



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Université
de Strasbourg

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA
SANTÉ*

CNRS UPR3212 – Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives

THÈSE présentée par :

Florian GABEL

Soutenue le : 10 décembre 2021

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/S spécialité : Neurosciences

**Etude du lien entre le dimorphisme sexuel observé dans le
métabolisme et l'effet antinociceptif de la morphine**

THÈSE dirigée par :

M. GOUMON Yannick

Dr, CNRS UPR3212, Université de Strasbourg,

RAPPORTEURS EXTERNES:

Mme NOBLE Florence

Dr, ERL3649 UMR S1124 : Pharmacologie et thérapies
des addictions, Université Paris Descartes, France.

M. PICARD Nicolas

PU-PH, UMR Inserm-CHU 1248 : IPPRITT, Université
de Limoges, France.

RAPPORTEUR INTERNE:

Mme MASSOTTE Dominique

Dr, CNRS UPR3212, Université de Strasbourg, France.

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier mon jury de thèse, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Yannick, tu m'as accueilli dans ton équipe, tu m'as fait confiance, tu m'as laissé une liberté scientifique sans bornes et j'ai eu l'occasion de m'essayer à un panel de techniques énorme, et pour ça, je ne te remercierai jamais assez. J'ai appris énormément à tes côtés, que ce soit en communication, en management, en réflexion scientifique, en écriture ou sur les différentes techniques auxquelles j'ai pu m'essayer. Tu as toujours été un soutien indispensable dans mon épanouissement durant cette thèse. Il me semble te l'avoir déjà dit, et malgré les hauts et les bas, je ne pouvais rêver d'une meilleure thèse, et si je devais recommencer, je le ferai.

Virginie, techniquement, tu m'as tout appris. Tu as une expertise incroyable sur tous les points. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que j'ai appris à tes côtés, de la conception des expériences d'enzymo (qui étaient, il faut le dire, un enfer) jusqu'aux subtilités de l'analyse MS. Tes réflexions ont été cruciales dans le développement de nos expériences et ton support, qu'il ait été technique ou moral, a beaucoup compté pour moi. Merci pour tout.

Valod, merci à toi. Ton arrivée dans l'équipe a changé notre quotidien, surtout le mien. Ca a été un très grand plaisir de travailler avec toi. Nous avons échangé un nombre incalculable de discussions, qu'elles soient scientifiques ou non, qui m'ont énormément apportées dans mes réflexions scientifiques et techniques. Tu es un ami qui m'est cher et j'espère que tu t'épanouieras autant que moi durant ta thèse. J'en profite pour remercier également Lana, avec qui nous avons partagé notre quotidien au laboratoire pendant 6 mois, et avec qui nous sommes rapidement devenus amis.

Zélie, merci pour tout, pour toi, pour ton soutien, pour notre quotidien, et pour tout ce que tu as fait pour moi. Je ne vais pas rentrer dans les détails, mais ton aide pour la rédaction du manuscrit m'a été absolument indispensable, d'un point de vue scientifique, linguistique et moral. Merci.

Sylvain, merci à toi pour m'avoir pris sous ton aile pour les expériences d'imagerie calcique. Ca a été un vrai plaisir d'échanger et d'apprendre avec toi. Plusieurs de nos

conversations m'ont beaucoup apportées dans mes réflexions, qu'elles soient d'ordre scientifiques ou non.

Mélanie, merci pour ton soutien et ta disponibilité pour les expériences d'injection i.t. Tu as été flexible alors que l'organisation de l'expérience était un peu chaotique.

Katia, merci beaucoup pour ton soutien pour les punchs des structures cérébrales et ta participation à mon comité de suivi de thèse.

Merci à mes parents, à Marion, à Raphaël, et à Charlie, que j'embrasse fort, pour leur soutien tout au long de ce périple. Ils ont toujours été un support infailible, et ont su se rendre disponible à tout moment, quelle que soit la situation. Merci pour tout.

Merci à mes amis, rencontrés au laboratoire ou non, avec qui j'ai partagé des moments inestimables pendant ces années particulières. Merci à Damien pour m'avoir aidé à réparer mon mur. Merci à Angel pour nos « interventions » dans les couloirs (et pour les expériences tests) et merci à tous les autres. Merci à mes amis du lycée, avec qui, malgré le temps qui passe, nous restons toujours soudés.

Merci à Euridol, pour m'avoir accordé une prolongation de contrat de thèse de 3 mois.

Aline, merci pour ton efficacité. Grâce à toi, je n'ai pas eu besoin de penser à ma prolongation de contrat, ce qui m'a déchargé d'un poids important.

J'aimerais également remercier Dominique, Sophie, Nicolas, Bruno, Olivier, Stéphane, Edouard ainsi que tous les membres du personnel animalier qui ont su se rendre disponible et trouver des solutions lorsqu'un problème se présentait.

Etude du lien entre le dimorphisme sexuel observé dans le métabolisme et l'effet antinociceptif de la morphine

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	I
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES	IX
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES ANNEXES	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIII
Introduction	1
Généralités sur la douleur	2
Définition, caractéristiques et enjeux sociétaux	2
Physiologie de la douleur	5
Traitement médicamenteux de la douleur	8
Généralités sur la morphine	10
Bref historique	12
Production et fabrication	13
Le système opioïdérique	14
Les récepteurs opioïdes	16
Les ligands exogènes	21
Effet analgésique de la morphine	25
Effets périphériques	25
Effets dans la moelle épinière	26

Effets dans le système PAG-RVM des contrôles descendants	28
Effets dans l'amygdale.....	30
Effets secondaires de la morphine.....	31
Effets sur le système immunitaire.....	32
Tolérance analgésique	34
La tolérance aux effets antinociceptifs au niveau cellulaire	35
La tolérance aux effets antinociceptifs au niveau anatomique	38
La tolérance aux effets antinociceptifs et la neuroinflammation	39
Hyperalgésie induite par les opioïdes	40
Addiction.....	41
Pharmacocinétique de la morphine	43
Absorption, distribution, métabolisme et excrétion de la morphine.....	44
Absorption.....	44
Distribution	44
Métabolisme	46
Généralités.....	46
Glucuronidation de la morphine	50
<i>Glucuronidation par les UDP-glucuronosyltransférases</i>	<i>50</i>
<i>Transport cellulaire de la morphine et de ses glucuronides.....</i>	<i>50</i>
<i>Isoformes des UGT impliqués dans la glucuronidation de la morphine</i>	<i>53</i>
<i>Localisation des UGT.....</i>	<i>54</i>
Métabolisme central	54
Excrétion	59
Activité biologique des métabolites glucuronidés de la morphine.....	59
Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique pour la M3G et la M6G	60
La morphine-6-glucuronide	61
La morphine-3-glucuronide	63

Observations comportementales	63
Etudes en faveur des effets pronociceptifs de la M3G	63
Etudes en défaveur des effets pronociceptifs de la M3G	65
Cibles pharmacologiques	66
Effets neuronaux.....	68
Dimorphisme sexuel dans l’analgésie à la morphine.....	69
Différences d’analgésie et d’effets secondaires liées au sexe chez l’humain	70
Différences d’analgésie et d’effets secondaires liées au sexe chez le rongeur	74
Mécanismes impliqués dans les différences liées au sexe dans les effets de la morphine	75
Effets activationnels et organisationnels des hormones sexuelles.....	75
Dimorphisme sexuel dans l’expression des récepteurs opioïdes μ.....	76
Dimorphisme sexuel dans l’anatomie du circuit PAG-RVM des contrôles descendants	77
Dimorphisme sexuel dans le métabolisme de la morphine	78
Objectifs	81
Méthodes	82
Animaux	83
Design expérimental	83
Test d’immersion de la queue.....	84
<i>Caractérisation de la dose efficace moyenne de la morphine chez les souris mâles et femelles</i>	85
<i>Protocole d’induction de la tolérance à l’effet antinociceptif de la morphine chez les souris mâles et femelles.....</i>	85
<i>Evaluation de l’hyperalgésie induite par administration i.p. et i.t. de M3G chez les souris mâles et femelles.....</i>	86
Injections i.p.....	86
Injections i.t.....	87

Métabolisme périphérique : méthode de prélèvement	87
<i>Cinétique métabolique périphérique de la morphine</i>	88
Métabolisme et système nerveux central : méthode de prélèvement	88
<i>Evaluation des quantités de morphine et de M3G au sein du système nerveux central</i>	89
<i>Etude du passage de la M3G par la barrière hémato-encéphalique</i>	89
La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem	90
<i>Quantification absolue par la méthode de dilution isotopique</i>	92
<i>Préparation des échantillons et analyse LC-MS/MS</i>	92
Préparation des échantillons de sang	92
Préparation des échantillons de cerveau	93
Préparation des surnageants de culture	93
Conditions d'analyse de la LC-MS/MS	94
<i>Quantification des protéines par la méthode de Bradford</i>	94
Culture cellulaire	95
<i>Lignée de cellules transgéniques : RAW-DUALTM & RAW-DUALTM KO-TLR4</i>	95
Effets de la M3G sur les lignées RAW-DUAL TM et RAW-DUAL TM KO-TLR4... 96	
<i>La culture primaire de cellules gliales</i>	97
Mise en culture et conditions d'entretien	98
Purification des microglies et des astrocytes par tri cellulaire magnétique.....	98
<i>Microglies</i>	100
<i>Astrocytes</i>	101
Expérience de métabolisme de la morphine sur cellules gliales primaires	101
L'imagerie calcique	101
<i>Condition de chargement de la sonde Fura-2 dans les cultures primaires de microglies</i>	102
<i>Protocole d'imagerie calcique</i>	103
Analyses statistiques	104

<i>Expériences de comportement</i>	106
<i>Analyse non-compartmentale</i>	107
<i>Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique pour la M3G et métabolisme central</i>	107
<i>Métabolisme de la morphine sur cultures primaires de cellules gliales</i>	107
<i>Effet de la M3G sur les cellules RAW-DUALTM et RAW-DUALTM KO-TLR4</i>	108
<i>Effet de la M3G et du LPS sur la microglie en imagerie calcique</i>	108
Résultats	109
Effet antinociceptif de la morphine et tolérance chez les souris mâles et femelles	110
Effet pronociceptif de la M3G chez les souris mâles et femelles	114
Métabolisme périphérique de la morphine	117
Quantification de la morphine et de la M3G dans les structures cérébrales associées à la douleur	122
Rapports cerveau/sang de la morphine et de la M3G obtenus dans les régions cérébrales impliquées dans le contrôle de la douleur	128
Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique pour la M3G chez les mâles et les femelles	132
Métabolisme central de la morphine chez les souris mâles et femelles	132
Métabolisme de la morphine en culture primaire de cellules gliales	134
Effet de la M3G sur les cellules RAW-DUALTM et RAW-DUALTM KO-TLR4	136
Effet de la M3G et du LPS sur des microglies primaires exprimant ou non le MOR	139
Discussion	143
L'influence du sexe sur l'antinociception induite par la morphine	144
Les différences de sexe dans l'effet antinociceptif de la morphine	144
Chez le rongeur	144
Chez l'humain	145
Les différences liées au sexe dans le métabolisme périphérique de la morphine	146
L'influence du sexe sur le métabolisme central de la morphine	148

Les quantités de morphine et de M3G retrouvées au sein des régions impliquées dans le contrôle de la douleur.....	148
Les rapports cerveau/sang.....	149
La perméabilité de la barrière hémato-encéphalique pour la morphine et la M3G	150
Le métabolisme central de la morphine	151
Les différences liées au sexe dans le métabolisme central de la morphine	154
Les effets de la M3G dans le système nerveux central.....	156
L'influence du sexe sur le développement de la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine.....	160
 Les différences de sexe dans le développement de la tolérance	160
 Le métabolisme périphérique de la morphine et la tolérance.....	161
 Le métabolisme central de la morphine dans la tolérance	162
Conclusion.....	164
Projet secondaire	166
Annexes	169
Bibliographie.....	304

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Affinité de 4 ligands exogènes pour le MOR, le DOR et le KOR.....	23
Tableau 2 : Rapports entre les quantités de M3G et de morphine et entre les quantités de M6G et de morphine dans le plasma et le LCR chez l'humain.....	49
Tableau 3 : Etudes cliniques et expérimentales évaluant les différences d'analgésie à la morphine liées au sexe.....	72
Tableau 4 : Composition du liquide d'imagerie.	103
Tableau 5 : Paramètres de pharmacocinétique obtenus à partir de l'analyse non-compartimentale pour la morphine et la M3G retrouvées dans le sang des souris mâles et femelles contrôles et tolérantes.....	121
Tableau 6 : Quantités de morphine et de M3G retrouvées dans l'amygdale, la PAG, la LSC et le OB des souris mâles et femelles contrôles et tolérantes	123

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Modèle bio-psycho-social de la douleur	3
Figure 2 : De la genèse du message nociceptif à la naissance de la douleur	6
Figure 3 : La circuiterie de la douleur	7
Figure 4 : La crise des opioïdes en France	10
Figure 5 : Structure de la morphine	11
Figure 6 : Production de la paille de pavot et consommation de la morphine à travers le monde	14
Figure 7 : Les fonctions du système opioïdérique.....	15
Figure 8 : Structures des récepteurs opioïdes MOR, DOR, KOR et NOP en conformation inactive obtenu par cristallisation en présence d'antagonistes spécifiques	17
Figure 9 : Signalisation des récepteurs opioïdes	19
Figure 10 : Effets médiés par l'activation des récepteurs opioïdes.....	21
Figure 11 : Structures chimiques de différents opioïdes exogènes.....	22
Figure 12 : Concept d'agonisme biaisé avec la morphine et le MOR.....	24
Figure 13 : Effets de la morphine sur les MOR périphériques et spinaux.....	27
Figure 14 : Modèle de la désinhibition du tonus GABAergique induite par la morphine dans la PAG produisant une forte analgésie.....	30
Figure 15 : La tolérance aux effets analgésiques de la morphine	34
Figure 16 : Adaptations possibles du MOR suite à l'administration chronique de morphine	36
Figure 17 : L'hyperalgésie induite par la morphine	41
Figure 18 : L'implication des récepteurs opioïdes dans le cycle de l'addiction.....	42
Figure 19 : Le métabolisme de la morphine chez l'humain.....	47
Figure 20 : Le transport cellulaire de la morphine et de ses glucuronides	52
Figure 21 : Le métabolisme au sein du SNC	56
Figure 22 : Activités biologiques des métabolites principaux de la morphine.....	60
Figure 23 : Evolution du choix du sexe des animaux utilisés dans les études publiées dans le journal <i>Pain</i> entre 2015 et 2019.....	71
Figure 24 : Protocole d'induction de la tolérance et expériences de métabolisme	86
Figure 25 : La spectrométrie de masse triple quadripôle.	91
Figure 26 : Principe du MACS.....	99
Figure 27 : Spectre d'excitation et d'émission de la sonde Fura-2 en absence et en présence de liaison aux ions Ca^{2+}	102

Figure 28 : L'effet antinociceptif et la tolérance induite par la morphine sont influencés par le sexe.....	112
Figure 29 : La M3G possède un effet pronociceptif indépendant du sexe	115
Figure 30 : Cinétiques de la morphine et de la M3G dans le sang des souris mâles et femelles contrôles et tolérantes.....	118
Figure 31 : Ratios métaboliques et quantités normalisées observés dans l'amygdale, la PAG, la LSC et le OB des souris mâles et femelles contrôles et tolérantes.....	126
Figure 32 : Rapports cerveau/sang calculés pour la morphine et la M3G dans l'amygdale, la PAG, la LSC et le OB des souris mâles et femelles contrôles et tolérantes.....	130
Figure 33 : Métabolisme de la morphine <i>in vitro</i> par des cultures primaires de cellules gliales mixtes ou purifiées	135
Figure 34 : Effet de la M3G sur les RAW-DUAL™ et les RAW-DUAL™ KO-TLR4 .	137
Figure 35 : Absence d'effet en imagerie calcique de l'application directe de M3G et de sa préincubation sur des microglies primaires en culture exprimant ou non le MOR	141

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Etudes comportementales sur la M3G	170
Annexe 2 : Etudes des effets pharmacologiques de la M3G	174
Annexe 3 : Revue : Morphine-3-glucuronide: physiology and behaviour (<i>en cours de soumission</i>)	178
Annexe 4 : Conditions utilisées en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem	202
Annexe 5 : Détails statistiques	204
Annexe 6 : Publication - Central metabolism as a potential origin of sex differences in morphine antinociception but not in the induction of antinociceptive tolerance in mice (en révision chez <i>British Journal Of Pharmacology</i>)	217
Annexe 7 : Paramètres pharmacocinétiques obtenus après l'analyse non-compartimentale pour la morphine et la M3G	271
Annexe 8 : Quantités de morphine et de M3G retrouvées dans les différentes régions du SNC chez les souris mâles et femelles contrôles et tolérantes à la morphine.....	273
Annexe 9 : Quantités de M3G retrouvées dans les différentes régions du SNC chez des souris mâles et femelles naïves après injection de concentrations croissantes de M3G par voie i.p.....	275
Annexe 10 : Publication - Unveiling the Impact of Morphine on Tamoxifen Metabolism in Mice in vivo.....	277
Annexe 11 : Liste de publications scientifiques	302

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT : sérotonine

AA : acide arachidonique

AC : adénylate cyclase

ACN : acétonitrile

AEA : anandamine

AF : acide formique

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien

ALLO : allopregnalonone

AM : ester d'acetoxymethyle

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AP-1 : protéine activatrice 1

ATP : adénosine-triphosphate

AUC : Aire sous la courbe

AUMC : Aire sous la courbe du moment

β -Arr : β -arrestine

β -FNA : β -funaltrexamine

BHE : barrière hémato-encéphalique

BSA : albumine de sérum bovin

CFA : adjuvant complet de Freund

Cl/F : clairance sur la biodisponibilité

C_{\max} : concentration maximale atteinte lors de la cinétique

CT : contrôle

CTAP : peptide D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂

CYP : cytochrome P450

D3-M3G : molécule de M3G contenant 3 atomes de deutérium (²H)

D3-Morphine : molécule de morphine contenant 3 atomes de deutérium (²H)

Da : Dalton

DA : dopamine

DAMGO : [D-Ala₂, N-MePhe₄, Gly-ol]-enkephalin

DANTE : une Décennie d'ANTalgiques En France

DMEM : milieu minimum essentiel d'Eagle modifié par Dulbecco

DOR/DOP : récepteur opioïde δ

DRG : ganglions rachidiens

DSM-5 : manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux 5

ED₅₀ : Dose efficace moyenne

ERK : kinases impliquées dans la régulation des signaux extracellulaires

FBS : sérum fœtal de bovin

GABA : acide γ -aminobutyrique

GABA_A : récepteur à l'acide γ -aminobutyrique

GDP : guanosine diphosphate

GFAP : protéine acide fibrillaire gliale

GIRK : canaux potassiques rectifiants entrants

GLAST : transporteur des acides aminés excitateurs

GLUT-1 : transporteur du glucose 1

GRK : kinase associée aux récepteurs couplés aux protéines G

GTP : guanosine triphosphate

HBSS : solution saline équilibrée de Hank

HEK : cellules embryonnaires de rein humains

IASP : International Association for the Study of Pain

IBA1 : molécule adaptatrice de liaison au calcium ionisé 1

IC 95 % : Intervalle de confiance à 95 %

i.c.v. : injection intracérébroventriculaire

IL-1 β : interleukine-1 β

IL-1ra : antagoniste des récepteurs de l'interleukine-1 β

IL-6 : interleukine-6

IL-10 : interleukine-10

i.m. : injection intramusculaire

i.p. : injection intrapéritonéale

ISG54 : promoteur du gène 54 dont l'expression est stimulée par les interférons

ISRE : élément de réponse à la stimulation aux interférons

IRF : Facteur de régulation des interférons

i.t. : injection intrathécale

i.v. : injection intraveineuse

KO : souris n'exprimant pas une protéine d'intérêt

KOR/KOP : récepteur opioïde κ

LC : locus coeruleus

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

LCR : liquide céphalo-raphidien

LPS : lipopolysaccharide

LSC : moelle épinière lombaire

m/z : Rapport masse/charge

M3G : morphine-3-glucuronide

M6G : morphine-6-glucuronide

MACS : trie cellulaire magnétique

MAPK : protéines kinases activité par le facteur mitogène

MD-2 : facteur de différenciation myéloïde 2

MIP-2 : protéine inflammatoire de macrophages

MOR/MOP : récepteur opioïde μ

MPE : effet maximal possible

MRM : multiple reaction monitoring

MRP : protéine associée à la résistance aux médicaments

MRT : temps de résidence moyen

NCA : analyse non-compartmentale

NF- κ B : Facteur nucléaire κ B

NK : lymphocyte cytotoxique naturel

NMDA : *N*-méthyl-*D*-aspartate

NO-cGMP-PKG : voie de signalisation monoxyde d'azote-guanosine monophosphate cyclique-protéine kinase G

NOP/ORL1 : récepteur opioïde à la nociceptine

ns : non significatif

OATP : transporteur polypeptidique d'anions organiques

OB : bulbe olfactif

OCT : transporteur de cations organiques

OIH : hyperalgésie induite par les opioïdes

PAG : substance grise périaqueducule

PBN : noyau parabrachial

PBS : Tampon phosphate salin

PD-L1 : ligands de mort programmée 1

P-gp : glycoprotéine P

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

RAW CTL : RAW-DUALTM exprimant le TLR4

RAW KO : RAW-DUALTM n'exprimant pas le TLR4

RCPG : récepteur couplé aux protéines G

RE : réticulum endoplasmique

RGS : protéines régulatrices de l'activité des protéines G

ROS : espèce réactive de l'oxygène

RT : temps de rétention

RVM : Formation réticulée rostral ventromédiane

s.c. : injection sous-cutanée

SD : rats Sprague-Dawley

SEAP : phosphatase alcaline embryonnaire sécrétée

SEM : Ecart standard à la moyenne

SNC : système nerveux central

SPE : extraction en phase solide

T_{1/2} : demi-vie terminale

TRL : récepteur toll-like

TNF α : facteur de nécrose tumorale α

UDPGA : acide glucuronique couplé à une uridine diphosphate

UDP-GlcNac : UDP-acétylglucosamine

UGT : UDP-glucuronosyltransférase

UTP : uridine-triphosphate

V_{dss}/F : volume de distribution à l'état stationnaire sur la biodisponibilité

vIPAG : substance grise périaqueducule ventro-latérale

WT : souris « sauvage »

Introduction

Généralités sur la douleur

Définition, caractéristiques et enjeux sociétaux

Selon l'association internationale pour l'étude de la douleur (IASP), la douleur est définie comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à, ou ressemblant à celle associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle » (Raja et al., 2020). Cette définition, récemment révisée de la version de 1979 publiée initialement par Merskey *et al.*, s'intègre dans un modèle bio-psycho-social de la douleur. Ce modèle tient compte des interactions dynamiques entre les facteurs biologiques, psychologiques et sociaux pouvant influencer l'expérience de la douleur (**Figure 1**) (Gatchel, Peng, Peters, Fuchs, & Turk, 2007; Merskey, 1979). Par exemple, une douleur qui prend son origine dans sa composante sensorielle peut influencer des fonctions cognitives et affectives (*e.g.* l'humeur, l'attention, l'empathie, l'anxiété) qui modulent initialement la perception de celle-ci (Loggia, Mogil, & Bushnell, 2008; Tang et al., 2008; Villemure & Bushnell, 2009; Willoughby, Hailey, Mulkana, & Rowe, 2002). De plus, les croyances (*e.g.* la catastrophisation, la peur associée à une douleur ou encore l'estime de soi), basées sur l'historique et le contexte social de chaque patient influencent fortement la perception et l'expression de la douleur ainsi que la réponse aux traitements (Edwards, Bingham, Bathon, & Haythornthwaite, 2006; Kalapurakkel, Carpino, Lebel, & Simons, 2015; Turk & Okifuji, 2002; Turk & Wilson, 2010). Il est important de noter que la douleur ne prend pas nécessairement pour origine l'intégration d'un stimulus par le système sensoriel. La définition de la douleur inclut un caractère désagréable qui confère à la douleur un aspect émotionnel important. Sa verbalisation témoigne de cet état psychologique, bien qu'il soit aujourd'hui admis que la douleur peut être présente en absence de verbalisation. Elle est donc caractérisée comme une expérience désagréable personnelle et évolutive qui peut varier en termes d'intensités, types, durées et mécanismes, et est par conséquent, difficile à définir précisément (Raja et al., 2020).

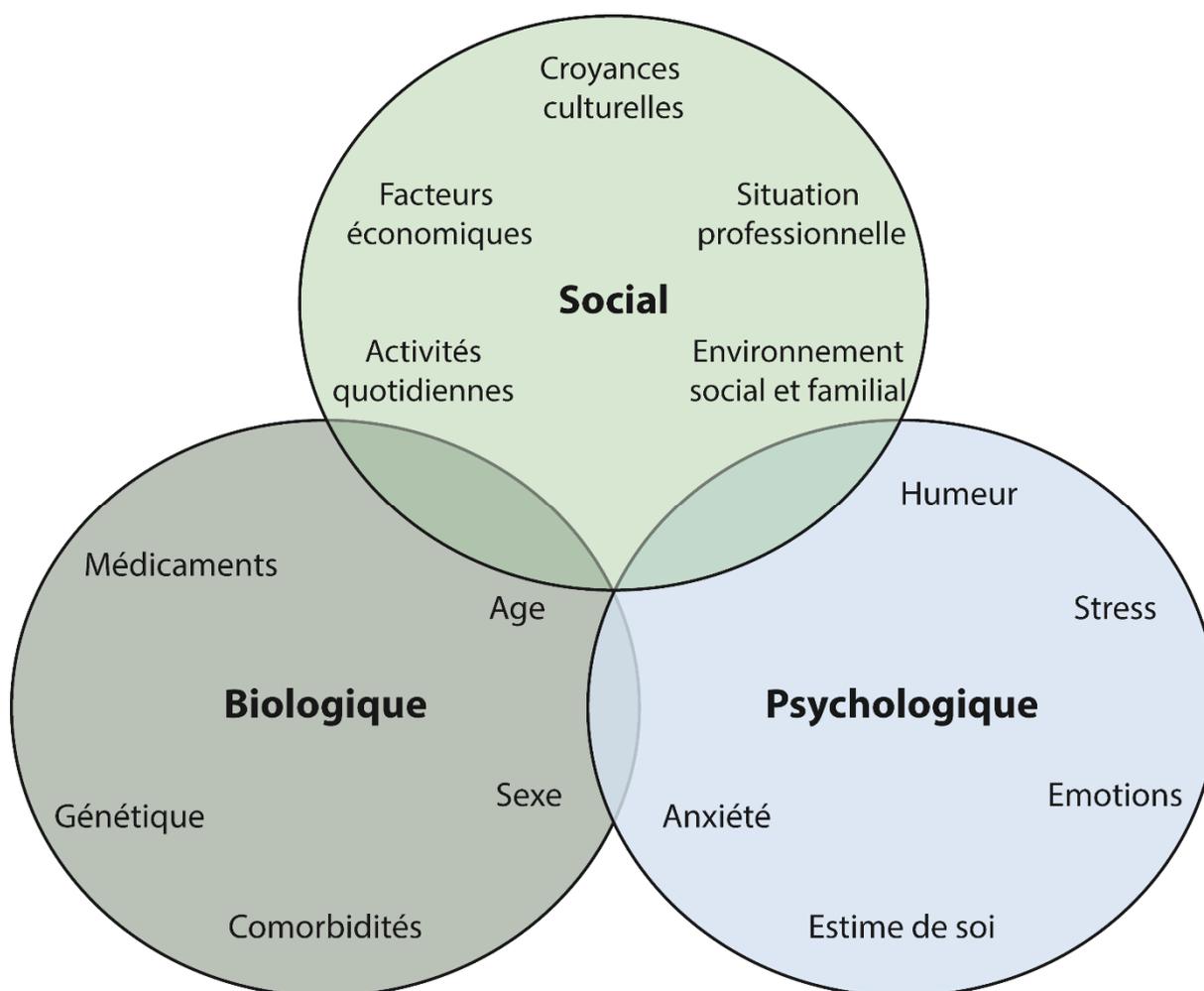


Figure 1 : Modèle bio-psycho-social de la douleur

Le modèle bio-psycho-social de la douleur intègre les interactions dynamiques entre les facteurs biologiques, psychologiques et sociaux qui influencent l'expérience de la douleur.

On distingue plusieurs types de douleur en fonction de leurs caractéristiques. Par exemple, on distingue la douleur somatique de la douleur viscérale, car elles possèdent des origines et des caractéristiques différentes. De plus, la durée de l'expérience de la douleur permet de distinguer la douleur aiguë (ou physiologique) de la douleur chronique (ou pathologique). La douleur aiguë est une douleur généralement intense, mais brève, qui permet une réponse rapide et adaptée suite à un stimulus lié à un danger appelé stimulus nociceptif. C'est un système d'alarme qui permet à l'individu de se protéger de lésions tissulaires potentielles (Inserm, 2017). La douleur chronique est, quant à elle, une douleur qui persiste au-delà de la guérison du tissu, ou qui existe en l'absence de causes évidentes. De ce fait, elle ne remplit plus sa fonction première adaptative. On considère une douleur comme chronique lorsque celle-ci persiste pendant plus de trois à six mois (Treede et al., 2015).

Parmi les douleurs chroniques, on trouve des douleurs dites nociceptives provenant d'un fonctionnement excessif du système sensoriel de la douleur. C'est notamment le cas de nombreuses douleurs liées aux cancers qui peuvent avoir des origines multiples, telles que la présence de la tumeur ou de métastases, les méthodes invasives pour lutter contre le cancer ou les traitements de chimiothérapie (McGuire, 2004). Contrairement à la douleur nociceptive, la douleur neuropathique provient d'une lésion nerveuse. Celle-ci est extrêmement handicapante et son traitement reste aujourd'hui un challenge de par la diversité des lésions possibles, l'hétérogénéité des mécanismes impliqués et les comorbidités potentiellement associées. Pour finir, il existe les douleurs dites « mixtes » qui associent à la fois une composante nociceptive et une composante neuropathique (Baron, Binder, & Wasner, 2010). Ainsi, on estime que 20 % des douleurs liées aux cancers sont de nature neuropathique et jusqu'à 40 % d'entre elles sont de nature mixte (Bennett et al., 2012).

La douleur chronique est un problème de santé publique majeur. En effet, elle est devenue l'une des premières causes d'handicap à travers le monde (Disease, Injury, & Prevalence, 2017). En France, on estime que la prévalence de la douleur chronique avoisine les 30 % de la population adulte (Bouhassira, Lanteri-Minet, Attal, Laurent, & Touboul, 2008; Chenaf et al., 2018). De plus, son coût économique pour les systèmes de santé nationaux est de plusieurs dizaines de milliards d'euros par an dans plusieurs pays d'Europe (Breivik, Eisenberg, O'Brien, & Openminds, 2013).

Il existe ainsi de nombreuses douleurs qui diffèrent de par leurs caractéristiques biologiques, mais également de par la singularité de chaque patient. Par conséquent, afin d'optimiser la prise en charge et les traitements de la douleur chronique, il est nécessaire de comprendre les mécanismes sous-jacents via des études précliniques et cliniques permettant, à terme, le développement de nouvelles approches thérapeutiques chez l'humain.

Physiologie de la douleur

La douleur naît de l'interprétation consciente de la nociception. La nociception est définie par l'IASP comme l'ensemble des processus neuraux impliqués dans l'encodage d'un stimulus nociceptif. Plus précisément, le message nociceptif prend naissance suite à la détection d'un stimulus nociceptif par un neurone pseudo-unipolaire sensoriel périphérique de premier ordre, également appelé nocicepteur. Ces nocicepteurs sont classifiés selon la modalité nociceptive détectée : thermique, mécanique, chimique ou polymodale. Les terminaisons périphériques de ces nocicepteurs sont localisées dans la grande majorité du corps, essentiellement au niveau de la peau, ainsi qu'au sein de tissus internes tels que les muscles, les articulations ou les viscères (Raja, Meyer, & Campbell, 1988; Robinson & Gebhart, 2008). Les corps cellulaires de ces neurones sensoriels sont situés dans les ganglions rachidiens (DRG) de la moelle épinière (ou dans les ganglions trigéminés), alors que leurs axones contactent un neurone de second ordre dans la corne dorsale de la moelle épinière. Dans la corne dorsale de la moelle épinière, le message est modifié, puis relayé à un neurone d'ordre supérieur situé au sein de structures supraspinales telles que le thalamus et l'amygdale. Ce dernier projette son axone vers les structures corticales qui permettront la perception de la douleur. En parallèle, plusieurs structures supraspinales sont à l'origine de contrôles descendants de la douleur telles que la substance grise périaqueducale (PAG) ou la formation réticulée rostrale ventromédiane (RVM) (H. Fields, 2004; Lau & Vaughan, 2014; Millan, 2002). Ces centres sont des carrefours des informations nociceptives et non nociceptives. Ils innervent directement ou indirectement la corne dorsale de la moelle épinière pour faciliter ou inhiber l'intégration de l'information nociceptive en fonction du contexte dans lequel l'organisme se trouve (**Figure 2**) (Brodin, 2016; Lamont, Tranquilli, & Grimm, 2000).

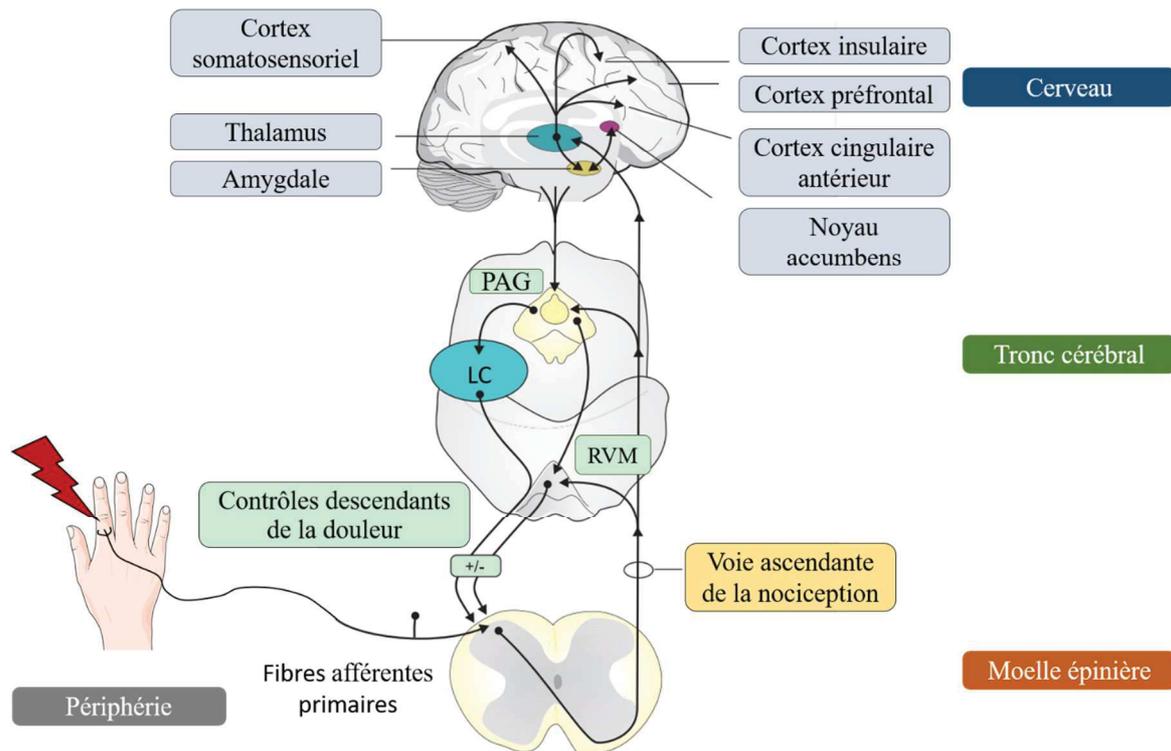


Figure 2 : De la genèse du message nociceptif à la naissance de la douleur

La stimulation nociceptive est détectée par les terminaisons périphériques des nocicepteurs (neurone de 1^{er} ordre) dont les corps cellulaires sont localisés dans les DRG (non représentés). Les terminaisons nerveuses centrales de ces nocicepteurs innervent des neurones de 2nd ordre situés dans la corne dorsale de la moelle épinière. Au sein de cette région, une première forme d'intégration de l'information est réalisée puis celle-ci est transmise aux centres supraspinaux par le biais de neurones de projections. Ces neurones empruntent plusieurs voies ascendantes dont la principale est la voie spino-thalamique qui rejoint différents noyaux du thalamus. D'autres voies existent, dont la voie spino-réticulaire et spino-mésencéphalique qui innervent également différents noyaux du thalamus, par le biais de relais dans la formation réticulée et le mésencéphale. Au sein du thalamus, des neurones d'ordres supérieurs projettent vers des structures corticales incluant les cortex somatosensoriels primaires et secondaires, le cortex cingulaire antérieur et le cortex insulaire. En retour, certaines structures supraspinales sont à l'origine des contrôles descendants de la douleur. Elles innervent directement ou indirectement la moelle épinière et modulent la transmission nociceptive. Cette organisation permet, à partir d'un stimulus nociceptif périphérique, de conférer au message nociceptif toutes les composantes nécessaires pour donner naissance à l'expérience de la douleur. **LC**, locus coeruleus ; **PAG**, substance grise périaqueducale ; **RVM**, formation réticulée rostral ventromédiane. **Adapté à partir de Brodin, 2016.**

Il existe ainsi un réseau complexe d'innervations des centres corticaux d'intégration de la douleur (**Figure 3**). Il est admis qu'il existe de nombreuses régions corticales interconnectées qui participent à cette intégration en fonction du stimulus. Ce réseau neuroanatomique cortical est nommé « matrice de la douleur » (Apkarian, Bushnell, Treede, & Zubieta, 2005; Legrain, Iannetti, Plaghki, & Mouraux, 2011). Parmi ces régions, on trouve notamment le cortex insulaire, le cortex cingulaire antérieur, le cortex préfrontal et les cortex somatosensoriels primaires et secondaires qui jouent des rôles clés dans la perception de la douleur (Apkarian et al., 2005; Corder, Castro, Bruchas, & Scherrer, 2018).

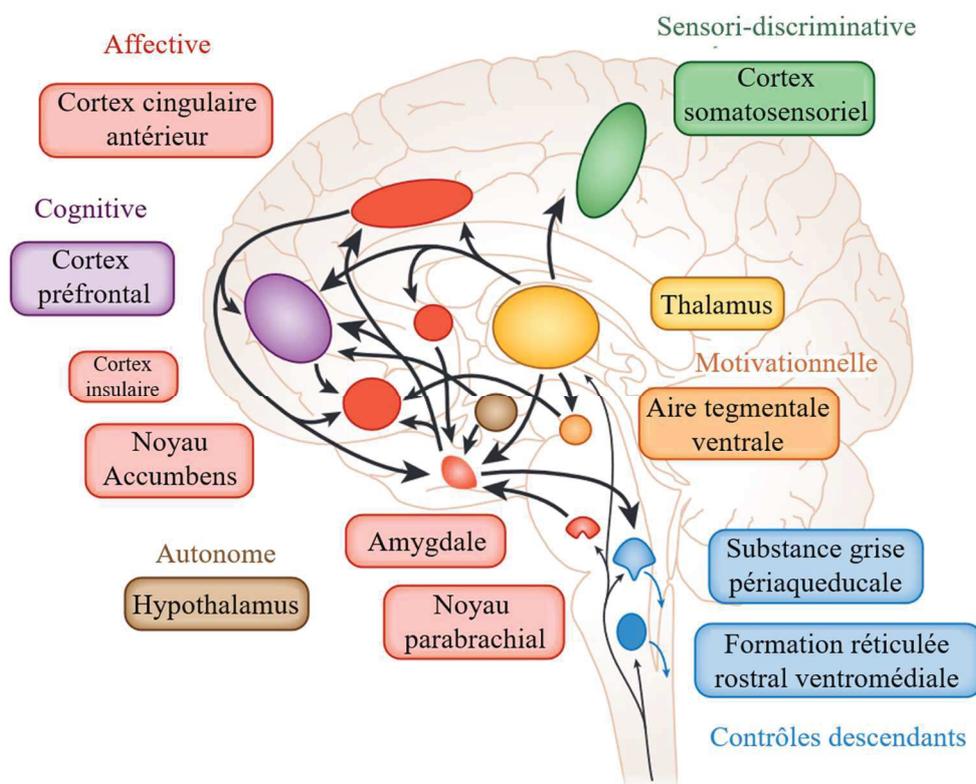


Figure 3 : La circuiterie de la douleur

Les informations nociceptives, provenant de la moelle épinière, sont intégrées au sein d'un circuit neuronal complexe, puis sont relayées vers un réseau cortical, appelé matrice de la douleur, pour donner naissance à une expérience douloureuse et aversive. Ici, des structures corticales impliquées dans la matrice de la douleur et d'autres structures cérébrales sont regroupées en fonction des composantes (sensori-discriminatives, affectives, cognitives, ...) qu'elles attribuent à la douleur. Les afférences neuronales primaires et leurs relais au sein de la moelle épinière font partie intégrante de la circuiterie de la douleur bien qu'ils ne soient pas représentés. **Adapté à partir de Corder, 2018.**

Lors de ma thèse, une attention particulière a été portée sur la moelle épinière, la PAG et l'amygdale. En effet, ces trois structures sont des carrefours d'intégration de l'information nociceptive et possèdent des rôles centraux dans l'intégration et la modulation de l'information nociceptive.

Traitement médicamenteux de la douleur

Pour plus de clarté, le terme « opioïde », au sens d'une substance qui agit sur le système opioïdergique, a été préféré au terme « opiacé » dans ce manuscrit, bien qu'ils ne soient pas synonymes.

Le traitement de la douleur est un objectif majeur de la recherche fondamentale et clinique. Il existe différents types de traitements de la douleur qui sont utilisés en fonction de l'intensité (*e.g.* faible, modérée ou sévère) et du type de douleur (*e.g.* douleurs inflammatoires, douleurs neuropathiques). Par exemple, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont utilisés pour traiter les douleurs légères à modérées. Lorsque leur effet analgésique n'est pas suffisant, voire leur utilisation impossible (*i.e.* contre-indications), les opioïdes représentent le traitement de référence pour la douleur modérée à sévère malgré d'importants effets secondaires associés à leur utilisation. Ces opioïdes, incluant la morphine, produisent une analgésie puissante par le biais de leur action sur le système opioïdergique endogène. Leur utilisation est très courante. À titre d'exemple, en France en 2015, il est estimé qu'environ 10 millions de personnes (~17,1 % de la population française) ont reçu un antalgique opioïde sur prescription (Barreau, 2017). Ces opioïdes se déclinent en de nombreux dérivés et sont classés en deux catégories en fonction de leurs effets analgésiques faibles ou forts. Par exemple, la codéine et le tramadol sont considérés comme des opioïdes faibles, bien qu'ils nécessitent une prescription médicale. La morphine, l'oxycodone et le fentanyl sont considérés comme des opioïdes forts classés comme stupéfiants et nécessitant des prescriptions sur ordonnance sécurisée et une délivrance restreinte. Le recours aux antalgiques opioïdes est associé à différentes douleurs et différents contextes allant de la douleur modérée aiguë non-cancéreuse prise en charge par un médecin généraliste, à la douleur sévère chronique d'origine cancéreuse traitée à l'hôpital. La prescription d'un type d'opioïde et la voie d'administration varie en fonction de l'intensité et de la durée de la douleur, ainsi que du statut médical du patient. En France, la consommation globale d'antalgiques opioïdes, et plus généralement, d'antalgiques, tend à augmenter et témoigne d'une amélioration de la prise en charge de la douleur. Ainsi, d'après l'étude « une Décennie d'ANTalgiques En France » (DANTE), la consommation d'antalgiques opioïdes forts

a augmenté de 150 % entre 2006 et 2015. Celle des antalgiques non opioïdes et opioïdes faibles a également augmenté (Guerlais, 2018; Monzon, 2019).

Alors que l'intérêt des antalgiques opioïdes dans la prise en charge de la douleur est incontestable, leur utilisation est associée à des risques élevés de troubles de l'usage et d'addiction qui peuvent conduire à l'overdose. En effet, les opioïdes peuvent induire une dépression respiratoire qui, si elle n'est pas prise en charge, peut conduire au décès du patient. Cette overdose représente en général, la dernière étape d'une longue période de consommation et de troubles d'usage. Ainsi, un patient cherchant initialement à soulager une douleur peut développer une dépendance qui s'accompagne de l'apparition d'une tolérance aux effets analgésiques. Cette tolérance décrit le phénomène de diminution de l'effet analgésique au fur et à mesure des administrations et induit la nécessité d'augmenter les doses pour soulager la douleur. Cette escalade des doses engendre une addiction plus forte qui augmente très fortement les risques de troubles d'usage et d'overdose. Ces risques sont aujourd'hui au cœur de la problématique de l'utilisation des opioïdes et de la tristement célèbre « crises des opioïdes » aux Etats-Unis (**Figure 4**). En effet, en 2017, plus de 68 000 américains sont morts suite à une overdose d'opioïdes et plusieurs millions ont rapporté des troubles d'usage des opioïdes (Ahmad, 2021). Par ailleurs, cette crise a un impact économique majeur estimé à 504 milliards de dollars en 2015 aux Etats-Unis (Roper-Miller & Speaker, 2019). L'Europe n'est pas épargnée par la crise, bien qu'elle soit touchée dans une moindre mesure. En effet, les réglementations encadrant les prescriptions et les délivrances, ainsi que les informations délivrées aux professionnels de santé et au grand public européen relatives à l'utilisation de ces antalgiques, sont différentes des Etats-Unis (Monzon, 2019). On estime tout de même que la consommation générale d'opioïdes au sein et en dehors du contexte médical a augmenté en Europe et que plus de 80 % des overdoses rapportées sont liées aux opioïdes (Ayoo, Mikhaeil, Huang, & Wasowicz, 2020). Le nombre d'intoxications, d'hospitalisations et de décès, suite à la consommation d'antalgiques opioïdes obtenus par prescription a également augmenté depuis une quinzaine d'années. Pour accentuer ce constat, le nombre de cas de troubles d'usage de ces antalgiques a également doublé entre 2006 et 2015 (Monzon, 2019). De par l'intensification de l'utilisation des antalgiques opioïdes et afin d'améliorer la prise en charge de la douleur, il est nécessaire de comprendre les mécanismes sous-jacents aux risques qui leurs sont associés. Le but est d'adapter ou de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Malheureusement, aujourd'hui, seule la rotation d'opioïdes est utilisée à l'hôpital et semble partiellement efficace pour pallier à l'apparition de la tolérance analgésique (Treillet, Laurent, & Hadjiat, 2018).

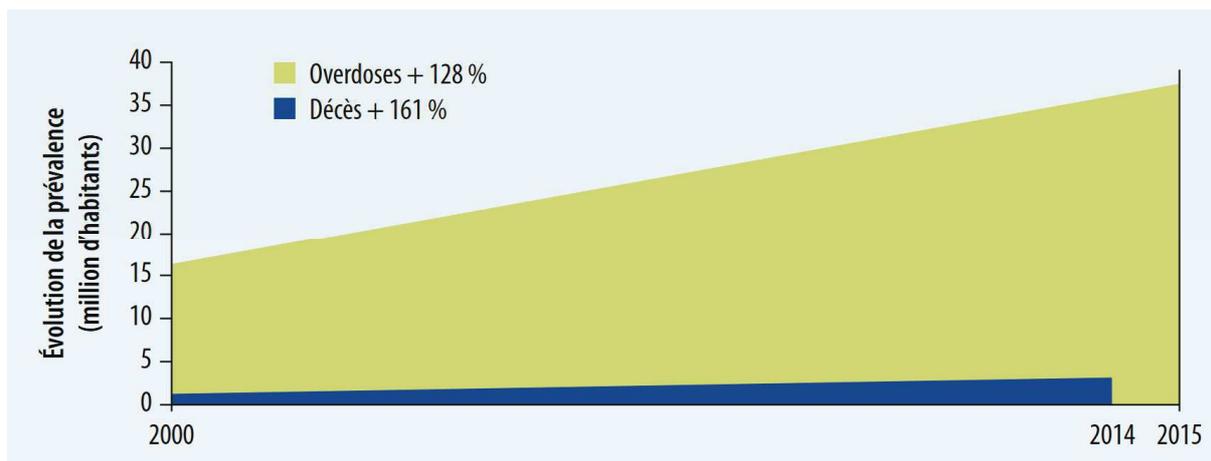


Figure 4 : La crise des opioïdes en France

En France entre 2000 et 2015, des tendances à l'augmentation sont constatées dans le nombre d'hospitalisations et le nombre de décès liés à une overdose impliquant un opioïde. On compte, en France à cette période, au moins 4 décès par semaine suite à une overdose impliquant un opioïde. **Reproduit à partir de Barreau, 2017.**

Généralités sur la morphine

La morphine est un alcaloïde extrait de l'opium du *Papaver Somniferum* qui possède des propriétés analgésiques puissantes, euphorisantes et hypnotiques (**Figure 5**). Elle est l'une des plus vieilles molécules connues et utilisées dans le traitement de la douleur et reste aujourd'hui une référence en clinique, particulièrement, dans la gestion de la douleur post-opératoire. Néanmoins, son utilisation est associée à des effets secondaires, notamment sur le système respiratoire, et son administration répétée provoque le développement d'une tolérance à ses effets analgésiques et une addiction prononcée. Paradoxalement, il est également possible que l'administration répétée de morphine induise une sensibilité accrue à la douleur, aussi appelée, hyperalgésie induite par les opioïdes (OIH). Ces effets secondaires peuvent conduire à des troubles de la consommation, voir au décès par dépression respiratoire suite à une overdose.

Le nom morphine dérive du grec ancien *Μορφεύς*, Morphée, en référence au dieu grec du sommeil et des rêves. L'opium, dont elle est extraite, concentre plusieurs autres alcaloïdes actifs, comme la codéine et la thébaine, ayant également des propriétés analgésiques. La morphine est le principal alcaloïde présent dans l'opium à hauteur de 8 à 25 % de son poids

total (Carlin, Dean, & Ames, 2020). Traditionnellement, l'opium est récolté après lacération du bulbe dont le latex blanc s'échappe et brunit en séchant.

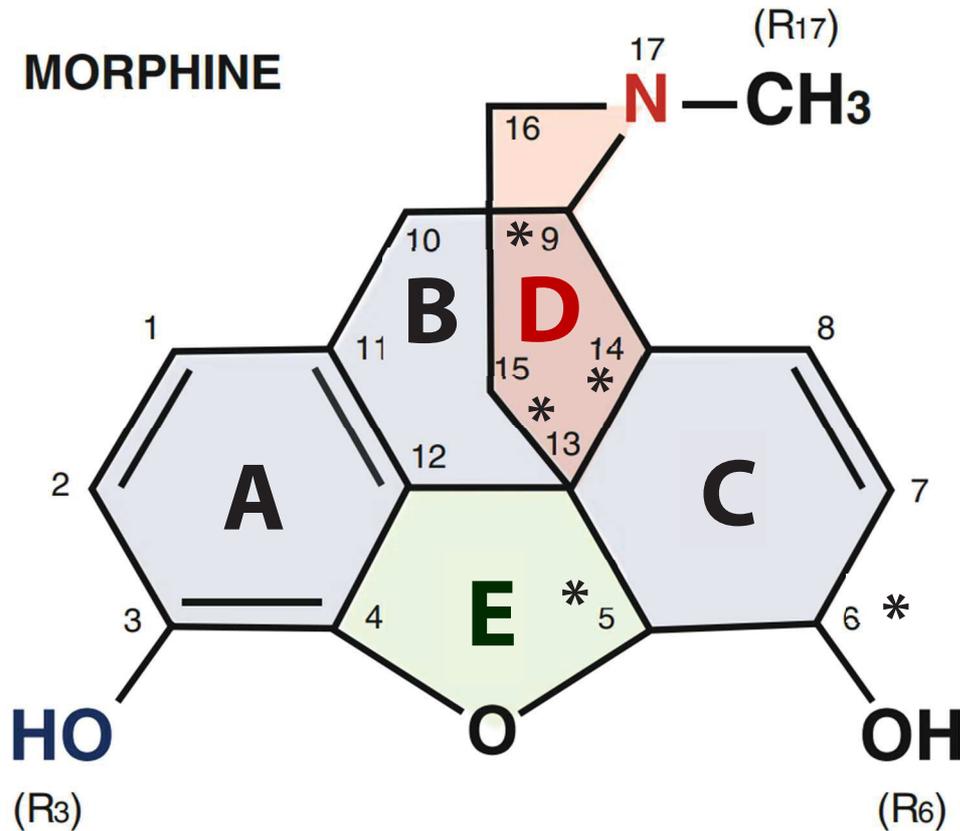


Figure 5 : Structure de la morphine

La morphine, dont la formule brute est $C_{17}H_{19}NO_3$, possède une masse moléculaire de 285,34 daltons (Da). La morphine se décompose en trois groupements : un squelette phénanthrène (Cycle A, B et C en bleu), un cycle furane (Cycle E en vert) et un cycle pipéridine (Cycle D en rouge). Elle fait partie du groupe chimique des alcaloïdes benzylisoquinolines car elle possède un squelette benzylisoquinoline (Cycle A, C en bleu et D en rouge) auquel deux cycles supplémentaires sont ajoutés par cyclisation (Cycle B en bleu et E en vert). Les cycles phénol (Cycle A en bleu) et cyclohexenol (Cycle C en bleu) portent, tous deux, une fonction hydroxyle qui est importante dans la modification de la morphine lors de son métabolisme. La numérotation des carbones de la morphine, réalisée avant la caractérisation complète de sa structure, est basée sur le squelette phénanthrène (Cycle A, B et C en bleu) (Baggesgaard Rasmussen, 1955). La morphine contient 5 centres chiraux (dénotés par des astérisques) qui font d'elle une molécule optiquement active. **A** : cycle phénol, **B** : cycle cyclohexane, **C** : cycle cyclohexenol, **D** : cycle N-méthyl-pipéridine, **E** : cycle furane. **Modifiée à partir de (Cruz & Granados-Soto, 2016).**

Bref historique

Les traces les plus anciennes de graines de *Papaver Somniferum* en association avec l'humain remontent à l'aire néolithique (environ vers -5600 avant J-C) et ont été retrouvées au fond du lac de Bracciano sur le site de La Marmotta en Italie. Ces évidences suggèrent que la culture du pavot à opium était déjà pratiquée à cette époque. Cependant, les raisons de cette pratique (alimentaire, médicinale, religieuse...) restent à élucider (Merlin, 2003).

La première extraction de la morphine à partir de l'opium a été réalisée par le pharmacien Friedrich Sertürner en 1805 (Sertürner, 1806). Cette extraction est effectuée en dissolvant l'opium dans de l'eau acidifiée, puis en précipitant la solution avec de l'ammoniac permettant d'isoler une base faible que Sertürner appela « morphium ». Il lui décrit par la suite des propriétés analgésiques nettement supérieures à celles de l'opium chez l'animal et l'humain. En effet, la possibilité de doser précisément la morphine, principal actif de l'opium, a permis de normaliser les différences d'efficacité liées au pourcentage d'alcaloïdes présents dans les différentes préparations d'opium de l'époque. Une publication détaillée de l'ensemble de ses découvertes est publiée en 1817, et révolutionna le traitement médical de la douleur (Sertürner, 1817). L'attribution de cette découverte est néanmoins controversée. En 1804, Armand Séquin et Bernard Courtois présentent à l'Institut de France une méthode d'isolement de la substance active de l'opium, mais ils ne publient ces observations que 10 ans plus tard, en 1814 (Brook, Bennett, & Desai, 2017). Successivement, l'allemand Carl Friedrich Wilhelm Meissner classifie en 1819 la morphine comme le premier alcaloïde, composé organique à base azoté de provenance majoritairement végétale (Meissner, 1819).

En comparaison aux autres produits à base d'opium, la popularité de la morphine explose suite à l'invention de la première seringue à aiguille hypodermique par Alexander Wood en 1853. Celle-ci a permis le développement de l'analgésie post-opératoire utilisant la morphine, dont une des premières traces est décrite par James Paget en 1863 (Hamilton & Baskett, 2000). Dès lors, la morphine s'impose comme étant le traitement standard dans la gestion de la douleur. Par exemple, celle-ci est omniprésente pendant la première guerre mondiale où elle est donnée aux soldats blessés malgré les risques d'accoutumance. Par ailleurs, depuis la découverte de la structure chimique de la morphine par Sir Robert Robinson en 1925, un grand nombre de dérivés morphiniques ont été développés afin d'obtenir une meilleure analgésie et moins d'effets secondaires (Brook et al., 2017). Cependant, la morphine reste aujourd'hui l'analgésique de référence auquel tous les autres traitements antidouleurs sont comparés.

Production et fabrication

La culture légale de *Papaver Somniferum* se concentre principalement en Australie, en France, en Turquie, en Espagne et en Hongrie, bien que l'extraction de morphine à partir de la paille du pavot se déroule également dans d'autres pays tels que la Chine, la Norvège, le Royaume-Uni ou les Etats-Unis (**Figure 6a**) (INCB, 2020). En 2019, 380,1 tonnes de morphine sont produites, avec comme premier fabricant, le Royaume-Uni responsable de 21,6 % de la production mondiale, suivi par la France avec 18,9 %. Seuls 13 % de la production totale de morphine sont dédiés à la consommation directe. Les 87 % restant sont transformés en d'autres dérivés morphiniques, principalement en codéine. En termes de consommation, de fortes disparités existent entre les différentes régions du monde en 2019. Les Etats-Unis sont les premiers consommateurs de morphine avec 47,6 % de la consommation mondiale suivi par l'Europe avec 32,3 % (**Figure 6b**). Ces deux régions du globe consomment à elles seules, environ 80 % de la consommation mondiale de morphine, alors qu'elles ne représentent qu'environ 16 % de la population mondiale. Il existe ainsi de très fortes disparités dans la consommation de la morphine entre les différentes régions du monde (INCB, 2020).

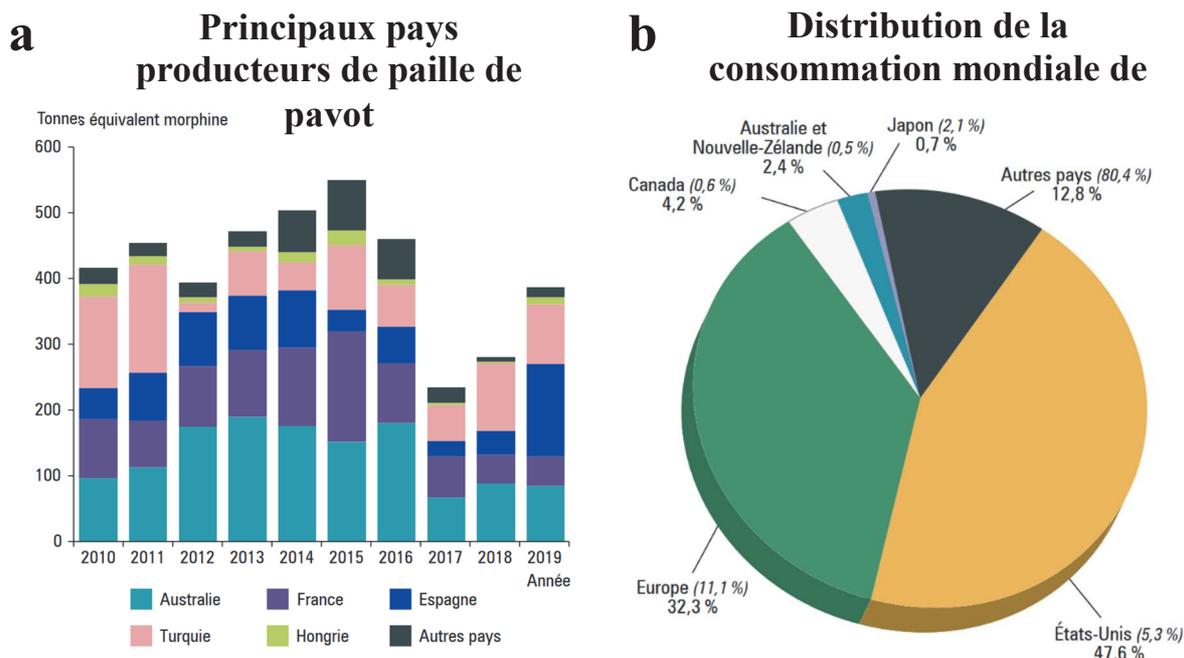


Figure 6 : Production de la paille de pavot et consommation de la morphine à travers le monde

(a) Production de la paille de pavot en tonnes équivalent morphine par les 5 principaux pays producteurs de 2010 à 2019. En 2019, les 5 principaux pays producteurs ont produit 372 tonnes de paille de pavot équivalent morphine des 392 tonnes totales produites légalement à l'échelle mondiale. (b) Répartition de la consommation mondiale de morphine par rapport au pourcentage de la population mondiale en 2019. **Reproduit à partir de INCB, 2020.**

Le système opioïdérique

Les effets analgésiques de la morphine reposent principalement sur son interaction avec le système opioïdérique endogène. Dans le système nerveux central (SNC), ce système est omniprésent dans le contrôle de la douleur et la réponse au stress (Kibaly, Xu, Cahill, Evans, & Law, 2019; Przewlocki & Almeida, 2017). Il est également impliqué dans des fonctions physiologiques prenant place principalement dans le SNC (motivation, plaisir, stress, appétit...) et en périphérie où il module, par exemple, le système entérique et le système immunitaire (**Figure 7**) (Kibaly et al., 2019).

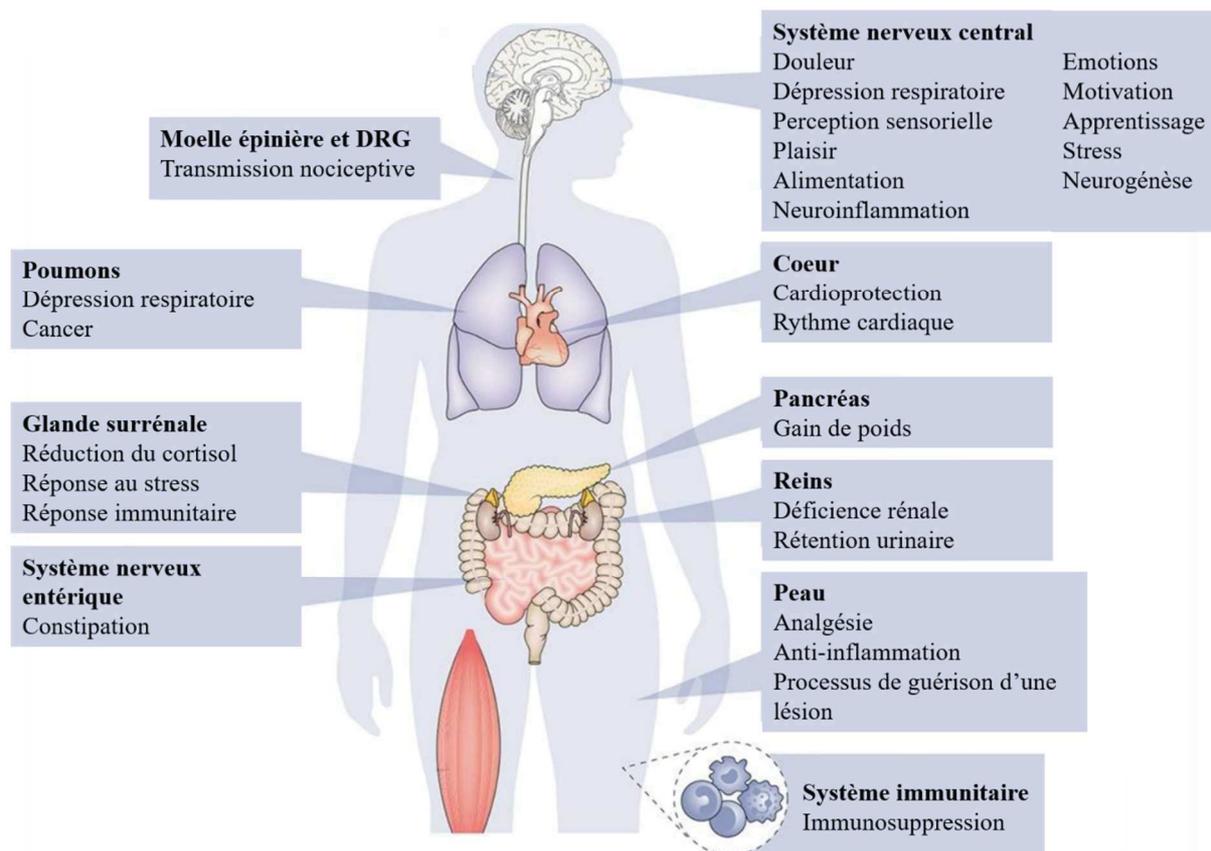


Figure 7 : Les fonctions du système opioïdérique

Au sein du SNC, le système opioïdérique participe à la transmission nociceptive et au contrôle de la douleur. Il est également impliqué dans de nombreuses autres fonctions telles que le contrôle de la respiration, le plaisir, le stress et la motivation. En périphérie, il module notamment le système immunitaire et le système gastro-entérique et certaines études lui ont attribué un rôle régulateur dans le pancréas ou les reins. **DRG**, ganglions rachidiens de la moelle épinière. **Adapté à partir de Kibaly, 2019.**

Le système opioïdérique est composé de quatre grandes familles de ligands qui incluent les endorphines, les enképhalines, les dynorphines, et la nociceptine et de quatre types de récepteurs. Les ligands se lient à des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) appelés : le récepteur opioïde μ (MOR, également appelé MOP), le récepteur opioïde δ (DOR, également appelé DOP), le récepteur opioïde κ (KOR, également appelé KOP) et le récepteur opioïde à la nociceptine (NOP, également appelé ORL1). Ces récepteurs et ligands sont exprimés dans la vaste majorité de l'organisme et participent à de nombreuses fonctions (Przewlocki & Almeida, 2017).

Les récepteurs opioïdes

Dans les années 1990, l'existence des récepteurs opioïdes a été confirmée grâce à l'avènement de la technique du clonage moléculaire. Les clonages des MOR, DOR et KOR ont permis de mettre en évidence la forte homologie de séquence entre ces récepteurs et d'approfondir les connaissances du système opioïdérique (Y. Chen, Mestek, Liu, Hurley, & Yu, 1993; Y. Chen, Mestek, Liu, & Yu, 1993; Evans, Keith, Morrison, Magendzo, & Edwards, 1992; Kieffer, Befort, Gaveriaux-Ruff, & Hirth, 1992; Meng et al., 1993; J. B. Wang et al., 1993). En parallèle, l'ORL1 a également été cloné et partage une homologie forte avec les récepteurs opioïdes (Mollereau et al., 1994). Le MOR, DOR, KOR et NOP sont encodés respectivement par les gènes *Oprm1*, *Oprd1*, *Oprk1* et *Oprl1*. Ces gènes partagent 50 à 70 % d'homologie et codent pour des RCPG, plus particulièrement, à des protéines hétérotrimériques $G_{i/o}$ inhibitrices sensibles à la toxine pertussique (Laugwitz, Offermanns, Spicher, & Schultz, 1993; Prather et al., 1995). Ces récepteurs opioïdes appartiennent au groupe γ de la famille des RCPG de classe A (famille de type Rhodopsine) (Katritch, Cherezov, & Stevens, 2013). Ils sont formés de 7 hélices α transmembranaires avec un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal cytoplasmique. Les segments transmembranaires et les boucles intracellulaires sont très conservés, contrairement aux domaines N-terminal et C-terminal et aux boucles extracellulaires (Pasternak & Pan, 2013). Des études récentes de cristallographie ont permis d'approfondir les connaissances relatives aux structures des récepteurs opioïdes en conformation inactive (**Figure 8**) (Granier et al., 2012; Manglik et al., 2012; A. A. Thompson et al., 2012; H. Wu et al., 2012) et active (Che et al., 2018; Claff et al., 2019; Huang et al., 2015).

