as mean \pm s.e. mean ($n = 7$ per group). Area Under the Curve (AUC) for the inflammatory phase, # $P < 0.001$ 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.

Figure 4

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

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 μ L). Data is expressed as mean \pm s.e. mean ($n = 3$ per group). AUC = Area Under the Curve for the acute phase, † $P < 0.001$ for URB602 500 μ g vs. control (NaCl 0.9 %); AUC for the inflammatory phase, # $P < 0.001$ for URB602 500 μ g vs. control (NaCl 0.9 %) group.

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 μ L). Antinociceptive effects of the combination of 2-AG with URB602 for the acute (B) and the inflammatory

(C) phases of the test. (D) Paw edema. Data is expressed as mean \pm s.e. mean (n = 4 per group). Area Under the Curve (AUC) for the acute phase, † $P < 0.005$ for all the drugs vs. control (NaCl 0.9 %) group; AUC for the inflammatory phase, # $P < 0.001$ for all the drugs vs. control (NaCl 0.9 %) group. * $P < 0.005$ for all the drugs vs. control (NaCl 0.9 %) group; ‡ $P < 0.025$ for URB602 + 2-AG vs. 2-AG or URB602 given alone.

Figure 7

(A) Antinociceptive effects of URB602 when administered at a dose of 70 μ g into the hind paw 15 min before 2.5% formalin (50 μ L); Effects of cannabinoid antagonists on URB602 antinociceptive effects for the early (B) and late (C) phases of the test. (D) Paw edema. Data is expressed as mean \pm s.e. mean (n = 4 per group). Area Under the Curve (AUC), # $P < 0.001$ for URB602 vs. control (NaCl 0.9 %) group; * $P < 0.001$ for URB602 vs. control (NaCl 0.9 %) group.

Conflicts of interest: None

Figure 1

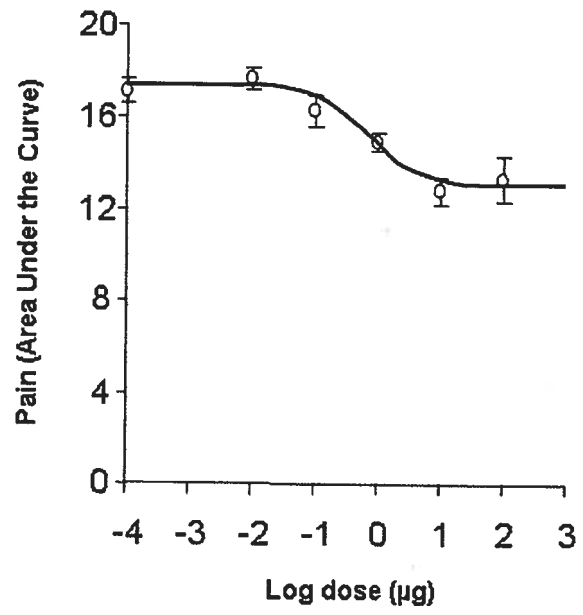
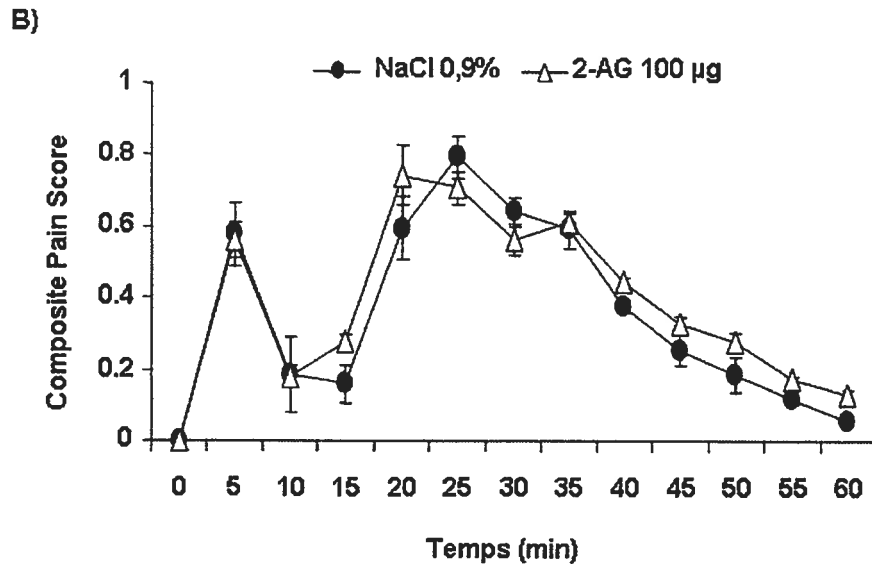
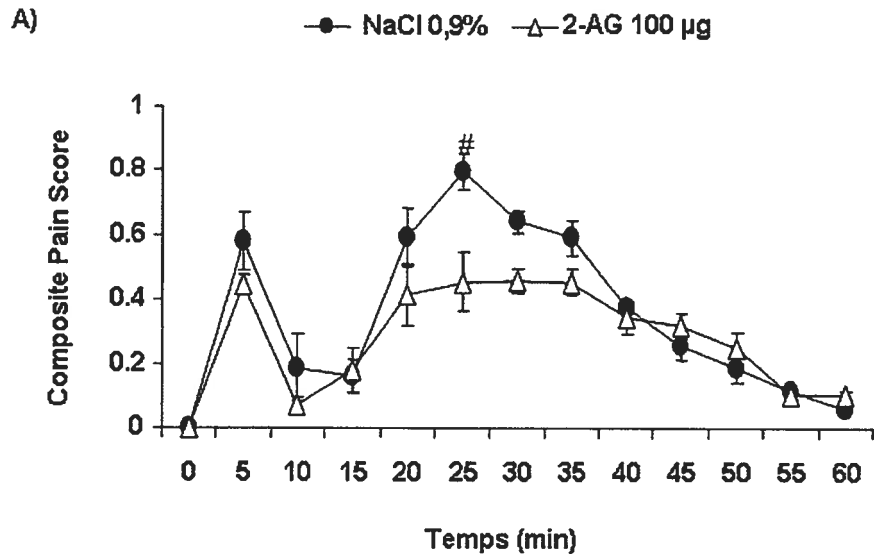


Figure 2



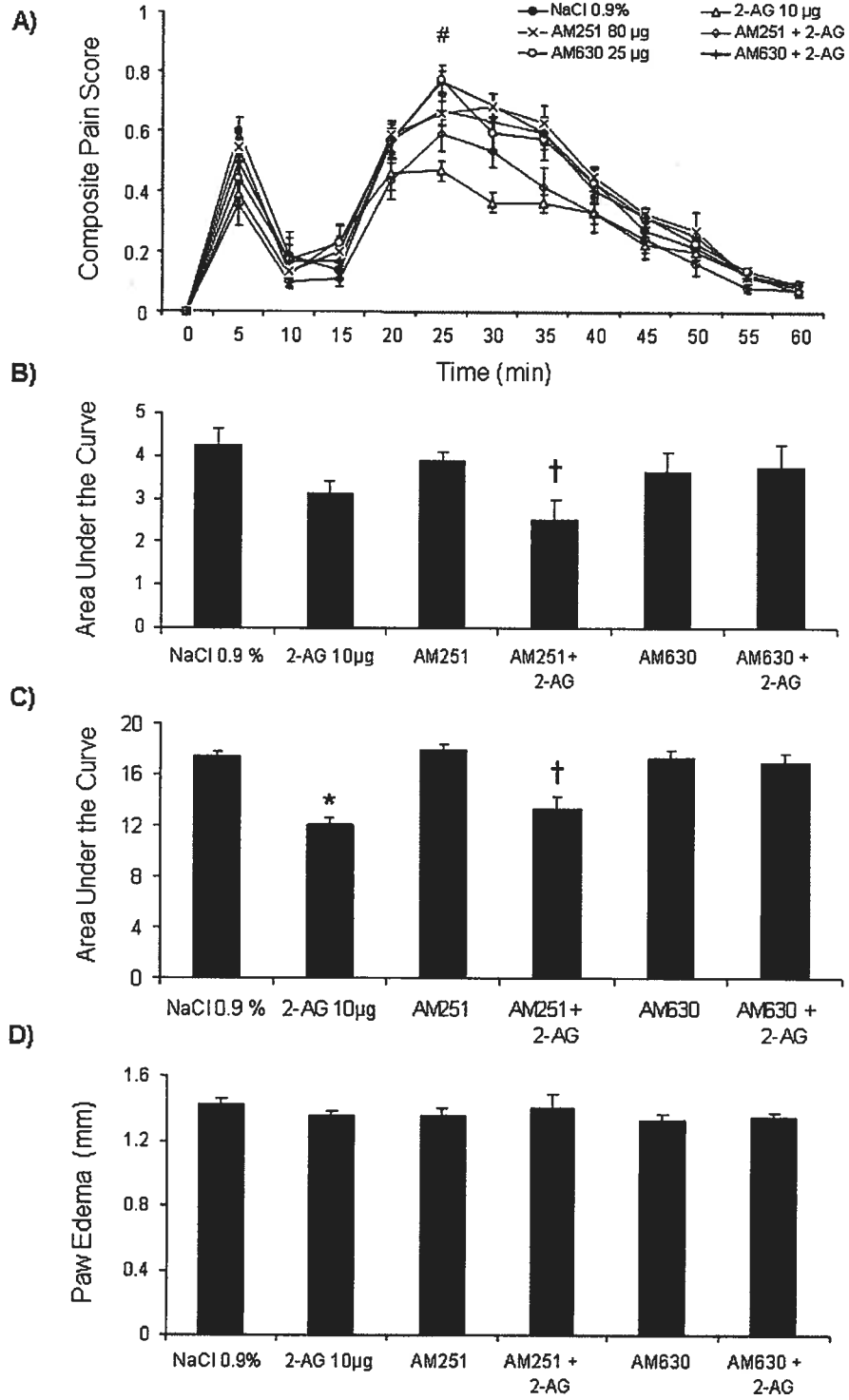


Figure 4

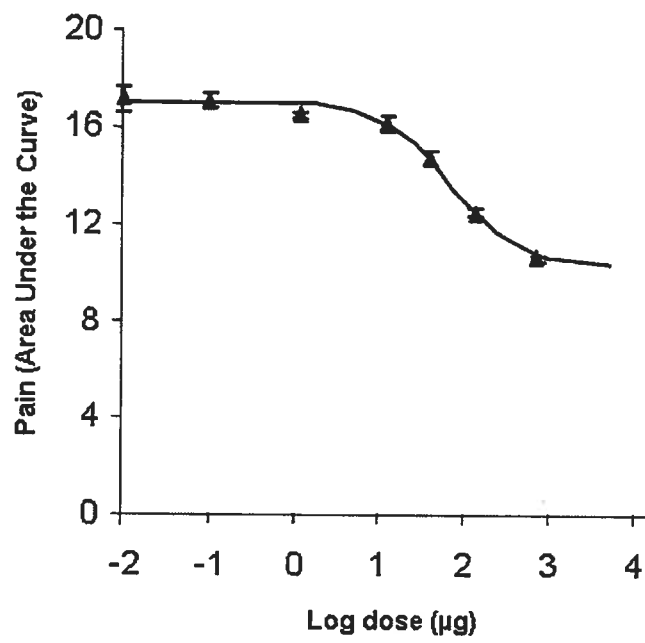


Figure 5

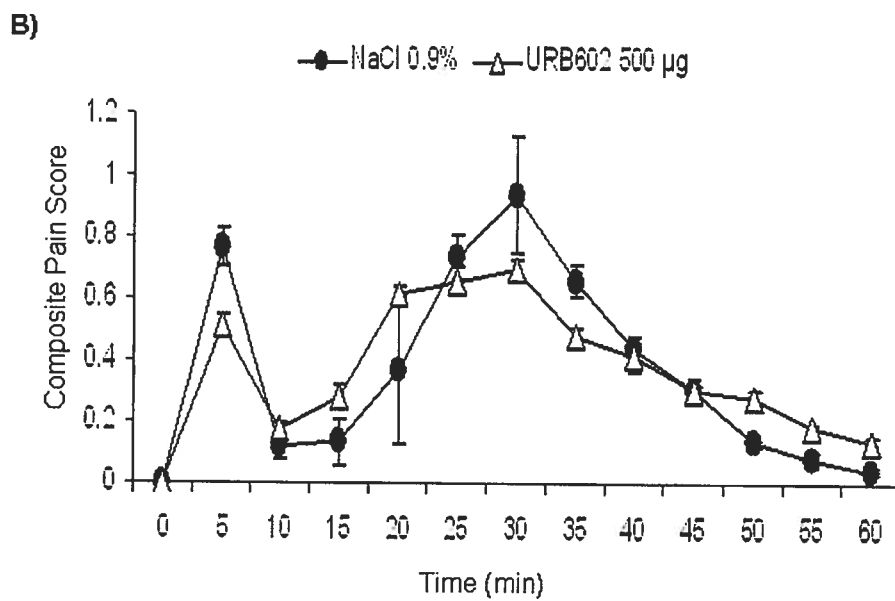
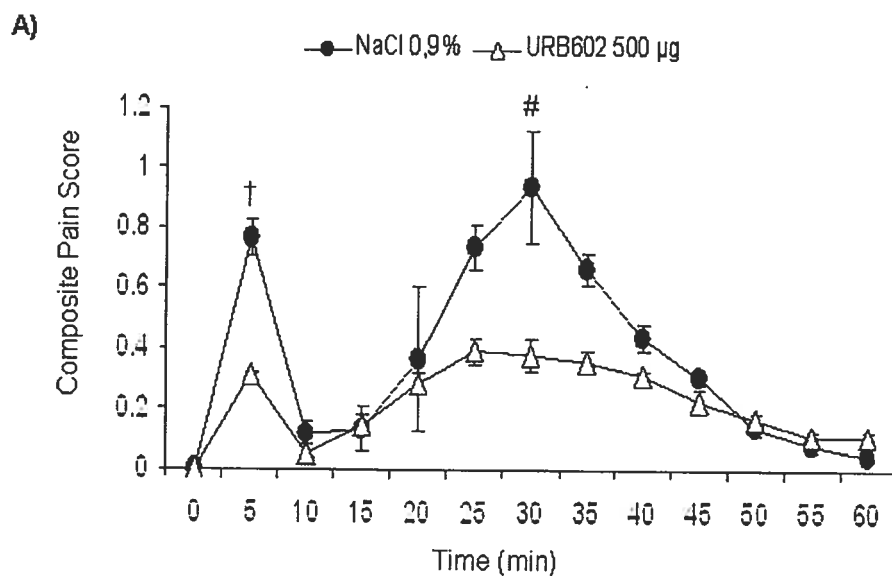


Figure 6

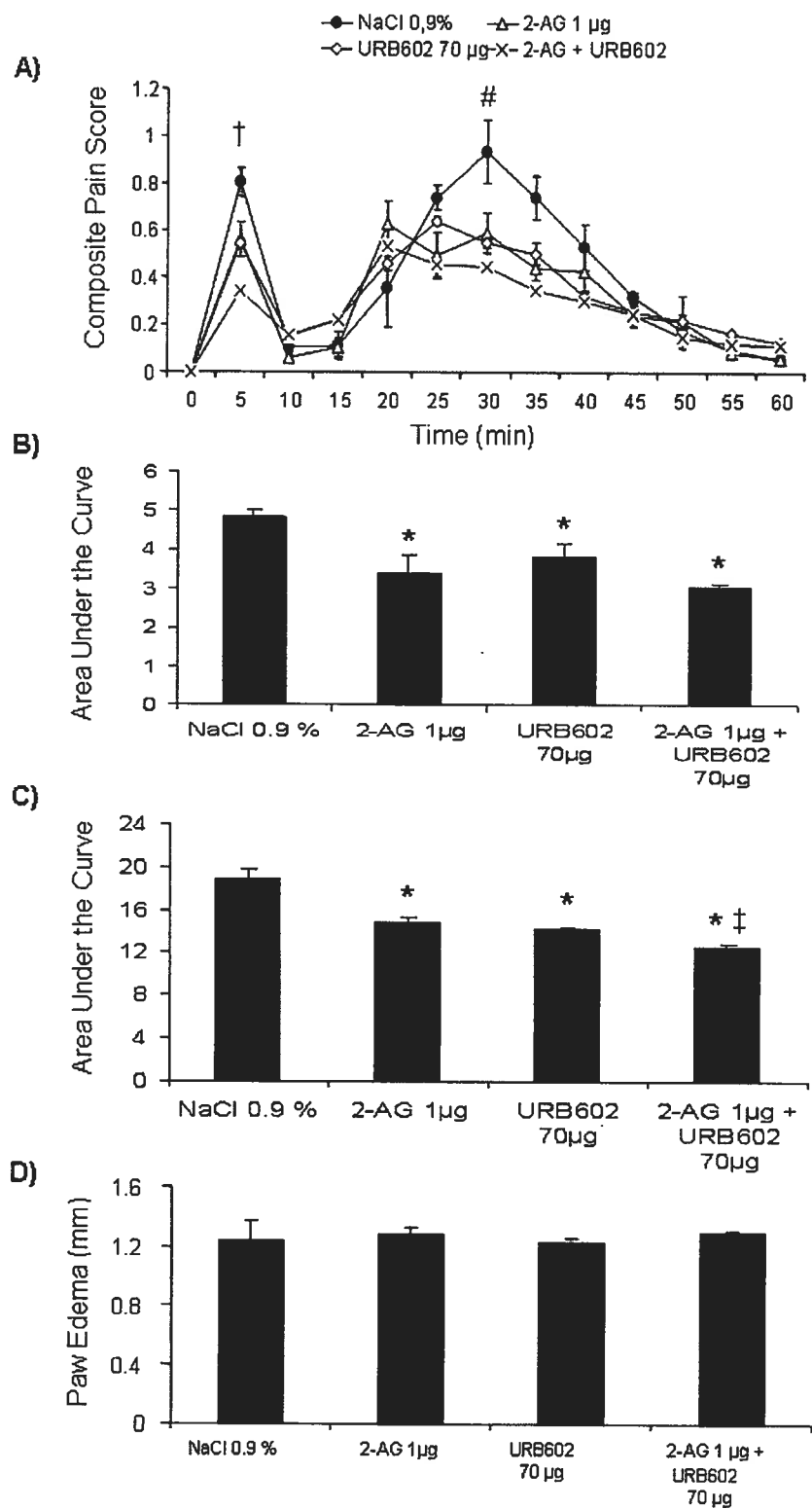
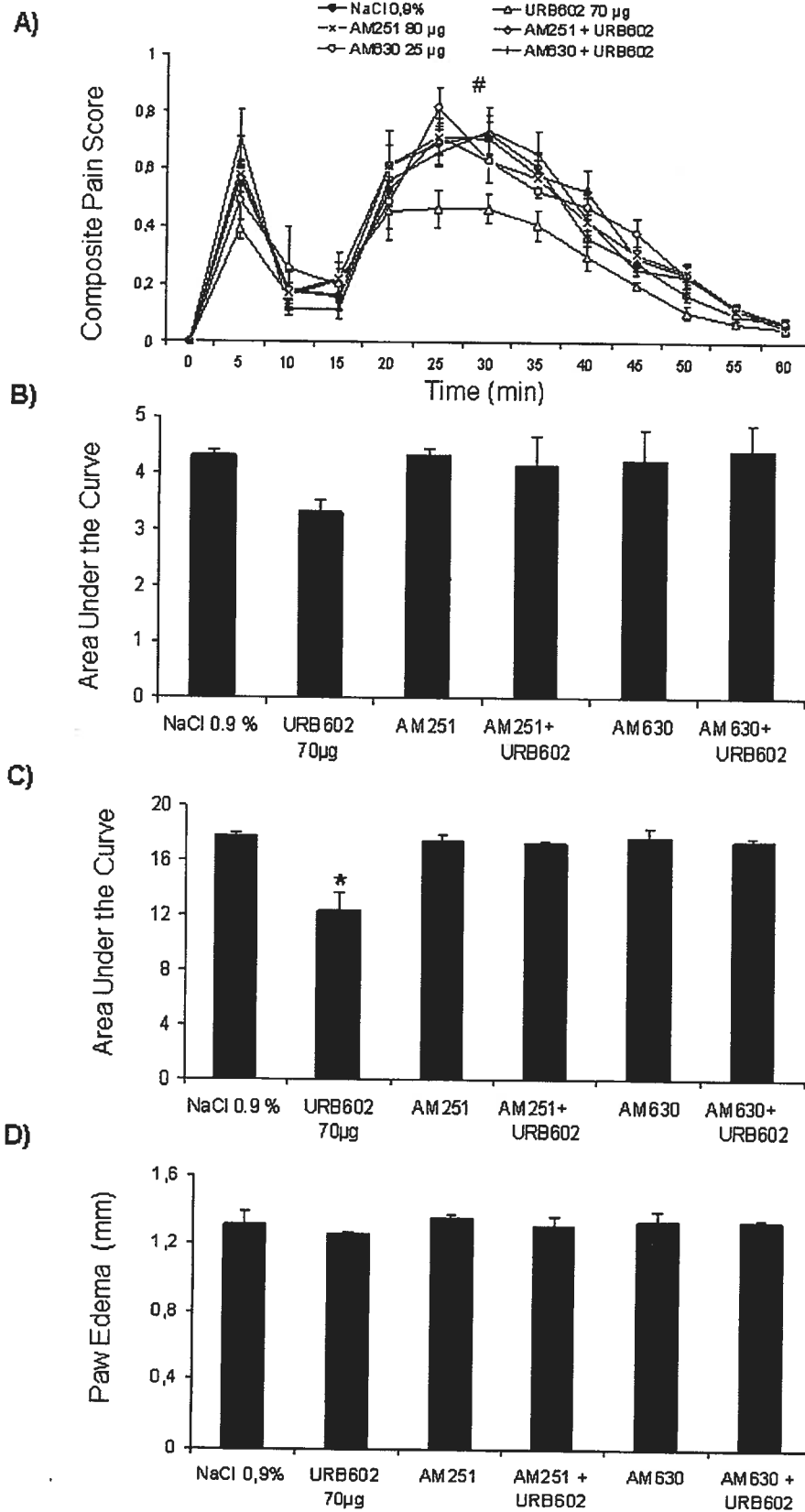


Figure 7



6.4 Article 4 publié dans *Neuropharmacology*

“Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain”

Running title: Anandamide and NSAIDs interactions in pain

Josée Guindon¹ & Pierre Beaulieu^{1,2*}

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

*Author for Correspondence: Pierre Beaulieu, Department of Anesthesiology, CHUM –
Hôtel-Dieu, 3840 rue St-Urbain, Montréal, H2W 1T8, Québec, Canada

Tel: (1) 514-343-6338

Fax: (1) 514-412-7222

E-mail: 

6.4.0 Abstract

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit fatty acid amidohydrolase (FAAH), the enzyme responsible for the metabolism of anandamide, an endocannabinoid. The analgesic interactions between anandamide (0.01 μg), ibuprofen (0.1 μg) and rofecoxib (0.1 μg) or their combinations administered locally in the hind paw of neuropathic rats were investigated together with the effects of specific antagonists for the cannabinoid CB₁ (AM251; 80 μg) and CB₂ (AM630; 25 μg) receptors. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were evaluated in 108 Wistar rats allocated to: (1-4) NaCl 0.9%; anandamide; ibuprofen; rofecoxib; (5-6) anandamide + ibuprofen or rofecoxib; (7-8) AM251 or AM630; (9-10) anandamide + AM251 or AM630; (11-12) ibuprofen + AM251 or AM630; (13-14) rofecoxib + AM251 or AM630; (15-16) anandamide + ibuprofen + AM251 or AM630; (17-18) anandamide + rofecoxib + AM251 or AM630. Drugs were given subcutaneously in the hind paw 15 min before pain tests. Anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations significantly decreased mechanical allodynia and thermal hyperalgesia with an ED₅₀ of 1.6 ± 0.68 ng and 1.1 ± 1.09 ng for anandamide, respectively. The effects of NSAIDs were not antagonized by AM251 or AM630 but those of anandamide were inhibited by AM251 but not by AM630. In conclusion, locally injected anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations decreased pain behavior in neuropathic animals. Local use of endocannabinoids to treat neuropathic pain may be an interesting way to treat this condition without having the deleterious central effects of systemic cannabinoids.

Key words: anandamide; ibuprofen; rofecoxib; neuropathic pain; cannabinoid receptors; fatty acid amide hydrolase.

6.4.1 Introduction

Δ^9 -tetrahydrocannabinol, the principal active ingredient of cannabis produces its effect by binding to G protein-coupled receptors, identified as the cannabinoid CB₁ (Matsuda et al., 1990) and CB₂ (Munro et al., 1993) receptors. Cannabinoid CB₁ receptors are localized primarily in the central nervous system but have also been found in the spinal cord, in dorsal root ganglia and in the periphery (Rice et al., 2002 for review). Cannabinoid CB₂ receptors are mainly localized in immune tissues (Galiègue et al., 1995) and have also been found in the periphery. Endogenous cannabinoid ligands (or endocannabinoids) such as anandamide (arachidonylethanolamide), a cannabinoid CB₁ receptor agonist, have also been identified (Devane et al., 1992; Di Marzo, 1998; Piomelli, 2003). Anandamide is produced following intracellular cleavage of N-arachidonylphosphatidylethanolamine by phospholipase D, which indicates that anandamide is synthesized on demand instead of being stored in synaptic vesicles (Piomelli et al., 1998). Finally, anandamide is hydrolyzed into arachidonic acid and ethanolamine by a membrane-bound enzyme named fatty acid amide hydrolase (FAAH) (Cravatt et al., 1996).

In neuropathic pain conditions, WIN 55,212-2, a synthetic cannabinoid CB₁ and CB₂ receptor agonist, given intraperitoneally (i.p.) in rats completely alleviated mechanical allodynia and thermal hyperalgesia (Herzberg et al., 1997; Bridges et al., 2001). Other experiments have evaluated the antinociceptive effects of anandamide (Helyes et al., 2003), AM1241, a cannabinoid CB₂ agonist, (Ibrahim et al., 2003), WIN 55,212-2 (Lim et al., 2003) and CP55,940, a cannabinoid CB₁ and CB₂ agonist (Scott et al., 2004) on different

neuropathic pain models, but these drugs were given either i.p. (Helyes et al., 2003; Ibrahim et al., 2003) or intrathecally (i.t.) (Lim et al., 2003; Scott et al., 2004).

Furthermore, WIN 55,212-2 reversed mechanical hyperalgesia following intraplantar (i.pl.) administration into the ipsilateral hind paw (Fox et al., 2001) and JWH-133, a cannabinoid CB₂ receptor agonist, also significantly reduced noxious mechanically evoked responses of wide dynamic range dorsal horn neurons following i.pl. injections (Elmes et al., 2004). These two studies showed that pain relief was produced by the activation of peripheral CB₁ and CB₂ receptors. For a review of the role of CB₁ and CB₂ receptors in mediating peripheral analgesia, see Hohmann (2002) and Malan (2002), respectively. However, none of these studies has evaluated the analgesic effect of an endocannabinoid such as anandamide when administered locally in an animal model of neuropathic pain.

The therapeutic utility of using compounds that would modulate the endocannabinoid system is beginning to get more interest (Piomelli et al., 2000). For example, the activity of FAAH is inhibited by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as ibuprofen, ketorolac and flurbiprofen (Fowler et al., 1997; 1999). Furthermore, NSAIDs like ketorolac and NS-398 may act by attenuating tactile allodynia following intrathecal injection, and therefore prevent the maintenance of mechanical hypersensitivity caused by cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 (Ma et al., 2002).

Little data is available in the literature concerning the analgesic effects of the combination of a cannabinoid with an NSAID in acute and inflammatory pain conditions (Conti et al.,

2002; Gühring et al., 2002; Ates et al., 2003). Furthermore, nothing is known about the analgesic effects of this association in neuropathic pain conditions.

Therefore, the present study was designed to investigate the antihyperalgesic effects of anandamide, ibuprofen (non-specific COX inhibitor) and rofecoxib (a selective COX-2 inhibitor) and their combinations, administered locally, in a neuropathic pain model in the rat. The mechanism by which the association of anandamide with either NSAID produced antihyperalgesic effects was also investigated by using specific antagonists for the cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors.

6.4.2 Methods

6.4.2.1 Animals

This research protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the Université de Montréal and all procedures conformed to the guidelines of the Canadian Council for Animal Care. Male Wistar rats (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) of 180-220 g at the time of testing were housed two per cage with a bedding of sawdust (8 - 16 mm) (Pro Chip, Canada) and maintained on a 12-hour dark-light cycle with free access to food (18.0% protein, 4.5% fat, 5.5% fiber, 7.0% ash, 2.5% added minerals) (Charles River, Canada) and water. During periods of testing, rats were brought to the testing room one day before testing and kept there under natural daylight.

6.4.2.2 Drug administration

Anandamide is an agonist with a four-fold selectivity for the CB₁ receptor (K_i = 89 nM) over the CB₂ receptor (K_i = 371 nM) and was purchased already in water-dispersible emulsion and further dissolved in 0.9% NaCl (Pertwee, 1999; Ross et al., 2001). AM251 and AM630 are selective antagonists, 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) for CB₁ and CB₂ receptors, respectively. AM251 and AM630 were dissolved in 0.9% NaCl solution containing 8 and 2.5% dimethyl sulfoxide (DMSO), respectively. Anandamide, AM251 and AM630 were purchased from Tocris (Ellisville, MO, USA). Ibuprofen (Sigma, St-Louis, USA), a non-specific COX inhibitor and rofecoxib, a specific COX-2 inhibitor were dissolved in 0.9% NaCl solution. For rofecoxib, the compressed tablet from commercial preparations (VIOXX[®], 25 mg) was weighed and crushed into a fine suspension with physiological saline (Francischi et al., 2002).

6.4.2.3 Neuropathic pain model

Unilateral hind-limb neuropathy was achieved using the technique of partial sciatic nerve ligation (PNL) described by Seltzer et al. (1990). Briefly, under isoflurane anesthesia (1-2%) and aseptic conditions, the left sciatic nerve was exposed at high-thigh level and 1/3-1/2 of the dorsal thickness of the nerve was trapped in a ligature using an 8-0 monofilament nylon suture. In sham-operated rats, the nerve was left intact. The wound was then closed with 5-0 absorbable suture for the muscles and two staples for the skin. The rats were then

allowed nine days to recover. On the 10th day, rats were tested to verify that mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were present and, on the 11th day, drugs were administered 15 min prior to neuropathic testing.

6.4.2.4 Sensory testing

During sensory testing, animals were placed in elevated Plexiglas boxes (21 x 17 x 14 cm) with a 0.7 cm diameter mesh floor to test mechanical allodynia and a dry glass floor was used for thermal hyperalgesia testing. Rats were allowed to acclimatize for 15 min or until exploratory behavior ceased. The sequence of testing was alternated between mechanical allodynia and thermal hyperalgesia to make sure that the order in which the tests were done did not influence the antihyperalgesic effect of drugs with short half-lives like anandamide. The time to complete one battery of tests was approximately 40 min.

6.4.2.4.1 Mechanical allodynia

Mechanical allodynia was evaluated with von Frey hairs (Senselab aesthesiometer, Somedic, Sweden). The plantar surface of the paw was stimulated with a series of von Frey filaments of ascending forces (with a range comprised between 0.63 and 235 mN). For each filament, the stimulus was repeated five times with an interval of 1-2 s between each stimulation. The threshold was determined as the lower force that evoked a withdrawal response to one of the five stimuli (Tal and Bennett, 1994).

6.4.2.4.2 Thermal hyperalgesia

Thermal hyperalgesia was assessed using an infrared noxious heat stimulus (Plantar test, Ugo Basile, Italy). The center of a focused beam of radiant heat was applied to the plantar surface of the hind paw and the withdrawal latency time recorded. Results of each test are expressed as the mean of three withdrawal latencies (s). Three minutes was allowed between each test (Hargreaves et al., 1988).

6.4.2.5 Protocol

The experiments were conducted in a randomized and blinded manner by the same experimenter. A total of 180 rats were used in this study. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were evaluated in 108 Wistar rats the day before PNL and on the 10th day after PNL for the ipsilateral and contralateral paws to confirm that rats were neuropathic. Preliminary experiments with neuropathic rats (n=4) have shown that there was no difference in neuropathic testing between 0.9% NaCl and 0.9% NaCl solution with 8% DMSO (data not shown). On the 11th day, rats were allocated to 18 different groups: (1) NaCl 0.9%; (2) anandamide; (3) ibuprofen; (4) rofecoxib; (5) anandamide + ibuprofen; (6) anandamide + rofecoxib; (7-8) AM251 or AM630; (9-10) anandamide + AM251 or AM630; (11-12) ibuprofen + AM251 or AM630; (13-14) rofecoxib + AM251 or AM630; (15-16) anandamide + ibuprofen + AM251 or AM630; (17-18) anandamide + rofecoxib + AM251 or AM630. Anandamide (0.01 μ g), ibuprofen (0.1 μ g), rofecoxib (0.1 μ g), AM251 (80 μ g; Malan et al., 2001) and AM630 (25 μ g; 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).

In order to exclude any possible systemic effect of the drugs, NaCl 0.9 %, anandamide, ibuprofen, rofecoxib, anandamide + ibuprofen and anandamide + rofecoxib were also given s.c. on the dorsal surface of the contralateral side (right hind paw) (n = 4 per group).

Finally, dose-response curves of anandamide for mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were determined using 0.0001, 0.00033, 0.001, 0.0033, 0.01, 0.1 and 1 μg (n = 4-6 per group).

Sham-operated rats were tested for mechanical allodynia (Von Frey) and thermal hyperalgesia (Plantar test), the day before the PNL and on the 10th day after PNL for the ipsilateral and contralateral paws to confirm that rats were not neuropathic and on the 11th day, they received NaCl 0.9 %, anandamide, ibuprofen, rofecoxib, anandamide + ibuprofen and anandamide + rofecoxib on the dorsal surface of the left hind paw (n = 4 per group).

6.4.2.6 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 either NaCl 0.9%, AM251 or AM630, analgesic effects of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in 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). Each of the analyses mentioned above was assessed for mechanical allodynia and thermal hyperalgesia of the ipsilateral side. The contralateral side

was analyzed separately, still using an ANOVA adapted for factorial experimental design. The dose-response curves for anandamide were determined using ALLFIT software (De Léan et al., 1978). The critical level of significance was set at 5% ($P < 0.05$).

6.4.3 Results

Animals were neuropathic 10 days after PNL, as a statistically significant difference was present in comparison to presurgery for mechanical allodynia [$F(1, 214) = 474.53, P < 0.001$] (Figure 1A) and thermal hyperalgesia [$F(1, 214) = 148.62, P < 0.001$] (Figure 1B).

6.4.3.1 Mechanical allodynia

Von Frey values obtained in neuropathic conditions were not different [$F(1, 20) = 0.92$] 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 antagonists [$F(1, 20) = 0.87$]. Finally, results in the AM251 group were not different from those found in the AM630 group [$F(1, 20) = 0.01$] (Table 1). In the absence of antagonists, anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations produced significant antiallodynic effects when compared to control group [$F(1, 30) = 19.78, P < 0.001$] with values returning to presurgery levels (Figure 2A). In the presence of AM251, ibuprofen and rofecoxib differed [$F(1, 30) = 31.74, P < 0.001$] from anandamide (Figure 2B), the antiallodynic effect of anandamide and of its combination with either ibuprofen or rofecoxib being completely abolished. In the presence of AM630, anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their

combinations produced significant antiallodynic effects when compared to the AM630 group [$F(1, 30) = 29.42, P < 0.001$] (Figure 2C). Therefore and contrary to AM251, AM630 did not influence mechanical allodynia testing.

On the contralateral side (right hind paw), there was no difference between the day before surgery (pre-lesion) compared with the days after surgery (days 10 and 11) [$F(1, 321) = 2.20$], and day 10 (before drug administration) was not different [$F(1, 321) = 1.95$] from day 11 (after drug administration). Furthermore, neither was there any difference between all the groups tested on the contralateral side (Figure 2A, 2B and 2C, inset).

When the drugs were given on the contralateral side to neuropathic rats [$F(1,69) = 388.99, P < 0.001$], there was no statistical difference between day 10 and day 11 (i.e. before and after drug administration locally) [$F(1,69) = 0.02$] on the ipsilateral (tested) side (Figure 4A). 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) [$F(1,69) = 0.08$] and no difference was observed between day 10 and day 11 [$F(1,69) = 2.05$] (Figure 4A, inset).

We have also demonstrated that anandamide produced a dose-dependent antiallodynic effect with an ED_{50} of $1.6 \text{ ng} \pm 0.68$ (Figure 5A).

In sham-operated rats, there was no difference between the day before surgery (baseline) compared with the days after surgery (days 10 and 11) [$F(1, 69) = 0.20$ and 0.17], and day 10 was not different [$F(1, 69) = 0.01$ and 0.02] from day 11 for the ipsilateral and contralateral sides, respectively (data not shown).

6.4.3.2 Thermal hyperalgesia

Noxious heat stimulus values obtained in neuropathic conditions were not different [$F(1, 20) = 1.64$] 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 antagonists [$F(1, 20) = 0.05$]. Finally, results in the AM251 group were not different from those found in the AM630 group [$F(1, 20) = 1.76$] (Table 1). In the absence of antagonists, anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations produced significant antihyperalgesic effects when compared to control groups [$F(1, 30) = 8.14, P < 0.01$] with values returning to presurgery levels (Figure 3A). In the presence of AM251, ibuprofen and rofecoxib differed [$F(1, 30) = 8.12, P < 0.01$] from anandamide (Figure 3B), the antihyperalgesic effect of anandamide and of its combination with either ibuprofen or rofecoxib being completely abolished. In the presence of AM630, anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations produced significant antihyperalgesic effects when compared to the AM630 group [$F(1, 30) = 13.22, P < 0.005$] (Figure 3C). Therefore and contrary to AM251, AM630 did not influence thermal hyperalgesia testing.

On the contralateral side (right hind paw), there was no difference between the day before surgery (baseline) compared with the days after surgery (days 10 and 11) [$F(1, 321) = 1.16$], and day 10 (before drug administration) was not different [$F(1, 321) = 3.71$] from day 11 (after drug administration). Furthermore, neither was there any difference between all the groups tested on the contralateral side (Figure 3A, 3B and 3C, inset).

When the drugs were given on the contralateral side to neuropathic rats [$F(1,69) = 93.14$, $P < 0.001$], there was no statistical difference between day 10 and day 11 [$F(1,69) = 0.01$] on the ipsilateral side (Figure 4B). 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) [$F(1,69) = 1.64$] and no difference was observed between day 10 and day 11 [$F(1,69) = 0.03$] (Figure 4B, inset).

We have also demonstrated that anandamide produced a dose-dependent antihyperalgesic effect with an ED_{50} of $1.1 \text{ ng} \pm 1.09$ (Figure 5B).

In sham-operated rats, there was no difference between the day before surgery (baseline) compared with the days after surgery (days 10 and 11) [$F(1, 69) = 3.49$ and 3.42], and day 10 was not different [$F(1, 69) = 0.05$ and 0.28] from day 11 for the ipsilateral and contralateral side, respectively (data not shown).

6.4.4 Discussion

This study is the first to demonstrate that an endocannabinoid like anandamide administered locally, significantly reduced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in a neuropathic pain model. We have also found that ibuprofen (a non-specific COX inhibitor) and rofecoxib (a selective COX-2 inhibitor) as well as their combination with anandamide decreased pain behavior when given locally in neuropathic conditions. Finally, the analgesic effects of anandamide and its association with either ibuprofen or rofecoxib were completely abolished by AM251, a cannabinoid CB_1 receptor antagonist, but not by

AM630, a cannabinoid CB₂ receptor antagonist. We have also demonstrated that anandamide produced dose-dependent antiallodynic and antihyperalgesic effects.

6.4.4.1 Local analgesic effects of cannabinoids and endocannabinoids

In this study, direct injection of anandamide in the affected paw significantly decreased, in a dose-dependent manner, mechanical allodynia and thermal hyperalgesia with values returning to presurgery levels. As expected considering anandamide affinity for cannabinoid receptor, this analgesic effect was abolished by a CB₁ but not by a CB₂ cannabinoid receptor antagonist. Furthermore, these findings are consistent with the decrease in mechanical hyperalgesia induced by anandamide administration which was reversed by SR141716A, a cannabinoid CB₁ receptor antagonist, with the consideration that the endocannabinoid was given i.p. (Helyes et al., 2003). Other studies have shown that WIN 55,212-2, a cannabinoid CB₁ and CB₂ receptor agonist, also given i.p., completely alleviated mechanical allodynia and thermal hyperalgesia (Herzberg et al., 1997; Bridges et al., 2001). The antihyperalgesic effect of WIN 55,212-2 following i.pl. administration into the ipsilateral paw was blocked by SR141716A (Fox et al., 2001). In the present study, behavioral testing in the non-operated side was not affected by the dose of anandamide given locally on the operated side, because all values on the contralateral side were similar no matter which drugs were administered. Furthermore, local injection of the tested drugs in the contralateral paw did not modify pain responses, indicating that anandamide and NSAIDs produced their effects by a local and not a systemic mechanism of action.

Therefore, it is very unlikely that the low dose of anandamide or NSAIDs used in the present study would have caused any systemic effect.

Meanwhile, the analgesic effects of cannabinoids seem to be mediated by an up-regulation of spinal cannabinoid CB₁ receptors which accounts for the enhanced effect of WIN 55,212-2 on thermal hyperalgesia and mechanical allodynia (Lim et al., 2003) when given i.t. Furthermore, up-regulation of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors was observed in the periphery (paw), dorsal root ganglion and ipsilateral spinal cord of neuropathic rats using a new model of neuropathic pain targeted at the saphenous nerve (Walczak et al., 2005).

The implication of the cannabinoid CB₂ receptor in mediating antinociception in neuropathic pain is growing stronger as AM1241 (a cannabinoid CB₂ receptor agonist) given i.p. blocked tactile allodynia and thermal hyperalgesia (Ibrahim et al., 2003), while CP55,940 (a non-selective receptor agonist) given i.t. was also effective in attenuating mechanical allodynia (Scott et al., 2004). Furthermore, another study reported that i.pl. injection of the cannabinoid CB₂ receptor agonist, JWH-133 (15 µg), significantly reduced noxious mechanically evoked responses of wide dynamic range dorsal horn neurons in a neuropathic pain model (Elmes et al., 2004). JWH-133 given on the contralateral side did not attenuate evoked responses of wide dynamic range neurons which mean that the effects of JWH-133 were mediated by a local peripheral site of action (Elmes et al., 2004). It has been reported that chronic pain models associated with peripheral nerve injury induce cannabinoid CB₂ receptor expression within the lumbar spinal cord (Zhang et al., 2003; Walczak et al., 2005) which may explain the analgesic effect of cannabinoid CB₂ receptor

agonists mentioned in the previous studies. Finally, and despite the above-mentioned role of CB₂ receptors in attenuating nociceptive behavior in models of neuropathic pain, the fact that anandamide antinociceptive effects were not antagonized by a CB₂ antagonist is not surprising. Indeed, anandamide is mainly a CB₁ receptor agonist but some of its affinity for the CB₂ receptor may be seen when the combination of anandamide and AM630 decreased, although not significantly, mechanical threshold compared with anandamide given alone.

Finally, anandamide at high doses may activate vanilloid (TRPV1) receptors. The role of these receptors in neuropathic pain is still unclear. Although TRPV1 receptor antagonists attenuate symptoms of neuropathic pain (Walker et al., 2003), neuropathic pain behavior is not altered in TRPV1-null mice (Caterina et al., 2000). In neuropathic pain conditions, TRPV1 receptor distribution in primary afferent neuron is altered, but mostly in the dorsal root ganglia (Rashid et al. 2003). However, the contribution of peripheral TRPV1 receptors to nociceptive responses is unaltered in neuropathic rats and peripheral TRPV1 receptors do not make a significant contribution to noxious mechanically evoked responses (Jhaveri et al., 2005). At the same time because peripheral CB₁ receptors are also up-regulated in a saphenous neuropathic pain model (Walczak et al. 2005), therefore the antihyperalgesic effects of anandamide at high concentrations may not be observed as anandamide may then act on CB₁ rather than TRPV1 receptors.

Additionally in an inflammatory pain model, Richardson et al. (1998) have shown that intraplantar anandamide at doses of 0.1 to 1 ng produced anti-hyperalgesic effects via an interaction with peripheral cannabinoid CB₁ receptors, and suggested that cannabinoids

inhibit neurosecretion calcitonin gene-related peptide release from capsaicin-sensitive primary afferent fibres. The antinociceptive effects of anandamide in the present study (ED₅₀ of 1-2 ng) in neuropathic conditions are somehow close from Richardson's study.

In conclusion, our results show that locally administered anandamide abolished mechanical allodynia and thermal hyperalgesia and that this effect is mediated by a cannabinoid CB₁ receptor. However, we did not test a locally administered endocannabinoid with CB₂ agonist activity and therefore we cannot be conclusive about its ability to reduce pain behavior in neuropathic pain conditions.

6.4.4.2 Local analgesic effects of NSAIDs

We found that local administration of ibuprofen and rofecoxib abolished mechanical allodynia and thermal hyperalgesia and that this analgesic effect was not affected by a CB₁ or a CB₂ cannabinoid receptor antagonist. It has been already shown, using the same neuropathic pain model, that local injection of ketorolac (a COX-1 inhibitor) into the ipsilateral plantar side reversed tactile allodynia (Ma & Eisenach, 2002), which is consistent with our findings. The authors also observed that anti-allodynic effects produced by local injection of ketorolac were associated with the abundance of COX-2 immunoreactive cells in injured nerves (COX-2 up-regulation) and that the local anti-allodynic effect of ketorolac varied according to the type of injury and the time after injury and seems to last longer when given two to four weeks after various types of peripheral nerve injury (Ma & Eisenach, 2003). Another study demonstrated that s.c. injection of indomethacin (a non-specific inhibitor of COX) into the affected paw prolonged the

reduction of mechanical hypersensitivity in a neuropathic pain model for 10 days (Syriatowicz et al., 1999), while ketorolac following i.t. injection significantly attenuated tactile allodynia for six days (Ma et al., 2002) and reduced hypersensitivity to thermal stimuli (Parris et al., 1996). Finally, NS-398, a COX-2 preferred inhibitor given i.t., significantly reversed tactile allodynia for one day (Ma et al., 2002), as did orally administered etodolac, a COX-2 inhibitor, which alleviated heat-evoked hyperalgesia in a neuropathic pain model (Suyama et al., 2004). In contrast, rofecoxib, which is also a COX-2 inhibitor, failed to modify the development of allodynia and hyperalgesia when given i.p. in neuropathic conditions (Broom et al., 2004). This data indicates that spinal prostaglandin synthesis is important in the maintenance of hypersensitivity states following injury to the nerve.

It seems significant from both studies done by Ma & Eisenach (2002; 2003) that locally administered ketorolac (COX-1 inhibitor) in the ipsilateral paw produced anti-allodynic effects. However, the analgesic effects of rofecoxib (COX-2 inhibitor) do not seem to be so obvious as it did not alter the development of allodynia and hyperalgesia when given i.p. (Broom et al., 2004). The present study is the first to demonstrate the antihyperalgesic effects of rofecoxib in a neuropathic pain model when administered locally.

The use of rofecoxib in suspensions of commercial preparations, with the potential variety of excipients present, may have altered the response of the model. However, the dose-dependency of analgesia obtained in a previous study with rofecoxib, as with ibuprofen and anandamide, both pure substances and also reported by other authors, strongly suggests that

this effect was mediated by some biological activity shared by the three compounds and not by excipients (Francischi et al., 2002).

6.4.4.3 Analgesic effects of the combination of endocannabinoid with NSAIDs

The combination of anandamide with either NSAID significantly reduced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia but we cannot comment on a possible additive or synergistic effect as only one dose of the combination between anandamide and NSAID was tested. Furthermore, the doses of anandamide, ibuprofen and rofecoxib used in these neuropathic experiments may have been too high and led already to a complete reversal of pain behavior when drugs were administered alone. Indeed, the dose of anandamide (10 ng) used in combination with NSAIDs happened to be six to nine times higher than the ED₅₀ of anandamide in neuropathic conditions.

In conclusion, locally injected anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations decreased pain behavior in a model of neuropathic pain. However, anandamide and its combination with either NSAID did not alleviate mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in the presence of a cannabinoid CB₁ receptor antagonist. The local use of endocannabinoids to treat neuropathic pain is interesting as it would be effective without having the deleterious psychoactive effects of systemic cannabinoids. Finally, further studies are needed to evaluate the role of endocannabinoids with CB₂ agonist activity in the local treatment of neuropathic pain and to assess whether the combination of endocannabinoid and NSAID may be additive or synergistic.

6.4.5 Acknowledgments

We wish to thank Drs. Robert Élie and De Léan for their kind assistance with the statistical analyses. This work was supported (P.B.) by a research grant from the Research Centre of the CHUM – Montreal, by the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec* (FRSQ) and by a grant from Organon Canada to the Department of Anesthesiology of the Université de Montréal.

6.4.6 References

Ates, M., Hamza, M., Seidel, K., Kotalla, C.E., Ledent, C., Guhring, H. 2003. Intrathecally applied flurbiprofen produces an endocannabinoid-dependent antinociception in the rat formalin test. *Eur J Neurosci* 17, 597-604.

Bridges, D., Ahmad, K., Rice, A.S. 2001. The synthetic cannabinoid WIN55,212-2 attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 133, 586-594.

Broom, D.C., Samad, T.A., Kohno, T., Tegeder, I., Geisslinger, G., Woolf, C.J. 2004. Cyclooxygenase 2 expression in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Neuroscience* 124, 891-900.

Conti, S., Costa, B., Colleoni, M., Parolaro, D., Giagnoni, G. 2002. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br J Pharmacol* 135, 181-187.

Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B. 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384, 83-87.

De Léan A., Munson P.J., 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.

Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-1949.

Di Marzo, V. 1998. 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta* 1392, 153-175.

Elmes, S.J., Jhaveri, M.D., Smart, D., Kendall, D.A., 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.

Fowler, C.J., Janson, U., Johnson, R.M., Wahlstrom, G., Stenstrom, A., Norstrom, K., Tiger, G. 1999. Inhibition of anandamide hydrolysis by the enantiomers of ibuprofen, ketorolac and flurbiprofen. *Arch Biochem Biophys* 362, 191-196.

Fowler, C.J., Stenstrom, A., Tiger, G. 1997. Ibuprofen inhibits the metabolism of the endogenous cannabimimetic agent anandamide. *Pharmacol Toxicol* 80, 103-107.

Fox, A., Kesingland, A., Gentry, C., McNair, K., Patel, S., Urban, L., James, I. 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.

Francischi, J.N., Chaves, C.T., Moura, A.C., Lima, A.S., Rocha, O.A., Ferreira-Alves, D.L., Bakhle, Y.S. 2002. Selective inhibitors of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. *Br J Pharmacol* 137, 837-844.

Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., Casellas, P. 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232, 54-61.

Gatley, S.J., Gifford, A.N., Volkow, N.D., Lan, R., Makriyannis, A. 1996. ¹²³I-labelled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB₁ receptors. *Eur J Pharmacol* 307, 331-338.

Gatley, S.J., Lan, R., Pyatt, B., Gifford, A.N., Volkow, N.D., Makriyannis, A. 1997. Binding of the non-classical cannabinoid CP55,940, and the diarylpyrazole AM251 to rodent brain cannabinoid receptors. *Life Sci* 61, PL191-PL197.

Guhring, H., Hamza, M., Sergejeva, M., Ates, M., Kotalla, C.E., Ledent, C., Brune, K. 2002. A role for endocannabinoids in indomethacin-induced spinal antinociception. *Eur J Pharmacol* 454, 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.

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.

Herzberg, U., Eliav, E., Bennett, G.J., Kopin, I.J. 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.

Hohmann, A.G. 2002. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem Phys Lipids* 121, 173-190.