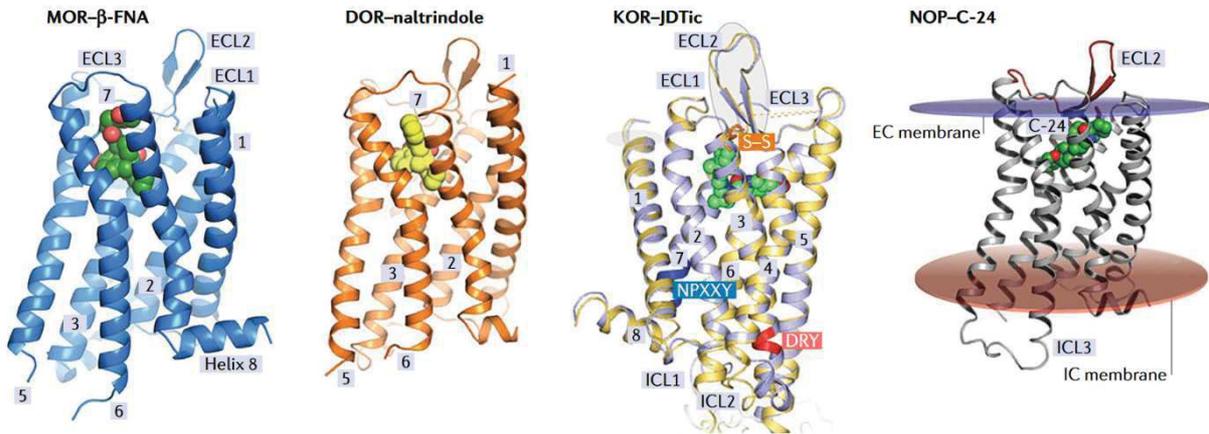


Figure 8 : Structures des récepteurs opioïdes MOR, DOR, KOR et NOP en conformation inactive obtenu par cristallisation en présence d'antagonistes spécifiques

Les structures des récepteurs opioïdes illustrées correspondent aux conformations inactives des récepteurs en présence d'un antagoniste spécifique. La β -funtaltrexamine a été utilisée pour le MOR, la naltrindole pour le DOR, le JDTic pour le KOR et le peptide antagoniste mimétique Compound-24 (C-24) pour le NOP. β -FNA, β -funtaltrexamine ; DOR, récepteur opioïde δ ; EC, membrane extracellulaire ; ECL, boucle extracellulaire ; IC, membrane intracellulaire ; ICL, boucle intracellulaire ; KOR, récepteur opioïde κ ; MOR, récepteur opioïde μ ; NOP-C-24, récepteur opioïde à la nociceptine lié au Coumpound-24. Reproduit à partir de Darcq, 2018.

Il est important de noter qu'il existe un phénomène d'épissage alternatif produisant une variété de récepteurs fonctionnels différents. Par exemple, le MOR est encodé par 4 exons dont le 4^{ème} code uniquement pour une séquence de 12 acides aminés. Chez la souris, 31 variants d'épissage ont été identifiés pour le MOR et ont été classifiés en trois catégories : les MOR possédant 7 segments transmembranaires dont la séquence d'acide aminé codée par l'exon 4 varie, les MOR tronqués avec 6 segments transmembranaires et les MOR tronqués avec un segment transmembranaire. Le DOR, le KOR et le NOP présentent également des variants d'épissages avec un nombre variable de segments transmembranaires (Piltonen et al., 2021; Piltonen et al., 2019). Chaque variant possède sa propre distribution et fonctionnalité, ce qui participe à la complexité du système opioïdiergic (Pasternak, 2014).

Les RCPG ont pour but de convertir un signal extracellulaire en réponse intracellulaire par le biais de l'activation d'une protéine G hétérotrimérique composée d'un complexe formé d'une sous-unité G_α , dotée d'un domaine GTPase et d'une sous-unité $G_{\beta\gamma}$. Le changement de conformation du récepteur, induit par la liaison de l'agoniste, provoque l'échange de la

guanosine diphosphate (GDP) par une guanosine triphosphate (GTP) au sein de la sous-unité G_{α} et entraîne sa dissociation du complexe. Les deux sous-unités sont alors en mesure de moduler leurs effecteurs (Premont & Gainetdinov, 2007). Après liaison d'un agoniste aux récepteurs opioïdes, la sous-unité G_{α} de la protéine $G_{i/o}$ induit l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase (AC) qui provoque la diminution de l'AMP cyclique (AMPC) (Sharma, Klee, & Nirenberg, 1977). La sous-unité $G_{\beta\gamma}$ provoque l'efflux d'ions K^{+} par le biais des canaux potassiques rectificants entrants (GIRK) et l'inhibition des canaux calciques voltage dépendants (Hescheler, Rosenthal, Trautwein, & Schultz, 1987; North, Williams, Surprenant, & Christie, 1987). Au sein du système nerveux, l'activation des récepteurs opioïdes induit l'hyperpolarisation des neurones qui expriment ces récepteurs.

L'arrêt de l'activité de la protéine G est médiée, d'une part, par des protéines régulatrices de l'activité des protéines G (RGS) qui catalysent la réaction de conversion du GTP en GDP par le domaine GTPase de la sous-unité G_{α} . D'autre part, l'activité des récepteurs opioïdes est aussi régulée par la désensibilisation. En effet, la phosphorylation du récepteur par une kinase associée aux RCPG (GRK) ou la protéine kinase C (PKC) initie le recrutement de la β -arrestine 1 ou 2 ce qui empêche le couplage entre le récepteur et la protéine G (Benovic et al., 1985; Premont & Gainetdinov, 2007). En plus d'empêcher la signalisation liée à la protéine G, la liaison intracellulaire de l'arrestine au récepteur phosphorylé initie l'internalisation clathrine-dépendante du récepteur. Une fois internalisé, le récepteur est soit recyclé à la membrane plasmique, soit dégradé (Lamberts & Traynor, 2013; Whistler et al., 2002).

La liaison de l'arrestine au récepteur opioïdique phosphorylé induit l'activation de plusieurs voies de signalisation dont celle des protéines kinases activées par le facteur mitogène (MAPK) (Lefkowitz & Shenoy, 2005). Pour illustrer son importance au sein de la signalisation opioïdique, plusieurs études reportent l'activation des kinases impliquées dans la régulation des signaux extracellulaires (ERK) 1 et 2 après stimulation des MOR. L'altération de l'activité de ces kinases a été démontrée dans les processus de tolérance aux effets analgésiques et de sevrage (Al-Hasani & Bruchas, 2011). À l'échelle cellulaire, on trouve ainsi une voie dépendante des protéines G et une voie dépendante des arrestines recrutant les MAPK (**Figure 9**). La voie MAPK s'inscrit notamment dans le concept d'agonisme biaisé (cf. section, *les ligands exogènes*).

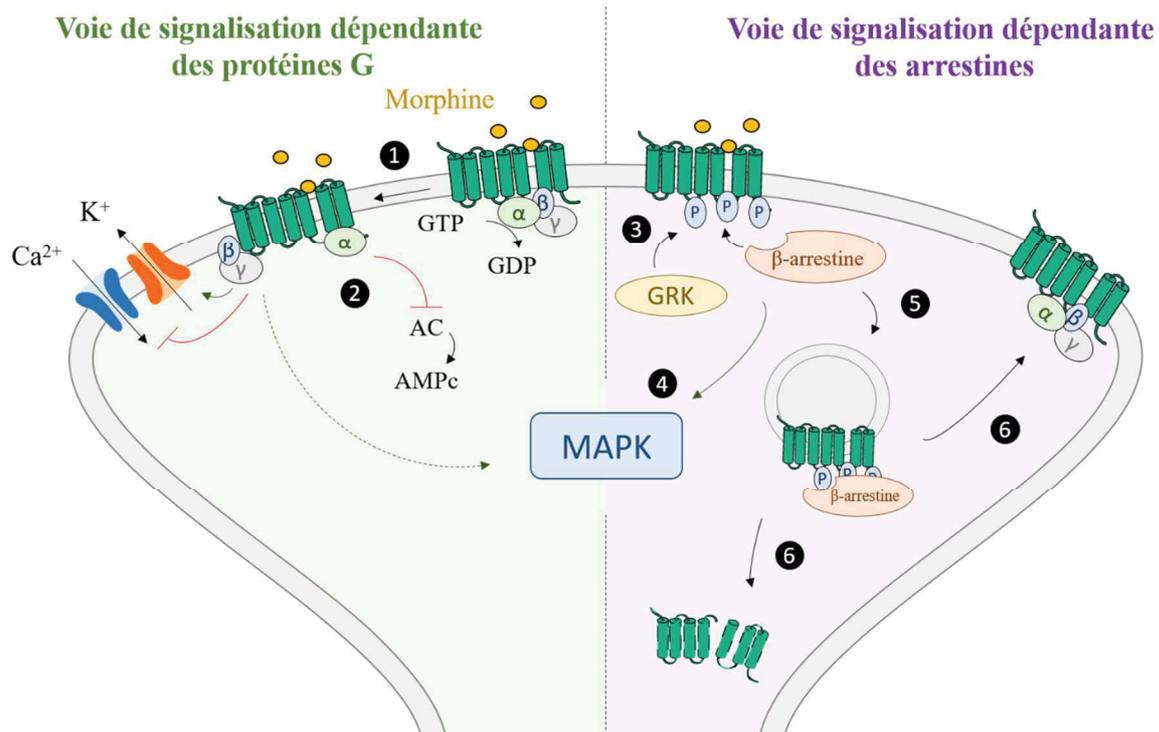


Figure 9 : Signalisation des récepteurs opioïdes

(1) Un agoniste se lie au récepteur opioïde entraînant un changement de conformation qui favorise l'échange d'un GDP pour un GTP au sein du domaine GTPase de la sous-unité G_{α} . (2) Cet échange induit la dissociation des sous-unités G_{α} et $G_{\beta\gamma}$. La sous-unité G_{α} inhibe alors l'AC responsable de la production d'AMPc. La sous-unité $G_{\beta\gamma}$ inhibe les canaux calciques voltage dépendant et favorise l'efflux d'ions K^{+} par l'activation des canaux potassiques rectifiants entrants. (3) Lors de l'activation du récepteur, des GRK sont recrutées et phosphorylent le récepteur, induisant le recrutement d'une β -arrestine au niveau du récepteur. Cette arrestine a pour but d'empêcher le couplage du récepteur avec la protéine G et bloque ainsi la signalisation. (4) Il existe une voie de signalisation alternative dépendante des arrestines qui est responsable d'effets qui dépendent principalement de la voie des MAPK. Il semble également que la voie dépendante de la protéine G participe à l'activation de la voie des MAPK, de la PKC et de la PKA. (5) L'arrestine promeut l'internalisation dépendante des clathrines du récepteur qui (6) est soit recyclé à la membrane, soit dégradé. **AC**, Adénylate cyclase ; **AMPc**, Adénosine monophosphate cyclique, **GDP**, Guanosine diphosphate ; **GRK**, kinase associée aux récepteurs couplés aux protéines G, **GTP**, Guanosine triphosphate ; **MAPK**, protéines kinases activité par le facteur mitogène. **Adapté à partir de Williams, 2013.**

On retrouve le MOR, le DOR, le KOR et le NOP dans plusieurs régions cérébrales impliquées notamment dans la réponse au stress, dans la gestion de la douleur et dans la sécrétion neuroendocrine (Peluso et al., 1998; Przewlocki & Almeida, 2017). Chaque type de récepteur possède ses propres spécificités en termes de localisation et de densité. Par exemple, on trouve une densité forte de DOR, mais faible de MOR, au sein de la partie antérieure de l'amygdale basolatérale, alors que la densité de ces deux types de récepteurs est modérée au sein de la PAG ventrolatérale (vlPAG) (Erbs et al., 2015). Les récepteurs opioïdes sont également exprimés en périphérie, notamment par certaines cellules du système immunitaire, pour y réguler l'inflammation (Chuang et al., 1994; L. F. Chuang et al., 1995; Peluso et al., 1998; Sedqi, Roy, Ramakrishnan, Elde, & Loh, 1995). Un niveau de complexité est ajouté par le fait que les récepteurs opioïdes peuvent former des hétéromères. L'un des plus étudiés est l'hétéromère MOR-DOR. En effet, des études ont démontré la colocalisation des MOR et des DOR ainsi que des interactions physiques entre ces récepteurs notamment dans des neurones du noyau accumbens. L'activation de ces hétéromères induit des effets semblables à certains anxiolytiques et antidépresseurs (Erbs et al., 2015; Kabli, Nguyen, Balboni, O'Dowd, & George, 2014). Il existe également d'autres hétéromères qui n'impliquent pas forcément l'interaction entre deux récepteurs opioïdes. Par exemple, il existe des hétéromères MOR-récepteur dopaminergique D₁ impliqués dans l'hyperlocomotion induite par les opioïdes (Derouiche & Massotte, 2019).

En conditions physiologiques, le MOR, le DOR et le KOR participent à la survie de l'organisme en régulant notamment les phénomènes de récompense et d'aversion vis-à-vis des stimuli environnementaux, la réponse au stress et aux situations qui présentent un danger potentiel (via leur action sur la douleur), ainsi que l'humeur (Darcq & Kieffer, 2018). L'activation des trois types de récepteurs produit une analgésie variable, et chacun d'entre eux est impliqué dans des fonctions spécifiques (Zjawiony et al., 2019). L'activation du MOR induit une forte analgésie, une euphorie et une sensation de plaisir, alors que les agonistes du KOR produisent une analgésie, mais aussi une dysphorie et une anhédonie. Par conséquent, l'équilibre entre l'activité de ces deux récepteurs permet de moduler le tonus hédonique. L'humeur est modulée par la balance entre l'activation du DOR, qui produit un effet anxiolytique et antidépresseur, et celle du KOR qui promeut le stress et les émotions négatives (**Figure 10**) (Valentino & Volkow, 2018). Le NOP participe également aux fonctions de survie de l'organisme. Cependant, il semble posséder des effets « anti-opioïdiques » par sa capacité

à inhiber l'analgésie supraspinale induite par les agonistes des autres récepteurs opioïdes (Donica, Awwad, Thakker, & Standifer, 2013).

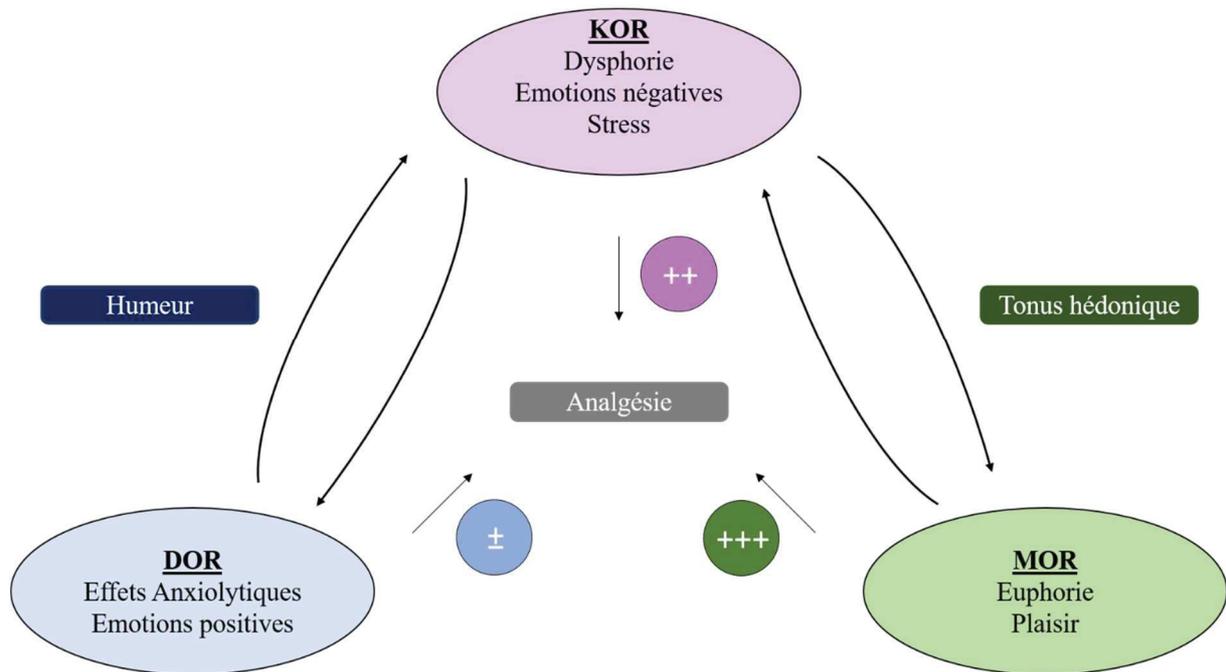


Figure 10 : Effets médiés par l'activation des récepteurs opioïdes

Les expériences de pharmacologie et l'utilisation de modèles animaux génétiquement modifiés ont mis en évidence certaines fonctions des récepteurs opioïdes. L'activation de chacun des trois types de récepteurs opioïdes produit une analgésie variable et chacun d'entre eux est impliqué dans des fonctions physiologiques spécifiques comme l'humeur et la régulation du tonus hédonique. **DOR**, récepteur opioïde δ ; **KOR**, récepteur opioïde κ ; **MOR**, récepteur opioïde μ . **Adapté à partir de Darcq, 2018.**

Les ligands exogènes

Le système opioïde est la cible d'un grand nombre de molécules exogènes utilisées en clinique dans le traitement de la douleur (**Figure 11**). Leurs effets sont principalement médiés par leurs actions sur les récepteurs opioïdes localisés dans le SNC. La morphine, par exemple, est utilisée en clinique car elle produit une analgésie très forte principalement via son interaction avec les MOR du SNC. Ses autres actions sur le système opioïdérique central sont à l'origine d'effets secondaires non désirés tel que constipation, nausées, vomissements, tolérance et addiction. Actuellement, le principal challenge de la pharmacologie des opioïdes est de développer un analgésique aussi puissant que la morphine présentant une faible toxicité et moins d'effets secondaires (Madariaga-Mazon et al., 2017).

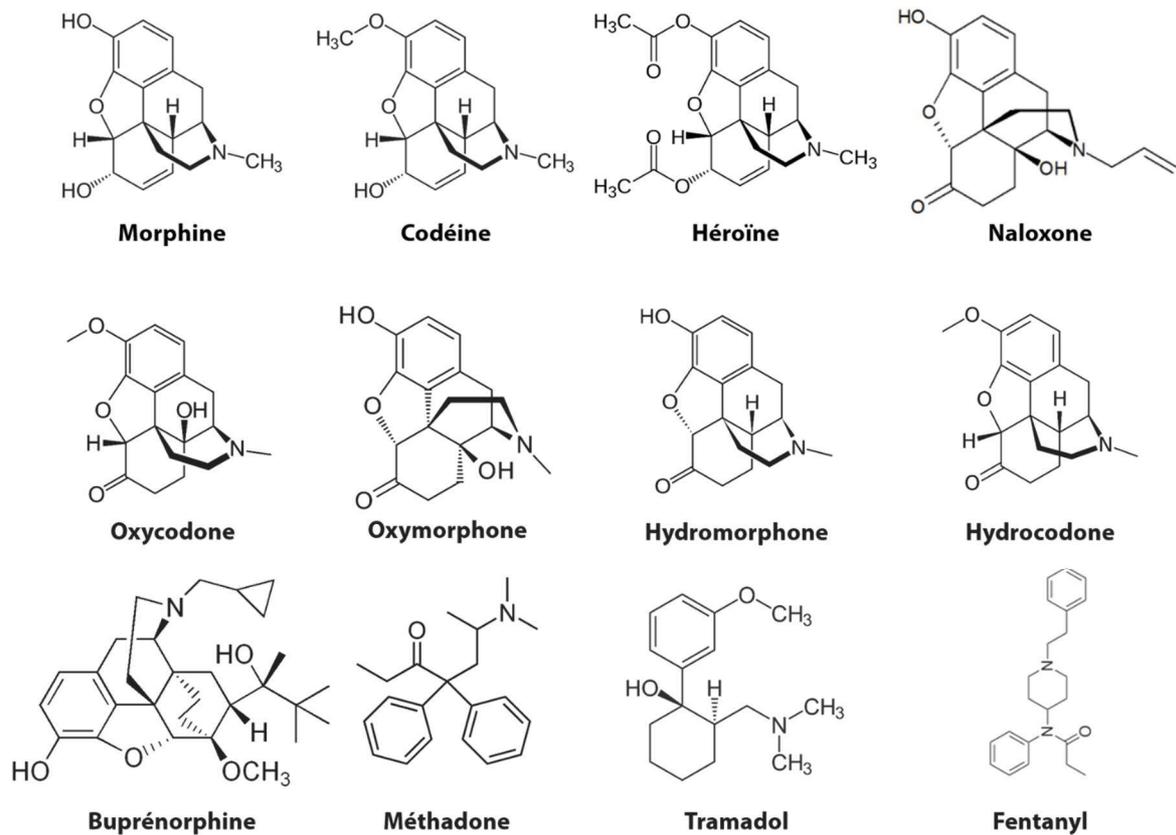


Figure 11 : Structures chimiques de différents opioïdes exogènes

La structure de la plupart des opioïdes exogènes utilisés repose sur celle de la morphine. Certains sont présents dans la nature, tels que la codéine, d'autres sont semi-synthétiques comme l'oxymorphone, ou synthétiques comme le fentanyl. À l'exception de l'héroïne, tous ces opioïdes exogènes sont utilisés pour traiter la douleur. On peut noter que la naloxone est un antagoniste des récepteurs opioïdes qui est utilisée pour bloquer leurs effets, notamment la dépression respiratoire, induite lors d'une overdose.

La morphine possède une forte affinité pour le MOR, ainsi que des affinités plus faibles pour le DOR et le KOR (**Tableau 1**). À partir de ces évidences, des agonistes spécifiques d'un type de récepteurs ont été développés dans l'idée d'aboutir à une molécule capable de produire une forte analgésie, sans les effets secondaires associés. Néanmoins, les différentes études de comportements chez l'animal ont mis en évidence que l'activation des MOR provoque des effets sur le système hédonique pouvant conduire à l'initiation de l'addiction (Darcq & Kieffer, 2018). Les DOR ont un effet modeste sur l'analgésie aiguë et peuvent induire des convulsions (Pradhan, Befort, Nozaki, Gaveriaux-Ruff, & Kieffer, 2011). Les KOR, quant à eux, provoquent dysphorie, sédation et anhédonie (Bruchas & Roth, 2016). Des ligands mixtes capables d'agir

à la fois sur plusieurs récepteurs du système opioïdérique ont été développés. Certains sont des agonistes de plusieurs récepteurs opioïdes, d'autres sont agonistes pour les uns, et antagonistes pour les autres (Madariaga-Mazon et al., 2017).

	<i>MOR (nM)</i>	<i>DOR (nM)</i>	<i>KOR (nM)</i>
Morphine	4,19 (2,03–11,1)	250 (177–346)	40,4 (23,7–70,9)
Fentanyl	7,96 (6,19–10,3)	539 (300–987)	202 (128–349)
Codéine	350 ± 111	7200 ± 2500	8000 ± 2500
Buprénorphine	0,903 (0,71–1,21)	1,51 (0,975–2,35)	1,29 (0,980–2,09)

Tableau 1 : Affinité de 4 ligands exogènes pour le MOR, le DOR et le KOR

Les constantes d'affinité (K_i) sont exprimées en nM. Les données de la morphine, du fentanyl et de la buprénorphine ont été extraites de Obeng, 2021 et celles de la codéine, de Migant, 1994 (Mignat, Wille, & Ziegler, 1995; Obeng et al., 2021).

Le concept d'agonisme biaisé propose qu'un agoniste donné induit un changement de conformation de son récepteur qui lui est propre et peut résulter en une activation différentielle des voies de signalisation associées à ce récepteur (J. D. Urban et al., 2007). Dans le contexte des récepteurs opioïdes, ce concept propose que les effets analgésiques et les effets secondaires de la morphine ne seraient pas forcément médiés par les mêmes voies de signalisation (**Figure 12**). Par exemple, Rivero et collaborateurs ont calculé un facteur de biais pour caractériser la tendance d'un agoniste du MOR à activer la voie de signalisation dépendante des protéines G, par rapport à celle dépendante des arrestines (Rivero et al., 2012). Ce concept d'agonisme biaisé se retrouve ainsi également dans la capacité d'un agoniste à désensibiliser et induire l'internalisation du MOR. La morphine, par exemple, n'induit pas, ou très peu, l'internalisation du MOR car elle recrute assez faiblement la GRK2 et la GRK3, contrairement à la Métrénképhaline (Arttamangkul et al., 2008; Moller et al., 2020). De plus, la morphine recrute sélectivement la β -arrestine-2 alors que d'autres agonistes recrutent également la β -arrestine-1 (Groer, Schmid, Jaeger, & Bohn, 2011).

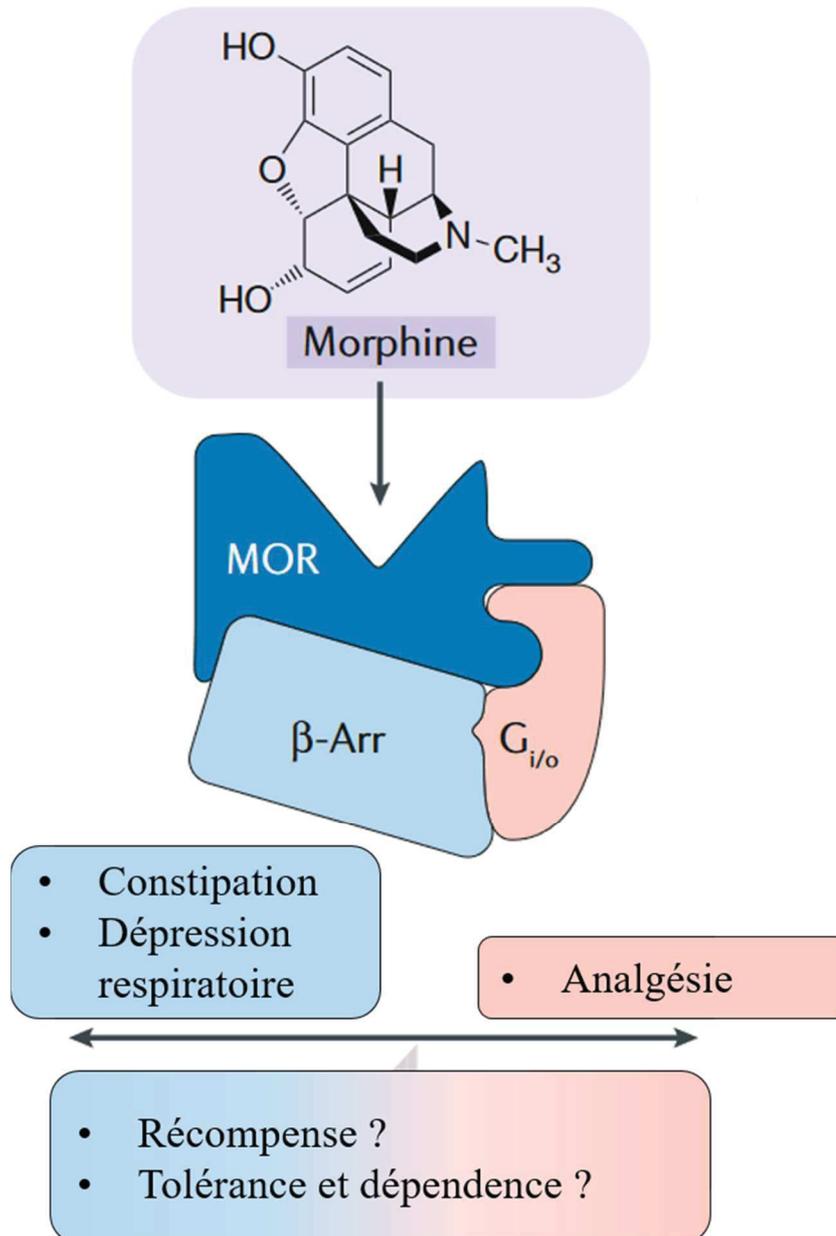


Figure 12 : Concept d'agonisme biaisé avec la morphine et le MOR

La liaison de la morphine aux MOR induit des cascades de signalisation qui dépendent des protéines G ou des β -arrestines. Ces deux voies ne produisent pas forcément les mêmes effets physiologiques. L'une semble être responsable des effets analgésiques de la morphine, et l'autre, provoquer certains effets secondaires. En fonction de l'agoniste utilisé, il est possible de stimuler préférentiellement une des deux voies. β -Arr, β -arrestine ; MOR, récepteur opioïde μ . Adapté à partir de Darcq, 2018.

L'ensemble de ces évidences ont permis de développer de nouveaux agonistes biaisés ou modulateurs allostériques positifs, qui présentent tous des avantages thérapeutiques. Cependant, l'usage de ces agonistes se retrouve souvent limité chez l'humain, chez qui leur profil thérapeutique n'est plus adapté. De ce fait, la recherche pharmaceutique reste toujours en quête de la découverte d'un analgésique aussi puissant et plus sûr que la morphine.

Effet analgésique de la morphine

L'effet analgésique de la morphine est principalement dépendant des MOR. En effet, dans un modèle murin modifié génétiquement pour ne pas exprimer le MOR, l'injection de morphine ne produit pas d'effet analgésique, témoignant du rôle de ce récepteur dans ce processus (Matthes et al., 1996). Ces récepteurs sont exprimés dans l'ensemble des régions cérébrales impliquées dans la gestion de la douleur et leur activation induit l'hyperpolarisation des neurones qui les expriment.

Effets périphériques

En périphérie, les MOR sont exprimés par les terminaisons périphériques des nocicepteurs et par leurs corps cellulaires situés dans les DRG (Antonijevic, Mousa, Schafer, & Stein, 1995; Bardoni et al., 2014; Hervera, Negrete, Leanez, Martin-Campos, & Pol, 2011; Y. Zhu, Hsu, & Pintar, 1998). Plusieurs études suggèrent l'implication de ces récepteurs périphériques dans l'analgésie à la morphine (**Figure 13**). Par exemple, chez la souris soumise au test à la formaline (*i.e.* dans lequel une inflammation se met en place) (Tjolsen, Berge, Hunskaar, Rosland, & Hole, 1992), l'injection systémique de N-méthylmorphine, une forme de morphine qui ne passe pas la barrière hémato-encéphalique (BHE), possède un effet antinociceptif (Tjolsen et al., 1992). Cet effet, contrairement à l'effet observé suite à l'injection de cette molécule par voie intracérébroventriculaire (*i.c.v.*), est contrecarré par celle de N-méthylnaloxone, une forme de naloxone qui ne passe pas la BHE. Cette étude suggère l'implication des récepteurs opioïdes périphériques dans l'effet antinociceptif de la N-méthylmorphine (Oluyomi, Hart, & Smith, 1992). Un effet comparable dans le test à la formaline chez le rat a été observé avec le loperamide, un agoniste des MOR qui ne passe pas la BHE et qui est principalement utilisé pour son action antidiarrhéique (DeHaven-Hudkins et al., 1999).

Cependant, l'implication des récepteurs opioïdes périphériques, et plus particulièrement, du MOR périphérique dans l'analgésie morphinique, est discutée par plusieurs points. D'une part, l'absence d'effets antinociceptifs après injection systémique de ces agents qui ne passe pas la BHE (*i.e.* Loperamide et N-méthyl-morphine) chez l'animal naïf suggère que l'analgésie produite par la morphine dépend des récepteurs opioïdes centraux (Foster, Jenden, & Lomax, 1967; Hurwitz, Sztern, Looney, & Ben-Zvi, 1994; T. W. Smith, Buchan, Parsons, & Wilkinson, 1982). D'autre part, des études plus récentes utilisant des modèles animaux génétiquement modifiés, dont l'expression du MOR est conservé dans le SNC mais pas dans les DRG, ont montré que l'analgésie morphinique est comparable en présence et en absence des MOR périphériques chez l'animal naïf (Corder et al., 2017; Weibel et al., 2013). Weibel et collaborateurs ont tout de même observé une diminution de l'analgésie induite par la morphine dans un modèle d'injection de l'adjuvant complet de Freund (CFA) chez les souris qui n'expriment pas les MOR périphériques. En résumé, les récepteurs opioïdes périphériques ne semblent pas avoir une implication majeure dans l'analgésie morphinique après injection de morphine chez l'animal naïf. Néanmoins, en conditions d'inflammation, les MOR périphériques seraient recrutés et participeraient à l'analgésie après injection de morphine.

Effets dans la moelle épinière

Au sein de la corne dorsale de la moelle épinière, les MOR sont exprimés au niveau pré-synaptique par les terminaisons centrales des nocicepteurs et au niveau post-synaptique par les neurones de second ordre (**Figure 13**) (Aicher, Punnoose, & Goldberg, 2000; Aicher, Sharma, Cheng, Liu-Chen, & Pickel, 2000; Moriwaki et al., 1996; D. Wang et al., 2018). Ils se situent majoritairement au sein des laminae superficielles, principalement les laminae I et II, innervées par les afférences primaires nociceptives (Aicher, Punnoose, et al., 2000; Erbs et al., 2015; Scherrer et al., 2009). Dans ces laminae, les MORs sont exprimés par des interneurons excitateurs et des neurones de projection (Kemp, Spike, Watt, & Todd, 1996; D. Wang et al., 2018). L'activation de ces MOR a un effet inhibiteur sur la transmission excitatrice dans ces laminae (Budai & Fields, 1998; Glaum, Miller, & Hammond, 1994; Hori, Endo, & Takahashi, 1992; Jeftinija, 1988; Kohno, Kumamoto, Higashi, Shimoji, & Yoshimura, 1999; Schneider, Eckert, & Light, 1998). En effet, l'application d'agonistes des MOR provoque à la fois une réduction de l'activité des afférences excitatrices glutamatergiques via un mécanisme d'action pré-synaptique et une inhibition des neurones de la corne dorsale via un mécanisme d'action post-synaptique (Kohno et al., 1999; Schneider et al., 1998). En 2005, Chen et collaborateurs

ont réalisé des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* des neurones de projection de la corne dorsale de la moelle épinière de rat. Ils ont montré que l'injection systémique de morphine, à des doses induisant une analgésie, inhibe ces neurones par le biais de l'activation directe des MOR, et ce, indépendamment des contrôles descendants (Y. P. Chen, Chen, & Pan, 2005). Par ailleurs, lorsqu'elle est injectée directement par voie intrathécale (i.t.), le puissant effet antinociceptif de la morphine est atténué si elle est coadministrée avec de la β -funaltrexamine (β -FNA ; un antagoniste spécifique des MOR) (Mjanger & Yaksh, 1991; J. K. Wang, Nauss, & Thomas, 1979). Des résultats similaires ont été obtenus dans des études de coadministration avec la naloxone et le peptide D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂ (CTAP), deux antagonistes qui bloquent l'activation des MOR (S. R. Chen & Pan, 2006). Enfin, la lésion spécifique des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière exprimant les MOR diminue l'effet antinociceptif de la morphine (Kline & Wiley, 2008). L'ensemble de ces résultats suggère l'implication des MOR spinaux dans l'analgésie morphinique.

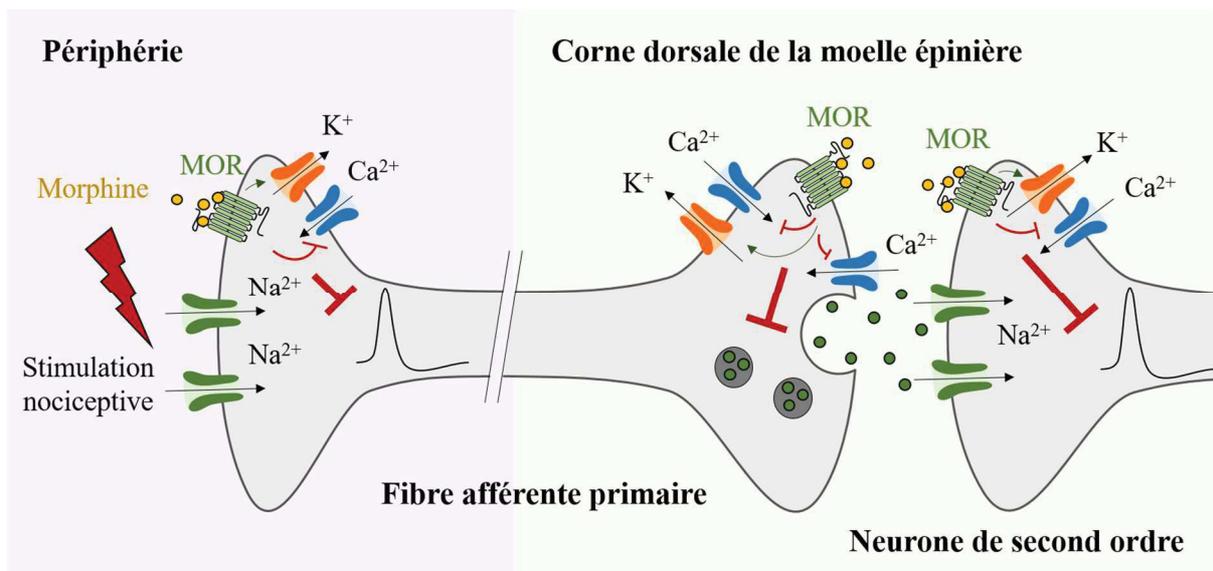


Figure 13 : Effets de la morphine sur les MOR périphériques et spinaux

L'activation des MOR périphériques et spinaux par des agonistes tels que la morphine, participe à l'analgésie en diminuant l'excitabilité des fibres afférentes primaires et des neurones de second ordre. Dans la corne dorsale de la moelle épinière, leur activation présynaptique inhibe la libération vésiculaire dépendante du calcium. **MOR**, récepteur opioïde μ . **Adapté à partir de Corder, 2017.**

Effets dans le système PAG-RVM des contrôles descendants

C'est au sein des structures impliquées dans les contrôles descendants de la douleur, telles que la PAG et la RVM, que l'analgésie morphinique est la mieux caractérisée. En 1971, les études électrophysiologiques de Satoh *et* Takagi montrent que l'effet analgésique de la morphine est médié par sa capacité à activer les contrôles descendants de la douleur (Sato & Takagi, 1971). L'injection de morphine dans la PAG induit un effet analgésique robuste avec des doses largement inférieures à celles nécessaires pour évoquer un effet antinociceptif par voie systémique (Sharpe, Garnett, & Cicero, 1974; Tsou & Jang, 1964). Sur une centaine de régions testées, c'est lors de l'injection dans la vlPAG que l'effet antinociceptif évoqué par la morphine est le plus fort, effet aboli par l'administration de naloxone suggérant une action médiée par les récepteurs opioïdes (Yaksh, Yeung, & Rudy, 1976). Par la suite, le rôle de la RVM dans l'effet antinociceptif de la morphine, initié dans la PAG, est démontré (Beitz, Mullett, & Weiner, 1983; Budai & Fields, 1998; Morton, Duggan, & Zhao, 1984; M. O. Urban & Smith, 1994; Watkins, Young, Kinscheck, & Mayer, 1983). En effet, l'inhibition des neurones de la RVM abolit l'analgésie à la morphine après injection dans la PAG (M. O. Urban & Smith, 1994). D'un point de vue cellulaire, les MOR sont exprimés dans la PAG et dans la RVM (Erbs *et al.*, 2015). L'implication de ces récepteurs exprimés dans la RVM dans les effets de la morphine médiés par la PAG a été prouvée (Kiefel, Rossi, & Bodnar, 1993). L'activation des MOR dans la PAG et dans la RVM induit l'inhibition ou la désinhibition de différentes sous-populations de neurones (Chieng & Christie, 1994; Connor, Borgland, & Christie, 1999; Pan, Williams, & Osborne, 1990; Vaughan & Christie, 1997; Vaughan, Ingram, Connor, & Christie, 1997).

À partir de l'ensemble des études réalisées sur la PAG et la RVM, un modèle neuroanatomique pour expliquer l'origine de l'effet analgésique de la morphine a émergé et stipule que, en absence d'activation des MOR, des interneurones libérant l'acide γ -aminobutyrique (GABA) sont actifs et inhibent les neurones de projections de la PAG qui innervent la RVM. En présence de morphine, ou d'un autre agoniste des MOR, les interneurones sont inhibés ce qui provoque la diminution du tonus GABAergique et la levée de l'inhibition des neurones de projection glutamatergique de la PAG (**Figure 14**) (Depaulis, Morgan, & Liebeskind, 1987; Lueptow, Fakira, & Bobeck, 2018; Moreau & Fields, 1986; P. B. Osborne, Vaughan, Wilson, & Christie, 1996; Vaughan & Christie, 1997; Vaughan *et al.*, 1997). Au sein de la RVM, il existe des cellules ON qui montrent une augmentation de leur activité lors d'un réflexe nociceptif et leur activation facilite la nociception. Il existe également

des cellules OFF qui fonctionnent en tandem avec les cellules ON. Leur activité est arrêtée lors d'un réflexe nociceptif et leur activation inhibe la nociception. La désinhibition des sorties glutamatergiques de la PAG induite par la morphine permet l'inhibition des cellules ON et la désinhibition des cellules OFF, ce qui induit une analgésie prononcée (H. Fields, 2004; Lau & Vaughan, 2014; Samineni et al., 2017). Ce modèle est soutenu par le fait que l'injection de naloxone, après une injection de morphine, produit l'effet opposé. L'activité des cellules ON augmente et celle des cellules OFF diminue, résultant en une diminution de l'effet analgésique de la morphine, voir l'apparition d'une hyperalgésie (Bederson, Fields, & Barbaro, 1990). Toutefois, il existe également des sorties GABAergiques de la PAG qui semblent être à l'origine d'un contrôle facilitateur de la nociception (Samineni et al., 2017). De plus, des études suggèrent que les MOR sont également exprimés sur certaines sous-populations de neurones de projection de la PAG, ainsi que par une proportion significative de neurones glutamatergiques de la PAG (Commons, Aicher, Kow, & Pfaff, 2000; X. Y. Zhang et al., 2020). Il est donc probable que ce modèle de désinhibition ne reflète que partiellement les mécanismes d'antinociception induits par l'action de la morphine dans la PAG.

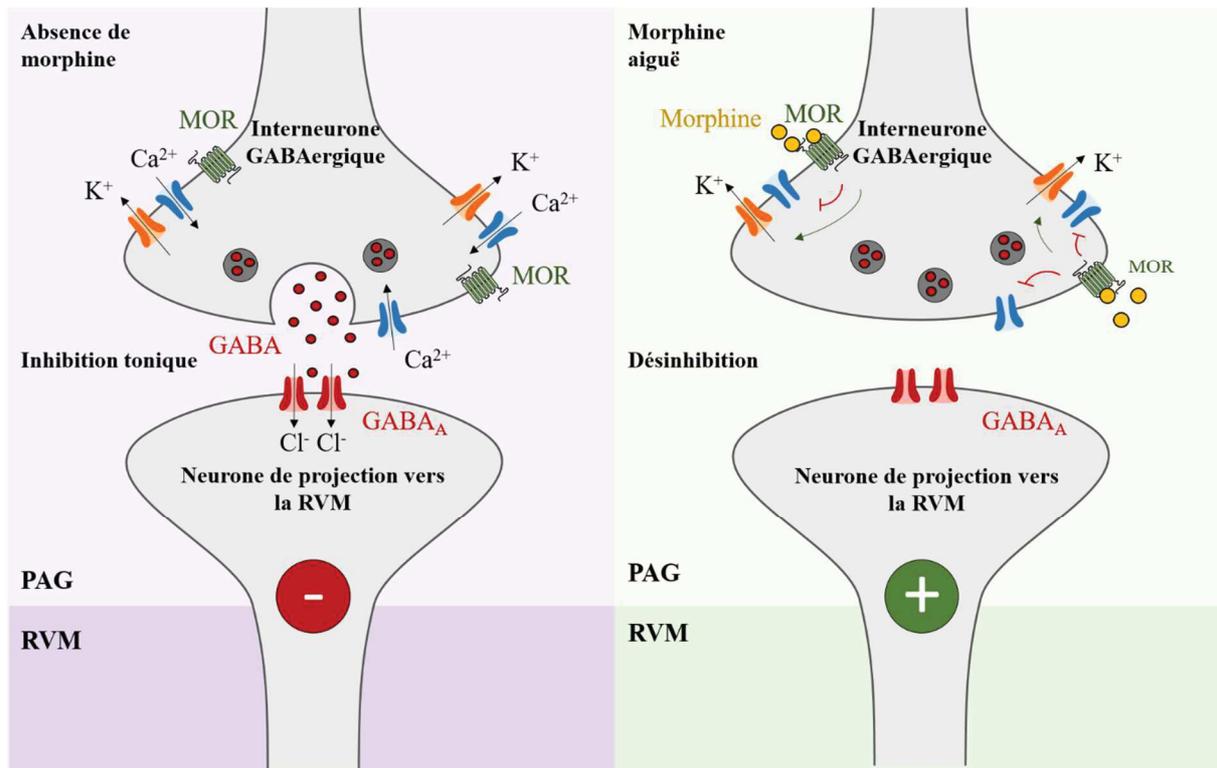


Figure 14 : Modèle de la désinhibition du tonus GABAergique induite par la morphine dans la PAG produisant une forte analgésie

En absence de morphine, les neurones de projection de la PAG qui innervent la RVM sont inhibés. Cette inhibition est liée à l'activité tonique des interneurons GABAergiques inhibiteurs. Lorsque la morphine se lie aux MOR exprimés par les interneurons GABAergiques de la PAG, leur activité est inhibée ce qui induit la levée de l'inhibition des neurones de projections et une forte analgésie. **GABA**, acide γ -aminobutyrique ; **GABA_A**, récepteur à l'acide γ -aminobutyrique ; **MOR**, récepteur opioïde μ ; **PAG**, substance grise périaqueducatale ; **RVM**, formation réticulée rostral ventromédiane. **Adapté à partir de Lueptow, 2018.**

Effets dans l'amygdale

Bien que l'analgésie à la morphine soit principalement caractérisée au sein du système PAG-RVM, d'autres structures supra-spinales impliquées dans la douleur participent également à l'analgésie morphinique. L'amygdale, structure impliquée dans la composante émotionnelle de la douleur, est en contact direct avec la PAG et participe à la modulation de la nociception en conditions physiologiques, notamment lors de l'analgésie provoquée par une situation stressante (Helmstetter & Bellgowan, 1993; Watkins, Wiertelak, & Maier, 1993). Plusieurs

études ont démontré, par le biais de micro-injections de morphine dans les différents noyaux de l'amygdale, l'implication de cette structure dans l'analgésie morphinique chez le rongeur (Helmstetter, Bellgowan, & Poore, 1995; Helmstetter, Bellgowan, & Tershner, 1993; Manning & Mayer, 1995; McGaraughty, Farr, & Heinricher, 2004; McGaraughty & Heinricher, 2002; Pavlovic & Bodnar, 1998; Sabetkasaei, Masoudnia, Khansefid, & Behzadi, 2007; Shin & Helmstetter, 2005; Tershner & Helmstetter, 2000). Des évidences suggèrent que l'effet antinociceptif obtenu lors de la stimulation des MOR dans l'amygdale est médié par l'activation des MOR de la PAG (Shin & Helmstetter, 2005; Tershner & Helmstetter, 2000). Cet effet dépend de la connectivité de l'amygdale avec le système PAG-RVM, indiquant que l'amygdale fait partie intégrante des contrôles descendants de la douleur (McGaraughty et al., 2004).

D'autres structures supra-spinales ont été impliquées dans l'analgésie à la morphine, telles que l'hypothalamus latéral (Dafny et al., 1996) et le noyau parabrachial (PBN) latéral (uniquement en conditions inflammatoires) (X. Y. Zhang et al., 2020). Le consensus actuel est de considérer que l'effet antinociceptif de la morphine provient majoritairement de son action au sein de la moelle épinière, du système PAG-RVM et, dans une certaine mesure, de l'amygdale.

Effets secondaires de la morphine

La prise de morphine provoque des effets secondaires qui varient en termes de sévérité et de fréquence. En France, la morphine est notamment commercialisée sous forme de comprimés à libération prolongée (Moscontin) qui peut induire des nausées et une constipation (plus de 1 patient sur 10), des confusions, des insomnies et des vomissements (entre 1 à 10 patients sur 100) et, moins fréquemment (entre 1 à 10 patients sur 1000), des vertiges, des hallucinations et une gêne respiratoire, voir des difficultés à respirer qui sont associées à une dépression respiratoire. De plus, un patient sous traitement chronique peut développer une dépendance à la morphine, accompagnée de l'apparition de la tolérance analgésiques et de l'addiction. Dans ce cas, à l'arrêt de la prise du traitement, un syndrome de sevrage important est observé et se caractérise par des tremblements, des diarrhées, des nausées, une forte irritabilité, des troubles de l'anxiété et la dépression. Le patient peut aussi, paradoxalement, développer une OIH qui s'oppose au traitement.

Lors de ma thèse, une attention particulière a été portée à la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine. C'est pourquoi les effets sur le système respiratoire et le système gastro-entérique ne seront pas abordés et l'addiction et l'OIH ne seront pas détaillées.

Effets sur le système immunitaire

De nombreuses évidences suggérant que la morphine possède un effet immunosuppresseur sur les cellules immunitaires via son action sur les MOR ont été publiées (Eisenstein, 2019). D'une part, les cellules immunitaires expriment les récepteurs opioïdes (Bidlack, 2000; T. K. Chuang et al., 1995; Gaveriaux, Peluso, Simonin, Laforet, & Kieffer, 1995). D'autre part, l'administration de morphine chez la souris inhibe l'activité des lymphocytes cytotoxiques naturels (NK) (Sacerdote, Manfredi, Mantegazza, & Panerai, 1997). Cet effet est aboli dans un modèle murin génétiquement modifié pour ne pas exprimer le MOR (Gaveriaux-Ruff, Matthes, Peluso, & Kieffer, 1998). La prolifération des lymphocytes B et la production d'anticorps sont réduites en présence de morphine *in vivo* et *in vitro* (Eisenstein, Meissler, Rogers, Geller, & Adler, 1995; Gaveriaux-Ruff et al., 1998; LeVier et al., 1994; Lockwood et al., 1994). De plus, l'application de morphine *in vitro* et son traitement chronique *in vivo* diminuent l'activité phagocytaire des macrophages qui est bloquée par la naltrexone, un antagoniste des récepteurs opioïdes (Rojavin et al., 1993). Pour finir, la production de cytokines par les macrophages et les lymphocytes T est aussi diminuée après application de morphine (Clark et al., 2007; Limiroli, Gaspani, Panerai, & Sacerdote, 2002; Roy et al., 1997), bien que ces effets semblent dépendre des doses utilisées (Roy, Cain, Chapin, Charboneau, & Barke, 1998). En résumé, de nombreuses études suggèrent que la morphine possède des effets immunosuppresseurs qui impliquent les récepteurs opioïdes.

De manière surprenante, au sein du SNC, des mécanismes différents sont décrits. En effet, plusieurs études proposent que les cellules gliales libèrent des cytokines proinflammatoires en réponse à la morphine. Ces cytokines proinflammatoires induisent une augmentation de l'excitabilité des neurones et, en particulier, des neurones du système nociceptif. Un concept émergent propose que la morphine induise une forte analgésie, mais aussi une neuroinflammation qui pourrait être responsable de l'apparition de la tolérance et de l'OIH suite à un traitement chronique avec de la morphine (Watkins, Hutchinson, Johnston, & Maier, 2005). Plusieurs évidences illustrent ce concept. D'une part, une activation gliale, concomitante à l'injection chronique de morphine, est observée et l'utilisation d'inhibiteurs gliaux potentialise l'antinociception observée après une injection aiguë et chronique de

morphine (Cui et al., 2006; Cui et al., 2008; Hutchinson et al., 2009; Raghavendra, Rutkowski, & DeLeo, 2002; Song & Zhao, 2001). D'autre part, l'antinociception observée après une injection aiguë et chronique i.t. ou sous-cutannée (s.c.) de morphine est amplifiée lorsque l'interleukine 1ra (IL-1ra), un antagoniste des récepteurs de l'interleukine-1 β (IL-1 β), est injecté (Hutchinson et al., 2008; Johnston et al., 2004). De plus, l'injection chronique i.t. et s.c. de morphine provoque une augmentation de cytokines proinflammatoires (IL-1 β , interleukine-6 (IL-6) et facteur de nécrose tumorale α (TNF α)) dans la moelle épinière et la tolérance développée est réduite en présence de leur antagonistes respectifs (Hutchinson et al., 2008; Johnston et al., 2004; Raghavendra et al., 2002; Shavit, Wolf, Goshen, Livshits, & Yirmiya, 2005).

Les récepteurs opioïdes semblent être exprimés par les cellules gliales du SNC, bien qu'il existe des données contrastées à ce sujet (Machelska & Celik, 2020; Maduna et al., 2018; Nam et al., 2018; Ruzicka & Akil, 1997). Une étude suggère que la libération d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF α par la microglie induite par la morphine est dépendante de l'activation de la PKC par le biais du MOR (Merighi et al., 2013). Néanmoins, l'utilisation d'un modèle génétiquement modifié n'exprimant ni le MOR, ni le DOR, ni le KOR a permis de proposer l'hypothèse d'un effet de la morphine qui n'est pas médié par le système opioïdergique. Malgré l'absence d'analgésie dans ce modèle, l'hyperalgésie à la morphine est toujours observée (Juni, Klein, Pintar, & Kest, 2007). L'injection i.t. de lipopolysaccharide (LPS), un agoniste des récepteurs toll-like (TRL), en particulier du TLR4, 60 min avant l'injection de morphine chez la souris induit une augmentation de l'activation gliale dans la moelle épinière et s'oppose à l'antinociception produite (H. E. Wu, Sun, Cheng, Terashvili, & Tseng, 2006). Ainsi, les effets proinflammatoires observés après l'injection aiguë et en condition de tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine pourraient être liés au TLR4 (L. Bai et al., 2014; Eidson, Inoue, Young, Tansey, & Murphy, 2017; Eidson & Murphy, 2013a; Ellis et al., 2016; Hutchinson et al., 2010; Liang, Chu, Jiang, & Yuan, 2016; H. Wang et al., 2021; H. Wang et al., 2020; X. Wang et al., 2012).

Tolérance analgésique

Chez l'humain, la tolérance aux effets analgésiques de la morphine correspond à la diminution de l'effet antinociceptif de la morphine au fur et à mesure des administrations lors d'un traitement chronique (**Figure 15**). Pour soulager le patient, il est alors nécessaire d'augmenter la dose de morphine pour produire le même niveau d'analgésie qui existait avec la dose précédente (Trescot et al., 2008). Cette tolérance entraîne ainsi l'escalade des doses de morphine et augmente dramatiquement les risques d'addiction et d'overdose. Elle limite, par conséquent, l'utilisation de la morphine dans le traitement de la douleur.

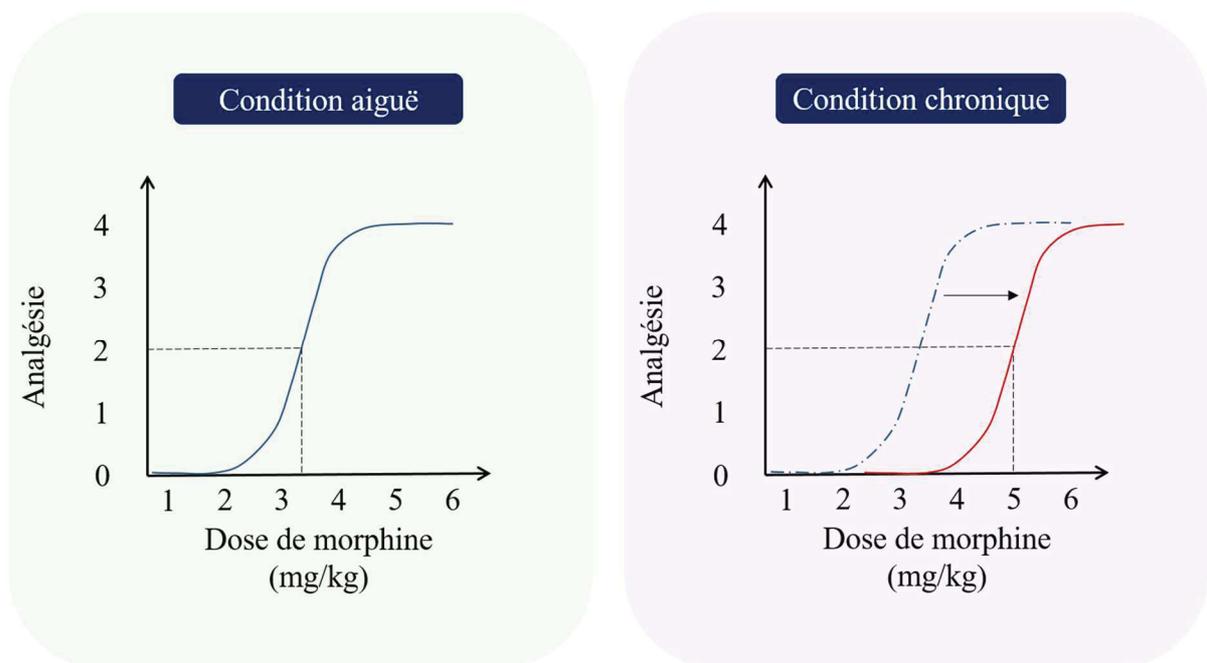


Figure 15 : La tolérance aux effets analgésiques de la morphine

Lors de l'administration chronique de morphine, la tolérance aux effets analgésiques correspond à la diminution progressive de l'effet analgésique observé pour une dose donnée. Pour atteindre le même degré d'analgésie, une dose plus importante est alors nécessaire. La tolérance provoque l'escalade des doses et augmente les risques d'addiction et d'overdose.

La tolérance aux effets antinociceptifs au niveau cellulaire

La tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine est un phénomène physiologique multifactoriel qui témoigne de l'adaptation de l'organisme à la prise répétée de morphine. De nombreuses études se sont concentrées sur l'étude du récepteur MOR dans la mise en place de cette tolérance. D'un point de vue cellulaire, la tolérance est définie comme une perte d'efficacité dans la signalisation des MOR qui est associée avec une réduction de l'activation des GIRK et une diminution du couplage avec les canaux calciques (Bagley, Chieng, Christie, & Connor, 2005; Christie, Williams, & North, 1987; Connor et al., 1999). La désensibilisation des récepteurs et la diminution de leur expression pourraient être responsables de cette tolérance cellulaire. Néanmoins, la littérature suggère que le traitement chronique de morphine ne modifie pas l'expression des MOR (Koch & Hollt, 2008). C'est pourquoi de nombreuses études se sont concentrées sur la désensibilisation de ces récepteurs. Ces études ont décrit plusieurs mécanismes (**Figure 16**) (Christie, 2008; Williams et al., 2013).

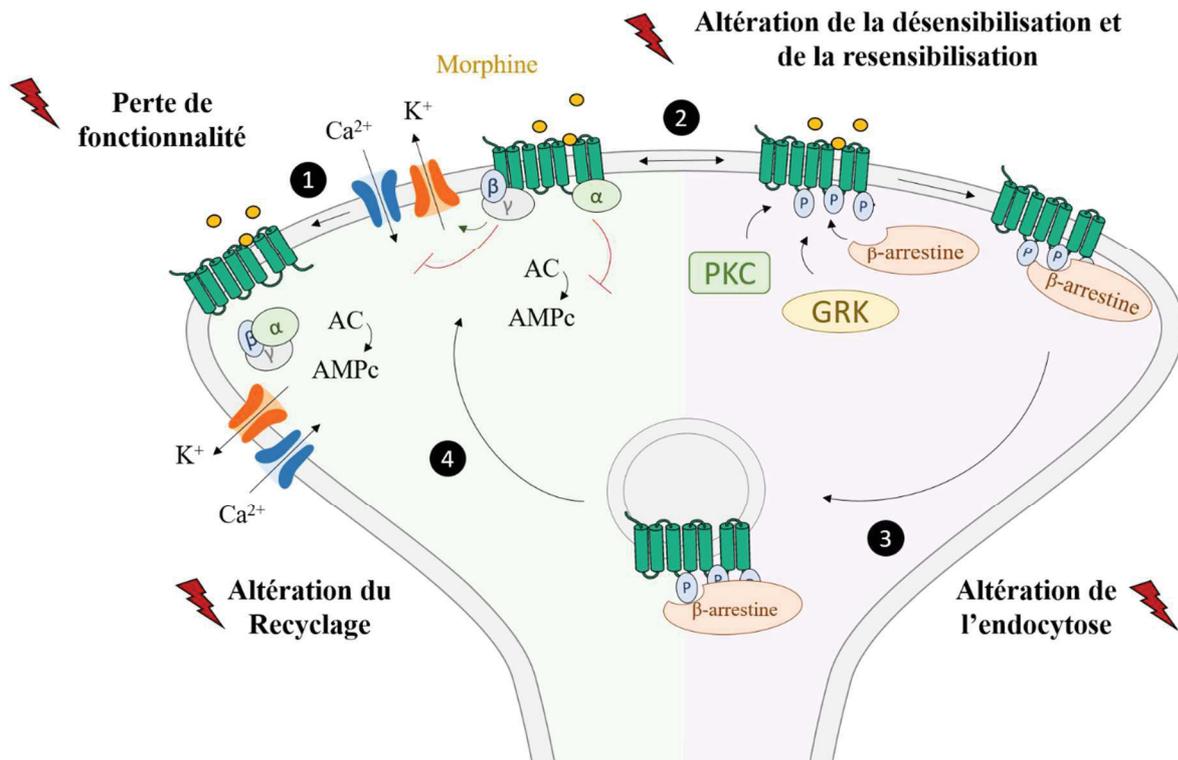


Figure 16 : Adaptations possibles du MOR suite à l'administration chronique de morphine

Plusieurs mécanismes pouvant participer à la mise en place de la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine ont été décrits. **(1)** Certaines études suggèrent que la perte de fonctionnalité des MOR participe à la mise en place de la tolérance. **(2)** Une altération de l'équilibre entre la désensibilisation et la resensibilisation des MOR a également été décrite. Certaines évidences suggèrent l'implication des GRK et des arrestines dans cette altération. De plus, l'activité persistante de certaines kinases, telles que la PKC, a également été suggérée comme un mécanisme important dans l'apparition de la tolérance. **(3)** L'augmentation de l'endocytose pourrait participer à la tolérance, bien que certaines évidences suggèrent que ce phénomène ne se produit pas. **(4)** Enfin, l'accumulation des MOR dans la partie intracellulaire, à cause d'un défaut de recyclage à la membrane plasmique, pourrait participer à la mise en place de la tolérance cellulaire. **AC**, adénylate cyclase ; **AMPc**, adénosine monophosphate cyclique ; **GRK**, kinase associée aux récepteurs couplés aux protéines G ; **PKC**, protéine kinase C. Adapté à partir de Williams, 2013.

Par exemple, après un traitement chronique à la morphine, la désensibilisation des MOR est augmentée dans la PAG et le locus coeruleus (LC), bien que la morphine n'induit pas, ou peu, l'internalisation du MOR en condition aiguë (Dang & Williams, 2005; Ingram, Macey, Fossum, & Morgan, 2008). Cette désensibilisation semble être liée à un défaut du recyclage des MOR impliquant la β -arrestin-2 à la membrane plasmique plutôt qu'à une augmentation de leur endocytose (Quillinan, Lau, Virk, von Zastrow, & Williams, 2011). La β -arrestin-2 est un élément central dans le développement de la tolérance antinociceptive à la morphine. En effet, la tolérance est atténuée dans un modèle modifié génétiquement pour ne pas exprimer la β -arrestin-2 (Bohn, Gainetdinov, Lin, Lefkowitz, & Caron, 2000; Bohn, Lefkowitz, & Caron, 2002). De plus, le traitement chronique de morphine induit une déficience dans le couplage des MOR avec les canaux calciques et les GIRK qui n'est pas observée chez les animaux modifiés génétiquement pour ne pas exprimer la β -arrestin-2 (Connor, Bagley, Chieng, & Christie, 2015; Dang, Chieng, Azriel, & Christie, 2011). À partir de ces études, il a été proposé que la régulation des MOR par la β -arrestin-2 soit augmentée suite à un traitement chronique de morphine. Cette augmentation serait responsable de l'altération de l'équilibre entre les MOR actifs et les MOR désensibilisés à la membrane plasmique et, par conséquent, du développement de la tolérance cellulaire (Williams et al., 2013). L'augmentation de l'activité de la β -arrestin-2, qui favorise la désensibilisation des MOR, pourrait être liée à l'activité de la GRK2 (Whistler & von Zastrow, 1998). D'autres mécanismes semblent être également impliqués dans l'augmentation de la désensibilisation des MORs après un traitement chronique à la morphine tels que l'augmentation de l'expression des RGS (Gold et al., 2003). Cependant, les évidences qui suggèrent que la morphine n'induit que très peu la désensibilisation et l'internalisation des MOR, ainsi que le recrutement des GRK2 et GRK3, alimentent une controverse autour de la désensibilisation de ces récepteurs suite au traitement chronique à la morphine (Arttamangkul et al., 2008; Blanchet & Luscher, 2002; Moller et al., 2020). De plus, l'augmentation artificielle de l'endocytose des MOR atténue la tolérance cellulaire (He, Fong, von Zastrow, & Whistler, 2002; Kim et al., 2008). Une des explications de ce mécanisme alternatif est que la morphine induit une signalisation persistante qui induit des adaptations dans l'activité des messagers secondaires aboutissant à la tolérance cellulaire. L'endocytose supprimerait alors cette signalisation persistante et les adaptations qui en résultent (Berger & Whistler, 2010).

Il existe d'autres mécanismes qui impliquent la fonctionnalité des MOR, et notamment l'adenylase cyclase et la voie des MAPK (Bobeck, Chen, Morgan, & Ingram, 2014; Christie, 2008). Un des éléments supplémentaires qui semble important dans la tolérance cellulaire réside

dans l'augmentation de l'activité de la PKC et de la protéine kinase A (PKA). L'administration d'inhibiteurs de la PKC ou de la PKA atténue la tolérance antinociceptive à la morphine (Bohn et al., 2002; Gabra et al., 2008; Hua et al., 2002; Javed, Dewey, Smith, & Smith, 2004; Morgan, Reid, & Saville, 2014; F. L. Smith, Lohmann, & Dewey, 1999). Par ailleurs, la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine est diminuée en l'absence de différents isoformes de PKC dans des modèles de souris génétiquement modifiées (Newton et al., 2007; Zeitz, Malmberg, Gilbert, & Basbaum, 2001). D'un point de vue cellulaire, la tolérance observée *in vitro*, après un traitement chronique à la morphine, est partiellement dépendante de la PKC (Bailey et al., 2009).

En résumé, il existe une pléthore de mécanismes cellulaires décrits, contradictoires ou non, pour expliquer la tolérance cellulaire aux effets de la morphine. Ces contradictions sont en partie expliquées par les différences dans les effets observés entre les études *in vitro* et *in vivo*, ainsi que par la divergence des mécanismes entre les différentes structures cérébrales (Williams et al., 2013).

La tolérance aux effets antinociceptifs au niveau anatomique

C'est au sein des structures cérébrales impliquées dans l'effet antinociceptif de la morphine que la tolérance analgésique se met en place, notamment au sein du système PAG-RVM des contrôles descendants (Eidson & Murphy, 2019). L'injection répétée de morphine dans la PAG, et plus particulièrement dans la vlPAG, est suffisante pour induire la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine (Jacquet & Lajtha, 1976; V. A. Lewis & Gebhart, 1977; Morgan, Fossum, Levine, & Ingram, 2006; Siuciak & Advokat, 1987; Tortorici, Robbins, & Morgan, 1999). De plus, le blocage de l'action de la morphine au sein de la vlPAG par la naltrexone, un antagoniste des récepteurs opioïdes, est suffisant pour atténuer le développement de la tolérance après injection systémique chronique de morphine (Lane, Patel, & Morgan, 2005). De manière surprenante, la RVM ne semble pas être directement impliquée dans la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine, du moins pas au même degré que la PAG (Campion, Saville, & Morgan, 2016; Lane et al., 2005; Morgan, Clayton, & Boyer-Quick, 2005). Dans la PAG, cette tolérance implique la désensibilisation des MOR, notamment ceux localisés au niveau pré-synaptique sur les neurones GABAergiques et au niveau post-synaptique sur les neurones contactés (Bagley et al., 2005; Bobeck et al., 2014; Chieng & Christie, 1996; Ingram et al., 2008). Ces résultats suggèrent que l'activation des MOR par la morphine est incapable d'inhiber pleinement l'activité tonique des neurones GABAergiques de

la PAG et par conséquent, participe à la tolérance. Pour appuyer ces évidences, l'activité des cellules ON et OFF de la RVM, après infusion continue de morphine dans la vIPAG, n'est plus modulée par l'administration de morphine suggérant que la morphine ne produit plus d'effets sur les sorties modulatrices de la PAG (Lane, Tortorici, & Morgan, 2004).

Bien que de nombreuses études pointent en direction de la PAG, une étude suggère que la tolérance à la morphine est liée à l'expression des MOR sur les nocicepteurs périphériques. En effet, la tolérance est abolie dans un modèle de souris génétiquement modifiées qui n'expriment pas le MOR dans certains nocicepteurs. L'action prolongée de la morphine sur ces MOR périphériques serait responsable de la mise en place d'une plasticité synaptique au sein de la corne dorsale de la moelle épinière, qui aboutirait au développement de la tolérance (Corder et al., 2017). La plasticité synaptique qui prend place dans le système de la douleur, et notamment, au sein de la corne dorsale de la moelle épinière, a en effet été impliquée dans la tolérance suite à l'administration d'un agoniste du MOR. Ces effets semblent dépendre des récepteurs *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA) et de l'augmentation de l'excitabilité des fibres afférentes primaires et des neurones de la corne dorsale responsable de la transmission nociceptive (W. G. Chu et al., 2020; Trujillo & Akil, 1991; Zeng, Thomson, Aicher, & Terman, 2006; Zhou, Chen, Chen, & Pan, 2010).