Hosohata, Y., Quock, R.M., Hosohata, K., Makriyannis, A., Consroe, P., Roeske, W.R., Yamamura, H.I. 1997. AM630 antagonism of cannabinoid-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding in the mouse brain. *Eur J Pharmacol* 321, R1-R3.

Ibrahim, M.M., Deng, H., Zvonok, A., Cockayne, D.A., Kwan, J., Mata, H.P., Vanderah, T.W., Lai, J., Porreca, F., Makriyannis, A., Malan, T.P. Jr. 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.

Lim, G., Sung, B., Ji, R.R., 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.

Ma, W., Du, W., Eisenach, J.C. 2002. Role for both spinal cord COX-1 and COX-2 in maintenance of mechanical hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Brain Res* 937, 94-99.

Ma, W., Eisenach, J.C. 2002. Morphological and pharmacological evidence for the role of peripheral prostaglandins in the pathogenesis of neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 15, 1037-1047.

Ma, W., Eisenach, J.C. 2003. Cyclooxygenase 2 in infiltrating inflammatory cells in injured nerve is universally up-regulated following various types of peripheral nerve injury. *Neuroscience* 121, 691-704.

Malan, T.P., Ibrahim, M.M., Deng, H., Liu, Q., Mata, H.P., Vanderah, T., Porreca, F., Makriyannis, A. 2001. CB₂ cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 93, 239-245.

Malan, T.P., Ibrahim, M.M., Vanderah, T.W., Makriyannis, A., Porreca, F. 2002. Inhibition of pain responses by activation of CB₂ cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 121, 191-200.

Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564.

Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-65.

Parris, W.C., Janicki, P.K., Johnson, B. Jr., Horn, J.L. 1996. Intrathecal ketorolac tromethamine produces analgesia after chronic constriction injury of sciatic nerve in rat. *Can J Anesth* 43, 867-870.

Pertwee, R.G. 1999. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 6, 635-664.

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

Piomelli, D. 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4, 873-884.

Piomelli, D., Beltramo, M., Giuffrida, A., Stella, N. 1998. Endogenous cannabinoid signaling. *Neurobiol Dis* 5, 462-473.

Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A., Rodriguez de Fonseca, F. 2000. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 21, 218-224.

Rice, A.S., Farquhar-Smith, W.P., Nagy, I. 2002. Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66, 243-256.

Richardson JD, Kilo S, Hargreaves KM. 1998. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain* 75, 111-9.

Ross, R.A., Brockie, H.C., Stevenson, L.A., Murphy, V.L., Templeton, F., Makriyannis, A., Pertwee, R.G. 1999. Agonist-inverse agonist characterization at CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br J Pharmacol* 126, 665-672.

Ross, R.A., Gibson, T.M., Brockie, H.C., Leslie, M., Pashmi, G., Craib, S.J., Di Marzo, V., Pertwee, R.G. 2001. Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid,

anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens. *Br J Pharmacol* 132, 631-640.

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.

Scott, D.A., Wright, C.E., Angus, J.A. 2004. Evidence that CB-1 and CB-2 cannabinoid receptors mediate antinociception in neuropathic pain in the rat. *Pain* 109, 124-131.

Suyama, H., Kawamoto, M., Gaus, S., Yuge, O. 2004. Effect of etodolac, a COX-2 inhibitor, on neuropathic pain in a rat model. *Brain Res* 1010, 144-150.

Syriatowicz, J.P., Hu, D., Walker, J.S., Tracey, D.J. 1999. Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. *Neuroscience* 94, 587-594.

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.

Walczak, J.S., Pichette, V., Leblond, F., Desbiens, K., Beaulieu, P. 2005. Development and characterization of a new model of neuropathic pain by partial ligation of the saphenous nerve in the rat. *Neuroscience* 132, 1093-1102.

Winer, B.J. 1971. *Statistical Principles in Experimental Design*. New-York: McGraw-Hill.

Zhang, J., Hoffert, C., Vu, H.K., 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.

6.4.7 Figures legend

Figure 1

Mechanical allodynia using von Frey (A) and thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimulus (B) before surgery (baseline) and 10 days after surgery. * or ‡ = $P < 0.001$ for day 10 vs. day 0. Data is expressed as mean \pm s.e.mean ($n = 108$). Inset represents contralateral data.

Figure 2

Mechanical allodynia using von Frey filaments in absence of antagonists (A), in presence of AM251 (B) and in presence of AM630 (C) 11 days after surgery for the ipsilateral side and contralateral side (Figure 2A, 2B and 2C, inset). Data is expressed as mean \pm s.e.mean ($n = 6$ per group). Anan = anandamide, Ibu = ibuprofen, Rof = rofecoxib, I+A = ibuprofen + anandamide, R+A = rofecoxib + anandamide. * $P < 0.001$ for all the drugs vs. NaCl group; ‡ $P < 0.001$ vs. AM251 + anandamide group; † $P < 0.001$ vs. AM630 + NaCl group.

Figure 3

Thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimulus in absence of antagonists (A), in presence of AM251 (B) and in presence of AM630 (C) 11 days after surgery for the ipsilateral side and contralateral side (Figure 3A, 3B and 3C, inset). Data is expressed as

mean \pm s.e.mean (n = 6 per group). Anan = anandamide, Ibu = ibuprofen, Rof = rofecoxib, I+A = ibuprofen + anandamide, R+A = rofecoxib + anandamide. $\Delta P < 0.01$ vs. NaCl group; $\S P < 0.01$ vs. AM251 + anandamide group; $\# P < 0.005$ vs. AM630 + NaCl group.

Figure 4

Mechanical allodynia using von Frey (A) and thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimulus (B) before, 10 and 11 days after surgery for the ipsilateral side and contralateral side (Figure 4A and 4B, inset). On day 11, rats received NaCl 0.9%, anandamide, ibuprofen, rofecoxib, anandamide + ibuprofen and anandamide + rofecoxib on the *contralateral side*. Data is expressed as mean \pm s.e.mean (n = 4 per group). * or ‡ = $P < 0.001$ vs. baseline.

Figure 5

Dose-response curves of anandamide for mechanical allodynia using von Frey (A), and for thermal hyperalgesia using infrared noxious heat stimulus (B). Data is expressed as mean \pm s.e. mean (n = 4-6).

Figure 1

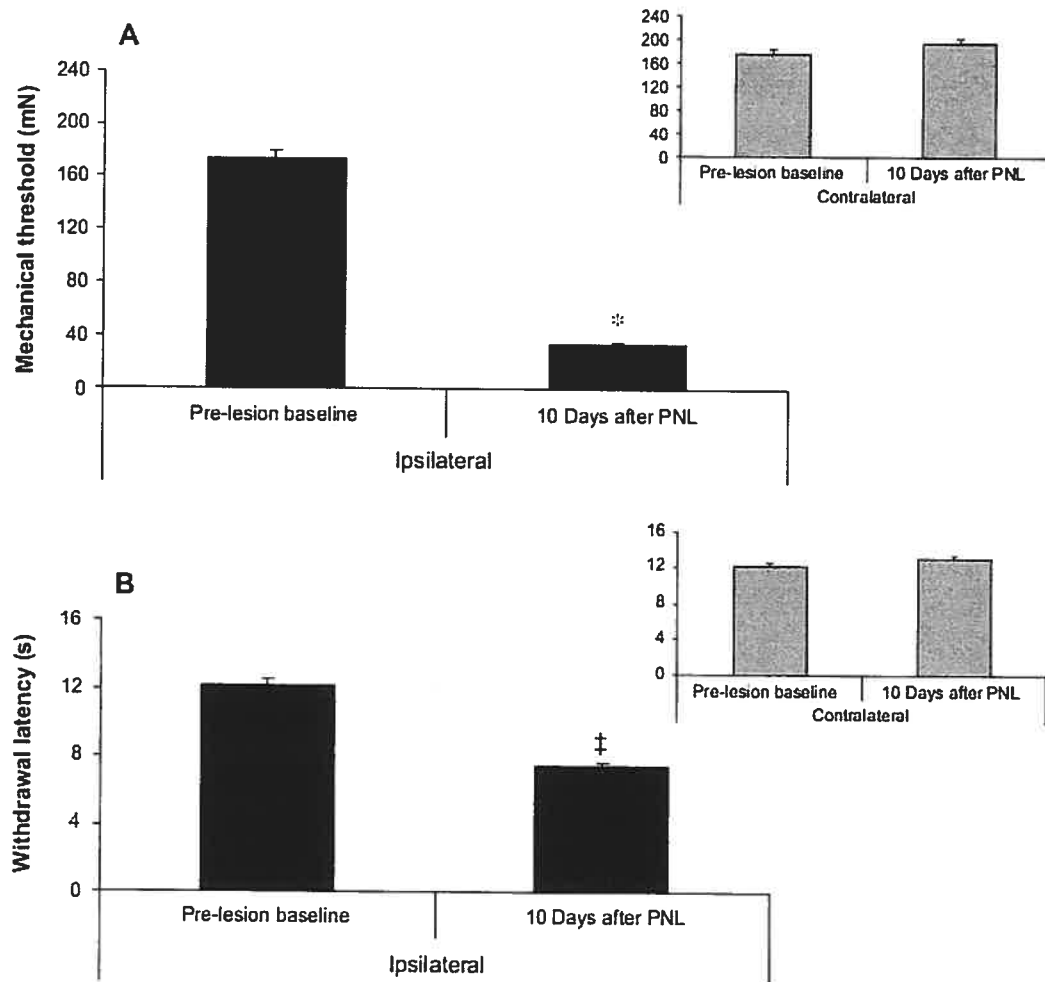


Figure 2

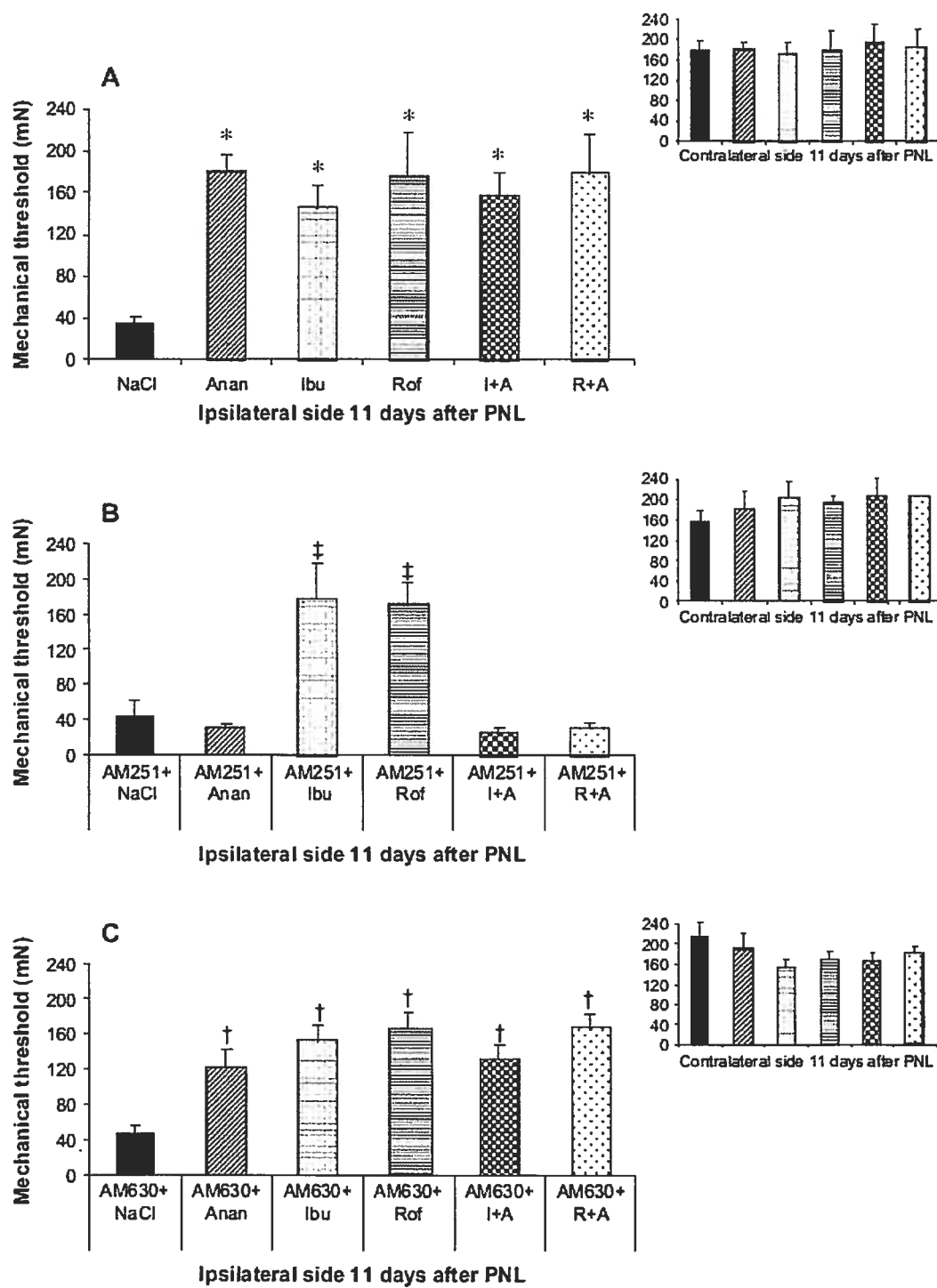


Figure 3

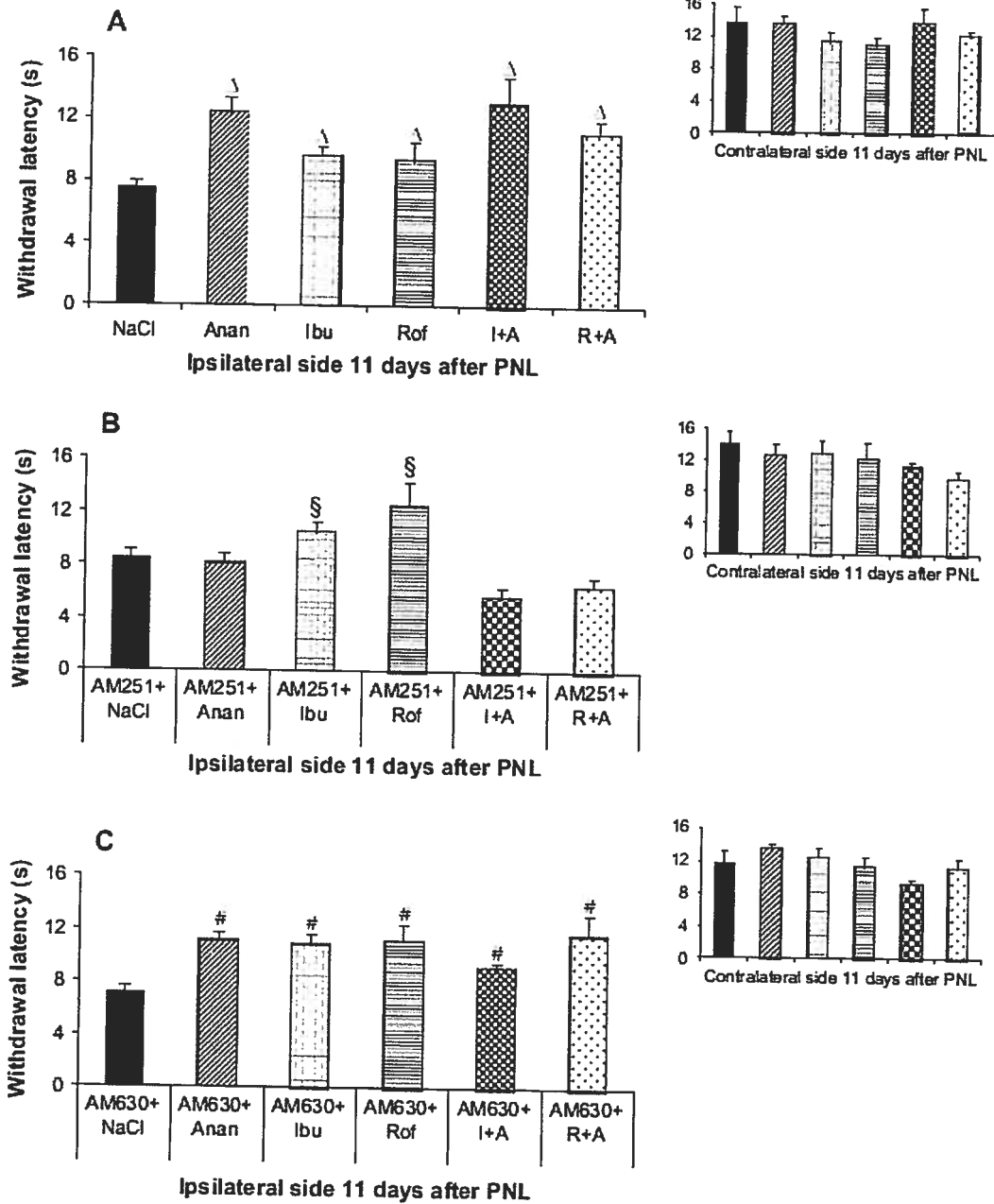


Figure 4

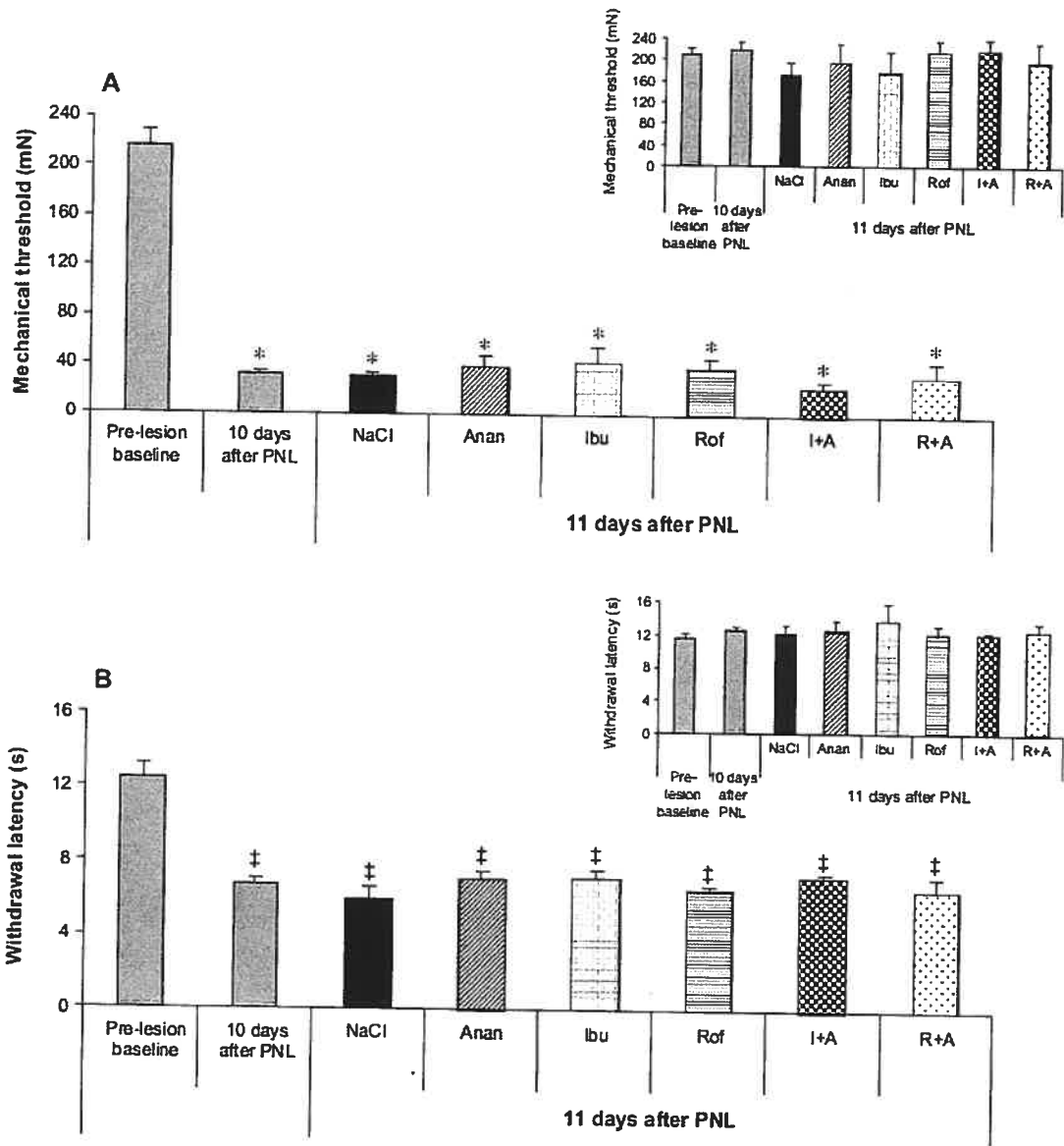
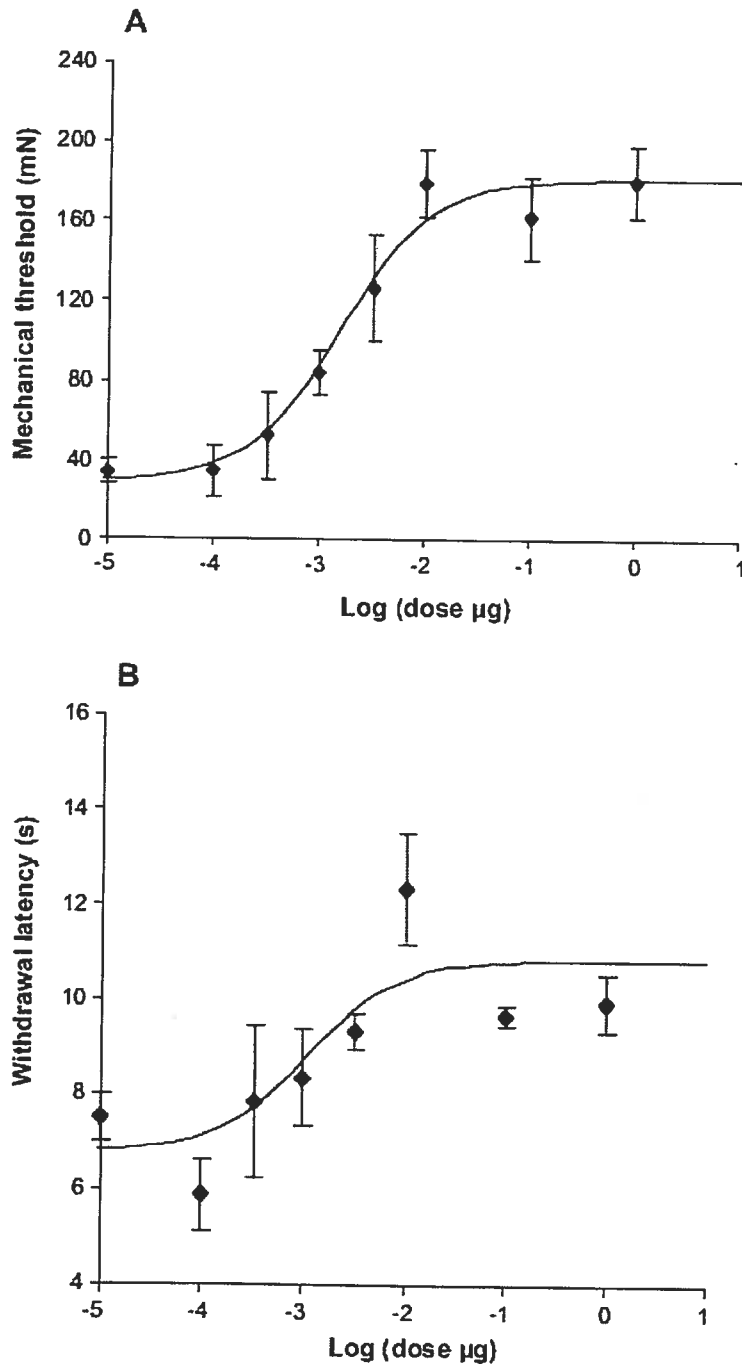


Figure 5



VII. Discussion

L'action antinociceptive périphérique des cannabinoïdes dans divers modèles animaux de douleur a été démontrée dans différentes études (Hohmann, 2002; Malan et coll., 2002 pour une revue de la littérature). Cette approche est très pertinente en soi, puisqu'elle permet aux analgésiques cannabinoïdes d'agir localement et donc prévient les effets délétères centraux liés à l'administration systémique (Malan et coll., 2003). Dans ce travail, il est question de la modulation locale du système endocannabinoïde par l'inhibition des enzymes (FAAH et MGL) pouvant dégrader les cannabinoïdes endogènes. C'est alors que l'effet analgésique des endocannabinoïdes (anandamide et 2-AG) ainsi que celui de leurs inhibiteurs enzymatiques spécifiques (les AINS et l'URB602) ont été démontrés dans la douleur inflammatoire et neuropathique. Une synergie d'effet a également été observée pour la combinaison de l'anandamide avec les AINS. Cette dernière serait le fait des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ dans la douleur inflammatoire et, des récepteurs cannabinoïdes CB₁, en ce qui concerne la douleur neuropathique. Un effet additif a aussi été noté lors de la combinaison du 2-AG avec l'URB602. Il sera question, en premier lieu, de cette modulation dans la douleur inflammatoire, suivi de son étude dans la douleur neuropathique.

7.1 Modulation des endocannabinoïdes dans un modèle de douleur inflammatoire

7.1.1 Modulation de l'action de l'anandamide et effets antinociceptifs dans le test au formol

Une hypothèse a été émise selon laquelle l'effet antinociceptif de l'administration locale d'anandamide serait potentialisé par sa co-administration avec un AINS. En effet, l'hydrolyse enzymatique de l'anandamide par la FAAH est bloquée par l'ibuprofène, le kétorolac et le flurbiprofène (mais non par les autres tels que le kétoprofène ou le naproxène), ce qui fait en sorte que l'anandamide ne serait pas hydrolysé et donc présent en plus grande quantité (Fowler et coll., 1997; 1999). Un autre mécanisme pouvant expliquer cette élévation des niveaux d'anandamide consiste en une synthèse accrue d'endocannabinoïdes à partir de l'acide arachidonique qui serait favorisée comparativement à son métabolisme en raison de l'inhibition des COX (Malmberg & Yaksh, 1992; Gühring et coll., 2002; Ates et coll., 2003; Seidel et coll., 2003). Un troisième mécanisme s'explique par le fait que la COX-2 peut métaboliser l'anandamide *in vitro* (Kozak et coll., 2003) et *in vivo* chez des souris dont le gène pour la FAAH a été invalidé (Weber et coll., 2004), ce qui préviendrait la dégradation de l'anandamide par la COX-2 et donc augmenterait ces niveaux endogènes.