La tolérance aux effets antinociceptifs et la neuroinflammation

Plus récemment, l'implication de l'inflammation induite par les cellules gliales au sein du système de la douleur a été décrite (Eidson & Murphy, 2019). En effet, l'administration d'inhibiteurs des cellules gliales ou d'antagonistes de l'IL-1 β , l'IL-6 ou le TNF- α , trois cytokines proinflammatoires, atténue la tolérance antinociceptive observée après injection systémique répétée de morphine (Cui et al., 2008; Mika, Wawrzczak-Bargiela, Osikowicz, Makuch, & Przewlocka, 2009; Raghavendra et al., 2002; Raghavendra, Tanga, & DeLeo, 2004; Song & Zhao, 2001). De plus, l'injection i.t. chronique de morphine provoque l'augmentation de l'inflammation spinale, ce qui participe au développement de la tolérance (L. Bai et al., 2014; Hutchinson et al., 2008; Johnston et al., 2004). De manière similaire, une augmentation de l'activité gliale est observée dans la vIPAG et cette activation est concomitante avec le développement de la tolérance à la morphine (Eidson & Murphy, 2013b; Harada, Nakamoto, & Tokuyama, 2013). Le mécanisme par lequel l'administration chronique de morphine provoque cette activation gliale semble impliquer le TLR4 (L. Bai et al., 2014; Eidson et al., 2017; Eidson & Murphy, 2013a; P. M. Grace et al., 2014; Hutchinson et al., 2010; H. Wang et al., 2021; H.

Wang et al., 2020; X. Wang et al., 2012). En effet, le TLR4 est exprimé par les cellules gliales de la vIPAG et son activation, via des micro-injections d'agonistes tels que le LPS, est suffisante pour induire une tolérance à la morphine (Eidson & Murphy, 2013a). Un mécanisme similaire est observé dans la corne dorsale de la moelle épinière dans laquelle, l'absence d'expression du TLR4 dans un modèle modifié génétiquement, atténue la tolérance à la morphine (H. Wang et al., 2020). Les cytokines ainsi produites augmentent l'excitabilité neuronale par le biais de plusieurs mécanismes (Watkins et al., 2005). Néanmoins, ces évidences sont contestées par l'existence de données contradictoires qui indiquent que la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine n'est pas modifiée dans un autre modèle n'exprimant pas le TLR4 (Fukagawa, Koyama, Kakuyama, & Fukuda, 2013; Mattioli et al., 2014).

Ainsi, de nombreux mécanismes ont été décrits comme étant à l'origine de la tolérance analgésique. La désensibilisation des MOR et la plasticité synaptique au sein du système de la douleur, ainsi que la neuroinflammation, semblent participer à l'élaboration d'un phénomène multi-factoriel qui limite l'utilisation de la morphine en clinique.

Hyperalgésie induite par les opioïdes

L'OIH correspond à une augmentation de la sensibilité à la douleur après l'exposition chronique à un opioïde (**Figure 17**). Ainsi, le traitement qui est censé soulager la douleur du patient, crée paradoxalement un effet opposé, en générant une hypersensibilité aux stimuli douloureux. En clinique, la tolérance et l'OIH agissent en tandem et limitent fortement l'utilisation de la morphine, et des opioïdes plus généralement (Roeckel, Le Coz, Gaveriaux-Ruff, & Simonin, 2016). Bien que ces deux mécanismes partagent des composantes communes, ce sont deux phénomènes distincts qu'il est possible de dissocier (L. F. Chu, Angst, & Clark, 2008; Juni, Klein, & Kest, 2006). D'un point de vue mécanistique, l'OIH, au même titre que la tolérance, est un phénomène multifactoriel qui prend racine dans des composantes cellulaires, anatomiques et physiologiques. L'implication des MOR et de la neuroinflammation a par exemple été démontrée dans ce phénomène (Roeckel et al., 2016).

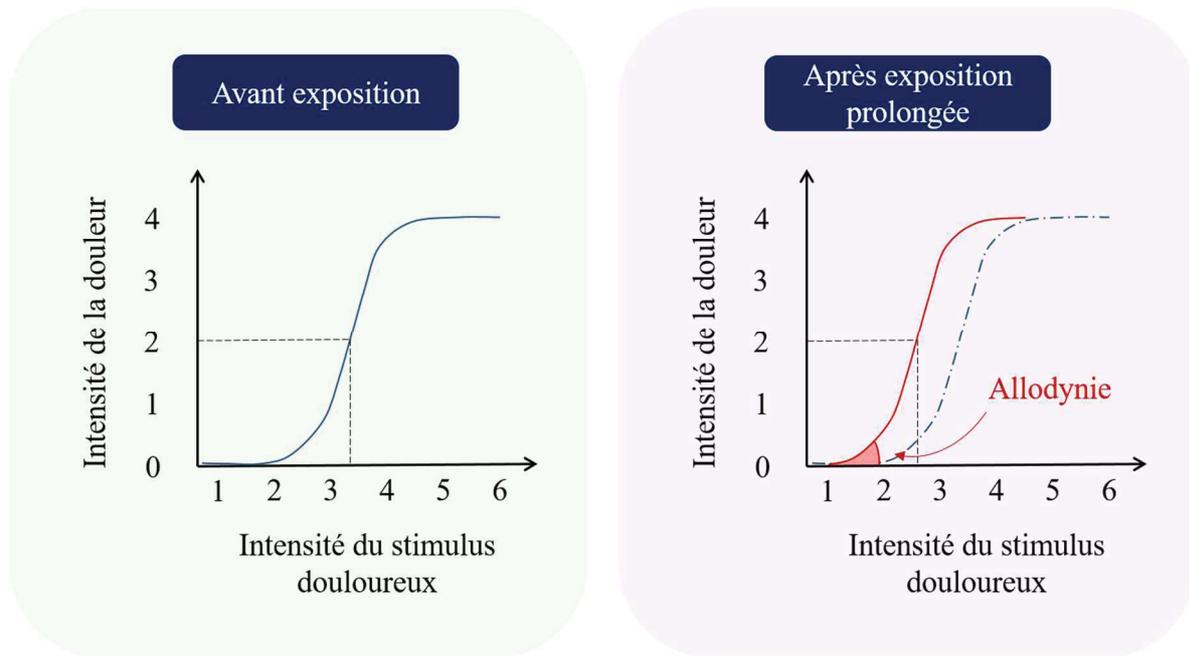


Figure 17 : L’hyperalgésie induite par la morphine

L’hyperalgésie aux opioïdes (OIH) est caractérisée par une augmentation de la sensibilité aux stimuli douloureux. Après exposition prolongée à un opioïde, une allodynie et une hyperalgésie peuvent être observées. Un stimulus normalement non nociceptif produit alors une réponse de douleur, et un stimulus nociceptif provoque une réponse exacerbée.

Addiction

L’addiction, ou le trouble de l’usage d’une substance, est définie par le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux 5 (DSM-5) comme un ensemble de symptômes cognitifs, comportementaux et physiologiques qui indique qu’un individu continue à consommer une substance malgré l’ensemble des problèmes associés à son usage. Chez l’humain, le diagnostic se fait à l’aide de 11 critères tels que les critères liés à la perte de contrôle de la consommation de la substance ou ceux liés aux déficits sociaux associés. De plus, il existe une très forte hétérogénéité dans l’addiction chez l’humain, notamment liée aux facteurs génétiques et psycho-sociaux qui contribuent à l’addiction (DSM5, 2013).

L’addiction est composée de trois étapes : la consommation abusive, la descente pendant laquelle le manque apparaît et le sevrage qui précipite la prochaine prise de la substance (Koob & Volkow, 2016). Dans chacune de ces étapes, les récepteurs opioïdes participent à la plasticité qui se met en place et renforcent l’addiction. Par exemple, l’activation des MOR participe aux effets récompensants de la prise de la substance. Néanmoins leur activation répétée induit une

diminution des effets et l'apparition des symptômes de manque (H. L. Fields & Margolis, 2015). Une fois la substance éliminée de l'organisme, le manque est associé avec un état émotionnel négatif et aversif lié à l'absence de la substance. Cette aversion implique notamment les KOR qui entraînent dysphorie, stress et anxiété (Lalanne, Ayranci, Kieffer, & Lutz, 2014). Lors du sevrage, caractérisé par le désir irrésistible de consommer, les MOR, DOR et KOR participent à la préoccupation et à l'anticipation de la consommation de la substance qui précipite la prochaine prise (**Figure 18**) (Darcq & Kieffer, 2018). Ainsi, l'addiction se caractérise par la consommation d'une substance dont les effets hédoniques diminuent et dont les effets aversifs après consommation augmentent. Le consommateur cherche alors, en augmentant les prises, à sortir de l'état émotionnel négatif lié à l'absence de la substance et à récupérer les effets hédoniques caractéristiques de la première prise de la substance.

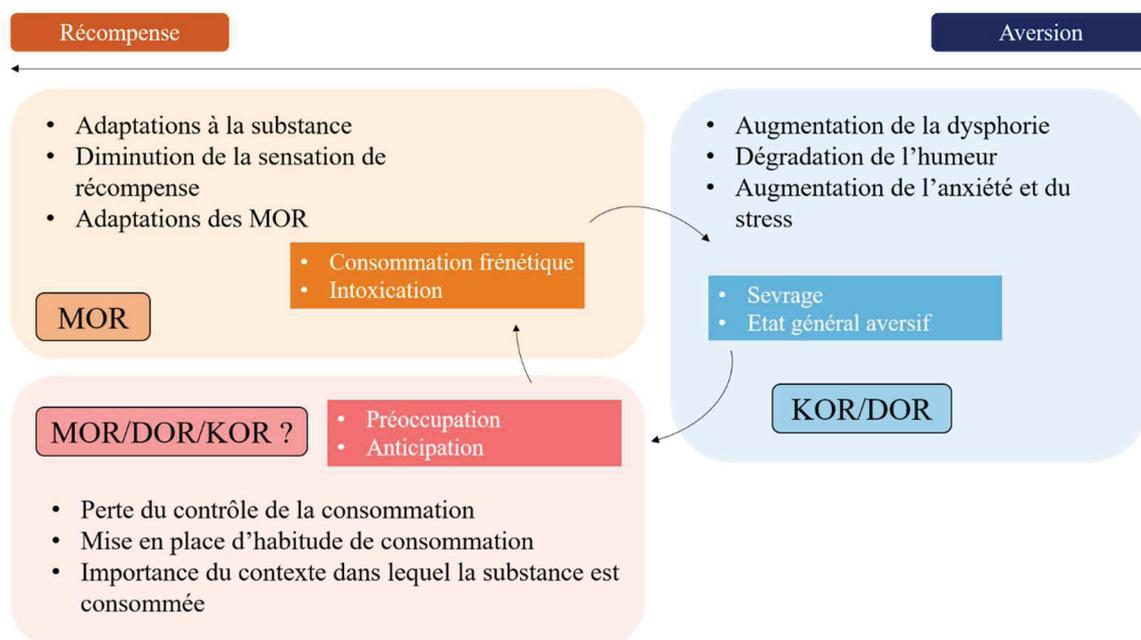


Figure 18 : L'implication des récepteurs opioïdes dans le cycle de l'addiction

Le cercle vicieux de l'addiction implique la consommation abusive et incontrôlée d'une substance. La consommation répétée provoque des adaptations telles que la diminution des effets récompensants obtenus. Après la consommation, les symptômes de manque, caractérisés par un état général intérieur aversif, et le désir irrésistible de consommer se font ressentir. La diminution des aspects récompensants et l'augmentation des aspects aversifs liés à l'usage de la substance provoque la perte de contrôle de la consommation. Dans chacune de ces étapes, les récepteurs opioïdes alimentent la plasticité et renforcent le processus d'addiction. **DOR**, récepteur opioïde δ , **KOR**, récepteur opioïde κ , **MOR**, récepteur opioïde μ . **Adapté à partir de Darcq, 2018.**

En résumé, malgré la nécessité d'utiliser la morphine en tant qu'analgésique, les nombreux effets secondaires limitent son utilisation en clinique. La tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine provoque une escalade des doses, ce qui renforce l'OIH et participe à la précipitation du patient dans l'addiction. Une fois que l'addiction est présente, le patient ne cherche plus forcément à soulager sa douleur, mais consomme la morphine de manière abusive selon un cycle récompense-aversion et passe alors une grande majorité de son temps à se focaliser sur la recherche et la consommation de la morphine. L'augmentation de la consommation aboutie à un risque élevé de dépression respiratoire par overdose.

Pharmacocinétique de la morphine

La pharmacocinétique correspond à une branche de la pharmacologie qui étudie le devenir d'une molécule au sein de l'organisme en se basant sur 4 paramètres : *(i)* l'absorption *(ii)* la distribution, *(iii)* le métabolisme et *(iv)* l'excrétion. L'ensemble de ces paramètres sont résumés par un acronyme utilisé couramment en pharmacocinétique : l'ADME.

Après administration orale, l'absorption correspond à l'ensemble des processus qui interviennent dans le transfert de la morphine de son site d'administration jusqu'à la circulation sanguine. Les cellules du tube digestif permettent le transport de la morphine du tube digestif au système porte hépatique. Avant de rejoindre la circulation générale, la morphine est acheminée jusqu'au foie par la veine porte. Dans les hépatocytes du foie, une première métabolisation de la morphine a lieu et correspond à l'effet de premier passage. Ces hépatocytes transfèrent alors la morphine restante vers la circulation sanguine générale. Ces deux phénomènes définissent le pourcentage de morphine qui est retrouvé dans la circulation sanguine générale, aussi appelé, biodisponibilité. La morphine biodisponible est distribuée aux tissus par la circulation sanguine. Au sein des tissus cibles, elle produit ses effets. Le métabolisme de la morphine se déroule principalement dans le foie et implique majoritairement la glucuronidation de la morphine en deux métabolites majeurs : la morphine-3-glucuronide (M3G) et la morphine-6-glucuronide (M6G). L'ajout d'un groupement glucuronide hydrophile sur la morphine facilite son excrétion par l'urine.

Ainsi, la pharmacocinétique est un paramètre crucial dans l'évaluation des effets de la morphine. Elle détermine, à la fois, la durée pendant laquelle la morphine peut produire ses effets et les quantités que l'on retrouve aux sites d'action de la morphine, en périphérie et dans le SNC.

Absorption, distribution, métabolisme et excrétion de la morphine

Absorption

Après administration orale, la biodisponibilité de la morphine chez l'humain est relativement faible, bien que son absorption dans le système digestif soit supérieure à 80 % (Lotsch, Weiss, Ahne, Kobal, & Geisslinger, 1999). En effet, seulement 42 % de la morphine absorbée n'est pas métabolisée durant le premier passage dans le foie, ce qui détermine sa biodisponibilité à 34 % (Lotsch et al., 1999). Cette valeur varie de 23.9 à 38.3 % en moyenne en fonction des études (Hasselstrom & Sawe, 1993; Hoskin et al., 1989; Lotsch et al., 1999; Sawe, Dahlstrom, Paalzow, & Rane, 1981). Néanmoins, il est important de noter qu'une forte hétérogénéité a été observée et des valeurs aussi faibles que 15 % et aussi fortes que 64 % ont été observées (Hoskin et al., 1989; Sawe et al., 1981). Chez le rat, l'absorption se fait principalement dans le duodénum et le jéjunum (Tan et al., 1989). Cette absorption semble être limitée par l'expression du transporteur d'efflux appelé glycoprotéine-P (P-gp, également appelé MDR1, ABCB1) au sein du tractus digestif. Chez l'humain, l'inhibition de ce transporteur par la quinidine augmente la biodisponibilité de la morphine (Kharasch, Hoffer, Whittington, & Sheffels, 2003).

Distribution

La distribution de la morphine dans les tissus est relativement rapide (Bjorkman, Akeson, Helfer, Fyge, & Gustafsson, 1995; Sawe, 1986). Le volume apparent de distribution chez l'humain est estimé en moyenne à 2,7 L/kg (Hasselstrom & Sawe, 1993; Mojaverian et al., 1982; Stanski, Greenblatt, & Lowenstein, 1978). Il est important de noter qu'environ 25 % de la morphine est liée de manière non-spécifique à des protéines du sang, notamment l'albumine (Milne, Nation, & Somogyi, 1996).

Pour produire ses effets centraux, la morphine doit traverser la BHE pour se distribuer au sein du SNC, comme en témoigne la corrélation entre les quantités de morphine trouvées dans la moelle épinière et la PAG et le degré d'antinociception (Bostrom, Hammarlund-Udenaes, & Simonsson, 2008; Matos, Rollema, Taiwo, Levine, & Basbaum, 1995). De manière similaire, les concentrations plasmatiques de morphine ne corrélaient pas forcément avec l'antinociception observée (Glare & Walsh, 1991; G. D. Smith & Smith, 1995). La BHE est une barrière semi-perméable sélective qui sépare le compartiment sanguin du SNC. Elle est

composée de cellules endothéliales adjacentes, de perycites, qui permettent la contraction des capillaires sanguins, et de pieds astrocytaires qui entourent les perycites (Ballabh, Braun, & Nedergaard, 2004). Cette structure particulière limite la diffusion des molécules au sein du SNC grâce à ses propriétés. En effet, elle constitue une barrière physique, composée par des jonctions serrées entre les cellules endothéliales, qui empêche le passage paracellulaire des molécules hydrophiles. De plus, un nombre important de transporteurs et d'enzymes du métabolisme sont exprimés à la surface des cellules et régulent le transit transcellulaire des molécules vers le SNC (Chaves, Remiao, Cisternino, & Decleves, 2017). La morphine possède un certain degré de lipophilicité qui lui permet de traverser la BHE (van Bree, de Boer, Danhof, Ginsel, & Breimer, 1988; Viscusi & Viscusi, 2020; R. Xie, Hammarlund-Udenaes, de Boer, & de Lange, 1999). Par exemple, chez l'humain, on retrouve dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) environ $0.64 \pm 0,1$ fois les quantités de morphine retrouvées dans le plasma bien que ces valeurs peuvent légèrement varier en fonction des études (Goucke, Hackett, & Ilett, 1994; Meineke et al., 2002; Poulain et al., 1990; M. T. Smith, Wright, Williams, Stuart, & Cramond, 1999; van Dongen, Crul, Koopman-Kimenai, & Vree, 1994; Wolff, Samuelsson, & Hedner, 1995, 1996).

Le passage de la morphine est limité par la P-gp (Callaghan & Riordan, 1993; Hamabe et al., 2007; Schinkel, Wagenaar, van Deemter, Mol, & Borst, 1995). En effet, ce transporteur exprimé à la membrane plasmique du côté luminal des cellules endothéliales permet l'efflux des molécules substrats localisées dans le cytoplasme vers le sang. Dans un modèle génétiquement modifié pour ne pas exprimer ce transporteur, les concentrations de morphine trouvées dans le fluide cérébral extracellulaire sont plus de 2 fois plus élevées qu'en présence du transporteur (S. J. Thompson, Koszdin, & Bernards, 2000; R. Xie et al., 1999). De plus, l'absence de ce transporteur induit une augmentation de l'antinociception à la morphine (S. J. Thompson et al., 2000; Zong & Pollack, 2000). Il a même été suggéré qu'une augmentation de l'expression de la P-gp pouvait participer à l'apparition de la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine, bien que ces données soient sujet à controverses (Aquilante, Letrent, Pollack, & Brouwer, 2000; Weinsanto et al., 2018). Outre le fait que la P-gp semble être le transporteur le plus important dans la limitation de l'entrée de la morphine dans le SNC, d'autres transporteurs, tels que la protéine associée à la résistance aux médicaments (MRP), ont été impliqués dans son transit (Su & Pasternak, 2013). De manière intéressante, il a été montré que la distribution de la morphine diffère de manière significative dans différentes régions cérébrales ce qui suggère des différences locales du transport de la morphine vers le SNC

(Bhargava, Villar, Rahmani, & Larsen, 1993; Bolander, Kourtopoulos, Lundberg, & Persson, 1983; Fuller, Lin, Caprioli, Wiggins, & Dafny, 1988).

Métabolisme

Généralités

La demi-vie terminale de la morphine chez l'humain correspond au temps nécessaire pour que la concentration sanguine de morphine restante diminue de moitié une fois que le pseudo-équilibre de distribution est atteint (Toutain & Bousquet-Melou, 2004). Ses valeurs varient entre 1,9 h et 15,1 h chez le sujet sain mais sont situées en moyenne entre 2 h et 3 h (Hasselstrom & Sawe, 1993; Hoskin et al., 1989; Kharasch et al., 2003; Mojaverian et al., 1982; Stanski et al., 1978). La morphine et ses métabolites principaux sont détectables dans l'urine chez l'humain plusieurs jours après une dose unique de morphine (Hasselstrom & Sawe, 1993). Chez le rongeur, le métabolisme est beaucoup plus rapide et la demi-vie terminale est estimée à environ 30 min (Bouw, Gardmark, & Hammarlund-Udenaes, 2000; Dalesio et al., 2016).

Chez l'humain, après administration aiguë, la morphine est principalement métabolisée en M3G et M6G. Il est estimé que 55 % et 10 % de la dose de morphine retrouvée dans le sang après administration intraveineuse ou orale est transformée et excrétée dans l'urine sous forme de M3G et M6G, respectivement (Hasselstrom & Sawe, 1993; Lotsch et al., 1996; R. Osborne, Joel, Trew, & Slevin, 1990). De plus, on retrouve également environ 2 à 8 % de morphine sous forme inchangée dans l'urine chez l'humain du fait de son hydrophilicité intrinsèque (Hasselstrom & Sawe, 1993). D'autres métabolites mineurs sont également retrouvés dans l'urine chez l'humain tels que la morphine-3-6-diglycuronide, la morphine-3-sulfate et la morphine-6-sulfate, la morphine-3-glucoside, la normorphine et ses glucuronides respectifs ou l'hydromorphone (**Figure 19**) (Andersson et al., 2014; X. Y. Chen, Zhao, & Zhong, 2003; Hasselstrom & Sawe, 1993; Laux-Biehlmann, Mouheiche, Veriepe, & Goumon, 2013; McDonough, Levine, Vorce, Jufer, & Fowler, 2008; Yeh, Gorodetzky, & Krebs, 1977). La dose restante est notamment évacuée par les fèces.

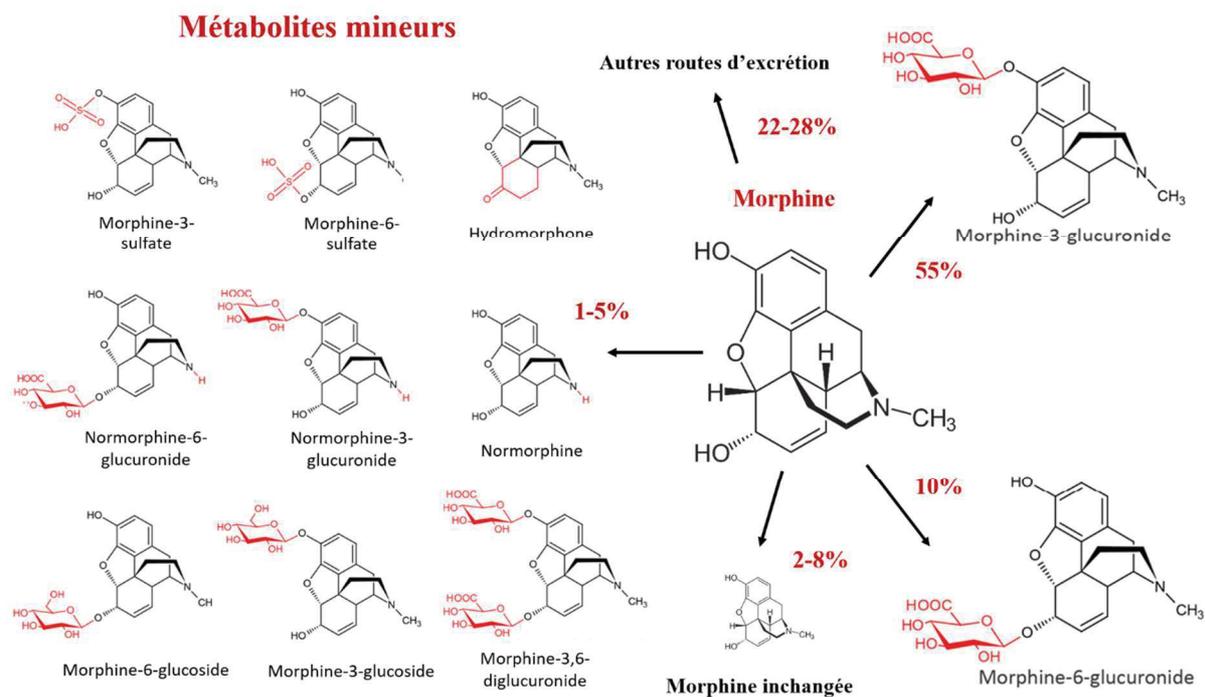


Figure 19 : Le métabolisme de la morphine chez l'humain

Le métabolisme de la morphine chez l'humain implique principalement la glucuronidation de la morphine en M3G (équivalent à 55 % de la dose biodisponible retrouvée dans l'urine) et en M6G (équivalent à 10 % de la dose biodisponible retrouvée dans l'urine). Environ 5 % de la morphine est directement excrétée dans l'urine sous forme inchangée. On retrouve de nombreux autres métabolites mineurs dans l'urine. La dose restante est évacuée par d'autres voies. **Adapté à partir de Laux-Biehlmann, 2013.**

Il est important de noter que la M6G n'est pas retrouvée chez le rongeur. Certaines données suggèrent qu'elle est formée chez le rat *in vitro* ou chez la souris ICR *in vivo* (Nagano, Yamada, & Oguri, 2000; Togna et al., 2013; Z. Yang et al., 2016), mais des évidences *in vivo* indiquent le contraire (Dahan & Lotsch, 2015; Kuo, Hanioka, Hoshikawa, Oguri, & Yoshimura, 1991; Oguri, Hanioka, & Yoshimura, 1990; Salem & Hope, 1997; N. Xie et al., 2017; Zelcer et al., 2005). Il est cependant possible que ces contradictions proviennent des conditions d'expérimentation utilisées. Il semblerait que la synthèse de M6G soit possible par des microsomes de foie de rats traités au préalable de manière chronique avec de la codéine (Antonilli et al., 2012). Cependant, dans nos expériences, nous n'avons jamais observé de M6G dans le sang d'animaux traités de manière chronique à la morphine. Le consensus actuel est de considérer que la morphine est convertie exclusivement en M3G chez le rongeur.

Plusieurs métabolites de la morphine possèdent des activités biologiques, notamment les deux métabolites majeurs, la M3G et la M6G. C'est pourquoi de nombreuses études ont étudié le rapport de concentration entre la morphine et ses deux métabolites dans le plasma et le LCR pour déterminer si la présence de ces métabolites influence les effets de la morphine (cf. section, *Activité biologique des métabolites de la morphine*). Chez l'humain, suite à l'administration orale de morphine, on retrouve environ 29 fois plus de M3G et 4,6 fois plus de M6G, que de morphine sur l'ensemble de la cinétique plasmatique. Dans le LCR, on retrouve 7,3 fois plus de M3G mais un peu moins de M6G (0,8 fois) que de morphine (van Dongen et al., 1994). Ces valeurs peuvent varier en fonction des critères d'inclusion des patients, du mode d'administration, de collection des échantillons et de quantification. L'ordre reste cependant toujours le même et les ratios M3G/M6G observés dans le plasma en comparaison avec ceux obtenus dans le LCR sont relativement similaires indépendamment des protocoles utilisés (**Tableau 2**) (Christrup et al., 1999; Goucke et al., 1994; Hand et al., 1987; Hasselstrom & Sawe, 1993; Hoffman et al., 1997; Klimas & Mikus, 2014; McQuay et al., 1990; Meineke et al., 2002; R. Osborne et al., 1990; Portenoy et al., 1991; Poulain et al., 1990; M. T. Smith et al., 1999; van Dongen et al., 1994; Westerling, Persson, & Hoglund, 1995; Wolff et al., 1995, 1996).

Référence	Plasma		LCR		Patient	Mode d'administration
	M3G/M	M6G/M	M3G/M	M6G/M		
Hand, 1987*	9,92	0,96	1,10	0,17	10 patients en chirurgie	Oral
Poulain, 1990*	ND	10,1 ± 2,0	ND	4,2 ± 1,0	2 patients cancéreux	Oral
Osborne, 1990#	55,8 ± 24,5	9,7 ± 5,8	ND	ND	10 patients sains	Oral
McQuay, 1990\$	32 (0,84 – 117)	6,7 (0,11 – 61)	ND	ND	151 patients cancéreux	Oral
Portenoy, 1991*	ND	1,22 ± 0,13	ND	ND	8 patients cancéreux	Infusion
Hasselstorm, 1993#	29,9 ± 6,8	3,6 ± 1,2	ND	ND	7 patients sains	Oral
Van dongen, 1994#	29 ± 14	4,6 ± 2,8	7,3 ± 5,6	0,8 ± 0,7	16 patients cancéreux	Oral
Goucke, 1994\$	22,1 (8,9 – 95)	3,79 (1,6 – 15)	2,39 (1,1 – 12)	0,42 (0,2 - 1,4)	11 patients cancéreux	Oral
Wolff, 1995*	150 ± 18	23 ± 4	47 ± 12	5,1 ± 1,0	34 patients cancéreux	Oral – libération lente
Westerling, 1995#	32,4 ± 11,2	6,4 ± 2,3	ND	ND	14 patients sains	Oral
Wolff, 1996*	31 ± 6,0	3,4 ± 0,48	15 ± 6,0	0,50 ± 0,11	21 patients cancéreux	Infusion s.c
Hoffmann, 1997*	16,7 ± 7,0	3,8 ± 1,8	ND	ND	5 patients cancéreux	Oral
Smith, 1999*	5,05	0,98	1,86	0,29	14 patients cancéreux	Oral ou s.c
Christrup, 1999#	54,3 ± 28,2	6,0 ± 2,8	ND	ND	18 patients cancéreux	Oral
Meineke, 2002*	3,5 ± 0,5	0,9 ± 0,1	0,85 ± 0,2	0,2 ± 0,04	9 patients en neurologie	infusion

Tableau 2 : Rapports entre les quantités de M3G et de morphine et entre les quantités de M6G et de morphine dans le plasma et le LCR chez l'humain

Les valeurs des rapports entre la M3G et la morphine et la M6G et la morphine peuvent varier mais, dans une même étude, on retrouve toujours plus de M3G que de M6G comparativement à la quantité de morphine dans le plasma et dans le LCR. *, Les données représentent des moyennes ± SEM. #, Les données représentent des moyennes ± SD. \$, Les données représentent des moyennes ± range. Les valeurs non encadrées correspondent au calcul des rapports à partir des moyennes de quantité présentées dans l'article. **LCR**, liquide céphalo-rachidien ; **M**, morphine ; **M3G**, morphine-3-glucuronide ; **M6G**, morphine-6-glucuronide ; **ND**, non défini.

Glucuronidation de la morphine

Glucuronidation par les UDP-glucuronosyltransférases

La glucuronidation est la voie principale du métabolisme de la morphine. Elle implique des enzymes du métabolisme de phase II appelées UDP-glucuronosyltransférases (UGT). Ces enzymes catalysent de nombreuses réactions de glucuronidation visant à inactiver et à conférer un caractère hydrophile aux molécules cibles afin de faciliter leur excrétion. Parmi leurs substrats, on trouve notamment la bilirubine, des stéroïdes et hormones et des xénobiotiques variés. Les UGT catalysent l'ajout d'un groupement glucuronide hydrophile provenant d'un acide glucuronique couplé à une uridine diphosphate (UDPGA) sur ses substrats. Dans le cas de la morphine, ce groupement est ajouté en position C-3 ou C-6 pour former respectivement la M3G et la M6G. D'un point de vue moléculaire, les UGT sont des glycoprotéines transmembranaires d'environ 500 acides aminés, localisées dans le réticulum endoplasmique (RE) lisse. La grande majorité de leur structure est située dans le lumen du RE lisse et seulement une vingtaine d'acides aminés sont localisés du côté cytoplasmique (Magdalou, Fournel-Gigleux, & Ouzzine, 2010). Leur rétention à la membrane est permise par un motif composé de deux lysines (KK) (Jackson, Nilsson, & Peterson, 1990). La partie N-terminale présente le domaine de liaison au substrat alors que la partie C-terminale permet de lier l'UDPGA (Magdalou et al., 2010). Les mécanismes de liaison de la morphine aux UGT restent à déterminer. Les résidus 84 à 118 sembleraient impliqués (Coffman, Kearney, Goldsmith, Knosp, & Tephly, 2003). La spécificité de la plupart des UGT pour l'UDPGA est, quant à elle, conférée par un motif de 4 acides aminés : FXDQ, X pouvant être une glycine ou une alanine (Nair, Meech, Mackenzie, McKinnon, & Miners, 2015).

Transport cellulaire de la morphine et de ses glucuronides

Un transport de la morphine et de l'UDPGA dans le lumen du RE lisse est nécessaire pour que la réaction de glucuronidation puisse avoir lieu. Pour cela, la morphine est d'abord transportée du milieu extracellulaire vers le cytoplasme par des transporteurs membranaires tels que les transporteurs de cations organiques (OCT) OCT1 et probablement OCT2 (Kuhlmann et al., 2021; Tzvetkov et al., 2013; P. Zhu et al., 2018), et le transporteur polypeptidique d'anions organiques (OATP) 2B1 (Z. Z. Yang et al., 2016). La morphine est ensuite acheminée jusqu'à l'intérieur du RE lisse par un transporteur inconnu. L'UDPGA est transporté du cytoplasme vers le lumen du RE lisse par le biais de transporteurs spécifiques du RE, notamment l'UGTrel7

(Kobayashi, Sleeman, Coughtrie, & Burchell, 2006; Rowland, Mackenzie, & Miners, 2015). On estime que la vitesse à laquelle les substrats des UGT pénètrent dans le lumen du RE, aussi appelée phénomène de latence, est un des facteurs limitant de la glucuronidation (Y. Liu & Coughtrie, 2017; Revesz et al., 2013). Une fois les glucuronides formés, ceux-ci sont transportés dans le cytoplasme par des transporteurs inconnus. Il existe néanmoins des transporteurs non-spécifiques de grosses molécules glucuronidées capables de transporter la M3G (Csala et al., 2004). L'activité de ces transporteurs semble réguler la vitesse de glucuronidation. En effet, l'accumulation de M3G dans le lumen du RE lisse semble moduler la vitesse de glucuronidation de la morphine et participe ainsi à la régulation de ce processus (Revesz et al., 2013). Dans le cytoplasme, la M3G et la M6G sont acheminées vers le milieu extracellulaire par les MRP2 et MRP3 pour être captées par les cellules endothéliales et libérées dans le sang (**Figure 20**) (Lloret-Linares et al., 2016; Swartjes et al., 2012; Zelcer et al., 2005). Pour finir, ces produits glucuronidés sont transportés jusqu'au rein pour être éliminés dans l'urine.

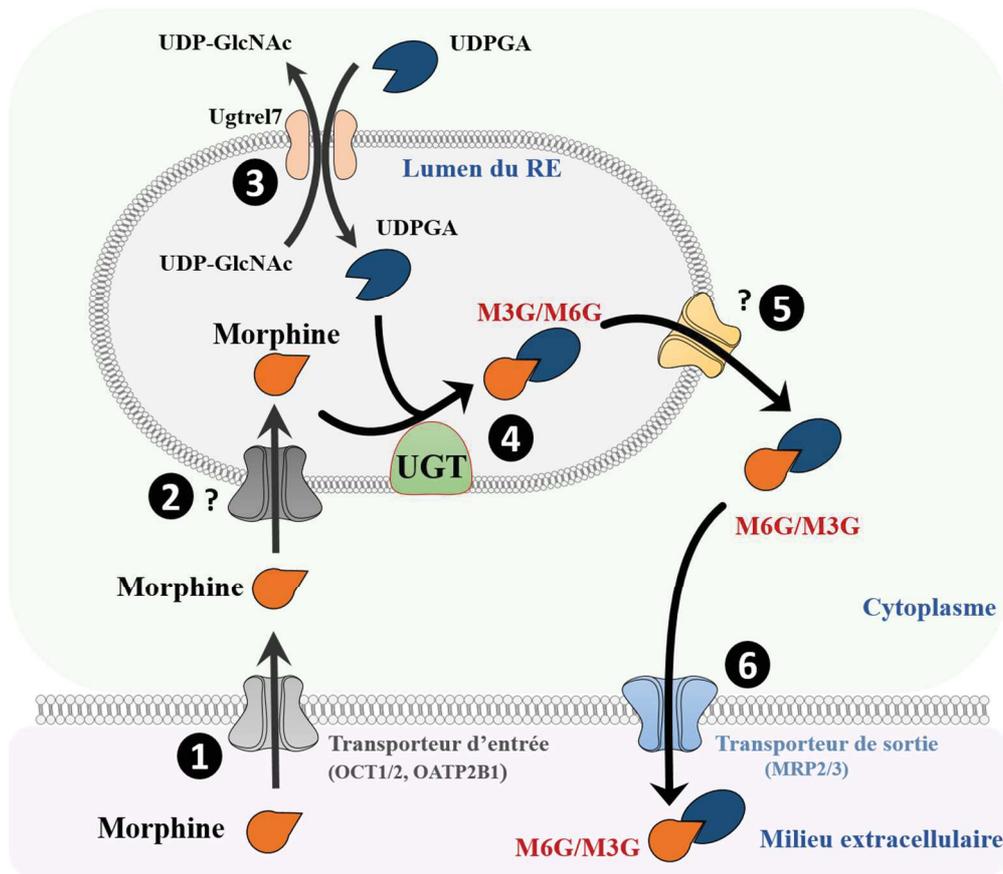


Figure 20 : Le transport cellulaire de la morphine et de ses glucuronides

(1) La morphine est transférée du milieu extracellulaire vers l'intérieur du cytoplasme par des transporteurs actifs tel que l'OATP2B1 ou l'OCT1. (2) Puis, la morphine est acheminée jusque dans le lumen du RE par le biais d'un transporteur inconnu. (3) L'UDPGA est quant à lui transporté majoritairement par l'UGTrel7, en échange d'un UDP-GlcNAc. (4) Au sein du lumen du RE, les UGT catalysent l'ajout d'un groupement glucuronide qui provient de l'UDPGA sur la morphine pour former la M3G et la M6G. (5) Ces métabolites sont transférés vers le cytoplasme par des transporteurs inconnus. (6) Enfin, les glucuronides sont transportés vers le milieu extracellulaire par le biais de transporteurs actifs tels que le MRP2 ou le MRP3 pour être captés par les cellules endothéliales, rejoindre la circulation sanguine et les reins, et être excrétés dans l'urine. Il est important de noter qu'une partie de la morphine présente dans le cytoplasme peut également être redirigée vers le milieu extracellulaire par l'intervention de la P-gp. **M3G**, morphine-3-glucuronide ; **M6G**, morphine-6-glucuronide ; **MRP**, protéine associée à la résistance aux médicaments ; **OATP2B1**, transporteur polypeptidique d'anions organiques ; **OCT1**, transporteur de cations organiques 1 ; **P-gp**, glycoprotéine P ; **RE**, réticulum endoplasmique ; **UDPGA**, acide glucuronique couplé à une uridine diphosphate ; **UDP-GlcNAc**, UDP-acétylglucosamine ; **UGT**, UDP-glucuronosyltransférase.

Isoformes des UGT impliqués dans la glucuronidation de la morphine

Les UGT représentent une superfamille d'enzymes composée de 4 familles dont les UGT1 et UGT2 en sont les principales chez l'humain et le rongeur (Meech et al., 2019). Elles sont largement représentées au sein de l'évolution, des plantes jusqu'aux mammifères. Chez l'humain, la glucuronidation de la morphine implique plusieurs isoformes mais on estime que l'UGT2B7 en est la principale (Abildskov, Weldy, & Garland, 2010; Coffman, King, Rios, & Tephly, 1998; Coffman, Rios, King, & Tephly, 1997; Court et al., 2003; Faura, Collins, Moore, & McQuay, 1998; Stone, Mackenzie, Galetin, Houston, & Miners, 2003). Celle-ci catalyse la formation de taux élevés de M3G et de M6G (Court et al., 2003; Ohno, Kawana, & Nakajin, 2008; Stone et al., 2003). Le consensus actuel est de considérer que seul l'UGT2B7 est responsable de la production de M6G chez l'humain, bien que des évidences suggèrent que les UGT1A1, 1A3, 1A8 et 2B4 soient capables de former de faibles quantités de M6G (Court et al., 2003; Ohno et al., 2008). Ainsi, la M6G est considérée comme un témoin de l'activité de l'UGT2B7 (Court, 2005; Stone et al., 2003). La glucuronidation de la M3G est en revanche moins spécifique d'un type d'isoformes d'UGT puisque plusieurs isoformes semblent capable de métaboliser la morphine en M3G dont l'UGT1A1, 1A3, 1A6, 1A8, 1A9, 1A10, 2A1, 2B4 et 2B7 (Court et al., 2003; Jedlitschky, Cassidy, Sales, Pratt, & Burchell, 1999; Miners, Lillywhite, & Birkett, 1988; Ohno et al., 2008; Stone et al., 2003; Wahlstrom, Pacifici, Lindstrom, Hammar, & Rane, 1988). La structure de la morphine pourrait expliquer cette différence de spécificité des UGT pour la formation de la M3G et de la M6G. Le cycle N-méthyle pipéridine en position N-17 pourrait perturber l'interaction entre les UGT (sauf l'UGT2B7) et le groupement hydroxyle en position C-6 diminuant la probabilité de glucuronidation en cette position. Il est intéressant de noter que chez l'humain, un polymorphisme au sein des gènes des UGT, notamment l'UGT1A1 et 1A8, influence les ratios métaboliques retrouvés dans le plasma chez des patients sous traitement oral de morphine (Fladvad et al., 2013). La principale raison qui explique l'absence de M6G chez le rat et la souris est que l'UGT2B7 n'est pas exprimée dans ces espèces (Buckley & Klaassen, 2007; Shelby, Cherrington, Vansell, & Klaassen, 2003). Chez la souris, la formation de M3G est assurée par l'UGT2B36 et les autres isoformes capables de catalyser sa formation (Kurita et al., 2017). Chez le rat, l'isoforme 2B1 semble être l'enzyme principalement responsable de la production de M3G (Coffman, Rios, & Tephly, 1996; Dzierlenga et al., 2015; Hasegawa et al., 2009; Kimura, Shibata, Tamada, Ozaki, & Arai, 2017; King, Rios, Green, MacKenzie, & Tephly, 1997).

Localisation des UGT

Les UGT, au même titre que l'ensemble des enzymes du métabolisme de phase I (*i.e.* Cytochrome P450) et de phase II (*e.g.* UGT, sulfotransférases, Glutathion-S-transférases etc.), sont principalement localisées dans les hépatocytes du foie au sein duquel elles participent à la détoxification des molécules endogènes et xénobiotiques présentes dans l'organisme. L'abondance relative des différentes isoformes d'UGT a été étudiée de manière extensive chez l'humain (Achour, Russell, Barber, & Rostami-Hodjegan, 2014; Nakamura, Nakajima, Yamanaka, Fujiwara, & Yokoi, 2008; Strassburg et al., 2000). Par exemple, à travers une analyse de protéomique sur des microsomes de foie humain, l'UGT2B7 (82,9 pmole/mg de protéines) a été déterminée comme la 3^{ème} UGT la plus abondante après l'UGT1A3 (123,1 pmole/mg de protéines) et l'UGT1A6 (107,1 pmole/mg de protéines) (Achour et al., 2014). Bien que la concentration d'UGT soit la plus forte dans le foie, ces enzymes sont également exprimées de manière significative dans d'autres organes. Leur expression a été recensée dans l'œsophage, l'intestin, le colon, les reins, l'estomac, la vésiculaire biliaire, les poumons, le cerveau, les testicules, les ovaires et l'utérus (Buckley & Klaassen, 2007; Margaillan et al., 2015; Nakamura et al., 2008; Sadeque, Usmani, Palamar, Cerny, & Chen, 2012; Strassburg et al., 2000; Strassburg, Manns, & Tukey, 1998; Strassburg et al., 1999). De plus, la morphine peut être dégradée dans certains de ces organes, à moindre mesure que dans le foie où l'on considère que la majorité du métabolisme de la morphine a lieu (Mazoit, Sandouk, Scherrmann, & Roche, 1990; Strassburg et al., 2000; Wahlstrom, Winblad, Bixo, & Rane, 1988; Yue, von Bahr, Odar-Cederlof, & Sawe, 1990).

Métabolisme central

Un métabolisme local de la morphine au sein du SNC, principal site d'action de la morphine, pourrait influencer son effet antinociceptif en modulant localement les quantités de morphine disponibles pour agir sur les MOR. L'implication des UGT et de la glucuronidation au sein du SNC est décrite pour plusieurs substances endogènes telles que la dopamine ou la sérotonine (5-HT) (**Figure 21**) (Sheng et al., 2021). De plus, l'implication des enzymes du métabolisme de phase I dans le SNC a été décrite dans le métabolisme et la potentialisation de la codéine en morphine (McMillan & Tyndale, 2015). Chez l'humain, certaines UGT impliquées dans le métabolisme de la morphine sont exprimées dans le cerveau. D'une part, l'expression de l'UGT2B7 et 1A6, deux isoformes impliquées dans la formation de taux élevés de glucuronides de la morphine, a été décrite dans le cervelet (King, Rios, Assouline, & Tephly,

1999). D'autre part, l'expression des UGT1A1, 1A3, 1A6 et 1A10 a été détectée dans le cerveau chez l'humain (Kutsuno et al., 2015). L'UGT2A1 a également été détectée dans l'épithélium olfactif humain (Jedlitschky et al., 1999). En parallèle, des données *in vitro* suggèrent que la morphine est transformée en M3G dans le cerveau humain. En effet, les microsomes de cervelet et de thalamus catalysent la production de faibles quantités de M3G (King et al., 1999). De manière similaire, l'UGT2A1 retrouvée dans l'épithélium olfactif humain catalyse également la formation de faibles quantités de M3G (Jedlitschky et al., 1999). Des expériences *post mortem* sur des cerveaux humains de patients cancéreux suggèrent également la production de M3G à partir de la morphine dans la PAG, la moelle épinière, le cortex et le cervelet (Wahlstrom, Winblad, et al., 1988). Dans cette étude, seuls 6 patients sur 19 présentaient un métabolisme détectable et tous étaient sous traitement aux opioïdes avant le décès, dont 2 à la morphine. Une autre étude a confirmé ces résultats *in vitro* à partir d'échantillons de lobes temporaux latéraux retirés chez des patients épileptiques, bien que le métabolisme n'ait été observé que chez 2 patients sur 5 (Yamada et al., 2003). De plus, la glucuronidation au sein du cerveau humain a été démontrée *in vitro* pour d'autres molécules telles que le 1-naphthol (Viani, Temellini, Tusini, & Pacifici, 1990).

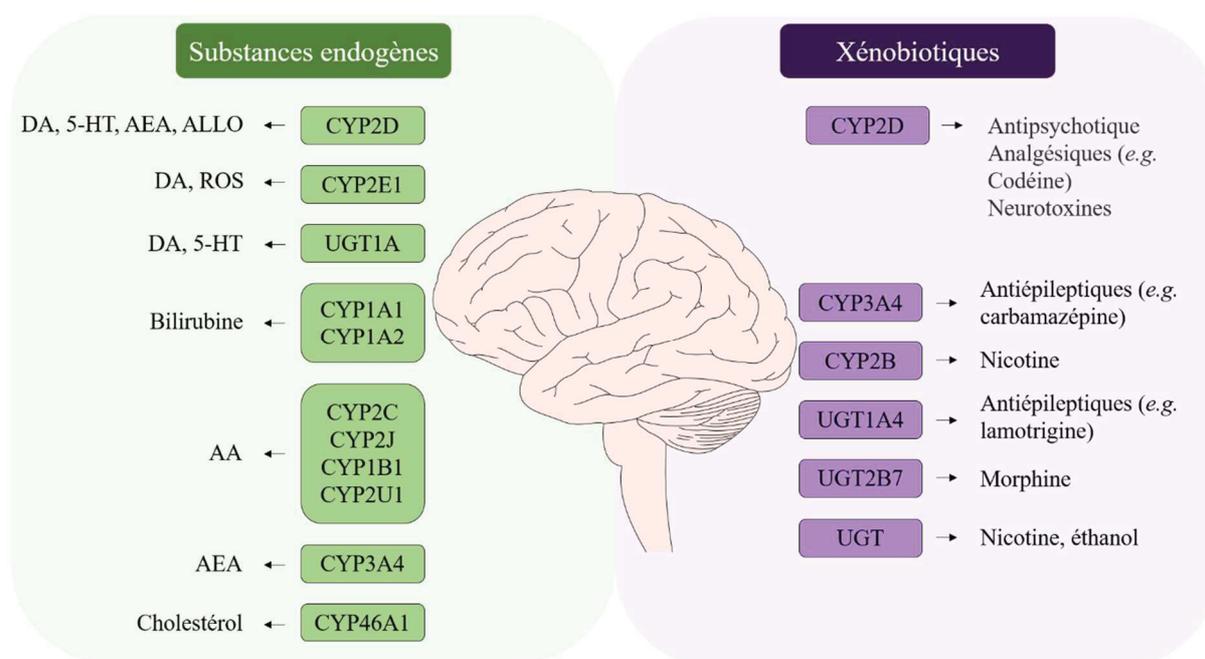


Figure 21 : Le métabolisme au sein du SNC

Les enzymes du métabolisme de phase I et II sont exprimées au sein du SNC et plusieurs d'entre elles ont été décrites pour métaboliser des substances endogènes et exogènes. **AA**, acide arachidonique ; **AEA**, anandamine ; **ALLO**, allopregnalone ; **CYP**, cytochrome P450 ; **DA**, dopamine ; **ROS**, espèce réactive de l'oxygène ; **5-HT**, sérotonine ; **UGT**, UDP-glucuronosyltransférase. **Adapté à partir de Sheng, 2021.**

Des études cliniques évaluant le métabolisme de la morphine suggèrent également l'existence du métabolisme central de la morphine. Après injection i.c.v. de morphine chez des patients cancéreux, la M3G et la M6G sont détectées dans le LCR, et non dans le sang, suggérant que la morphine a été convertie localement dans le cerveau (Sandouk, Serrie, Scherrmann, Langlade, & Bourre, 1991; M. T. Smith et al., 1999). Néanmoins, dans une des deux études, la méthode de détection utilisée ne permet pas de conclure avec certitude quant à l'identité des métabolites (Sandouk et al., 1991). De manière similaire, Goudas et collaborateurs ont observé une augmentation des quantités de M6G dans le LCR après injection i.c.v. de morphine chez 2 patients cancéreux sur 3 malgré des faibles quantités dans le plasma, cependant, les données dans le plasma ne sont pas représentées (Goudas et al., 1999). De plus, Samuelsson et collaborateurs ont recensé chez un seul patient cancéreux sur 35, un métabolisme central significatif après injection de morphine par voie épidurale (Samuelsson, Hedner, Venn, & Michalkiewicz, 1993). Un constat similaire a été réalisé par Wolff et collaborateurs chez 1

patient cancéreux sur 20 où les quantités de M6G observées dans le LCR étaient équivalentes à celles retrouvées dans le sang (Wolff et al., 1996). L'ensemble de ces données suggère l'existence d'un métabolisme central chez l'humain *in vivo*, bien que les évidences restent assez disparates. Son implication dans la modulation de l'analgésie induite par la morphine, ainsi que les différents acteurs (*e.g.* UGT2B7) impliqués dans ce métabolisme, restent à déterminer.

Chez le rongeur, les UGT impliquées dans le métabolisme de la morphine sont également exprimées dans le SNC (Brands, Munzel, & Bock, 2000; Buckley & Klaassen, 2007; Heydel et al., 2010; Ouzzine, Gulberti, Ramalanjaona, Magdalou, & Fournel-Gigleux, 2014; Sakamoto, Itoh, Tukey, & Fujiwara, 2015; Shelby et al., 2003). Par exemple, l'UGT1A6 est exprimée par des cultures primaires de neurones, de microglies et d'astrocytes de rat (Heurtaux et al., 2006; Suleman et al., 1998; Togna et al., 2013). De plus, l'expression de cet enzyme a été déterminée par hybridation *in situ* dans différentes populations de neurones incluant les cellules de Purkinje du cervelet et les cellules pyramidales de l'hippocampe (Brands et al., 2000). Les UGT1A1 et 1A7 sont également détectées dans des cultures primaires de microglies et d'astrocytes de rat (Gambaro, Robert, Tiribelli, & Gazzin, 2016; Gradinaru, Minn, Artur, Minn, & Heydel, 2012; Togna et al., 2013). Par ailleurs, l'UGT2B1 est présente dans le cerveau de rats mâles et femelles bien que son expression soit relativement faible (Shelby et al., 2003). Chez la souris, les UGT1A1, 1A3 et 1A6 sont détectées dans le cerveau (Sakamoto et al., 2015). Dans cette dernière étude, les UGT1A4, 1A5, 1A7, 1A8, 1A9 et 1A10 n'ont pas été détectées, contrairement à d'autres études décrivant l'expression de l'UGT1A5, 1A8 et 1A10 dans le cerveau de souris (Buckley & Klaassen, 2007). De manière intéressante, l'UGT1A1 et 1A6 montrent des expressions spécifiques aux régions cérébrales qui évoluent avec l'âge des souris, et qui suggèrent que les UGT du SNC sont impliquées dans le métabolisme des composés endogènes et exogènes de manière différentielle en fonction des régions cérébrales et de l'âge (Kutsuno et al., 2015). Par ailleurs, l'UGT2B36, principale isoforme impliquée dans la glucuronidation de la morphine chez la souris (Kurita et al., 2017), est exprimée de manière différentielle dans le cerveau de souris mâles et femelles (Buckley & Klaassen, 2007). D'un point de vue cellulaire, l'UGT1A1 est exprimée par des cultures primaires d'astrocytes (Liddelow et al., 2017). En résumé, les UGT impliquées dans le métabolisme de la morphine sont exprimées dans le SNC chez le rongeur. Leur expression semble s'étendre à quasiment toutes les cellules du SNC, bien que les résultats décrits chez la souris soient plus limités que chez le rat.

Dans le SNC de rongeur, l'activité de ces enzymes dans la glucuronidation de la morphine et d'autres composés, comme le resveratrol ou le β -estradiol, a été démontrée *in vitro* (Asai, Sakakibara, Onouchi, Nadai, & Katoh, 2017; Sabolovic, Heurtaux, Humbert, Krisa, & Magdalou, 2007; Suleman, Ghersi-Egea, Leininger-Muller, & Minn, 1993; Wahlstrom, Hammar, Lundin, & Rane, 1986). L'exposition de la morphine à des microsomes de cerveau de souris permet la production de quantités significatives de M3G (Wahlstrom et al., 1986). Les microglies primaires de rat semblent capables de métaboliser la morphine en quantités élevées de M3G et de M6G (Togna et al., 2013). Néanmoins, des expériences similaires ont été réalisées chez le rat dans lesquelles aucune production de M3G n'est observée (Suleman et al., 1993). De manière convaincante, Murphey *et Olsen*, ont analysé les quantités de morphine, de M3G et de M6G dans le cerveau et le sang après des injections s.c. de ces trois molécules chez le cochon d'Inde. Ils ont observé des quantités de M3G significativement plus élevées après une injection de morphine qu'après une injection de M3G, suggérant l'existence d'un métabolisme central *in vivo* (Murphey & Olsen, 1994). Ces évidences sont contestées par une étude qui utilise un modèle de souris génétiquement modifiées pour ne pas exprimer le MRP3, le principal transporteur qui permet la sortie de la M3G des hépatocytes vers le sang. Dans cette étude, après une injection de morphine, des niveaux extrêmement faibles de M3G ont été observés dans le sang des souris génétiquement modifiées par rapport aux souris contrôles. Les auteurs ont évalué les quantités de M3G dans le cerveau et ont observé une absence de la M3G dans le cerveau des souris génétiquement modifiées malgré la présence de morphine (Zelcer et al., 2005). Ces résultats suggèrent que la M3G retrouvée dans le cerveau des souris contrôles provient de la périphérie.

Il est intéressant de noter, que *in vitro*, la stimulation avec du LPS n'altère pas le métabolisme de la morphine par les microglies primaires de rat suggérant que celui-ci est indépendant de l'état d'activation de la microglie (Togna et al., 2013). À l'inverse, l'activation des astrocytes primaires de rat par le LPS augmente la glucuronidation observée à l'aide de microsomes de ces cellules (Heurtaux et al., 2006). Ces résultats indiquent que la glucuronidation, au sein du SNC, est régulée de manière différente en fonction du type cellulaire. La régulation de l'expression des UGT semble faire intervenir des mécanismes différents dans le foie et le cerveau. Un traitement chronique à la pregnenolone-16 α -carbonitrile induit l'expression des UGT1A1 et 1A6 dans le foie de souris mais cette induction n'est pas observée dans le cerveau (Kutsuno et al., 2015). De même, le traitement chronique à la nicotine

induit l'augmentation de l'expression de l'UGT1A3 dans le cerveau de souris, mais pas dans le foie (Sakamoto et al., 2015).

En résumé, bien que les données concernant le métabolisme central de la morphine *in vivo* soient limitées, plusieurs évidences *in vitro* indiquent que le métabolisme central de la morphine est possible et, que celui-ci diffère potentiellement du métabolisme périphérique du fait d'une régulation différente des enzymes impliquées. L'ensemble de ces spécificités font du métabolisme central un acteur potentiellement clef dans la modulation de l'antinociception à la morphine.

Excrétion

L'excrétion de la morphine et de ses métabolites se fait principalement par l'urine après passage dans les reins. En effet, cette excrétion dépend principalement de la filtration glomérulaire et de la sécrétion tubulaire rénale (Van Crugten, Sallustio, Nation, & Somogyi, 1991). La dépendance de l'excrétion de la morphine et ses métabolites envers les fonctions rénales est d'autant plus marquée chez les patients atteints de déficience rénale. Chez ces patients, on constate une accumulation des métabolites de la morphine dans le plasma (Faura et al., 1998; Franken et al., 2016; Sjogren, Dragsted, & Christensen, 1993). Cette accumulation est normalisée après transplantation rénale illustrant l'importance de la fonction rénale dans l'élimination des métabolites (R. Osborne, Joel, Grebenik, Trew, & Slevin, 1993).

Activité biologique des métabolites glucuronidés de la morphine

Depuis le début des années 1970, les principaux métabolites de la morphine ont été décrits pour posséder des activités biologiques. D'une part, la M6G possède une forte affinité pour les MOR du SNC et son injection produit une analgésie. D'autre part, la M3G semble posséder des effets pronociceptifs pouvant s'opposer aux effets antinociceptifs de la morphine et de la M6G via son action sur le TLR4 localisé dans le SNC (**Figure 22**). Cependant, les effets de la M3G et ses mécanismes d'action sont encore débattus.

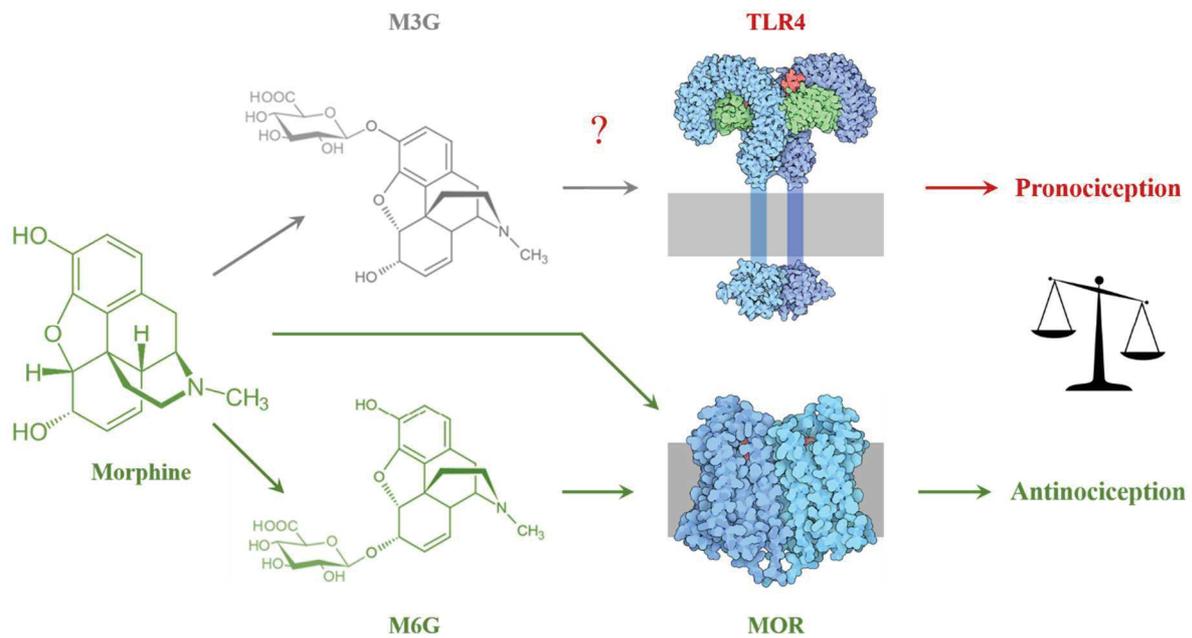


Figure 22 : Activités biologiques des métabolites principaux de la morphine

Le métabolisme de la morphine produit majoritairement deux métabolites, la M3G et la M6G. La morphine et la M6G produisent un effet antinociceptif puissant via leur liaison aux MOR. La M3G possède un effet pronociceptif qui pourrait impliquer l'activation du TLR4. Il existe ainsi une balance métabolique qui pourrait moduler l'antinociception à la morphine. **M3G**, morphine-3-glucuronide, **M6G**, morphine-6-glucuronide ; **MOR**, récepteur opioïde μ ; **TLR4**, récepteur toll-like 4

Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique pour la M3G et la M6G

La M3G et la M6G sont relativement lipophiles, ce qui leur permet de traverser la BHE. Toutefois, la perméabilité de la BHE pour ces métabolites est assez faible (Bickel, Schumacher, Kang, & Voigt, 1996; Carrupt et al., 1991; Gaillard, Pierre-Alain, & Testa, 1994; D. Wu, Kang, Bickel, & Pardridge, 1997; Yoshimura, Ida, Oguri, & Tsukamoto, 1973). En comparaison à la morphine pour laquelle un rapport entre les concentrations trouvées dans le cerveau et celles trouvées dans le sang est environ égal à 0.6, on estime qu'environ 10 % seulement de la M3G et de la M6G, présentes dans le sang, pénètrent dans le cerveau. En effet, chez l'humain, on retrouve dans le LCR en moyenne $0,11 \pm 0,02$ fois les quantités de M3G et $0,13 \pm 0,03$ fois les quantités de M6G observées dans le plasma (Goucke et al., 1994; Meineke et al., 2002; Poulain et al., 1990; M. T. Smith et al., 1999; van Dongen et al., 1994; Wolff et al., 1995, 1996). Ces résultats suggèrent également que chez l'humain, il n'existe pas de différences entre la M3G et la M6G dans la perméabilité de la BHE. La perméabilité de la M3G semble être légèrement

plus faible chez le rongeur et le lapin pour lesquels on évalue ces rapports à 0,05 en moyenne (Mignat, Jansen, & Ziegler, 1995; Murphey & Olsen, 1994; R. Xie et al., 1999).

Il semblerait qu'il existe, au même titre que pour la morphine, un transport actif des glucuronides vers le SNC (Bouw, Xie, Tunblad, & Hammarlund-Udenaes, 2001). Certaines évidences suggèrent l'implication de l'OATP2 et du transporteur du glucose 1 (GLUT-1) dans le transport de la M6G. Ces transporteurs sont exprimés des deux côtés de la BHE et pourraient ainsi être responsables de l'entrée et de la sortie de la M6G dans le SNC (Bourasset, Cisternino, Temsamani, & Scherrmann, 2003; R. Xie, Bouw, & Hammarlund-Udenaes, 2000). Dans cette étude, les auteurs ont également mis en évidence l'absence de transport de la M6G par la P-gp et le MRP1, bien que des contradictions existent dans la littérature concernant la P-gp (Lotsch et al., 2002; R. Xie et al., 1999).

La morphine-6-glucuronide

Lors de ma thèse, j'ai travaillé exclusivement sur la souris. Puisque la M6G n'est pas produite dans cette espèce, ces effets seront simplement brièvement évoqués (Dahan & Lotsch, 2015; Klimas & Mikus, 2014; Lotsch & Geisslinger, 2001).

En 1970, une première étude observe un effet analgésique suite à l'injection s.c., intrapéritonéale (i.p.) ou i.c.v. de M6G. De manière intéressante, cet effet analgésique semble être plus puissant que celui de la morphine et est aboli par l'administration de nalorphine, un antagoniste des MOR. De plus, une tolérance aux effets antinociceptifs de la M6G est également observée (Shimomura et al., 1971). À partir de ces premières données, plusieurs études ont étudié le potentiel de la M6G comme alternative au traitement à la morphine. Plusieurs études ont reproduit les résultats de Shimomura et collaborateurs et retrouvent, dépendamment de la voie d'administration et de l'espèce, des effets analgésiques comparables ou plus importants que ceux de la morphine (Abbott & Palmour, 1988; Frances, Gout, Monsarrat, Cros, & Zajac, 1992; Paul, Standifer, Inturrisi, & Pasternak, 1989; Qian-Ling, Hedner, Bjorkman, & Hedner, 1992; Stain et al., 1995; van Crugten, Somogyi, Nation, & Reynolds, 1997). L'action de la M6G dépend de l'interaction avec les récepteurs opioïdes comme en témoigne l'abolition de l'effet antinociceptif en présence d'un antagoniste de ces récepteurs (Abbott & Palmour, 1988; Paul et al., 1989; Shimomura et al., 1971). Plus précisément, l'ablation de l'exon 2 du MOR-1 abolit l'effet antinociceptif de la M6G (Schuller et al., 1999). Celle-ci possède effectivement une forte affinité pour les MOR, comparable à celle de la morphine (Z. R. Chen, Irvine, Somogyi, &

Bochner, 1991; Christensen & Jorgensen, 1987; Loser et al., 1996; Pasternak, Bodnar, Clark, & Inturrisi, 1987). Il est intéressant de noter qu'au même titre que la morphine, la M6G possède également une affinité pour les DOR et les KOR bien que celles-ci soient moins fortes et que les valeurs observées varient en fonction des études (Frances et al., 1992; Loser et al., 1996).

Paradoxalement, bien que la M6G possède une affinité similaire pour les MOR à celle de la morphine, la M6G produit un effet analgésique plus important. La M6G induit *ex vivo* des courants potassiques sortants dans les neurones du LC de rat plus importants que ceux induits par la morphine (P. B. Osborne, Chieng, & Christie, 2000), et une plus forte inhibition des réponses évoquées par les fibres C que la morphine (Sullivan, McQuay, Bailey, & Dickenson, 1989). Afin d'expliquer ce paradoxe, plusieurs groupes ont suggéré des différences entre la M6G et la morphine dans leurs efficacités relatives, leurs affinités pour les différents variants des MOR et dans leurs cinétiques d'entrée et d'élimination du SNC (Bouw et al., 2001; Frances et al., 1992; Lotsch & Geisslinger, 2001; P. B. Osborne et al., 2000; Schuller et al., 1999). L'action de la M6G sur les MOR lui confère également des effets non analgésiques comparables à ceux de la morphine, tels que des effets secondaires sur le système de la récompense et sur le système respiratoire (Abbott & Franklin, 1991; Qian-Ling et al., 1992).

Chez l'humain, la M6G a été décrite pour participer à l'analgésie lors de l'infusion de morphine (Portenoy, Thaler, Inturrisi, Friedlander-Klar, & Foley, 1992) et son injection i.t. provoque une analgésie plus importante par rapport à celle induite par la morphine (D. Grace & Fee, 1996; Hanna, Peat, Woodham, Knibb, & Fung, 1990). Certaines études ont également observé l'effet analgésique de la M6G après une injection intraveineuse (i.v.) (R. Osborne et al., 1992; Penson et al., 2000; Romberg et al., 2007; T. W. Smith, Binning, & Dahan, 2009; P. I. Thompson et al., 1995). Néanmoins, ces données sont contestées par d'autres études dans lesquelles aucun effet n'est observé (Lotsch, Kobal, Stockmann, Brune, & Geisslinger, 1997; Motamed et al., 2000). L'injection de M6G chez l'humain provoque une dépression respiratoire (D. Grace & Fee, 1996; Hasselstrom, Berg, Lofgren, & Sawe, 1989; Tiseo et al., 1995). Ces évidences sont appuyées par la dépression respiratoire prolongée qui est observée chez les patients avec une déficience rénale pendant laquelle la M6G s'accumule dans le sang (Bodd et al., 1990; R. J. Osborne, Joel, & Slevin, 1986). La M6G semble posséder un profil thérapeutique assez similaire à celui de la morphine. Toutefois, celle-ci semble provoquer des effets secondaires légèrement moins prononcés (Hanna, Elliott, & Fung, 2005). Le décours de l'analgésie est également différent pour la M6G qui induit une apparition de l'analgésie plus tardive en comparaison à la morphine (Binning et al., 2011; Cann, Curran, Milner, & Ho, 2002).