Nous avons démontré que l'anandamide, l'ibuprofène et le rofécoxib produisent des effets analgésiques dépendants de la dose dans le test au formol (article 1 et 2). Par ailleurs, la combinaison de l'anandamide avec les AINS produit un effet synergique. Ces effets sont locaux puisque l'anandamide, l'ibuprofène et le rofécoxib administrés du côté de la patte controlatérale ne produisent pas d'effets antinociceptifs à des doses bien supérieures à leurs doses efficaces 50 (DE₅₀) administrées du côté ipsilatéral. De plus, l'administration exogène de l'anandamide avec les AINS (ibuprofène et rofécoxib) a augmenté les niveaux d'anandamide, d'oléoyléthanolamide et de palmitoyléthanolamide dans les tissus de pattes inflammées (article 2). Finalement, l'effet antinociceptif de la combinaison de l'anandamide avec les AINS ne passe pas par les récepteurs TRPV1, mais impliquerait plutôt les récepteurs CB₁ et CB₂ pour ce qui concerne l'anandamide combinée avec l'ibuprofène (article 1 et 2).

7.1.1.1 Effet antinociceptif local des cannabinoïdes et des endocannabinoïdes

L'administration locale d'anandamide produit une réduction significative du comportement douloureux (article 1 et 2). Ces résultats confirment l'habileté des endocannabinoïdes à réduire l'hyperalgésie dans les modèles murins d'inflammation aiguë (Mazzari et coll., 1996; Calignano et coll., 1998; 2001; Jaggar et coll., 1998; Richardson et coll., 1998c; Hanus et coll., 1999). L'administration locale d'anandamide a été reconnue comme étant 100 fois plus puissante pour prévenir le comportement douloureux lié à l'injection du formol comparativement à son injection intraveineuse (Calignano et coll., 1998). Une

hydrolyse plus importante est retrouvée lors d'administration systémique correspondant à un effet inhibiteur maximum dans les dix premières minutes. C'est ainsi que l'effet antinociceptif de l'anandamide durant les deux phases du test au formol (correspondant au total à 60 minutes) s'expliquerait par son injection locale causant des niveaux plus élevés dans les tissus, contribuant ainsi à sa durée d'action prolongée (article 1 et 2).

Il a été démontré que l'effet antinociceptif de l'injection locale d'anandamide dans le test au formol (Calignano et coll., 1998; article 1) et dans le test à la carragénine (Richardson et coll., 1998c) passe par les récepteurs CB₁. Lichtman et coll. (2004) ont montré une réduction du comportement douloureux dans le test au formol qui serait dépendante des récepteurs CB₁ chez des souris dont le gène codant pour la FAAH a été invalidé. Certains auteurs favorisent toutefois l'implication prédominante des récepteurs CB₂ dans cet effet antinociceptif de l'administration locale d'anandamide (Sokal et coll., 2003). Cependant, l'augmentation des niveaux d'anandamide tissulaire ne cause pas l'activation des récepteurs TRPV1, puisque l'interaction de l'anandamide avec les AINS (ibuprofène ou rofécoxib) produit le même effet antinociceptif en présence ou en absence de capsazépine, un antagoniste des récepteurs TRPV1 (article 2). Afin de conclure définitivement à une absence d'activation des récepteurs TRPV1 lors d'une élévation des quantités d'anandamide, il serait important de confirmer ces résultats par l'utilisation de souris dont le gène pour le récepteur TRPV1 a été invalidé (Bolcskei et coll., 2005; Barton et coll., 2006). Toutefois, l'effet antinociceptif retrouvé dans les deux phases du test au formol lors de l'administration exclusive de capsazépine suggère l'existence d'un tonus pronociceptif

des récepteurs vanilloïdes au niveau périphérique (article 2). Ceci a été corroboré chez les souris dont le gène pour le récepteur TRPV1 a été invalidé lors d'hyperalgésie mécanique et thermique, mais non lors du test au formol et à la carragénine (Bolcskei et coll., 2005). L'activation des récepteurs TRPV1 joue donc un rôle pronociceptif dans certains modèles animaux de blessures tissulaires aiguës.

Le PEA possède des propriétés anti-inflammatoires et antinociceptives (Calignano et coll., 1998) dont les effets anti-inflammatoires s'expliqueraient par l'activation des récepteurs PPAR α (Lo Verme et coll., 2005a). Il est à noter que les niveaux de PEA sont augmentés de façon significative lors de la combinaison de l'anandamide avec les AINS et plus particulièrement avec le rofécoxib (article 2). Cette différence produite par le rofécoxib nécessite d'être approfondie plus en détails afin de mieux comprendre la hausse des niveaux de PEA, un ligand endogène des PPAR α .

7.1.1.2 Effet antinociceptif local des AINS

L'inhibition de la synthèse des prostaglandines au niveau du site périphérique d'inflammation est causée par l'action antinociceptive des AINS (Taiwo & Levine, 1990). En effet, il a été démontré que l'administration locale d'un inhibiteur non-sélectif des COX (diclofénac) (Torres-Lopez et coll., 2002), d'un inhibiteur spécifique de la COX-1 (resvératrol) (Torres-Lopez et coll., 2002) ou d'inhibiteurs spécifiques de la COX-2 (lumiracoxib, nimésulide, méloxicam) (Islas-Cadena et coll., 1999; Aguirre-Banuelos & Granados-Soto, 2000; Lozano-Cuenza et coll., 2005) produit un effet antinociceptif dans le

test au formol. Par ailleurs, l'administration orale ou intrathécale d'indométhacine ou de célécoxib diminue le comportement douloureux lors du test au formol (Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 2002). De plus, le rofécoxib et le NS-398, tous deux des inhibiteurs spécifiques de la COX-2, ainsi que l'indométhacine et le diclofénac diminuent le comportement douloureux dans le test au formol (Euchenhofer et coll., 1998; Sandrini et coll., 2002; Choi et coll., 2003). Par ailleurs, le rofécoxib produit un effet antinociceptif à de très basses concentrations dans les deux phases du test au formol, ce qui a également été corroboré avec le NS-398 (article 2). Cependant, l'effet antinociceptif des inhibiteurs sélectifs pour la COX-2 reste controversé, particulièrement lors de la première phase du test au formol, puisque les niveaux de COX-2 sont très peu exprimés en périphérie. Toutefois, l'induction de l'expression des COX-2 et/ou la hausse des niveaux de prostaglandines peuvent être augmentées suite à un stimulus aigu, tel que l'injection de formol, causant une augmentation de la sensibilité pour les inhibiteurs des COX-2 (Dirig et coll., 1997). De plus, plusieurs tissus périphériques expriment la COX-2 à de faibles niveaux, mais ces derniers sont augmentés dramatiquement suite à une insulte tissulaire (Ghilardi et coll., 2004). Par ailleurs, il a été démontré que les produits de la COX-2 sont libérés immédiatement après l'injection de formol et que l'injection intraplantaire de célécoxib inhibe complètement l'hyperalgésie secondaire qui s'est développée (Veiga et coll., 2004). Ainsi, selon les découvertes retrouvées dans les études précédentes (Dirig et coll., 1997; Ghilardi et coll., 2004), il est possible que l'injection de NaCl 0,9 %, de rofécoxib ou de NS-398, dans les 15 minutes précédant l'injection de formol, induise l'expression locale de

COX-2. Pour répondre à cette question, nous avons étudié l'administration de formol 2,5 % dans trois groupes de rats dont le premier et le troisième ont reçu respectivement du NaCl 0,9 % et du rofécoxib 0,1 µg dans les 15 minutes précédant l'injection de formol, tandis que le deuxième groupe a seulement reçu du formol. Nous avons démontré que l'administration de NaCl 0,9 % avant l'injection de formol provoque plus de douleur comparativement au groupe ayant reçu uniquement du formol. De plus, l'injection unique de formol ou l'injection de rofécoxib avant le formol produisent des niveaux semblables de douleur tel que démontré dans le schéma suivant.

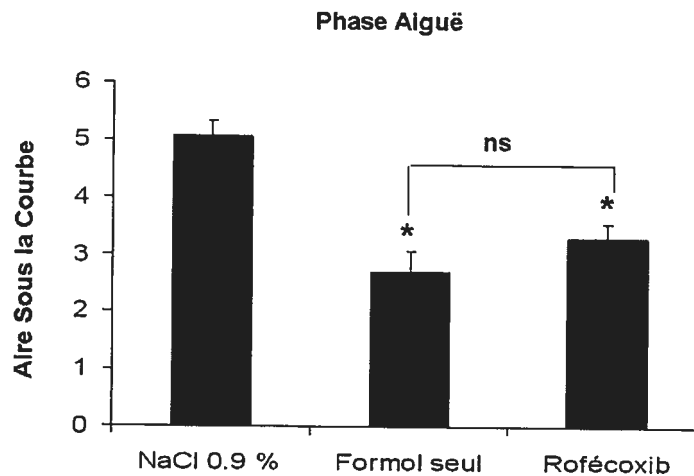


Figure 10 : L'effet local de l'administration ou non de substances avant l'injection de formol 2,5 % dans la phase aiguë du test au formol.

Dans plusieurs tissus périphériques, la COX-2 est exprimée normalement à des niveaux très bas, mais ces derniers sont augmentés dramatiquement suite à une blessure tissulaire (Ghilardi et coll., 2004). Nous pouvons donc suggérer que l'injection intraplantaire avant l'injection de formol produit une blessure tissulaire assez importante pour induire la formation de COX-2 localement, ce qui explique la différence obtenue entre l'injection de NaCl 0,9 % produisant plus de douleur comparativement à l'injection unique de formol ainsi que l'analgésie produite par le rofécoxib.

Cependant, il n'y a pas seulement les AINS qui peuvent inhiber l'action de la FAAH, mais il y a aussi les inhibiteurs des sérines-protéases tel que le fluorure phénylméthylsulfonyl (PMSF) (Deutsch et coll., 2002), le fluorophosphonate diisopropyl (Ueda & Yamamoto, 2000), le propofol (Patel et coll., 2003; article 5 dans l'annexe 1) et bien d'autres. Ainsi, il a été démontré que le propofol (un agent anesthésique intraveineux) inhibe l'action de la FAAH *in vitro* et que l'administration de propofol augmente les concentrations d'anandamide au niveau du cerveau murin (Patel et coll., 2003). De plus, le propofol produit un effet antinociceptif dépendant de la dose dans le test au formol. Cet effet local implique les récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ et une augmentation des niveaux de PEA est retrouvée (article 5 dans l'annexe 1). Par contre, la contribution des récepteurs cannabinoïdes ainsi que celle d'autres médiateurs dans l'implication de l'effet antinociceptif du propofol nécessite d'être approfondie plus en avant.

7.1.1.3 Effet antinociceptif de la combinaison des cannabinoïdes avec les AINS

Dans le test au formol, il a été démontré que l'injection intrathécale d'indométhacine (Gühring et coll., 2002) ou de flurbiprofène (Ates et coll., 2003) produit un effet antinociceptif. Cet effet est inhibé par un antagoniste des récepteurs CB₁ et absent chez des souris dont le gène pour le récepteur CB₁ a été invalidé. De plus, le flurbiprofène inhibe la libération de CGRP (« calcitonin gene-related peptide ») induite par la capsaïcine au niveau spinal et fait en sorte que cette inhibition est renversée par un antagoniste des récepteurs CB₁ (AM251) (Seidel et coll., 2003). Il a également été observé que l'indométhacine administrée de façon systémique engendre un effet anti-inflammatoire (test à la carragénine) (Holt et coll., 2005) et que l'acétaminophène donné *per os* produit un effet analgésique (test de la plaque chauffante) (Ottani et coll., 2006). L'effet anti-inflammatoire est dépendant des récepteurs CB₂ (inhibé par le SR144528) (Holt et coll., 2005) et l'effet analgésique est lié au récepteur CB₁ (renversé par l'AM281 et le SR141716A) (Ottani et coll., 2006). De plus, l'administration orale de PEA (Lo Verme et coll., 2005a) et d'indométhacine (Conti et coll., 2002) est associée à des propriétés anti-œdémateuses et anti-inflammatoires dans un modèle d'inflammation aiguë. Par ailleurs, l'administration locale d'anandamide, d'ibuprofène ainsi que leur combinaison diminue le comportement douloureux dans le test au formol (article 2). Cette combinaison d'un endocannabinoïde avec l'ibuprofène produit un effet antinociceptif synergique dépendant des récepteurs CB₁ et CB₂. Cette synergie d'effet 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 action individuelle. Cette augmentation des niveaux d'amides des acides gras endogènes est significativement plus marquée pour l'association de l'anandamide avec le rofécoxib par rapport à celle avec l'ibuprofène et, dans les deux cas, n'est pas due à une action au niveau des récepteurs TRPV1 (article 2). Ainsi, une augmentation de la synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique pourrait être favorisée en raison des niveaux élevés d'anandamide (son métabolisme est inhibé par le blocage de la FAAH et de la COX-2), ce qui expliquerait l'effet hyperalgésique de la combinaison de l'anandamide avec l'ibuprofène en présence des antagonistes des récepteurs cannabinoïdes. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en mesurant les niveaux endogènes des prostaglandines. Par ailleurs, la COX-2 pourrait être impliquée dans l'oxydation métabolique des endocannabinoïdes et donc, en présence de rofécoxib, il y aurait une diminution dans le métabolisme des amides des acides gras endogènes, ce qui augmenterait leurs niveaux locaux comparativement à l'utilisation de l'ibuprofène (Kozak et coll., 2003; Weber et coll., 2004).

L'effet antinociceptif synergique produit par la combinaison de l'anandamide avec les AINS (ibuprofène et rofécoxib) déplace la courbe dose-réponse vers la gauche (article 1 et 2) ce qui s'explique par l'inhibition du métabolisme de l'anandamide par les AINS. Par ailleurs, cette même combinaison produit un autre effet puisque la courbe se rapproche de l'axe des X ce qui est caractéristique d'une plus grande efficacité. Ainsi, cet effet pourrait être expliqué par l'activation des récepteurs cannabinoïdes et aussi par l'inhibition de la synthèse des prostaglandines et donc expliquerait l'efficacité supérieure de la combinaison

de l'anandamide avec les AINS (ibuprofène et rofécoxib) comparativement à chacune des substances administrés seules (article 1).

7.1.1.4 Niveaux tissulaires d'amides des acides gras endogènes

D'autres études ont évalué les niveaux d'endocannabinoïdes (Beaulieu et coll., 2000) ou de l'activité de la FAAH (Beaulieu et coll., 2000; Holt et coll., 2005) mesurés dans les pattes chez les rongeurs. Toutefois, les endocannabinoïdes étaient mesurés à partir des lipides extraits des tissus (Beaulieu et coll., 2000) comparativement à la mesure de ces derniers en fonction de la quantité exprimée dans les tissus (article 2). Par ailleurs, les amides des acides gras endogènes ont été mesurés après l'injection de NaCl 0,9 % suivie du formol (article 2) et non dans des conditions témoins sans injection de toute sorte (Beaulieu et coll., 2000). Ainsi, la comparaison entre ces deux études s'avère plutôt périlleuse étant donné leurs différences méthodologiques.

Une différence importante est observée quant aux niveaux d'anandamide lorsqu'administré seul comparativement à ceux observés lors de sa combinaison avec les AINS et plus particulièrement avec le rofécoxib, et ce, aussi pour l'OEA et le PEA dans le test au formol (article 2). Cette différence, sans être évidente, peut s'expliquer par une inhibition de la dégradation de l'anandamide (Cravatt et coll., 1996) et de l'OEA (Lo Verme et coll., 2005b) par la FAAH qui est inhibée par les AINS et, plus spécifiquement, par les inhibiteurs sélectifs des COX-2 (article 2). Cependant, le PEA est métabolisé par une enzyme particulière la NPAA (N-palmitoyléthanolamine acide amidase) (différente de la FAAH) (Ueda et coll., 2001). Il serait donc possible d'envisager que la NPAA soit inhibée

par les AINS et de façon plus marquée par le rofécoxib. Cette possibilité n'est toutefois pas exclusive et d'autres avenues devront être explorées lors de nouvelles études afin d'élucider l'augmentation des niveaux d'amides des acides gras endogènes et, plus particulièrement, des niveaux de PEA.

7.1.2 Modulation du 2-AG dans le test au formol

L'hypothèse suivante stipule que l'administration locale de 2-AG produirait un effet antinociceptif qui serait potentialisé par l'URB602 lorsque les deux sont administrés simultanément. En effet, le 2-AG est hydrolysé par son enzyme, la MGL qui est inhibée par l'URB602, son inhibiteur sélectif (Hohmann et coll., 2005). Le 2-AG serait donc présent de façon plus abondante puisqu'il ne serait pas hydrolysé tel qu'il a été démontré au niveau de la substance grise périaqueducule (PAG) (Hohmann et coll., 2005) et des neurones pyramidaux de l'hippocampe (Makara et coll., 2005).

Un effet antinociceptif dépendant de la dose a été démontré par l'administration périphérique de 2-AG et d'URB602 dans le test au formol (article 3). Ces effets sont produits localement étant donné que l'administration de doses supérieures à leurs DE_{50} du côté controlatéral n'engendre pas d'effets antinociceptifs. De plus, la combinaison du 2-AG avec l'URB602 produit un effet analgésique additif. C'est ainsi que l'effet analgésique du 2-AG est expliqué par l'activation des récepteurs CB_2 alors que celui de l'URB602 implique les récepteurs CB_1 et CB_2 .

7.1.2.1 Effet antinociceptif local des cannabinoïdes et des endocannabinoïdes

Des études suggèrent que les récepteurs cannabinoïdes CB₂ contribuent à l'effet antinociceptif produit 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). En effet, l'AM1241, un agoniste sélectif des récepteurs CB₂, atténue la nociception (Malan et coll., 2001) et l'hyperalgésie (Nackley et coll., 2003b; Quartilho et coll., 2003) thermique suite à son administration locale. Par ailleurs, le 2-AG produit un effet antinociceptif dépendant de la dose tel que démontré par la courbe dose-réponse et impliquant les récepteurs CB₂ (article 3). Il y a des études qui suggèrent que le 2-AG agirait comme un agoniste spécifique des récepteurs CB₂ (Gonsiorek et coll., 2000; Sugiura et coll., 2000; Maresz et coll., 2005). C'est ainsi que l'activation sélective des récepteurs CB₂ situés en périphérie produirait des effets antinociceptifs malgré la distribution de ces derniers au niveau des voies de la douleur. Leur rôle exact nécessite toutefois quelques clarifications. Les récepteurs CB₂ sont principalement situés au niveau des cellules du système immunitaire tels que les lymphocytes T et B ainsi que les macrophages (Munro et coll., 1993; Galiègue et coll., 1995) et au niveau des terminaisons périphériques (Griffin et coll., 1997; Pertwee, 1999). Par ailleurs, il a été démontré que ces derniers ne sont pas situés au niveau du système nerveux central (Munro et coll., 1993; Griffin et coll., 1997; Zimmer et coll., 1999; Buckley et coll., 2000) malgré une étude récente qui démontre le contraire (Van Sickle et coll., 2005). Ces données suggèrent donc que des agonistes sélectifs pour les récepteurs CB₂ ne produiront pas les effets délétères centraux liés aux

agonistes des récepteurs CB₁ situés au niveau du système nerveux central. De plus, le 2-AG est présent au niveau des tissus périphériques (Beaulieu et coll., 2000) et les récepteurs CB₂ ont été identifiés au niveau des tissus de la patte de souris et de rats (Walczak et coll., 2005; 2006). C'est ainsi que l'effet antinociceptif du 2-AG semble passer par une activation directe des récepteurs CB₂ situés localement au niveau des pattes injectées et ceci est confirmé par l'effet analgésique qui est inhibé par un antagoniste des récepteurs CB₂ (article 3). De plus, l'injection du 2-AG du côté controlatéral n'atténue pas le comportement douloureux associé à l'injection de formol démontrant un effet périphérique. Cependant, d'autres mécanismes peuvent expliquer l'effet antinociceptif produit par les agonistes sélectifs des récepteurs CB₂. Une des possibilités consiste en l'action de ces derniers au niveau des terminaisons périphériques des neurones afférents primaires (Malan et coll., 2002) mais leur présence au niveau des neurones périphériques reste controversée. Une autre alternative consiste en l'activation des récepteurs CB₂ situés sur les mastocytes et les cellules immunitaires diminuant ainsi la libération des médiateurs de l'inflammation, réduisant la sensibilité des neurones afférents primaires et donc atténuant les comportements douloureux (Malan et coll., 2002). Un autre mécanisme suggère que les récepteurs cannabinoïdes peuvent inhiber la réponse des neurones afférents primaires en raison de la stimulation de la libération locale d'endorphines endogènes par les kératinocytes. En effet, il a été démontré que l'activation des récepteurs CB₂ stimulait la libération de β -endorphines provenant des kératinocytes qui agissent au niveau des récepteurs μ -opioïdes localement afin d'inhiber la douleur (Ibrahim et coll., 2005). Le

marquage immunologique a démontré la présence de récepteurs CB₂ et de β-endorphines au niveau des kératinocytes situés dans la couche granuleuse de l'épiderme de la patte (Ibrahim et coll., 2005). La voie de signalisation intracellulaire reliant l'activation des récepteurs CB₂ à la synthèse de β-endorphines reste inconnue. Les données actuelles démontrent qu'il est peu probable que l'action analgésique du 2-AG et des autres endocannabinoïdes s'explique seulement par l'exclusivité de leur action directement au niveau de leurs récepteurs, mais qu'elle impliquerait plutôt d'autres voies de signalisation et l'interaction avec d'autres récepteurs. C'est pourquoi l'effet antinociceptif du 2-AG pourrait passer, en partie, par l'activation des récepteurs CB₂ et aussi par l'activation des récepteurs μ-opioïdes par les β-endorphines produites au niveau des kératinocytes. Par ailleurs, il ne faut pas oublier que l'existence d'autres récepteurs cannabinoïdes a été suggérée (Begg et coll., 2005). Il serait donc possible que le 2-AG exerce un effet antinociceptif par le biais d'un autre récepteur cannabinoïde non-caractérisé jusqu'à maintenant.

7.1.2.2 Effet antinociceptif local des inhibiteurs de la MGL

La capacité des inhibiteurs de la MGL à amplifier l'analgésie induite par le stress et dépendante des endocannabinoïdes souligne l'importance de cette enzyme comme nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des douleurs et des désordres liés au stress (Hohmann et coll., 2005). En effet, les auteurs ont développé l'URB602, un inhibiteur non-compétitif de la MGL qui bloque l'hydrolyse du 2-AG au niveau de coupe cérébrale murine sans

affecter la dégradation de l'anandamide par la FAAH. Une inhibition sélective du 2-AG peut offrir l'opportunité de mieux étudier ses fonctions faisant suite au blocage de sa dégradation, causant ainsi une amplification de son action intrinsèque et de ses propriétés analgésiques. Une augmentation des niveaux de 2-AG a été démontrée au niveau du PAG suite à l'administration d'URB602 (Hohmann et coll., 2005). Par ailleurs, l'URB602 augmente aussi les niveaux de 2-AG dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe (Makara et coll., 2005). C'est ainsi que l'effet antinociceptif local de l'URB602 a été démontré par sa courbe dose-réponse obtenue à partir du test au formol (article 3). L'effet analgésique de l'administration locale de l'URB602 impliquerait l'augmentation des niveaux de 2-AG en périphérie comme un mécanisme probable. Cet effet analgésique de l'URB602 implique les récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ (article 3). Ces résultats sont quelque peu inattendus puisque l'effet antinociceptif du 2-AG est surtout le fait des récepteurs CB₂ et donc une augmentation de ses niveaux en bloquant la MGL activerait seulement les récepteurs CB₂. Une explication possible consiste dans le fait que le 2-AG présent localement en plus grande quantité activerait les récepteurs CB₁ et CB₂ afin de produire son effet antinociceptif. Une autre alternative serait que, suite au blocage de la MGL par l'URB602, le 2-AG serait dégradé par la FAAH qui peut aussi métaboliser le 2-AG (Di Marzo et coll., 1998b). Dans ce cas, une augmentation des niveaux d'anandamide serait obtenue dans les tissus périphériques et expliquerait l'effet antinociceptif impliquant les récepteurs CB₁.

7.1.2.3 Effet antinociceptif de la combinaison du 2-AG avec les inhibiteurs de la MGL

L'inhibition de la dégradation du 2-AG par la MGL produit une analgésie supérieure dépendante des endocannabinoïdes dans un modèle de stress (Hohmann et coll., 2005). Par ailleurs, l'administration simultanée de 2-AG et d'URB602 localement au niveau de la surface dorsale de la patte du rat diminue le comportement douloureux dans les deux phases du test au formol (article 3). Dans la phase inflammatoire, un effet analgésique additif est observé. Malgré le fait que l'URB602 soit un inhibiteur sélectif de la MGL, ce dernier possède une puissance assez faible (Hohmann et coll., 2005). C'est pourquoi l'utilisation d'agent plus puissant et plus sélectif reste à considérer. L'URB574 semblerait plus puissant que l'URB602 dans son inhibition de la MGL (Makara et coll., 2005), ce qui reste controversé (Dr Nephi Stella en 2006: communication personnelle lors du 36^e Congrès de Neurosciences). D'autres inhibiteurs de la MGL restent à découvrir, puisque cette nouvelle cible thérapeutique confère des possibilités intéressantes dans le soulagement des douleurs et des désordres liés au stress. Les effets délétères centraux sont ainsi évités étant donné que cette enzyme est principalement située au niveau du système immunitaire et en périphérie.

Il a été question de l'inhibition de la dégradation des endocannabinoïdes (anandamide et 2-AG) par le blocage spécifique de leurs enzymes, ce qui constitue la manipulation pharmacologique du métabolisme. Cependant, il faut noter que cinq étapes allant de la synthèse jusqu'à la dégradation des endocannabinoïdes sont impliquées et peuvent donc

être utilisées comme possibilités thérapeutiques (Fowler et coll., 2005). C'est ainsi qu'une augmentation de la synthèse des endocannabinoïdes peut être envisagée par l'administration des constituants nécessaire à leur formation (acide arachidonique et éthanolamine pour l'anandamide et acide arachidonique et glycérol pour le 2-AG). Il est donc possible de moduler leur synthèse de même que leur libération (Fowler et coll., 2005). Ainsi, la libération d'anandamide ou d'endocannabinoïdes peut être bloquée par l'AM404 (Maccarrone et coll., 2002b) et le VDM11 (Ronesi et coll., 2004) donc la libération d'endocannabinoïdes peut être bloquée de façon pharmacologique. L'interaction avec les récepteurs cannabinoïdes et/ou vanilloïdes constitue une autre avenue thérapeutique comme, par exemple, le SR141716A (rimonabant) qui vient d'être mis sur le marché, dans certains pays européens, dans le traitement de l'obésité; il peut aussi aider les fumeurs qui veulent arrêter de fumer (Fowler et coll., 2005). La recapture de l'anandamide au niveau de la fente synaptique par le biais de son transporteur pourrait être inhibée par des composés inhibiteurs tels que le VDM11 (De Petrocellis et coll., 2000a) et l'UCM707 (Lopez-Rodriguez et coll., 2001), malgré le débat actuel quant à l'existence d'un tel transporteur. Cette inhibition de la recapture augmenterait les niveaux d'endocannabinoïdes au niveau de la fente synaptique et donc les effets produits par ceux-ci. Le métabolisme des endocannabinoïdes est produit par leurs enzymes de dégradation qui peuvent être bloquées par différents composés tels que les AINS, l'URB597, le PMSF, l'URB602, ce qui augmente leurs niveaux endogènes.

En conclusion, 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), ce qui lui confère un potentiel thérapeutique intéressant. Il a été question, dans les études précédentes, de la manipulation du métabolisme des endocannabinoïdes (anandamide et 2-AG) par les AINS et l'URB602 dans un modèle de douleur inflammatoire, ce qui constitue seulement qu'un des cinq niveaux. Les autres niveaux devront également être étudiés et considérés plus en détails afin d'améliorer les traitements concernant les douleurs inflammatoire et neuropathique.

7.2 Modulation des endocannabinoïdes dans un modèle de douleur neuropathique

7.2.1 Modulation de l'anandamide dans le modèle de Seltzer

Il s'est avéré que l'activité de la FAAH est inhibée par les AINS tels que l'ibuprofène, le kétorolac et le flurbiprofène (Fowler et coll., 1997; 1999). De ce fait, des AINS comme le kétorolac et le NS-398 peuvent agir en atténuant l'allodynie tactile suite à leur injection intrathécale et donc préviendrait l'hypersensibilité mécanique causée par la COX-1 et la COX-2 (Ma et coll., 2002). Ainsi, l'administration locale d'un endocannabinoïde comme l'anandamide diminue significativement l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique dans le modèle de ligature partielle du nerf sciatique (article 4). Par ailleurs, il a aussi été suggéré que l'ibuprofène et le rofécoxib ainsi que leur combinaison avec l'anandamide

abaissent le comportement douloureux lorsqu'administrés localement dans des conditions neuropathiques. Finalement, l'effet antiallodynique et antihyperalgésique de l'anandamide est dépendant de la dose. Cet effet de l'anandamide ainsi que sa combinaison avec les AINS (ibuprofène ou rofécoxib) implique les récepteurs cannabinoïdes CB₁ (article 4). Les résultats précédents sont confirmés par l'administration d'anandamide au niveau péritonéal, qui réduit l'hyperalgésie mécanique et qui là encore passe par les récepteurs cannabinoïdes CB₁ (Helyes et coll., 2003). Par ailleurs, l'administration systémique de WIN 55,212-2 renverse complètement l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique (Herzberg et coll., 1997; Bridges et coll., 2001; Walczak et coll., 2005; 2006). Par ailleurs, l'antinociception produite par l'activation des récepteurs cannabinoïdes CB₂ cause une diminution de l'allodynie et/ou de l'hyperalgésie retrouvée dans des modèles neuropathiques utilisant l'AM1241 (Ibrahim et coll., 2003) et le CP 55,940 (Scott et coll., 2004), deux agonistes CB₂ préférentiels administrés de façon systémique.

7.2.1.1 Effet antinociceptif local des cannabinoïdes et des endocannabinoïdes

L'injection locale d'anandamide au niveau de la patte opérée produit un effet analgésique dépendant de la dose pour les valeurs d'allodynie mécanique et d'hyperalgésie thermique qui retournent alors aux valeurs de bases (article 4). Cet effet de l'anandamide passe par les récepteurs cannabinoïdes CB₁. Ces résultats sont confirmés par l'administration intraplantaire de WIN 55,212-2 du côté ipsilatéral, ce qui produit un effet antihyperalgésique dépendant des récepteurs CB₁ (Fox et coll., 2001). Les valeurs de

l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie thermique du côté controlatéral demeurent les mêmes avant et après l'injection locale d'anandamide du côté ipsilatéral. De plus, l'administration de l'anandamide ou des AINS du côté controlatéral ne modifie pas les valeurs d'allodynie et d'hyperalgésie pour ce côté et aucun effet analgésique n'est retrouvé du côté ipsilatéral excluant la possibilité d'un effet systémique attribué à l'injection locale de l'anandamide ou des AINS (article 4). De plus, l'injection intraplantaire de JWH-133 (15 µg), un agoniste des récepteurs CB₂, diminue de façon significative la réponse mécanique des neurones à larges gammes réceptives dans le modèle de ligature du nerf spinal et cet effet est produit localement, puisque son administration du côté controlatéral n'a pas atténué la réponse des neurones à larges gammes (Elmes et coll., 2004). Ainsi, il y a peu d'études actuellement qui se sont intéressées aux effets antinociceptifs locaux produits par les cannabinoïdes endogènes dans la douleur neuropathique.

Une régulation à la hausse des récepteurs cannabinoïdes CB₁ est retrouvée lors de l'administration du WIN 55,212-2 (Lim et coll., 2003). De plus, cette régulation à la hausse a aussi été observée en périphérie (patte), au niveau des ganglions de la racine dorsale et du côté ipsilatéral lors de la ligature du nerf saphène (Walczak et coll., 2005; 2006). Une étude récente a également démontré que l'induction d'une neuropathie (utilisant la ligature du nerf spinal) engendre une augmentation des récepteurs cannabinoïdes et de leurs ligands endogènes (anandamide et 2-AG) du côté ipsilatéral au niveau des ganglions de la racine dorsale (Mitrirattanakul et coll., 2006). Ces résultats

démontrent que l'effet antinociceptif local produit par les endocannabinoïdes tel que l'anandamide active les récepteurs cannabinoïdes CB₁ situés en périphérie (article 4).

De ce fait, il est intéressant de constater que l'administration répétée de WIN 55,212-2 durant le développement de la neuropathie renverse l'hyperalgésie thermique et l'allodynie mécanique évaluée au 7^e jour et au 14^e jour dans le modèle de constriction du nerf sciatique (Costa et coll., 2004). Par ailleurs, l'administration préventive et continue de WIN 55,212-2 respectivement une semaine avant et deux semaines après la chirurgie du nerf sciatique diminue significativement l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie dans les 14 jours suivant la chirurgie (article 6 dans l'annexe 2). Il serait donc intéressant d'évaluer si l'administration préventive et continue d'un endocannabinoïde (anandamide) une semaine avant et deux semaines après la chirurgie du nerf sciatique provoque également un renversement de l'allodynie et de l'hyperalgésie dans ce modèle de douleur neuropathique.

7.2.1.2 Effet antinociceptif local des AINS

Il a été montré que l'injection locale (intraplantaire) de kétorolac du côté ipsilatéral suite à la ligature partielle du nerf sciatique renverse l'allodynie tactile (Ma & Eisenach, 2002). Ces résultats sont corroborés par l'administration locale d'ibuprofène et de rofécoxib qui ont aboli l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique et ce dans le même modèle neuropathique sans impliquer les récepteurs cannabinoïdes (article 4). Les effets anti-allodyniens de l'injection locale de kétorolac sont associés à une abondance de cellules réagissant à la COX-2 du côté des nerfs lésés donc causant une régulation à la hausse des

COX-2 (Ma & Eisenach, 2003a). Cet effet anti-allodynique du kétorolac injecté localement est retrouvé dans différents modèles de douleurs neuropathiques et semble durer plus longtemps lorsqu'administré dans les premières semaines suivant la lésion (Ma & Eisenach, 2003a). Une autre étude a suggéré que l'injection sous-cutanée d'indométhacine au niveau de la patte opérée réduit l'hypersensibilité mécanique de façon prolongée pour une période de dix jours dans un modèle de douleur neuropathique (Syriatowicz et coll., 1999). De plus, l'injection unique de kétorolac au niveau intrathécal réduit de façon significative l'allodynie mécanique pendant six jours (Ma et coll., 2002) dans le modèle de Seltzer. Par ailleurs, le NS-398 renverse significativement l'allodynie tactile lors d'administration intrathécale (Ma et coll., 2002). Ces résultats sont corroborés par l'administration orale d'étodolac (inhibiteur spécifique de la COX-2) (Suyama et coll., 2004) ou locale de rofécoxib (article 4) qui diminue l'allodynie mécanique et/ou l'hyperalgésie thermique lors de douleur neuropathique. De façon contradictoire, le rofécoxib ne modifie pas le développement de l'allodynie et de l'hyperalgésie suite à son injection systémique dans la douleur neuropathique (Broom et coll., 2004). C'est ainsi que l'implication de la COX-2 dans le développement de l'allodynie et de l'hyperalgésie fait actuellement l'objet d'une controverse (Broom et coll., 2004; Suyama et coll., 2004; article 4). Ainsi, l'effet antihyperalgésique du rofécoxib administré localement dans un modèle de douleur neuropathique n'avait jamais été démontré auparavant (article 4).

7.2.1.3 Effet antinociceptif de la combinaison des cannabinoïdes avec les AINS

La combinaison de l'anandamide avec un AINS (l'ibuprofène ou le rofécoxib) réduit l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique et implique l'activation des récepteurs cannabinoïdes CB₁ (article 4). Il est difficile de conclure à un effet additif ou synergique étant donné que seulement une dose de la combinaison de l'anandamide avec les AINS a été évaluée. Par ailleurs, les doses utilisées pour l'anandamide, l'ibuprofène et le rofécoxib étaient peut-être trop élevées et donc l'effet analgésique de leur administration individuelle pouvait renverser complètement le comportement douloureux. En effet, la dose d'anandamide (10 ng) utilisée en combinaison avec les AINS est de six à neuf fois supérieure à la DE₅₀ de l'anandamide obtenue dans des conditions neuropathiques (article 4).

Il ne faut pas perdre de vue que l'inhibition pharmacologique de la dégradation de l'anandamide que ce soit au niveau de la douleur inflammatoire ou neuropathique constitue une des cinq étapes pouvant être envisagées afin de moduler le système endocannabinoïde (Fowler et coll., 2005).

Il est donc important de considérer que cette inhibition du métabolisme de l'anandamide par les AINS constitue une des possibilités thérapeutiques pouvant être utilisées, qu'elle n'est pas exclusive et que les cinq étapes allant de la synthèse à sa dégradation peuvent être

combinées afin de mieux soulager les douleurs neuropathiques. Par exemple, une inhibition de la dégradation de l'anandamide pourrait être combinée avec un inhibiteur de la recapture de l'anandamide, ce qui causerait une augmentation de ses niveaux dans la fente synaptique ainsi que dans les terminaisons nerveuses.

VIII. Conclusion et perspectives

Ce travail a permis d'étudier la modulation du système endocannabinoïde par l'inhibition des enzymes dégradant les endocannabinoïdes (anandamide et 2-AG) en utilisant les AINS (ibuprofène et rofécoxib) ou un bloqueur de la MGL (URB602). Il s'est avéré que cette modulation de l'anandamide par les AINS produit un effet analgésique causant l'augmentation des niveaux d'endocannabinoïdes dans un modèle de douleur inflammatoire. De plus, l'interaction de l'anandamide avec les AINS produit un effet analgésique synergique dans le modèle de douleur inflammatoire (test au formol), mais seulement un effet additif dans le modèle de douleur neuropathique (lésion partielle du nerf sciatique). Ces effets antinociceptifs sont produits localement et impliquent les récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ dans la douleur inflammatoire et uniquement les récepteurs cannabinoïdes CB₁ dans la douleur neuropathique. Par ailleurs, la modulation du 2-AG par l'URB602 produit un effet analgésique additif local. De plus, l'action antinociceptive du 2-AG fait intervenir les récepteurs cannabinoïdes CB₁ alors que celle de l'URB602 passe par les récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂. Ainsi, la modulation périphérique des endocannabinoïdes par l'inhibition de leur dégradation s'avère une cible thérapeutique très intéressante dans le traitement des douleurs inflammatoire et neuropathique et permet d'éviter les effets délétères centraux liés à l'administration systémique des endocannabinoïdes. Un tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus permet de mettre en perspectives les effets produits localement dans la modulation du système endocannabinoïde.

Tableau V : Données obtenues dans un modèle de douleur inflammatoire et neuropathique. Abréviations: AEA, anandamide; URB, URB602; Ibu, ibuprofène; Rofe, rofécoxib; A + I, anandamide + ibuprofène; A + R, anandamide + rofécoxib; CB₁, récepteur cannabinoïde CB₁; CB₂, récepteur cannabinoïde CB₂; TRPV1, « transient receptor potential vanilloid 1 ».

	2-AG DE ₅₀ en µg	AEA DE ₅₀ en µg	URB DE ₅₀ en µg	Ibu DE ₅₀ en µg	Rofe DE ₅₀ en µg	A + I DE ₅₀ en µg	A + R DE ₅₀ en µg	CB₁ impliqué dans l'effet de	CB₂ impliqué dans l'effet de	TRPV1
Modèle inflammatoire (test au formol)	0,65 2-AG avec URB donne effet additif	0,018	67,93 2-AG avec URB donne effet additif	0,18	0,12	0,006 A+I donne effet synergique	0,0035 A+R donne effet synergique	URB, AEA et A+I	2-AG, URB et A+I en partie	non impliqué dans analgésie de A+I ou de A+R
Modèle neuropathique (Seltzer)	à faire	0,0016 (von Frey) et 0,0011 (laser)	à faire	pas fait en raison de l'effet additif	pas fait en raison de l'effet additif	pas fait en raison de l'effet additif	pas fait en raison de l'effet additif	AEA, A+I et A+R pour von Frey et laser	pas implique	pas fait en raison de l'effet additif

Quelques mécanismes d'action ont été explicités par notre étude, mais l'élucidation de bien d'autres mécanismes s'avère nécessaire à une meilleure compréhension de l'effet analgésique des cannabinoïdes administrés en périphérie. Ainsi, l'effet antinociceptif des endocannabinoïdes s'explique par l'action au niveau des récepteurs cannabinoïdes, mais certainement aussi par l'activation d'autres récepteurs et voies de signalisation. Par

ailleurs, il est important de noter que l'utilisation thérapeutique du SR141716A (Rimonabant), un antagoniste des récepteurs cannabinoïdes, dans le traitement de l'obésité (par diminution de l'appétit) pourrait poser un problème. En effet, l'inhibition chronique des récepteurs cannabinoïdes pourrait être associée à des douleurs s'il existe un tonus basal endocannabinoïde. De plus, il serait important en tenant compte de nos résultats d'étudier la possibilité ou non de la perte de l'effet analgésique des AINS lorsqu'ils sont combinés à des antagonistes des récepteurs cannabinoïdes en présence de niveaux élevés de cannabinoïdes endogènes. Des études cliniques devraient être en mesure de répondre à ces questions dans un futur proche.

IX. Bibliographie

Abel EL. (1980) Marijuana : The first twelve thousand years. New York: Plenum Press.

Adams IB, Martin BR. (1996) Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* 91: 1585-1614.

Adams R, Baker BR, Wearn RB. (1940) Structure of Cannabinol. III. Synthesis of Cannabinol, 1-Hydroxy-3-*n*-amyl-6,6,9-trimethyl-6-dibenzopyran. *J Am Chem Soc* 62: 2204-2207.

Aguirre-Banuelos P, Granados-Soto V. (2000) Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxicam in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 395: 9-13.

Ahern GP. (2003) Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J Biol Chem* 278: 30429-30434.

Alger BE. (2002) Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol* 68: 247-286.

Alger BE, Pitler TA, Wagner JJ, Martin LA, Morishita W, Kirov SA, Lenz RA. (1996) Retrograde signalling in depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampal CA1 cells. *J Physiol* 496: 197-209.

Al-Hayani A, Wease KN, Ross RA, Pertwee RG, Davies SN. (2001) The endogenous cannabinoid anandamide activates vanilloid receptors in the rat hippocampal slice. *Neuropharmacology* 41: 1000-1005.

Ates M, Hamza M, Seidel K, Kotalla CE, Ledent C, Gühring H. (2003) Intrathecally applied flurbiprofen produces an endocannabinoid-dependent antinociception in the rat formalin test. *Eur J Neurosci* 17: 597-604.

Bachur NR, Masek K, Melmon KL, Udenfriend S. (1965) Fatty acid amides of ethanolamine in mammalian tissues. *J Biol Chem* 240: 1019-1024.

Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ. (2003) The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol* 2: 291-298.

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.

Barg J, Fride E, Hanus L, Levy R, Matus-Leibovitch N, Heldman E, Bayewitch M, Mechoulam R, Vogel Z. (1995) Cannabinomimetic behavioral effects of and adenylate cyclase inhibition by two new endogenous anandamides. *Eur J Pharmacol* 287: 145-152.

Barton NJ, McQueen DS, Thomson D, Gauldie SD, Wilson AW, Salter DM, Chessell IP. (2006) Attenuation of experimental arthritis in TRPV1R knockout mice. *Exp Mol Pathol* 81: 166-170.

Beaulieu P, Bisogno T, Punwar S, Farquhar-Smith WP, Ambrosino G, Di Marzo V, Rice AS. (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, Baydoun A, Parsons ME, Molleman A. (2001) Signal transduction of cannabinoid CB1 receptors in a smooth muscle cell line. *J Physiol* 531: 95-104.

Begg M, Mo FM, Offertaler L, Batkai S, Pacher P, Razdan RK, Lovinger DM, Kunos G. (2003) G protein-coupled endothelial receptor for atypical cannabinoid ligands modulates a Ca²⁺-dependent K⁺ current. *J Biol Chem* 278: 46188-46194.

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

Beiche F, Scheuerer S, Brune K, Geisslinger G, Goppelt-Struebe M. (1996) Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Lett* 390: 165-169.

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.

Berger C, Schmid PC, Schabitz WR, Wolf M, Schwab S, Schmid HHO. (2004) Massive accumulation of N-acylethanolamines after stroke. Cell signalling in acute cerebral ischemia? *J Neurochem* 88: 1159-1167.

Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P. (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, Maurelli S, Melck D, De Petrocellis L, Di Marzo V. (1997) Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J Biol Chem* 272: 3315-3323.

Bolcskei K, Helyes Z, Szabo A, Sandor K, Elekes K, Nemeth J, Almasi R, Pinter E, Petho G, Szolcsanyi J. (2005) Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 117: 368-376.

Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrié B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P. (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB₁. *Biochem J* 312: 637-641.

Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrié B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Le Fur G, Casellas P. (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.

Breder CD, Dewitt D, Kraig RP. (1995) Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* 355: 296-315.

Bridges D, Ahmad K, Rice AS. (2001) The synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 133: 586-594.

Broom DC, Samad TA, Kohno T, Tegeder I, Geisslinger G, Woolf CJ. (2004) Cyclooxygenase 2 expression in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Neuroscience* 124: 891-900.

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

Buritova J, Besson JM. (1999) Expression de la protéine c-fos dans la corne dorsale de la moelle épinière : une technique pour étudier certains aspects physiopharmacologiques de la nociception. *Médecine/sciences* 15: 1126-1134.

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 SH, Rossetti RG, Yagen B, Zurier RB. (2000) Oxidative metabolism of anandamide. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 61: 29-41.

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.

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

Calignano A, La Rana G, Piomelli D. (2001) Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. *Eur J Pharmacol* 419: 191-198.

Carai MA, Colombo G, Gessa GL. (2005) Rimonabant: the first therapeutically relevant cannabinoid antagonist. *Life Sci* 77: 2339-2350.

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.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13926-13931.

Choi HS, Lee HJ, Jung CY, Ju JS, Park JS, Ahn DK. (2003) Central cyclooxygenase-2 participates in interleukin-1 beta-induced hyperalgesia in the orofacial formalin test of freely moving rats. *Neurosci Lett* 352: 187-190.

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

Connell K, Bolton N, Olsen D, Piomelli D, Hohmann AG. (2005) Role of the basolateral nucleus of the amygdala in endocannabinoid-mediated stress-induced analgesia. *Neurosci Lett* 397: 180-184.

Conti S, Costa B, Colleoni M, Parolaro D, Giagnoni G. (2002) Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br J Pharmacol* 135: 181-187.

Costa B, Colleoni M, Conti S, Trovato AE, Bianchi M, Sotgiu ML, Giagnoni G. (2004) Repeated treatment with 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 BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH. (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 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. (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.

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.

De Petrocellis L, Bisogno T, Davis JB, Pertwee RG, Di Marzo V. (2000a) Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett* 483: 52-56.

De Petrocellis L, Bisogno T, Ligresti A, Bifulco M, Melck D, Di Marzo V. (2002) Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide interacting with both the cannabinoid and vanilloid signalling systems. *Fundam Clin Pharmacol* 16: 297-302.

De Petrocellis L, Melck D, Bisogno T, Di Marzo V. (2000b) Endocannabinoids and fatty acid amides in cancer, inflammation and related disorders. *Chem Phys Lipids* 108: 191-209.

Deutsch DG, Lin S, Hill WA, Morse KL, Salehani D, Arreaza G, Omeir RL, Makriyannis A. (1997) Fatty acid sulfonyl fluorides inhibit anandamide metabolism and bind to the cannabinoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 217-221.

Deutsch DG, Ueda N, Yamamoto S. (2002) The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 201-210.

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, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946-1949.

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. (2006) A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends Pharmacol Sci* 27: 134-140.

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, De Petrocellis L, Melck D, Orlando P, Wagner JA, Kunos G. (1999) Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *Eur J Biochem* 264: 258-267.

Di Marzo V, Bisogno T, Melck D, Ross R, Brockie H, Stevenson L, Pertwee R, De Petrocellis L. (1998a) Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. *FEBS Lett* 436: 449-454.

Di Marzo V, Bisogno T, Sugiura T, Melck D, De Petrocellis L. (1998b) The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide. *Biochem J* 331: 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, Zimmer A, Martin BR. (2000) Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB₁ cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB₁, non-CB₂ receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem* 75: 2434-2444.

Di Marzo V, De Petrocellis L. (2006) Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu Rev Med* 57: 553-574.

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, Piomelli D. (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372: 686-691.

Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10819-10824.

Dirig DM, Konin GP, Isakson PC, Yaksh TL. (1997) Effect of spinal cyclooxygenase inhibitors in rat using the formalin test and in vitro prostaglandin E2 release. *Eur J Pharmacol* 331: 155-160.

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.

Euchenhofer C, Maihofner C, Brune K, Tegeder I, Geisslinger G. (1998) Differential effect of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS 398 and diclofenac on formalin-induced nociception in the rat. *Neurosci Lett* 248: 25-28.

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, Jaggar SI, Rice AS. (2002) Attenuation of nerve growth factor-induced visceral hyperalgesia via cannabinoid CB(1) and CB(2)-like receptors. *Pain* 97: 11-21.

Farquhar-Smith WP, Rice AS. (2001) Administration of endocannabinoids prevents a referred hyperalgesia associated with inflammation of the urinary bladder. *Anesthesiology* 94: 507-513.

Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Mol Pharmacol* 48: 443-450.

FitzGerald GA, Patrono C. (2001) The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 345: 433-442.

Fowler CJ. (2004) Oleamide: a member of the endocannabinoid family? *Br J Pharmacol* 141: 195-196.

Fowler CJ, Holt S, Nilsson O, Jonsson KO, Tiger G, Jacobsson SO. (2005) The endocannabinoid signaling system: pharmacological and therapeutic aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 248-262.

Fowler CJ, Janson U, Johnson RM, Wahlstrom G, Stenstrom A, Norstrom K, Tiger G. (1999) Inhibition of anandamide hydrolysis by the enantiomers of ibuprofen, ketorolac, and flurbiprofen. *Arch Biochem Biophys* 362: 191-196.

Fowler CJ, Stenstrom A, Tiger G. (1997) Ibuprofen inhibits the metabolism of the endogenous cannabimimetic agent anandamide. *Pharmacol Toxicol* 80: 103-107.

Fox A, Kesingland A, Gentry C, McNair K, Patel S, Urban L, James I. (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.

Francischi JN, Chaves CT, Moura AC, Lima AS, Rocha OA, Ferreira-Alves, Bakhle YS. (2002) Selective inhibitors of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. *Br J Pharmacol* 137: 837-844.

Gaetani S, Oveisi F, Piomelli D. (2003) Modulation of meal pattern in the rat by the anorexic lipid mediator oleoylethanolamide. *Neuropsychopharmacology* 28: 1311-1316.

Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232: 54-61.

Gaoni Y, Mechoulam R. (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86: 1646-1647.

Gaoni Y, Mechoulam R. (1971) The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J Am Chem Soc* 93: 217-224.

Gérard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. (1991) Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 279: 129-134.