Observations comportementales

Etudes en faveur des effets pronociceptifs de la M3G

La M3G est dénuée d'effet analgésique après injection s.c., i.c.v. ou dans la PAG (Pasternak et al., 1987; Shimomura et al., 1971). De manière surprenante, de nombreuses évidences suggèrent qu'elle possède un effet neuroexcitateur chez le rongeur qui pourrait s'opposer aux effets antinociceptifs de la morphine et de la M6G (un tableau récapitulatif est présenté en **Annexe 1**). Par exemple, l'injection i.t. ou i.c.v. de M3G induit un comportement d'excitation généralisée considérable chez le rongeur, marqué notamment par l'apparition d'une hyperalgésie, des épisodes d'épilepsie, voir la mort de l'animal à forte dose (Bartlett, Cramond, & Smith, 1994; Bian & Bhargava, 1996; Labella, Pinsky, & Havlicek, 1979; Woolf, 1981; Yaksh & Harty, 1988; Yaksh, Harty, & Onofrio, 1986). Sur la base de ces résultats, les effets pronociceptifs de la M3G ont été évalués après injection directe de M3G ou lorsque celle-ci est coadministrée avec de la morphine ou de la M6G. Chez le rongeur, l'administration en i.p., s.c. et i.t. de M3G provoque une hyperalgésie thermique et mécanique (Allette et al., 2017; Arout, Caldwell, McCloskey, & Kest, 2014; Blomqvist et al., 2020; Due et al., 2012; Juni et al., 2006; Komatsu et al., 2016; Komatsu et al., 2009; S. S. Lewis et al., 2010; Roeckel et al., 2017). De plus, la coadministration i.t., i.p., i.c.v. ou sous forme d'infusion de M3G avec de la morphine ou de la M6G chez le rongeur réduit l'effet analgésique observé en comparaison à l'administration de morphine ou de M6G seule (Ekblom, Gardmark, & Hammarlund-Udenaes, 1993; Faura, Olaso, Cabanes, & Horga, 1996; Faura, Olaso, & Horga, 1997; Gardmark, Karlsson, Jonsson, & Hammarlund-Udenaes, 1998; Qian-Ling et al., 1992; M. T. Smith, Watt, & Cramond, 1990). De manière intéressante, Smith et collaborateurs ont infusé de la morphine en continue chez le rat et ont constaté que plus le ratio métabolique M3G/morphine était élevé dans le plasma, plus le degré d'antinociception était faible, indépendamment des quantités plasmatiques de morphine ou de M3G (G. D. Smith & Smith, 1995). Barjavel et collaborateurs ont observé la même relation inversement proportionnelle entre l'antinociception et le ratio métabolique M3G/morphine dans le liquide cortical extracellulaire après injection s.c. de morphine chez le rat (M. J. Barjavel, Scherrmann, & Bhargava, 1995). Ces résultats suggèrent l'existence d'une balance métabolique entre la morphine, responsable de l'effet analgésique, et la M3G, produisant des effets pronociceptifs. L'implication de la M3G dans les effets

secondaires de la morphine a été décrite, et notamment dans la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine et l'OIH (Blomqvist et al., 2020; Faura et al., 1997; Gong, Hedner, Hedner, Bjorkman, & Nordberg, 1991; Roeckel et al., 2017; G. D. Smith & Smith, 1995).

La présence du groupement glucuronide pourrait être à l'origine de l'effet pronociceptif de la M3G. La M3G n'est pas le seul métabolite 3-glucuronide qui a été décrit pour produire un effet pronociceptif. Plusieurs études publiées par le même laboratoire ont montré que l'estradiol-3-glucuronide ainsi que l'éthyle-glucuronide, un des métabolites de l'éthanol, produit une hyperalgésie lorsqu'ils sont administrés par voie i.t. (S. S. Lewis et al., 2015; S. S. Lewis et al., 2013). Un effet similaire est observé lors de l'administration directe d'acide glucuronide par voie i.t. révélant l'importance de ce groupement dans l'hyperalgésie induite par ces différents composés (S. S. Lewis et al., 2013). Pour appuyer ces évidences, d'autres métabolites 3-glucuronides ont été décrits pour produire une hyperalgésie tels que la normorphine-3-glucuronide, la noroxymorphine-3-glucuronide ou l'hydromorphine-3-glucuronide (G. D. Smith, Prankerd, & Smith, 1997; Wright, Mather, & Smith, 2001; Yaksh & Harty, 1988).

Chez l'humain, il existe peu d'évidences de l'implication de cette balance métabolique dans l'analgésie. Smith et collaborateurs ont pu constater que, chez 14 patients cancéreux, l'amélioration de l'analgésie morphinique est corrélée avec une diminution des ratios M3G/(morphine + M6G) dans le LCR (M. T. Smith et al., 1999). Par ailleurs, dans une étude de modélisation pharmacocinétique-pharmacodynamique chez 50 patients avec une douleur modérée à sévère, les effets de la M3G semblent s'opposer aux effets analgésiques de la morphine (Mazoit, Butscher, & Samii, 2007). Six études de cas suggèrent que des concentrations plasmatiques de M3G élevées, ainsi que le ratio M3G/M6G dans le plasma et le LCR, pourraient participer au développement de l'hyperalgésie induite par la morphine (Sjogren, Thunedborg, Christrup, Hansen, & Franks, 1998). D'autres études de cas évoquent une éventuelle implication de la M3G dans certains effets secondaires observés après des injections de doses élevées de morphine. Ces données sont toutefois difficiles à interpréter au vu de l'hétérogénéité des cas étudiés, et aucune d'entre elles ne prouvent l'implication de la M3G dans ces phénomènes (Hagen & Swanson, 1997; Kronenberg et al., 1998; Morley, Miles, Wells, & Bowsher, 1992; Rozan, Kahn, & Warfield, 1995; Sjogren et al., 1998).

Etudes en défaveur des effets pronociceptifs de la M3G

Il existe une certaine controverse autour des effets pronociceptifs de la M3G (**Annexe 1**). Premièrement, chez le rongeur, toutes les études ne font pas forcément état d'un effet pronociceptif après injection directe de M3G ou coadministration avec de la morphine ou de la M6G (Bian & Bhargava, 1996; Ekblom et al., 1993; Lipkowski, Carr, Langlade, Osgood, & Szyfelbein, 1994; Ouellet & Pollack, 1997; Salem & Hope, 1997; Suzuki, Kalso, & Rosenberg, 1993). Par exemple, Ouellet et collaborateurs ont infusé de la M3G pendant 12 h chez le rat et n'ont observé aucun effet sur la réponse nociceptive de base, ni sur l'effet antinociceptif de la morphine (Ouellet & Pollack, 1997). De manière surprenante, il a même été noté que chez le rat, la coadministration i.v. de M3G avec de la morphine pouvait provoquer une amélioration de l'antinociception induite et une diminution de la tolérance (Lipkowski et al., 1994). Aucun effet de la M3G seule n'a été observé dans cette étude. Dans un modèle de souris génétiquement modifiée pour ne pas exprimer le MPR3, l'antinociception et l'hyperalgésie induites par la morphine sont identiques à celles observées chez les contrôles, bien que ces souris ne montrent pas de M3G ni dans le sang, ni dans le cerveau (Swartjes et al., 2012; Zelcer et al., 2005).

Chez l'humain, le constat est d'autant plus appuyé. Un certain nombre d'études n'ont pas observé de corrélation entre l'analgésie et les quantités de M3G ou son ratio métabolique M3G/(morphine + M6G) dans le plasma et le LCR (Andersen, Christrup, Sjogren, Hansen, & Jensen, 2002; Goucke et al., 1994; Samuelsson et al., 1993; Toce, Kim, Chung, & Krauss, 2019; Wolff et al., 1995, 1996). Par exemple, Samuelsson et collaborateurs ont injecté de la morphine par voie épidurale à des patients cancéreux et ont observé l'effet analgésique par échelle analogue visuelle en parallèle des quantités de morphine et de M3G dans le plasma et le LCR. Ils n'ont pu établir aucune corrélation entre l'analgésie et les quantités de M3G ou son ratio métabolique M3G/morphine dans le LCR (Samuelsson et al., 1993). Ces résultats ont été reproduits par le même groupe après administration chronique par voie orale et s.c. (Wolff et al., 1995, 1996). Deux études réalisées par le même groupe alimentent grandement la controverse. En effet, Penson et collaborateurs ont réalisé deux études dans lesquelles la M3G est directement injectée chez l'humain ou coadministrée avec de la morphine ou de la M6G (Penson et al., 2000; Penson, Joel, Clark, Gloyne, & Slevin, 2001). La première étude est randomisée en double aveugle et contrôlée à l'aide d'un groupe placebo (Penson et al., 2000). Dans cette étude, la M3G est infusée par voie i.v. chez 10 patients sains volontaires. L'analgésie a été mesurée par échelle analogue visuelle et numérique dans un modèle de douleur submaximale ischémique. Aucune hyperalgésie, dysphorie ou effet sur le système respiratoire

n'a été observé lorsque la M3G était infusée seule. De plus, lors de la coadministration de morphine ou de M6G avec de la M3G, aucune modulation de l'analgésie induite n'a été observée en comparaison avec la morphine ou la M6G seule. Lors de la deuxième étude, cette fois-ci, non contrôlée et en simple aveugle, mais dans laquelle trois doses différentes de M3G ont été injectées par voie i.v. à des patients volontaires sains (dont la dose maximale correspond à celle utilisée dans la première étude), aucun effet de la M3G n'a été observée (Penson et al., 2001). Ainsi, les études chez l'humain sont très controversées. L'existence d'une étude randomisée, contrôlée et en double aveugle dans laquelle aucun effet de l'injection directe de M3G chez l'humain n'est observé suggère que la M3G n'est pas impliquée dans la modulation de l'analgésie à la morphine. On notera tout de même le très faible effectif de cette étude et l'implication de patients sains qui ne présentaient, à la base, aucune douleur. De par l'existence de données précliniques et cliniques contradictoires, il est difficile de conclure quant aux effets de la M3G chez l'humain. Les données existantes chez le rongeur sont, néanmoins, plus consistantes.

Cibles pharmacologiques

Chez le rongeur, les mécanismes sous-jacents aux effets de la M3G sont également controversés. D'une part, la M3G possède une affinité très faible pour les récepteurs opioïdes (de l'ordre du μM), ce qui est cohérent avec son absence d'effet analgésique (Z. R. Chen et al., 1991; Christensen & Jorgensen, 1987; Labella et al., 1979; Pasternak et al., 1987). Cette affinité apparente, bien que faible de base, a même été proposée pour être la conséquence de la présence de très faibles doses contaminantes de morphine dans les expériences réalisées (Bartlett & Smith, 1995; Loser et al., 1996). De plus, plusieurs études ont montré la présence des effets neuroexcitateurs de la M3G (et de forte dose de morphine) injectée directement dans le SNC en présence de naloxone ou de naltrexone (Halliday, Bartlett, Colditz, & Smith, 1999; Labella et al., 1979; Woolf, 1981; Yaksh & Harty, 1988; Yaksh et al., 1986). L'ensemble de ces évidences suggèrent que la M3G produit ses effets par le biais d'un autre récepteur que les récepteurs opioïdes. Cependant, une autre étude a mis en évidence la nécessité du MOR dans l'hyperalgésie produite par la M3G. Dans cette étude, la M3G produit une hyperalgésie thermique et mécanique robuste qui est absente dans un modèle de souris génétiquement modifiées pour ne pas exprimer le MOR (Roeckel et al., 2017).

À partir de ces premières études, l'existence d'un récepteur non-opioïde a été proposée, sur lequel la morphine ou la M3G agirait. Plus particulièrement, des évidences *in vitro*, *in vivo* et *in silico* proposent que la M3G, au même titre que la morphine (cf. section, *Effets sur le système immunitaire*), peut se lier au complexe TLR4-facteur de différenciation myéloïde 2 (MD-2) (Allette et al., 2017; Due et al., 2012; P. M. Grace et al., 2014; Hutchinson et al., 2010; S. S. Lewis et al., 2010; K. Wang et al., 2021; X. Wang et al., 2012; N. Xie et al., 2017). Par exemple, la M3G a été montrée *in vitro* comme capable d'activer significativement le TLR4 à travers l'utilisation d'une lignée de cellules embryonnaires de rein humain (HEK) surexprimant le gène humain du TLR4, ainsi qu'un gène rapporteur de l'induction de la signalisation de ce récepteur. Cette activation est inhibée par l'application de LPS-RS, un antagoniste spécifique du TLR4 (S. S. Lewis et al., 2010). Par ailleurs, *in vivo*, l'hyperalgésie induite par l'administration i.p. de M3G est abolie par l'administration d'un inhibiteur du TLR4, ou dans un modèle de souris modifiée génétiquement pour ne pas exprimer le TLR4 (Allette et al., 2017; Due et al., 2012). En conséquence, la M3G semble posséder des effets inflammatoires par le biais de l'augmentation de l'expression du facteur nucléaire κ B (NF- κ B) et de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α (Doyle & Murphy, 2018; P. M. Grace et al., 2014; S. S. Lewis et al., 2010; K. Wang et al., 2021). En résumé, l'ensemble de ces évidences suggèrent que la M3G agit par le biais du TLR4 pour induire la libération de cytokines proinflammatoires résultant en un effet pronociceptif. À partir de ces données, et au vu des nombreuses études qui suggèrent l'implication du TLR4 dans les effets secondaires de la morphine (cf. section, *La tolérance et la neuroinflammation*), la M3G a été proposée pour participer au développement de la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine (Blomqvist et al., 2020; Juni et al., 2006). Il est cependant important de noter que, au même titre que pour la morphine, deux études robustes postulent que le TLR4 n'est pas impliqué ni dans l'effet antinociceptif de la morphine, ni dans la tolérance antinociceptive, ni dans l'OIH (Fukagawa et al., 2013; Mattioli et al., 2014).

Ainsi, plusieurs études suggèrent l'implication du TLR4 dans les effets de la M3G, bien qu'une étude postule la nécessité du MOR dans l'hyperalgésie provoquée par son administration (Roedel et al., 2017). Il est important de noter qu'il est également possible que la M3G produise ces effets par le biais d'un autre récepteur alternatif inconnu.

Effets neuronaux

La M3G est décrite pour moduler l'activité neuronale (Allette et al., 2017; Arout et al., 2014; Bartlett, Cramond, et al., 1994; Bartlett, Dodd, & Smith, 1994; Due et al., 2012; Due et al., 2014; Hemstapat, Monteith, Smith, & Smith, 2003; Moran & Smith, 2002). Par exemple, la M3G augmente l'excitabilité des neurones des DRG d'une manière similaire au LPS, et cet effet dépend de l'activation du TLR4 (Allette et al., 2017; Due et al., 2012; Due et al., 2014). L'implication des courants sodiques voltage-dépendants a successivement été démontrée dans ce phénomène à l'aide de la carbamazépine, un inhibiteur des canaux sodiques voltage-dépendants (Due et al., 2014).

Les récepteurs NMDA apparaissent comme centraux dans les effets de la M3G. En effet, des résultats obtenus à l'aide de la technique d'imagerie calcique indiquent que la M3G provoque l'excitation des neurones embryonnaires hippocampaux en culture, et que cet effet est aboli en présence d'un inhibiteur des récepteurs NMDA, mais pas de la naloxone. L'entrée de calcium dans la cellule, provoquée par la M3G, ne semble pas être liée au recrutement des stocks calciques intracellulaires mais à l'activation indirecte des récepteurs NMDA (Hemstapat et al., 2003). De plus, l'excitation comportementale induite par l'administration i.t. ou i.c.v. de M3G chez le rat est atténuée par le prétraitement ou la coadministration d'un antagoniste des récepteurs NMDA (Bartlett, Cramond, et al., 1994; Komatsu et al., 2009). Dans la même série d'expériences, Komatsu et collaborateurs ont montré l'implication de la voie monoxyde d'azote-guanosine monophosphate cyclique-protéine kinase G (NO-cGMP-PKG) en réponse à l'activation des récepteurs NMDA qui pourrait être responsable de l'excitabilité neuronale (Komatsu et al., 2009).

Dans une certaine mesure, ces résultats sont cohérents avec l'absence d'affinité de la M3G pour le récepteur NMDA et son incapacité à moduler la libération de glutamate par des synaptosomes de cerveau entier (Bartlett, Dodd, et al., 1994; Bartlett & Smith, 1996). Dans une expérience d'électrophysiologie *ex vivo* sur des tranches de moelle épinière, Moran et collaborateurs ont montré que la M3G réduisait les courants postsynaptiques inhibiteurs dans les neurones des lamina I et II sans avoir d'effet sur les courants postsynaptiques excitateurs. Cet effet semble prendre pour origine un mécanisme présynaptique qui n'est pas inhibé en présence de naloxone, cependant, l'identité des neurones enregistrés était inconnue (Moran & Smith, 2002). Il est important de noter que la libération de GABA par des synaptosomes de cerveau entier n'est pas inhibé par la M3G, ni la morphine (Bartlett & Smith, 1996). Néanmoins, une suppression locale de la libération de GABA, par exemple, dans la moelle

épineière ou dans des régions cérébrales discrètes, n'est pas à exclure. D'autres études supplémentaires amènent d'autant plus de complexité et postulent qu'*in vivo*, chez le rat anesthésié, aucun effet de la M3G n'a été observé sur la réponse des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière évoquée par les fibres C, ni sur l'activité des neurones du LC (Hewett, Dickenson, & McQuay, 1993; P. B. Osborne et al., 2000; Sullivan et al., 1989).

En résumé, la M3G possède des effets neuroexcitateurs et pronociceptifs qui pourraient éventuellement impliquer l'activation du TLR4. Cette activation provoquerait la libération de cytokines proinflammatoires et l'augmentation de l'excitabilité des neurones impliqués dans la transmission nociceptive. De plus, d'autres mécanismes impliquant indirectement les récepteurs NMDA et l'inhibition présynaptique des neurones GABAergiques de la moelle épinière, pourraient également participer aux effets de la M3G, bien que certaines études suggèrent le contraire.

Il est intéressant de noter que la M3G a également été décrite pour avoir d'autres effets. Par exemple, chez le rat, l'administration i.t. de M3G provoque une facilitation du réflexe de miction. Cet effet est exacerbé en présence de naloxone. Il est intéressant de noter que les auteurs ont également constaté une excitation comportementale après l'injection i.t. de M3G (Igawa, Westerling, Mattiasson, & Andersson, 1993). Par ailleurs, *in vitro*, la M3G possède un effet immunomodulateur sur les cellules du système immunitaire, et notamment sur la prolifération des lymphocytes B (Thomas, Bhargava, & House, 1995). Enfin, lorsque la M3G est injectée i.c.v. avec de la M6G, elle potentialise les effets métaboliques et hormonaux de la M6G, notamment sur la concentration plasmatique de glucose, et ce, bien que la M3G ne semble pas induire d'effets métaboliques directement (Hashiguchi, Molina, & Abumrad, 1995).

Un tableau récapitulant les différentes études concernant les cibles pharmacologiques et les effets sur l'activité neuronale de la M3G est présenté dans l'**Annexe 2**. Ce travail bibliographique sur la M3G a abouti à l'écriture d'une revue en cours de soumission à *British Journal of Pharmacology*. Ce travail est présenté en **Annexe 3**.

Dimorphisme sexuel dans l'analgésie à la morphine

Chez l'humain, il existe une variabilité interindividuelle importante des effets analgésiques et des effets secondaires de la morphine (Aubrun, Langeron, Quesnel, Coriat, &

Riou, 2003; Baber, Bapat, Nichol, & Koren, 2016; Maier et al., 2002; Nielsen et al., 2015; Riley et al., 2006; H. S. Smith, 2008). Ces variations ont pour origine des facteurs environnementaux, psycho-sociaux et biologiques associés à l'expérience de la douleur. Il est ainsi difficile de généraliser une approche thérapeutique qui puisse aboutir à un traitement optimal chez tous les patients. Parmi la pléthore de variables cliniques qui influencent l'expérience de la douleur et l'analgésie à la morphine, l'importance du genre, de l'âge, de l'ethnicité et de la génétique a été démontrée (Aubrun, Salvi, Coriat, & Riou, 2005; Cepeda & Carr, 2003; Fujita et al., 2010; Konstantatos et al., 2012). Lors de ma thèse, j'ai étudié exclusivement les différences d'antinociception liées au sexe chez la souris. C'est pourquoi, ces différences et leurs origines potentielles seront abordées dans cette partie de mon manuscrit.

Par soucis de clarté, pour les études chez l'humain présentées dans le manuscrit, le terme « sexe » remplace de manière imprécise le terme « genre ». Le sexe se réfère aux caractéristiques biologiques alors que le genre inclut une dimension sociétale importante qui impacte l'évaluation et le traitement de la douleur chez l'humain (Fillingim, King, Ribeiro-Dasilva, Rahim-Williams, & Riley, 2009; Richie, 2019). Par conséquent, dans les études présentées, bien que les groupes aient été constitués en fonction du sexe, l'évaluation de la douleur est influencée par le genre.

Différences d'analgésie et d'effets secondaires liées au sexe chez l'humain

Dans le contexte actuel où la prévalence de la douleur chronique est plus importante chez la femme (Umeda & Kim, 2019), la grande majorité des études précliniques qui ont été réalisées chez le rongeur sur la douleur impliquent des mâles, bien que la situation tende enfin à évoluer (**Figure 23**) (Mogil, 2020). Chez l'humain, plusieurs études font un état des lieux des différences liées au sexe dans la douleur et l'analgésie morphinique (Fillingim et al., 2009). En clinique, plusieurs études ont tenté de répondre à deux questions principales :

- (i) est-ce qu'il existe une différence d'analgésie induite par la morphine entre les hommes et les femmes ?
- (ii) est-ce que les effets secondaires se développent de la même façon chez les hommes et les femmes ?

Plusieurs études ont rapporté des résultats contradictoires (**Tableau 3**) (Aubrun et al., 2005; Bijur et al., 2008; Cepeda & Carr, 2003; Comer et al., 2010; Fillingim et al., 2009; Gordon

et al., 1995; Larijani, Goldberg, Gratz, & Warshal, 2004; Miller & Ernst, 2004; Nielsen et al., 2015; Niesters et al., 2010; Pisanu et al., 2019; Pud et al., 2006; Sarton et al., 2000).

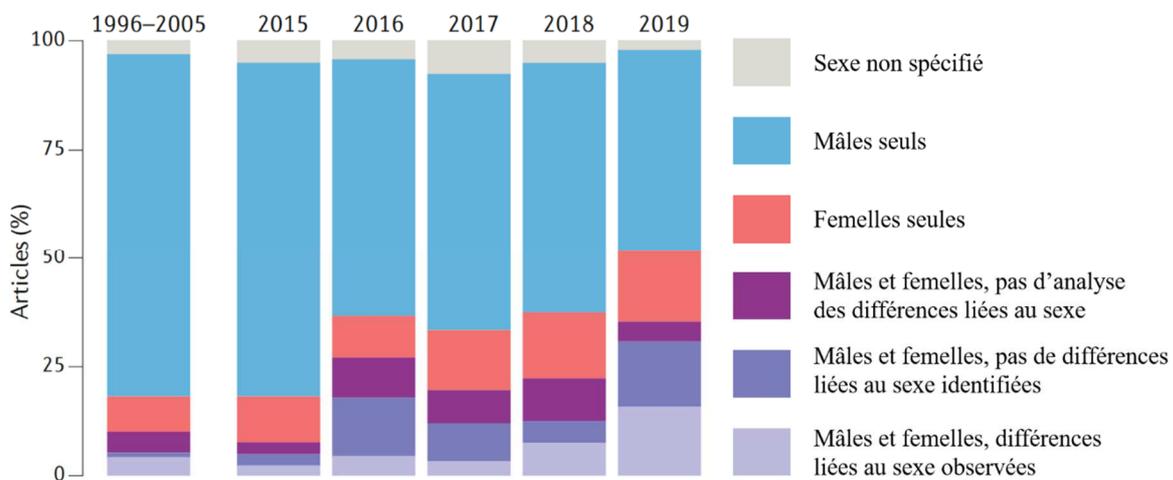


Figure 23 : Evolution du choix du sexe des animaux utilisés dans les études publiées dans le journal *Pain* entre 2015 et 2019

Le nombre d'études, publiées dans *Pain* dans lesquelles uniquement des animaux mâles sont utilisés tend à diminuer, au profit de l'augmentation de celles où uniquement des femelles sont utilisées. Une forte tendance est également observée dans l'augmentation des études qui utilisent les deux sexes et qui analysent les différences observées. Il est important de noter que ces articles ne représentent qu'une petite proportion du nombre d'articles publiés sur la douleur. Le pourcentage d'articles sur la période allant de 1996 à 2005 est représenté à titre de comparaison. **Adapté à partir de Mogil, 2020.**

Par exemple, Cepeda et collaborateurs ont évalué chez 423 femmes et 277 hommes la dose de morphine postopératoire nécessaire pour atteindre un soulagement minimal, intermédiaire et maximal de la douleur suite à un acte chirurgicale. Dans les trois catégories, les femmes nécessitaient des doses plus importantes de morphine par rapport aux hommes (Cepeda & Carr, 2003). De manière similaire, et sur un effectif conséquent de 4317 patients (46 % de femmes et 54 % d'hommes), il a été montré que les femmes nécessitent des doses plus élevées de morphine pour soulager leur douleur lorsque celle-ci est injectée par voie i.v. dans la période postopératoire suivant une chirurgie. Néanmoins, bien que les différences observées soient statistiquement significatives à cause de l'effectif important de l'étude, celles-ci restent relativement faibles (11 % de différences) (Aubrun et al., 2005). Dans une étude sur la douleur postopératoire en double aveugle, randomisée et contrôlée par placebo, l'injection i.v. de faible dose de morphine semble soulager la douleur mesurée à l'aide d'une échelle verbale (aucune -

faible – modérée – sévère) chez les hommes, contrairement aux femmes, bien que ces dernières témoignent d’une plus grande satisfaction quant à la prise en charge de la douleur par le traitement (Larijani et al., 2004).

<i>Référence</i>	<i>Patients</i>	<i>Administration</i>	<i>Modèle douleur</i>	<i>Efficacité morphine</i>
Sarton, 2000	10 F / 10 H	i.v.	Douleur expérimentale	F > H
Cepeda, 2003	423 F / 277 H	i.v.	NRS - Postopératoire	H > F
Aubrun, 2005	1983 F / 2334 H	i.v.	VAS - Postopératoire	H > F
Miller, 2004	22 F / 24 H	i.v.	VAS – douleur aiguë	H = F (mais tendance H > F)
Comer, 2010	10 F / 8 H	i.m.	Douleur expérimentale	H = F
Pud, 2006	12 F / 9 M	oral	Douleur expérimentale	F > H
Bijur, 2008	211 F / 144 M	i.v.	NRS – douleur aiguë	H = F
Larijani, 2004	25 F / 12 M	i.v.	Echelle verbale - postopératoire	H > F
Gordon, 1995	11 F / 6 M	i.v.	VAS - Postopératoire	H = F
Filligim, 2005	61 F / 39 M	i.v.	Douleur expérimentale	H = F

Tableau 3 : Etudes cliniques et expérimentales évaluant les différences d’analgésie à la morphine liées au sexe

Les études dans lesquelles la morphine a été administrée par analgésie contrôlée par le patient ne sont pas répertoriées ici. **H**, homme ; **F**, femme ; **i.m.**, intra-musculaire ; **i.v.**, intra-veineuse ; **NRS**, échelle d’évaluation numérique ; **VAS**, échelle analogue visuelle.

À l’inverse, Sarton et collaborateurs ont évalué l’effet analgésique de la morphine par voie i.v. et son métabolisme chez 10 volontaires sains de chaque sexe à l’aide d’une stimulation électrique transcutanée. À partir des valeurs de tolérance à la douleur en présence de morphine et des dosages de morphine dans le sang, ils ont réalisé des modèles pharmacocinétiques-pharmacodynamiques et ont estimé la concentration requise dans le SNC pour produire un effet anti-douleur. Ils ont constaté que cette concentration était inférieure chez les femmes que chez les hommes. Néanmoins, le début de l’analgésie est plus tardif chez les femmes et l’analgésie est plus longue. De manière intrigante, durant cette étude, un nombre plus important d’effets

secondaires liés à la morphine a été observé chez les femmes que chez les hommes. Aucune différence de métabolisme liée au sexe n'a été observée dans cette étude (Sarton et al., 2000). Il est tout de même important de noter le faible effectif utilisé dans cette étude et l'absence de dosage de la morphine dans le LCR.

Certaines études ont également indiqué qu'il n'existe aucune différence d'analgésie à la morphine entre les hommes et les femmes. Comer et collaborateurs ont réalisé une étude en double-aveugle contrôlée avec l'utilisation d'un placebo sur 8 hommes et 10 femmes volontaires sains à l'aide du test mécanique de pression et du test de pression au froid. Après une injection intramusculaire de morphine, ils n'ont constaté aucune différence liée au sexe dans la sensibilité à la morphine. Ils ont cependant observé des effets aversifs subjectifs plus importants chez les femmes que chez les hommes (Comer et al., 2010). De manière similaire, les hommes et les femmes ne présentaient pas de différence d'analgésie dans une étude incluant 211 femmes et 144 hommes lors d'une douleur aiguë nécessitant l'administration i.v. de morphine. Néanmoins, les femmes présentaient une incidence d'effets secondaires aversifs plus élevée que les hommes (Bijur et al., 2008).

Dans une méta-analyse sur les différences d'analgésie à la morphine entre les hommes et les femmes incluant 19 études cliniques dans lesquelles la morphine était utilisée, aucune différence liée au sexe n'a été statistiquement observée. Dans ces 19 études, les protocoles d'administration sont assez hétérogènes. On distingue les études dans lesquelles la morphine est administrée par analgésie contrôlée par le patient (PCA), et les autres modes d'administration. La PCA est un mode d'administration de morphine permettant au patient qui reçoit de la morphine en continue, d'obtenir un supplément à sa demande. L'analgésie par PCA est évaluée par la quantité de morphine consommée. L'une des conclusions de la méta-analyse suggère que, lorsque la morphine est administrée par PCA, les femmes montrent une analgésie plus forte que les hommes car elles consomment moins de morphine. Dans ce contexte, il est possible que la consommation plus faible de morphine chez les femmes ne reflète pas un effet analgésique plus fort, mais plutôt des effets secondaires plus importants. Il aurait été intéressant d'exclure les études dans lesquelles la morphine est administrée par PCA, afin d'évaluer s'il existe des différences liées au sexe lorsque la morphine est administrée par le biais des autres modes d'administration (Niesters et al., 2010). Cependant, les résultats concernant les études cliniques expérimentales sont plus tranchés et suggèrent que la morphine produit un effet analgésique plus important chez la femme que chez l'homme (Niesters et al., 2010). En résumé, en fonction des protocoles d'administration, des effectifs utilisés et des méthodes utilisées pour

évaluer la douleur, les résultats varient grandement. Le constat est un peu plus net quant aux différences liées au sexe dans les effets secondaires de la morphine qui sont souvent plus prononcés chez les femmes (Bijur et al., 2008; Cepeda & Carr, 2003; Comer et al., 2010; Dahan, Sarton, Teppema, & Olievier, 1998; Fillingim et al., 2005; Sarton, Teppema, & Dahan, 1999).

Différences d'analgésie et d'effets secondaires liées au sexe chez le rongeur

Chez le rongeur, les différences liées au sexe sont beaucoup plus tranchées. Bien sûr, il existe une certaine controverse, mais la majorité des études réalisées chez le rongeur suggèrent que l'antinociception induite par la morphine est supérieure chez le mâle, qu'elle soit injectée de manière systémique ou centrale (Boyer, Morgan, & Craft, 1998; Candido et al., 1992; Cataldo et al., 2005; Cicero, Nock, & Meyer, 1996, 1997; Cicero, Nock, O'Connor, & Meyer, 2002; Craft, 2003; Craft, Stratmann, Bartok, Walpole, & King, 1999; Doyle, Eidson, Sinkiewicz, & Murphy, 2017; Doyle & Murphy, 2018; Holtman & Wala, 2005; Islam, Cooper, & Bodnar, 1993; Ji, Murphy, & Traub, 2006; Kepler, Kest, Kiefel, Cooper, & Bodnar, 1989; Kest, Wilson, & Mogil, 1999; Krzanowska & Bodnar, 1999; Krzanowska, Ogawa, Pfaff, & Bodnar, 2002; Lipa & Kavaliers, 1990; A. Liu et al., 2018; Loyd, Morgan, & Murphy, 2008; Loyd, Wang, & Murphy, 2008; Mogil, Chesler, Wilson, Juraska, & Sternberg, 2000; Peckham, Barkley, Divin, Cicero, & Traynor, 2005; X. Wang, Traub, & Murphy, 2006). Par exemple, Cicero et collaborateurs ont observé un ED₅₀ de la morphine de 8,5 mg/kg chez le rat mâle et 11,7 mg/kg chez la femelle après administration s.c. de morphine (Cicero et al., 2002). Des résultats similaires ont été observés chez la souris pour laquelle des injections s.c. et i.c.v. de morphine produisent une analgésie plus forte chez le mâle que chez la femelle (Kest et al., 1999; A. Liu et al., 2018). Il est important de noter que ces différences sont également observées lors de l'injection de morphine directement dans la vIPAG ou la RVM (Boyer et al., 1998; Krzanowska & Bodnar, 1999; Krzanowska et al., 2002). Certaines études contestent ces résultats et suggèrent soit, une absence de différence liée au sexe, soit une analgésie plus forte chez les femelles que chez les mâles (Kanarek & Homoleski, 2000; Kasson & George, 1984; Kest, Palmese, & Hopkins, 2000; Kest et al., 1999). Cependant, le consensus actuel est de considérer que la morphine produit une analgésie plus forte chez le mâle que chez la femelle.

De manière similaire, il est suggéré que les effets secondaires de la morphine, notamment la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine, sont différents entre les mâles

et les femelles (Barrett, Cook, Turner, Craft, & Picker, 2001; Craft et al., 1999; Holtman & Wala, 2005; Juni, Klein, Kowalczyk, Ragnauth, & Kest, 2008; Kest et al., 2000; A. Liu et al., 2018; Loyd, Morgan, et al., 2008). Il a été montré que les rats femelles développent une hyperalgésie plus forte que les mâles suite à des doses ultra faibles de morphine ou lors de l'infusion continue de morphine (Holtman & Wala, 2005; Juni et al., 2008). Par ailleurs, il semblerait que les rats mâles développent une tolérance plus importante que les rats femelles (Craft et al., 1999), bien que ces données soient contestées (Barrett et al., 2001).

Mécanismes impliqués dans les différences liées au sexe dans les effets de la morphine

Effets activationnels et organisationnels des hormones sexuelles

Un nombre conséquent d'articles se sont focalisés sur l'étude de l'implication des hormones dans les différences d'effets de la morphine liées au sexe. On distingue les effets activationnels, (effets directs de l'action des hormones sur leur récepteur) et les effets organisationnels (effets des hormones pendant le développement de l'organisme qui se répercutent sur l'architecture du SNC).

Plusieurs études ont attribué les différences liées au sexe dans l'analgésie aux effets organisationnels des hormones. Par exemple, la castration postnatale chez le rat mâle abolit les différences liées au sexe dans l'analgésie à la morphine à l'âge adulte. De manière similaire, la supplémentation postnatale de testostérone chez la femelle aboutit au même résultat (Cicero et al., 2002). À l'inverse, la gonadectomie à l'âge adulte ne semble pas avoir d'effet sur ces différences liées au sexe, suggérant l'implication des effets organisationnels plutôt qu'activationnels des hormones dans ces différences (Candido et al., 1992; Cataldo et al., 2005; Cicero et al., 1996; Cicero et al., 2002; Kepler et al., 1989; Krzanowska et al., 2002).

Il est cependant important de noter que certaines études ont répertorié des effets de la manipulation des hormones à l'âge adulte sur les différences liées au sexe dans l'antinociception à la morphine (Baker & Ratka, 2002; Craft, Ulibarri, Leidl, & Sumner, 2008; Stoffel, Ulibarri, & Craft, 2003). L'antinociception due à la morphine varie en fonction du cycle estrien chez la femelle, bien que ces variations ne soient pas toujours observées (Krzanowska & Bodnar, 1999; Loyd, Wang, et al., 2008; Peckham et al., 2005; Stoffel et al., 2003; Turner, Lomas, & Picker, 2005). La supplémentation à l'estradiol chez les femelles ovariectomisées à l'âge adulte produit une fluctuation de l'antinociception à la morphine (Craft et al., 2008; Ratka

& Simpkins, 1991). De plus, la gonadectomie chez le mâle adulte produit une diminution de l'ED₅₀ de la morphine, bien que ces résultats soient contraires aux études présentées ci-dessus (Stoffel et al., 2003).

La tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine semble également être influencée par les hormones (X. Bai, Wang, Zhang, Feng, & Zhang, 2020; Juni et al., 2008; Karami, Hosseini, Khodabandehloo, Khatami, & Tairani, 2011; Shekunova & Bernalov, 2006). Par exemple, les souris femelles ovariectomisées à l'âge adulte présentent une tolérance moins importante suite à l'administration chronique de morphine par rapport aux souris non ovariectomisées (Karami et al., 2011). De manière similaire, l'administration d'estradiol chez la femelle ovariectomisée à l'âge adulte facilite le développement de la tolérance aux effets antinociceptif de la morphine (Shekunova & Bernalov, 2006).

Ainsi, les effets des hormones sur les différences liées aux sexes dans l'antinociception à la morphine sont incontestables, mais leurs origines restent débattues. Au regard de la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine, l'implication des hormones est beaucoup moins documentée.

Dimorphisme sexuel dans l'expression des récepteurs opioïdes μ

Un dimorphisme sexuel dans l'expression des MOR et dans leur fonctionnalité a été associé aux différences d'antinociception observées entre les mâles et les femelles. L'expression des MOR dans la PAG, une structure clef dans l'analgésie morphinique, est associée à un dimorphisme sexuel. L'expression des MOR est significativement plus importante dans cette région cérébrale chez le mâle (Bernal, Morgan, & Craft, 2007; Loyd, Wang, et al., 2008). De plus, son expression varie selon le cycle chez la femelle. La lésion sélective des neurones exprimant ces MOR dans la PAG réduit considérablement l'effet analgésique de la morphine après administration uniquement chez le mâle. Ces résultats suggèrent l'existence d'un réseau neuroanatomique sous-jacent à la douleur qui diffère entre les mâles et les femelles (Loyd, Wang, et al., 2008). L'expression des MOR dans le LC est également plus importante chez le mâle, ainsi que l'inhibition induite par le [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin (DAMGO) dans ces neurones (Enman, Reyes, Shi, Valentino, & Van Bockstaele, 2019; Guajardo, Snyder, Ho, & Valentino, 2017). L'expression des variants du MOR est également influencée par le sexe. En effet, différents variants du MOR montrent des motifs d'expression qui sont influencés par le sexe et par les régions cérébrales dans

lesquelles ils sont exprimés, comme en témoignent les différences dans les niveaux d'ARN messagers observés (A. Liu et al., 2018). Il est cependant important de noter que les niveaux d'ARN messagers ne corrèlent pas toujours avec les quantités de protéines traduites.

En termes de fonctionnalité des MOR, des différences liées au sexe ont également été observées (Craft, Tseng, McNiel, Furness, & Rice, 2001; Eckersell, Popper, & Micevych, 1998; Enman et al., 2019; Gonzales et al., 2011; Micevych, Rissman, Gustafsson, & Sinchak, 2003; Mitrovic et al., 2003; Schwindinger, Borrell, Waldman, & Robishaw, 2009; Torres-Reveron et al., 2009). Il a été suggéré que la réserve des MOR est influencée par le sexe, bien que les résultats observés soient peu reproductibles en fonction des agonistes utilisés (Craft et al., 2001). Le trafic et la localisation cellulaire des MOR semblent être différents chez les mâles et les femelles (Enman et al., 2019), et les estrogènes sont à priori capables de provoquer l'internalisation des MOR par le biais de leur action sur les récepteurs estrogènes α modulant ainsi leur disponibilité (Eckersell et al., 1998; Micevych et al., 2003; Torres-Reveron et al., 2009). La signalisation des MOR semble, quant à elle, également être la source d'un dimorphisme sexuel chez l'animal. Les différences liées au sexe dans l'antinociception à la morphine sont abolies dans un modèle de souris génétiquement modifiées pour ne pas exprimer les canaux GIRK-2 (Mitrovic et al., 2003). À l'inverse, aucune différence liée au sexe n'a été observée dans l'affinité de la morphine pour les MOR, ni dans l'activation de la protéine G par le MOR (Kepler et al., 1991; Peckham et al., 2005; Selley et al., 2003).

Dimorphisme sexuel dans l'anatomie du circuit PAG-RVM des contrôles descendants

Au niveau neuroanatomique, le développement du circuit PAG-RVM, qui est impliqué dans le contrôle de la douleur et l'antinociception à la morphine, est influencé par le sexe. Il a été montré, d'une part, que l'organisation anatomique de ce circuit présente un dimorphisme sexuel, et d'autre part, que le recrutement de ce réseau est différent chez les mâles et les femelles. Premièrement, il semble, en effet, que les femelles montrent un nombre de neurones rétromarqués plus important dans la vIPAG lors de l'administration du Flurogold (*i.e.* un traceur rétrograde) dans la RVM. Ces résultats suggèrent qu'il existe un nombre de projections de la vIPAG vers la RVM différent chez les mâles et les femelles (Loyd & Murphy, 2006). Deuxièmement, en absence de douleur, la morphine provoque une activation (observée à l'aide d'un marquage c-fos) de ces mêmes neurones de manière moins prononcée chez les femelles (Loyd, Morgan, & Murphy, 2007).

Au sein de ce circuit, l'implication des cellules gliales dans les différences d'antinociception induites par la morphine entre les mâles et les femelles a été montrée. En effet, les mâles traités à la minocycline (inhibiteur de la microglie) par gavage montrent une analgésie plus forte à la morphine. Cet effet n'est pas observé chez les femelles (Posillico, Terasaki, Bilbo, & Schwarz, 2015). De plus, il semblerait que le pourcentage de microglies dans un état réactif dans la vlPAG soit supérieur chez la femelle que chez les mâles (Doyle et al., 2017). Dans la continuité de cette étude, les auteurs ont administré du LPS par voie i.p. et ont constaté une augmentation du nombre de microglies réactives dans la vlPAG et une augmentation de l'expression des cytokines proinflammatoires, ces augmentations étant plus marquées chez les femelles. Enfin, il a été observé que l'inhibition du TLR4 directement dans la vlPAG potentialise l'analgésie à la morphine uniquement chez les femelles et abolit les différences liées au sexe dans l'antinociception induite par la morphine (Doyle et al., 2017). L'ensemble de ces évidences suggèrent une implication différentielle de la microglie dans la vlPAG chez les mâles et les femelles qui participeraient aux différences liées au sexe dans l'antinociception à la morphine. Il est cependant important de noter que ces résultats se basent sur l'observation de la morphologie, qui n'est pas un indicateur strict de l'état de la microglie. Toutefois, il indique que le microenvironnement dans lequel ces microglies se trouvent et/ou la sous-population à laquelle elles appartiennent sont différents (Stratoulis, Venero, Tremblay, & Joseph, 2019). De manière intéressante, il a été montré que les MOR exprimés par les microglies participent à la tolérance antinociceptive, à l'hyperalgésie induite par la morphine et à sa dépendance (Reiss, Maduna, Maurin, Audouard, & Gaveriaux-Ruff, 2020). Leur implication dans ces phénomènes semble dépendre du sexe (Reiss et al., 2020).

Dimorphisme sexuel dans le métabolisme de la morphine

Le métabolisme a également été considéré comme source potentielle pouvant expliquer les différences liées au sexe dans l'antinociception induite par la morphine et dans le développement de ses effets secondaires. En effet, chez le rongeur, la pharmacocinétique de la morphine définit les quantités de morphine et de M3G disponibles pour induire leurs effets. L'influence du sexe sur ces quantités a été peu étudiée. Une étude chez le rat suggère qu'après une infusion de morphine sur une période de 48 h, l'antinociception induite est inversement proportionnelle aux ratios M3G/morphine observés dans le plasma et non pas aux concentrations de morphine ou de M3G. Cette relation évolue beaucoup plus rapidement chez les mâles, qui développent une tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine plus

rapidement, que chez les femelles. Ces observations semblent être reliées à la testostérone responsable d'une clairance plus importante de la morphine chez le mâle que chez la femelle (South, Wright, Lau, Mather, & Smith, 2001). Dans une autre étude, les auteurs ont mesuré l'antinociception induite par l'administration aiguë de morphine à 10 mg/kg par voie i.v. chez des rats mâles et femelles. En parallèle, ils ont évalué les ratios M3G/morphine dans le plasma. Ils ont observé une antinociception plus faible chez les femelles qui est corrélée avec des ratios M3G/morphine plus élevés dans le plasma. Il est important de noter qu'ils n'ont pas observé de différences dans les concentrations plasmatiques de morphine, mais celles de M3G étaient significativement plus élevées dans le plasma des femelles (South, Edwards, & Smith, 2009). Par ailleurs, Baker *et* Ratka ont obtenu une conclusion similaire en mesurant l'antinociception et les niveaux de morphine et de M3G dans le plasma de rat mâles et femelles gonadectomisés ou non (Baker & Ratka, 2002). Ils ont également décrit des quantités plus élevées de M3G dans le plasma des femelles.

Il est cependant important de noter que cette corrélation entre les quantités plasmatiques de morphine et de métabolites glucuronidés dans le plasma et l'antinociception n'est pas toujours observée. Chez l'humain, notamment, Sarton et collaborateurs n'ont observé aucune différence dans les quantités de morphine et de M3G dans le plasma entre les deux sexes (Sarton et al., 2000). De plus, une autre étude a montré que les niveaux de morphine et de M6G étaient plus bas chez l'homme, alors que les niveaux de M3G étaient similaires à ceux retrouvés chez les femmes (McQuay et al., 1990).

Chez le rongeur, d'autres études suggèrent l'implication du métabolisme dans les différences mâles femelles observées dans l'antinociception induite par la morphine. D'une part, lorsque la M6G est injectée directement dans la PAG, elle produit une antinociception supérieure chez la femelle que chez le mâle. Pourtant, des différences opposées sont observées avec la morphine, bien que ces deux molécules partagent une cible commune (Doyle & Murphy, 2018). De plus, l'inhibition du TLR4, cible potentielle de la M3G, au sein de la vIPAG abolit les différences liées au sexe dans l'antinociception à la morphine (Doyle, 2017). Ces résultats suggèrent l'implication du métabolisme et de la M3G dans les différences liées au sexe observées. La M3G, elle-même, produit des effets influencés par le sexe lorsque celle-ci est injectée directement dans la PAG. Elle semble participer à la diminution de l'antinociception produite par la morphine injectée par voie systémique uniquement chez le mâle, bien que ces résultats soient difficilement conciliables avec les observations précédentes. À l'inverse, dans cette même étude, l'injection intra-PAG de M3G produit une augmentation de l'expression du

TNF α supérieure chez les femelles (Doyle & Murphy, 2018). D'autre part, Peckham et collaborateurs ont étudié les différences liées au sexe dans l'antinociception induite par plusieurs opioïdes. Ils ont identifié ces différences quasiment exclusivement avec les composés dont le métabolisme produit un métabolite 3-glucuronide, suggérant une implication majeure du métabolisme dans ces différences (Peckham & Traynor, 2006).

Objectifs

Au vu des évidences, il est probable que le métabolisme périphérique et central de la morphine influence les différences liées au sexe observées pour l'antinociception à la morphine et la tolérance antinociceptive chez la souris. En effet,

- (i) La morphine produit son antinociception principalement par son action au sein du SNC dans les structures impliquées dans la douleur, et sa concentration plasmatique ne corrèle pas forcément avec l'antinociception.
- (ii) La M3G semble posséder des effets pronociceptifs qui s'opposent aux effets antinociceptifs de la morphine *via* son action sur le TLR4 au sein du SNC.
- (iii) Il existe par conséquent une balance métabolique entre la M3G et la morphine qui semble influencer l'antinociception.
- (iv) Le rôle du TLR4 dans le développement de la tolérance à la morphine a été observé mais reste débattu.
- (v) Des adaptations de la balance métabolique M3G/morphine pourraient être impliquées dans le développement de la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine.

Ainsi, l'influence du sexe sur cette balance métabolique pourrait participer aux différences d'antinociception et de tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine observées entre les mâles et les femelles. Dans ce contexte, aucune étude à ce jour n'a évalué les différences liées au sexe dans cette balance au sein de structures clés du SNC impliquées dans le contrôle de la douleur. Lors de ma thèse, mon projet visait, dans un premier temps à,

- (i) **évaluer les différences liées au sexe dans l'antinociception et la tolérance aux effets de la morphine, ainsi que dans les effets pronociceptifs de la M3G,**
- (ii) **caractériser la balance métabolique dans le sang de souris mâles et femelles tolérantes ou non aux effets antinociceptifs de la morphine,**
- (iii) **évaluer si cette balance diffère au sein de régions impliquées dans le contrôle de la douleur dans ces mêmes conditions,**
- (iv) **déterminer s'il existe un métabolisme central de la morphine au sein de ces régions qui pourrait être responsable des potentielles différences observées.**

Dans un deuxième temps, des résultats préliminaires ont été obtenus quant aux mécanismes d'action de la M3G au sein du SNC.

Méthodes

Animaux

Les expériences ont été réalisées avec des souris C57BL/6J mâles et femelles âgées de 10 semaines (26 ± 4 g et 20 ± 4 g, respectivement). Elles ont été hébergées à 5 par cage selon leur sexe avec un cycle lumière/obscurité de 12 h/12 h et une température de 23 ± 2 °C. La nourriture et l'eau de boisson étaient disponibles *ad libitum*. Toutes les procédures réalisées chez ces animaux étaient en accord avec les directives européenne (2010/63/EU) et ont été approuvées par un comité d'éthique régional (CREMEAS) et par le Ministère de l'Agriculture (licence No. APAFIS# 23671-2020010713353847v5 et APAFIS#16719-2018091211572566v8 délivré au Dr. Goumon). De plus, la retranscription des résultats qui concernent les expériences animales est en accord avec les directives ARRIVES (Kilkenny, Browne, Cuthill, Emerson, & Altman, 2010).

Design expérimental

Au vu de l'importance du sexe comme variable biologique, particulièrement dans les études du système de la douleur (Mogil, 2020), toutes les expériences qui impliquent la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine, ont été réalisées chez des souris mâles et femelles selon un design factoriel 2x2 pour évaluer l'effet du sexe, du traitement chronique et de leur interaction. Ce design statistique permet notamment d'évaluer l'effet d'une variable, comme le sexe, dans deux conditions différentes au sein de la même expérience et permet de formuler des conclusions robustes. Les injections de morphine et de M3G conduites lors des expériences de comportements ont été réalisées en aveugle. Le nombre d'échantillon par groupe avait été désigné pour être égal. Cependant, du fait d'un problème technique avec les moelles épinières lombaires (LSC) et le sang des premières souris mâles, l'expérience de métabolisme central a été répliquée chez les mâles uniquement et toutes les structures ont été à nouveau extraites. Le nombre d'échantillon pour chaque structure chez les souris mâles a donc été augmenté. Aucune des premières interprétations statistiques n'a été impactée par ce changement.

Test d'immersion de la queue

Le test d'immersion de la queue évalue la réponse nociceptive d'un animal suite à une stimulation de modalité thermique au chaud. Il consiste à plonger les 2/3 de la queue de l'animal dans une eau chauffée à une température permettant d'induire une réponse nociceptive. Suite à ce stimulus, l'animal effectue un réflexe de retrait de la queue qui peut être observé et être mesuré par la latence de retrait de la queue. Cette latence caractérise le seuil nociceptif thermique de l'animal pour une température donnée. Elle permet d'évaluer l'effet d'un composé analgésique ou pronociceptif sur le seuil nociceptif.

Ce test a été réalisé selon les recommandations précédemment décrites (Elhabazi, Ayachi, Ilien, & Simonin, 2014). Les souris ont tout d'abord été habituées à leur nouvel environnement pendant une semaine après leur arrivée à l'animalerie (*i.e* sans manipulation). Puis, il était nécessaire d'habituer les souris à rentrer dans une grille de contention qui permet la rétention de l'animal pendant la mesure de latence de retrait de la queue. Ensuite, elles ont été testées tous les jours avec une eau chauffée à 47 °C à l'aide d'un bain-marie thermostatique. En l'absence de réponse, un point-limite a été fixé à 25 secondes afin d'éviter des dommages tissulaires. Les seuils nociceptifs de base des animaux ont été déterminés durant deux semaines et ont été considérés comme stable après trois jours de mesures uniformes. Les résultats de la phase de test sont exprimés en pourcentage d'effet maximal possible (MPE) selon la formule suivante :

$$\%MPE = \frac{(\textit{latence test}) - (\textit{latence baseline})}{(\textit{latence point limite}) - (\textit{latence baseline})} \times 100$$

Avec :

- la « latence test » correspondant à la latence mesurée pendant le test
- la « latence baseline » correspondant à la moyenne des trois dernières mesures stables de ligne de base
- la « latence point limite » à 25s

Caractérisation de la dose efficace moyenne de la morphine chez les souris mâles et femelles

Afin d'évaluer les différences liées au sexe dans l'effet analgésique de la morphine, nous avons déterminé la dose efficace moyenne (ED₅₀) de la morphine à l'aide du test d'immersion de la queue. Pour ce faire, nous avons utilisé 5 doses différentes de morphine (1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg et 20 mg/kg). En fonction du sexe, nous avons assigné des souris de manière aléatoire pour composer 5 groupes de 6 souris. Le jour du test, toutes les souris ont été pesées et injectées en i.p. avec une dose de morphine dissoute dans une solution de NaCl 0,9 %. Les souris ont été testées avant l'injection (ligne de base) et 30 min après l'injection afin d'évaluer l'effet antinociceptif de la morphine.

Protocole d'induction de la tolérance à l'effet antinociceptif de la morphine chez les souris mâles et femelles

La tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine a été induite par des injections quotidiennes de morphine chez des souris mâles et femelles durant 9 jours. En fonction du sexe, les souris ont été assignées de manière aléatoire de sorte à former deux groupes. Le premier groupe a reçu des injections i.p. quotidiennes de morphine 10 mg/kg dissoute dans de la solution saline (NaCl 0,9 %) pour induire la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine. Le deuxième groupe (groupe contrôle) a reçu des injections i.p. quotidiennes de solution saline (NaCl 0,9 %) à volume égal (5 µl/g). L'évolution de la mise en place de la tolérance a été testée quotidiennement, par le test d'immersion de la queue, avant l'injection et 30 min après l'injection pendant toute la durée du protocole (**Figure 24**).

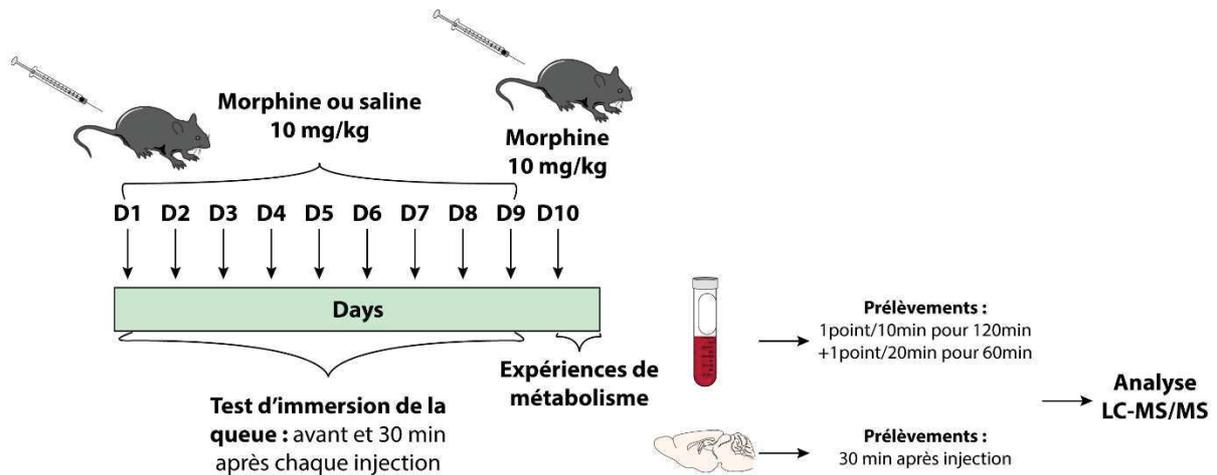


Figure 24 : Protocole d'induction de la tolérance et expériences de métabolisme

Les souris ont été injectées en i.p avec de la morphine 10 mg/kg ou une solution saline (NaCl 0,9 %, groupe contrôle) pendant 9 jours. Au jour 10 du protocole, toutes les souris ont été injectées en i.p avec de la morphine 10 mg/kg pour réaliser les expériences de métabolisme. Un groupe de souris a été dédié à l'expérience de métabolisme périphérique pendant laquelle 5 µl de sang ont été prélevés à la queue toutes les 10 min pendant 2 h, puis toutes les 20 min pendant la dernière heure de la procédure. Un autre groupe de souris a été assigné à l'expérience de métabolisme central et a été mis à mort 30 min après l'injection afin de prélever les régions cérébrales d'intérêts. LC-MS/MS, chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Evaluation de l'hyperalgésie induite par administration i.p. et i.t. de M3G chez les souris mâles et femelles

Afin de déterminer s'il existe un effet pronociceptif induit par la M3G, si cet effet est influencé par le sexe et si son origine est périphérique et/ou central, nous avons réalisé des injections i.p. et i.t. de M3G chez des souris mâles et femelles.

Injections i.p.

Les injections i.p. ont été réalisées pour déterminer si la M3G possède un effet pronociceptif périphérique et si cet effet diffère entre les mâles et les femelles. Cette expérience a été réalisée selon une procédure de dose cumulative à l'aide des doses de M3G diluées dans une solution saline (NaCl 0/9 %) suivantes : 1 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg et 20 mg/kg. Cette procédure consiste à injecter la première dose de M3G, tester l'animal à l'aide du test

d'immersion de la queue, puis de réinjecter après une période d'environ 45 min la même souris avec la deuxième dose de M3G, et ceci pour aboutir à un effet cumulatif des doses. Cette procédure est ensuite répétée pour l'ensemble des doses et permet de d'établir un modèle de l'évolution de l'effet de la M3G en fonction des doses pour chaque animal. Dans notre cas, les doses injectées correspondent à des quantités cumulées de 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg et 40 mg/kg. L'effet pronociceptif de la M3G a été évalué chez 10 souris mâles et 10 souris femelles avant l'injection afin d'obtenir une valeur de base, puis 30 min après chaque injection.

Injections i.t.

Les injections i.t. ont été réalisées pour déterminer si la M3G possède un effet pronociceptif central et si cet effet diffère entre les mâles et les femelles. Pour ce faire, nous avons utilisé 5 doses de M3G (0,01 µg, 0,5 µg, 1 µg, 2,5 µg, 5 µg diluées dans de la solution saline (NaCl 0,9 %)). En fonction du sexe, nous avons assigné de manière aléatoire 30 souris pour former 5 groupes (6 souris/dose/sexe). Les solutions d'injections stocks ont été préparées, puis assignées à une lettre de manière aléatoire (de A à E) de sorte à réaliser le test d'immersion de la queue en aveugle. Les souris ont d'abord été anesthésiées à l'isoflurane (3 %), puis ont été injectées avec une dose de M3G à l'aide d'une seringue Hamilton de 50 µl et d'une aiguille 27G stérile. Pour réaliser ces injections, l'espace intervertébral L5-L6 est d'abord localisé avec l'index. Ensuite, l'aiguille est insérée avec un angle de 70 degrés pour atteindre l'espace épidual. La réussite de l'insertion de l'aiguille dans cet espace est marquée par un réflexe de mouvement de la queue. La dose appropriée est dispensée dans un volume total de 10 µl. Ensuite, la souris est réintroduite dans sa cage jusqu'au réveil. L'effet pronociceptif de la M3G a été évalué à l'aide du test d'immersion de la queue avant l'injection pour obtenir une valeur de base et 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 4 h et 24 h après l'injection.

Métabolisme périphérique : méthode de prélèvement

Afin d'étudier le métabolisme périphérique de la morphine, nous avons réalisé des prélèvements sanguins à l'extrémité de la queue. Pour ce faire, les queues des souris C57BL/6J ont été anesthésiées localement par application topique de lidocaine/prilocaine 5 %. Après 5 min, une légère incision a été réalisée au bout de la queue et du sang a été collecté en utilisant un capillaire calibré hépariné. L'écoulement sanguin est ensuite stoppé par un coton

hémostatique. Puis, la plaie est légèrement grattée pour permettre un nouveau prélèvement et éviter ainsi une nouvelle incision. Après chaque prélèvement, le sang a été transféré dans un tube contenant 4 µl d'héparine qui a été immédiatement congelé à -20 °C pour stockage avant analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Cinétique métabolique périphérique de la morphine

Les cinétiques métaboliques périphériques de la morphine ont été réalisées au jour 10 du protocole d'induction de la tolérance chez des souris mâles et femelles contrôles (*i.e.* injection aiguë au jour 10) et tolérantes aux effets analgésiques de la morphine (**Figure 24**). Pour ce faire, 12 souris par groupe et par sexe ont été utilisées. Après incision, 5 µl de sang ont été collectés. Ensuite, toutes les souris ont été injectées en i.p. avec de la morphine 10 mg/kg dissoute dans de la solution saline (NaCl 0,9 %, 5 µl/g). Suite à l'injection, 5 µl de sang ont été prélevés toutes les 10 min sur une période de 2 heures puis toutes les 20 min pendant la dernière heure de la procédure.

Métabolisme et système nerveux central : méthode de prélèvement

Nous avons déterminé s'il existe des différences de quantités de morphine et de M3G dans la LSC, la PAG, l'amygdale et le bulbe olfactif (OB) dans nos conditions chez la souris C57BL/6J. Après mise à mort des souris par dislocation cervicale, nous avons prélevé le cerveau qui a été placé dans une matrice refroidit au préalable dans la glace. Cette matrice permet d'effectuer des tranches de cerveau de 1 mm. A l'aide d'un atlas de cerveau de souris et d'une loupe binoculaire, les structures d'intérêt ont été extraites à l'aide d'emporte-pièces de diamètre adéquat. Plus précisément, la PAG a été prélevée à l'aide d'un emporte-pièce de diamètre 1 mm, alors que les deux amygdales ont été prélevées à l'aide d'un emporte-pièce de diamètre 0,5 mm. Les OB ont été prélevés à la pince brucelles car il a été montré que les UGTs impliquées dans le métabolisme de la morphine y sont fortement exprimés (Heydel et al., 2010; Ouzzine et al., 2014). Pour finir, la LSC a été extraite par extrusion hydraulique comme décrit précédemment (Richner, Jager, Siupka, & Vaegter, 2017). Brièvement, une seringue de 5ml est remplie au préalable avec de la solution saline froide (NaCl 0,9 %) et une pointe de pipette de 200 µl est fixée au bout. Après mise à mort de l'animal, une ouverture est effectuée le long de la colonne vertébrale et celle-ci est dégagée en coupant les os des côtes de part et d'autre.

Ensuite, une section est réalisée au niveau de l'os pelvien pour sortir la colonne vertébrale. Une deuxième section est réalisée au niveau de l'insertion des côtes flottantes de sorte à isoler la section lombaire de la moelle épinière. Enfin, la pointe de pipette de 200 µl fixée au bout de la seringue est insérée dans la cavité spinale et la LSC est extraite en appliquant une pression constante sur la seringue. Une fois extraites, les structures ont été placées dans la carboglace et transférées à -80 °C pour stockage avant analyse par LC-MS/MS.

Evaluation des quantités de morphine et de M3G au sein du système nerveux central

Nous avons déterminé les quantités de morphine et de M3G retrouvées au sein des régions du SNC d'intérêt chez des souris mâles et femelles en conditions aiguë et de tolérance aux effets analgésiques de la morphine. Pour ce faire, au jour 10 du protocole, toutes les souris ont été injectées en i.p. avec de la morphine 10 mg/kg dissoute dans de la solution saline (NaCl 0,9 %) (**Figure 24**). Trente minutes après l'injection, les souris ont été mises à mort, 5 µl de sang ont été prélevés selon la même procédure que décrite précédemment et les structures d'intérêt ont été extraites. Nous avons utilisé 20 souris mâles et 13 souris femelles par condition. Ce design asymétrique est lié à une difficulté technique de quantification de la morphine et de la M3G au sein des moelles épinières et des sangs des 10 premiers mâles utilisés.

Etude du passage de la M3G par la barrière hémato-encéphalique

Pour évaluer le passage de la M3G par la BHE, nous avons injecté différentes concentrations de M3G chez des souris mâles et femelles naïves. Plus précisément, 15 animaux par sexe ont été divisés en 3 groupes de manière aléatoire. Ensuite, toutes les souris ont été pesées et injectées en i.p. avec de la M3G (5 µl/g) concentrée soit à 10 mg/kg, 20 mg/kg ou 40 mg/kg en fonction du groupe. Trente minutes après l'injection, les souris ont été mises à mort, 5 µl de sang ont été collectés et les structures cérébrales d'intérêts ont été extraites selon le protocole décrit ci-dessus.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

La LC-MS/MS est une technique analytique qui permet d'identifier et de quantifier une ou plusieurs molécules d'intérêts au sein d'un mélange liquide complexe. Elle combine (*i*) la capacité de la chromatographie liquide à séparer et purifier les molécules d'intérêts avec (*ii*) la sélectivité et la sensibilité de la spectrométrie de masse en tandem. Elle représente donc une approche de choix pour l'analyse de molécules d'intérêts au sein d'un échantillon biologique.

La chromatographie liquide permet de séparer et de purifier les molécules présentes dans l'échantillon selon leurs propriétés physico-chimiques en fonction de la colonne utilisée. Dans notre cas, les molécules sont éluées en fonction de leur profil d'hydrophobicité (colonne en phase inverse) et possèdent un temps de rétention (RT) précis. Un spectromètre de masse est un appareil qui permet d'identifier et de quantifier une molécule selon son rapport masse/charge (m/z). Il est composé de trois parties. La source permet d'ioniser les molécules et de leur conférer une charge. L'analyseur permet de séparer les ions en fonction de leur rapport m/z . Le détecteur transforme la quantité d'ions présente en signal électrique.

Le spectromètre de masse en tandem se réfère à l'addition d'une cellule de collision et d'un analyseur supplémentaire qui permet un gain de spécificité important en comparaison à un spectromètre de masse classique. Dans un spectromètre de masse en tandem, le premier analyseur permet la sélection d'un ion dit « parent », c'est-à-dire, d'un précurseur à un m/z donné. Cet ion parent, ainsi que tous les ions qui possèdent le même m/z , traversent ensuite une cellule de collision dans laquelle un gaz inerte (*e.g.* argon) est injecté et des énergies de collision données permettent de fragmenter le précurseur et de générer des ions appelés ions « fils » ou « transition ». Le deuxième analyseur permet alors la séparation et l'analyse de ces fragments. Ces ions fils sont caractéristiques de l'ion parent et lui procure une signature de fragmentation précise et unique, permettant d'identifier une molécule avec une très grande précision. Par ailleurs, les deux sélections successives permettent un gain de sensibilité important car elles permettent de limiter le nombre d'ions qui arrivent au détecteur et donc de réduire drastiquement le bruit de fond. Dans notre cas, l'appareil utilisé est un spectromètre de masse en tandem qui combine une source électrospray avec un triple quadripôle et d'un photomultiplicateur (**Figure 25**).

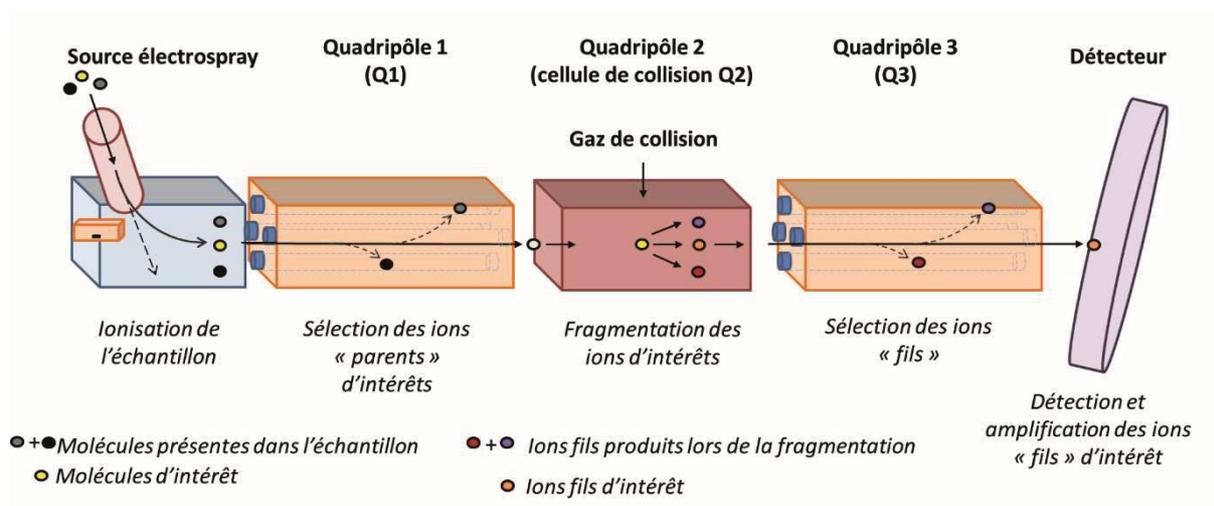


Figure 25 : La spectrométrie de masse triple quadripôle.