Ghafouri N, Tiger G, Razdan RK, Mahadevan A, Pertwee RG, Martin BR, Fowler CJ. (2004) Inhibition of monoacylglycerol lipase and fatty acid amide hydrolase by analogues of 2-arachidonoylglycerol. *Br J Pharmacol* 143: 774-784.

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.

Glaser ST, Abumrad NA, Fatade F, Kaczocha M, Studholme KM, Deutsch DG. (2003) Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4269-4274.

Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW. (2000) Endocannabinoid 2-arachidonyl 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.

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, Huffman JW, Yu S, Lainton JA, Pertwee RG. (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.

Gühring H, Hamza M, Sergejeva M, Ates M, Kotalla CE, Ledent C, Brune K. (2002) A role for endocannabinoids in indomethacin-induced spinal antinociception. *Eur J Pharmacol* 454: 153-163.

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.

Hajos N, Ledent C, Freund TF. (2001) Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience* 106: 1-4.

Hansen HH, Schmid PC, Bittigau P, Lastres-Becker I, Berrendero F, Manzanares J, Ikonomidou C, Schmid HH, Fernandez-Ruiz JJ, Hansen HS. (2001) Anandamide, but not 2-arachidonoylglycerol, accumulates during in vivo neurodegeneration. *J Neurochem* 78: 1415-1427.

Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3662-3665.

Hanus L, Breuer A, Tchilibon S, Shiloah S, Goldenberg D, Horowitz M, Pertwee RG, Ross RA, Mechoulam R, Fride E. (1999) HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14228-14233.

Hanus L, Gopher A, Almog S, Mechoulam R. (1993) Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. *J Med Chem* 36: 3032-3034.

- 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.
- 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.
- 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.
- Hermann A, Kaczocha M, Deutsch DG. (2006) 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) membrane transport: history and outlook. *AAPS J* 8: E409-E412.
- 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, Jarrahian A, Campbell WB. (1997) Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *Neurochem* 69: 631-638.
- Hillard CJ, Jarrahian A. (2003) Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy. *Br J Pharmacol* 140: 802-808.
- Hirst RA, Lambert DG, Notcutt WG. (1998) Pharmacology and potential therapeutic uses of cannabis. *Br J Anaesth* 81: 77-84

Ho WS, Hiley CR. (2003) Vasodilator actions of abnormal-cannabidiol in rat isolated small mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 138: 1320-1332.

Hoehle MR, Caenazzo L, Martinez MM, Hsieh WT, Modi WS, Gershon ES, Bonner TI. (1991) Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6 q14-q15. *New Biol* 3: 880-885.

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. (1999a) 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, Herkenham M. (1999b) Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience* 92: 1171-1175.

Hohmann AG, Herkenham M. (2000) Localization of cannabinoid CB(1) receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study. *Synapse* 37: 71-80.

Hohmann AG, Martin WJ, Tsou K, Walker JM. (1995) Inhibition of noxious stimulus-evoked activity of spinal cord dorsal horn neurons by the cannabinoid WIN 55,212-2. *Life Sci* 56: 2111-2118.

Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, Krey JF, Walker JM, Holmes PV, Crystal JD, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D. (2005) An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435: 1108-1112.

Hohmann AG, Tsou K, Walker JM. (1998) Cannabinoid modulation of wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat by spinally administered WIN 55,212-2. *Neurosci Lett* 257: 119-122.

Hohmann AG, Tsou K, Walker JM. (1999) 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.

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.

Howlett AC. (1998) The CB₁ cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiol Dis* 5: 405-416.

Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ. (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 47: 345-358.

Howlett AC, Mukhopadhyay S. (2000) Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids* 108: 53-70.

Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V. (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8400-8405.

Ibrahim MM, Deng H, Zvonok A, Cockayne DA, Kwan J, Mata HP, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Makriyannis A, Malan TP Jr. (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, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, Davar G, Makriyannis A, Vanderah TW, Mata HP, Malan TP Jr. (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, Porreca F, Buckley NE, Makriyannis A, Malan TP Jr. (2006) CB2 cannabinoid receptor mediation of antinociception. *Pain* 122: 36-42.

Islas-Cadena M, Aguirre-Banuelos P, Granados-Soto V. (1999) Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive effect of nimesulide. *J Pharmacol Toxicol Methods* 42: 87-92.

Iversen L. (1999) High times for cannabis research. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5338-5339.

Iversen L. (2003) Cannabis and the brain. *Brain* 126: 1252-1270.

Iversen L, Chapman V. (2002) Cannabinoids: a real prospect for pain relief? *Curr Opin Pharmacol* 2: 50-55.

Izzo AA, Mascolo N, Capasso F. (2001) The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids. *Curr Opin Pharmacol* 1: 597-603.

Jacob A, Todd AR. (1940) Cannabis indica. Part II. Isolation of cannabidiol from Egyptian hashish. Observations on the structure of cannabinol. *J Chem Soc*: 649-653.

Jaggar 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, Goparaju SK, Wang L, Razdan RK, Sugiura T, Zimmer AM, Bonner TI, Zimmer A, Kunos G. (2000) Cardiovascular effects of 2-arachidonoyl glycerol in anesthetized mice. *Hypertension* 35: 679-684.

Jarai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A, Kunos G. (1999) Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB₁ or CB₂ receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14136-14141.

Jarrahan A, Manna S, Edgemond WS, Campbell WB, Hillard CJ. (2000) Structure-activity relationships among N-arachidonylethanolamine (Anandamide) head group analogues for the anandamide transporter. *J Neurochem* 74: 2597-2606.

- 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.
- Jin KL, Mao XO, Goldsmith PC, Greenberg DA. (2000) CB1 cannabinoid receptor induction in experimental stroke. *Ann Neurol* 48: 257-261.
- Jonsson KO, Holt S, Fowler CJ. (2006) The endocannabinoid system: current pharmacological research and therapeutic possibilities. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98: 124-134.
- Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Tiger G, Fowler CJ. (2001) Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *Br J Pharmacol* 133: 1263-1275.
- Joy JE, Watson SJ, Benson JA. (1999) Marijuana and medicine, assessing the science base. Washington (DC): National Academy Press.
- Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valino F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D. (2003) Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 9: 76-81.
- Kehl LJ, Hamamoto DT, Wacnik PW, Croft DL, Norsted BD, Wilcox GL, Simone DA. (2003) A cannabinoid agonist differentially attenuates deep tissue hyperalgesia in animal models of cancer and inflammatory muscle pain. *Pain* 103: 175-186.

- 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.
- Kim SH, Chung JM. (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50: 355-363.
- Kolesnick RN, Kronke M. (1998) Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 60: 643-665.
- Kozak KR, Prusakiewicz JJ, Rowlinson SW, Prudhomme DR, Marnett LJ. (2003) Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid anandamide. *Biochemistry* 42: 9041-9049.
- Kreitzer AC, Regehr WG. (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29: 717-727.
- Kunos G, Jarai Z, Batkai S, Goparaju SK, Ishac EJ, Liu J, Wang L, Wagner JA. (2000) Endocannabinoids as cardiovascular modulators. *Chem Phys Lipids* 108: 159-168.
- Lambert DM, Di Marzo V. (1999) The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas : are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr Med Chem* 6: 757-773.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M. (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB₁ receptor knockout mice. *Science* 283: 401-404.

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.

Leggett JD, Aspley S, Beckett SR, D'Antona AM, Kendall DA, Kendall DA. (2004) Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 141: 253-262.

Li J, Daughters RS, Bullis C, Bengiamin R, Stucky MW, Brennan J, Simone DA. (1999) The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 mesylate blocks the development of hyperalgesia produced by capsaicin in rats. *Pain* 81: 25-33.

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, 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.

Lichtman AH, Smith PB, Martin BR. (1992) The antinociceptive effects of intrathecally administered cannabinoids are influenced by lipophilicity. *Pain* 51: 19-26.

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.

Lopez-Rodriguez ML, Viso A, Ortega-Gutierrez S, Lastres-Becker I, Gonzalez S, Fernandez-Ruiz J, Ramos JA. (2001) Design, synthesis and biological evaluation of novel arachidonic acid derivatives as highly potent and selective endocannabinoid transporter inhibitors. *J Med Chem* 44: 4505-4508.

Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. (2005a) The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α 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.

Lozano-Cuenca J, Castaneda-Hernandez G, Granados-Soto V. (2005) Peripheral and spinal mechanisms of antinociceptive action of lumiracoxib. *Eur J Pharmacol* 513: 81-91.

Lutz B. (2002) Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 123-142.

Ma W, Du W, Eisenach JC. (2002) Role for both spinal cord COX-1 and COX-2 in maintenance of mechanical hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Brain Res* 937: 94-99.

Ma W, Eisenach JC. (2002) Morphological and pharmacological evidence for the role of peripheral prostaglandins in the pathogenesis of neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 15: 1037-1047.

Ma W, Eisenach JC. (2003a) Cyclooxygenase 2 in infiltrating inflammatory cells in injured nerve is universally up-regulated following various types of peripheral nerve injury. *Neuroscience* 121: 691-704.

Ma W, Eisenach JC. (2003b) Intraplantar injection of a cyclooxygenase inhibitor ketorolac reduces immunoreactivities of substance P, calcitonin gene-related peptide, and dynorphin in the dorsal horn of rats with nerve injury or inflammation. *Neuroscience* 121: 681-690.

Maccarrone M, Bari M, Battista N, Finazzi-Agro A. (2002a) Endocannabinoid degradation, endotoxic shock and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1: 53-63.

Maccarrone M, Bari M, Battista N, Finazzi-Agro A. (2002b) Estrogen stimulates arachidonylethanolamide release from human endothelial cells and platelet activation. *Blood* 100: 4040-4048.

Maccarrone M, Van Der Stelt M, Rossi A, Veldink GA, Vliegthart JF, Agro AF. (1998) Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain. *J Biol Chem* 273: 32332-32339.

Mackie K, Hille B. (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 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.

Maione S, Bisogno T, de Novellis V, Palazzo E, Cristino L, Valenti M, Petrosino S, Guglielmotti V, Rossi F, Di Marzo V. (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.

Makara JK, Mor M, Fegley D, Szabo SI, Kathuria S, Astarita G, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Rivara S, Freund TF, Piomelli D. (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, Porreca F, Makriyannis A. (2001) CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 93: 239-245.

Malan TP, 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, 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.

Malmberg AB, Yaksh TL. (1992) Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 136-146.

Malmberg AB, Yaksh TL. (1995) Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J Neurosci* 15: 2768-2776.

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.

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. (1999a) Anatomical basis for cannabinoid-induced antinociception as revealed by intracerebral microinjections. *Brain Res* 822: 237-242.

Martin WJ, Hohmann AG, Walker JM. (1996) Suppression of noxious stimulus-evoked activity in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus by a cannabinoid agonist: correlation between electrophysiological and antinociceptive effects. *J Neurosci* 16: 6601-6611.

Martin WJ, Loo CM, Basbaum AI. (1999b) Spinal cannabinoids are anti-allodynic in rats with persistent inflammation. *Pain* 82: 199-205.

Martin WJ, Patrick AL, 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.

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.

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.

McAllister SD, Glass M. (2002) CB₁ and CB₂ receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 161-171.

McFarland MJ, Barker EL. (2004) Anandamide transport. *Pharmacol Ther* 104: 117-135.

Mechoulam R. (1986) The pharmacohistory of cannabis sativa. Dans: Mechoulam R, éd. *Cannabinoids as therapeutic agents*. Boca Raton: CRC Press: 1-19.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50: 83-90.

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.

Millns PJ, Chapman V, Kendall DA. (2001) Cannabinoid inhibition of the capsaicin-induced calcium response in rat dorsal root ganglion neurones. *Br J Pharmacol* 132: 969-971.

Mitirattanakul S, Ramakul N, Guerrero AV, Matsuka Y, Ono T, Iwase H, Mackie K, Faull KF, Spigelman I. (2006) Site-specific increases in peripheral cannabinoid receptors and their endogenous ligands in a model of neuropathic pain. *Pain*, sous presse.

Moore SA, Nomikos GG, Dickason-Chesterfield AK, Schober DA, Schaus JM, Ying BP, Xu YC, Phebus L, Simmons RM, Li D, Iyengar S, Felder CC. (2005) Identification of a high-affinity binding site involved in the transport of endocannabinoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 17852-17857.

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 CB(2) receptors suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience* 119: 747-757.

Nackley AG, Suplita RL 2nd, 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.

Nicholson RA, Liao C, Zheng J, David LS, Coyne L, Errington AC, Singh G, Lees G. (2003) Sodium channel inhibition by anandamide and synthetic cannabimimetics in brain. *Brain Res* 978: 194-204.

Nolin P-C, Kenny C. (2003) *Le Cannabis : Rapport du comité spécial du Sénat sur les drogues illicites*. Montréal: Presse Université Montréal.

Offertaler L, Mo FM, Batkai S, Liu J, Begg M, Razdan RK, Martin BR, Bukoski RD, Kunos G. (2003) Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 63: 699-705.

Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M. (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29: 729-738.

Oka S, Tsuchie A, Tokumura A, Muramatsu M, Suhara Y, Takayama H, Waku K, Sugiura T. (2003) Ether-linked analogue of 2-arachidonoylglycerol (noladin ether) was not detected in the brains of various mammalian species. *J Neurochem* 85: 1374-1381.

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.

Onaivi ES, Chakrabarti A, Chaudhuri G. (1996) Cannabinoid receptor genes. *Prog Neurobiol* 48: 275-305.

O'Shaughnessy WB. (1838-1840) On the preparations of the Indian hemp (*Cannabis indica*); their effects on the animal system in health, and their utility in the treatment of tetanus and other convulsive diseases. *Transactions of the Medical and Physical Society, Bengal* 71-102: 421-426.

Ottani A, Leone S, Sandrini M, Ferrari A, Bertolini A. (2006) The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 531: 280-281.

Palmer SL, Thakur GA, Makriyannis A. (2002) Cannabinergic ligands. *Chem Phys Lipids* 121: 3-19.

Panikashvili D, Shein NA, Mechoulam R, Trembovler V, Kohen R, Alexandrovich A, Shohami E. (2005) The endocannabinoid 2-AG protects the blood-brain barrier after closed head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines. *Neurobiol Dis* 22: 257-264.

Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R, Shohami E. (2001) An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* 413: 527-531.

Parkkari T, Salo OM, Huttunen KM, Savinainen JR, Laitinen JT, Poso A, Nevalainen T, Jarvinen T. (2006) Synthesis and CB1 receptor activities of dimethylheptyl derivatives of 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) and 2-arachidonoyl glyceryl ether (2-AGE). *Bioorg Med Chem* 14: 2850-2858.

Parris WC, Janicki PK, Johnson B, Horn JL. (1996) Intrathecal ketorolac tromethamine produces analgesia after chronic constriction injury of sciatic nerve in rat. *Can J Anaesth* 43: 867-870.

Patel S, Wohlfeil ER, Rademacher DJ, Carrier EJ, Perry LJ, Kundu A, Falck JR, Nithipatikom K, Campbell WB, Hillard CJ. (2003) The general anesthetic propofol

increases brain N-arachidonylethanolamine (anandamide) content and inhibits fatty acid amide hydrolase. *Br J Pharmacol* 139: 1005-1013.

Paylor B, Holt S, Fowler CJ. (2006) The potency of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 is dependent upon the assay pH. *Pharmacol Res* 54: 481-485.

Pertwee RG. (1997) Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacol Ther* 74: 129-180.

Pertwee RG. (1998) Advances in cannabinoid receptor pharmacology. Dans: Brown D. T., éd. *Cannabis. The Genus Cannabis*. Amsterdam:Harwood Academic Publishers: 125-174.

Pertwee RG. (1999) Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 6: 635-664.

Pertwee RG. (2001) Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* 63: 569-611.

Pertwee R, Griffin G, Hanus L, Mechoulam R. (1994) Effects of two endogenous fatty acid ethanolamides on mouse vasa deferentia. *Eur J Pharmacol* 259: 115-120.

Pertwee RG, Ross RA. (2002) Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 101-121.

Picot D, Loll PJ, Garavito RM. (1994) The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1. *Nature* 367: 243-249.

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.

Piomelli D, Beltramo M, Giuffrida A, Stella N. (1998) Endogenous cannabinoid signalling. *Neurobiol Dis* 5: 462-473.

Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodriguez de Fonseca F. (2000) The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 21: 218-224.

Pitler TA, Alger BE. (1994) Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells: G protein involvement in a presynaptic mechanism. *Neuron* 13: 1447-1455.

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 1020-1024.

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

Richardson JD, Aanonsen L, Hargreaves KM. (1998a) Hypoactivity of the spinal cannabinoid system results in NMDA-dependent hyperalgesia. *J Neurosci* 18: 451-457.

Richardson JD, Aanonsen L, Hargreaves KM. (1998b) Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids. *Eur J Pharmacol* 345: 145-153.

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

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Neliat G, Caput D, Ferrara P, Soubrié P, Brelière JC, Le Fur G. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350: 240-244.

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.

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 ». Rapport effectué à la demande de Bernard Kouchner, Secrétariat d'État à la santé, publié à La documentation Française – Odile Jacob.

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, MacEwan DJ, Scott RH. (2001) Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology* 40: 221-232.

Rouach N, Nicoll RA. (2003) Endocannabinoids contribute to short-term but not long-term mGluR-induced depression in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 18: 1017-1020.

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.

Sanchez C, Rueda D, Segui B, Galve-Roperh I, Levade T, Guzman M. (2001) The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein fan. *Mol Pharmacol* 59: 955-959.

Sandrini M, Vitale G, Pini LA. (2002) Effect of rofecoxib on nociception and the serotonin system in the rat brain. *Inflamm Res* 51: 154-159.

Santé Canada. (2003) Bureau de l'accès médical au cannabis. Information destinée aux professionnels de la santé. 18 juillet 2003. http://www.hc-sc.gc.ca/hecs-sesc/bamc/publication/marihuana_fr/tm.htm

Scott DA, Wright CE, Angus JA. (2004) Evidence that CB-1 and CB-2 cannabinoid receptors mediate antinociception in neuropathic pain in the rat. *Pain* 109: 124-131.

Seidel K, Hamza M, Ates M, Gühring H. (2003) Flurbiprofen inhibits capsaicin induced calcitonin gene related peptide release from rat spinal cord via an endocannabinoid dependent mechanism. *Neurosci Lett* 338: 99-102.

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.

Showalter VM, Compton DR, Martin BR, Abood ME. (1996) Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 989-999.

Slipetz DM, O'Neill GP, Favreau L, Dufresne C, Gallant M, Gareau Y, Guay D, Labelle M, Metters KM. (1995) Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 48: 352-361.

Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB. (2000) The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol* 129: 227-230.

Smith FL, Fujimori K, Lowe J, Welch SP. (1998) Characterization of delta9-tetrahydrocannabinol and anandamide antinociception in nonarthritic and arthritic rats. *Pharmacol Biochem Behav* 60: 183-191.

Smith PB, Martin BR. (1992) Spinal mechanisms of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced analgesia. *Brain Res* 578: 8-12.

Smith PB, Welch SP, Martin BR. (1994) Interactions between delta 9-tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 268:1381-1387.

Snyder SH. (1971) *The uses of marijuana*. New York: Oxford University Press.

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.

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 USA* 96: 5786-5790.

Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388: 773-778.

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, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. (2002) Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 173-192.

Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Tonegawa T, Nakane S, Kishimoto S, Yamashita A, Waku K. (1996) 2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of intracellular free Ca^{2+} 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, Takayama H, Waku K, Seki C, Baba N, Ishima Y. (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, Suhara Y, Takayama H, Waku K. (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, Yamashita A, Waku K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 89-97.

Suplita RL, Farthing JN, Gutierrez T, Hohmann A. (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.

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.

Suyama H, Kawamoto M, Gaus S, Yuge O. (2004) Effect of etodolac, a COX-2 inhibitor, on neuropathic pain in a rat model. *Brain Res* 1010: 144-150.

Syriatowicz JP, Hu D, Walker JS, Tracey DJ. (1999) Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. *Neuroscience* 94: 587-594.

Taiwo YO, Levine JD. (1990) Effects of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism on cutaneous nociceptive threshold in the rat. *Brain Res* 537: 372-374.

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.

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

Torres-Lopez JE, Ortiz MI, Castaneda-Hernandez G, Alonso-Lopez R, Asomoza-Espinosa R, Granados-Soto V. (2002) Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test. *Life Sci* 70: 1669-1676.

Tsou K, Lowitz KA, Hohmann AG, Martin WJ, Hathaway CB, Bereiter DA, Walker JM. (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.

Tsuboi K, Sun YX, Okamoto Y, Araki N, Tonai T, Ueda N. (2005) Molecular characterization of N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the cholesteryl glycerol hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase. *J Biol Chem* 280: 11082-11092.

Uda R, Horiguchi S, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O. (1990) Nociceptive effects induced by intrathecal administration of prostaglandin D₂, E₂, or F₂ alpha to conscious mice. *Brain Res* 510: 26-32.

Ueda N, Yamamoto S. (2000) Anandamide amidohydrolase (fatty acid amide hydrolase). *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 61: 19-28.

Ueda N, Yamanaka K, Yamamoto S. (2001) Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance. *J Biol Chem* 276: 35552-35557.

- Vane JR. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231: 232-235.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors. *Science* 310: 329-332.
- Veiga AP, Duarte ID, Avila MN, da Motta PG, Tatsuo MA, Francischi JN. (2004) Prevention by celecoxib of secondary hyperalgesia induced by formalin in rats. *Life Sci* 75: 2807-2817.
- Venance L, Maldonado R, Manzoni O. (2004) Endocannabinoids in the central nervous system. *Med Sci (Paris)* 20: 45-53.
- Wagner JA, Varga K, Jarai Z, Kunos G. (1999) Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. *Hypertension* 33: 429-434.
- 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, Huang SM, Strangman NM, Tsou K, Sanudo-Pena MC. (1999) Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12198-12203.

Wang X, Miyares RL, Ahern GP. (2005) Oleoylethanolamide excites vagal sensory neurones, induces visceral pain and reduces short-term food intake in mice via capsaicin receptor TRPV1. *J Physiol* 564: 541-547.

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

Weber A, Ni J, Ling KH, Acheampong A, Tang-Liu DD, Burk R, Cravatt BF, Woodward D. (2004) Formation of prostamides from anandamide in FAAH knockout mice analyzed by HPLC with tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* 45: 757-763.

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.

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 RI, Nicoll RA. (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410: 588-592.

Witting A, Weydt P, Hong S, Kliot M, Moller T, Stella N. (2004) Endocannabinoids accumulate in spinal cord of SOD1 G93A transgenic mice. *J Neurochem* 89:1555-1557.

Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N. (2002) The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. *Anesth Analg* 94: 962-967.

Zias J, Stark H, Sellgman J, Levy R, Werker E, Breuer A, Mechoulam R.(1996) Early medical use of cannabis. *Nature* 363: 215.

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

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400: 452-457.

Annexe 1

Article 5 publié dans *Anesthesia & Analgesia*

“The antinociceptive effects of local injections of propofol in rats are mediated in part by cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors”

Short running title: Peripheral analgesic effects of propofol

**Josée Guindon¹, Jesse LoVerme³, André De Léan¹, Daniele Piomelli⁴
& Pierre Beaulieu^{1,2*}**

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

Departments of Psychiatry³ and Pharmacology⁴, University of California, Irvine, California
92697-4260.

*Author for Correspondence: Pierre Beaulieu, Department of Anesthesiology, CHUM –
Hôtel-Dieu, 3840 rue St-Urbain, Montréal, H2W 1T8, Québec, Canada

Tel: (1) 514-890-8000 ext. 14570

Fax: (1) 514-412-7222

E-mail: [REDACTED]

A.1.0 Abstract

Background: Propofol can inhibit fatty acid amidohydrolase (FAAH), the enzyme responsible for the metabolism of anandamide (an endocannabinoid). To study the potential antinociceptive effect of propofol, different doses (0.005-0.05-0.5-5 and 500 μg) of the anesthetic were administered in the hind paw of animals to determine an ED_{50} . To further investigate the mechanisms by which propofol produced its antinociceptive effect, we used specific antagonists for the cannabinoid CB_1 (AM251) and CB_2 (AM630) receptors and measured fatty-acid amide / endocannabinoid (anandamide, 2-arachidonylglycerol and palmitoylethanolamide) concentrations in skin paw tissues.

Methods: Formalin tests were performed on 65 Wistar rats allocated to six different groups: (1) control (Intralipid™ 10%); (2) propofol (ED_{50} dose); (3) AM251; (4) AM251 + propofol; (5) AM630; (6) AM630 + propofol. Drugs were injected subcutaneously in the dorsal surface of the hind paw (50 μL) 15 min before 2.5 % formalin injection into the same paw. Fatty-acid amide / endocannabinoid levels were measured by HPLC/MS analysis.

Results: Propofol produced a dose-dependent antinociceptive effect for the early and late phases of the formalin test with an ED_{50} of $0.08 \mu\text{g} \pm 0.061$ for the latter phase. This effect was antagonized by AM251 and AM630. It was locally mediated since a higher dose of propofol given in the contralateral paw was not antinociceptive. Finally, only paw concentrations of palmitoylethanolamide were significantly increased.

Conclusion: Locally injected propofol decreased pain behavior in a dose-dependent manner in a test of inflammatory pain. This antinociceptive effect was mediated in part by CB₁ and CB₂ receptors.

Key words: propofol; endocannabinoids; cannabinoid receptors; fatty acid amide hydrolase; formalin test; inflammatory pain; fatty-acid amides.

A.1.1 Introduction

Propofol is a widely used general anesthetic acting at the spinal and supraspinal level of the central nervous system.^{1,2} Propofol, dissolved in a fat emulsion containing 10% soybean oil consisting of long chain triglycerides, frequently induces pain at the site of injection when administered intravenously at induction of anesthesia possibly because of the generation of bradykinin produced by contact between the lipid solvent for propofol and the plasma kallikrein-kinin system. Despite this, an apparent paradox exists because antinociceptive properties of propofol have been demonstrated in animals.³⁻⁵ There is also evidence of a peripheral antinociceptive action of propofol in an inflammatory pain model.⁶ Furthermore, *in vitro*, propofol is a competitive inhibitor of fatty acid amide hydrolase (FAAH) (IC₅₀ value of 52 μ M) which catalyses the degradation of anandamide, an endogenous cannabinoid (endocannabinoid). Thus, it has been suggested in mice that propofol is able to activate the endocannabinoid system in mice via inhibition of anandamide catabolism and, therefore, it increases whole-brain content of anandamide which could contribute to its sedative properties.⁷

Natural or synthetic cannabinoids and endocannabinoids have potent antinociceptive properties in most animal models of pain⁸. The cannabinoid system comprises two G protein-coupled receptors, the CB₁ receptors localized mainly in the central nervous system including the spinal cord and dorsal root ganglia and in the periphery^{8,9}, and the CB₂ receptors found in immune tissues.¹⁰ Endocannabinoids such as anandamide and 2-arachidonylglycerol (2-AG) have been described together with their degrading enzymes, fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MGL), respectively. The

therapeutic utility of using compounds that would modulate the endocannabinoid system is beginning to attract more interest.¹¹ For example, FAAH activity is also inhibited by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)^{12,13} and we have shown that local administration of a combination of anandamide and NSAIDs produced antinociceptive effects in inflammatory¹⁴ and neuropathic¹⁵ pain models.

Therefore, the present study was designed to investigate the peripherally mediated antinociceptive effects of propofol in a test of acute and inflammatory pain. The mechanism by which propofol was able to produce its antinociceptive effect was also investigated by using specific antagonists for the cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors and by measuring fatty-acid amide / endocannabinoid paw skin concentrations.

A.1.2 Methods

A.1.2.1 Animals

This research protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the Université de Montréal and all procedures conformed to the guidelines of the Canadian Council for Animal Care. Sixty-nine male Wistar rats (Charles River, St-Constant, Québec, Canada), 180-220 g at the time of testing were housed in standard plastic cages with sawdust bedding in a climate-controlled room on a 12-h light/dark cycle. Animals were allowed free access to food pellets and water.

A.1.2.2 Drug administration

Propofol 1% (2,6-diisopropylphenol) (Abbott Laboratories Ltd., Saint-Laurent, Quebec, Canada) was further dissolved in Intralipid™ 10 % (Pharmacia & Upjohn Inc., Mississauga, Ontario, Canada). AM251 and AM630 are 306-fold¹⁶ and 70-165-fold¹⁷ selective for CB₁ and CB₂ receptor antagonists, respectively. AM251 and AM630 were dissolved in normal saline containing 8 and 2.5% dimethylsulfoxide (DMSO), respectively. AM251 and AM630 were purchased from Tocris (Ellisville, MO, USA).

A.1.2.3 Formalin test

The formalin test is a well-established model of persistent pain characterized by two phases. The first (early) phase is described as an acute activation of C and A δ fibres and the second (late) phase as an inflammatory reaction in peripheral tissue.¹⁸ Rats were acclimatized to the testing environment (clear Plexiglass box 29 x 29 x 25 cm) during 15 min or until cessation of explorative behavior. Propofol (0.005, 0.08, 0.05, 0.5, 5 or 500 μ g in 50 μ L), AM251 (80 μ g in 50 μ L) and AM630 (25 μ g in 50 μ L) were injected subcutaneously (s.c.) in the dorsal surface of the right hind paw 15 min before the injection of 2.5% formalin (50 μ L) next to the previous injection. Following each injection, the rat was immediately put back in the observation chamber. To exclude an effect of propofol on pain behavior in the time-interval (15 min) following its administration and formalin injection, experiments were performed in four rats consisting of the s.c. injection of 0.1 ml of propofol 1 % (1 mg). Rats behavior was subsequently observed for 30 min. Apart from the initial licking of the paw (lasting few seconds) associated with the actual pain of

injection (due to needle trauma), no animal displayed signs of discomfort at this very high dose of propofol.

Nociceptive behavior was observed with the help of a mirror angled at 45° below the observation chamber. Observation of the animal's behavior was made in consecutive 5-min periods for 60 min following formalin administration. In each 5-min period, the total time the animal spent in three different behavioral 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 behavior 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 behavioral response.¹⁹ The area under the curve (AUC) which corresponds to CPS-WST_{0,1,2} x time (min) was calculated for the acute phase (0-15 min) and the inflammatory phase (15-50 min) using the trapezoidal rule.

A.1.2.4 Protocol

The experiments were conducted in a randomized and blinded manner by the same experimenter. In a first study, the dose-response curves for propofol were determined using the data from the first and second phases. In a second study, the antinociceptive effects of propofol (at ED₅₀ dose) were studied in absence or in presence of cannabinoid antagonists: AM251 (80 µg)^{14,15,20} and AM630 (25 µg).^{14,15,20} For the first two studies (n = 4 for each group), the tested drugs were dissolved in the same total volume (50 µL) and administered in the right hind paw. Preliminary experiments in the formalin test (n = 3) have shown that there was no difference in pain behavior between Intralipid™ 10 %, 0.9% NaCl in water

and 0.9% NaCl in water with 8% DMSO (data not shown). Therefore, Intralipid™ 10 % was used as the control solution.

Finally, in order to exclude any possible systemic effect of the drugs, 500 µg of propofol was administered s.c. on the dorsal surface of the contralateral (left hind paw) or ipsilateral paw (n = 4 per group).

At the end of the formalin test (60 minutes after its injection), the skin and tissues of the dorsal surface of the right hind paw were removed, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used for measurement of fatty-acid ethanolamides / endocannabinoids as described as below.

A.1.2.5 High Performance Liquid Chromatography /Mass Spectrometry analysis

Synthesis of [$^2\text{H}_4$]-labeled standards. Standard [$^2\text{H}_4$]-labeled fatty-acid ethanolamides were synthesized by the reaction of the corresponding fatty acyl chlorides with [$^2\text{H}_4$]-labeled ethanolamine. Fatty acyl chlorides (purchased from Nu-Check Prep, Elysian, MN) were dissolved in dichloromethane (10 mg/ml) and allowed to react with 1 equivalent of [$^2\text{H}_4$]-labeled ethanolamine (purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) for 15 min at $0-4^{\circ}\text{C}$. The reaction was stopped by adding purified water. After vigorous stirring and phase separation, the upper aqueous phase was discarded and the organic phase was washed twice with water to remove unreacted ethanolamine. The reaction resulted in quantitative formation of [$^2\text{H}_4$]-labeled fatty-acid ethanolamides, which were concentrated to dryness under a stream of N_2 and reconstituted in chloroform at a concentration of 20

mM. Fatty-acid ethanolamide solutions were stored at -20°C until use. Identity and chemical purity ($> 99.9\%$) of the synthesized fatty-acid ethanolamides were determined by thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry (HPLC/MS). 2-arachidonoylglycerol (2-AG) and $[^2\text{H}_8]$ 2-AG were purchased from Cayman Scientific (Ann Arbor, MI).

Tissue preparation. Skin tissue was diced with scissors and incubated in 2 ml of chloroform containing 25 pmol of $[^2\text{H}_4]$ -anandamide, 25 pmol of $[^2\text{H}_8]$ -2-AG and 500 pmol of $[^2\text{H}_4]$ -labeled-palmitoylethanolamide overnight at $+ 4^{\circ}\text{C}$ with shaking. The tissue was then homogenized and lipids were extracted with 2 ml of methanol and 2.25 ml of saturated sodium chloride solution (1 M). The organic layer was removed, evaporated to dryness under N_2 , reconstituted in a mixture of chloroform/methanol (1:1, 100 μL) and transferred to 2.0 ml screw top vials with 0.1 ml glass inserts to be injected into the HPLC/MS.

HPLC/MS analysis. Fatty-acid ethanolamides were quantified using an isotope dilution HPLC/MS assay in positive ionization mode.²¹

A.1.2.6 Paw edema

At the end of the formalin test, paw edema was measured at the base of the right hind paw using a digital micrometer (Mitutoyo Corporation, USA) with an instrumental error of \pm (maximum measuring length/75) μm and a resolution of 0.001 mm.²²

A.1.2.7 Statistical analysis

Pain behavior for each treatment group was expressed as mean \pm s.e.mean. The dose-response curve for propofol was determined using ALLFIT software.²³ In the second study, the antinociceptive effects of propofol in absence or presence of cannabinoid antagonists were assessed for significance using factorial experimental design.²⁴ To compare ipsi- vs. contralateral paw injections of the drugs, an ANOVA adapted for factorial experimental design was used. The different components of the total variation were settled *a priori* using multiple regression analysis.²⁵ The critical level of significance was set at 5% ($P < 0.05$).

A.1.3 Results

A.1.3.1 Antinociceptive effect of propofol and implication of cannabinoid receptors

Propofol decreased pain behavior in the formalin test with an ED₅₀ (\pm standard error) of 0.015 $\mu\text{g} \pm 0.0161$ and 0.084 $\mu\text{g} \pm 0.0611$ for the early and late phases, respectively (**Figure 1A, 1B**). Pain behavior following injection of propofol in the contralateral hind paw was not statistically different when compared with the control (Intralipid™ 10 %) group [$F(1,6) = 0.42$ and 0.72 for the first and second phases, respectively] (**Figure 2**).

When given locally (dorsal surface of the paw) at ED₅₀ dose, propofol produced a significant antinociceptive effect when compared with the control group either for the early (**Figure 3A, 3B**) [$F(1,18) = 9.17$, $P < 0.01$] or late (**Figure 3A, 3C**) phase [$F(1,18) = 11.65$, $P < 0.005$] of the formalin test. This antinociceptive effect was inhibited by AM251 and AM630 since there was no statistical difference between those antagonists given alone

compared with their combination with propofol for the first [$F(1,18) = 1.87$ and 1.46] or second phase [$F(1,18) = 0.21$ and 0.95], respectively (**Figure 3A, 3B, 3C**).

A.1.3.2 Paw edema

Edema of the injected paw differs significantly among the groups [$F(5,18) = 19.53$, $P < 0.001$]: AM251 [$F(1,18) = 37.99$, $P < 0.001$] and AM630 [$F(1,18) = 35.09$, $P < 0.001$] when given alone significantly reduced paw oedema (**Figure 3D**).

A.1.3.3 Concentration of fatty-acid ethanolamides / endocannabinoids following peripheral administration of propofol

The amounts of anandamide and 2-AG in paw tissues were not significantly higher when propofol ($0.05 \mu\text{g}$) was given locally compared to the control group (IntralipidTM 10 %) (**Figure 4 A, B**) [$F(1,12) = 1.90$ and 1.94 , respectively]. However, the amount of palmitoylethanolamide in paw tissues was significantly higher when propofol ($0.05 \mu\text{g}$) was given locally compared to the control group (**Figure 4 C**) [$F(1,12) = 6.68$, $P < 0.025$].

A.1.4 Discussion

In this study, we have demonstrated that propofol when given in the periphery (hind paw) produced a dose-dependent antinociceptive effect. This effect is locally mediated since a high dose of propofol given in the contralateral paw did not reduce pain behavior. We also observed a slight increase in the concentration of anandamide, 2-AG and PEA in paw skin

tissues which was only significant for PEA when propofol was injected locally at ED₅₀ doses. We suggest that the antinociceptive effect of propofol was mediated in part by cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors since antagonists to these receptors (AM251 and AM630, respectively) completely inhibited the antinociceptive effect of propofol when administered together. However, the dose dependency of propofol did not exist anymore when one consider the data from tissue levels of endocannabinoids and PEA. In our opinion, it shows that the exact mechanism of action of propofol is more complex than a simple tissue increase in anandamide levels. This could have been expected as many actors are present locally which can interact to modulate anandamide levels. For example, FAAH and cyclooxygenase-2 (COX-2) enzymes are present locally and anandamide is a potential target for them. Furthermore, 2-AG, PEA and other fatty-acid amides are present locally and their metabolism (by FAAH in particular) is highly intricate and could also explain different levels of anandamide.

The action of propofol at the spinal level has been demonstrated in animal models using different modalities (noxious heat, mechanical stimulus)^{2,5} but evidence for the peripheral antinociceptive effect of propofol has only recently been demonstrated using bee venom-induced inflammatory pain state.⁶ However, in this latter study, only a single dose of propofol was used and further it was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). DMSO has been shown to produce analgesia in some studies.^{26,27} Therefore, the antinociceptive effect of propofol reported in the study of Sun et al.⁶ may not have been optimal and necessitated confirmation. Intralipid 10%, which has the same composition as propofol 1%, was used in

the present study to avoid this bias. Furthermore, it was shown that a dose of 0.08 μg reduced pain behavior by 50%, which constitutes a dose six times inferior to the one used by Sun et al.⁶

Knowing that propofol has antinociceptive properties, the mechanism by which it produced these effects was investigated. It has been demonstrated that propofol increased whole-brain content of anandamide (through inhibition of FAAH) which could explain its sedative properties, mediated by the cannabinoid CB₁ receptor.⁷ However, propofol was a mild inhibitor of FAAH compared to strong inhibitors like URB532 and URB597.²⁸ This could explain the small increase in the concentration of anandamide in paw skin tissues reported in the present study. Furthermore, PEA is a fatty-acid amide that has both anti-inflammatory and antinociceptive properties.^{29,30} Palmitoylethanolamide does not bind to cannabinoid receptors^{31,32} although its effects are antagonized by cannabinoid CB₂ receptor antagonists.³³ Indeed, Calignano et al. (1998) found that PEA inhibited both early and late phases of formalin-evoked pain behavior after intra-plantar injection in mice. Furthermore, these authors showed that the analgesia produced by PEA was reversed by the CB₂ receptor antagonist SR144528 but not by administration of the CB₁ receptor antagonist SR141716A nor by the opioid antagonist naloxone. Therefore, the significant local increase in PEA in the present study could explain why the antinociceptive properties of propofol were attenuated by a CB₂ receptor antagonist. These findings corroborate the results observed which suggest that the dose-dependent antinociceptive effects of propofol are mediated in part by CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors.

Considering paw tissue levels of endocannabinoids and PEA, no saline controls were tested. However, we have already measured in a previous study fatty-acid amides such as anandamide and PEA in rat paw tissues.³⁴ The measurements were performed using similar techniques although obviously not at the same time and therefore not under exactly the same conditions. However, the levels of anandamide and PEA after injection of 2.5% formalin were in the same magnitude as the one reported in this study with Intralipid 10%. To further confirm the findings of the present study, it must be considered that cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors are expressed in dorsal root ganglion, spinal cord and also in peripheral tissues.⁹ We showed, using Western blot technique, that the CB₁ and CB₂ receptor proteins are indeed present in peripheral tissues under normal conditions (naïve rats) and that their expression is increased in neuropathic conditions.⁹ Furthermore, FAAH activity is present in peripheral tissues^{34,35} and it is therefore reasonable to propose that propofol, although weakly, inhibited FAAH activity. Additionally, it was shown that FAAH knock out mice exhibit significant reduction in pain behavior in the formalin test probably due to the local increase in anandamide concentrations.³⁵ Finally, a direct action of propofol on cannabinoid receptors is very unlikely as Patel et al.⁷ have shown that propofol did not bind to CB₁ receptors, although binding to CB₂ receptors was not determined.

We cannot rule out the fact that other mechanisms of action may be involved in the attenuation of pain sensation by propofol. Indeed, the antinociceptive effects of propofol at high doses are difficult to explain by a sole implication of the cannabinoid system.

Furthermore, as other studies have pointed out, propofol can control pain by a central modulation through the opioid system⁴ and/or by having an interaction with spinal GABA_A receptors.³ Although, the implication of propofol acting on neuronal cells is well documented, its involvement in glial cells seems to be controversial since propofol had no effect on the production of nitric oxide or TNF- α from glial cells stimulated by LPS.³⁶ Sun et al. suggested that propofol could activate GABA_A receptors and/or inhibit N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors⁶, although to our knowledge these experiments have not yet been performed. Finally, it is always possible that Intralipid interfered with the metabolism of fatty-acid amides, being itself a lipid-based compound.

The marked decrease in paw edema reported after local administration of both cannabinoid antagonists could be explained by the fact that these antagonists are dissolved in NaCl 0.9 % which is better absorbed than intralipid and/or propofol. Another explanation may be the involvement of a non-CB₁/non-CB₂ distinct cannabinoid receptor regulating cannabinoid-induced vasodilatation.¹¹

In conclusion, peripheral administration of propofol was associated with a dose-dependent decrease in pain behavior in animals submitted to inflammatory pain. This effect was locally mediated by action on cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors and with the involvement of PEA a fatty-acid ethanolamide. However, the exact contribution of these receptors and of other mediators to the antinociceptive effects of propofol needs to be further investigated.

A.1.5 Acknowledgments

This work was supported by a research grant from the Research Centre of the CHUM – Montréal and by a grant from the Department of Anesthesiology of the Université de Montréal and Organon Canada (P.B.) and by grants from the National Institute on Drug Abuse (NIDA) 12447 and 3412 (D.P.)

A.1.6 References

1. Smith I, White PF, Nathanson M, and Gouldson R: Propofol. An update on its clinical use. *Anesthesiology* 1994; 81: 1005-1043.
2. Sun YY, Li KC, and Chen J: Inhibitory effects of spinal propofol on the responses of spinal dorsal horn neurons in normal rats. *Acta Physiol Sin* 2004; 56: 444-450.
3. Nadeson R, and Goodchild CS: Antinociceptive properties of propofol: involvement of spinal cord gamma-aminobutyric acid(A) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 1181-1186.
4. Anwar MM, and Abdel-Rahman MS: Effect of propofol on perception of pain in mice: mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol* 1998; 120: 249-253.
5. Antognini JF, Wang XW, Piercy M, and Carstens E: Propofol directly depresses lumbar dorsal horn neuronal responses to noxious stimulation in goats. *Can J Anesth* 2000; 47: 273-279.
6. Sun YY, Li KC, and Chen J: Evidence for peripherally antinociceptive action of propofol in rats: behavioral and spinal neuronal responses to subcutaneous bee venom. *Brain Res* 2005; 1043: 231-235.

7. Patel S, Wohlfeil ER, Rademacher DJ, Carrier EJ, Perry LJ, Kundu A, Falck JR, Nithipatikom K, Campbell WB, and Hillard CJ: The general anesthetic propofol increases brain N-arachidonylethanolamine (anandamide) content and inhibits fatty acid amide hydrolase. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 1005-1113.
8. Rice AS, Farquhar-Smith WP, and Nagy I: Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66: 243-256.
9. Walczak JS, Pichette V, Leblond F, Desbiens K, and Beaulieu P: Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain. *Neuroscience* 2005; 132: 1093-10102.
10. Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, and Casellas P: Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 1995; 232: 54-61.
11. Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, and Rodriguez de Fonseca F: The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 218-224.

12. Fowler CJ, Stenstrom A, and Tiger G: Ibuprofen inhibits the metabolism of the endogenous cannabimimetic agent anandamide. *Pharmacol Toxicol* 1997; 80: 103-107.
13. Fowler CJ: Possible involvement of the endocannabinoid system in the actions of three clinically used drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 59-61.
14. Guindon J, De Léan A, and Beaulieu P: Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, an NSAID, in acute and inflammatory pain. *Pain* 2006; 121: 85-93.
15. Guindon J, and Beaulieu P: Analgesic effects of anandamide, non steroidal anti-inflammatory drugs and their combination in a rat model of neuropathic pain. *Neuropharmacology (In Press, Available online 24 January 2006)*
16. Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, and Makriyannis A: ¹²³I-labelled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 1996; 307: 331-338.
17. Pertwee RG, Griffin G, Fernando S, Li X, Hill A, and Makriyannis A: AM630, a competitive cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci* 1995; 56: 1949-1955.

18. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, and Hole K: The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51: 5-17.
19. Watson GS, Sufka KJ, andCoderre TJ: Optimal scoring strategies and weights for the formalin test in rats. *Pain* 1997; 70: 53-58.
20. Malan TP, Ibrahim MM, Deng H, Liu Q, Mata HP, Vanderah T, Porreca F, and Makriyannis A: CB₂ cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 2001; 93: 239-245.
21. Giuffrida A, Rodriguez de Fonseca F, and Piomelli D: Quantification of bioactive acylethanolamides in rat plasma by electrospray mass spectrometry. *Anal Biochem* 2000; 280: 87-93.
22. Nackley AG, Suplita RL 2nd, and Hohmann AG: A peripheral cannabinoid mechanism suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience* 2003; 117: 659-670.
23. De Léan A, Munson PJ, and Rodbard D: Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am J Physiol* 1978; 235: E97-E102.

24. Winer BJ: Statistical Principles in Experimental Design. New-York, McGraw-Hill Publishers, 1971.
25. Draper NR, and Smith H: Applied regression analysis. New York, Wiley Publishers, 1998.
26. Evans MS, Reid KH, and Sharp JB Jr: Dimethylsulfoxide (DMSO) blocks conduction in peripheral nerve C fibers: a possible mechanism of analgesia. *Neurosci Lett* 1993; 150:145-148.
27. Theophilidis G, and Kravari K: Dimethylsulfoxide (DMSO) eliminates the response of the sensory neurones of an insect mechanoreceptor, the femoral chordotonal organ of *Locusta migratoria*, but blocks conduction of their sensory axons at much higher concentrations: a possible mechanism of analgesia. *Neurosci Lett* 1994; 181: 91-94.
28. Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valino F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, and Piomelli D: Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 2003; 9: 76-81.

29. Mazzari S, Canella R, Petrelli L, Marcolongo G, and Leon A: N-(2-hydroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur J Pharmacol* 1996; 300: 227-236.
30. Calignano A, La Rana G, and Piomelli D: Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. *Eur J Pharmacol* 2001; 419: 191-198.
31. Showalter VM, Compton DR, Martin BR, and Abood ME: Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278: 989-999.
32. Lambert DM, DiPaolo FG, Sonveaux P, Kanyonyo M, Govaerts SJ, Hermans E, Bueb J, Delzenne NM, and Tschirhart EJ: Analogues and homologues of N-palmitoylethanolamide, a putative endogenous CB(2) cannabinoid, as potential ligands for the cannabinoid receptors. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1440: 266-274.
33. Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, and Piomelli D: Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 1998; 394: 277-281.

34. Beaulieu P, Bisogno T, Punwar S, Farquhar-Smith P, DiMarzo V, Rice ASC: Role of the endogenous cannabinoid system in the formalin test of persistent pain in the rat. *Eur J Pharmacol* 2000; 396: 85-92.
35. Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH: Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9371-9376.
36. Shibakawa YS, Sasaki Y, Goshima Y, Echigo N, Kamiya Y, Kurahashi K, Yamada Y, and Andoh T: Effects of ketamine and propofol on inflammatory responses of primary glial cell cultures stimulated with lipopolysaccharide. *Br J Anaesth* 2005; 95: 803-810.

A.1.7 Figures legend

Figure 1

(A) Dose-response curve for propofol (open triangle) in the early phase of the formalin test.

Data are expressed as mean \pm s.e. mean (n = 4 per group).

(B) Dose-response curve for propofol (open triangle) in the late phase of the formalin test.

Data are expressed as mean \pm s.e. mean (n = 4 per group).

Figure 2

Antinociceptive effects of propofol after injection in the dorsal surface of the ipsilateral (A) and contralateral (B) hind paws 15 min before 2.5% formalin (50 μ L). Data are expressed as mean \pm s.e. mean (n = 4 per group). AUC = Area Under the Curve for the first phase, † $P < 0.05$ for propofol 500 μ g vs. control (IntralipidTM 10 %) group; AUC for the second phase, # $P < 0.001$ for propofol 500 μ g vs. control (IntralipidTM 10 %) group.

Figure 3

Effects of AM251 and AM630 on propofol antinociceptive effects when administered at ED₅₀ dose into the hind paws 15 min before 2.5% formalin (50 μ L). (A) Antinociceptive effect of propofol. (B) Effects of cannabinoid antagonists on propofol antinociceptive effects for the first phase of the test (0-15 min). (C) Effects of cannabinoid antagonists on propofol antinociceptive effects for the late phase of the test (15-50 min). (D) Paw edema. Data are expressed as mean \pm s.e. mean (n = 4 per group). Area Under the Curve (AUC) for

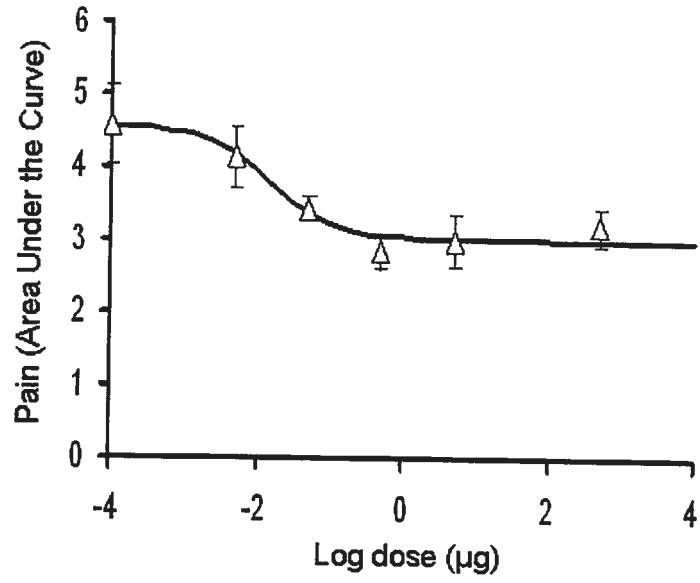
the early phase, † $P < 0.01$ for propofol vs. control (Intralipid™ 10 %) group; AUC for the late phase, # $P < 0.005$ for propofol vs. control (Intralipid™ 10 %) group; * propofol vs. control (Intralipid™ 10 %) group, $P < 0.01$; ‡ AM251 vs. AM251 + propofol, $P < 0.001$; Δ AM630 vs. AM630 + propofol, $P < 0.001$.

Figure 4

Measurements of fatty-acid ethanolamide / endocannabinoid concentrations in skin paw tissues. Amount in pmol/g of tissue of anandamide (A), 2-arachidonoylglycerol (B) and palmitoylethanolamide (C) following local administration of propofol on the dorsal surface of the right hind paw. Data are expressed as mean \pm s.e. mean ($n = 4$ per group). * Propofol 0.05 μg vs. Intralipid™ 10 %, $P < 0.025$.