Un spectromètre de masse triple quadripôle est composé par une source électrospray, un triple quadripôle et un détecteur. Les molécules sont d'abord ionisées dans la source de l'appareil, puis une première sélection des ions parents a lieu. Dans la cellule de collision, les ions parents sont fragmentés en plusieurs ions fils. La sélection des ions fils se fait dans le troisième quadripôle puis ces ions rentrent en contact avec le détecteur qui les quantifie.

Cet appareil est de basse résolution ($\pm 0,2$ Da) et ne permet que l'analyse de petites molécules (< 2800 Da), mais il possède l'avantage d'avoir la capacité d'analyser un nombre important de molécules d'intérêts en même temps (multiple reaction monitoring, MRM, jusqu'à 500 transitions/seconde). Il génère alors un spectre de masse par molécule d'intérêt avec son RT observé en chromatographie liquide et son profil de fragmentation associé. Il convient donc à perfection à l'analyse de petites molécules telles que la morphine et ses métabolites. Sa capacité à analyser l'ensemble de ces molécules en même temps au sein d'un unique échantillon complexe, en fait un atout de choix pour les études pharmacocinétiques.

Pour résumer, la spécificité d'une molécule d'intérêt en LC-MS/MS est garantie par 3 caractéristiques propres à l'utilisation de cette technologie : le RT observé lors de la chromatographie liquide, le m/z de l'ion parent et son profil de fragmentation.

Quantification absolue par la méthode de dilution isotopique

La dilution isotopique est une méthode de quantification absolue utilisée en LC-MS/MS. Elle est basée sur l'ajout, à chaque échantillon, d'une quantité connue d'un isotope stable de la molécule d'intérêt. Cette molécule lourde possède un rapport m/z légèrement plus élevé que la molécule d'intérêt de par la présence, par exemple, d'un certain nombre de deutériums (^2H) à la place d'hydrogènes (^1H). Ce standard interne et la molécule d'intérêt possèdent des propriétés physico-chimiques identiques. En d'autres termes, ces deux molécules possèdent le même RT lors de leur passage sur la LC et très souvent, elles possèdent des profils de fragmentation identiques (au nombre de ^2H près). Leur distinction se fait alors par leur différence de m/z. L'ajout d'un tel standard en interne à chaque échantillon, au tout début de la procédure d'analyse, permet de s'affranchir de plusieurs contraintes telles que l'effet matrice (Van Eeckhaut, Lanckmans, Sarre, Smolders, & Michotte, 2009).

Puisqu'entre le composé d'intérêt et son standard, seul le m/z est différent, l'ajout d'une quantité donnée de l'isotope stable permet d'établir des rapports d'intensité entre le signal de la molécule d'intérêt et celui de son standard. Par conséquent, il est possible de déterminer la concentration du composé d'intérêt dans l'échantillon à partir de celle du standard ajouté. Cette méthode, à l'inverse de la quantification relative par gamme externe, est considérée comme une méthode de quantification absolue.

Préparation des échantillons et analyse LC-MS/MS

Avant d'analyser l'échantillon par LC-MS/MS, il est très souvent nécessaire de réaliser une pré-purification afin de décomplexifier l'échantillon. Durant mon travail de thèse, j'ai utilisé deux types de traitements : (i) la précipitation des protéines et (ii) la pré-purification par extraction en phase solide (SPE).

Préparation des échantillons de sang

Le jour de l'analyse, les sangs ont été décongelés et 10 μl d'un standard interne contenant 12 pmoles de morphine contenant 3 atomes de deutérium (D3-morphine) et 10,5 pmoles de M3G contenant 3 atomes de deutérium (D3-M3G) ont été ajoutés aux échantillons. Les échantillons ont ensuite été précipités en ajoutant 100 μl d'acétonitrile (ACN) 100 % froid, vortexés et centrifugés à 20 000 g à 4 °C pendant 15 min. Les surnageants ont été prélevés, évaporés sous vide et resuspendus dans 800 μl d'eau acidifiée avec de l'acide formique (AF ;

99,9 % H₂O, 0,1 % AF). Par la suite, les échantillons ont été purifiés à l'aide de cartouches de SPE HyperSep PGC (1 cc, 25 mg, Thermo Electron). Pour ce faire, les colonnes ont été d'abord conditionnées avec 1ml d'ACN puis lavées 2 fois avec 1ml d'eau acidifiée (99,9 % H₂O, 0,1 % AF) avant que les échantillons soient déposés sur la phase stationnaire. Ensuite, les cartouches ont été séchées pendant 1 minute à forte pression, puis lavées successivement avec 1ml d'eau acidifiée (99,9 % H₂O, 0,1 % AF) et 1ml d'ACN 2 % (2 % ACN, 97,9 % H₂O, 0,1 % AF). Enfin, l'élution a été réalisée avec 800 µl d'ACN 20 % (20 % ACN, 79,9 % H₂O, 0,1 % AF). Les éluas ont été centrifugés pendant 15 min à 20 000 g et 4 °C avant d'être évaporés et resuspendus dans 50 µl d'eau acidifiée (99,9 % H₂O, 0,1 % AF) afin d'être analysés par LC-MS/MS.

Préparation des échantillons de cerveau

Le jour de l'analyse, les échantillons ont été décongelés et soniqués (2 x 5 s, 100 W) dans 200 µl d'eau contenant 10 µl d'un standard interne contenant 40 pmoles de D3-morphine et 60 pmoles de D3-M3G). Après centrifugation pendant 10 min à 10 000 g à 4 °C, 10 µl de surnageant de chaque échantillon ont été précipités avec 100 µl d'ACN froid sur glace. Après 30 min, les échantillons précipités ont été centrifugés pendant 15 min à 20 000 g à 4 °C et les surnageants ont été évaporés sous vide. Finalement, les échantillons ont été repris dans 20 µl d'eau acidifiée (99,9 % H₂O, 0,1 % AF) pour être analysés en LC-MS/MS.

Préparation des surnageants de culture

Nous avons réalisé des expériences de métabolisme *in vitro* à l'aide de cultures primaires de cellules gliales. La quantité de M3G produite par ces cellules à partir de la morphine a été mesurée (cf. section, *Expérience de métabolisme de la morphine sur cellules gliales primaires*). Le jour de l'analyse, les surnageants de culture ont été décongelés et 10 µl d'un standard interne contenant 12 pmoles de D3-morphine et 10,5 pmoles de D3-M3G ont été ajoutés aux échantillons. Les surnageants ont ensuite été acidifiés avec de l'AF pour atteindre une concentration de 1 %. Par la suite, les échantillons ont été purifiés à l'aide de cartouches de SPE HyperSep PGC (1 cc, 25 mg, Thermo Electron) selon le même protocole que celui utilisé pour la purification des sangs (cf. section, *Préparation des échantillons de sang*). Les éluas ont été centrifugés pendant 15 min à 20 000 g et 4 °C avant d'être évaporés et resuspendus dans 30 µl d'eau acidifiée (99,9 % H₂O, 0,1 % AF) pour être analysés en LC-MS/MS.

Conditions d'analyse de la LC-MS/MS

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un système HPLC (Dionex Ultimate 3000 HPLC system, Thermo Electron) couplé à un spectromètre de masse en tandem Endura doté d'une source électrospray et d'un triple quadripôle (Thermo Electron). Les échantillons ont été chargés sur une colonne Zorbax SB-C18 en phase inverse (150 x 1 mm, 3,5 μ M, Agilent) à un débit de 90 μ l/min et une température de 40 °C. La caractérisation des 3 transitions les plus intenses, et l'optimisation des énergies de collision et des valeurs des lentilles RF, ont été réalisées manuellement en mode infusion. Plus précisément, chaque molécule d'intérêt a été infusée directement dans le spectromètre de masse en mode « full-scan » à une concentration de 10 μ M. Ce mode permet d'analyser la composition d'une solution en scannant l'ensemble des m/z compris dans une certaine gamme. Une fois le m/z d'intérêt sélectionné, les 3 transitions les plus intenses, les énergies de collisions et les valeurs des lentilles RF sont définies et optimisées par l'appareil. La qualification et la quantification des molécules d'intérêts dans les échantillons ont été réalisées en mode MRM à l'aide des 3 transitions les plus intenses. L'ensemble des conditions de la LC-MS/MS est résumé dans l'**Annexe 4**.

Quantification des protéines par la méthode de Bradford

La méthode de Bradford permet de déterminer la quantité totale de protéines au sein de chaque prélèvement de tissu. Cette technique permet de normaliser la quantité de morphine ou de M3G obtenue à l'aide de la LC-MS/MS en fonction de la quantité totale de protéine présente. Le principe de cette méthode repose sur un dosage colorimétrique qui se base sur une modification de l'absorbance à 595 nm. Cette modification se manifeste par le changement de couleur du bleu de Coomassie G-250 suite à sa liaison majoritairement aux acides aminés basiques (arginine, histidine et lysine) des protéines (Bradford, 1976). Dans un premier temps, une gamme étalon est réalisée en préparant des quantités croissantes d'albumine de sérum bovin (BSA, 0 μ g à 20 μ g). Ensuite, en fonction de la structure testée, de 1 à 5 μ l d'extraits tissulaires sont utilisés. Les volumes de chaque échantillon, ainsi que chaque point de la gamme, sont ajustés avec de l'eau ultrapure pour atteindre un volume final de 800 μ l. Après ajout de 200 μ l de réactif de Bradford, les cuves sont homogénéisées et incubées 20 min à température ambiante. L'absorbance à 595 nm est déterminée avec un spectrophotomètre. L'équation de la droite d'étalonnage obtenue grâce aux concentrations connues de BSA permet de calculer la

quantité de protéines présentes dans les extraits tissulaires. À partir des concentrations protéiques obtenues, les quantités de morphine et de M3G sont normalisées par mg de protéines.

Culture cellulaire

A l'aide de la culture cellulaire, nous avons étudié deux mécanismes différents :

- (i) le *métabolisme central* de la morphine *in vitro* par les glies
- (ii) l'origine des effets pronociceptifs de la M3G

Concernant les effets de la M3G, l'ensemble des études récentes au sein du SNC semble pointer vers l'implication du TLR4. Une étude conteste cette association et propose une cible alternative, le MOR. Cette étude est relativement convaincante dans la mesure où elle utilise un modèle transgénique qui permet de mettre en avant des évidences qui s'opposent à l'hypothèse du TLR4. Ainsi, pour l'expérience impliquant les effets cellulaires de la M3G, nous avons réalisé des cultures cellulaires à l'aide de deux modèles différents : l'un n'exprime pas le TLR4, l'autre n'exprime pas le MOR. Ces modèles sont toutefois différents et difficilement comparables l'un avec l'autre. Cependant, ils apportent tout deux des informations précieuses quant à l'implication du MOR et du TLR4 dans les effets de la M3G. L'ensemble des expériences impliquant la culture cellulaire a été réalisé en conditions stériles.

Lignée de cellules transgéniques : RAW-DUALTM & RAW-DUALTM KO-TLR4

Les lignées de cellules transgéniques RAW-DUALTM et RAW-DUALTM KO-TLR4 sont dérivées de la lignée de macrophages RAW 264.7. Elles expriment 2 gènes rapporteurs : le premier correspond à la phosphatase alcaline embryonnaire sécrétée (SEAP) sous le contrôle du promoteur de la protéine inflammatoire de macrophage (MIP-2). Le deuxième est la luciférase LUCIA sous le contrôle du promoteur du gène 54 dont l'expression est stimulée par les interférons (ISG54), en conjonction avec un élément de réponse à la stimulation aux interférons (ISRE). L'activité de ces deux promoteurs témoigne respectivement de l'activation de la voie NF-κB, et de celle des facteurs de régulations des interférons (IRF). Ces deux voies sont centrales dans la transduction du signal des TLRs. Par conséquent, l'expression des protéines rapporteuses est corrélée à l'activité des TLRs. L'avantage de ces modèles est que les deux protéines rapporteuses sont sécrétées dans le milieu de culture. Ainsi, il est possible de mesurer l'activation des TLRs en prélevant simplement un volume donné du milieu de culture. L'analyse est ensuite réalisée en mettant en contact les enzymes présentes ou non dans le

surnageant de culture prélevé et un substrat qui, lorsqu'il est converti par les enzymes, permet l'émission d'un photon capté par un photodétecteur. La quantité de photon enregistrée par le détecteur est alors proportionnelle (dans une certaine gamme dynamique) à la quantité d'enzymes présentes dans le surnageant et donc à l'activité des promoteurs qui dépendent des voies NF- κ B et IRF. La lignée RAW-DUALTM KO-TLR4 est une lignée dérivée de la lignée RAW-DUALTM qui n'exprime pas le TLR4. Elle permet ainsi de valider l'implication du TLR4 dans l'activation des voies NF- κ B et IRF suite à une stimulation avec un ligand d'intérêt.

Les cellules ont été cultivées avec du milieu minimum essentiel d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) stérile contenant une forte concentration de glucose (4,5 g/L), 10 % de sérum fœtal bovin inactivé (FBS ; l'inactivation du complément est réalisée pendant 30 min à 56 °C) supplémenté en L-glutamine (2 mM) et en pénicilline/streptomycine (100 μ g/ml). De plus, la normocine (une combinaison de trois antibiotiques supplémentaires fournis avec les lignées cellulaires) est ajoutée au milieu de culture à une concentration de 200 μ g/ml. Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de pétri (100 mm de diamètre x 15 mm) et maintenues à 37 °C et 5 % de CO₂. Elles ont été repiquées à 70 % de confluence à l'aide d'un râteau cellulaire, environ 2 fois par semaine et maintenues au maximum pendant 8 passages pour éviter la dérive génétique. Afin de sélectionner les cellules qui expriment les transgènes, la zeocine, un antibiotique de sélection, est fourni avec les lignées cellulaires. Cet antibiotique s'intercale à l'ADN des cellules et induit leur apoptose en l'absence de l'expression d'un gène de résistance (gène Sh ble qui code pour une protéine qui permet l'inactivation de la zeocine). Seules les cellules qui expriment les transgènes d'intérêts expriment le gène de résistance, ce qui permet de les sélectionner. La Zeocine (200 μ g/ml) a été ajoutée au milieu de culture à partir du passage 2 pour maintenir une pression de sélection sur les cellules.

Effets de la M3G sur les lignées RAW-DUALTM et RAW-DUALTM KO-TLR4

Afin d'évaluer si la morphine et la M3G sont capables de se lier et d'activer le TLR4, nous avons incubé les cellules RAW-DUALTM et RAW-DUALTM KO-TLR4 avec différentes concentrations de M3G et de morphine pendant 24 h, avant de réaliser l'analyse des surnageants. Pour ce faire, l'expérience s'est déroulée en deux étapes : (i) l'incubation des ligands et l'ensemencement des cellules (ii) l'analyse des surnageants. Cette expérience a été réalisée 4 fois de manière indépendante. Nous avons testé 4 concentrations de M3G (100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M) et de morphine (100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M) en triplicat par expérience. Nous avons réalisé plusieurs contrôles en triplicat : le milieu contenant 10 % de

FBS seul, les cellules incubées sans ligands, les cellules incubées avec du LPS (100 ng/ml) et les cellules incubées avec du LPS-EK (100 ng/ml). Le LPS-EK est un LPS produit par *E.Coli K12* qui active spécifiquement le TLR4. Dans notre expérience, il permet de valider l'absence d'activation du TLR4 dans la lignée RAW-DUALTM KO-TLR4.

(i) La première étape consiste à préparer les concentrations des ligands à incubé. Pour ce faire, les ligands ont été dilués avec le même milieu DMEM que celui utilisé pour la culture des cellules mais en l'absence de normocine et de zeocine. Ensuite, les cellules ont été lavées et décrochées de leur boîte à l'aide d'un râteau à cellules, centrifugées à 300 g pendant 5 min et comptées à l'aide du bleu Trypan et d'une cellule de Neubauer. Nous avons incubé 80 000 cellules par puits dans une plaque 96 puits, avec un volume final de 200 µl. Une fois l'incubation des ligands et l'ensemencement de cellules réalisés, les cellules ont été replacées dans l'incubateur pendant 24 h.

(ii) Après 24 h, 50 µl et 20 µl de surnageant ont respectivement été prélevés pour l'analyse de la SEAP et de la LUCIA. Ces analyses ont été réalisées à l'aide de kits commerciaux et d'un photodétecteur avec une exposition d'une seconde.

La culture primaire de cellules gliales

Nous avons réalisé deux expériences différentes à l'aide de cultures primaires de souris.

- (i) Afin d'étudier le métabolisme central de la morphine *in vitro*, nous avons réalisé des cultures primaires de microglies et d'astrocytes ainsi que des cultures mixtes de glies à partir de souris C57BL/6J.
- (ii) Afin d'étudier l'effet de la M3G sur la microglie *in vitro*, nous avons réalisé des cultures primaires de microglies à partir d'une lignée de souris transgéniques KO pour le MOR et de leur homologue non transgénique « sauvage ». Cette lignée de souris, décrite pour la première fois par Matthes et collaborateurs en 1996, est un outil précieux pour comprendre l'implication du MOR dans les effets de la M3G (Matthes et al., 1996).

Mise en culture et conditions d'entretien

Les cultures primaires ont été réalisées à partir de cerveaux de souriceaux âgés de 1 à 4 jours selon le protocole décrit par Lian et collaborateurs (Lian, Roy, & Zheng, 2016). Après décapitation, le cerveau a été prélevé et plongé dans de la solution saline équilibrée de Hank (HBSS) à 4 °C contenant 6 g/L de glucose et 10 mM d'hépès. Le cervelet et les bulbes olfactifs ont ensuite été retirés et les deux hémisphères ont été séparés. Chaque hémisphère a alors été coupé en fins morceaux qui ont ensuite été transférés dans 30 ml d'HBSS à 4 °C. Pour permettre la dissociation du tissu, 1,5 ml de trypsin (2,5 %) a été ajouté et le tout a été incubé pendant 15 min à 37 °C. Après 15 min, respectivement 1,2 ml d'un inhibiteur de trypsin (1 mg/ml) et 750 µl de DNase ont été ajoutés successivement pour stopper la réaction et digérer l'ADN provenant des cellules mortes. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 300 g pendant 5 min. Le surnageant a été aspiré, puis le culot de cellule a été repris dans 5 ml de milieu DMEM F12 à 37 °C contenant 10 % de FBS et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine. L'étape finale consiste à dissocier mécaniquement le tissu à l'aide d'une pipette de 1000 µl, puis à centrifuger le mélange obtenu à 500 g pendant 5 min. Le surnageant a ensuite été aspiré et repris dans 5 ml de milieu DMEM F12 à 37 °C. Les cellules ont alors étéensemencées dans des flasques T-75 traitées au préalable avec 5 ml de poly-D-lysine (10 µg/ml) diluée dans de l'eau stérile et ont été incubées à 37 °C et 5 % de CO₂. Le milieu a été changé le jour suivant la mise en culture, puis une fois par semaine.

Lorsque les cellules étaient à confluence, une partie a été allouée à la purification des microglies et des astrocytes, l'autre, à l'expérience de métabolisme sur cultures mixtes de glies. Pour cette dernière, les cellules dans les flasques ont été décrochées par ajout de 7,5ml de trypsin et ont été centrifugées 5 min à 500 g. Le surnageant a été aspiré et les cellules ont été reprises dans 1ml de milieu frais. Puis, les cellules ont été comptées à l'aide du bleu Trypan et d'une cellule de Neubauer et 500 000 cellules ont étéensemencées dans des boîtes de culture (60 mm de diamètre x 15 mm) traitées au préalable avec 1,5ml de poly-D-lysine (10 µg/ml). Les cultures ont alors été replacées dans l'incubateur jusqu'au début de l'expérience.

Purification des microglies et des astrocytes par tri cellulaire magnétique

Afin de purifier les microglies ou les astrocytes, nous avons utilisé la technique du tri cellulaire magnétique (MACS). Cette technique fait intervenir l'utilisation d'anticorps spécifiques couplés à des billes magnétiques qui permettent de retenir une population de cellule sur une colonne en fonction des protéines de surface qu'elle exprime. Après incubation avec

l'anticorps, les cellules sont déposées sur une colonne sous un champ magnétique puissant. Les cellules, qui expriment l'antigène correspondant à l'anticorps couplé aux billes magnétiques, sont alors retenues sur la colonne alors que les autres sont éliminées dans le volume mort. En retirant la colonne du champ magnétique, les cellules d'intérêts sont récupérées (**Figure 26**). Dans notre cas, nous avons utilisé un anticorps anti-CD11b spécifique des microglies et des macrophages ou un mix d'anticorps (anticorps anti-transporteur des acides aminés excitateurs (GLAST) couplé à la biotine et anticorps anti-biotine couplé à des billes magnétiques) pour purifier les astrocytes (Miltenyi Biotec). La pureté des cultures a été vérifiée à l'aide d'un marquage immunohistochimique de la molécule adaptatrice de liaison au calcium ionisé 1 (IBA1 ; marqueur de la microglie) et de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP ; marqueur des astrocytes).

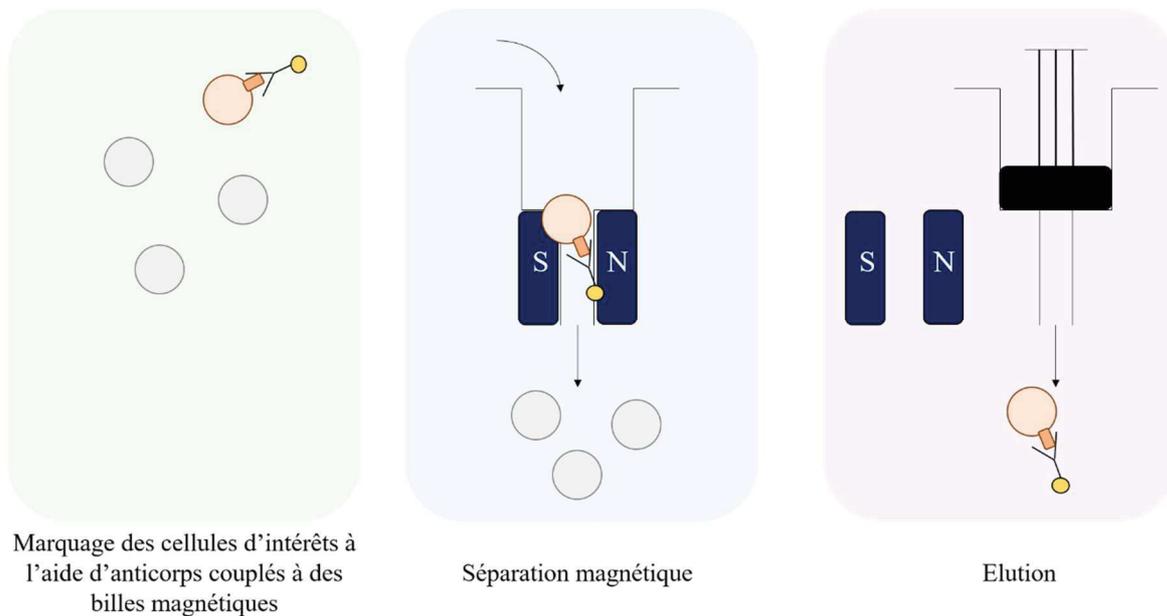


Figure 26 : Principe du MACS.

Les cellules sont d'abord mises en contact avec des anticorps (spécifiques pour une population d'intérêt) couplés à des billes magnétiques. Ensuite, les cellules sont passées sur une colonne placée dans un champ magnétique puissant. Seules les cellules qui expriment l'antigène d'intérêt sont alors retenues sur la colonne. L'élution se fait en retirant la colonne du champ magnétique et à l'aide d'un piston.

Microglies

Une fois les cellules en coculture à confluence, les milieux de cultures ont été prélevés, filtrés avec un filtre 40 μM et congelés. Ces milieux serviront de milieux conditionnés par les astrocytes, essentiels à la culture de microglies pures. Les cellules ont été décrochées de leur flasque par ajout de trypsine (5 ml) durant 15 min à 37 °C. Ensuite, la trypsine a été récoltée et la boîte a été nettoyée avec du milieu DMEM F12 frais (10 % FBS, 100 $\mu\text{g/ml}$ pénicilline/streptomycine, 2 mM glutamine) afin de récupérer les cellules restantes. L'ensemble a été mélangé et complété à 15 ml avec le même milieu. Puis, les cellules ont été centrifugées à 500 g pendant 5 min, le surnageant a été aspiré et le culot a été repris dans 90 μl d'un tampon phosphate salin (PBS) à 4 °C contenant de la BSA (0,5 %). 10 μl d'anticorps anti-CD11b couplés à des billes magnétiques ont été ajoutés, puis les cellules ont été incubées pendant 1 min à 4 °C. Pendant ce temps, les colonnes ont été mises en place au sein du champ magnétique et ont été conditionnées par ajout de 500 μl de la solution tampon. Avant de réaliser la purification sur colonne, les cellules ont été centrifugées à 500 g pendant 5 min. Le surnageant a été éliminé et le culot a été repris dans 500 μl de PBS contenant 0,5 % de BSA. Puis, les cellules ont été passées sur la colonne, et 3 lavages avec la solution tampon ont été réalisés. Enfin, les colonnes ont été écartées du champ magnétique et l'élution des microglies a été réalisée avec 1 ml de la solution tampon en appliquant une pression vive à l'aide d'un piston. Les cellules éluées ont une nouvelle fois été centrifugées à 500 g pendant 5 min. Le surnageant a été éliminé et le culot a été repris dans du milieu conditionné pour permettre (i) l'expérience de métabolisme de la morphine sur cultures et (ii) l'expérience d'imagerie calcique.

(i) Les cellules ont été comptées à l'aide du bleu Trypan et d'une cellule de Neubauer et 500 000 cellules ont étéensemencées avec du milieu conditionné dans des boîtes de culture (60 mm de diamètre x 15 mm) traitées au préalable avec 1,5 ml de poly-D-lysine (10 $\mu\text{g/ml}$). Les cellules ont été placées dans l'incubateur jusqu'au début de l'expérience.

(ii) Après reprise, les cellules ont été transférées dans des petites boîtes de culture stériles adaptées au poste d'imagerie calcique et enduite au préalable avec 500 μl de poly-D-lysine (10 $\mu\text{g/ml}$) diluée dans un tampon borate. Ces boîtes ont été complétées avec 3 ml de milieu conditionné et les cellules ont été laissées dans l'incubateur pendant 5 jours avant de réaliser les expériences d'imagerie calcique.

Astrocytes

Le protocole de purification des astrocytes est similaire à celui des microglies, mais l'anticorps utilisé est différent. Celui-ci correspond à un mix de deux anticorps (anticorps anti-GLAST couplé à la biotine et anticorps anti-biotine couplé aux billes magnétiques). De plus, avant l'incubation des anticorps, les cellules ont d'abord été mises en contact d'un bloqueur des récepteurs Fc pendant 15 min à 4 °C pour éviter une contamination microgliale durant la purification. Ensuite, 20 µl d'anticorps anti-GLAST couplés à la biotine ont été ajoutés pendant 15 min à 4 °C. Puis, les cellules ont été centrifugées pendant 5 min à 500 g, le surnageant a été aspiré et les cellules ont été reprises dans 80 µl du tampon qui contenait de la BSA. 20 µl de l'anticorps anti-biotine couplé aux billes magnétiques ont alors été ajoutés pendant 15 min à 4 °C. La séparation a ensuite été réalisée de la même manière que pour les microglies. Les cultures purifiées d'astrocytes ont été uniquement utilisées pour l'expérience de métabolisme pour laquelle, 100 000 cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits traitées au préalable avec 500 µl/puit de poly-D-lysine (10 µg/ml). Les cellules ont ensuite été replacées dans l'incubateur jusqu'au jour de l'expérience.

Expérience de métabolisme de la morphine sur cellules gliales primaires

Au 2^{ème} jour après la purification des cellules par le MACS, les cultures mixtes ainsi que les cultures de microglies et d'astrocytes purifiées ont été préincubées en absence ou présence de 100 ng/ml de LPS. Après 24 h, le milieu a été changé pour un milieu qui contenait 10 ou 100 µM de morphine. Le jour suivant, le surnageant a été récupéré et stocké à -20 °C avant l'analyse LC-MS/MS (cf. section, *Préparation des surnageants de culture*).

L'imagerie calcique

L'imagerie calcique est une technique de microscopie qui repose sur l'utilisation de sondes calciques fluorescentes incorporées par les cellules et capables de chélater les ions Ca²⁺. Après leur liaison, leurs propriétés de fluorescence sont modifiées et ce changement est détecté. Dans notre cas, nous avons utilisé une sonde dite ratiométrique, le Fura-2. Cette sonde est caractérisée par un décalage de son spectre d'excitation lorsqu'elle se lie au calcium. Plus précisément, la sonde Fura-2 est excitée à une longueur d'onde de 380 nm lorsque celle-ci n'est pas liée au calcium et à une longueur d'onde de 340 nm lorsque celle-ci est liée au calcium. Dans les deux cas, l'émission se fait à 510 nm (**Figure 27**). Il est alors possible, à l'aide d'un

système de filtre adapté, d'alterner les longueurs d'ondes d'excitation et de détecter le signal associé à chacun des états de la sonde. Ensuite, un rapport de fluorescence est calculé et son évolution témoigne de la dynamique des ions Ca^{2+} au sein de la cellule enregistrée. Les sondes ratiométriques ont notamment l'avantage de s'affranchir des différences de chargement de la sonde au sein des cellules.

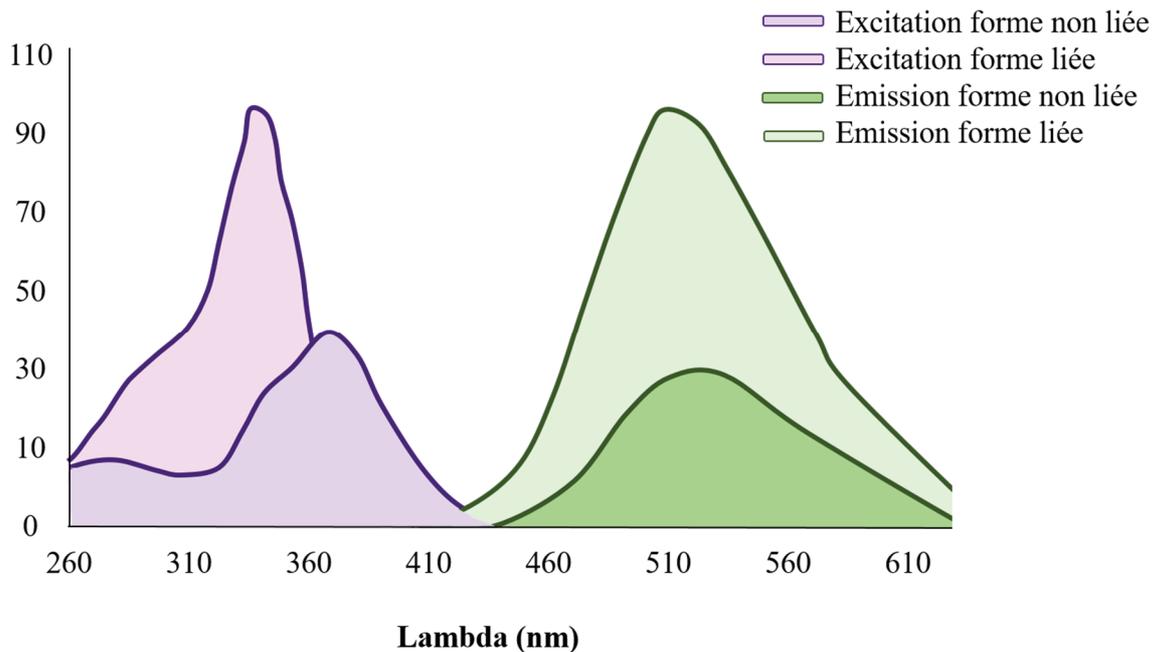


Figure 27 : Spectre d'excitation et d'émission de la sonde Fura-2 en absence et en présence de liaison aux ions Ca^{2+} .

La sonde Fura-2 non liée aux ions Ca^{2+} est excitée à une longueur d'onde de 380 nm. Ce spectre d'excitation se décale lorsque la sonde est liée aux Ca^{2+} et atteint son pic à une longueur d'onde de 340 nm. Pour les deux longueurs d'ondes d'excitation, l'émission est enregistrée à une longueur d'onde de 510 nm.

Condition de chargement de la sonde Fura-2 dans les cultures primaires de microglies

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux effets de la M3G sur la dynamique des ions Ca^{2+} dans les microglies KO pour le MOR et dans celles de leur homologue non transgénique. Cinq jours après la purification des cellules par le MACS, les cellules ont d'abord été lavées avec du liquide d'imagerie préparé la veille (voir **Tableau 4**). Ensuite, 3 μl de Fura-2-ester d'acetoxyéthyle (AM) ont été mélangés à 3 μl d'acide pluronique, complétés

à 1 ml avec du liquide d'imagerie et transférés dans la boîte de culture. Le groupement AM présent sur la sonde Fura-2 lui confère une forte perméabilité aux membranes cellulaires. Une fois la sonde-AM incorporée aux cellules, le groupement AM est clivé par des estérases cytoplasmiques qui permettent de piéger la sonde dans les cellules. L'acide pluronique, ajouté au mélange, permet d'augmenter encore un peu l'incorporation de la sonde aux cellules en perméabilisant légèrement les membranes. Les cellules ont été incubées à l'abri de la lumière pendant 1 h avant d'être placées sous le microscope.

Composition du liquide d'imagerie		
Composé	Concentration (mM)	g/1L
NaCl	135	7,89
KCl	5	0,37
CaCl ₂ (*2H ₂ O)	2,5	0,37
MgCl ₂ (*6H ₂ O)	1	0,203
HEPES	5	1,19
Glucose	10	1,8
pH = 7,3		

Tableau 4 : Composition du liquide d'imagerie.

Les concentrations (en mM), et les masses pesées pour réaliser 1L de liquide d'imagerie (g/1L), sont indiquées pour chaque composé. Le pH a été vérifié à l'aide d'un pH-mètre.

Protocole d'imagerie calcique

Afin de déterminer l'effet de la M3G sur la dynamique des ions Ca²⁺ dans des microglies de souris en culture, et dans un deuxième temps, d'évaluer l'implication du MOR et du TLR4 dans les effets de la M3G, nous avons utilisé trois types de protocoles.

Le premier consiste en une application aiguë de M3G ou de LPS pour déterminer si ces ligands sont capables d'induire une augmentation calcique transitoire au sein des microglies, et auquel cas, de comparer ces réponses. Le deuxième protocole consiste en une préincubation de la M3G ou du LPS avec les microglies 24 h avant l'expérience pour évaluer si, après stimulation, la réponse à l'application aiguë de M3G ou de LPS est modifiée. Le dernier protocole a permis d'étudier la modulation d'une réponse calcique microgliale caractérisée, la réponse purinergique, par la M3G ou le LPS (Chun, Stewart, Vaughan, Bachstetter, & Kekeneshuskey, 2019). En effet, en l'absence de réponse directe à la stimulation, il est tout de même possible que la M3G et le LPS induisent des modifications de l'homéostasie du calcium au sein

des microglies. Pour réaliser cette dernière approche, nous avons utilisé l'uridine-triphosphate (UTP), un agoniste des récepteurs purinergiques plus stable que l'adénosine-triphosphate (ATP). En effet, l'application d'UTP sur les microglies provoque un pic calcique transitoire (Hoffmann, Kann, Ohlemeyer, Hanisch, & Kettenmann, 2003). Par conséquent, l'UTP a également été utilisé comme contrôle positif dans les deux premières approches pour confirmer l'état fonctionnel des microglies. L'ensemble des applications a été réalisé via un système permettant d'appliquer des « bouffées » des composés à tester. Ce système est composé d'un appareil de perfusion et d'aspiration qui permet la stimulation des cellules uniquement présente dans le champ du microscope. Il est donc possible, en changeant de champ, de répliquer le protocole au sein de la même culture. Ce système s'oppose à l'application en « bain » pendant laquelle la molécule à tester est introduite dans l'ensemble du bain de culture pendant un temps donné et où les cellules sont toutes stimulées.

Trois protocoles ont donc été utilisés :

(i) Des microglies, en culture non traitées, ont été stimulées par une première application de M3G pendant 10 s à une concentration de 30 μ M, puis par une application d'UTP pendant 3 s à une concentration de 30 μ M. Ce même protocole a également été testé avec une application de LPS pendant 10 s à une concentration de 1 μ g/ml à la place de la M3G.

(ii) Les mêmes protocoles ont été appliqués à des microglies en culture préincubées avec 30 μ M de M3G ou 1 μ g/ml de LPS pendant 24 h.

(iii) Des microglies, non traitées ou préincubées pendant 24 h avec 30 μ M de M3G ou 1 μ g/ml de LPS, ont été stimulées avec de l'UTP pendant 3 s à une concentration de 30 μ M.

En parallèle, nous avons également utilisé ces trois approches sur des microglies KO pour le MOR.

Analyses statistiques

Le design et l'analyse statistique ont été réalisés en adéquation avec les recommandations en pharmacologie publiées par Curtis et collaborateurs en 2018 (Curtis et al., 2018). GraphPad 8 a été utilisé pour réaliser l'analyse.

Dans la majorité des expériences qui impliquent les souris mâles et femelles contrôles et tolérantes aux effets antinociceptifs de la morphine, nous avons utilisé l'ANOVA à deux

facteurs pour comparer les groupes au sein de notre design factoriel 2x2. Lorsque le F était significatif et que les variances étaient homogènes entre les groupes, nous avons réalisé un test de comparaison multiple de Tukey. La normalité et l'homogénéité des variances ont été respectivement vérifiées à l'aide du test de normalité de D'Agostino & Pearson et du test de Levene. Lorsque les hypothèses de l'ANOVA n'étaient pas respectées, nous avons utilisé une approche non-paramétrique appelée l'ART ANOVA (Wobbrock, Findlater, Gergle, & Higgins, 2011). De manière générale, l'ANOVA identifie des différences, alors que le test post-hoc indique leur direction. D'un point de vue statistique, dans le cas particulier d'un design factoriel 2x2, puisqu'il n'y a que 2 variables indépendantes qui possèdent chacune deux niveaux, les résultats de l'ANOVA, pour les deux effets principaux et l'interaction, indiquent déjà la direction des effets. Le test post-hoc ne donne par conséquent aucune information supplémentaire. Afin de rester consistant avec la littérature, nous avons tout de même décidé de les réaliser. Pour les autres expériences, l'analyse statistique est précisée ci-dessous.

Les valeurs aberrantes ont été incluses dans l'analyse et la présentation des données sauf dans les cas suivants : (i) pour les expériences de métabolisme périphérique, les souris, qui montrent une cinétique de la morphine biaisée avec des quantités de morphine extrêmement basse, ont été exclues sur la base d'une mauvaise injection. (ii) Pour les expériences de métabolisme central, les structures cérébrales, dans lesquelles des quantités extrêmement importantes de morphine et de M3G ont été trouvées, ont été exclues sur la base d'une contamination des échantillons. Les données sont exprimées en moyenne \pm l'écart standard à la moyenne (SEM) et les n sont indiqués dans les figures.

Le seuil de significativité a été fixé à $P < 0,05$. Ce seuil n'est pas varié (*i.e.* des seuils de significativité multiples ne sont pas indiqués) volontairement tout au long du manuscrit. En effet, comme il est suggéré par Curtis et collaborateurs en 2015, la p-value indique la probabilité de chance que l'hypothèse nulle soit vraie (*i.e.* qu'il n'existe aucune différence entre les groupes comparés) avec l'échantillonnage réalisé mais ne fournit aucune information relative à la taille de l'effet observé (Curtis et al., 2015). Le seuil de significativité est fixé au préalable de la réalisation des expériences et lorsque la p-value dépasse ce seuil, nous concluons qu'il existe une différence entre les groupes. Utiliser des seuils de significativité multiples (*e.g.* $P < 0,01$; $P < 0,001$; $P < 0,0001$) revient à définir des différences « plus significatives » que significatives et établir un ordre hiérarchique qui n'est pas approprié. Ces seuils de significativité ont tout de même leur importance vis-à-vis du taux de faux positifs, c'est pourquoi nous avons décidé de

répertorier les p-value exactes au sein des tableaux qui récapitulent le détail statistique de chaque expérience présentés en **Annexe 5**.

Expériences de comportement

Une régression non-linéaire basée sur une fonction logistique à 4 paramètres a été utilisée afin de déterminer l'ED₅₀ et les intervalles de confiance à 95 % (IC 95 %) de la morphine chez les souris mâles et femelles. Les deux modèles ont ensuite été comparés à l'aide d'une comparaison de modèles réalisée avec la méthode des moindres carrés suivi d'un test F. Le même type de régression non linéaire a été utilisé pour modéliser l'évolution de la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine dans le temps pour chaque souris. Ensuite, les paramètres suivants ont été extraits du modèle pour chaque souris : le jour à partir duquel l'effet antinociceptif maximal de la morphine est divisé de moitié et le coefficient de Hill de la courbe. Enfin, ces paramètres ont été moyennés par groupe, puis comparés à l'aide d'un t-test de Welch non apparié.

L'évolution de l'effet pronociceptif de la M3G, en fonction des concentrations injectées en i.t., a été analysée à l'aide d'une ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey. La normalité et l'homogénéité des variances ont été vérifiées respectivement à l'aide du test de normalité de D'Agostino & Pearson et du test de Levene. Lors de cette expérience, nous n'avons pas pu définir de point intermédiaire entre l'absence d'effet et l'effet maximum de la M3G. Il est par conséquent impossible de définir un modèle qui récapitule correctement l'effet de la M3G. La cinétique de l'effet pronociceptif de la M3G après injection de 2,5 µg en i.t., quant à elle, a fait l'objet d'une analyse par régression non linéaire à l'aide d'une équation de type semi-log. Pour chaque souris, une modélisation a été réalisée et les paramètres suivants ont été extraits : Valeur maximale d'hyperalgésie atteinte en %MPE et valeur de la pente de décroissante de l'effet pronociceptif de la M3G. Ensuite, les paramètres obtenus pour chaque groupe (M3G 2,5 µg mâles, M3G 2,5 µg femelles, M3G 0,01 µg mâles, M3G 0,01 µg femelles) ont été moyennés et comparés à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey. La normalité et l'homogénéité des variances ont été vérifiées respectivement à l'aide du test de normalité de D'Agostino & Pearson et du test de Levene. Pour des raisons similaires à celles évoquées précédemment, l'évolution de l'effet pronociceptif de la M3G, en fonction des concentrations injectées en i.p., a été analysée à l'aide d'une ANOVA à 2 facteurs à mesures répétées.

Analyse non-compartmentale

Les paramètres pharmacocinétiques de la morphine et de la M3G ont été déterminés à l'aide d'une analyse non-compartmentale (NCA) réalisée avec PKsolver (Zhang, Huo, Zhou, & Xie, 2010). Les critères d'acceptation du λ_z ont été définis de la manière suivante : $R_{\text{ajusté}} > 0.80$, inclut au minimum 3 points, $AUC_{\text{last-inf}} \leq 20 \% AUC_{0\text{-inf}}$. Les AUC de la morphine et de la M3G ont été déterminées après extrapolation à l'infini par la méthode des trapèzes s'appuyant sur l'interpolation linéaire/logarithmique par intervalle.

Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique pour la M3G et métabolisme central

Afin de comparer l'évolution de la perméabilité de la BHE pour la M3G en fonction des concentrations sanguines de M3G entre les mâles et les femelles, nous avons modélisé pour chaque structure, à travers une régression linéaire, l'évolution des rapports cerveau/sang calculés pour la M3G en fonction des concentrations sanguines de M3G. Les comparaisons entre les mâles et les femelles ont ensuite été effectuées à l'aide d'une comparaison de modèle réalisée avec la méthode des moindres carrés suivi d'un test F. La même méthode a été appliquée pour déterminer l'existence d'un métabolisme central de la morphine (*i.e.* si les modèles de l'évolution des rapports cerveau/sang calculés pour la M3G et obtenus après une injection de morphine étaient différents de ceux obtenus après une injection de M3G) et pour déterminer si ce métabolisme est différent entre les mâles et les femelles (*i.e.* si les modèles de l'évolution des rapports cerveau/sang obtenus après une injection de morphine étaient différents entre les mâles et les femelles).

Métabolisme de la morphine sur cultures primaires de cellules gliales

Afin de définir les acteurs impliqués dans le métabolisme central de la morphine en culture en condition contrôle et de préincubation au LPS, nous avons comparé les groupes à l'aide de l'ANOVA à deux facteurs. Néanmoins, la normalité et l'homogénéité des variances n'étaient pas vérifiées pour les deux concentrations de morphine utilisées. Par conséquent, et après analyse de la distribution des données, nous avons réalisé une transformation logarithmique des données pour atteindre la normalité et l'homogénéité des variances, comme suggéré par Curtis et collaborateurs en 2018 (Curtis et al., 2018). L'ANOVA à deux facteurs et

le test post-hoc ont ensuite été réalisés sur les données transformées, bien que seuls les résultats bruts soient présentés.

Effet de la M3G sur les cellules RAW-DUALTM et RAW-DUALTM KO-TLR4

Dans le but de déterminer si la M3G peut activer la signalisation du TLR4, nous avons comparé les groupes à l'aide de l'ANOVA à deux facteurs pour évaluer l'impact des concentrations de M3G, celui de la lignée utilisée et leur interaction. La normalité et l'homogénéité des variances ont été vérifiées respectivement à l'aide du test de normalité de D'Agostino & Pearson et du test de Levene. Pour cette expérience, le nombre d'échantillons est relativement faible mais nous n'avons observé aucun effet sur plusieurs expériences indépendantes.

Effet de la M3G et du LPS sur la microglie en imagerie calcique

Afin de déterminer l'effet de la préincubation de M3G et de LPS sur les microglies exprimant ou non le MOR, nous avons évalué les différences dans l'amplitude et l'AUC maximale atteinte suite à l'application d'UTP entre les groupes (protocole *iii*, cf. section, *Protocole d'imagerie calcique*). Ces comparaisons ont été réalisées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs pour évaluer l'effet de la préincubation, celui de la lignée utilisée et leur interaction. Par ailleurs, en l'absence de réponse à l'application directe de M3G ou de LPS, aucune comparaison n'a été réalisée. Pour cette expérience, le nombre d'échantillons est relativement faible mais nous n'avons observé aucun effet sur plusieurs expériences indépendantes.

Résultats

Dans cette section, les groupes « contrôles » se réfèrent aux souris ayant reçu 9 injections de solution saline (NaCl 0,9 %) en i.p. et une seule injection de morphine 10 mg/kg en i.p. au jour 10 du protocole. Les groupes « tolérants » se rapportent aux souris ayant reçu 9 injections de morphine 10 mg/kg en i.p. et une injection finale de morphine 10 mg/kg en i.p. au jour 10 du protocole. Par ailleurs, par soucis de simplification le terme « tolérance » se réfèrera à la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine. **Les résultats sur les différences liées au sexe dans le métabolisme et la tolérance ont abouti à une publication en cours de révision dans le journal *British Journal of Pharmacology*.** Cette publication est présentée en **Annexe 6.**

Effet antinociceptif de la morphine et tolérance chez les souris mâles et femelles

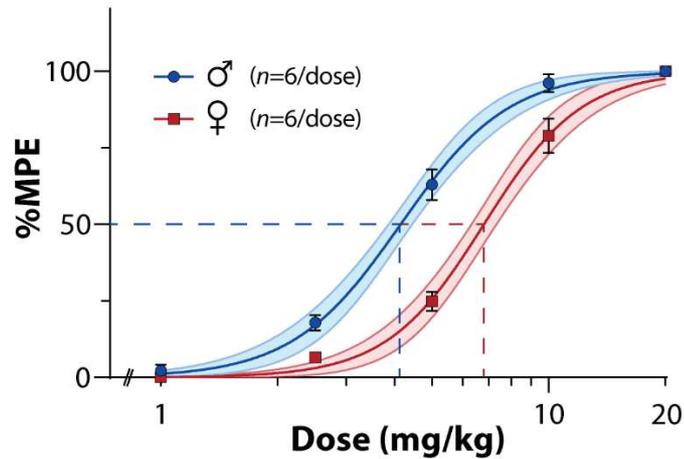
L'effet antinociceptif de la morphine ainsi que ses effets secondaires sont influencés par le sexe (Fullerton, Doyle, & Murphy, 2018). Afin d'estimer ces différences, nous avons évalué l'effet antinociceptif de la morphine ainsi que le développement de la tolérance chez des souris mâles et femelles à l'aide du test d'immersion de la queue (le protocole d'induction de la tolérance est décrit dans la **Figure 24**). Le détail statistique est présenté dans l'**Annexe 5, tableau supplémentaire 1.**

L'injection systémique (i.p.) aiguë de morphine produit un effet dose-dépendant chez les souris mâles et femelles. Cependant, cet effet est influencé par le sexe. En effet, les femelles nécessitent une dose de morphine plus élevée que les mâles pour atteindre le même degré d'analgésie, comme en témoigne la différence significative d'ED₅₀ calculés à partir des modélisations de l'effet dose-dépendant de la morphine (**Figure 28a**). Il est également important de noter qu'aucune différence significative dans les seuils nociceptifs de base n'a été observée entre les mâles et les femelles.

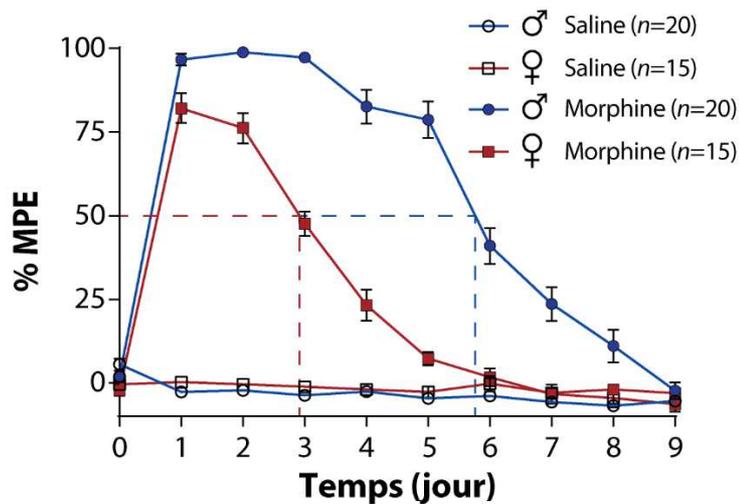
De plus, comme illustré sur la **Figure 28b**, bien que la tolérance se développe chez les mâles et chez les femelles, celle-ci est également influencée par le sexe. Ainsi, au cours du protocole d'administration chronique de morphine, le %MPE diminue suivant les injections successives de morphine pour atteindre une valeur moyenne nulle chez les mâles et chez les femelles. Néanmoins, les femelles deviennent tolérantes aux effets analgésiques de la morphine plus tôt durant le protocole (environ au 3^{ème} jour) que les mâles (environ au 6^{ème} jour), comme en témoigne la différence significative dans le jour à partir duquel l'effet antinociceptif maximal de la morphine est divisé de moitié (**Figure 28b**). De manière surprenante, aucune différence

significative n'a été observée dans le coefficient de Hill entre les mâles et les femelles suggérant que la vitesse à laquelle se développe la tolérance est la même chez les deux sexes (**Figure 28b**). Cependant, il est important de noter que les mâles atteignent le point-limite du test d'immersion de la queue durant les trois premiers jours du protocole. Par conséquent, il est possible que des différences dans le coefficient de Hill n'aient pas été observées du fait de notre point limite (*i.e.* 25s).

En résumé, ces résultats indiquent qu'il existe des différences significatives dans l'effet antinociceptif de la morphine et dans le développement de la tolérance entre les mâles et les femelles.

a

	Mâles	Femelles
ED₅₀	4,15 mg/kg [IC95% : 3,87 - 4,45]	6,81 mg/kg* [IC95%: 6,33 - 7,33]

b

	Mâles	Femelles
Jour à partir duquel 50% MPE restant	Jour 5,88±0,17	Jour 2,89±0,10*
Coefficient de Hill	-0,79±0,14	-0,57±0,07

Figure 28 : L'effet antinociceptif et la tolérance induite par la morphine sont influencés par le sexe

L'antinociception est exprimée en %MPE qui a été calculée à partir des valeurs de latence obtenues avec le test d'immersion de la queue avant et 30 min après les injections de morphine ou de solution saline. (a) Courbe de dose-réponse de l'effet antinociceptif de la morphine chez

des souris mâles et femelles. Chaque groupe a reçu une unique dose de morphine (i.p., 1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg ou 20 mg/kg). $n = 6$ pour toutes les conditions, sauf pour la dose 20 mg/kg chez les mâles où $n = 5$. Les intervalles de confiance à 95 % (IC 95 %) sont représentés en zone bleue ombrée pour les mâles et en rouge pour les femelles. **(b)** Développement de la tolérance au cours du protocole d'administration chronique de morphine (i.p. 10 mg/kg, du jour 1 au jour 9). Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les ED₅₀ ont été calculés à partir des modélisations de l'effet dose-dépendant de la morphine réalisées à l'aide de la méthode des moindres carrés et ont été comparés avec un test F. Le jour à partir duquel les souris ne montrent en moyenne plus que 50 % de MPE et le coefficient de Hill ont été comparés avec un t-test de Welch non apparié. *, $p < 0,05$. IC, interval de confiance ; MPE, effet maximal possible.

Effet pronociceptif de la M3G chez les souris mâles et femelles

La M3G est décrite pour induire un effet pronociceptif après une injection central et systémique (Bartlett, Cramond, et al., 1994; S. S. Lewis et al., 2010; Roeckel et al., 2017). Afin de déterminer si cet effet est influencé par le sexe, nous avons *(i)* injecté des doses croissantes de M3G en i.p. et en i.t. chez des souris mâles et femelles et évalué leurs effets pronociceptifs à l'aide du test d'immersion de la queue et *(ii)* nous avons évalué le décours temporel de cet effet après injection i.t. de M3G. Le détail statistique est présenté dans l'**Annexe 5, tableau supplémentaire 2**. Je tiens à remercier chaleureusement le Dr. Mélanie Kremer pour avoir réalisée les injections i.t.

L'injection i.p. de M3G produit une hyperalgésie qui semble dépendre de la dose (**Figure 29a**). Un effet pronociceptif significatif est observé pour les concentrations 20 mg/kg et 40 mg/kg atteintes lors de la procédure d'injection cumulative. Aucune différence liée au sexe n'est observée dans l'effet pronociceptif de la M3G après son injection systémique, ni dans le seuil nociceptif de base des souris.

Par ailleurs, l'injection i.t. de M3G produit également une hyperalgésie qui semble dépendre de la dose (**Figure 29b**). En effet, un effet pronociceptif significatif est uniquement remarqué pour les doses 2,5 µg et 5 µg chez les mâles et les femelles. Cet effet n'est pas influencé par le sexe. L'absence d'une dose intermédiaire qui ne produirait qu'un effet pronociceptif partiel empêche de conclure quant à l'effet dose-réponse. Aucune différence liée au sexe dans le seuil nociceptif de base n'a été observée.

Le décours temporel des effets pronociceptifs de la M3G ne semble pas être influencé par le sexe (**Figure 29c**). Pour les deux sexes, celui-ci s'étale sur une durée minimum de 4 h et atteint son maximum environ 45 min après l'administration, bien qu'il n'existe pas de différence significative entre les points situés entre 15 min et 2 h. L'analyse des paramètres de modélisation révèle un effet pronociceptif induit par la M3G significatif mais qui n'est pas influencé par le sexe, comme en témoigne les valeurs pour lesquelles l'ordonnée est interceptée par les courbes modélisées. De plus, les pentes de ces courbes qui caractérisent la décroissance de l'effet pronociceptif de la M3G chez les mâles et les femelles sont identiques. Ces résultats indiquent que l'effet pronociceptif maximal induit par la M3G, ainsi que sa durée, sont les mêmes chez les souris mâles et femelles. Il est cependant important de noter que des différences liées au sexe ont pu être masquées par l'absence de point entre 4 h et 24 h. Il serait alors possible que l'effet pronociceptif de la M3G s'estompe plus rapidement chez un des deux sexes.

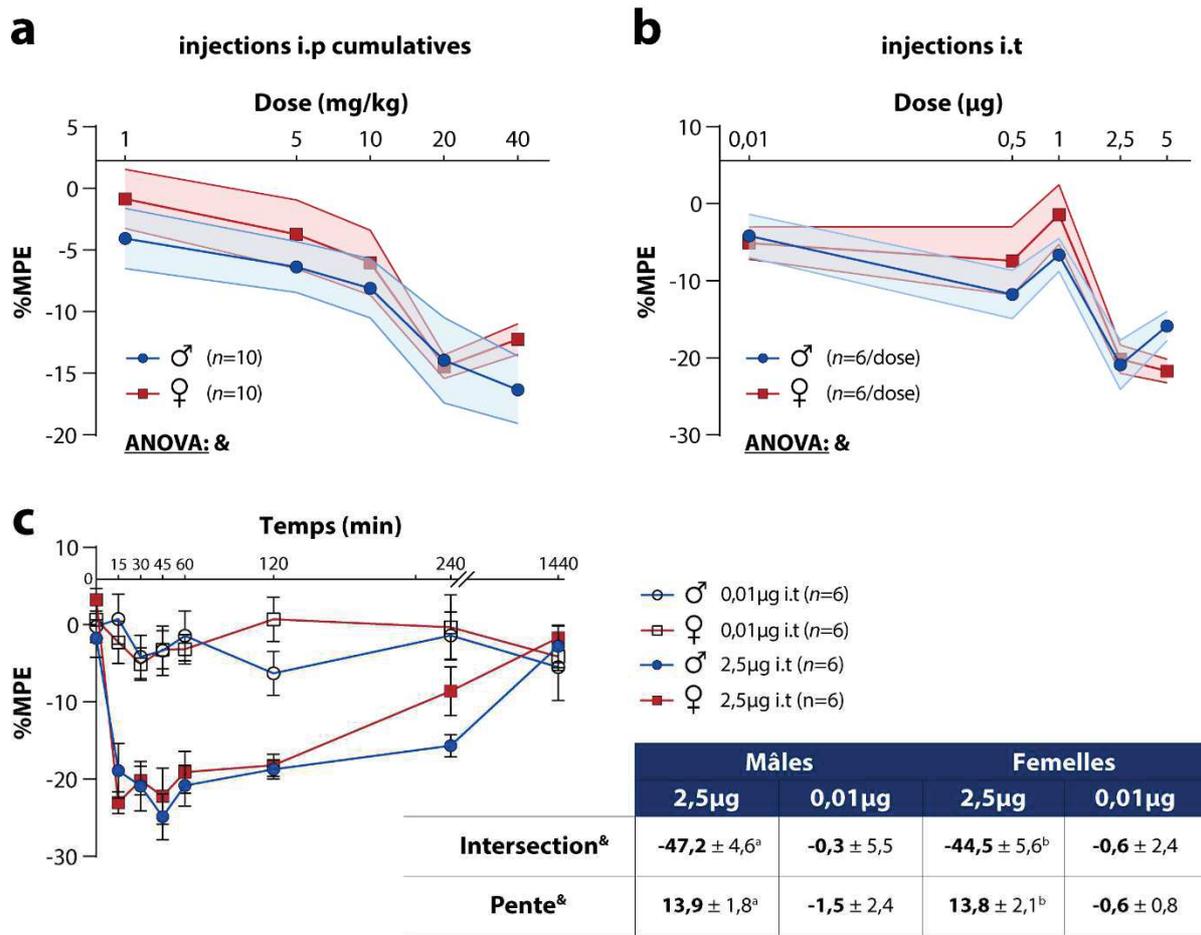


Figure 29 : La M3G possède un effet pronociceptif indépendant du sexe

La pronociception est exprimée en %MPE et a été calculée à partir des valeurs de latence obtenues avec le test d’immersion de la queue avant et 30 min après l’injection i.p. de M3G. (a) Effet pronociceptif de la M3G après injections i.p. de doses croissantes chez les mâles et les femelles. Chaque souris a reçu 5 injections i.p. de M3G selon une procédure cumulative afin d’atteindre les concentrations suivantes : 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg et 40 mg/kg. $n = 10$ par sexe. Les IC 95 % sont représentés en zone bleue ombrée pour les mâles et en rouge pour les femelles. (b) Effet pronociceptif de la M3G après injections i.t. de doses croissantes chez les mâles et les femelles. Chaque groupe a reçu une dose unique de M3G (0,01 µg, 0,5 µg, 1 µg, 2,5 µg et 5 µg). $n = 6$ pour toutes les doses. Les IC 95 % sont représentés en zone bleue ombrée pour les mâles et en rouge pour les femelles. (c) Décours temporel de l’effet pronociceptif de la M3G après injection i.t. de 2,5 µg et 0,01 µg. La pronociception est exprimée en %MPE et a été calculée à partir des valeurs de latence obtenues avec le test d’immersion de la queue avant et 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 4 h et 24 h après l’injection i.t. de M3G. $n = 6$ par dose. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Les effets pronociceptifs de la M3G en fonction de la dose après injection i.p. et i.t. ont été analysés à

l'aide d'une ANOVA à deux facteurs à mesure répétée et d'une ANOVA à deux facteurs, respectivement. Les paramètres moyens de la modélisation du décours temporel de l'effet de la M3G ont également été comparés à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs. Si le F obtenu était significatif et que les variances étaient homogènes, un test de comparaisons multiples de Tukey a été réalisé. Dose : &, $p < 0,05$. Mâles 2,5 μg M3G vs mâles 0,01 μg M3G: a, $P < 0,05$. Femelles 2,5 μg M3G vs femelles 0,01 μg M3G: b, $P < 0,05$. **i.p.**, injection intrapéritonéale ; **i.t.**, injection intrathécale ; **MPE**, effet maximal possible

Métabolisme périphérique de la morphine

Le métabolisme périphérique de la morphine contribue à la modulation des concentrations sanguines de morphine et de M3G. Puisque la morphine et la M3G induisent des effets opposés, des variations dans la balance métabolique périphérique entre ces deux composés pourraient participer aux différences liées au sexe observées dans l'effet antinociceptif de la morphine, et le développement de la tolérance. Par conséquent, nous avons évalué si le métabolisme périphérique de la morphine est différent chez les mâles et les femelles lors d'une injection i.p. aiguë de morphine ainsi qu'en condition de tolérance aux effets analgésiques de la morphine (voir protocole décrit dans la **Figure 24**).

Les cinétiques de la morphine et de la M3G, ainsi que leur ratio métabolique ont été déterminés par LC-MS/MS. Les résultats sont illustrés respectivement dans les **Figures 30a, 30b et 30c** pour les souris contrôles et les **Figures 30d, 30e et 30f** pour les souris tolérantes. L'ensemble des résultats obtenus lors de l'analyse non-compartimentale sont répertoriés dans le **Tableau 5** et sous forme d'histogrammes dans l'**Annexe 7**. Chacun de ces paramètres a fait l'objet d'une ANOVA à 2 facteurs afin d'évaluer l'impact du sexe, du traitement chronique et de leurs interactions. Le détail statistique est présenté dans l'**Annexe 5, tableau supplémentaire 3**.

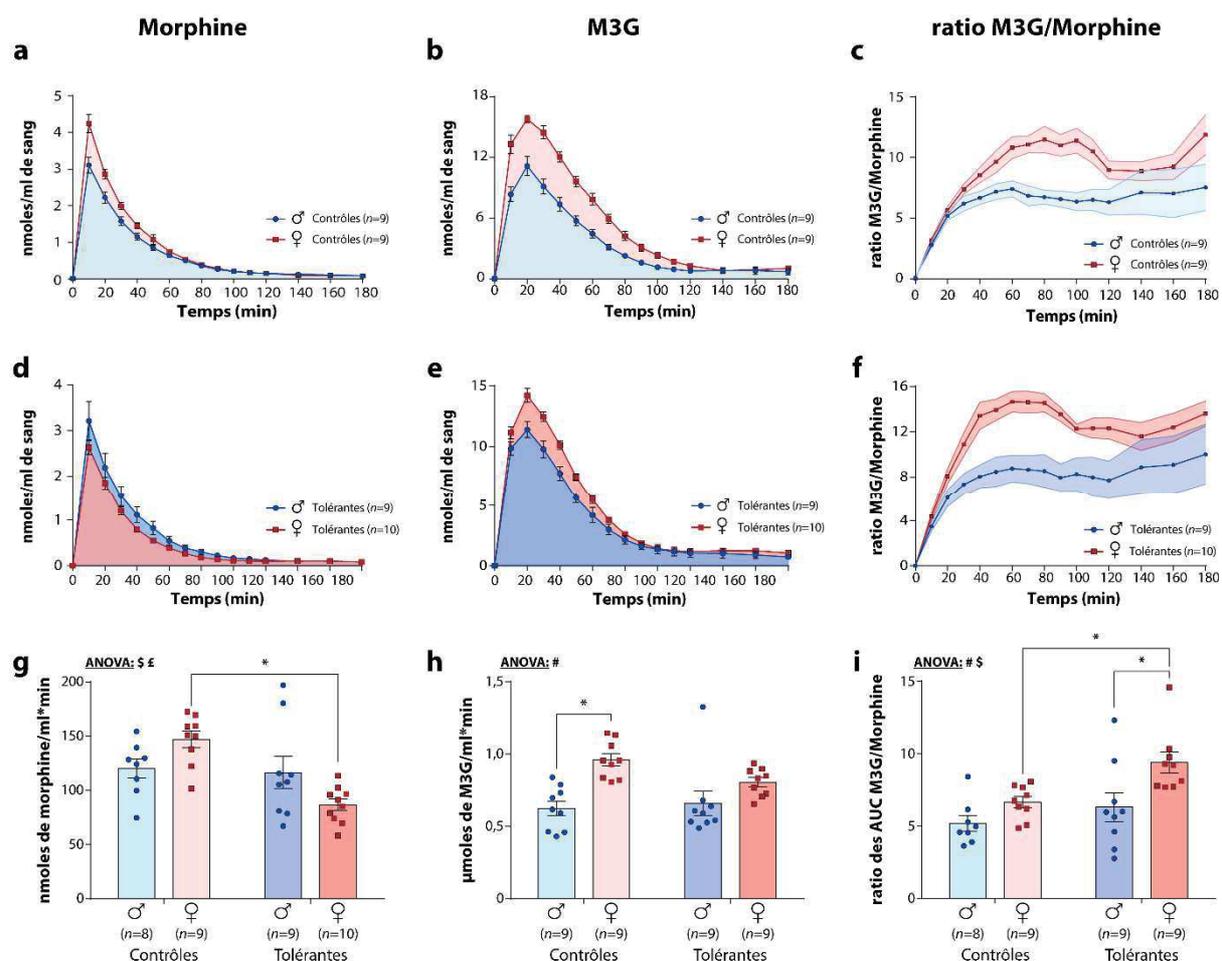


Figure 30 : Cinétiques de la morphine et de la M3G dans le sang des souris mâles et femelles contrôles et tolérantes

Au jour 10 du protocole de tolérance, toutes les souris ont été injectées avec de la morphine 10 mg/kg en i.p. Le sang a ensuite été collecté à plusieurs reprises sur une période de 180 min. Les quantités de morphine et de M3G ont alors été déterminées par LC-MS/MS. **(a)** Cinétique de la morphine, **(b)** de la M3G et **(c)** de l'évolution de leur ratio métabolique dans le sang des souris mâles et femelles contrôles. **(d)** Cinétique de la morphine, **(e)** de la M3G et **(f)** de l'évolution de leur ratio métabolique dans le sang des souris mâles et femelles tolérantes. **(g)** Quantité totale (AUC) de morphine et **(h)** de M3G sur l'ensemble de la cinétique. **(i)** Ratio M3G/morphine des AUC correspondantes. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM et les *n* sont indiqués dans la figure. Les AUC ont été comparés avec une ANOVA à deux facteurs. Si le F obtenu était significatif et que les variances étaient homogènes, un test de comparaisons multiples de Tukey a été réalisé. Sexe : #, $P < 0,05$. Traitement : \$, $P < 0,05$. Interaction : £, $P < 0,05$. *, $P < 0,05$. AUC, aire sous la courbe ; LC-MS/MS, chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem ; M3G, morphine-3-glucuronide.

L'analyse statistique de l'aire sous la courbe (AUC) obtenue à partir de la cinétique de la morphine a permis de mettre en évidence une interaction entre le sexe et le traitement chronique de morphine (**Figure 30g**). L'AUC correspondant à la quantité totale de la molécule présente dans le sang sur l'ensemble de la cinétique. Chez les femelles contrôles, cette quantité est significativement plus élevée que chez les femelles tolérantes. Cette différence, absente chez les mâles, explique l'interaction. Cependant, aucune interaction n'a été mise en évidence dans l'AUC de la M3G, bien que celle-ci soit significativement inférieure chez les mâles que chez les femelles (**Figure 30h**). Aucun effet du traitement n'a été observé. Par conséquent, (*i*) les femelles montrent des ratios métaboliques M3G/morphine significativement supérieurs à ceux des mâles (**Figure 30i**) et (*ii*) les souris tolérantes montrent également des ratios métaboliques significativement plus élevés que ceux des souris contrôles (**Figure 30i**).