Figure 1

A)



B)

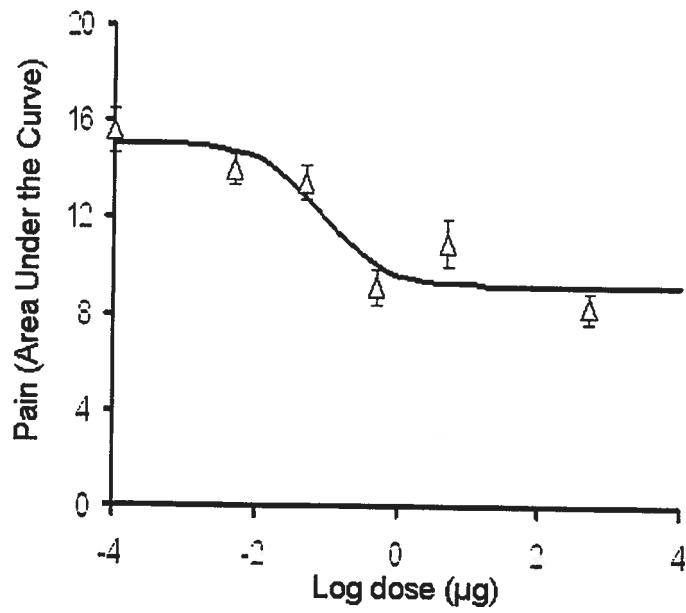
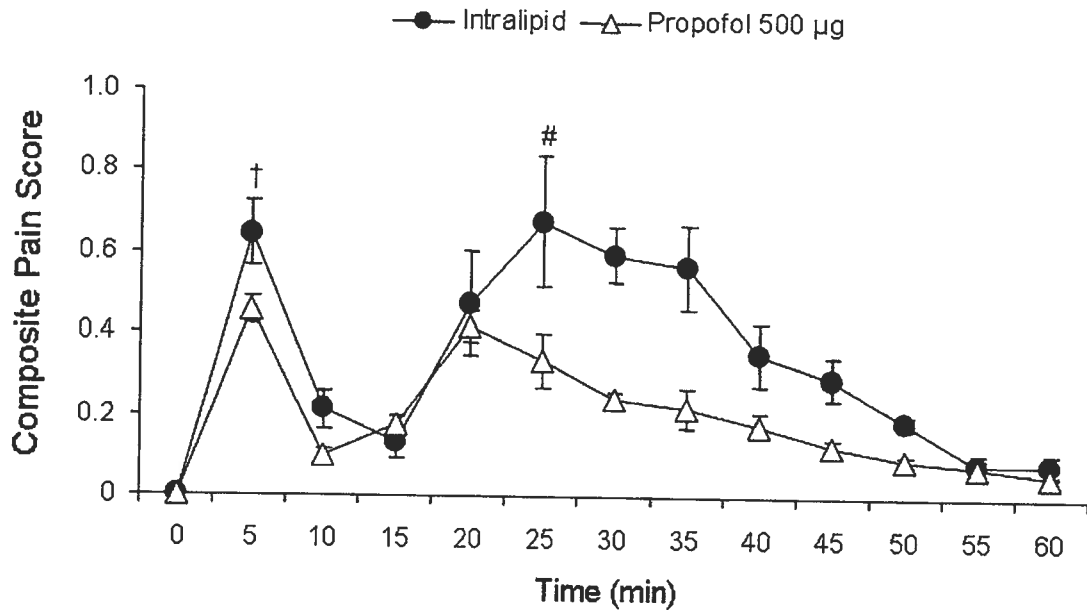


Figure 2

A)



B)

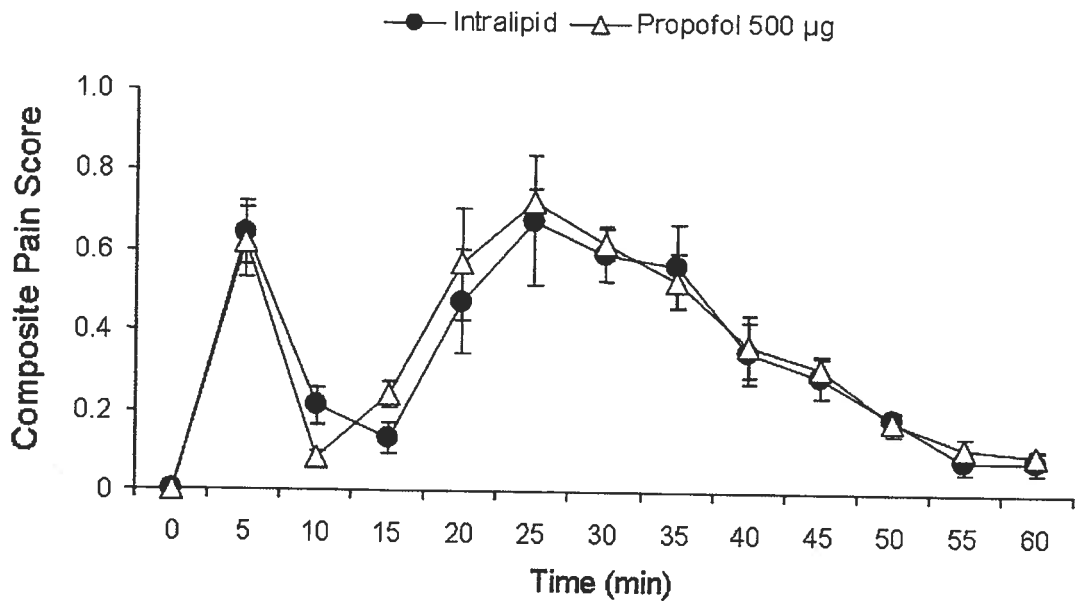


Figure 3

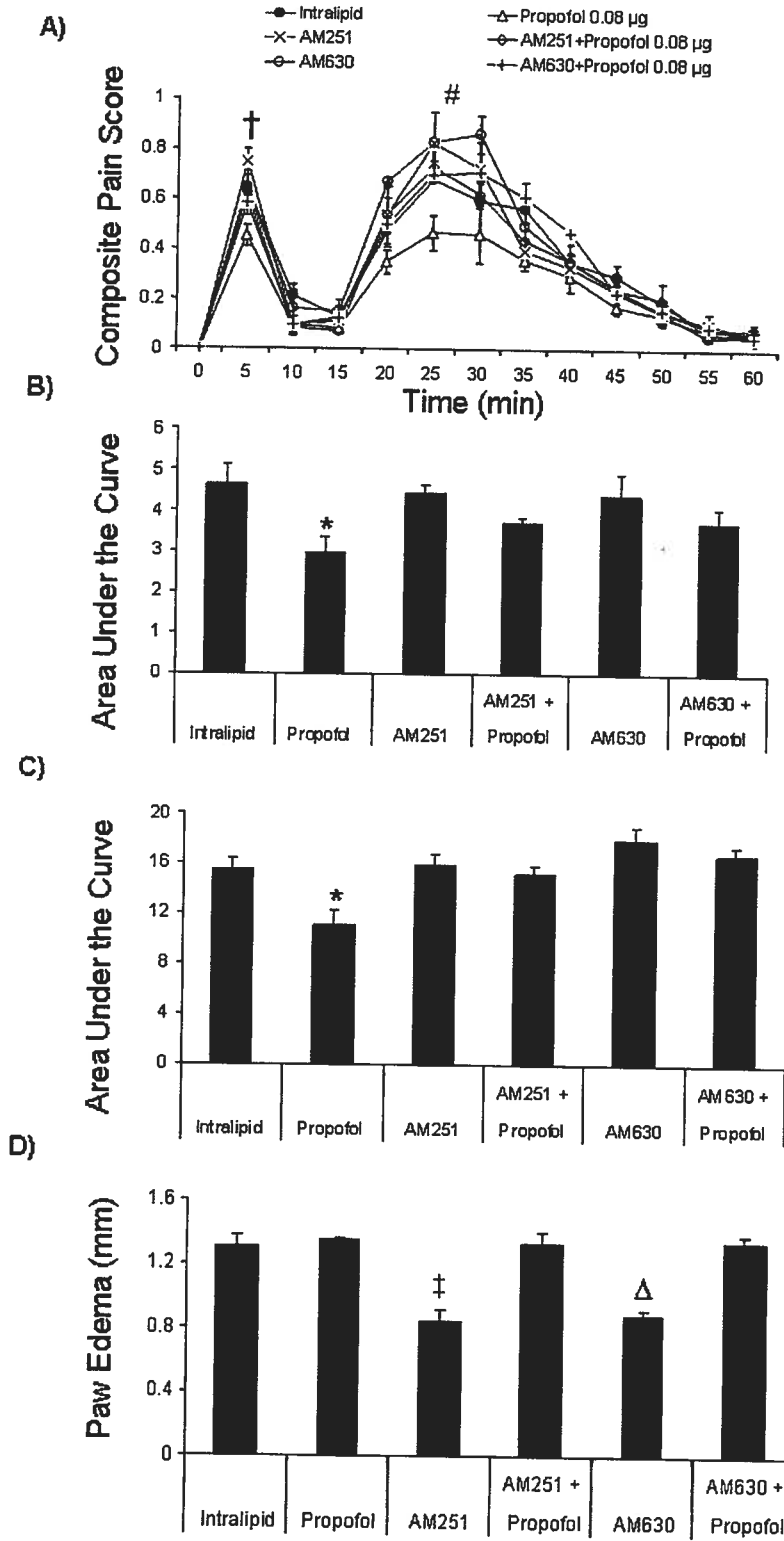
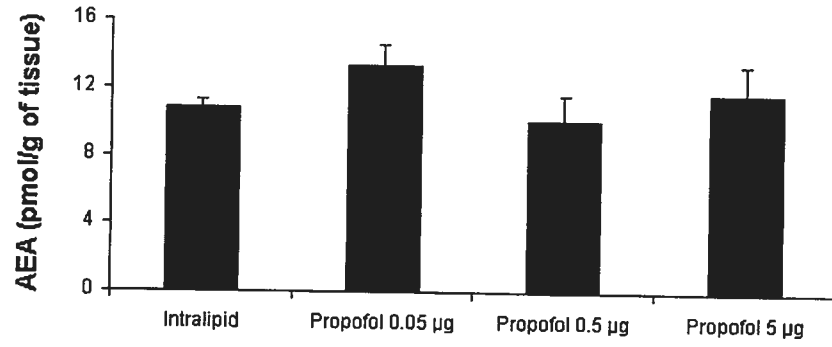
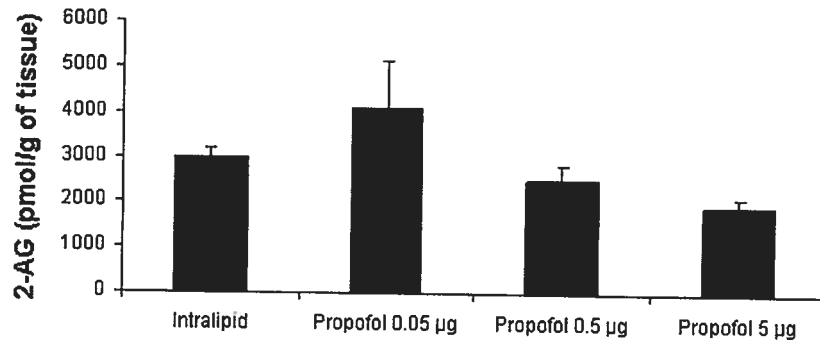


Figure 4

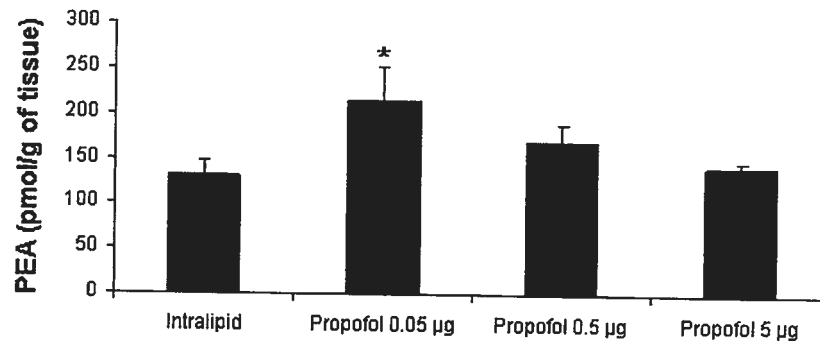
A)



B)



C)



Annexe 2

Article 6 soumis dans *European Journal of Pharmacology*

**“Pre-emptive antinociceptive effects of a synthetic cannabinoid in a model
of neuropathic pain”**

Josée Guindon¹, Julie Desroches¹ & 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

*Author for Correspondence: Pierre Beaulieu, Department of Anesthesiology, CHUM –
Hôtel-Dieu, 3840 rue St-Urbain, Montréal, H2W 1T8, Québec, Canada

Tel: (1) 514-890-8000 ext. 14570

Fax: (1) 514-412-7222

E-mail: 

A.2.0 Abstract

The antinociceptive effects of WIN 55,212-2 (WIN), a synthetic cannabinoid, were evaluated in the model of partial sciatic nerve ligation after daily subcutaneous administration of 0.1 mg/kg a week before and two weeks after surgery. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were evaluated in 15 rats allocated to receive: (1) Vehicle (before surgery) - Vehicle (after surgery); (2) Vehicle-WIN; (3) WIN-Vehicle; (4) WIN-WIN; (5) Sham. The decreased in mechanical allodynia and thermal hyperalgesia by WIN was significantly greater when it was administered one week before surgery. In conclusion, pre-emptive use of cannabinoids produced greater antinociceptive effects in a model of neuropathic pain.

Key words: WIN 55,212-2; neuropathic pain; pre-emptive analgesia; cannabinoids.

A.2.1 Introduction

Neuropathic pain models have been developed in animals to better understand the neurophysiology of nerve injuries. Accumulating evidence has suggested that the endogenous cannabinoid system may be implicated in the modulation of pain through CB1 and CB2 receptors (Rice et al., 2002). Since the discovery of endogenous cannabinoids, such as anandamide and 2-arachidonyl glycerol, many synthetic cannabinoid compounds have been developed to modulate pain in a more effective way. Therefore, WIN 55,212-2, a synthetic cannabinoid with CB1 and CB2 receptor activity, completely alleviated mechanical allodynia and thermal hyperalgesia when given intraperitoneally (i.p.) in neuropathic pain conditions (Herzberg et al., 1997). Furthermore, it has been demonstrated that repeated subcutaneous administration of WIN 55,212-2 reduced hyperalgesia in a chronic constriction neuropathic pain model (Costa et coll., 2004). Therefore, the present study was designed to investigate the effect of daily systemic administration of WIN 55,212-2 given pre-emptively a week before surgery and then for two weeks after surgery in a neuropathic pain model in the rat.

A.2.2 Methods

A.2.2.1 Animals

This research protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the Université de Montréal and all procedures conformed to the guidelines of the Canadian Council for

Animal Care. Male Wistar rats (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) of 180-220 g at the time of testing were housed two per cage with a bedding of sawdust (8 - 16 mm) (Pro Chip, Canada) and maintained on a 12-hour dark-light cycle with free access to food (18% protein, 4.5% fat, 5.5% fibre, 7% ash, 2.5% added minerals) (Charles River, Canada) and water.

A.2.2.2 Drug administration

WIN 55,212-2 mesylate (0.1 mg/kg) was purchased from Tocris (Ellisville, MO, USA) in a powder form and further dissolved in 1:1:18 mixture of ethanol:cremophor:saline (Costa et coll., 2004). The vehicle consisted of the same mixture without WIN 55,212-2.

A.2.2.3 Neuropathic pain model

Unilateral hind-limb neuropathy was achieved using the technique of partial sciatic nerve ligation (PNL) described by Seltzer et al. (1990) where the left sciatic nerve was exposed at high-thigh level and 1/3-1/2 of the dorsal thickness of the nerve was trapped in a ligature using an 8-0 monofilament nylon suture. In sham-operated rats, the nerve was left intact.

A.2.2.4 Sensory testing

A.2.2.4.1 Mechanical allodynia

Mechanical allodynia was evaluated with von Frey hairs (Senselab aesthesiometer, Somedic, Sweden). The plantar surface of the paw was stimulated with a series of von Frey filaments of ascending forces (with a range comprised between 0.63 and 350 mN).

For each filament, the stimulus was repeated five times with an interval of 1-2 s between each stimulation. The threshold was determined as the lower force that evoked a withdrawal response to one of the five stimuli (Tal and Bennett, 1994).

A.2.2.4.2 Thermal hyperalgesia

Thermal hyperalgesia was assessed using an infrared noxious heat stimulus (Plantar test, Ugo Basile, Italy). The center of a focused beam of radiant heat was applied to the plantar surface of the hind paw and the withdrawal latency time recorded. Results of each test are expressed as the mean of three withdrawal latencies (s). Three minutes was allowed between each test (Hargreaves et al., 1988).

A.2.2.5 Protocol

The experiments were conducted in a randomised and blinded manner by the same experimenter. A total of 15 rats were used in this study allocated to: (1) Vehicle (before surgery) - Vehicle (after surgery); (2) Vehicle - WIN 55,212-2; (3) WIN 55,212-2 - Vehicle; (4) WIN 55,212-2 - WIN 55,212-2; and (5) Sham group. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were evaluated the first day to assess baseline, every two days for a week before surgery and between two to three weeks after the PNL for the ipsilateral and contralateral paws. WIN 55,212-2 or Vehicle was administered subcutaneously (s.c.) in a 1 ml volume 24 hours after baseline pain tests and subsequently at the same time every day for three weeks.

A.2.2.6 Statistical analysis

Mechanical threshold and withdrawal latency for each treatment group are expressed as mean \pm S.E.M. Assessment of the neuropathy was made with the group receiving vehicle a week before and two weeks after surgery by comparing values before and after PNL while using an ANOVA adapted for factorial experimental design (Winer, 1971). The contralateral side was analyzed similarly but separately. The critical level of significance was set at 5% ($P < 0.05$).

A.2.3 Results

At baseline and on the first day after drug administration, there was no difference between the groups for mechanical allodynia. However, there was a statistical difference between the groups receiving the vehicle (G1-G2) compared with those receiving WIN 55,212-2 (G3-G4) at day 3, 5 and 7 before surgery (**Figure**). On the first day after surgery, there was a significant increase in von Frey values for the (G3-G4) [$F(1,8) = 30.62$, $P < 0.001$] groups compared with the (G1-G2) groups and there was significantly higher von Frey values for the groups still receiving WIN 55,212-2 (G4) [$F(1,8) = 5.62$, $P < 0.05$] compared with the groups receiving vehicle after surgery (G3) (**Figure**). On the 15th day after surgery, the groups (G2-G4) receiving the cannabinoid after surgery were switched to receive vehicle and observed for another six days. On the 17th day mechanical allodynia was lower for the group 4 compared with the group 2 [$F(1,4) = 1083.91$, $P < 0.001$]. On the 19th and 21th day there was no statistical difference between those two groups [$F(1,4) = 0.5$ and 4 , respectively] (**Figure**). On the contralateral side,

there was no difference between the groups for the baseline or any of the following days (**Figure, upper**). In sham-operated rats, there was no difference between the days before and after surgery for mechanical allodynia on the ipsilateral [$F(1,33) = 1.74$] and contralateral [$F(1,33) = 0.18$] side (data not shown).

Similar results were obtained with thermal hyperalgesia compared with mechanical allodynia, although more variability was observed (data not shown).

A.2.4 Discussion

The actual treatments of neuropathic pain produce inadequate pain relief and side effects explaining the need for new therapeutic approaches since the use of antidepressants and anticonvulsants are not fully effective. In behavioural studies, it has been shown that cannabinoids and endocannabinoids reduced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia following single (Herzberg et al., 1997; Guindon and Beaulieu, 2006) or repeated (Costa et al., 2004) administrations. Therefore, in the present work, we tested the hypothesis that the effect of daily systemic administration of WIN 55,212-2 given pre-emptively a week before surgery and then two weeks after surgery could reverse mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. The results demonstrated, for the first time, that pre-emptive WIN 55,212-2 significantly decreased mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in a greater way compared to the systemic administration of this synthetic cannabinoid started only the day after surgery. Furthermore, the dose of 0.1

mg/kg did not produce psychoactive effects since there were no alterations of sensory thresholds for mechanical allodynia and thermal hyperalgesia on the contralateral paw of PNL rats. Another interesting finding is that no tolerance was found after 14 or 21 days of administration of the cannabinoid. This may be particularly relevant if these compounds were to be used in the clinical setting. It is also worth noticing that the antihyperalgesic effects of continuous administration of WIN 55,212-2 were reversed two days after discontinuing WIN in the group that received vehicle before and WIN after PNL, whereas in the group that received pre-emptive WIN a week before and two weeks after surgery, it took four days. This persistent effect is probably associated with the stimulation of the cannabinoid system at the spinal and central level. It will be unlikely associated with its accumulation since higher dose of WIN 55,212-2 (4.3 mg/kg i.p.) did not maintain the antihyperalgesic effect after 24 hours (Herzberg et al., 1997). The antiallodynic and antihyperalgesic effects of WIN 55,212-2 are likely to be mediated by CB1 and/or CB2 receptors as shown in previous neuropathic studies.

In conclusion, WIN 55,212-2 decreased mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in neuropathic animals. Furthermore, the group receiving pre-emptive WIN 55,212-2 had significantly greater antihyperalgesic and antiallodynic effects compared with the group receiving vehicle before the surgery. Pre-emptive cannabinoids produced a greater analgesic effect in this neuropathic pain model.

A.2.5 References

Costa, B., Colleoni, M., Conti, S., Trovato, A.E., Bianchi, M., Sotgiu, M.L., Giagnoni, G., 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.

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.

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.

Herzberg, U., Eliav, E., Bennett, G.J., Kopin, I.J., 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.

Rice, A.S., Farquhar-Smith, W.P., Nagy, I., 2002. Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66, 243-256.

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.

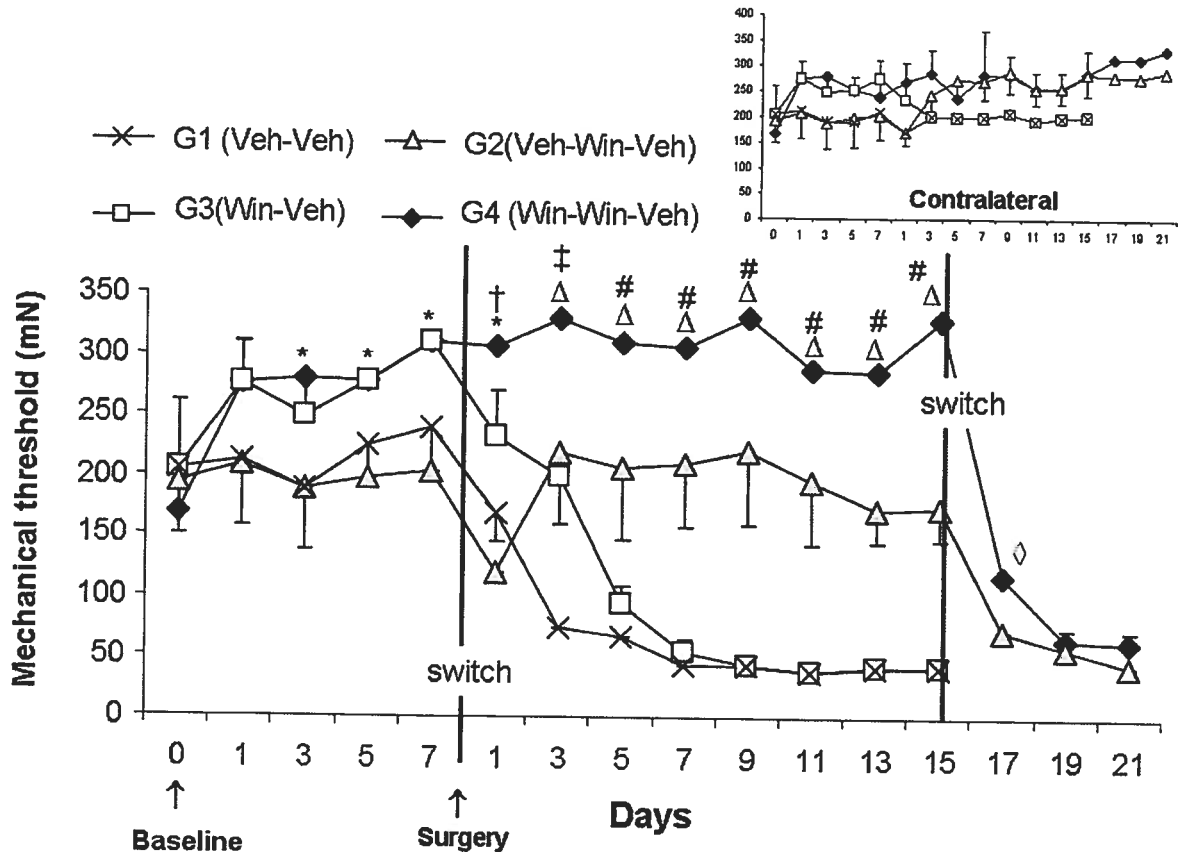
Tal, M., Bennett, G.J., 1994. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 57, 375-382.

Winer, B.J., 1971. *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw-Hill, New-York, NY.

A.2.6 Figure legend

Measurement of mechanical allodynia using von Frey filaments in different groups of rats receiving daily injection of either WIN 55,212-2 or vehicle during one week before surgery (partial sciatic nerve ligation) or after switching on the day after surgery for a different treatment during the following two weeks. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Win = WIN 55,212-2, Veh = Vehicle. * $P < 0.05$ for G1-2 vs. G3-4 groups; † $P < 0.05$ for G3 vs. G4; $\Delta P < 0.05$ for G2 vs. G4; ‡ $P < 0.025$ for G1 vs. G3; # $P < 0.001$ for G1-3 vs. G2-4; $\diamond P < 0.001$ for G2 vs. G4.

Figure



Annexe 3

Autorisation des coauteurs selon l'ordre de présentation des articles dans la thèse