De plus, une interaction entre le sexe et le traitement chronique de morphine a été mise en évidence sur les paramètres suivants : la concentration maximale de morphine atteinte au cours de la cinétique, l'aire sous la courbe du moment (AUMC) de la morphine et la clairance de la morphine (**Tableau 5**). Une tendance non significative a été également observée pour la concentration maximale de M3G atteinte au cours de la cinétique. Ces trois interactions sont principalement expliquées par les différences entre les souris femelles contrôles et celles tolérantes aux effets analgésiques de la morphine alors que celles-ci n'existent pas chez les mâles (voir **Tableau 5**, analyse post-hoc). Néanmoins, aucune interaction n'a été observée pour les paramètres NCA de la M3G ou pour les ratios métaboliques M3G/morphine. Ces résultats suggèrent que le métabolisme périphérique de la morphine ne semble pas être influencé différemment par le développement de la tolérance à la morphine entre les mâles et les femelles. Ces interactions semblent plutôt avoir pour origine des modifications différentielles d'absorption et de clairance de la morphine.

Il est intéressant de noter que la morphine possède un temps de résidence moyen (MRT) significativement supérieur chez les mâles en comparaison des femelles, alors que la concentration maximale de M3G chez ces dernières est significativement supérieure à celle des mâles (**Tableau 5**). Ces résultats suggèrent que le métabolisme périphérique de la morphine est significativement moins rapide chez les mâles. Aucun effet du sexe sur les autres paramètres n'a été observé.

Enfin, la clairance de la morphine, ainsi que son volume de distribution à l'état stationnaire, sont significativement plus élevés chez les souris tolérantes que chez les souris contrôles. Ces derniers résultats indiquent que le traitement chronique à la morphine induit des

adaptations du métabolisme et/ou de l'expression des transporteurs associés (**Tableau 5**). Il n'y a aucun effet du traitement chronique de morphine sur les autres paramètres observés.

En résumé, ces résultats indiquent que :

- (i) les femelles montrent un métabolisme périphérique de la morphine plus élevé que les mâles ainsi que des niveaux de M3G plus importants
- (ii) le métabolisme périphérique de la morphine est exacerbé en condition de tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine.

	Morphine			
	Mâles CT	Femelles CT	Mâles tolérants	Femelles tolérantes
C_{max} (nmoles/ml)^{§, £}	2,93 ± 0,28 (n=9)	4,24 ± 0,25^a (n=9)	3,22 ± 0,42 (n=9)	2,63 ± 0,16^d (n=10)
AUC_{0-inf} (nmoles.min/ml)^{§, £}	120,12 ± 8,7 (n=8)	146,99 ± 7,7 (n=9)	116,41 ± 14,9 (n=9)	86,66 ± 52,7^d (n=10)
AUMC_{0-inf} (µmoles.min²/ml)^{#, §, £}	5,76 ± 0,37 (n=8)	6,14 ± 0,36 (n=9)	5,80 ± 0,57 (n=9)	3,37 ± 0,24^{b, d} (n=10)
MRT (min)[#]	49,10 ± 3,46 (n=8)	41,72 ± 1,09 (n=9)	52,21 ± 4,63 (n=9)	39,06 ± 2,12^b (n=10)
T_{1/2} (min)[#]	34,03 ± 2,40 (n=8)	28,91 ± 0,75 (n=9)	36,19 ± 3,21 (n=9)	27,07 ± 1,47^b (n=10)
Cl/F (L/h/kg)^{§, £}	18,31 ± 1,62 (n=8)	14,68 ± 0,91 (n=9)	20,25 ± 2,27 (n=9)	25,16 ± 1,67^d (n=10)
V_{dss}/F (L/kg)[§]	15,51 ± 2,61 (n=8)	10,18 ± 0,61 (n=9)	18,16 ± 2,74 (n=9)	16,44 ± 1,46 (n=10)
	M3G			
	Mâles CT	Femelles CT	Mâles tolérants	Femelles tolérantes
C_{max} (nmoles/ml)[#]	11,38 ± 0,85 (n=9)	16,35 ± 0,39^a (n=9)	11,52 ± 0,72 (n=9)	14,21 ± 0,57^b (n=10)
AUC_{0-inf} (nmoles.min/ml)[#]	624,4 ± 50,3 (n=9)	959,7 ± 42,9^a (n=9)	659,1 ± 85,8 (n=9)	805,8 ± 32,2 (n=9)
AUMC_{0-inf} (µmoles.min²/ml)	33,62 ± 4,1 (n=9)	47,22 ± 3,2 (n=9)	39,14 ± 12,0 (n=9)	44,90 ± 5,4 (n=9)
MRT (min)	53,12 ± 3,6 (n=9)	48,85 ± 1,4 (n=9)	53,22 ± 6,3 (n=9)	54,88 ± 4,8 (n=9)

Tableau 5 : Paramètres de pharmacocinétique obtenus à partir de l'analyse non-compartimentale pour la morphine et la M3G retrouvées dans le sang des souris mâles et femelles contrôles et tolérantes

Les paramètres pharmacocinétiques de la morphine et de la M3G ont été déterminés à partir des cinétiques métaboliques réalisées au jour 10 du protocole. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM et les *n* sont indiqués dans le tableau. Les groupes ont été comparés à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs. Si le F obtenu était significatif et que les variances étaient homogènes, un test de comparaisons multiples de Tukey a été réalisé. Seul le volume de distribution de la morphine à l'état stationnaire a été analysé avec une version non-paramétrique de l'ANOVA à deux facteurs (*i.e.* l'ART ANOVA). Sexe : #, *P*<0,05. Traitement : \$, *P*<0,05. Interaction : £, *P*<0,05. Mâles contrôles vs femelles contrôles : a, *P*<0,05. Mâles tolérants vs femelles tolérantes : b, *P*<0,05. Femelles contrôles vs femelles tolérantes : d, *P*<0,05. **AUC**, Aire sous la courbe ; **AUMC**, Aire sous la courbe du moment ; **Cl/F**, clairance sur la biodisponibilité ; **C_{max}**, concentration maximale atteinte lors de la cinétique ; **CT**, contrôle ; **M3G**, morphine-3-glucuronide ; **MRT**, temps de résidence moyen ; **V_{dss}/F**, volume de distribution sur la biodisponibilité.

Quantification de la morphine et de la M3G dans les structures cérébrales associées à la douleur

L'antinociception produite par la morphine dépend principalement de l'action de la morphine au sein du SNC, et plus particulièrement, au sein de structures cérébrales impliquées dans le contrôle de la douleur comme la moelle épinière, la PAG et l'amygdale. De plus, la M3G produit un effet pronociceptif lorsqu'elle injectée par voie i.t. Par conséquent, la balance métabolique entre la M3G et la morphine dans des structures cérébrales impliquées dans l'antinociception à la morphine pourrait contribuer à la modulation de l'effet antinociceptif de la morphine en condition aiguë et de tolérances. Dans ce cadre, nous avons évalué si le sexe et le traitement chronique à la morphine, conduisant à une tolérance, influencent les quantités de morphine et de M3G aboutissant à une modification de leur ratio métabolique au sein de la LSC, la PAG et l'amygdale. Par ailleurs, les OB ont également été analysés car ils expriment fortement les UGTs impliquées dans le métabolisme de la morphine (Heydel et al., 2010; Ouzzine et al., 2014).

Les quantités de morphine et de M3G ont été quantifiées par LC-MS/MS au jour 10 du protocole, dans l'amygdale, la PAG, la LSC et l'OB des souris mâles et femelles contrôles et tolérantes 30 min après l'injection de morphine (10 mg/kg en i.p. ; voir protocole décrit dans la **Figure 24**). Les quantités observées sont répertoriées dans le **Tableau 6** ainsi que sous la forme d'histogrammes dans l'**Annexe 8**. Les ratios métaboliques sont présentés dans la **Figure 31**. Les valeurs obtenues pour chaque molécule et chacune des structures d'intérêt ont été comparées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs afin d'évaluer l'impact du sexe, du traitement chronique et de leur interaction. Le détail statistique est présenté dans l'**Annexe 5, tableau supplémentaire 4**.

Morphine (pmoles/mg de protéines)				
	Mâles CT	Femelles CT	Mâles tolérants	Femelles tolérantes
Amygdale^{#, \$}	9,70 ± 1,01 (n=20)	7,94 ± 0,41 (n=12)	7,65 ± 0,63 (n=19)	5,10 ± 0,51 (n=12)
PAG[#]	10,26 ± 0,75 (n=20)	6,76 ± 0,54^a (n=13)	9,43 ± 0,68 (n=20)	5,28 ± 0,80^b (n=13)
LSC[#]	12,68 ± 1,31 (n=17)	18,20 ± 1,17 (n=11)	11,51 ± 1,54 (n=15)	16,71 ± 4,06 (n=9)
OB^{#, \$}	13,12 ± 2,28 (n=16)	8,26 ± 0,37 (n=13)	8,55 ± 0,50 (n=16)	6,48 ± 1,04^{b, d} (n=13)
M3G (pmoles/mg de protéines)				
	Mâles CT	Femelles CT	Mâles tolérants	Femelles tolérantes
Amygdale ^{#, \$}	6,56 ± 0,94 (n=20)	12,23 ± 1,41^a (n=12)	4,88 ± 0,62 (n=19)	7,41 ± 1,37^d (n=12)
PAG	4,89 ± 0,65 (n=20)	5,29 ± 0,84 (n=13)	4,34 ± 0,48 (n=19)	4,64 ± 1,15 (n=13)
LSC[#]	34,87 ± 5,63 (n=17)	59,71 ± 3,49^a (n=11)	36,76 ± 4,09 (n=15)	49,59 ± 9,29 (n=9)
OB[#]	15,64 ± 1,87 (n=16)	13,04 ± 1,07 (n=13)	13,67 ± 0,80 (n=16)	9,59 ± 1,23 (n=13)

Tableau 6 : Quantités de morphine et de M3G retrouvées dans l'amygdale, la PAG, la LSC et le OB des souris mâles et femelles contrôles et tolérantes

Au jour 10 du protocole, les régions cérébrales d'intérêts ont été extraites 30 min après l'injection de morphine 10 mg/kg en i.p. et la morphine et la M3G ont été quantifiées par LC-MS/MS. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM, les *n* sont indiqués dans le tableau. Les groupes ont été comparés à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs. Si le F obtenu était significatif et que les variances étaient homogènes, un test de comparaisons multiples de Tukey a été réalisé. La morphine et la M3G dans le OB ont été analysées avec une version non-paramétrique de l'ANOVA à deux facteurs (*i.e.* l'ART ANOVA). Sexe : #, $P < 0,05$. Traitement : \$, $P < 0,05$. Mâles contrôles vs femelles contrôles : a, $P < 0,05$. Mâles tolérants vs femelles tolérantes : b, $P < 0,05$. Mâles contrôles vs mâles tolérants : c, $P < 0,05$. Femelles contrôles vs femelles tolérantes : d, $P < 0,05$. **CT**, souris contrôles ; **LSC**, moelle épinière lombaire, **M3G**, morphine-3-glucuronide ; **OB**, bulbe olfactif ; **PAG**, substance grise périaqueducule.

Amygdales – L'analyse statistique a mis en évidence que les quantités de morphine sont significativement inférieures chez les femelles par rapport aux mâles. À l'inverse, les quantités de M3G sont significativement supérieures chez les femelles (**Tableau 6**). Par conséquent, le ratio métabolique M3G/morphine est significativement plus élevé chez les femelles que chez les mâles (**Figure 31a**). De plus, les quantités de morphine et de M3G sont significativement inférieures chez les souris tolérantes que celles observées pour les souris contrôles (**Tableau 6**). Aucune différence n'est observée pour le ratio métabolique M3G/morphine entre les souris contrôles et les souris tolérantes (**Figure 31a**).

PAG – Les quantités de morphine sont significativement inférieures chez les femelles, bien qu'aucune différence ne soit observée pour les quantités de M3G (**Tableau 6**). Ainsi, le ratio métabolique M3G/morphine observé dans la PAG est significativement inférieur chez les mâles (**Figure 31b**). Par ailleurs, aucune différence dans les quantités de morphine, de M3G (**Tableau 6**) ou de leur ratio métabolique (**Figure 31b**) n'est observée entre les souris contrôles et les souris tolérantes.

LSC – Les niveaux de morphine et de M3G sont significativement plus élevés chez les femelles (**Tableau 6**). Cependant, aucune différence statistique n'est observée pour le ratio métabolique M3G/morphine (**Figure 31c**). De plus, les comparaisons des quantités de morphine et de M3G (**Tableau 6**) ainsi que de leur ratio métabolique (**Figure 31c**) n'ont montré aucune différence entre les souris contrôles et tolérantes.

OB – Les quantités de morphine et de M3G sont significativement plus basses chez les souris femelles que chez les souris mâles (**Tableau 6**). Néanmoins, le ratio métabolique est tout de même supérieur chez les femelles (**Figure 31d**). Les souris tolérantes montrent des niveaux de morphine significativement inférieurs à ceux observés pour les souris contrôles (**Tableau 6**). Une tendance non significative est observée dans la même direction pour la M3G. Aucun impact du traitement n'est observé pour le ratio métabolique M3G/morphine bien qu'une tendance soit observée (**Figure 31d**).

Enfin, dans le but de visualiser les différences globales liées au sexe, les **Figure 31e et 31f** représentent respectivement les quantités de morphine et de M3G (normalisées par rapport aux quantités trouvées chez les souris mâles dans chaque structure ou le sang) présentes chez les mâles et les femelles pour les groupes contrôles et tolérants. Cette normalisation a été réalisée à partir des valeurs reportées dans le **Tableau 6** dans le but de pouvoir représenter, sur une même figure, les différences liées au sexe dans les quantités de morphine et de M3G

retrouvées dans l'ensemble des structures analysées. Comme les ordres de grandeur diffèrent significativement entre les structures analysées, il était impossible de représenter convenablement les quantités réelles. C'est pourquoi, ces deux figures représentent combien de fois plus ou moins de morphine ou de M3G sont retrouvées chez les femelles en comparaison aux mâles après une injection aiguë de morphine ou en condition de tolérance.

En résumé, ces résultats indiquent que les quantités de morphine et de M3G retrouvées 30 min après une injection de morphine, ainsi que leur ratio métabolique, sont influencées par le sexe au sein de certaines structures impliquées dans l'antinociception induite par la morphine. Le protocole d'induction de la tolérance ne semble pas avoir d'impact sur les ratios métaboliques M3G/morphine trouvés au sein de ces régions cérébrales. Ainsi, ces résultats suggèrent un impact limité de la mise en place de la tolérance sur la balance métabolique M3G/morphine dans les structures analysées. Enfin, aucune interaction n'est observée suggérant que le sexe n'est pas impliqué dans les différences de quantités observées entre les souris contrôles et les souris tolérantes.

ratios M3G/Morphine

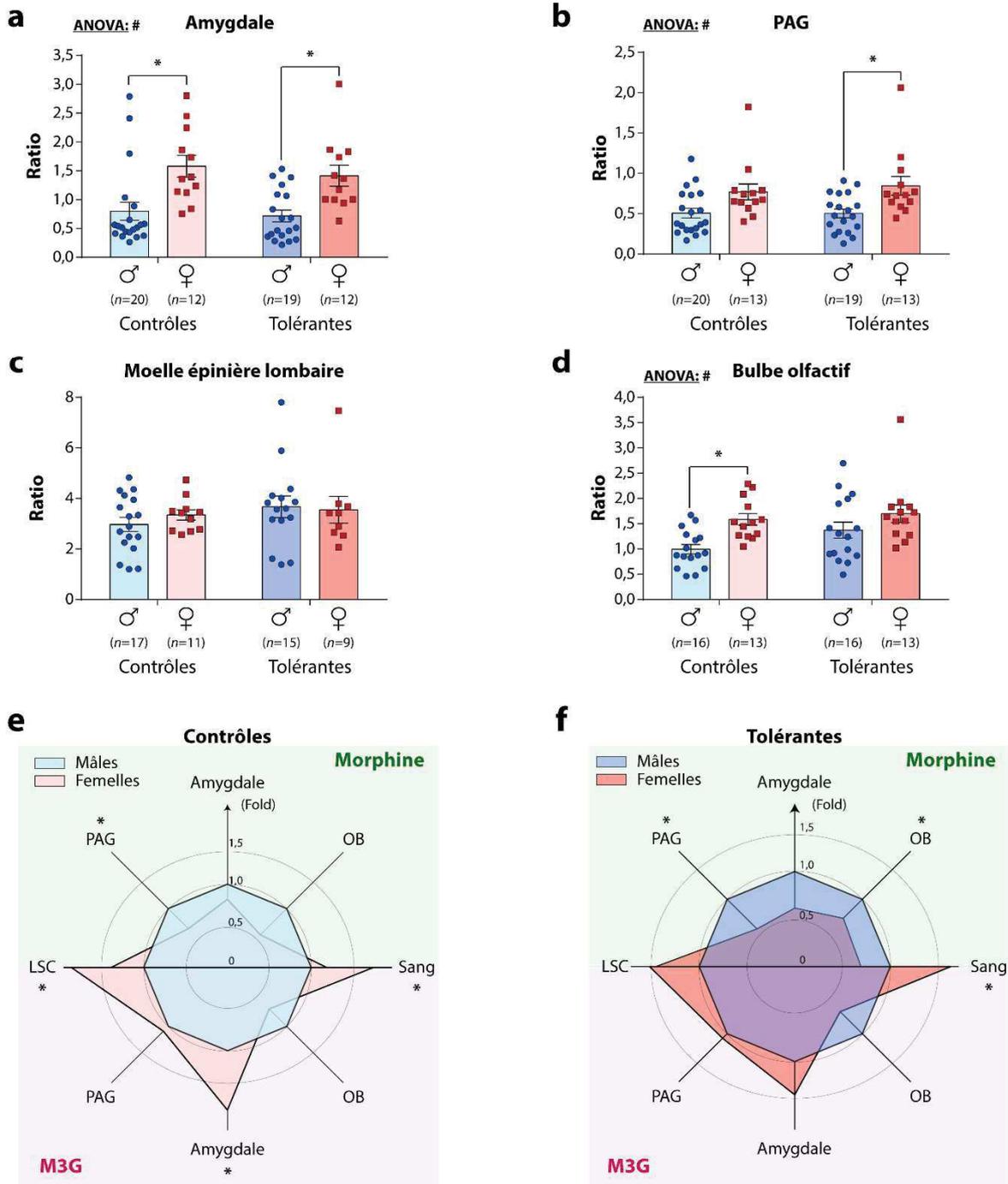


Figure 31 : Ratios métaboliques et quantités normalisées observés dans l'amygdale, la PAG, la LSC et le OB des souris mâles et femelles contrôles et tolérantes

Les ratios métaboliques ont été calculés à partir des quantités de morphine et de M3G obtenues dans les régions d'intérêt après injection de morphine au jour 10 du protocole. Ratio métabolique M3G/morphine dans (a) l'amygdale, (b) la PAG, (c) la LSC et (d) le OB. Afin de mieux visualiser les différences globales liées au sexe, les quantités de morphine et de M3G

(reportées dans le **Tableau 6**) ont été normalisées en fonction de celles retrouvées chez les mâles. Elles sont représentées pour **(e)** les souris contrôles et **(f)** les souris tolérantes. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, les n sont indiqués dans la figure. Les groupes ont été comparés à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs. Si le F obtenu était significatif et que les variances étaient homogènes, un test de comparaisons multiples de Tukey a été réalisé. Le ratio métabolique observé dans l'amygdale a été analysé avec une version non-paramétrique de l'ANOVA à deux facteurs (*i.e.* l'ART ANOVA). Sexe : #, $P < 0,05$. Traitement : \$, $P < 0,05$. *, $P < 0,05$. **LSC**, moelle épinière lombaire, **M3G**, morphine-3-glucuronide ; **OB**, bulbe olfactif ; **PAG**, substance grise périaqueducule.

Rapports cerveau/sang de la morphine et de la M3G obtenus dans les régions cérébrales impliquées dans le contrôle de la douleur

Afin d'étudier l'origine des différences observées entre les groupes pour les quantités de morphine et de M3G, ainsi que pour leurs ratios métaboliques, nous avons émis trois hypothèses :

- (i) ces différences sont dépendantes du métabolisme périphérique de la morphine qui diffère entre les groupes,
- (ii) il existe des différences dans la perméabilité de la BHE pour la M3G entre les groupes,
- (iii) et/ou elles reposent sur l'existence d'un métabolisme central de la morphine qui est différent selon les groupes.

Dans un premier temps, nous avons calculé les rapports entre les quantités trouvées dans les régions cérébrales d'intérêts et celle trouvées dans le sang. En effet, cette méthode permet de normaliser les niveaux de morphine et de M3G trouvés dans les régions cérébrales d'intérêts en fonction de ceux observés dans le sang de chaque animal. En d'autres termes, elle permet de s'affranchir des différences de métabolisme périphérique afin d'évaluer si les niveaux retrouvés dans les structures cérébrales d'intérêts reflètent ceux observés dans le sang. Les panneaux de gauche et du milieu de la **Figure 32** illustrent les rapports cerveau/sang calculés pour la morphine et la M3G dans l'amygdale, la PAG, la LSC et le OB après une injection i.p. de morphine 10 mg/kg. Les rapports cerveau/sang obtenus pour chaque molécule et chacune des structures d'intérêt ont été comparés à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs pour évaluer l'impact du sexe, du traitement chronique et de leur interaction. Le détail statistique est présenté dans l'**Annexe 5, tableau supplémentaire 5**.

Amygdale – L'analyse n'a révélé aucune différence significative dans les rapports cerveau/sang calculés pour la morphine (**Figure 32a**). Cependant, une interaction entre le sexe et le traitement chronique de morphine est observée dans les rapports cerveau/sang calculés pour la M3G (**Figure 32b**). En effet, l'analyse post-hoc indique que ces rapports cerveau/sang sont significativement supérieurs chez les femelles contrôles comparé aux mâles contrôles alors que les mâles tolérants montrent des rapports significativement supérieurs à ceux des mâles contrôles. Cette dernière différence statistique est uniquement observée chez les mâles et explique l'interaction.

PAG – Les rapports cerveau/sang calculés pour la morphine (**Figure 32d**) et la M3G (**Figure 32e**) sont significativement plus élevés chez les mâles par rapport aux femelles. Par ailleurs, une tendance non significative est également observée pour les rapports cerveau/sang calculés pour la morphine entre les souris tolérantes et les souris contrôles (**Figure 32d**). De la même manière, aucun impact du traitement chronique de morphine n'est observé pour les rapports cerveau/sang calculés pour la M3G (**Figure 32e**).

LSC – De manière surprenante, les rapports cerveau/sang pour la morphine sont significativement supérieurs chez les femelles par rapport aux mâles dans la LSC (**Figure 32g**). À l'inverse, aucune différence statistique n'est observée dans les rapports cerveau/sang calculés pour la M3G entre les mâles et les femelles, ni dans les rapports cerveau/sang calculés pour la morphine ou la M3G entre les souris contrôles et tolérantes (**Figure 32h**).

OB – L'analyse indique l'absence de différence significative dans les rapports cerveau/sang calculés pour la morphine entre les mâles et les femelles (**Figure 32j**), bien que les rapports cerveau/sang pour la M3G soient significativement plus élevés chez les mâles (**Figure 32k**). Aucun effet du traitement n'est mis en évidence dans le OB.

En résumé, ces résultats indiquent que les différences de quantités observées entre les mâles et les femelles dans les différentes régions du SNC ne reflètent pas nécessairement les différences observées dans le sang, comme en témoignent les différences liées au sexe dans les rapports cerveau/sang. La perméabilité de la BHE pour la morphine et la M3G, ainsi que l'existence d'un métabolisme central, pourraient être partiellement responsable de ces différences. Cependant, il semble que le traitement chronique de morphine a une influence limitée sur les ratios cerveau/sang. Ce résultat suggère que les différences de quantité de morphine et de M3G observées au sein des structures du SNC, entre les souris contrôles et tolérantes, reflètent les différences observées dans le sang et pourraient donc être la simple conséquence des adaptations métaboliques qui prennent place en périphérie.

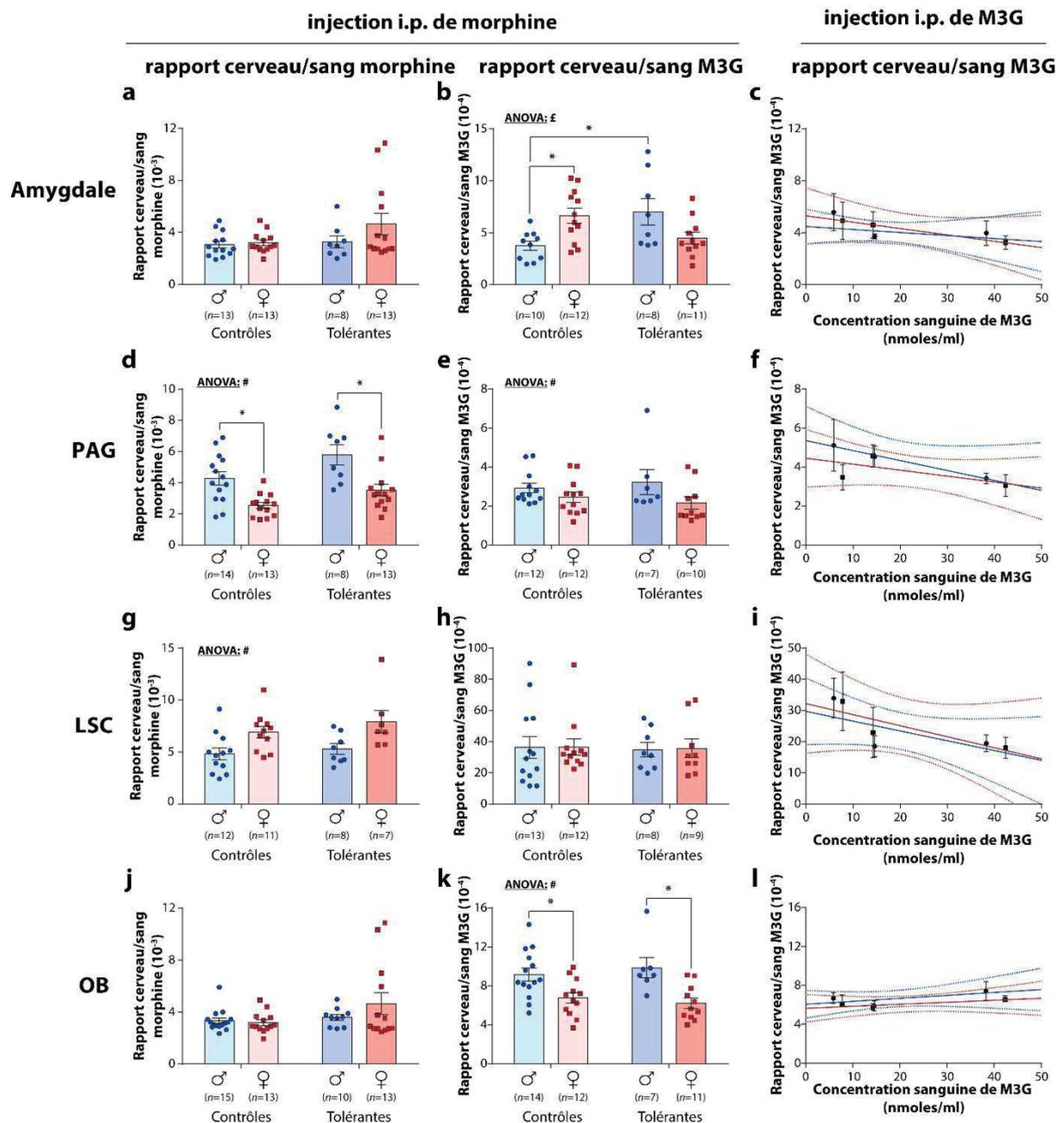


Figure 32 : Rapports cerveau/sang calculés pour la morphine et la M3G dans l'amygdale, la PAG, la LSC et le OB des souris mâles et femelles contrôles et tolérantes

Les rapports cerveau/sang ont été calculés à partir des quantités de morphine et de M3G obtenues dans les régions d'intérêt et le sang après injection de morphine au jour 10 du protocole. Rapports cerveau/sang calculés pour (a) la morphine et (b) la M3G dans l'amygdale après une injection i.p. de morphine. (c) Modèle de l'évolution des rapports cerveau/sang calculés pour la M3G dans l'amygdale en fonction de sa concentration sanguine après injections i.p. de concentrations croissantes de M3G. $n = 4$ pour l'injection de 10 mg/kg chez les mâles et chez les femelles, $n = 5$ pour les autres concentrations. Rapports cerveau/sang calculés pour (d)

la morphine et **(e)** la M3G dans la PAG après une injection i.p. de morphine. **(f)** Modèle de l'évolution des rapports cerveau/sang calculés pour la M3G dans la PAG en fonction de sa concentration sanguine après injections i.p. de concentrations croissantes de M3G. $n = 3$ pour l'injection de 10 mg/kg chez les femelles, $n = 5$ pour les autres concentrations. Rapports cerveau/sang calculés pour **(g)** la morphine et **(h)** la M3G dans la LSC après une injection i.p. de morphine. **(i)** Modèle de l'évolution des rapports cerveau/sang calculés pour la M3G dans la LSC en fonction de sa concentration sanguine après injections i.p. de concentrations croissantes de M3G. $n = 4$ pour l'injection de 10 mg/kg chez les mâles, $n = 5$ pour les autres concentrations. Rapports cerveau/sang calculés pour **(j)** la morphine et **(k)** la M3G dans le OB après une injection i.p. de morphine. **(l)** Modèle de l'évolution des rapports cerveau/sang calculés pour la M3G dans le OB en fonction de sa concentration sanguine après injections i.p. de concentrations croissantes de M3G. $n = 4$ pour l'injection de 40 mg/kg chez les mâles, $n = 5$ pour les autres concentrations. Les courbes bleues et rouges représentent respectivement les modélisations de la perméabilité de la BHE pour la M3G chez les mâles et les femelles. Les CI95 % sont représentés en pointillés dans la couleur appropriée à leur groupe. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, les n sont indiqués dans la figure. Les groupes ont été comparés à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs. Si le F obtenu était significatif et que les variances étaient homogènes, un test de comparaisons multiples de Tukey a été réalisé. Les rapports cerveau/sang calculés pour la morphine et la M3G dans la PAG ainsi que les rapports cerveau/sang calculés pour la M3G dans la LSC ont été analysés avec une version non-paramétrique de l'ANOVA à deux facteurs (*i.e.* l'ART ANOVA). Sexe : #, $P < 0,05$. Interaction : £, $P < 0,05$. *, $P < 0,05$. **LSC**, moelle épinière lombaire, **M3G**, morphine-3-glucuronide ; **OB**, bulbe olfactif ; **PAG**, substance grise périaqueducule.

Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique pour la M3G chez les mâles et les femelles

Etant donné que les principales différences observées pour les rapports cerveau/sang calculés pour la M3G sont liées au sexe, nous avons évalué dans quelle mesure la perméabilité de la BHE pour la M3G est potentiellement influencée par le sexe. Pour ce faire, nous avons injecté plusieurs doses de M3G en i.p. (10 mg/kg, 20 mg/kg et 40 mg/kg) à différents groupes de souris mâles et femelles. Les quantités de M3G ont été quantifiées par LC-MS/MS dans le sang et dans nos régions cérébrales d'intérêts 30 min après l'injection. Des régressions linéaires, modélisant la perméabilité de la BHE pour la M3G dans chaque structure, ont été réalisées à partir des rapports cerveau/sang calculés pour la M3G en fonction des concentrations croissantes de M3G dans le sang. Ces modèles sont illustrés dans les panneaux de droite de la **Figure 32** et ont été confrontés à l'aide d'une comparaison de modèle réalisée avec la méthode des moindres carrés suivi d'un test F. Le détail statistique est présenté dans l'**Annexe 5, tableau supplémentaire 6**.

Comme illustré dans la **Figure 32**, aucune différence statistique n'est observée pour la perméabilité de la BHE pour la M3G entre les mâles et les femelles dans les régions analysées (courbe bleue et courbe rouge, respectivement ; **Figure 32c, 32f, 32i, 32l**). Par ailleurs, l'évolution de la perméabilité de la BHE pour la M3G semble être relativement linéaire avec les injections de doses croissantes de M3G dans la gamme de concentrations testées (**Annexe 9**).

Métabolisme central de la morphine chez les souris mâles et femelles

Puisque les différences observées dans les quantités de M3G au sein des structures d'intérêt du SNC ne semblent pas provenir des différences observées dans le sang ni de la perméabilité de la BHE pour la M3G, nous avons émis l'hypothèse d'un métabolisme central de la morphine qui pourrait être influencé par le sexe et ce, au sein de régions clefs impliquées dans le contrôle de la douleur. Afin de valider cette hypothèse, nous avons déterminé si les rapports cerveau/sang calculés pour la M3G après une injection de morphine (**Figure 32b** pour l'amygdale, **32e** pour la PAG, **32h** pour la LSC, **32k** pour le OB) étaient significativement différents de ceux obtenus après une injection de M3G (**Figure 32c** pour l'amygdale, **32f** pour la PAG, **32i** pour la LSC, **32l** pour le BO). En d'autres termes, nous avons déterminé si, pour une concentration sanguine de M3G donnée, les quantités de M3G trouvées dans les régions d'intérêt du SNC sont significativement supérieures après une injection de morphine qu'après

une injection de M3G. Comme, après l'injection de morphine, chaque souris montre des concentrations sanguines de M3G différentes, nous avons réalisé des régressions linéaires à partir des rapports cerveau/sang calculés pour la M3G dans chaque structure, en fonction des concentrations sanguines de M3G obtenues après l'injection de morphine. Ensuite, nous avons comparé les modèles obtenus avec les modèles de perméabilité de la BHE pour la M3G réalisés à l'aide des injections i.p. de M3G, afin de déterminer s'il existe un métabolisme central de la morphine et si ce métabolisme est significativement différent entre les sexes. Ces analyses ont été réalisées à l'aide d'une comparaison de modèle produite avec la méthode des moindres carrés suivi d'un test F. Le détail statistique est présenté dans l'**Annexe 5, tableau supplémentaire 6**.

Les rapports cerveau/sang calculés pour la M3G au sein de l'amygdale sont significativement plus élevés après une injection de morphine qu'après une injection de M3G chez les femelles (**Figure 32b, 32c**). Aucune différence n'est observée chez les mâles. De plus, les femelles montrent des rapports cerveau/sang calculés pour la M3G significativement supérieurs aux mâles. Ces résultats suggèrent l'existence d'un métabolisme central de la morphine dans l'amygdale et que ce métabolisme diffère entre les mâles et les femelles. À l'inverse, les mâles possèdent un métabolisme de la morphine plus important que les femelles dans le OB (**Figure 32k, 32l**). Aucune différence n'est observée dans la LSC et les rapports cerveau/sang calculés pour la M3G sont anormalement plus bas après une injection de morphine qu'après une injection de M3G.

En résumé, ces résultats suggèrent que la morphine est métabolisée *in vivo* dans des régions importantes dans le contrôle de la douleur. Par ailleurs, ce métabolisme central est influencé par le sexe et pourrait contribuer aux différences d'antinociception observées entre les mâles et les femelles. Cependant, il ne semble pas être impliqué dans le développement de la tolérance.

Métabolisme de la morphine en culture primaire de cellules gliales

In vivo, le métabolisme central de la morphine est influencé par le sexe. Afin de mieux comprendre l'origine de ce dimorphisme sexuel, nous avons étudié ce métabolisme en *in vitro* à l'aide de cultures primaires de cellules gliales provenant de cerveau de souris. Nous avons réalisé des cultures de microglies et d'astrocytes purifiées à l'aide de la technique MACS, ainsi que des cultures mixtes de glie. Ensuite, nous avons incubé les cellules avec deux concentrations différentes de morphine et quantifiés la M3G présentes dans le surnageant après 24 h par LC-MS/MS. Comme décrit dans l'introduction, l'une des cibles supposées de la M3G est le TLR4. Or le LPS, principal agoniste du TLR4, a précédemment été décrit pour induire l'activation des astrocytes ayant pour résultante l'induction de certaines UGTs (Heurtaux et al., 2006). C'est pourquoi, nous avons également évalué le métabolisme de la morphine sur des cellules en culture primaire après une préincubation avec du LPS à une concentration de 100 ng/ml. Les quantités de M3G obtenues ont été comparées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs pour évaluer l'impact du type cellulaire, du traitement au LPS et de leur interaction. Le détail statistique est présenté dans l'**Annexe 5, tableau supplémentaire 7**. Je n'ai pas réalisé cette expérience moi-même et je remercie chaleureusement Volodya pour son précieux travail.

Des concentrations significatives de M3G ont été retrouvées dans le surnageant de culture lorsque 10 μ M et 100 μ M de morphine ont été incubés pendant 24 h avec les microglies et les astrocytes purifiés, ainsi qu'avec les cultures mixtes avec ou sans préincubation avec le LPS 100 ng/ml. Cette analyse a mis en évidence une interaction entre la préincubation au LPS et le type cellulaire pour les deux concentrations de morphine. En effet, à 10 μ M (**Figure 33a**), comme à 100 μ M de morphine (**Figure 33b**), en l'absence de préincubation au LPS, les cultures mixtes produisent significativement plus de M3G que les astrocytes purifiés. Les astrocytes purifiés produisent significativement plus de M3G que les microglies purifiées. Ce constat est le même en condition de préincubation au LPS, mais les différences observées entre les types cellulaires sont beaucoup plus fortes, ce qui explique la présence de l'interaction. Plus précisément, l'analyse post-hoc a révélée l'absence de différence significative dans la production de M3G à partir de 10 μ M (**Figure 33a**) et 100 μ M (**Figure 33b**) de morphine entre les microglies prétraitées ou non au LPS. À l'inverse des microglies, une différence significative a été observée entre les astrocytes prétraités ou non au LPS, ainsi qu'entre les cultures mixtes pour les deux concentrations (**Figure 33a, 33b**).

Ces résultats suggèrent que :

- (i) les microglies et les astrocytes sont capables de métaboliser la morphine
- (ii) la préincubation au LPS exacerbe le métabolisme de la morphine par les astrocytes, mais pas par les microglies
- (iii) il existe une synergie entre ces deux types cellulaires qui provoque une augmentation du métabolisme de la morphine
- (iv) cette synergie est exacerbée par une préincubation au LPS.

Il est également important de noter que le métabolisme de la morphine augmente proportionnellement avec les deux concentrations testées (Figure 35a, 35b).

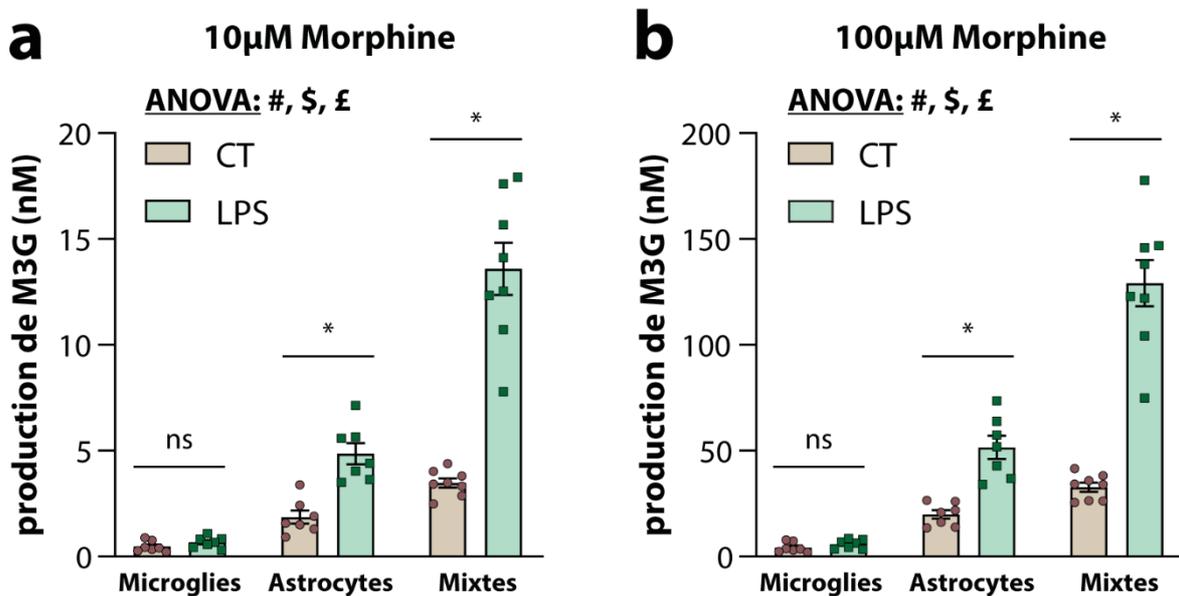


Figure 33 : Métabolisme de la morphine *in vitro* par des cultures primaires de cellules gliales mixtes ou purifiées

Les cellules ont été préincubées ou non avec du LPS 100 ng/ml pendant 24 h. Ensuite, celles-ci ont été incubées pendant 24 h avec (a) 10 µM et (b) 100 µM de morphine. La M3G produite a alors été quantifiée par LC-MS/MS dans le surnageant des cultures. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM, $n = 7-8$. Les groupes ont été comparés à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs après transformation logarithmique des données pour atteindre la normalité et l'homogénéité des variances. Un test de comparaisons multiples de Tukey a été ensuite réalisé. Lignée cellulaire : #, $P < 0,05$. Préincubation au LPS : \$, $P < 0,05$. Interaction : £, $P < 0,05$. *, $P < 0,05$. CT, préincubation contrôles ; LPS, préincubation au lipopolysaccharide ; M3G, morphine-3-glucuronide ; ns, non significatif.

Effet de la M3G sur les cellules RAW-DUAL™ et RAW-DUAL™ KO-TLR4

L'une des hypothèses de l'origine des effets de la M3G suggère sa liaison au TLR4 au sein du SNC. Néanmoins, ce mécanisme est débattu de par l'existence de données contradictoires. Afin d'évaluer la mesure dans laquelle la M3G peut se lier et entraîner une signalisation du TLR4, nous avons stimulé avec différentes concentrations de M3G un système rapporteur de la signalisation TLR, consistant en une lignée de macrophages qui expriment ou non le TLR4. Les données obtenues ont été comparées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs pour évaluer l'impact du type cellulaire, du traitement et de leur interaction. Le détail statistique est présenté dans l'**Annexe 5, tableau supplémentaire 8**.

La stimulation des RAW-DUAL™ avec du LPS concentré à 100 ng/ml aboutit à une activité significative de la LUCIA (**Figure 34a**) et de la SEAP (**Figure 34b**) respectivement de 16,7 fois et 371,8 fois celle observée pour les contrôles non stimulés. Par ailleurs, lorsque les RAW-DUAL™ KO TLR4 sont stimulées avec la même concentration de LPS, aucune différence significative n'est observée avec les contrôles non stimulés, bien qu'une activité supérieure respectivement de 1,4 fois et 37,5 fois soit observée pour la LUCIA et la SEAP. Avec la volonté de réaliser un contrôle supplémentaire de nos lignées, nous avons utilisé le LPS-EK, un LPS spécifique du TLR4 pour confirmer l'absence d'activation dans notre lignée RAW-DUAL™ KO TLR4. Lorsque les cellules sont stimulées avec du LPS-EK concentré à 100 ng/ml, les RAW-DUAL™ montrent une activité significative de la LUCIA et de la SEAP respectivement de 14,9 fois et 171,7 fois celle des contrôles, alors que les RAW-DUAL™ KO TLR4 ne montrent aucune activation (1,05 fois pour la LUCIA et 0,80 fois pour la SEAP comparé au contrôle). L'analyse de la lignée RAW-DUAL™ KO TLR4 a révélé que, en comparaison aux contrôles non stimulés, la stimulation au LPS provoque une activité significative de la LUCIA et de la SEAP qui est inexistante avec le LPS-EK, ce qui confirme bien l'absence du TLR4.

La stimulation avec 4 concentrations de M3G (100 µM, 10 µM, 1 µM et 0,1 µM pendant 24 h avant l'analyse) ne produit aucun effet significatif sur l'activité de la LUCIA (**Figure 34c**) et de la SEAP (**Figure 34d**) dans les cellules RAW-DUAL™, ni dans les cellules RAW-DUAL™ KO TLR4.

En résumé, bien que les deux lignées soient parfaitement fonctionnelles, aucune différence significative n'a été observée avec la gamme de concentrations de M3G utilisée suggérant que la M3G n'active pas la signalisation du TLR4.

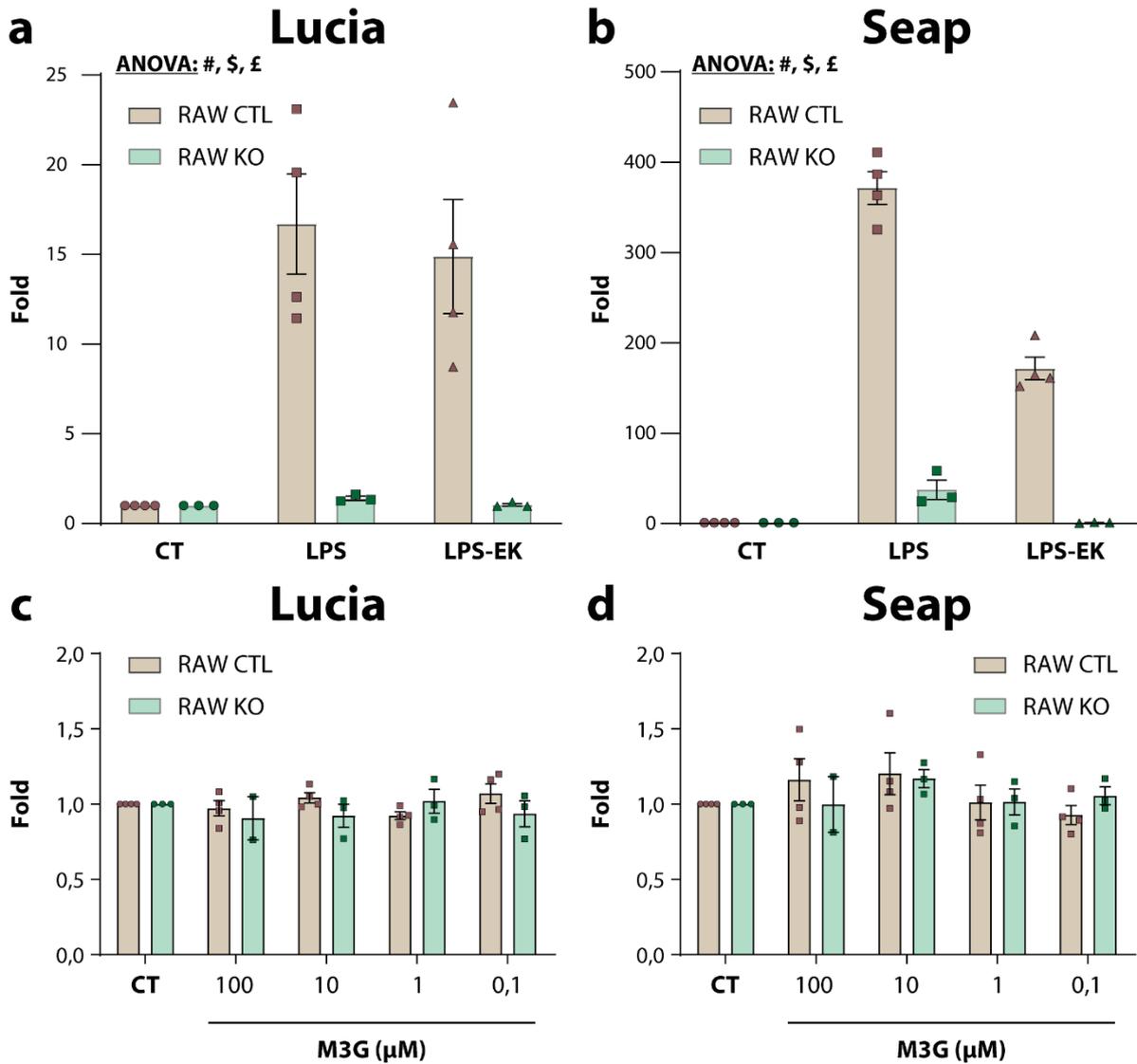


Figure 34 : Effet de la M3G sur les RAW-DUAL™ et les RAW-DUAL™ KO-TLR4

Les cellules ont été incubées pendant 24 h en l'absence de ligands, avec du LPS 100 ng/ml, du LPS-EK 100 ng/ml ou 100, 10, 1 ou 0,1 µM de M3G. Chaque expérience a été réalisée avec 80 000 cellules/puit. **(a)** Effet de la stimulation des cellules RAW-DUAL™ et RAW-DUAL™ KO-TLR4 à 100 ng/ml de LPS et à 100 ng/ml de LPS-EK sur l'activité de la LUCIA. **(b)** Effet de la stimulation des cellules RAW-DUAL™ et RAW-DUAL™ KO-TLR4 à la M3G (100, 10, 1 et 0,1 µM) sur l'activité de la LUCIA. **(c)** Effet de la stimulation des cellules RAW-DUAL™ et RAW-DUAL™ KO-TLR4 à 100 ng/ml de LPS et à 100 ng/ml de LPS-EK 100 ng/ml sur l'activité de la SEAP. **(d)** Effet de la stimulation des cellules RAW-DUAL™ et RAW-DUAL™ KO-TLR4 à la M3G (100, 10, 1 et 0,1 µM) sur l'activité de la SEAP. Les données représentées correspondent aux moyennes des triplicat par expériences indépendantes ± SEM, $n = 2-4$ expériences indépendantes. Les groupes ont été comparés à l'aide d'une ANOVA à deux

facteurs. Lignée cellulaire : #, $P < 0,05$. Préincubation au LPS : \$, $P < 0,05$. Interaction : £, $P < 0,05$. **CT**, préincubation contrôle ; **LPS**, lipopolysaccharide ; **LPS-EK**, lipopolysaccharide de la souche *Escherichia coli K12* ; **M3G**, morphine-3-glucuronide ; **RAW CTL**, RAW-DUALTM exprimant le TLR4 ; **RAW KO**, RAW-DUALTM n'exprimant pas le TLR4 ; **SEAP**, phosphatase alcaline embryonnaire sécrétée.

Effet de la M3G et du LPS sur des microglies primaires exprimant ou non le MOR

Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur l'étude de l'effet de la M3G sur la microglie en imagerie calcique. En effet, bien que l'expérience précédente avec les RAW-DUALTM n'ait pas abouti à la conclusion de l'implication du TLR4, celui-ci est exprimé par les microglies et la stimulation au LPS est décrite pour provoquer une augmentation transitoire du calcium au sein de ces cellules (Bader, Taupenot, Ulrich, Aunis, & Ciesielski-Treska, 1994; Lehnardt et al., 2002). De plus, afin de déterminer si le MOR est impliqué dans ces effets, nous avons utilisé une lignée de souris transgénique qui n'exprime pas ce récepteur. Les données d'amplitude maximale et d'aire sous la courbe suite à la stimulation à l'UTP en condition avec ou sans pré-ncubation de M3G ou de LPS ont été comparées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs pour évaluer l'impact du type cellulaire, de la préincubation et de leur interaction. Le détail statistique est présenté dans l'**Annexe 5, tableau supplémentaire 9**.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet d'une application aiguë de M3G sur des microglies primaires contrôles et KO pour le MOR. La **Figure 35a** illustre un exemple de réponse calcique suite au protocole d'application aiguë de M3G sur des microglies contrôles exprimant le MOR. La réponse calcique de base des cellules a été déterminée pendant 100 s avant d'appliquer la M3G (30 μ M pendant 10 s). Ensuite, l'UTP (30 μ M pendant 3 s) a été utilisé comme contrôle positif de la viabilité des cellules. Aucune réponse calcique significative n'a été observée suite à la stimulation à la M3G chez les microglies exprimant le TLR4 mais n'exprimant pas le MOR, ni chez les microglies contrôles. Ce résultat suggère que l'application aiguë de M3G ne provoque aucune réponse calcique transitoire chez les microglies. Par ailleurs, un résultat identique est observé avec le LPS avec lequel l'application directe aiguë (1 μ g/ml pendant 10 s) ne provoque aucune augmentation calcique transitoire au sein des microglies.

Dans un deuxième temps, et suite à l'absence d'effet de l'application aiguë de M3G, nous avons préincubé les deux types de microglies avec 30 μ M de M3G pendant 24 h avant de répéter le même protocole. Malgré l'absence d'effet direct de la M3G sur les microglies, il est possible que la préincubation des microglies avec la M3G puisse induire des modulations de l'expression de certains gènes, permettant l'apparition d'une réponse calcique transitoire lors de la prochaine application. La **Figure 35b** illustre un exemple type de réponse calcique suite au protocole d'application sur microglie KO pour le MOR préincubé avec de la M3G. A nouveau, aucune réponse calcique significative n'est observée suite à l'application aiguë de M3G chez les microglies KO pour le MOR, ni chez les microglies contrôles. Il est important de noter que la stimulation à l'UTP produit toujours l'effet escompté dans les deux cas. Ces

résultats suggèrent que la préincubation des microglies avec la M3G ne permet pas d'induire une réponse calcique suite à l'application aiguë de M3G. Un résultat similaire a été observé avec le LPS : la préincubation au LPS 1 µg/ml pendant 24 h ne permet pas l'apparition d'une réponse, ni à l'application directe de M3G, ni à celle du LPS.

Enfin, suite à l'absence de réponse à l'application aiguë de M3G en condition contrôle et préincubées avec la M3G, nous avons stimulé les microglies préincubées ou non directement avec de l'UTP. Ce protocole permet d'évaluer si la M3G modifie l'homéostasie du calcium au sein des cellules et module ainsi, l'intensité ou la durée d'une réponse calcique caractérisée. Par le biais de la modulation de l'expression de certains gènes (pompes, canaux, chélateur calcique etc.), il est possible que la M3G puisse moduler l'équilibre ionique du calcium au sein de la cellule, modifiant ainsi la réponse aux stimuli extérieurs (Hoffmann et al., 2003). Après la stimulation à l'UTP, aucune différence significative n'est observée dans l'amplitude de la réponse calcique transitoire entre la condition en absence de préincubation et celles de préincubation à la M3G, ou au LPS, chez les microglies KO pour le MOR, ni chez les microglies contrôles (**Figure 35c**). Une tendance est néanmoins observée entre la lignée contrôle et la lignée KO pour le MOR, bien que celle-ci ne soit pas significative (**Figure 35c**). Le même constat est réalisé dans l'AUC de la réponse calcique transitoire pour laquelle aucune différence significative n'est observée (**Figure 35d**).

En résumé, l'application de M3G sur des microglies primaires en culture ne semble pas induire d'effet direct ou indirect, indépendamment de la présence ou de l'absence du MOR. De plus, contrairement à ce qui peut être décrit dans la littérature, dans nos conditions, le LPS n'induit aucun effet direct ou indirect sur la microglie.

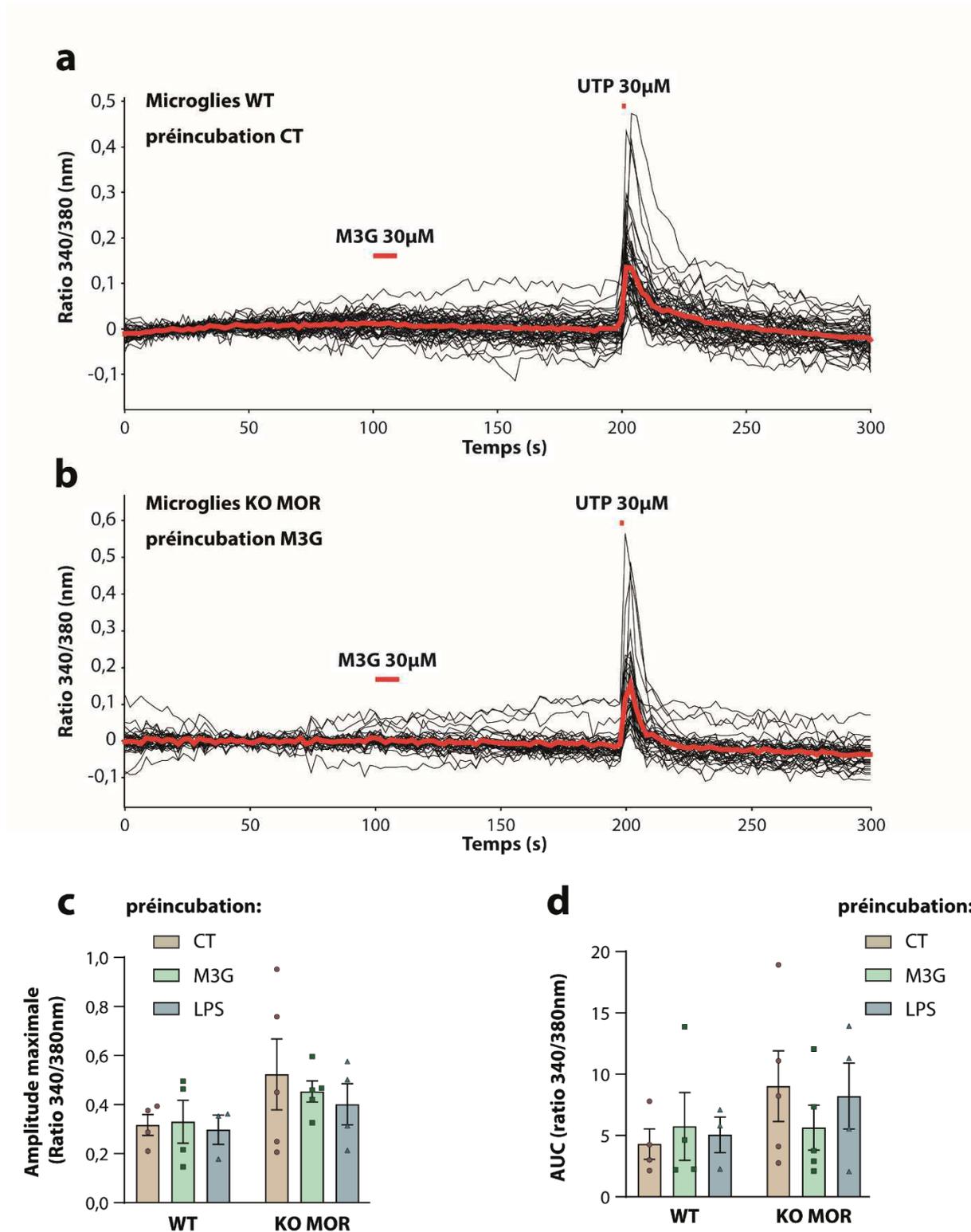


Figure 35 : Absence d'effet en imagerie calcique de l'application directe de M3G et de sa préincubation sur des microglies primaires en culture exprimant ou non le MOR

Les microglies ont été préincubées en absence ou présence de 30 µM de M3G ou 1 µg/ml de LPS pendant 24 h. Ensuite, elles ont été mises en contact avec la sonde calcique Fura-2 pendant

1 h avant que la fluorescence ne soit enregistrée. **(a)** Trace type obtenue avec des microglies exprimant le MOR en l'absence de préincubation au préalable. L'application directe de M3G (30 μ M pendant 10 s) est suivie d'une application d'UTP (30 μ M pendant 3 s). La trace en rouge représente la moyenne des traces de toutes les cellules enregistrées sur le champ. **(b)** Trace type obtenue avec le même protocole avec des microglies KO pour le MOR préincubée pendant 24 h avec 30 μ M de M3G. La trace en rouge représente la moyenne des traces de toutes les cellules enregistrées sur le champ. **(c)** Amplitude maximale moyenne atteinte par l'augmentation calcique transitoire induite par l'application d'UTP chez des microglies exprimant ou non le MOR préincubées en absence ou présence de M3G 30 μ M ou de LPS 1 μ g/ml pendant 24 h. L'amplitude maximale atteinte par cellule a été moyennée pour toutes les cellules d'une même boîte pour obtenir une valeur moyenne par boîte. **(d)** AUC maximale moyenne atteinte par l'augmentation calcique transitoire induite par l'application d'UTP chez des microglies exprimant ou non le MOR préincubées en absence ou présence de M3G 30 μ M ou de LPS 1 μ g/ml pendant 24 h. L'AUC maximale atteinte par chaque cellule a été moyennée pour toutes les cellules d'une même boîte afin d'obtenir une valeur moyenne par boîte. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, $n = 3-5$ boîtes de culture indépendantes. Les groupes ont été comparés à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs. **AUC**, aire sous la courbe ; **CT**, préincubation contrôle ; **KO**, souris n'exprimant pas le MOR ; **LPS**, lipopolysaccharide ; **M3G**, morphine-3-glucuronide ; **UTP**, uridine-triphosphate ; **WT**, souris exprimant le MOR.

Discussion

L'influence du sexe sur l'antinociception induite par la morphine

Les différences de sexe dans l'effet antinociceptif de la morphine

Chez le rongeur

Les différences de sexe dans l'effet antinociceptif de la morphine que nous avons observées durant nos expériences sont cohérentes avec celles reportées dans la littérature (Candido et al., 1992; Cicero et al., 1996; Doyle & Murphy, 2018; Kepler et al., 1989; Krzanowska et al., 2002; Mogil et al., 2000; Peckham et al., 2005). En effet, quel que soit le mode d'administration, les mâles présentent dans la vaste majorité des études une analgésie à la morphine plus forte que les femelles. Cette analgésie est de manière générale quantifiée par l'évaluation de l'ED₅₀ de la morphine. Nous avons observé un ED₅₀ de 4,15 mg/kg chez les souris mâles et 6,81 mg/kg chez les souris femelles 30 min après injection i.p. de morphine à l'aide du test d'immersion de la queue à une température de 47 °C. Par rapport à la littérature, Cicero et collaborateurs ont évalués un ED₅₀ de 4,59 mg/kg chez les rats mâles et 8,17 mg/kg chez les femelles 30 min après injection s.c. de morphine à l'aide du test du retrait de la queue (Cicero et al., 1996). Peckham et collaborateurs ont évalués un ED₅₀ chez les rats mâles de 2,4 mg/kg et 6,0 mg/kg chez les femelles 30 min après l'injection s.c. de morphine à l'aide du test d'immersion de la queue à une température de 50 °C (Peckham et al., 2005). Chez la souris, des ED₅₀ de 2,79 mg/kg chez les mâles et de 4,06 mg/kg chez les femelles ont été observés. Ces ED₅₀ ont été déterminés 45 min après injection s.c. de morphine et par le test de retrait de la queue (Candido et al., 1992). Nos valeurs d'ED₅₀ sont ainsi cohérentes avec celles décrites dans la littérature. La variabilité des valeurs d'ED₅₀ entre les études peut être expliquée par la différence d'espèces, de tests nociceptifs utilisés et de température, de mode d'administration et d'intervalle de temps utilisé entre l'injection et le test. L'origine de ces différences liées au sexe reste néanmoins débattue. Plusieurs mécanismes ont été décrits et impliquent la fonctionnalité des MOR, les hormones, un dimorphisme sexuel dans les circuits de la douleur ou encore le rôle du métabolisme de la morphine (cf. section, *Mécanismes impliqués dans les différences liées au sexe dans les effets de la morphine*). Il est également important de noter que nous n'avons pas observé de différences dans les seuils nociceptifs de base entre les deux sexes, alors que, dans d'autres études, de telles différences sont observées (Mogil, 2012).

Chez l'humain

Les études chez l'humain sont beaucoup plus contrastées que chez l'animal (cf. section, *Différences d'analgésie et d'effets secondaires liées au sexe chez l'humain*). En fonction des études, l'homme ou la femme présentent une analgésie plus forte et parfois, aucune différence liée au sexe n'est observée. Il est difficile de conclure quant aux différences liées au sexe dans l'analgésie à la morphine chez l'humain pour plusieurs raisons. En effet, ces études sont limitées par la faisabilité de l'étude expérimentale chez l'humain. Les études évaluant ces différences chez des patients sains et volontaires dans des modèles expérimentaux de douleur ont des effectifs relativement réduits (Sarton et al., 2000). Les études cliniques rétrospectives présentent des effectifs plus importants mais ces dernières sont réalisées dans un contexte clinique qui nécessite une prise en charge de la douleur par la morphine, et bien souvent chez des populations de patients très hétérogènes (Aubrun et al., 2005). Le contexte de douleur est donc différent chez ces patients et peut biaiser les conclusions tirées quant aux différences liées au sexe dans l'analgésie à la morphine. De plus, les protocoles d'administration de la morphine, d'évaluation de la douleur et de sélection des patients varient d'une étude à l'autre et peuvent conduire à des conclusions différentes. Par exemple, l'évaluation des différences liées au sexe dans l'analgésie à la morphine dans les études utilisant la PCA peut conduire à des conclusions éronnées. Plusieurs études ont évalué que les femmes consomment moins de morphine que les hommes lors de l'administration par PCA (Chia et al., 2002; Joels et al., 2003; Niesters et al., 2010). La variable dépendante pour évaluer ces différences est la consommation de morphine. Or, celle-ci est à la fois influencée par l'analgésie et par le développement des effets secondaires. Plusieurs études ont montré que les femmes développent plus d'effets secondaires que les hommes ce qui pourrait expliquer pourquoi elles consomment moins de morphine dans les études impliquant la PCA (Bijur et al., 2008; Cepeda et al., 2003; Comer et al., 2010; Dahan et al., 1998; Fillingim et al., 2005; Sarton et al., 1999).

D'autre part, l'évaluation de la douleur chez l'humain est différente de l'animal. En laboratoire, les tests nociceptifs communément utilisés évaluent l'antinociception à la morphine par le biais d'un réflexe nociceptif, chez des rongeurs d'une même espèce consanguine et de même âge. Ils présentent ainsi peu d'hétérogénéité génétique et le réflexe observé est relativement facile à caractériser. Chez l'humain, la douleur est généralement évaluée à l'aide d'une échelle analogue numérique ou visuelle qui nécessite la verbalisation de la douleur du patient. L'expression de la douleur, en comparaison à la nociception observée par un réflexe, intègre les dimensions psychologiques et sociales du patient. Elle est influencée à la fois par la

physiologie de la nociception, mais également par le contexte social, l'histoire du patient, les comorbidités, la manière de faire face à la douleur, la catastrophisation et même le sexe de l'interlocuteur praticien (Greenspan et al., 2007; Paller, Campbell, Edwards, & Dobs, 2009). La très forte hétérogénéité des patients en termes d'âges, de poids, d'ethnicités, de polymorphismes génétiques et de conditions médicales induit également une variabilité très importante dans l'évaluation de la douleur et l'analgésie à la morphine (Greenspan et al., 2007; Paller et al., 2009).

Dans le contexte de nos travaux, une étude réalisée chez l'humain est importante à citer. Sarton et collaborateurs ont réalisé une étude clinique expérimentale dans laquelle ils ont injecté de la morphine par voie i.v. à 10 hommes et 10 femmes jeunes en bonne santé. Ils ont observé une analgésie plus forte chez la femme (Sarton et al., 2000). Ils ont évalué la cinétique analgésique de la morphine et ont constaté que l'analgésie apparaissait et s'estompait plus rapidement chez l'homme, mais qu'elle était plus forte chez la femme. S'ils avaient uniquement mesuré l'analgésie 30 min après l'injection, ils auraient conclu que l'homme présentait une analgésie plus forte que la femme. Dans notre contexte, puisque nous n'avons testé l'antinociception qu'à 30 min après l'injection, il n'est pas impossible que nos conclusions concernant les différences liées au sexe soient en partie incomplètes. Néanmoins, nos observations sont soutenues par la littérature chez le rongeur dans laquelle aucune différence de cinétique analgésique n'est observée entre les sexes (Boyer et al., 1998; Cicero et al., 1996, 1997; Doyle & Murphy, 2018; Lipa & Kavaliers, 1990; X. Wang et al., 2006).

Les différences liées au sexe dans le métabolisme périphérique de la morphine

Nous avons observé une influence du sexe sur les concentrations circulantes de morphine et de M3G après injection i.p. de morphine. Les quantités de morphine n'étaient pas significativement différentes, mais les femelles présentaient des taux plus élevés de M3G dans le sang que les mâles. Ces résultats sont cohérents avec la littérature, bien que parfois, des quantités très légèrement plus élevées de morphine sont observées chez les mâles (Alnouti, Shelby, Chen, & Klaassen, 2007; Baker & Ratka, 2002; South et al., 2009). Dans l'ensemble des études chez le rongeur, les ratios métaboliques M3G/morphine sont supérieurs chez les femelles. South et collaborateurs ont observé des résultats similaires aux nôtres (South et al., 2009). Leurs résultats suggèrent que les différences que nous avons observées ne dépendent pas de l'absorption de la morphine, puisqu'ils ont constaté les mêmes différences après injection i.v. de morphine (*i.e.* en absence d'absorption). De manière surprenante, aucune différence liée

au sexe n'a été observée chez le rat *in vitro* dans la glucuronidation hépatique de la morphine (Rush, Newton, & Hook, 1983). De plus, dans notre expérience, nous n'avons pas observé de différence de clairance, ni de volume de distribution de la morphine entre les mâles et les femelles. Il était cependant impossible de définir la clairance et le volume de distribution de la M3G car ces paramètres sont définis à l'aide de la dose administrée. En résumé, l'ADME de la morphine ne semble pas expliquer les différences liées au sexe observées dans les quantités de M3G dans le sang. L'influence du sexe sur la distribution de métabolites glucuronidés a cependant été démontrée (Bond, Medinsky, Dent, & Rickert, 1981). Ainsi, il est possible que la clairance ou la distribution de la M3G diffère entre les mâles et les femelles résultant en des concentrations plus élevées de M3G dans le sang.

Il est important de noter que ces différences ne sont pas forcément toujours retrouvées chez l'humain. En effet, Sarton et collaborateurs ont observé que l'analgésie à la morphine était plus forte chez les femmes par rapport aux hommes (Sarton et al., 2000). Si le métabolisme chez la femme tend à produire plus de M3G, il est raisonnable de penser qu'il en va de même pour la M6G. Comme la M6G est analgésique, sa production accrue pourrait provoquer les différences observées dans l'analgésie. Néanmoins, cela ne semble pas être le cas, car Sarton et collaborateurs n'ont reporté aucune différence de métabolisme dans leur expérience (Sarton et al., 2000). D'autres observations suggèrent que les concentrations sanguines de morphine et de M6G sont plus faibles chez l'homme mais les concentrations de M3G sont similaires à celles retrouvés chez la femme (McQuay et al., 1990). Malheureusement, assez peu d'études chez l'humain ont évalué le métabolisme de la morphine en considérant le sexe comme variable.

Plusieurs études ont corrélé négativement la balance métabolique M3G/morphine observée dans le plasma avec l'antinociception chez le rongeur (Baker & Ratka, 2002; G. D. Smith & Smith, 1995; South et al., 2001). Nos résultats obtenus dans le sang semblent cohérents avec les différences d'antinociception observées entre les deux sexes. Cependant, il est peu probable que ces différences reposent uniquement sur le dimorphisme sexuel du métabolisme périphérique de la morphine. En effet, les différences liées au sexe dans l'antinociception à la morphine chez le rongeur sont également observées après injection de morphine en i.c.v., ou directement dans la vIPAG (Doyle & Murphy, 2018; Kepler et al., 1989; Kest et al., 1999; Krzanowska & Bodnar, 1999; Krzanowska et al., 2002).

L'influence du sexe sur le métabolisme central de la morphine

Les quantités de morphine et de M3G retrouvées au sein des régions impliquées dans le contrôle de la douleur

La balance métabolique entre la morphine et la M3G au sein du SNC semble être impliquée dans l'antinociception à la morphine chez le rongeur et chez l'humain (M. J. Barjavel et al., 1995; M. T. Smith et al., 1999). À ma connaissance, aucune étude n'a étudié à ce jour le lien entre cette balance métabolique dans des régions importantes dans le contrôle de la douleur et les différences liées au sexe dans l'antinociception à la morphine. Nous avons observé des quantités de morphine significativement plus élevées dans l'amygdale et dans la PAG 30 min après l'injection i.p. de morphine chez les souris mâles en comparaison aux souris femelles. Ce résultat est cohérent avec des données de la littérature obtenues par l'analyse du cerveau entier (Candido et al., 1992). Ces observations sont intéressantes au vu de l'implication de la PAG et de l'amygdale dans l'antinociception à la morphine et sont en adéquation avec les différences liées au sexe observées lors des expériences de comportement (cf. section, *Effets analgésique de la morphine*). Le résultat inverse a été observé dans la moelle épinière alors que celle-ci participe également à l'antinociception à la morphine. Nous avons observé significativement plus de M3G dans l'amygdale et dans la moelle épinière, mais aucune différence n'a été observée dans la PAG. De la même façon, au vu des effets de la M3G dans le SNC (cf. section, *Activité biologique des métabolites glucuronidés de la morphine*), ces résultats sont cohérents avec les données de comportement. Enfin, les ratios métaboliques étaient largement plus élevés chez les femelles que chez les mâles dans l'amygdale et la PAG, mais pas dans la moelle épinière. Ces derniers résultats sont d'une importance particulière car *(i)* l'antinociception est produite par la morphine et la pronociception est induite par la M3G *(ii)* l'amygdale et la PAG sont deux structures centrales dans l'antinociception à la morphine *(iii)* une étude de Barjavel et collaborateurs suggèrent que les ratios métaboliques M3G/morphine au sein du SNC chez le rongeur sont corrélés au degré d'antinociception (M. J. Barjavel et al., 1995). **Ainsi, nos résultats suggèrent un rôle de la balance métabolique M3G/morphine dans la PAG et l'amygdale dans les différences d'antinociception à la morphine liées au sexe.** Pour appuyer ces résultats, l'étude de Peckham et collaborateurs propose également l'implication du métabolisme dans ces différences. En effet, dans cette étude, les différences liées au sexe dans l'antinociception sont principalement observées avec des opioïdes dont le métabolisme produit un métabolite 3-glucuronide (Peckham & Traynor, 2006). De manière similaire, aucune

différence liée au sexe n'a été observée avec le fentanyl dont le métabolisme ne produit pas de métabolites 3-glucuronide (Bartok & Craft, 1997).

Il est important de noter que nous n'avons pas perfusé les animaux avant de prélever les structures cérébrales et réaliser les dosages. On ne peut exclure une possible contamination des structures prélevées avec la morphine et la M3G présentes dans la circulation sanguine, notamment dans la LSC. Cependant, le volume de sang est extrêmement minime dans les structures cérébrales prélevées à l'emporte-pièce. De plus, malgré la présence de sang, nous avons observé des différences significatives dans les rapports cerveau/sang de la morphine et de la M3G, suggérant que cette contamination n'impacte pas, ou peu, nos résultats.

Les différences liées au sexe retrouvées dans les quantités de morphine et de M3G dans le SNC pourraient dépendre d'un métabolisme central de la morphine. Des données suggèrent l'existence, au sein du SNC, d'un métabolisme de la morphine (Murphey & Olsen, 1994; Togna et al., 2013; Wahlstrom et al., 1986; Wahlstrom, Winblad, et al., 1988; Yamada et al., 2003). Pour évaluer ce métabolisme central, nous avons *(i)* déterminé les rapports de quantités trouvées dans les régions cérébrales d'intérêts et le sang entre la morphine et la M3G, *(ii)* évalué la perméabilité de la BHE pour la M3G et *(iii)* comparé les rapports cerveau/sang de la M3G obtenus après une injection de morphine avec ceux obtenus après une injection de M3G, pour évaluer si pour une concentration sanguine de M3G donnée, les quantités dans les régions cérébrales d'intérêts sont différentes.

Les rapports cerveau/sang

Les rapports cerveau/sang de la morphine et de la M3G que nous avons obtenus sont relativement faibles par rapport à ceux retrouvés dans la littérature. Ces rapports sont de l'ordre de 0,5 pour la morphine et 0,10 pour la M3G (Mignat, Jansen, et al., 1995; Murphey & Olsen, 1994; R. Xie et al., 1999) alors que nous avons trouvé des rapports 100x plus faibles. Ces quantifications ont été réalisées sur cerveau entier à différents points temporels alors que nous les avons effectuées sur structures discrètes 30 min après l'injection de morphine. Nos données sont normalisées par mg de protéines et les quantifications sont réalisées à l'aide de la dilution isotopique. Cependant, les données de la littérature ne sont pas forcément réalisées de la même manière, ni rapportées à la quantité de protéines. Une comparaison entre nos données et celles de la littérature est donc difficile, mais les rapports cerveau/sang de la M3G étaient environ 5 à

10 fois plus faibles que ceux obtenus pour la morphine. Ces résultats sont cohérents avec les différences de perméabilité de ces molécules reportées dans la littérature.

De plus, nous avons observé des différences dans les rapports cerveau/sang entre structures, suggérant des différences dans la distribution locale de la morphine et de ses métabolites, bien que nous n'ayons pas réalisé d'analyses statistiques pour comparer ces différences. Nos observations sont cohérentes avec la littérature suggérant que la distribution de la morphine au sein du SNC ne semble pas homogène en fonction des structures (Bhargava et al., 1993; Bolander et al., 1983; Fuller et al., 1988).

La perméabilité de la barrière hémato-encéphalique pour la morphine et la M3G

Puisque les rapports cerveau/sang étaient significativement différents entre les mâles et les femelles, il semblerait que les différences de quantités que nous avons observées dans les régions cérébrales d'intérêts ne dépendent pas nécessairement du métabolisme périphérique de la morphine. En effet, les rapports cerveau/sang permettent de normaliser les quantités de morphine ou de M3G dans le sang pour évaluer les différences de quantité pour une molécule donnée dans les régions cérébrales en s'affranchissant des différences dans le sang. Nous avons, par conséquent, postulé que les différences observées dans les régions du SNC pourraient dépendre de la perméabilité de la BHE pour la morphine et la M3G, qui serait influencée par le sexe.

De manière intéressante, nous n'avons pas observé de différences liées au sexe dans la perméabilité de la BHE pour la M3G, suggérant que les différences de quantité de M3G dans les régions analysées ne sont ni liées au métabolisme périphérique, ni au passage à travers la BHE. Cependant, nous n'avons pas déterminé l'influence du sexe sur la perméabilité de la BHE pour la morphine. En effet, dans le cas de la M3G, l'expérience est réalisable assez simplement car, après injection systémique, celle-ci est simplement excrétée mais n'est pas dégradée de manière significative. En d'autres termes, il n'y a pas d'interférence du métabolisme qui module les quantités de M3G dans le plasma ni le cerveau après une injection de M3G. Dans le cas de la morphine, l'interprétation des résultats est plus complexe car celle-ci est métabolisée en M3G. Dans notre contexte, l'hypothèse principale reposait sur l'existence d'un métabolisme central. Il était par conséquent impossible de distinguer l'implication de la perméabilité de la BHE pour la morphine et l'implication du métabolisme central dans les différences de quantités de morphine observées.

Le métabolisme central de la morphine

L'ensemble de nos données suggère l'existence d'un métabolisme central de la morphine influencé par le sexe et la localisation cérébrale. Les différences liées au sexe dans les quantités de M3G retrouvées dans les régions du SNC analysées ne semblent ni dépendre du métabolisme périphérique, ni de la perméabilité de la BHE pour la M3G. Pour appuyer ces résultats, nous avons comparé les rapports cerveau/sang obtenus pour la M3G après une injection de morphine avec ceux déterminés après une injection de M3G. Après l'injection de morphine, ces rapports étaient supérieurs à ceux obtenus après l'injection de M3G dans l'amygdale et dans le OB. En d'autres termes, pour une même concentration de M3G dans le sang, les quantités de M3G retrouvées dans l'amygdale et dans le OB étaient supérieures après l'injection de morphine qu'après l'injection de M3G. En résumé, ces résultats indiquent l'existence d'un métabolisme central de la morphine *in vivo* dans certaines régions cérébrales, dont l'amygdale. Ce métabolisme semble être influencé par le sexe. En effet, nous avons reporté un métabolisme central de la morphine dans l'amygdale uniquement chez les femelles. Le résultat opposé a été observé dans le OB. Par conséquent, ce métabolisme central pourrait participer aux différences liées au sexe dans l'antinociception à la morphine, du moins, dans l'amygdale, au vu de son rôle dans celle-ci.

Dans nos conditions, le métabolisme central est relativement faible et nous ne l'avons observé souvent que chez un seul sexe et dans certaines structures (aucun métabolisme central n'a été détecté dans la moelle épinière et dans la PAG). Dans la PAG, des différences prononcées ont été observées pour les rapports cerveau/sang de la morphine et pourraient prendre leur origine dans le métabolisme central de la morphine. On ne peut écarter l'hypothèse alternative d'une différence liée au sexe dans la perméabilité de la BHE pour la morphine à l'origine de des différences dans les rapports cerveau/sang de la morphine. Dans la PAG, les ratios cerveau/sang de la M3G étaient même significativement plus faibles après une injection de morphine qu'après une injection de M3G. Ce constat est difficilement réconciliable avec la situation réelle. Pour une concentration donnée de M3G dans le sang, il est impossible de concevoir de retrouver moins de M3G dans le SNC après une injection de morphine qu'après une injection de M3G. Un résultat cohérent aurait été de retrouver au moins la même quantité, suggérant que la M3G diffuse simplement à travers la BHE.

L'ensemble de ces résultats suggère que, dans notre expérience, nous avons sous-estimé le métabolisme central réel. En effet, nous avons quantifié la morphine et la M3G dans le sang et les régions du SNC 30 min après les injections systémiques de morphine et de M3G. Or, les

cinétiques métaboliques de la M3G après injection de morphine (*i.e.* après formation de M3G à partir de la morphine) et après injection de M3G dans le sang sont différentes. Nous avons observé une concentration maximale atteinte pour la M3G à 30 min après l'injection de morphine et un temps moyen de résidence d'environ 50 min. Handal et collaborateurs ont injecté de la M3G par voie i.p. et ont observé une concentration maximale atteinte pour la M3G à 15 min avec une demi-vie d'environ 30 min (Handal, Grung, Skurtveit, Ripel, & Morland, 2002). En d'autres termes, les quantités totales de M3G dans le sang sur l'ensemble des 30 min sont supérieures après injection de M3G qu'après injection de morphine.

Ce constat est d'une importance particulière dans notre expérience. En effet, les cinétiques cérébrales et sanguines de la morphine et de la M3G sont différentes (Aasmundstad, Morland, & Paulsen, 1995; Bhargava, Villar, Rahmani, & Larsen, 1992; Bhargava et al., 1993; Dahlstrom, Paalzow, Segre, & Agren, 1978; Meineke et al., 2002; Stain et al., 1995; Verscheijden et al., 2021; Vetulani, Melzacka, Adamus, & Danek, 1983), les quantités trouvées dans le plasma à un instant t ne reflétant pas forcément celles trouvées dans le SNC (Vetulani et al., 1983). Par exemple, il a été montré que le rapport cerveau/sang de la morphine dans l'amygdale est supérieur à 30 min qu'à 5 min après injection i.v. de morphine (Bhargava et al., 1992). Pourtant, après injection i.v., les quantités de morphine décroissent immédiatement après la fin de l'infusion, suggérant des cinétiques cérébrales et plasmatiques différentes. La plupart des études réalisées chez le rongeur s'accordent à dire que les concentrations maximales de morphine et de ses glucuronides, dosées par microdialyse dans le SNC, sont atteintes environ 45 min après l'injection, bien que ces valeurs peuvent varier en fonction des structures considérées (M. Barjavel, Sandouk, Plotkine, & Scherrmann, 1994; Matos, Rollema, & Basbaum, 1992; Stain et al., 1995). Pourtant les concentrations maximales de morphine et de ses glucuronides dans le sang sont atteintes après 15 min. Par exemple, Barjavel et collaborateurs ont observé qu'une concentration maximale de M3G est atteinte dans le fluide extracellulaire cortical 45 min après l'injection s.c. de M3G (M. Barjavel et al., 1994). De manière similaire, après injection s.c. de M6G chez le rat, la concentration maximale de M6G dans le sang est atteinte après 15 min alors que celle dans le liquide extracellulaire cérébral est atteinte après 45 min (Stain et al., 1995). Chez l'humain, un même constat est réalisé, bien que les points temporels soient différents (Mazoit et al., 2007; Meineke et al., 2002; Verscheijden et al., 2021). Une étude différente suggère que la microdialyse n'est pas une technique assez précise temporellement pour tenir compte des variations rapides de concentrations au sein du SNC. Les auteurs ont évalué la diffusion de la morphine et de la M3G dans des prélèvements de

sang de l'artère carotide et de la veine jugulaire du porc après infusion i.v. de morphine pendant 5 min. Ils ont observé que la morphine diffuse rapidement du sang vers le SNC pendant environ 5 min après la fin de l'infusion. À l'inverse, la M3G diffuse du sang vers le SNC pendant environ 25 min, temps nécessaire pour que la morphine soit progressivement métabolisée en M3G mais témoignant également de la diffusion plus lente de la M3G (Bjorkman et al., 1995; Bouw et al., 2001; Stain-Textier, Boschi, Sandouk, & Scherrmann, 1999). Ensuite, la sortie de la morphine et de ses glucuronides est beaucoup plus lente et stable (Bjorkman et al., 1995; Hanna et al., 1990). Par conséquent, la demi-vie terminale des glucuronides dans le liquide extracellulaire cérébrale est beaucoup plus longue que celle observée dans le sang (Aasmundstad et al., 1995; Bouw et al., 2001; Frances et al., 1992; R. Xie et al., 2000).

Ainsi, dans notre expérience, puisque les concentrations de M3G augmentaient moins vite après l'injection de morphine (*i.e.* le temps nécessaire pour convertir la morphine en M3G) qu'après une injection directe de M3G, il est possible que les cinétiques cérébrales de la M3G aient été différentes entre les deux types d'injections. En effet, il est très probable que les quantités de M3G diffusant en 30 min à travers la BHE aient été supérieures après l'injection de M3G qu'après l'injection de morphine. Par conséquent, les rapports cerveau/sang obtenus pour la M3G auraient été faussement plus élevés après l'injection de M3G. En d'autres termes, il est possible que les quantités de M3G issues du passage de la BHE aient été largement surestimées 30 min après l'injection de M3G à cause d'un biais de temporalité. Par conséquent, il est également très probable que nous ayons sous-estimé le métabolisme central de la morphine dans notre étude. Ce constat est d'autant plus appuyé par les résultats incohérents des rapports cerveau/sang obtenus dans la PAG. Alternativement, il serait possible de réaliser une expérience de microdialyse dans laquelle les cinétiques cérébrales et sanguines de la M3G après injection de morphine et après injection de M3G sont évaluées. Ainsi, nous pourrions doser la quantité totale de M3G dans le cerveau sur l'ensemble de la cinétique pour une concentration sanguine donnée (*i.e.* établir des rapports cerveau/sang qui évoluent dans le temps). À partir de la cinétique des rapports cerveau/sang de la M3G, il pourrait être déterminé, à l'aide de l'aire sous la courbe, si ces rapports sont significativement supérieurs après injection de morphine ou non (*i.e.* à cause du métabolisme central). Il est important de rappeler que nous avons tout de même observé, dans certaines conditions, un métabolisme central significatif 30 min après l'injection, malgré cette limite.

Par conséquent, nos résultats suggèrent qu'il existe un métabolisme central de la morphine *in vivo* qui est influencé par le sexe et qui est responsable de la modulation différentielle des quantités de morphine et de M3G observées dans les régions cérébrales impliquées dans la douleur.

Les différences liées au sexe dans le métabolisme central de la morphine

Nous avons observé des différences liées au sexe dans le métabolisme central de la morphine. Plus particulièrement, nous avons constaté que le métabolisme central dans l'amygdale était plus important chez la femelle que chez le mâle. De plus, dans la PAG, un résultat similaire est observé, bien qu'il soit difficile d'attribuer les différences de quantité de morphine dans cette région exclusivement au métabolisme central. L'influence du sexe sur le métabolisme central pourrait provenir d'un dimorphisme sexuel dans l'expression des UGT impliquées dans le métabolisme de la morphine dans le SNC. Par exemple, l'expression de l'UGT1A8 et 2B35 dans le cerveau est influencée par le sexe (Buckley & Klaassen, 2007). Bien que l'UGT2B35 n'ait jamais été étudiée dans le contexte du métabolisme de la morphine, l'UGT1A8 catalyse la formation de M3G à partir de la morphine (Stone et al., 2003). L'UGT2B36, la principale enzyme qui catalyse la conversion de la morphine en M3G chez la souris, semble être exprimée dans le cerveau chez la souris femelle, mais pas chez la souris mâle (Buckley & Klaassen, 2007). Ces différences peuvent être liées aux effets activationnels des hormones (Strasser, Smid, Mashford, & Desmond, 1997). D'une part, les hormones sexuelles agissent principalement par le biais de récepteurs nucléaires qui modulent l'expression de nombreux gènes, dont certaines UGT (Bao et al., 2008; Cho, Ning, Zhang, Rubin, & Jeong, 2016). D'autre part, chez le rat, la glucuronidation de la bilirubine par le foie est plus importante chez la femelle que chez le mâle. La castration chez le mâle adulte augmente cette glucuronidation, alors que l'ovariectomie chez la femelle adulte induit sa diminution suggérant un rôle différentiel des hormones sexuelles dans la régulation du métabolisme de la bilirubine (Muraca & Fevery, 1984). Cependant, dans le foie, aucune différence de métabolisme de la morphine par des microsomes hépatiques n'a été observée *in vitro* entre les mâles et les femelles (Rush et al., 1983) mais il est probable que l'activité des UGT soit régulée différemment en fonction des organes (cf. section, *Métabolisme central*). Une autre hypothèse repose sur l'existence d'un dimorphisme sexuel dans les transporteurs cellulaires et du RE de la morphine et de ses glucuronides (Smirnova, 2012). Ces différences potentielles n'ont jamais été étudiées dans le contexte du métabolisme central de la morphine. Il est aussi important de

noter que la plupart des études qui évaluent l'influence du sexe sur l'expression des UGT utilisent des méthodes basées sur l'analyse des ARN messagers qui n'est pas toujours corrélée aux quantités réelles de protéines traduites. Il reste difficile d'utiliser une approche basée sur l'analyse des protéines car la plupart de ces méthodes reposent sur l'utilisation d'anticorps assez peu spécifiques aux différentes UGT, qui partagent de très fortes homologies de séquence et de structure au sein d'une même famille. Les autres méthodes disponibles n'ont jamais été exploitées dans ce contexte (*e.g.* approche de protéomique, utilisation de modèle de souris génétiquement modifiées pour exprimer un gène rapporteur de l'expression d'une UGT donnée).

Nous avons réalisé des expériences de métabolisme préliminaires *in vitro* sur des cultures primaires de cellules gliales de souris. Ces expériences ont permis de mettre en évidence une synergie entre les astrocytes et les microglies dans le métabolisme de la morphine. En effet, bien que les astrocytes purs tendent à métaboliser la morphine de manière plus élevée que les microglies pures, la présence de ces deux types de cellules au sein de la même culture potentialise le métabolisme de la morphine. De plus, le prétraitement des cellules avec du LPS provoque l'augmentation du métabolisme de la morphine par les astrocytes et amplifie la synergie observée dans les cultures mixtes. Ce dernier résultat est relativement intéressant dans notre contexte d'étude des différences liées au sexe. Il a été montré que l'état réactif de la microglie *in vivo* au sein de la vPAG est plus prononcé chez les femelles que chez les mâles (Doyle et al., 2017). Par conséquent, il est possible que chez les femelles, le métabolisme central de la morphine soit exacerbé du fait de l'état d'activation de la microglie. À l'inverse, l'expression du TNF α , de l'IL-1 β , de l'IL-6 et de la cytokine anti-inflammatoire interleukine-10 (IL-10) n'est influencée par le sexe que lors d'une application de LPS, et non à l'état basal (Doyle et al., 2017). Cette hypothèse nécessite par conséquent une étude plus approfondie.

Afin d'établir le lien de cause à effet entre les différences liées au sexe dans le métabolisme central de la morphine et l'antinociception à la morphine, il serait intéressant d'inhiber spécifiquement le métabolisme central de la morphine et d'évaluer si cette inhibition abolit les différences liées au sexe dans l'antinociception à la morphine. En pratique, nous pourrions injecter un inhibiteur des UGT dans la PAG ou l'amygdale via l'insertion d'une canule et mesurer en même temps les quantités de morphine et de M3G et l'effet antinociceptif induit par l'injection systémique de morphine. Cette expérience est cependant difficilement réalisable pour les raisons suivantes : *(i)* les inhibiteurs d'UGT ne sont pas spécifiques d'une UGT donnée et il existe plusieurs UGT impliquées dans le métabolisme de la morphine, et *(ii)* l'action des UGT n'est pas spécifique au métabolisme de la morphine et est impliquée dans de

multiples réactions de glucuronidation endogènes (e.g. dopamine, 5-HT, bilirubine, estrogènes). Ainsi, en bloquant les UGT avec un inhibiteur non spécifique, nous altérerions un nombre important de processus physiologiques qui pourraient interférer très probablement avec la mesure de l'analgésie. Cependant, si les quantités de M3G se normalisent en fonction du sexe après avoir inhibé les UGT dans une de nos régions d'intérêt, alors nous pourrions confirmer que le métabolisme central est bien à l'origine des différences liées au sexe dans les quantités de morphine et de M3G retrouvées dans les régions du SNC.

Aussi, puisqu'il est probable que l'influence du sexe sur le métabolisme central de la morphine repose sur la présence des hormones, une expérience similaire à celle que nous avons réalisée pourrait être entreprise chez des animaux mâles et femelles gonadectomisés. L'hypothèse serait que les animaux gonadectomisés ne présentent plus de différences liées au sexe ni dans le métabolisme central, ni dans l'antinociception à la morphine. Il est important de noter que les effets activationnels des hormones sur les différences liées au sexe dans l'antinociception à la morphine sont débattus (cf. section, *Effets activationnels et organisationnels des hormones sexuelles*). De plus, les résultats de cette expérience n'établiraient pas forcément un lien de cause à effet entre l'antinociception et le métabolisme central de la morphine. Il est également important de noter que dans nos conditions, les souris femelles n'étaient pas synchronisées (données non présentées), pourtant, nous n'avons pas observé plus de variabilité dans la réponse à la morphine que chez les mâles suggérant un rôle limité du cycle estrien dans nos conditions.

Les effets de la M3G dans le système nerveux central

Bien que plusieurs études suggèrent que la M3G possède des effets pronociceptifs, il existe une controverse autour de ce phénomène (**Annexe 1**). Nous avons réalisé des injections i.p. et i.t. de M3G en aveugle afin de déterminer si, dans nos conditions, une pronociception est observée.

Suite aux injections i.t. de M3G, nous avons constaté l'apparition d'une hyperalgésie thermique au chaud à partir de la dose 2,5 µg de M3G. Cet effet ne semble pas évoluer avec des doses plus élevées. Ces résultats sont cohérents avec certaines études dans lesquelles la pronociception induite par la M3G est observée à des concentrations similaires après injection i.t. ou i.c.v. (Bartlett, Cramond, et al., 1994; Bian & Bhargava, 1996; Blomqvist et al., 2020; Yaksh et al., 1986). L'effet pronociceptif de la M3G injectée dans le SNC a également été

répertorié à des concentrations plus basses, bien que nous n'ayons pas reproduit ces résultats avec nos concentrations (Komatsu et al., 2009; S. S. Lewis et al., 2010; Qian-Ling et al., 1992). Par exemple, Lewis et collaborateurs ont observé une hyperalgésie après injection i.t. de 0,75 µg de M3G. À l'inverse, Bian et collaborateurs n'ont observé cette hyperalgésie qu'à partir de 3 µg après injection i.c.v. (Bian & Bhargava, 1996). Ces différences peuvent probablement être expliquées par les différences d'espèces et d'approches pour évaluer l'hyperalgésie. En résumé, l'injection centrale de M3G produit un effet pronociceptif.

De manière similaire, nous avons observé un effet pronociceptif après l'injection i.p. de M3G mais, à nouveau, uniquement aux deux doses les plus fortes (2,5 et 5 µg de M3G). L'injection systémique de M3G, cependant moins utilisée, produit une hyperalgésie (Arout et al., 2014; Due et al., 2012; Roeckel et al., 2017; M. T. Smith et al., 1999) mais d'autres études contestent ces effets systémiques (Bian & Bhargava, 1996; Faura et al., 1996; Faura et al., 1997; Salem & Hope, 1997). Dans notre cas, nos résultats sont partiellement en accord avec la littérature. En effet, nous n'avons observé une hyperalgésie qu'à 20 mg/kg et 40 mg/kg, alors que l'effet systémique de la M3G a été décrit pour des concentrations plus basses (Arout et al., 2014; Roeckel et al., 2017; M. T. Smith et al., 1990). Ces différences peuvent aussi être expliquées par les différences d'espèces et d'approches pour évaluer l'hyperalgésie. De manière intéressante, les concentrations pour lesquelles nous avons observé un effet pronociceptif coïncident avec les quantités de M3G retrouvées dans le SNC après l'injection de morphine. Par exemple, après injection i.p. de 20 mg/kg de M3G, approximativement 5 pmoles de M3G sont retrouvées dans la PAG chez les mâles et les femelles (**Annexe 9**). On retrouve des quantités similaires de M3G dans la PAG après injection i.p. de 10 mg/kg de morphine (**Tableau 6**). Ces résultats suggèrent que les quantités de M3G dans le cerveau après injection i.p. de morphine seraient suffisantes pour induire un effet pronociceptif. Il est également important de noter que les effets pronociceptifs de la M3G ne semblent pas être influencés par le sexe comme en témoigne l'absence de différence entre les mâles et les femelles dans notre expérience. Ces résultats suggèrent d'autant plus l'implication du métabolisme central dans les différences d'antinociception liées au sexe d'antinociception.

Plusieurs études suggèrent l'implication du complexe TLR4-MD2 dans les effets pronociceptifs de la M3G dans le SNC (**Annexe 2**). Nos résultats ne semblent pas corroborés ces données. En utilisant un système rapporteur de l'activation du TLR4 en culture, nous n'avons observé aucune activation significative de ce récepteur par la M3G. Pourtant, l'application du LPS, agoniste du TLR4, provoque une forte augmentation de la signalisation

associée suggérant que notre système fonctionne. De plus, nous avons également essayé de moduler l'activation du TLR4 par le LPS avec la M3G, mais nous n'avons observé aucun effet significatif (données non représentées). Dans la littérature, des résultats opposés sont notés, mais les modèles utilisés sont différents (Hutchinson et al., 2010; S. S. Lewis et al., 2010; N. Xie et al., 2017). Les principales données *in vitro* suggérant que la M3G peut activer le TLR4 ont été obtenues à l'aide d'un modèle de surexpression du TLR4 dans une lignée de cellules HEK 293. Cette lignée exprime également un gène rapporteur (la SEAP) sous un promoteur induit par l'activité de deux facteurs de transcription, le NF- κ B et la protéine activatrice 1 (AP-1), qui interviennent dans la cascade de signalisation du TLR4 suite à l'activation de protéines adaptatrices similaires (Guo & Friedman, 2010; Lee et al., 2003). Dans notre expérience, l'absence d'effet ne peut s'expliquer par des différences dans les voies de signalisation rapportées, car l'activité mesurée dans notre système dépend aussi de la voie d'AP-1. Cependant, nous avons utilisé des macrophages qui expriment naturellement le TLR4 alors que Lewis et collaborateurs ont utilisé des cellules HEK surexprimant le TLR4. Il n'est pas impossible que la sensibilité de notre système ne soit pas suffisante pour témoigner d'une activation significative du TLR4. En effet, bien que les différentes études utilisent un système dans lequel ce récepteur est surexprimé, ils n'observent qu'une activation modérée de leur système (Hutchinson et al., 2010; S. S. Lewis et al., 2010; N. Xie et al., 2017). En résumé, dans nos conditions, la M3G n'active pas le TLR4 exprimé par notre lignée cellulaire de macrophages.

Cette conclusion est appuyée par nos données obtenues par imagerie calcique. Dans ces expériences, aucun effet de l'application aiguë de M3G en condition contrôle ou de préincubation pendant 24 h avec de la M3G n'a été observé. De plus, aucun effet modulateur de la M3G n'a été observé sur la réponse purinergique des microglies suggérant l'absence d'effet de la M3G sur la microglie. De manière surprenante, aucun effet du LPS n'a été observé, bien que ces effets sur la dynamique des ions calcium dans les microglies soient caractérisés dans la littérature (Bader et al., 1994; Farber & Kettenmann, 2006; Hoffmann et al., 2003). L'origine de ces disparités entre nos résultats et ceux rapportés dans la littérature nécessite plus d'amples investigations. Nos données sont cependant préliminaires et nous avons réalisé les expériences uniquement sur des microglies primaires qui expriment ou non le MOR, car au moment de l'expérience, seule la purification des microglies était au point. Les effets de la M3G seront également évalués dans des cultures d'astrocytes, de neurones et des cultures mixtes.

En résumé, la M3G possède un effet pronociceptif lorsque celle-ci est injectée par voie centrale ou systémique. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents restent partiellement inconnus. Au vu des évidences obtenues à partir de modèle de souris modifiées génétiquement, il est possible que l'activation du MOR et du TLR4 soit nécessaire aux effets de la M3G car l'absence de l'un ou de l'autre de ces récepteurs abolit son effet pronociceptif (Due et al., 2012; Roeckel et al., 2017). De manière intéressante, la voie des MAPK est activée à la fois lors de la stimulation du TLR4 et lors de celle du MOR. Cette voie semble impliquée dans l'hyperalgésie induite par la morphine et son recrutement lors de l'activation du TLR4 participe à la réponse inflammatoire (P. Zhang et al., 2020). Aussi, certaines études suggèrent que la M3G seule n'induit pas d'effet, pourtant sa coadministration avec de la morphine réduit l'antinociception observée (Ekblom et al., 1993; Faura et al., 1996; Faura et al., 1997). Dans ces études, les concentrations de M3G utilisées sont relativement basses et injectées par voie systémique, en comparaison à la grande majorité des études montrant les effets pronociceptifs de fortes doses de M3G injectées directement dans le SNC (**Annexe 1**). Par conséquent, la M3G, malgré sa faible affinité pour les MOR, pourrait potentiellement atteindre des concentrations suffisantes pour induire leur activation lorsque celle-ci est injectée en fortes concentrations par voie centrale. De plus, une coadministration de M3G directement dans la vIPAG et de morphine par voie systémique induit une augmentation de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-6. Cette augmentation n'est cependant pas observée lors d'une administration de morphine ou de M3G seule (Doyle & Murphy, 2018). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer dans quelle mesure le MOR et le TLR4 sont nécessaires aux effets pronociceptifs de la M3G. Il est également important de noter que, dans ce contexte de controverse, on ne peut omettre l'existence d'un autre récepteur qui puisse véhiculer les effets de la M3G.

L'influence du sexe sur le développement de la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine

Les différences de sexe dans le développement de la tolérance

Nous avons observé des différences significatives liées au sexe dans le développement de la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine. Les femelles deviennent tolérantes aux effets antinociceptifs de la morphine significativement plus tôt que les mâles. Cependant, la vitesse de la mise en place de la tolérance semble être similaire entre les mâles et les femelles, comme en témoigne l'absence de différence significative dans les coefficients de Hill. Ces résultats suggèrent que dans notre paradigme expérimental, l'influence du sexe sur le développement de la tolérance est limitée. Les femelles présentent une antinociception plus faible au premier jour du protocole et par conséquent, la tolérance est atteinte prématurément. Ces résultats sont corroborés par une étude dans laquelle le degré initial d'antinociception à la morphine est contrôlé (Barrett et al., 2001). En effet, dans cette étude, les auteurs ont déterminé la tolérance en établissant des ED₅₀ avant et après l'administration chronique de morphine. Pour évaluer le degré de tolérance, ils ont divisé l'ED₅₀ obtenu après le protocole chronique par celui observé avant le protocole. Ils ont réalisé cette expérience pour plusieurs concentrations de morphine et ont défini une « dose chronique fonctionnelle » pour chaque animal qui permet de tenir compte des différences initiales d'antinociception à la morphine. Ils n'ont observé aucune influence du sexe sur la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine (Barrett et al., 2001). Plusieurs études suggèrent cependant l'existence de différences liées au sexe dans le développement de ce phénomène, mais aucune d'entre elles ne considère les différences initiales d'antinociception entre les mâles et les femelles (Craft et al., 1999; Kest et al., 2000; A. Liu et al., 2018; Loyd, Morgan, et al., 2008; Mousavi, Shafaghi, Kobarfard, & Jorjani, 2007; South et al., 2001). La plupart des études déterminent le développement de la tolérance à travers l'évaluation de l'ED₅₀ de la morphine avant et après administration chronique de morphine. Dans ces études, une augmentation plus importante de l'ED₅₀ est observée chez les mâles après une administration chronique de morphine, ce qui sous-tend que la tolérance est plus importante chez les mâles que chez les femelles. Par exemple, Mousavi et collaborateurs ont injecté la morphine par voie s.c. pendant 8 jours chez des rats mâles et femelles et ont mesuré l'antinociception par le test du retrait de la queue (Mousavi et al., 2007). Ils ont remarqué une antinociception supérieure chez le mâle au jour 1, et aucune différence entre sexe au jour 8. Ils ont alors défini le degré de la tolérance comme étant le rapport entre la latence du retrait de la

queue au jour 1 et celle observée au jour 8. Ils ont ainsi conclu que le degré de tolérance était supérieur chez le mâle que chez la femelle. Néanmoins, l'antinociception n'est plus significative au jour 8 suggérant que la tolérance s'est complètement développée chez les mâles et les femelles (Mousavi et al., 2007). Ainsi, le rapport du degré de tolérance est biaisé par les différences initiales d'antinociception entre les mâles et les femelles. Ces évidences ne permettent pas d'affirmer qu'il existe des différences liées au sexe dans les mécanismes de la mise en place de la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine. Dans notre expérience, les mâles atteignent cependant le point limite du test durant les trois premiers jours du protocole d'induction de la tolérance. Il est donc possible que de potentielles différences liées au sexe dans la vitesse de mise en place de ce phénomène aient été masquées.

Le métabolisme périphérique de la morphine et la tolérance

Lors des expériences de métabolisme périphérique de la morphine, nous avons observé des interactions entre le sexe et le protocole de tolérance dans plusieurs paramètres pharmacocinétiques de la morphine. En effet, des quantités de morphine significativement inférieures ont été observées chez les femelles tolérantes par rapport aux femelles contrôles, alors que cet effet n'est pas noté entre les mâles. Cependant, aucune interaction n'a été reportée dans les paramètres pharmacocinétiques de la M3G en périphérie, ni dans les ratios métaboliques ou dans aucunes autres conditions testées dans le SNC, à l'exception des ratios cerveau/sang dans l'amygdale. Ainsi, l'impact de la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine sur le métabolisme ne semble pas dépendre du sexe.

Nous avons tout de même observé que le métabolisme de la morphine était exacerbé en condition de tolérance à la morphine. En effet, les ratios métaboliques étaient significativement plus élevés chez les souris tolérantes que chez les souris contrôles. Les quantités de M3G étaient pourtant similaires entre ces deux conditions, mais les quantités de morphine étaient légèrement inférieures chez les souris tolérantes. Il a été montré que l'expression des enzymes du métabolisme de la testostérone chez le rat mâle augmente suite à l'administration s.c. aiguë de morphine, et induit une diminution des taux de testostérone dans le plasma et le cerveau (Aloisi et al., 2010). En particulier, l'expression de l'aromatase, enzyme responsable de la conversion de la testostérone en estrogènes, est augmentée dans le cerveau (Aloisi et al., 2010). Or, les hormones sexuelles peuvent moduler l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme de la morphine (South et al., 2001; Strasser et al., 1997). Ainsi, il est possible que l'administration chronique de morphine, via son action sur les hormones sexuelles, provoque

la modulation des enzymes du métabolisme et/ou des transporteurs impliqués dans son propre métabolisme, sa distribution ou son excrétion.

Il est cependant très improbable que cette adaptation métabolique joue un rôle majeur dans l'établissement de la tolérance à la morphine. Dans notre expérience, les mâles tolérants (*i.e.* qui ne montrent plus d'antinociception) présentaient les mêmes ratios métaboliques que les femelles contrôles (*i.e.* dont l'antinociception est significative, bien qu'inférieure aux mâles contrôles). Bien que l'augmentation des ratios métaboliques M3G/morphine dans le sang ait été corrélée avec la diminution de l'antinociception lors de la tolérance (G. D. Smith & Smith, 1995), nos résultats suggèrent que la contribution de l'adaptation métabolique observée est relativement limitée dans la mise en place de la tolérance. En d'autres termes, si seuls les ratios métaboliques étaient indicatifs du degré de tolérance, alors les mâles tolérants auraient des ratios beaucoup plus élevés que les femelles contrôles. De plus, dans l'étude de Smith et collaborateurs, il est important de prendre en compte que la tolérance et les ratios M3G/morphine évoluent indépendamment l'un de l'autre avec le temps. Il est ainsi possible que la corrélation observée entre le ratio métabolique M3G/morphine et la tolérance ne soit qu'une coïncidence (G. D. Smith & Smith, 1995). Ces observations indiquent l'implication d'autres mécanismes dans la mise en place de la tolérance.

L'administration d'autres opioïdes, comme le fentanyl, peut aussi induire le développement d'une tolérance aux effets antinociceptifs, mais ne fait pas intervenir la formation de métabolites 3-glucuronides pouvant s'opposer à ses effets antinociceptifs (Bobeck, Haseman, Hong, Ingram, & Morgan, 2012; Wilde et al., 2019). De manière complémentaire, la M3G retrouvée dans le sang ne participe pas à la mise en place de la tolérance à la morphine (Ouellet & Pollack, 1997). Ainsi, le métabolisme de la morphine en M3G ne semble pas impliqué de manière significative dans la tolérance à la morphine.

Le métabolisme central de la morphine dans la tolérance

Les concentrations de morphine étaient significativement moins élevées dans l'amygdale, le OB et le sang des souris tolérantes en comparaison aux souris contrôles. C'est pourquoi nous n'avons observé aucune influence du traitement dans les rapports cerveau/sang de morphine dans ces deux structures. Néanmoins, la morphine était toujours présente en quantités significatives et aucune différence n'a été observée dans la PAG et la moelle épinière entre les deux conditions. Ainsi, la morphine aurait dû toujours produire un effet antinociceptif

si l'altération du métabolisme était la cause principale de la tolérance. De plus, les quantités de M3G étaient soit diminuées, soit identiques, en condition de tolérance par rapport à la condition contrôle, éliminant une augmentation potentielle de l'effet pronociceptif de cette molécule en condition de tolérance. Enfin, les ratios métaboliques M3G/morphine, ainsi que les rapports cerveau/sang de la morphine et de la M3G ne sont pas influencés par le traitement, excluant un rôle potentiel du métabolisme central dans le développement de la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine. De manière similaire, dans la littérature, plusieurs évidences suggèrent l'absence d'implication majeure des processus pharmacocinétiques de la morphine dans la mise en place de sa tolérance. Par exemple, la distribution de la morphine au sein du SNC ne semble pas être impliquée dans la tolérance (Bhargava et al., 1992). De manière similaire, la perméabilité de la BHE pour la morphine n'est pas altérée lors de la tolérance à la morphine (Weinsanto et al., 2018). À l'inverse de ces évidences pharmacocinétiques, de nombreuses évidences impliquent plusieurs phénomènes pharmacodynamiques dans le développement de la tolérance à la morphine (cf. section, *Tolérance aux effets antinociceptifs*).

Conclusion

En conclusion, nous avons montré que :

- (i) L'antinociception à la morphine est influencée par le sexe, à l'inverse de la pronociception induite par la M3G.
- (ii) La balance métabolique M3G/morphine en périphérie est plus élevée chez les souris femelles que chez les souris mâles.
- (iii) Cette balance M3G/morphine est également beaucoup plus élevée chez les souris femelles dans des régions cérébrales impliquées dans le contrôle de la douleur.
- (iv) Dans ces régions cérébrales, il existe un métabolisme central de la morphine qui est influencé par le sexe.
- (v) Ce métabolisme central implique les cellules gliales qui métabolisent la morphine de manière synergique.
- (vi) Les effets de la M3G ne semblent pas dépendre du TLR4 exprimé par les microglies.
- (vii) La tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine se développe prématurément chez les femelles, bien que la vitesse d'induction de ce phénomène ne semble pas être influencée par le sexe.
- (viii) La contribution du métabolisme périphérique et central de la morphine dans la mise en place de la tolérance semble limitée.

En résumé, nous proposons qu'il existe un dimorphisme sexuel dans le métabolisme central qui participe aux différences d'antinociception à la morphine observées entre les souris mâles et femelles. Bien que des différences liées au sexe dans le développement de la tolérance à la morphine aient été observées, celles-ci semblent être principalement liées aux différences initiales d'antinociception entre les mâles et les femelles. L'implication du métabolisme dans la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine semble être relativement limitée.

Projet secondaire

Etude de l'interaction métabolique entre les traitements anticancéreux utilisés dans la lutte contre le cancer du sein et les traitements analgésiques

En France, le cancer du sein est le cancer le plus mortel chez la femme. On en distingue plusieurs types mais les cancers du sein hormono dépendants sont les plus communs. Il existe majoritairement deux types de traitements adjuvants pour lutter contre ces cancers. Le premier type est représenté par le tamoxifène qui est un modulateur sélectif des récepteurs aux estrogènes. Il est principalement utilisé chez la femme avant la ménopause. Au sein du tissu mammaire, il agit comme un antagoniste des récepteurs aux estrogènes et bloque la prolifération des cellules tumorales.

Le métabolisme du tamoxifène fait intervenir des enzymes du métabolisme de phase I et II. En particulier, les cytochromes P450 CYP2D6 et 3A4/5 génèrent deux métabolites 50 fois plus efficaces sur les récepteurs aux estrogènes : le 4-hydroxytamoxifène et l'endoxifène. Par la suite, ces métabolites sont glucuronidés par des UGTs (métabolisme de phase II) afin d'être éliminés par l'organisme.

Chez les patientes atteintes du cancer du sein, le tamoxifène est souvent co-administré avec des molécules traitant les comorbidités associées telles que la douleur ou la dépression. Or, une co-administration peut provoquer des interactions indésirables entre les molécules administrées. D'un point de vue métabolique, deux substances administrées peuvent entrer en compétition pour leur formation ou leur dégradation si elles partagent des enzymes métaboliques communes, ce qui est le cas pour le tamoxifène et la morphine.

Dans ce contexte, ce projet avait pour but de développer une méthodologie simple et rapide permettant l'analyse des interactions métaboliques potentielles entre deux molécules co-administrées chez la souris. Nous avons choisi d'étudier les interactions potentielles entre la morphine et le tamoxifène car leurs métabolismes sont simples et bien décrits. En effet, la morphine est uniquement dégradée en M3G chez la souris par l'action des mêmes UGTs qui dégradent les principes actifs du tamoxifène.

Ce projet a donné lieu à un article scientifique publié dans *Frontiers in Oncology* en février 2020 dans lequel nous avons décrit que la co-administration de la morphine et du tamoxifène provoque une augmentation drastique de la dégradation des métabolites actifs du tamoxifène. Cet article est présenté dans l'**Annexe 10**.

Par la suite, à partir des bases développées, nous avons mis en place un deuxième projet qui a pour but d'étudier les interactions métaboliques entre un deuxième type de traitements contre le cancer du sein hormono dépendant : l'anastrozole, et des traitements analgésiques utilisés plus couramment tels que le paracétamol et/ou la codéine.

L'anastrozole est également un traitement adjuvant contre le cancer du sein néanmoins son mode d'action est différent de celui du tamoxifène. Il inhibe la synthèse d'estrogènes et bloque ainsi la prolifération des cellules tumorales. Il est utilisé chez la femme après la ménopause. Il est dégradé en hydroxy-anastrozole par l'action du CYP3A4 puis est glucuronidé en hydroxy-anastrozole-glucuronide par l'UGT1A4 et 2B7. La codéine et le paracétamol possèdent des voies métaboliques similaires à celles de l'anastrozole. De plus, l'anastrozole est un traitement de fond qui est pris quotidiennement pendant 5 ans. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux effets de l'interaction métabolique entre l'anastrozole et le paracétamol et/ou la codéine en conditions aiguë et chronique (après 7 jours d'injection chronique d'anastrozole). Nous avons pu constater qu'indépendamment du traitement co-administré, l'administration chronique d'anastrozole induisait une augmentation de son métabolisme. De plus, il semblerait qu'il existe une synergie lors de la co-administration de l'anastrozole avec la codéine et le paracétamol en conditions aiguë et chronique qui induisent une réduction du métabolisme de l'anastrozole, donc un potentiel effet protecteur.

Annexes

Annexe 1 : Etudes comportementales sur la M3G

<i>Référence</i>	<i>Agoniste</i>	<i>Type d'administration</i>	<i>Espèces</i>	<i>Effets de la M3G</i>
Labella, 1979	M3G	Infusion i.c.v. (rampe)	Rats mâles SD	Excitation comportementale
Woolf, 1981	M3G	i.t. (15 µg)	Rats mâles SD	Hyperalgésie
Yaksh, 1986	M3G	i.t. (3 µg)	Rats & chats	Excitation comportementale
Smith, 1990	M3G / M3G + M / M3G + M6G	i.c.v. (2,5 et 3 µg) /i.p. (10 mg/kg)	Rats mâles SD	Hyperalgésie et diminution de l'analgésie
Gong, 1991	M3G	i.c.v. (0,2 à 8-10 µg)	Rats mâles SD	Hyperalgésie et stimulation du système respiratoire
Gong, 1992	M3G	i.c.v. (0,5 µg) i.t. (0,5 µg)	Rats mâles SD	Atténuation de l'analgésie induite par la M6G et des effets respiratoires
Morley, 1992	M	i.t. + orale puis M6G (1 mg) i.t.	1 homme de 47 ans	Présence de la M3G dans le LCR corroborée avec l'aggravation de la douleur
Sjogren, 1993	M	Infusion i.v. en continue (100 mg/h)	1 homme de 50 ans	Spasmes myocloniques
Ekblom, 1993	M3G + M	i.v. infusion (9,4 µmol/h/kg M3G, 35 µmol/h/kg M)	Rats mâles SD	Antinociception morphinique diminuée après infusion de M3G
Bartlett, 1994	M3G	i.c.v. (2-8 µg)	Rats mâles SD	Excitation comportementale
Smith, 1995	M	Infusion continue i.v. (3 régimes différents)	Rats mâles SD	Le ratio M3G/morphine dans le plasma est inversement proportionnel à l'antinociception
Barjavel, 1995	M	s.c. (10 mg/kg)	Rats mâles SD	Le ratio M3G/morphine dans le cerveau est inversement proportionnel à l'antinociception
Bian, 1996	M3G	i.p. (10-100 mg/kg) i.c.v. (3 et 10 µg)	Souris mâles Swiss- Webster	Excitation comportementale avec les fortes doses i.c.v. mais aucun effet en i.p.
Faura, 1996	M3G + M6G	s.c. (6 mg/kg M3G, 4 mg/kg M6G)	Souris mâles Swiss- Webster	Atténuation de l'analgésie induite par la M6G après le prétraitement avec la M3G

<i>Référence</i>	<i>Agoniste</i>	<i>Type d'administration</i>	<i>Espèces</i>	<i>Effets de la M3G</i>
Faura, 1997	M3G + M6G	s.c. (6 mg/kg M3G, 4 mg/kg M6G)	Souris mâles Swiss-Webster	Atténuation de l'analgésie induite par la M6G après le prétraitement avec la M3G
Gardmark, 1998	M3G + M	Infusion de la M3G pendant la nuit (9,4 ou 37,6 µmol/h/kg) puis infusion de morphine (10 – 20 mg/h/kg)	Rats mâles SD	Faible atténuation de l'antinociception à la morphine
Smith, 1999	M	i.c.v. + orale ou s.c. après ventriculostomie	14 patients	Amélioration de l'analgésie corrélée avec la diminution du ratio M3G/(morphine + M6G) dans le LCR
Juni, 2006	M3G	Infusion s.c. (5 mg/kg)	Souris mâles CD-1	Hyperalgésie
Mazoit, 2007	M	i.v. (bolus 10 mg)	50 patients avec une douleur	L'inclusion de l'inhibition par la M3G de l'analgésie morphinique améliore le modèle pharmacocinétique-pharmacodynamique
Komatsu, 2009a	M3G	i.t. (3 nmol)	Souris mâles ddY	Excitation comportementale
Lewis, 2010	M3G	i.t. (0,75 µg)	Rats	Hyperalgésie thermique Allodynie tactile
Due, 2012	M3G	i.p. (25 mg/kg)	Rats femelles SD and souris mâles C57BL/10ScNJ TLR4 ^{-/-}	Hyperalgésie
Arout, 2014	M3G	s.c. (5 mg/kg)	Souris mâles CD-1	Hyperalgésie
Komatsu, 2016	M3G	i.t. (2,5 nmol)	Souris mâles ddY	Excitation comportementale
Allette, 2017	M3G	i.p. (concentration non spécifiée)	Souris femelles C57BL/6J	Allodynie mécanique
Roeckel, 2017	M3G	i.p. (5 mg/kg)	Souris mâles et femelles 50% C57/BL6J:50% 129svPas	Hyperalgésie mécanique et thermique
Blomqvist, 2020	M3G / M3G + M	i.t. (5 µg)	Rats mâles SD	Allodynie mécanique et cross-tolérance avec la morphine

Absence d'effet de la M3G

Suzuki, 1993	M3G + M / M3G + M6G	i.t. (5 µg)	Rats mâles Wistar	Pas de modulation de l'antinociception par la M3G
Samuelsson, 1993	M	Epidurale	35 patients cancéreux	Pas de corrélation entre l'analgésie et le ratio M3G/Morphine dans le LCR
Ekblom, 1993	M3G	i.v. bolus (86,7 µmol/kg)	Rats mâles SD	Pas d'hyperalgésie par la M3G seule
Goucke, 1994	M	Orale ou s.c.	11 patients cancéreux	Pas de corrélation entre l'analgésie et le ratio M3G/M6G dans le plasma et le LCR
Lipkowski, 1994	M3G + M	i.v. (M3G : 10 µmol/kg et M : 2,6 µmol/kg)	Rats mâles SD	Augmentation de l'antinociception et prévention de la tolérance
Wolff, 1995	M	Chronique orale (libération lente)	34 patients cancéreux	Pas de corrélation entre l'analgésie et le ratio M3G/Morphine dans le LCR
Wolff, 1996	M	Chronique s.c.	21 patients cancéreux	Pas de corrélation entre l'analgésie et le ratio M3G/Morphine dans le LCR
Bian, 1996	M3G / M3G + M	i.p. (10-100 mg/kg) i.c.v. (0-2 µg)	Souris mâles Swiss-Webster	Pas d'effet de la M3G seule aux faibles doses et pas de modulation de l'analgésie
Faura, 1996	M3G + M6G	s.c. (6 mg/kg M3G, 4 mg/kg M6G)	Souris mâles Swiss-Webster	Pas d'effet de la M3G seule
Faura, 1997	M3G + M6G	s.c. (6 mg/kg M3G, 4 mg/kg M6G)	Souris mâles Swiss-Webster	Pas d'effet de la M3G seule
Ouellet, 1997	M3G + M	Infusion de M3G (0,15 ou 0,30 mg/hr) puis i.v. 2 mg/kg de M	Rats mâles SD	Aucune évidence de l'altération de l'antinociception
Salem, 1997	M3G / M3G + M	i.p. (2,5, 5 et 10 mg/kg)	Rats femelles Winstar	Pas d'effet comportemental ni d'effet sur la dépendance à la morphine
Penson, 2000	M3G / M3G + M / M3G + M6G	i.v. (30,6 mg/70 kg)	10 patients volontaires sains	Aucun effet de la M3G seule Aucune modulation de l'analgésie
Penson, 2001	M3G	i.v. (7,5, 15, et 30 mg/70 kg)	3 patients volontaires sains par dose	Aucune toxicité observée

<i>Référence</i>	<i>Agoniste</i>	<i>Type d'administration</i>	<i>Espèces</i>	<i>Effets de la M3G</i>
Andersen, 2002	M	Chronique orale	1 patient cancéreux	Ratio M3G/M6G très élevé dans le plasma mais non corrélé avec l'expérience de la douleur
Zelcer, 2005	M	i.p. (15 mg/kg)	Souris FVB MRP3 ^{-/-}	Antinociception non modulée par l'absence de M3G
Swartjes, 2012	M + naltrexone	s.c. (15 mg/kg chacune)	Souris FVB MRP3 ^{-/-}	Hyperalgésie induite par la morphine non modulée par l'absence de M3G
Toce, 2018	M	i.v. (2 mg)	1 patient masculin de 12 ans sans antécédents	Métabolisme de la morphine réduit associé à l'augmentation des effets secondaires

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des études comportementales de la M3G

Dans les études où plusieurs agonistes sont utilisés, les concentrations indiquées correspondent aux concentrations de M3G, sauf en cas d'indications contraires. **LCR**, liquide céphalo-raphidien ; **M**, morphine ; **M3G**, morphine-3-glucuronide ; **M6G**, morphine-6-glucuronide ; **MRP**, protéine associée à la résistance aux médicaments ; **SD**, Sprague-Dawley ; **TLR4**, récepteur toll-like 4.

Annexe 2 : Etudes des effets pharmacologiques de la M3G

<i>Référence</i>	<i>Espèce</i>	<i>Type d'expériences</i>	<i>Effets de la M3G</i>
Labella, 1979	Rats mâles SD	<i>In vivo</i>	L'excitation comportementale induite par la M3G par voie i.c.v. est exacerbée par le prétraitement à la naloxone
Woolf, 1981	Rats SD	<i>In vivo</i>	L'hyperalgésie induite par de fortes doses de morphine ou de faibles doses de M3G par voie i.t. est exacerbée par la naloxone
Yaksh, 1986	Rats	<i>In vivo</i>	L'hyperalgésie induite par de fortes doses de morphine ou de faibles doses de M3G par voie i.t. est exacerbée par la naltrexone
Pasternak, 1987	Membranes de cerveaux de bovins	<i>In vitro</i>	La M3G possède une affinité très faible pour les MOR
Christensen, 1987	Membranes de cerveaux de bovins	<i>In vitro</i>	La M3G possède une affinité très faible pour les MOR
Yaksh, 1988	Rats	<i>In vivo</i>	L'allodynie induite par de fortes doses de morphine ou de faibles doses de M3G par voie i.t. est exacerbée par la naltrexone
Sullivan, 1989	Rats mâles SD	Enregistrements électro-physiologiques <i>in vivo</i>	Pas d'effet de la M3G sur la réponse des neurones évoquée par la stimulation des fibres C
Chen, 1991	Membranes de cerveaux de rats	<i>In vitro</i>	La M3G possède une affinité très faible pour les MOR
Igawa, 1993	Rats femelles SD	<i>In vivo</i>	L'injection i.t. de M3G facilite le réflexe de miction
Hewett, 1993	Rats mâles SD	Enregistrements électro-physiologiques <i>in vivo</i>	Le prétraitement à la M3G par voie i.t. n'a pas d'effet sur l'inhibition des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière induite par la morphine
Bartlett, 1994a	Rats mâles SD	<i>In vivo</i>	L'excitation comportementale induite par la M3G par voie i.c.v. est réduite par la coadministration d'un antagoniste des récepteurs NMDA
Bartlett, 1994b	Rats mâles SD	<i>In vitro</i>	La M3G ne semble pas interagir avec les récepteurs opioïdes, GABA _A , AMPA, NMDA, au kaïnate ou à la glycine
Thomas, 1995	Cellules de souris femelles B6C3F1	<i>In vitro</i>	La M3G module la prolifération des lymphocytes B
Hashiguchi, 1995	Rats mâles SD	<i>In vivo</i>	La M3G renforce l'effet hyperglycémique de la M6G

<i>Référence</i>	<i>Espèce</i>	<i>Type d'expériences</i>	<i>Effets de la M3G</i>
Bartlett, 1996	Rats mâles SD	<i>In vitro</i>	La M3G n'altère pas la libération de GABA ou de glutamate par des synaptosomes de cerveau
Halliday, 1999	Rats mâles SD	<i>In vivo</i>	L'excitation comportementale induite par la M3G n'est pas atténuée par la naloxone
Osborne, 2000	Rats mâles SD	Enregistrements électrophysiologiques sur tranche	Pas d'effet électrophysiologique de la M3G sur les neurones du LC
Moran, 2002	Rats SD	<i>In vitro</i>	La M3G possède un effet inhibiteur dose-dépendant sur l'amplitude des courants post-synaptiques inhibiteurs dans la corne dorsale de la moelle épinière
Hemstapat, 2003	Rats femelles gestantes SD	<i>In vitro</i>	La M3G provoque l'excitation des neurones embryonnaires hippocampaux en cultures par un mécanisme impliquant indirectement les récepteurs NMDA
Juni, 2006	Souris mâles CD-1	<i>In vivo</i>	La M3G provoque une hyperalgésie après le traitement chronique avec de fortes doses de morphine, mais pas de faibles doses
Komatsu, 2009	Souris mâles ddY	<i>In vivo</i>	L'excitation comportementale induite par l'injection i.t. de M3G implique la voie de signalisation ERK-NO-cGMP-PKG
Lewis, 2010	Rats mâles SD	<i>In vivo</i>	La M3G par voie i.t. induit une hyperalgésie qui est abolie par l'administration d'inhibiteurs des cellules gliales et des cytokines proinflammatoires
		<i>In vitro</i>	La M3G active la signalisation du TLR4
		<i>In silico</i>	La M3G se lie à la même poche de liaison de MD-2 que le LPS
Due, 2012	Souris mâles C57BL/6 KO TRL4	<i>In vivo</i>	Le TLR4 est nécessaire à l'hyperalgésie induite par la M3G par voie i.p.
	Rats femelles SD	<i>In vitro</i>	La M3G augmente l'excitabilité des afférences primaires nociceptives via un mécanisme dépendant du TLR4
Arout, 2014	Souris mâles CD-1	<i>In vivo</i>	L'injection i.p. de M3G induit l'activation du marqueur c-Fos dans la PAG mais de manière différente à l'injection de morphine
Grace, 2014	Rats mâles SD et Lewis	<i>In vivo</i>	La M3G stimule les cellules endothéliales du SNC. L'injection i.t. de ces cellules endothéliales stimulées induit une allodynie
	Cellules endothéliales du SNC en culture	<i>In vitro</i>	La M3G induit l'activation de NF-κB et l'augmentation des cytokines proinflammatoires
		<i>In silico</i>	La M3G et la morphine se lient au MD-2 mais la M3G pourrait être un modulateur plus puissant

<i>Référence</i>	<i>Espèce</i>	<i>Type d'expériences</i>	<i>Effets de la M3G</i>
Due, 2014	Rats mâles et femelles SD	<i>In vitro</i>	L'augmentation de l'excitabilité des fibres afférentes primaires nociceptives induite par la M3G est abolie par la carmabazépine suggérant l'implication des canaux sodiques qui dépendent du voltage
Mattioli, 2014	Souris mâles C3H/HeJ mutante pour le TLR4	<i>In vivo</i>	L'antinociception, la tolérance et l'hyperalgésie après l'injection de morphine sont intactes dans un modèle de souris qui exprime un TLR4 non-fonctionnel
Komatsu, 2016	Souris mâles ddY	<i>In vivo</i>	L'excitation comportementale induite par l'injection i.t. de M3G implique les DOR2
Xie, 2016	Cellules HEK	<i>In vitro</i>	La M3G active faiblement le TLR4 mais antagonise efficacement l'action du LPS
Roeckel, 2017	Souris KO MOR C57BL/6J /129svPas	<i>In vivo</i>	Les MOR sont nécessaires à l'hyperalgésie induite par la M3G par voie i.p.
	Membranes de cerveaux de souris	<i>In vitro</i>	La M3G se lie aux MOR avec une faible affinité
Allette, 2017	Rats SD	<i>In vivo</i>	L'hyperalgésie induite par la M3G est abolie par un inhibiteur du TLR4
	Neurones des DRG dissociés en culture	<i>In vitro</i>	La M3G induit une entrée de calcium
Doyle, 2018	Rats mâles et femelles SD	<i>In vivo</i>	L'injection de M3G directement dans la PAG augmente l'expression des cytokines proinflammatoires chez les femelles
Blomqvist, 2020	Rats mâles SD	<i>In vivo</i>	L'injection chronique de M3G par voie i.t. provoque une tolérance croisée avec la morphine et induit l'augmentation de la substance P dans la corne dorsale de la moelle épinière
Wang, 2021	Souris C57BL/6	<i>In vivo</i>	Le traitement chronique à la M3G renforce la croissance tumorale
	Lignée de cellules cancéreuses humaines	<i>In vitro</i>	La M3G augmente l'expression de PD-L1 dans des cellules tumorales humaines via l'activation du TLR4

Annexe 2 : Tableau récapitulatif des études évaluant les cibles pharmacologiques et les effets de la M3G.

AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate ; **SNC**, système nerveux central ; **DOR**, récepteur opioïde δ ; **DRG**, ganglions rachidiens ; **ERK**, kinases impliquées dans la régulation des signaux extracellulaires ; **GABA**, acide γ -aminobutyrique ; **GABA_A**, récepteur à l'acide γ -aminobutyrique ; **HEK**, cellules embryonnaires de rein humain ; **KO**, souris

n'exprimant pas une protéine d'intérêt ; **LC**, locus coeruleus ; **LPS**, lipopolysaccharide ; **M3G**, morphine-3-glucuronide ; **M6G**, morphine-6-glucuronide ; **MD-2** : facteur de différenciation myéloïde 2 ; **MOR**, récepteur opioïde μ ; **NF- κ B**, facteur nucléaire κ B ; **NMDA**, *N*-méthyl-D-aspartate ; **NO-cGMP-PKG** : voie de signalisation monoxyde d'azote-guanosine monophosphate cyclique-protéine kinase G ; **PAG**, substance grise périaqueducule ; **PD-L1**, ligands de mort programmée 1 ; **SD**, Sprague-Dawley ; **TLR4**, récepteur toll-like 4

Annexe 3 : Revue : **Morphine-3-glucuronide: physiology and behaviour (*en cours de soumission*)**

Notre travail bibliographique sur la M3G a abouti à l'écriture d'une revue en cours de soumission. Les figures, le formatage et les références ne sont pas totalement finalisées. Nous prévoyons de soumettre la revue à *British Journal Of Pharmacology* au cours du mois de novembre 2021.

Morphine-3-glucuronide, physiology and behaviour

Florian Gabel¹, Volodya Hovhannisyan¹ & Yannick Goumon^{1,2*}

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

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

*To whom correspondence should be addressed: Dr Yannick Goumon, INCI, CNRS

UPR3212 ; 8 Allée du Général Rouvillois, F-67000 Strasbourg, France, Phone : (33)-3-88-45-

67-18; E-mail: ygoumon@unistra.fr

ACKNOWLEDGMENTS AND GRANT SPONSOR - This work was funded by CNRS, University of Strasbourg (Unistra) and French Ministère Délégué à la Recherche et à l'Enseignement Supérieur (PhD fellowship to F.G., and V.O.). We thank the following research programs of excellence for their support: FHU Neurogenycs, French National Research Agency (ANR) through the Programme d'Investissement d'Avenir (contract ANR-17-EURE-0022, EURIDOL graduate school of pain).

AUTHOR CONTRIBUTIONS - **Writing – Original Draft**, F.G., V.H., Y.G., **Writing – Review & Editing**, F.G., V.H., Y.G.; **Funding Acquisition**, Y.G.; **Resources**, Y.G.; **Supervision**, F.G., Y.G.

COMPETING INTERESTS - The authors declare that they have no competing interests.

DATA AVAILABILITY - NA

I- INTRODUCTION

Over the last decade, chronic pain has become one of the top health burdens threatening economical and health-care systems (GBD 2018). Opiates, such as morphine and its derivatives remain the most potent painkillers available at the hospital although their use and efficiency are limited by mild to serious side effects including nausea, constipation, analgesic tolerance, addiction and ultimately respiratory depression that can lead to death ¹⁻³. Among them, analgesic tolerance corresponds to the decrease potency of opiates analgesia following repeated administrations {Trescot, 2008 #5566;Weinsanto, 2018 #5341}. Consequently, dose escalation is required to relieve pain even though it might result in higher risks of dangerous side effects. In addition, opiates efficiency and side effects are influenced by numerous factors including sex, age ^{5,6}, comorbidities ⁷, additional drug treatments and pain types ^{8,9} resulting in complex patient care ^{9,10}. Among opiates, morphine has been extensively used to decipher mechanisms involved in opiate-induced analgesia, tolerance and addiction.

The effects of morphine are mediated mainly through the activation of pertussis toxin sensitive $G_{i/o}$ coupled mu opioid receptors (MORs) located on neurons of the central nervous system (CNS). Following activation, conformational changes of this G-protein coupled receptor (GPCR) leads to multiple downstream signalling pathways (Figure 1) ¹¹. The classical transduction pathway involves the dissociation of the G_{α} and $G_{\beta\gamma}$ subunits. Thereafter, the G_{α} subunit inhibits the adenylate cyclase (AC) activity leading to a decrease in the cyclic AMP (cAMP) signalling. Alternatively, the direct binding of the $\beta\gamma$ heterodimer to both inwardly rectifying K^{+} channels (GIRK) ¹² and voltage-gated Ca^{2+} channels conduces to potassium efflux and inhibition of calcium influx, respectively ¹³⁻¹⁵. Therefore, MOR activation leads to neuronal hyperpolarization. Subsequently, MOR signalling termination involves regulators of G protein signalling that catalyse the hydrolysis of GTP into GDP. In addition, receptor desensitization regulates MORs activity. The phosphorylation mediated by G-protein receptor kinases (GRK)

and/or Protein Kinase C (PKC) promotes the recruitment of a GPCR regulatory protein belonging to the arrestin family at the phosphorylated site, which blocks the receptor coupling and promotes internalization. It is noteworthy that opiates varyingly promote MOR internalization¹⁶⁻¹⁸. For the sake of an example, a vast majority of articles proved that morphine do not internalize MORs *in vivo* ({Arttamangkul, 2008 #5476; Lamberts, 2013 #5517}), whereas DAMGO induce its internalization (for review see {Williams, 2013 #3698}). Interestingly, there are increasing numbers of evidence based on the emergence of the biased-agonism theory that the arrestin-bound GPCR complex can mediate alternative signalling effects, especially through the MAPK pathway. Hence, to highlight the importance of this pathway, several studies have reported that morphine-induced ERK1 and 2 phosphorylation is implicated in opioid withdrawal, morphine tolerance, reward and plasticity (for review, see {Al-Hasani, 2011 #5262; Williams, 2013 #3698}).

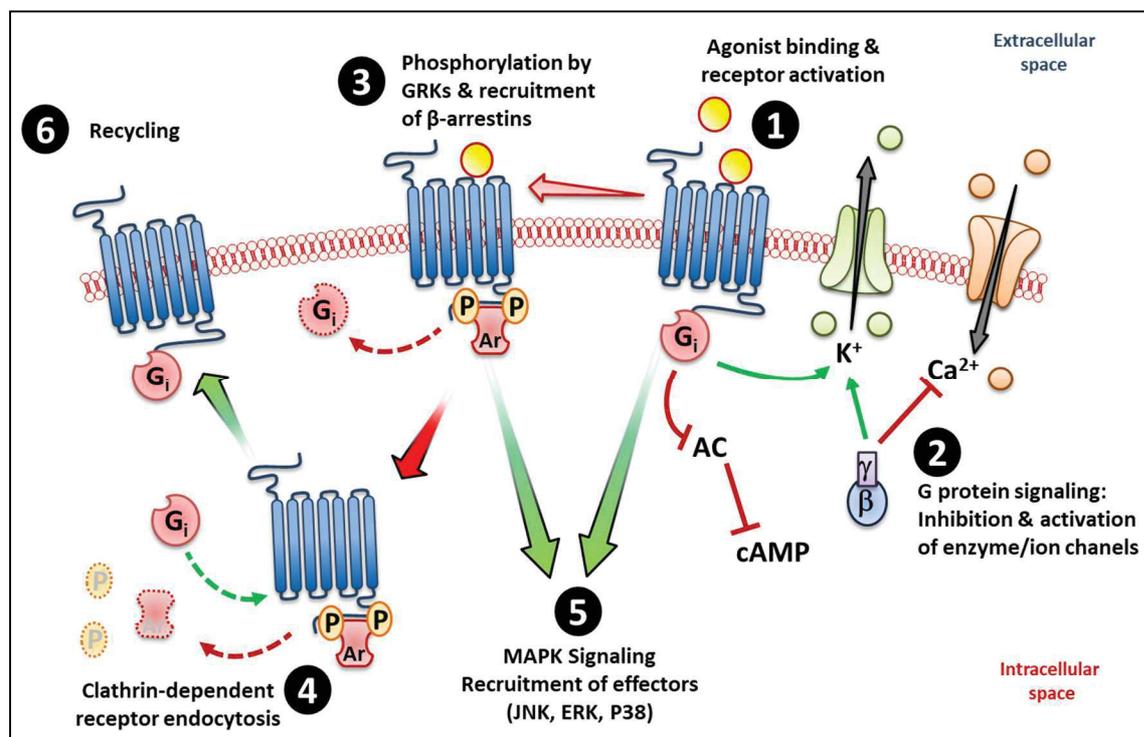


Figure 1- Different MOR intracellular pathways after its activation.

Importantly, MORs are also expressed by glial cells (astrocytes and microglia), as well as immune cells such as Natural Killer-cells, suggesting significant roles of these cells in morphine mediated effects {Maduna, 2018 #5194;Chao, 1997 #5736;Nam, 2018 #5728;Machelska, 2020 #5469;Eisenstein, 2019 #5238;Celik, 2016 #5281}. For instance, glial cells have been proposed to participate in physiological and pathological effects of opiates, including analgesia²⁰ and addiction²¹. Moreover, morphine has been overwhelmingly shown to produce immunosuppressive effects in the periphery through inhibition of leucocytes (for review, see {Eisenstein, 2019 #5238}). Interestingly, in the CNS, many studies reported that morphine could lead to pro-inflammatory effects responsible for several morphine side effects such as analgesic tolerance (for review, see {Liu, 2019 #5272}).

In the context of pain relief, morphine mainly acts on cerebral structures of the descending control of pain including the periaqueductal gray (PAG), rostral ventromedial medulla (RVM) and the spinal cord. In such structures, MORs activation induces hyperpolarisation of mostly MOR-expressing-GABAergic neurons, triggering disinhibitory mechanisms resulting in analgesia (for review, see ²²). Along with its action within the CNS, morphine analgesia relies also on peripheral MORs activation ²³⁻²⁵. For instance, morphine acts on primary afferent Nav_{1.8} expressing neurons of the dorsal root ganglia contributing to analgesia ²⁴. However, this effect seems to rely on pain states (*i.e.*, inflammation *vs.* baseline conditions) {Weibel, 2013 #5457}. However, it was recently shown that methylnaltrexone, a peripheral MOR antagonist, does not prevent neither morphine induced analgesia, nor analgesic tolerance when co-administered with morphine ²⁶. However, if analgesia is mainly a CNS process, minority peripheral implication might be hidden. Nevertheless, the current consensus is that morphine analgesia depends predominantly on MORs activation within the CNS implying that morphine reaches the CNS to produce analgesia.

After administration, morphine undergoes sequential pharmacological processes that consisting of an absorption, a distribution, a metabolism, and an excretion (ADME) mainly under the form of metabolites. Following intestinal absorption, morphine reaches the liver and enters in the hepatocytes wherein a major part of its metabolism occurs. Morphine bioavailability is hence relatively low in human {Hasselstrom, 1993 #4003; Lotsch, 1999 #5111; Loret-Linares, 2016 #5113} with only 25-35% of morphine reaching the circulation and even less is distributed within the CNS. Indeed, the CNS access is restrained to xenobiotics and, to a more general extent, hydrophilic compounds, by the blood-brain barrier (BBB). The BBB is a selectively semi-permeable barrier composed of adjacent endothelial cells, astrocyte end-feet, and pericytes²⁸. Even though morphine crosses the endothelial cell membranes due to a certain degree of lipophilicity, its BBB permeability relies on P-glycoprotein (P-gp) drug transporter that excretes morphine from the endothelial cells back into the blood {Schaefer, 2017 #5550}. Therefore, the potency and duration of the analgesic effect of morphine is modulated by both its metabolism and BBB permeability.

II- MORPHINE METABOLISM

Morphine metabolism involves mainly hepatic glucuronidation (65%) by uridine diphosphate glucuronosyltransferases (UGTs) phase II enzymes. Glucuronidation occurs on the C3-OH and C6-OH positions leading predominantly to two active metabolites: morphine-3-glucuronide (M3G) and morphine-6-glucuronide (M6G)²⁹. However, to a much lesser extent, other morphine metabolites (5%) can be found in the blood or urine and include as an example morphine-3,6-di-glucuronide or morphine sulfate³⁰⁻³². In addition, 10% of the morphine administered are excreted as intact form because of its intrinsic hydrophilicity {Yeh, 1975 #2517}. Pharmacokinetic studies of morphine in humans have shown blood half-life average

values of 3 to 4 hours in healthy patients³³. However, it shows significant variations based on the route of administration (*e.g.*, longer for oral vs intravenous) and individual physiology (*e.g.*, age, gender, comorbidities, cotreatments) ranging from less than one hour up to seven hours³⁴. In mouse, morphine's half-life is around 30 min for young and adult mice, but increases up to 55 min for old animals³⁵).

2.1- Morphine glucuronidation

UGTs are transmembrane glycoprotein located in the smooth endoplasmic reticulum (ER; Figure 2). They are composed of around 550 amino acids (± 57 kDa) and represent a superfamily of enzymes divided into 2 groups: UGT1A and UGT2B³⁶. Studies using human liver microsomes have established that several UGTs are involved in morphine glucuronidation including UGT1A1, 1A3, 1A6, 1A8, 2B1, or 2B7^{37,38}. These enzymes catalyse the conjugation of a nucleophilic aglycone moiety (acceptor substrate, *i.e.* morphine) to the glycosyl group of a nucleotide sugar (donor; *i.e.* UDP-Glucuronic Acid, UDPGA). The main transporters involved in morphine transport across cell membranes are organic cation transporter member 1 (OCT1), as well as potentially OCT2^{39 40} and the organic anion transporter polypeptides 1 (OATP2B1)⁴¹. UGTs are found in the ER lumen and only 20 amino acids remain in the cytosolic side with a di-lysine (KK) motif responsible of their membrane anchoring⁴². The luminal amino-terminal part of the protein carries the substrate-binding domain, whereas the carboxy-terminal part binds the co-substrate UDPGA. It means that both morphine and UDPGA need to be transported inside the ER. While the transport of UDPGA rely on several ER transporters such as *UGTrel7*⁴³⁻⁴⁵, there are currently no identified transporter for aglycones and conjugated compounds in general and for morphine in particular. Once morphine glucuronides are transported back into the cytosol, plasma membrane efflux transporters MRP2 and MRP3^{46,47}

located at the basolateral side of hepatocytes⁴⁸ allow their release outside the cell. Then, M3G and M6G are likely to be taken up and released by endothelial cells via a probenecid-sensitive transport system {Xie, 2000 #5738}.

UGTs are widely conserved across the evolution from plants to mammals^{49,50}. However, notable differences exist in enzyme expression and morphine metabolism between species⁵¹. For instance, major disparities in morphine metabolism have been reported between humans and rodents. In particular, morphine has a much shorter half-life in C57BL/6 mice due to faster hepatic metabolism (*i.e.*, 30 min vs few hours in human)⁵². In humans, M3G and M6G represent respectively 90% and 10% of all glucuronidation metabolites³³. Alternatively, mice exclusively convert morphine into M3G due to the lack of UGT2B7 expression. Indeed, the UGT2B7 seems to be required for M6G production as witnessed by several *in vitro* studies using human and rodent microsomes (for review, see⁵³). One hypothesis could be that the piperidine ring bearing the tertiary amine N17 disturbs the interaction between other UGTs and the C6-OH position of morphine. Thus, it might decrease glucuronidation probability at this position. Nevertheless, a baculovirus-Sf9 cell system for expressing UGTs was established by Kurita and collaborators and have demonstrated that the UGT2B36 is the main M3G-forming enzyme in male FVB mice⁵⁴. In addition, although in one particular study, UGT1A1 and UGT2B1 individually did not form M3G, whereas heterodimers did produced high levels of M3G⁵⁵. To sum up, even if few reports suggest that the ICR mouse strain lacking the UGT2B7 might produce low amounts of M6G^{41,56,57}, the general consensus is that mice cannot synthesize such metabolite {Yang, 2016 #3965; Yang, 2016 #5601; Yang, 2016 #4142}. Similarly, rats produce only very low amount of M6G despite a UGT2B7 expression *in vitro* and *in vivo* {Milne, 1996 #4143; Salem, 1997 #5596; Nagano, 2000 #1095; Kuo, 1991 #3939} even though one study reported that rat microglial cells seems to be able to metabolise morphine into significant levels of M6G⁶⁰.

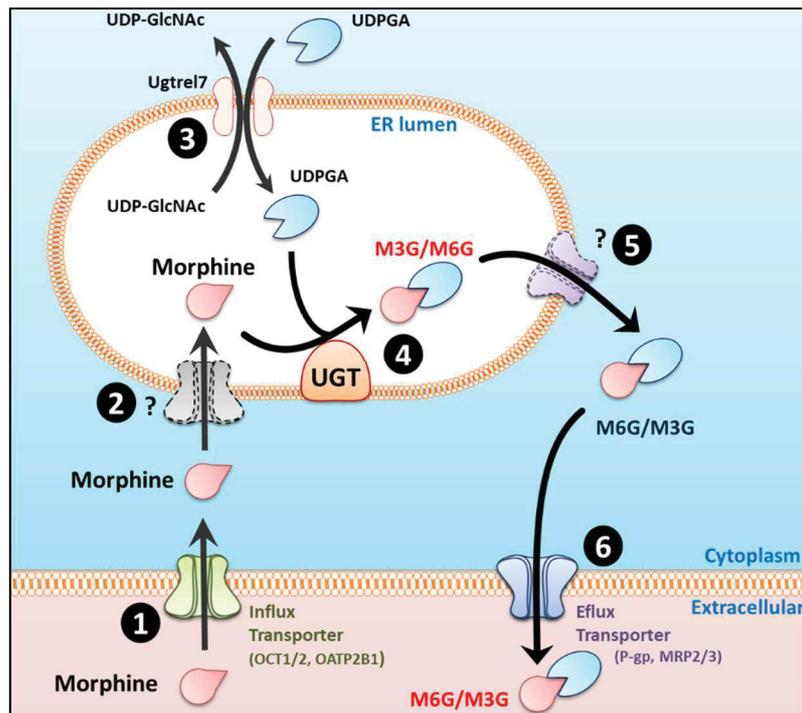


Figure 2- Glucuronidation process of morphine.

2.2- Metabolites biological activity

2.2.1- Morphine-6-glucuronide

Behavioural observations

Analgesic properties of M6G were investigated since the early 1970s. Depending on the route of administration and species, M6G displays the same or stronger analgesia than morphine (up to 678 time stronger; for review, see ⁵³). For instance, direct injection of M6G into the CNS produces a much more efficient analgesic effect than morphine ⁶¹. This prompted some researchers to consider morphine as a “pro-drug” of M6G ⁶², a concept that has somehow become common despite contrasting results and some fundamental flaws {De Gregori, 2012 #5490;Dahan, 2015 #5489}. Or, morphine still produces a potent analgesia even though M6G is absent in mice. Therefore, it is counterintuitive to imagine that such major metabolic benefit has been lost in some species and, as stated by Dahan and Loetsch in 2015, M6G cannot be pharmacologically considered as the main active compound during morphine analgesia ⁶⁴.

Pharmacological targets and properties

M6G displays the same⁶⁵ or even lower affinity⁶⁶ for MORs than morphine. In addition, experiments using MOR null mice have demonstrated the requirement of this receptor for M6G effects^{53,67-70}. It is worth to mention that M6G has also been described to have an affinity for the delta (DOR) and kappa opioid receptors as well⁵³. The glucuronide moiety increases considerably the hydrophilicity of the molecule, thus greatly reducing its BBB permeability, and therefore its central side effects⁷³. However, it also greatly limits M6G analgesic effects due to its distribution restrained to the periphery and to rapid renal clearance. Consequently, after oral or i.v. administrations, analgesic effect of M6G and morphine are almost similar. Alternatively, i.c.v. injection of M6G exerts equal or more pronounced side effects than morphine, including constipation⁷⁴ or respiratory depression in dogs and rats^{75,76}. In human, i.v. injection of M6G seems to have an identical analgesic effect as morphine. For a long time, M6G was thought to be the analgesic of the future and several clinical studies were carried out^{53,71} including phase III studies focusing on peripheral postoperative pain⁷². Interestingly, M6G induces significantly less nausea, vomiting and respiratory depression⁷³. In addition, M6G displays small effects on the cardiovascular system and on sedation compared to morphine. Even though M6G showed some interesting therapeutic benefits, its high cost of production greatly damp a future clinical use.

2.2.2- Morphine-3-glucuronide

Behavioural observations

The predominant morphine metabolite, M3G, is devoid of analgesic effect⁶¹. Interestingly, administration of M3G in rats has highlighted a robust hyperalgesia and allodynia (**Table 1**)⁷⁷⁻⁸⁵. For instance, Woolf in 1981, observed a similar hyperalgesia after i.t. injection of low dose of M3G than after high dose of morphine in rats {Woolf, 1981 #5574}. Similar reports were observed by Bartlett and al. and Roeckel and al., following i.c.v and i.p injections of M3G, respectively {Bartlett, 1994 #5480;Roeckel, 2017 #4729}. Consequently, M3G was proposed to oppose morphine analgesia and to produce neuroexcitatory effects responsible for some of morphine side effects^{26,85,86}. Following the first studies in rodents, morphine metabolism in humans was investigated and the amounts of M3G in the cerebrospinal fluid were found to be correlated with pain during morphine treatment⁸⁶. However, these results have been contrasted by several pieces of evidence in both rodents and humans (**Table 1**). As an example, Bian and al., have measured the analgesic effect of morphine using the tail flick test following i.p. and i.c.v co-injection of morphine and M3G⁸⁷. No modification of the area under the time curve of the analgesic effect of morphine over 3 hours was observed. In addition, in a randomized placebo-controlled trial involving 10 healthy volunteers, M3G was administered as two consecutive bolus (i.v injections) and pain was assessed with a visual analogue scale⁸⁸. The authors reported no significant effect compared to placebo in any parameter tested including pain relief, dysphoria and ventilatory parameters whether M3G was administered alone, with morphine or together with M6G.

The origin of the behavioural effect of M3G could rely in its glucuronide moiety. Indeed, M3G is not the only one 3-glucuronide metabolite that displaying pronociceptive effects. Several studies published by Lewis *et al.*, showed that estradiol-3-glucuronide, as well

as ethyl-glucuronide, an ethanol metabolite, produce hyperalgesia after i.t. administration {Lewis, 2010 #2693; Lewis, 2013 #5732; Lewis, 2015 #5733}. When injected alone, glucuronic acid triggered a similar effect, unravelling the importance of the glucuronide moiety in the behavioural effects of these molecules. To support this idea, other 3-glucuronide metabolite of morphine-derived compounds, such as normorphine, noroxymorphone and hydromorphone, fathered pronociceptive behaviours {Smith, 1997 #5584; Yaksh, 1988 #5585; Wright, 2001 #5739}). Consistently, Peckham and Traynor in 2006, used several morphine derivatives and showed robust sex differences in analgesia only with those that are conjugated into a 3-glucuronide metabolite {Peckham, 2006 #5470}. Importantly, these observations were not related to binding affinity, ability to activate the MOR or lipophilicity.

Pharmacological targets

The molecular mechanisms underlying M3G effects remain a matter of debate. On one hand, M3G shows only low (micromolar) affinity for the MOR in several binding studies employing radio-labelled molecules such as [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin (DAMGO) or naloxone {Pasternak, 1987 #398; Coimbra-Farges, 1990 #5486; Roeckel, 2017 #4729; Smith, 2000 #5586; Roeckel, 2017 #4729}. Several *in vivo* studies demonstrated the perpetuation of M3G's effects in the presence of naloxone, a nonselective antagonist of the MORs^{79,93}. These studies suggest that M3G mediates its effects through a different receptor than the MOR. On the other hand, one study published controversial observations in MOR null mice suggesting its requirement for M3G pronociceptive effects⁸⁵. MORs were also shown to be necessary for the response of low-dose of M3G, but not for high-dose, at least when directly injected in the ventral hippocampus⁹³.

The assumption of alternative targets than opioid receptors has grown the last two decades. Particularly, *in vitro*, *in vivo* and *in silico* evidences showed that M3G might eventually binds the Toll-Like Receptor 4 (TLR4) and Myeloid Differentiation factor 2 (MD-2) complex^{83,94-98}. For instance, using the reporter cell line HEK-Blue™-hTLR4, results have indicated that M3G weakly activates the TLR4⁹⁹. Several studies have also demonstrated that M3G-induced excitatory effects involve the TLR4, given that specific antagonists of this receptor inhibit M3G effects {Hutchinson, 2010 #3205;Allette, 2017 #5237;Due, 2014 #5224;Grace, 2014 #4663};Due, 2012 #5492}. These interesting findings take into account that a considerable number of studies had described the immunomodulatory effects of morphine and M3G^{96,100-103}. Importantly, M3G seems to display pro-inflammatory properties through an upregulation of NF-κB and pro-inflammatory cytokines including IL-1β, IL-6 and TNFα such that it was proposed to be involved in the modulation of morphine functionality^{83,97,104} {Wang, 2021 #5740}. Moreover, several studies have shown the implication of the TLR4 as an intermediary in the development of some side effects of morphine such as analgesic tolerance or in the sex differences observed in morphine effects {Hutchinson, 2010 #2692; Lewis, 2010 #2693;Eidson, 2017 #5426;Eidson, 2013 #5494;Blomqvist, 2020 #5483}. Taken together, these data suggest that the TLR4 could be responsible for the inflammation triggered by M3G that would thwart morphine analgesic effects. However, opposite results were published and tend to invalidate the TLR4 assumption. Hence; the mouse strain C3H/HeJ genetically depleted for the TLR4 have allowed two independent laboratories to prove that this receptor is not involved in the modulation of the antinociceptive effect of morphine, in its side effects and in the microglial activation observed in morphine tolerance {Mattioli, 2014 #3877;Fukagawa, 2013 #5588}. It is worth to note that the pro-inflammatory effects observed after morphine chronic treatment might be linked to LPS coming from gut bacteria infiltration into the CNS^{103,106-108}.

As for M6G, the glucuronide moiety increases the hydrophilicity of the M3G and therefore greatly reduces BBB permeability {Bickel, 1996 #5436} and induces a rapid renal clearance leading to a half-life of 60min in C57BL/6J mice {Handal, 2002 #5004}.

Modulation of neuronal activity

Since the early 1990s, several studies have studied M3G effects on the modulation of neuronal activity ^{81,82,84,109,110}. Consistent with the TLR4 assumption, M3G increases the excitability of nociceptive dorsal root ganglion neurons in a similar manner than LPS and, this effect seems to be TLR4-dependent ^{84,111}. The implication of NaV currents has subsequently been reported in this phenomenon through the use of carbamazepine, a known inhibitor of several NaV channels (Due, 2012, Due 2014). Concomitantly, one study showed that M3G elicits activity within the PAG following s.c. administration, but in a different manner than morphine does during morphine-induced hyperalgesia {Arout, 2014 #4977}.

Ionotropic N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) glutamatergic receptors appear also to be involved in M3G effects. First, M3G does not display excitation when embryonic cultured hippocampal neurons are pre-incubated with 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, NMDA receptor antagonist), showing the necessity of these receptors in M3G's excitatory effects *in vitro* ¹⁰⁹. Moreover, behavioural excitation triggered by M3G administration was attenuated in rats pre-treated with the LY274614 NMDA receptor antagonist ⁸¹ or when antagonists were co-injected with M3G {Bartlett, 1994 #5424; Kotmasu, 2009a). Finally, i.t. injections of M3G lead Komatsu and collaborators to postulate that the phosphorylation of ERK follows the activation of the NO-cGMP-PKG pathway in response to NMDA receptors activation and could be responsible for an increase of neuronal excitability (Kotmasu, 2009a).

Later on, they showed the potential implication of the delta2-opioid receptors (DOR2) using the same procedure (Kotmasu, 2016).

Nonetheless, additional studies have shown that M3G does not directly elicit neuronal excitation. Indeed, M3G fails to affect evoked excitatory postsynaptic currents obtained from patch-clamp recordings in neurons of the substantia gelatinosa although it increases the amplitude of inhibitory postsynaptic currents in a dose-dependent manner. The change of the paired-pulse ratio observed in this study indicates that a pre-synaptic mechanism exists¹¹². In addition, no effect has been observed on the C-fiber evoked responses of dorsal horn nociceptive neurons following pretreatment of i.t M3G in anesthetized rat {Hewett, 1993 #5093; Sullivan, 1989 #3439}. Interestingly, morphine-induced hyperalgesia was still present and unchanged in mice lacking the Mrp3. In these mice, the M3G remains trapped in the hepatocytes due to the lack of this M3G efflux transporters¹¹³. Therefore, no M3G is found in the blood, suggesting no role of M3G in morphine-induced hyperalgesia. However, it is worth to note that even though M3G is not found in the blood of these animal, morphine can directly be metabolized into M3G in the CNS and could still elicit its central effects (Gabel, 2021). Overwhelmingly, the current consensus is that M3G might modulate neuronal activity through a non-opioidergic pathway.

III- CONCLUSION

Taking together, even with more than hundred articles published, it is difficult to have a clear idea about the role of M3G and which receptor(s) are involved in its effects. Indeed, M3G might act on different receptors that might involve both TLR4 and MOR, as well as additional one(s) not yet characterized. Such multimodal mechanism might explain the difficulty to obtain clear results.

References

- 1 Trescot, A. M., Datta, S., Lee, M. & Hansen, H. Opioid pharmacology. *Pain Physician* **11**, S133-153 (2008).
- 2 Bachmutsky, I., Wei, X. P., Kish, E. & Yackle, K. Opioids depress breathing through two small brainstem sites. *Elife* **9**, doi:10.7554/eLife.52694 (2020).
- 3 Koller, G., Schwarzer, A., Halfter, K. & Soyka, M. Pain management in opioid maintenance treatment. *Expert Opin Pharmacother* **20**, 1993-2005, doi:10.1080/14656566.2019.1652270 (2019).
- 4 Weinsanto, I. *et al.* Stable isotope-labelled morphine to study in vivo central and peripheral morphine glucuronidation and brain transport in tolerant mice. *Br J Pharmacol* **175**, 3844-3856, doi:10.1111/bph.14454 (2018).
- 5 Van Crugten, J. T., Somogyi, A. A., Nation, R. L. & Reynolds, G. The effect of old age on the disposition and antinociceptive response of morphine and morphine-6 beta-glucuronide in the rat. *Pain* **71**, 199-205, doi:10.1016/s0304-3959(97)03363-0 (1997).
- 6 Fullerton, E. F., Rubaharan, M., Karom, M. C., Hanberry, R. I. & Murphy, A. Z. Advanced age attenuates the antihyperalgesic effect of morphine and decreases mu-opioid receptor expression and binding in the rat midbrain periaqueductal gray in male and female rats. *Neurobiol Aging* **98**, 78-87, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2020.10.020 (2021).
- 7 Gupta, K. *et al.* Risk factors for opioid-induced respiratory depression in surgical patients: a systematic review and meta-analyses. *BMJ Open* **8**, e024086, doi:10.1136/bmjopen-2018-024086 (2018).
- 8 Hopkins, R. E., Bui, T., Magliano, D., Arnold, C. & Dooley, M. Prescriber Education Interventions to Optimize Opioid Prescribing in Acute Care: A Systematic Review. *Pain Physician* **22**, E551-E562 (2019).
- 9 Vellucci, R. Heterogeneity of chronic pain. *Clin Drug Investig* **32 Suppl 1**, 3-10, doi:10.2165/11630030-000000000-00000 (2012).
- 10 Turk, D. C. Clinicians' attitudes about prolonged use of opioids and the issue of patient heterogeneity. *J Pain Symptom Manage* **11**, 218-230, doi:10.1016/0885-3924(95)00188-3 (1996).
- 11 Al-Hasani, R. & Bruchas, M. R. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology* **115**, 1363-1381, doi:10.1097/ALN.0b013e318238bba6 (2011).
- 12 Whorton, M. R. & MacKinnon, R. X-ray structure of the mammalian GIRK2-beta gamma G-protein complex. *Nature* **498**, 190-197, doi:10.1038/nature12241 (2013).
- 13 Sadjia, R., Alagem, N. & Reuveny, E. Gating of GIRK channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex. *Neuron* **39**, 9-12, doi:10.1016/s0896-6273(03)00402-1 (2003).
- 14 Torrecilla, M. *et al.* G-protein-gated potassium channels containing Kir3.2 and Kir3.3 subunits mediate the acute inhibitory effects of opioids on locus ceruleus neurons. *J Neurosci* **22**, 4328-4334, doi:20026414 (2002).
- 15 Williams, J. T. *et al.* Regulation of mu-opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol Rev* **65**, 223-254, doi:65/1/223 10.1124/pr.112.005942 (2013).

- 16 Arttamangkul, S. *et al.* Differential activation and trafficking of micro-opioid receptors in brain slices. *Mol Pharmacol* **74**, 972-979, doi:10.1124/mol.108.048512 (2008).
- 17 Trafton, J. A. & Basbaum, A. I. [d-Ala²,N-MePhe⁴,Gly-ol⁵]enkephalin-induced internalization of the micro opioid receptor in the spinal cord of morphine tolerant rats. *Neuroscience* **125**, 541-543, doi:10.1016/j.neuroscience.2004.02.019 (2004).
- 18 Keith, D. E. *et al.* Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J Biol Chem* **271**, 19021-19024, doi:10.1074/jbc.271.32.19021 (1996).
- 19 Lamberts, J. T. & Traynor, J. R. Opioid receptor interacting proteins and the control of opioid signaling. *Curr Pharm Des* **19**, 7333-7347, doi:10.2174/138161281942140105160625 (2013).
- 20 Machelska, H. & Celik, M. O. Opioid Receptors in Immune and Glial Cells- Implications for Pain Control. *Front Immunol* **11**, 300, doi:10.3389/fimmu.2020.00300 (2020).
- 21 Lacagnina, M. J., Rivera, P. D. & Bilbo, S. D. Glial and Neuroimmune Mechanisms as Critical Modulators of Drug Use and Abuse. *Neuropsychopharmacology* **42**, 156-177, doi:10.1038/npp.2016.121 (2017).
- 22 Fields, H. State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* **5**, 565-575, doi:10.1038/nrn1431 (2004).
- 23 Cunha, T. M. *et al.* Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4442-4447, doi:10.1073/pnas.0914733107 (2010).
- 24 Weibel, R. *et al.* Mu opioid receptors on primary afferent nav1.8 neurons contribute to opiate-induced analgesia: insight from conditional knockout mice. *PLoS One* **8**, e74706, doi:10.1371/journal.pone.0074706 (2013).
- 25 Sun, J., Chen, S. R. & Pan, H. L. mu-Opioid receptors in primary sensory neurons are involved in supraspinal opioid analgesia. *Brain Res* **1729**, 146623, doi:10.1016/j.brainres.2019.146623 (2020).
- 26 Blomqvist, K. J. *et al.* Morphine-3-glucuronide causes antinociceptive cross-tolerance to morphine and increases spinal substance P expression. *Eur J Pharmacol* **875**, 173021, doi:10.1016/j.ejphar.2020.173021 (2020).
- 27 Lloret-Linares, C., Scherrmann, J. M. & Decleves, X. The effect of morbid obesity on morphine glucuronidation. *Pharmacol Res* **114**, 299-300, doi:10.1016/j.phrs.2016.09.034 (2016).
- 28 Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* **16**, 1-13, doi:10.1016/j.nbd.2003.12.016 (2004).
- 29 Lotsch, J. Opioid metabolites. *J Pain Symptom Manage* **29**, S10-24 (2005).
- 30 Hand, C. W., Moore, R. A., McQuay, H. J., Allen, M. C. & Sear, J. W. Analysis of morphine and its major metabolites by differential radioimmunoassay. *Ann Clin Biochem* **24 (Pt 2)**, 153-160, doi:10.1177/000456328702400205 (1987).
- 31 Cone, E. J., Caplan, Y. H., Moser, F., Robert, T. & Black, D. Evidence that morphine is metabolized to hydromorphone but not to oxymorphone. *J Anal Toxicol* **32**, 319-323, doi:10.1093/jat/32.4.319 (2008).
- 32 Laux-Biehlmann, A., Mouheiche, J., Veriepe, J. & Goumon, Y. Endogenous morphine and its metabolites in mammals: history, synthesis, localization and perspectives. *Neuroscience* **233**, 95-117, doi:10.1016/j.neuroscience.2012.12.013 (2013).
- 33 Hasselstrom, J. & Sawe, J. Morphine pharmacokinetics and metabolism in humans. Enterohepatic cycling and relative contribution of metabolites to active opioid concentrations. *Clin Pharmacokinet* **24**, 344-354, doi:10.2165/00003088-199324040-00007 (1993).

- 34 Sawe, J. High-dose morphine and methadone in cancer patients. Clinical pharmacokinetic considerations of oral treatment. *Clin Pharmacokinet* **11**, 87-106, doi:10.2165/00003088-198611020-00001 (1986).
- 35 Webster, G. W., Shuster, L. & Eleftheriou, B. E. Morphine analgesia in mice of different ages. *Exp Aging Res* **2**, 221-233, doi:10.1080/03610737608257178 (1976).
- 36 Meech, R. *et al.* The UDP-Glycosyltransferase (UGT) Superfamily: New Members, New Functions, and Novel Paradigms. *Physiol Rev* **99**, 1153-1222, doi:10.1152/physrev.00058.2017 (2019).
- 37 Stone, A. N., Mackenzie, P. I., Galetin, A., Houston, J. B. & Miners, J. O. Isoform selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human udp-glucuronosyltransferases: evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7. *Drug Metab Dispos* **31**, 1086-1089 (2003).
- 38 Nair, P. C., Meech, R., Mackenzie, P. I., McKinnon, R. A. & Miners, J. O. Insights into the UDP-sugar selectivities of human UDP-glycosyltransferases (UGT): a molecular modeling perspective. *Drug Metab Rev* **47**, 335-345, doi:10.3109/03602532.2015.1071835 (2015).
- 39 Lin, C. J. *et al.* Cellular localization of the organic cation transporters, OCT1 and OCT2, in brain microvessel endothelial cells and its implication for MPTP transport across the blood-brain barrier and MPTP-induced dopaminergic toxicity in rodents. *J Neurochem* **114**, 717-727, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06801.x (2010).
- 40 Tzvetkov, M. V. *et al.* Morphine is a substrate of the organic cation transporter OCT1 and polymorphisms in OCT1 gene affect morphine pharmacokinetics after codeine administration. *Biochemical Pharmacology* **86**, 666-678, doi:10.1016/j.bcp.2013.06.019 (2013).
- 41 Yang, Z. Z. *et al.* siRNA capsulated brain-targeted nanoparticles specifically knock down OATP2B1 in mice: a mechanism for acute morphine tolerance suppression. *Sci Rep* **6**, 33338, doi:srep33338 [pii] 10.1038/srep33338 (2016).
- 42 Jackson, M. R., Nilsson, T. & Peterson, P. A. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* **9**, 3153-3162 (1990).
- 43 Kobayashi, T., Sleeman, J. E., Coughtrie, M. W. & Burchell, B. Molecular and functional characterization of microsomal UDP-glucuronic acid uptake by members of the nucleotide sugar transporter (NST) family. *Biochem J* **400**, 281-289, doi:10.1042/BJ20060429 (2006).
- 44 Rowland, A., Mackenzie, P. I. & Miners, J. O. Transporter-mediated uptake of UDP-glucuronic acid by human liver microsomes: assay conditions, kinetics, and inhibition. *Drug Metab Dispos* **43**, 147-153, doi:10.1124/dmd.114.060509 (2015).
- 45 Muraoka, M., Kawakita, M. & Ishida, N. Molecular characterization of human UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter, a novel nucleotide sugar transporter with dual substrate specificity. *FEBS Lett* **495**, 87-93, doi:10.1016/s0014-5793(01)02358-4 (2001).
- 46 Wobbrock, J. O., Findlater, L., Gergle, D. & Higgins, J. J. The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only anova procedures. *Proceedings of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems*, 143-146, doi:10.1145/1978942.1978963 (2011).
- 47 Zelcer, N. *et al.* Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7274-7279, doi:10.1073/pnas.0502530102 (2005).

- 48 Lloret-Linares, C. *et al.* Oral Morphine Pharmacokinetic in Obesity: The Role of P-Glycoprotein, MRP2, MRP3, UGT2B7, and CYP3A4 Jejunal Contents and Obesity-Associated Biomarkers. *Mol Pharm* **13**, 766-773, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00656 (2016).
- 49 Bock, K. W. The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: Animal-plant arms-race and co-evolution. *Biochem Pharmacol* **99**, 11-17, doi:10.1016/j.bcp.2015.10.001 (2016).
- 50 King, C. D., Rios, G. R., Green, M. D. & Tephly, T. R. UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* **1**, 143-161 (2000).
- 51 Oda, S., Fukami, T., Yokoi, T. & Nakajima, M. A comprehensive review of UDP-glucuronosyltransferase and esterases for drug development. *Drug Metab Pharmacokinet* **30**, 30-51, doi:10.1016/j.dmpk.2014.12.001 (2015).
- 52 Handal, M., Grung, M., Skurtveit, S., Ripel, A. & Morland, J. Pharmacokinetic differences of morphine and morphine-glucuronides are reflected in locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav* **73**, 883-892 (2002).
- 53 Lotsch, J. & Geisslinger, G. Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clin Pharmacokinet* **40**, 485-499, doi:10.2165/00003088-200140070-00001 (2001).
- 54 Kurita, A. *et al.* Comprehensive Characterization of Mouse UDP-Glucuronosyltransferase (Ugt) Belonging to the Ugt2b Subfamily: Identification of Ugt2b36 as the Predominant Isoform Involved in Morphine Glucuronidation. *J Pharmacol Exp Ther* **361**, 199-208, doi:10.1124/jpet.117.240382 (2017).
- 55 Miyauchi, Y. *et al.* Hetero-oligomer formation of mouse UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2b1 and 1a1 results in the gain of glucuronidation activity towards morphine, an activity which is absent in homo-oligomers of either UGT. *Biochem Biophys Res Commun* **525**, 348-353, doi:10.1016/j.bbrc.2020.02.075 (2020).
- 56 Yang, Z. *et al.* Reverse of Acute and Chronic Morphine Tolerance by Lithocholic Acid via Down-Regulating UGT2B7. *Front Pharmacol* **7**, 404, doi:10.3389/fphar.2016.00404 (2016).
- 57 Yang, Z. *et al.* Simultaneous analysis of gemfibrozil, morphine, and its two active metabolites in different mouse brain structures using solid-phase extraction with ultra-high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry with a deuterated internal standard. *J Sep Sci* **39**, 2087-2096, doi:10.1002/jssc.201600088 (2016).
- 58 Kuo, C. K., Hanioka, N., Hoshikawa, Y., Oguri, K. & Yoshimura, H. Species-Difference of Site-Selective Glucuronidation of Morphine. *Journal of Pharmacobio-Dynamics* **14**, 187-193 (1991).
- 59 Nagano, E., Yamada, H. & Oguri, K. Characteristic glucuronidation pattern of physiologic concentration of morphine in rat brain. *Life Sci* **67**, 2453-2464 (2000).
- 60 Togna, A. R. *et al.* In vitro morphine metabolism by rat microglia. *Neuropharmacology* **75C**, 391-398, doi:S0028-3908(13)00384-5 10.1016/j.neuropharm.2013.08.019 (2013).
- 61 Shimomura, K. *et al.* Analgesic effect of morphine glucuronides. *Tohoku J Exp Med* **105**, 45-52, doi:10.1620/tjem.105.45 (1971).
- 62 Klimas, R. & Mikus, G. Morphine-6-glucuronide is responsible for the analgesic effect after morphine administration: a quantitative review of morphine, morphine-6-glucuronide, and morphine-3-glucuronide. *British Journal of Anaesthesia* **113**, 935-944, doi:10.1093/bja/aeu186 (2014).
- 63 De Gregori, S. *et al.* Morphine metabolism, transport and brain disposition. *Metab Brain Dis* **27**, 1-5, doi:10.1007/s11011-011-9274-6 (2012).

- 64 Dahan, A. & Lotsch, J. Morphine is not a prodrug. *Br J Anaesth* **114**, 1005-1006, doi:10.1093/bja/aev125 (2015).
- 65 Osborne, P. B., Chieng, B. & Christie, M. J. Morphine-6 beta-glucuronide has a higher efficacy than morphine as a mu-opioid receptor agonist in the rat locus coeruleus. *Br J Pharmacol* **131**, 1422-1428 (2000).
- 66 Frances, B., Gout, R., Monsarrat, B., Cros, J. & Zajac, J. M. Further evidence that morphine-6 beta-glucuronide is a more potent opioid agonist than morphine. *J Pharmacol Exp Ther* **262**, 25-31 (1992).
- 67 Christensen, C. B. & Jorgensen, L. N. Morphine-6-glucuronide has high affinity for the opioid receptor. *Pharmacol Toxicol* **60**, 75-76, doi:10.1111/j.1600-0773.1987.tb01724.x (1987).
- 68 Loh, H. H. *et al.* mu Opioid receptor knockout in mice: effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality. *Brain Res Mol Brain Res* **54**, 321-326, doi:10.1016/s0169-328x(97)00353-7 (1998).
- 69 Mignat, C., Jansen, R. & Ziegler, A. Plasma and Cerebrospinal-Fluid Concentrations of Morphine and Morphine Glucuronides in Rabbits Receiving Single and Repeated Doses of Morphine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **47**, 171-175 (1995).
- 70 Schuller, A. G. *et al.* Retention of heroin and morphine-6 beta-glucuronide analgesia in a new line of mice lacking exon 1 of MOR-1. *Nat Neurosci* **2**, 151-156 (1999).
- 71 Binning, A. R. *et al.* A randomised controlled trial on the efficacy and side-effect profile (nausea/vomiting/sedation) of morphine-6-glucuronide versus morphine for post-operative pain relief after major abdominal surgery. *Eur J Pain* **15**, 402-408, doi:10.1016/j.ejpain.2010.09.007 (2011).
- 72 Dahan, A., van Dorp, E., Smith, T. & Yassen, A. Morphine-6-glucuronide (M6G) for postoperative pain relief. *Eur J Pain* **12**, 403-411 (2008).
- 73 Smith, T. W., Binning, A. R. & Dahan, A. Efficacy and safety of morphine-6-glucuronide (M6G) for postoperative pain relief: a randomized, double-blind study. *Eur J Pain* **13**, 293-299, doi:10.1016/j.ejpain.2008.04.015 (2009).
- 74 Massi, P. *et al.* Intestinal effect of morphine 6-glucuronide: in vivo and in vitro characterization. *Eur J Pharmacol* **253**, 269-274, doi:10.1016/0014-2999(94)90201-1 (1994).
- 75 Pelligrino, D. A., Riegler, F. X. & Albrecht, R. F. Ventilatory effects of fourth cerebroventricular infusions of morphine-6- or morphine-3-glucuronide in the awake dog. *Anesthesiology* **71**, 936-940, doi:10.1097/00000542-198912000-00018 (1989).
- 76 Gong, Q. L., Hedner, T., Hedner, J., Bjorkman, R. & Nordberg, G. Antinociceptive and ventilatory effects of the morphine metabolites: morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide. *Eur J Pharmacol* **193**, 47-56, doi:10.1016/0014-2999(91)90199-z (1991).
- 77 Labella, F. S., Pinsky, C. & Havlicek, V. Morphine derivatives with diminished opiate receptor potency show enhanced central excitatory activity. *Brain Res* **174**, 263-271, doi:10.1016/0006-8993(79)90849-7 (1979).
- 78 Woolf, C. J. Intrathecal high dose morphine produces hyperalgesia in the rat. *Brain Res* **209**, 491-495, doi:10.1016/0006-8993(81)90176-1 (1981).
- 79 Yaksh, T. L., Harty, G. J. & Onofrio, B. M. High dose of spinal morphine produce a nonopiate receptor-mediated hyperesthesia: clinical and theoretic implications. *Anesthesiology* **64**, 590-597, doi:10.1097/00000542-198605000-00008 (1986).
- 80 Smith, M. T., Watt, J. A. & Cramond, T. Morphine-3-glucuronide--a potent antagonist of morphine analgesia. *Life Sci* **47**, 579-585 (1990).
- 81 Bartlett, S. E., Cramond, T. & Smith, M. T. The excitatory effects of morphine-3-glucuronide are attenuated by LY274614, a competitive NMDA receptor antagonist,

- and by midazolam, an agonist at the benzodiazepine site on the GABAA receptor complex. *Life Sci* **54**, 687-694, doi:10.1016/0024-3205(94)00552-4 (1994).
- 82 Bartlett, S. E., Dodd, P. R. & Smith, M. T. Pharmacology of morphine and morphine-3-glucuronide at opioid, excitatory amino acid, GABA and glycine binding sites. *Pharmacol Toxicol* **75**, 73-81, doi:10.1111/j.1600-0773.1994.tb00327.x (1994).
- 83 Lewis, S. S. *et al.* Evidence that intrathecal morphine-3-glucuronide may cause pain enhancement via toll-like receptor 4/MD-2 and interleukin-1beta. *Neuroscience* **165**, 569-583, doi:S0306-4522(09)01651-0 10.1016/j.neuroscience.2009.10.011 (2010).
- 84 Due, M. R. *et al.* Neuroexcitatory effects of morphine-3-glucuronide are dependent on Toll-like receptor 4 signaling. *J Neuroinflammation* **9**, 200, doi:10.1186/1742-2094-9-200 (2012).
- 85 Roeckel, L. A. *et al.* Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. *Sci Rep* **7**, 10406, doi:10.1038/s41598-017-11120-4 (2017).
- 86 Smith, G. D. & Smith, M. T. Morphine-3-glucuronide: evidence to support its putative role in the development of tolerance to the antinociceptive effects of morphine in the rat. *Pain* **62**, 51-60, doi:10.1016/0304-3959(94)00228-7 (1995).
- 87 Bian, J. T. & Bhargava, H. N. Effects of morphine-3-glucuronide on the antinociceptive activity of peptide and nonpeptide opioid receptor agonists in mice. *Peptides* **17**, 1415-1419, doi:10.1016/s0196-9781(96)00215-x (1996).
- 88 Penson, R. T. *et al.* Randomized placebo-controlled trial of the activity of the morphine glucuronides. *Clin Pharmacol Ther* **68**, 667-676, doi:10.1067/mcp.2000.111934 (2000).
- 89 Lewis, S. S. *et al.* Select steroid hormone glucuronide metabolites can cause toll-like receptor 4 activation and enhanced pain. *Brain Behav Immun* **44**, 128-136, doi:10.1016/j.bbi.2014.09.004 (2015).
- 90 Pasternak, G. W., Bodnar, R. J., Clark, J. A. & Inturrisi, C. E. Morphine-6-glucuronide, a potent mu agonist. *Life Sci* **41**, 2845-2849 (1987).
- 91 Coimbra-Farges, R., Puget, A., Monsarrat, B., Moisand, C. & Meunier, J. C. Morphine metabolism in the naturally morphine-tolerant afghan pika: a preliminary study. *Life Sci* **46**, 663-669, doi:10.1016/0024-3205(90)90135-e (1990).
- 92 Smith, M. T. Neuroexcitatory effects of morphine and hydromorphone: evidence implicating the 3-glucuronide metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27**, 524-528, doi:10.1046/j.1440-1681.2000.03290.x (2000).
- 93 Halliday, A. J., Bartlett, S. E., Colditz, P. & Smith, M. T. Brain region-specific studies of the excitatory behavioral effects of morphine-3-glucuronide. *Life Sci* **65**, 225-236, doi:S0024320599002398 [pii] (1999).
- 94 Hutchinson, M. R. *et al.* Possible involvement of toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor-2 activity of opioid inactive isomers causes spinal proinflammation and related behavioral consequences. *Neuroscience* **167**, 880-893, doi:S0306-4522(10)00202-2 [pii] 10.1016/j.neuroscience.2010.02.011 (2010).
- 95 Hutchinson, M. R. *et al.* Evidence that tricyclic small molecules may possess toll-like receptor and myeloid differentiation protein 2 activity. *Neuroscience* **168**, 551-563, doi:S0306-4522(10)00502-6 [pii] 10.1016/j.neuroscience.2010.03.067 (2010).
- 96 Wang, X. *et al.* Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 6325-6330, doi:1200130109 [pii] 10.1073/pnas.1200130109 (2012).

- 97 Grace, P. M. *et al.* Activation of Adult Rat Cns Endothelial Cells by Opioid-Induced Toll-Like Receptor 4 (Tlr4) Signaling Induces Proinflammatory, Biochemical, Morphological, and Behavioral Sequelae. *Neuroscience* **280**, 299-317, doi:10.1016/j.neuroscience.2014.09.020 (2014).
- 98 Watkins, L. R., Hutchinson, M. R., Rice, K. C. & Maier, S. F. The "toll" of opioid-induced glial activation: improving the clinical efficacy of opioids by targeting glia. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 581-591, doi:10.1016/j.tips.2009.08.002 (2009).
- 99 Khabbazi, S., Xie, N., Pu, W., Goumon, Y. & Parat, M. O. The TLR4-Active Morphine Metabolite Morphine-3-Glucuronide Does Not Elicit Macrophage Classical Activation In Vitro. *Front Pharmacol* **7**, 441, doi:10.3389/fphar.2016.00441 (2016).
- 100 Wybran, J., Appelboom, T., Famaey, J. P. & Govaerts, A. Suggestive evidence for receptors for morphine and methionine-enkephalin on normal human blood T lymphocytes. *J Immunol* **123**, 1068-1070 (1979).
- 101 Shavit, Y. *et al.* Effects of footshock stress and morphine on natural killer lymphocytes in rats: studies of tolerance and cross-tolerance. *Brain Res* **372**, 382-385, doi:10.1016/0006-8993(86)91149-2 (1986).
- 102 Freier, D. O. & Fuchs, B. A. A mechanism of action for morphine-induced immunosuppression: corticosterone mediates morphine-induced suppression of natural killer cell activity. *J Pharmacol Exp Ther* **270**, 1127-1133 (1994).
- 103 Eisenstein, T. K. The Role of Opioid Receptors in Immune System Function. *Front Immunol* **10**, 2904, doi:10.3389/fimmu.2019.02904 (2019).
- 104 Doyle, H. H. & Murphy, A. Z. Sex-dependent influences of morphine and its metabolites on pain sensitivity in the rat. *Physiol Behav* **187**, 32-41, doi:10.1016/j.physbeh.2017.11.030 (2018).
- 105 Mattioli, T. A. *et al.* Toll-like receptor 4 mutant and null mice retain morphine-induced tolerance, hyperalgesia, and physical dependence. *PLoS One* **9**, e97361, doi:10.1371/journal.pone.0097361 (2014).
- 106 Kang, M. *et al.* The effect of gut microbiome on tolerance to morphine mediated antinociception in mice. *Sci Rep* **7**, 42658, doi:srep42658 [pii] 10.1038/srep42658 (2017).
- 107 Zhang, L. *et al.* Morphine tolerance is attenuated in germfree mice and reversed by probiotics, implicating the role of gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 13523-13532, doi:10.1073/pnas.1901182116 (2019).
- 108 Meng, J. *et al.* Morphine induces bacterial translocation in mice by compromising intestinal barrier function in a TLR-dependent manner. *PLoS One* **8**, e54040, doi:10.1371/journal.pone.0054040 (2013).
- 109 Hemstapat, K., Smith, S. A., Monteith, G. R. & Smith, M. T. The neuroexcitatory morphine metabolite, morphine-3-glucuronide (M3G), is not neurotoxic in primary cultures of either hippocampal or cerebellar granule neurones. *Pharmacol Toxicol* **93**, 197-200, doi:10.1034/j.1600-0773.2003.930408.x (2003).
- 110 Due, M. R. *et al.* Carbamazepine potentiates the effectiveness of morphine in a rodent model of neuropathic pain. *PLoS One* **9**, e107399, doi:10.1371/journal.pone.0107399 (2014).
- 111 Allette, Y. M. *et al.* Decoy peptide targeted to Toll-IL-1R domain inhibits LPS and TLR4-active metabolite morphine-3 glucuronide sensitization of sensory neurons. *Sci Rep* **7**, 3741, doi:10.1038/s41598-017-03447-9 (2017).
- 112 Moran, T. D. & Smith, P. A. Morphine-3beta-D-glucuronide suppresses inhibitory synaptic transmission in rat substantia gelatinosa. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 568-576, doi:10.1124/jpet.102.035626 (2002).

- 113 Swartjes, M. *et al.* Morphine induces hyperalgesia without involvement of mu-opioid receptor or morphine-3-glucuronide. *Mol Med* **18**, 1320-1326, doi:10.2119/molmed.2012.00244 (2012).

Annexe 4 : Conditions utilisées en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Les conditions de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse en tandem sont présentées pour la purification, la détection et la quantification de la morphine et de la M3G ainsi que pour leurs homologues deutérés respectifs. Le débit était fixé à 90µL/min, et nous avons utilisé une colonne ZORBAX SB-C18 (150 x 1mm, 3,5µm, Agilent).

	ACN	H₂O	Acide formique
Phase mobile A	1%	98,9%	0,1%
Phase mobile B	99,9%	0	0,1%

Gradient de la chromatographie liquide						
Temps (min)	0	2,5	3,5	4,5	5,0	8
% phase mobile B	0	0	98	98	0	0

Paramètres MS	
Mode	positif
Voltage de l'électrospray	3500 V
Gaz de nébulisation	Azote
Gaz de désolvatation	18 Arb
Gaz auxiliaires	7 Arb
Température du tube de transfert	297°C
Température de vaporisation	131°C
Résolutions du Q1 et du Q3	0,7 FWHM
Pression du gaz de collision (Argon)	2 mTorr

Paramètres d'ionisation, de sélection, de fragmentation et d'identification en spectrométrie de masse en tandem.

Composé	Polarité	Ion parent (m/z)	Ions fils (m/z)	Type d'ion fils	Energie de collision (V)	Lentille RF (V)
Morphine	Positive	285,98	201,11	Quantification	26,23	183
Morphine	Positive	285,98	165,36	Qualification	40,89	183
Morphine	Positive	285,98	181,06	Qualification	36,24	183
D3-morphine	Positive	289,1	201,06	Quantification	26,48	178
D3-morphine	Positive	289,1	153,13	Qualification	43,16	178
D3-morphine	Positive	289,1	165,04	Qualification	39,02	178
M3G	Positive	462,19	286,11	Quantification	30,02	276
D3-M3G	Positive	465,19	289,17	Quantification	29,92	242

Annexe 5 : Détails statistiques

Tableau supplémentaire 1 : Détails statistiques des expériences d'antinociception à la morphine et de tolérance (cf. Figure 33). Des régressions non linéaires ont été réalisées à l'aide d'une équation logistique à 4 paramètres pour définir l'ED₅₀ et l'intervalle de confiance pour les souris mâles et femelles. Les deux modèles ont été comparés à l'aide d'une comparaison de modèles réalisée avec la méthode des moindres carrés suivi d'un test F. Les paramètres dérivés de chaque souris pour les expériences de tolérance ont été moyennés et comparés à l'aide d'un t-test de Welch non apparié. **MPE**, effet maximal possible.

Paramètres	Courbe dose-réponse	Tolérance à la morphine	
	ED ₅₀	50% MPE (jour)	Coefficient de Hill
Test	méthode des moindres carrés suivi d'un test F	t-test de Welch non apparié	t-test de Welch non apparié
F, t, df	F (2, 55) = 50,96	t=15,40 df=27,33	t=1,419 df=25,31
p-value	< 0,0001*	< 0,0001*	0,1680

Tableau supplémentaire 2 : Détails statistiques des expériences d'hyperalgésie à la M3G (cf. Figure 34). Les courbes obtenues après les injections cumulatives de M3G par voie i.p. ont été analysées par ANOVA à deux facteurs à mesure répétée alors que celles observées après les injections de M3G par voie i.t. ont été analysées par ANOVA à deux facteurs. Après modélisation par régression semi-log des courbes de cinétique obtenues avec 0,1 µg et 2,5µg de M3G par voie i.t., les paramètres obtenus pour chaque souris ont été moyennés et comparés par ANOVA à deux facteurs.

	ED₅₀ M3G par voie i.t.	ED₅₀ M3G par voie i.p.
Interaction	F (4, 50) = 1,227 p = 0,31	F (5, 54) = 0,30 p = 0,91
Dose	F (4, 50) = 14,89 p < 0,0001*	F (5, 54) = 15,03 p < 0,0001*
Sexe	F (1, 50) = 0,15 p = 0,70	F (1, 54) = 1,57 p < 0,22

Tableau supplémentaire 3 : Détails statistiques des paramètres pharmacocinétiques de la morphine et de la M3G dans le sang obtenus à l'aide de l'analyse non-compartmentale (cf, Tableau 6). L'ANOVA à deux facteurs a été utilisée pour comparer les paramètres pharmacocinétique entre chaque groupe. L'approche ART ANOVA non paramétrique (indiquée en gras) a été utilisée pour le volume de distribution de la morphine. **AUC**, Aire sous la courbe ; **AUMC**, Aire sous la courbe du moment ; **Cl/F**, clairance sur la biodisponibilité ; **C_{max}**, concentration maximale atteinte lors de la cinétique ; **MRT**, temps de résidence moyen ; **V_{dss}/F**, volume de distribution sur la biodisponibilité.

Métabolisme périphérique			
C_{max}			
	Morphine	M3G	M3G/Morphine
Interaction	F (1, 33) = 10,99 p = 0,0022*	F (1, 33) = 3,07 p = 0,089	/
Traitement	F (1, 33) = 5,37 p = 0,027*	F (1, 33) = 2,33 p = 0,14	/
Sexe	F (1, 33) = 1,60 p = 0,21	F (1, 33) = 34,42 p < 0,0001*	/
AUC			
	Morphine	M3G	M3G/Morphine
Interaction	F (1, 32) = 8,54 p = 0,0063*	F (1, 32) = 2,79 p = 0,11	F (1, 31) = 1,26 p = 0,27
Traitement	F (1, 32) = 10,92 p = 0,0023*	F (1, 32) = 1,11 p = 0,30	F (1, 31) = 7,44 p = 0,01*
Sexe	F (1, 32) = 0,022 p = 0,88	F (1, 32) = 18,20 p = 0,0002*	F (1, 31) = 10,31 p = 0,0031*
AUMC			
	Morphine	M3G	M3G/Morphine
Interaction	F (1, 32) = 12,44 p = 0,0013*	F (1, 32) = 0,31 p = 0,58	/
Traitement	F (1, 32) = 11,71 p = 0,0017*	F (1, 32) = 0,052 p = 0,82	/
Sexe	F (1, 32) = 6,59 p = 0,015*	F (1, 32) = 1,88 p = 0,18	/

MRT			
	Morphine	M3G	M3G/Morphine
Interaction	F (1, 32) = 0,88 p = 0,36	F (1, 32) = 0,45 p = 0,51	/
Traitement	F (1, 32) = 0,0055 p = 0,94	F (1, 32) = 0,49 p = 0,49	/
Sexe	F (1, 32) = 11,16 p = 0,0021*	F (1, 32) = 0,088 p = 0,77	/
T_{1/2}			
	Morphine	M3G	M3G/Morphine
Interaction	F (1, 32) = 0,88 P = 0,36	/	/
Traitement	F (1, 32) = 0,0055 p = 0,94	/	/
Sexe	F (1, 32) = 11,16 p = 0,0021*	/	/
Cl/F			
	Morphine	M3G	M3G/Morphine
Interaction	F (1, 32) = 6,31 p = 0,017*	/	/
Traitement	F (1, 32) = 13,34 p = 0,0009*	/	/
Sexe	F (1, 32) = 0,14 p = 0,71	/	/
V_{dss}/F			
	Morphine	M3G	M3G/Morphine
Interaction	F (1, 31) = 0,12 p = 0,73	/	/
Traitement	F (1, 32) = 7,275 p = 0,011*	/	/
Sexe	F (1, 32) = 2,185 p = 0,15	/	/

Tableau supplémentaire 4 : Détails statistiques des expériences de quantification de la morphine et de la M3G dans le SNC (cf, Tableau 7). L'ANOVA à deux facteurs a été utilisée pour comparer les quantités de morphine et de M3G entre les groupes. L'approche ART ANOVA non paramétrique (indiquée en gras) a été utilisée pour le ratio M3G/Morphine dans l'amygdale et les quantités de morphine et de M3G dans le OB. **LSC**, moelle épinière lombaire ; **OB**, bulbe olfactif ; **PAG**, substance grise périaqueducule.

Quantification dans les régions cérébrales			
Amygdale			
	Morphine	M3G	M3G/Morphine
Interaction	F (1, 59) = 0,2349 p = 0,63	F (1, 59) = 2,210 p = 0,14	F (1, 59) = 0,82 p = 0,37
Traitement	F (1, 59) = 9,01 p = 0,0039*	F (1, 59) = 9,49 p = 0,0031*	F (1, 59) = 0,41 p = 0,52
Sexee	F (1, 59) = 7,04 p = 0,0102*	F (1, 59) = 15,12 p = 0,0003*	F (1, 59) = 29,84 p < 0,0001*
PAG			
	Morphine	M3G	M3G/Morphine
Interaction	F (1, 62) = 0,19 p = 0,66	F (1, 61) = 0,0049 p = 0,94	F (1, 61) = 0,26 p = 0,61
Traitement	F (1, 62) = 2,46 p = 0,12	F (1, 61) = 0,62 p = 0,44	F (1, 61) = 0,20 p = 0,65
Sexe	F (1, 62) = 26,86 p < 0,0001*	F (1, 61) = 0,20 p = 0,65	F (1, 61) = 14,4 p = 0,0003*
LSC			
	Morphine	M3G	M3G/Morphine
Interaction	F (1, 48) = 0,0005 p = 0,98	F (1, 48) = 1,08 p = 0,30	F (1, 48) = 0,44 p = 0,51
Traitement	F (1, 48) = 0,43 p = 0,5140	F (1, 48) = 0,50 p = 0,48	F (1, 48) = 1,44 p = 0,24
Sexe	F (1, 48) = 4,76 p = 0,034*	F (1, 48) = 10,57 p = 0,0021*	F (1, 48) = 0,12 p = 0,74

	OB		
	Morphine	M3G	M3G/Morphine
Interaction	F (1, 54) = 0,54 p = 0,47	F (1, 54) = 0,91 p = 0,34	F (1, 54) = 0,9002 p = 0,3470
Traitement	F (1, 54) = 16,64 p = 0,0001*	F (1, 54) = 3,13 p = 0,083	F (1, 54) = 3,155 p = 0,0813
Sexe	F (1, 54) = 20,69 p < 0,0001*	F (1, 54) = 5,85 p = 0,019*	F (1, 54) = 10,97 p = 0,0017*

Tableau supplémentaire 5 : Détails statistiques des expériences de ratio cerveau/sang obtenus pour la morphine et la M3G (cf, Figure 37). L'ANOVA à deux facteurs a été utilisée pour comparer les quantités de morphine et de M3G entre les groupes. L'approche ART ANOVA non paramétrique (indiquée en gras) a été utilisée pour les rapports cerveau/sang de la morphine dans la PAG et ceux de la M3G dans la PAG et la LSC. **LSC**, moelle épinière lombaire ; **OB**, bulbe olfactif ; **PAG**, substance grise périaqueducale.

Rapport cerveau/sang		
Amygdale		
	Morphine	M3G
Interaction	F (1, 43) = 1,35 p = 0,25	F (1, 37) = 12,88 p = 0,0010*
Traitement	F (1, 43) = 2,43 p = 0,13	F (1, 37) = 0,56 p = 0,46
Sexe	F (1, 43) = 2,010 p = 0,16	F (1, 37) = 0,059 p = 0,8092
PAG		
	Morphine	M3G
Interaction	F (1, 44) = 0,40 p = 0,53	F (1, 37) = 0,98 p = 0,33
Traitement	F (1, 44) = 3,795 p = 0,058	F (1, 37) = 1,63 p = 0,21
Sexe	F (1, 44) = 18,74 p < 0,0001*	F (1, 37) = 5,27 p = 0,027*
LSC		
	Morphine	M3G
Interaction	F (1, 34) = 0,1681 p = 0,68	F (1, 38) = 0,34 p = 0,57
Traitement	F (1, 34) = 1,25 p = 0,27	F (1, 38) = 0,01 p = 0,92
Sexe	F (1, 34) = 12,27 p = 0,0013*	F (1, 38) = 0,06 p = 0,80

	OB	
	Morphine	M3G
Interaction	F (1, 47) = 1,62 p = 0,21	F (1, 40) = 0,82 p = 0,37
Traitement	F (1, 47) = 3,31 p = 0,08	F (1, 40) = 0,010 p = 0,92
Sexe	F (1, 47) = 0,97 p = 0,33	F (1, 40) = 18,80 p < 0,0001*

Tableau supplémentaire 6 : Détails statistiques des expériences de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique pour la M3G et de métabolisme central (cf, Figure 37). Des régressions linéaires ont été réalisées pour modéliser l'évolution des concentrations de M3G dans le SNC en fonction des concentrations sanguines entre les mâles et les femelles après les injections de morphine et de M3G. Les modèles obtenus ont été comparés entre eux à l'aide d'une comparaison de modèles réalisée avec la méthode des moindres carrés suivi d'un test F. Ces comparaisons permettent d'évaluer *(i)* les différences liées au sexe dans la perméabilité de la BHE pour la M3G (*i.e.* comparaison des régressions linéaires modélisant les rapports cerveau/sang de la M3G en fonction des concentrations sanguines de M3G après injection de M3G chez les mâles et les femelles) *(ii)* l'existence d'un métabolisme central (*i.e.* comparaison des régressions linéaires modélisant les rapports cerveau/sang de la M3G en fonction des concentrations sanguines de M3G après injection de morphine ou de M3G) et *(iii)* les différences liées au sexe dans ce métabolisme central (*i.e.* comparaisons des régressions linéaires des rapports cerveau/sang de la M3G en fonction des concentrations sanguines de M3G après injection de morphine chez les mâles et les femelles). **BHE**, barrière hémato-encéphalique ; **F**, Femelles ; **LSC**, moelle épinière lombaire ; **M**, Mâles ; **OB**, bulbe olfactif ; **PAG**, substance grise périaqueducule.

BHE et métabolisme central			
	Perméabilité de la M3G pour la BHE	Métabolisme central de la morphine: Injection de M3G vs Morphine	Différences liées au sexe dans le métabolisme central
Amygdale			
Mâles	/	F (1, 22) = 1,61 p = 0,22	/
Femelles	/	F (1, 24) = 6,74 p = 0,016*	/
M vs F	F (2, 24) = 0,046 p = 0,96	/	F (1, 20) = 12,84 p = 0,0019*
PAG			
Mâles	/	F (1, 25) = 11,53 p = 0,0023*	/
Femelles	/	F (1, 23) = 10,25 p = 0,0040*	/
M vs F	F (2, 24) = 0,41 p = 0,67	/	F (1, 22) = 0,052 p = 0,82
LSC			
Mâles	/	F (1, 25) = 1,88 p = 0,18	/
Femelles	/	F (1, 25) = 3,02 p = 0,095	/
M vs F	F (2, 25) = 0,059 p = 0,94	/	F (1, 23) = 0,12 p = 0,73
OB			
Mâles	/	F (2, 24) = 6,27 p = 0,0064*	/
Femelles	/	F (2, 23) = 2,79 p = 0,082	/
M vs F	F (2, 25) = 0,66 p = 0,53	/	F (1, 24) = 8,52 p = 0,0075*

Tableau supplémentaire 7 : Détails statistiques des expériences de métabolisme central *in vitro* sur cultures primaires de glies (cf, Figure 38). L'ANOVA à deux facteurs a été utilisée pour comparer les quantités de M3G entre les groupes.

Quantité de M3G		
Culture primaires de glies		
	10 μ M	100 μ M
Interaction	F (2, 38) = 36,86 p < 0,0001*	F (1, 37) = 39,89 p < 0,0001*
Type de cellules	F (2, 38) = 91,63 p < 0,0001*	F (1, 37) = 98,56 p < 0,0001*
Traitement	F (1, 38) = 80,26 p < 0,0001*	F (1, 37) = 91,85 p < 0,0001*

Tableau supplémentaire 8 : Détails statistiques des expériences d'activation du TLR4 par la M3G sur les RAW-DUAL (cf, Figure 39). L'ANOVA à deux facteurs a été utilisée pour comparer l'activité de la LUCIA et de la SEAP entre les groupes. **LPS**, lipopolysaccharide ; **SEAP**, phosphatase alcaline embryonnaire sécrétée.

Stimulation au LPS		
	LUCIA	SEAP
Interaction	F (2, 15) = 8,5 p = 0,0034*	F (2, 15) = 110,3 p < 0,0001*
Type cellulaire	F (1, 15) = 33,8 p < 0,0001*	F (1, 15) = 335,4 p < 0,0001*
Traitement	F (2, 15) = 9,14 p = 0,0025*	F (2, 15) = 165,2 p < 0,0001*
Stimulation à la M3G		
	LUCIA	SEAP
Interaction	F (4, 24) = 1,4 p = 0,27	F (4, 24) = 0,47 p = 0,76
Type cellulaire	F (1, 24) = 1,48 p = 0,24	F (1, 24) = 0,04 p = 0,85
Traitement	F (4, 24) = 0,36 p = 0,83	F (4, 24) = 1,30 p = 0,30

Tableau supplémentaire 9 : Détails statistiques des expériences d'imagerie calcique sur microglies primaires de souris (cf, Figure 40). L'ANOVA à deux facteurs a été utilisée pour comparer l'amplitude et l'aire sous la courbe atteinte par l'augmentation calcique transitoire induite par l'UTP dans les différentes conditions. **AUC**, Aire sous la courbe. **UTP**, uridine-triphosphate.

	Amplitude	AUC
Interaction	F (2, 19) = 0,17 p = 0,84	F (2, 15) = 0,57 p = 0,57
Type cellulaire	F (1, 19) = 3,6 p = 0,07	F (1, 15) = 1,74 p = 0,20
Préincubation	F (2, 19) = 0,27 p = 0,77	F (2, 15) = 0,11 p = 0,89

Annexe 6 : Publication - Central metabolism as a potential origin of sex differences in morphine antinociception but not in the induction of antinociceptive tolerance in mice (en révision chez *British Journal Of Pharmacology*)

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

Abbreviated title: Morphine central metabolism is potentially driving the sex differences
observed in morphine antinociception.

Florian Gabel¹, Volodya Hovhannisyan¹, Virginie Andry^{1,2} & Yannick Goumon^{1,2*}

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

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

*To whom correspondence should be addressed: Dr Yannick Goumon, CNRS UPR3212,
Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives; 8 Allée du Général Rouvillois, F-67000
Strasbourg, France, Phone : (33)-3-88-45-67-18 ; Fax: (33)-3-88-60-16-64. E-mail:
ygoumon@unistra.fr

WORD COUNT

Abstract: 250

Main text : 4953

ACKNOWLEDGMENTS AND GRANT SPONSOR - This work was funded by CNRS, University of Strasbourg (Unistra) and French Ministère Délégué à la Recherche et à l'Enseignement Supérieur (PhD fellowship to F.G., and V.O.). We thank the following research programs of excellence for their support: FHU Neurogenyocs, French National Research Agency (ANR) through the Programme d'Investissement d'Avenir (contract ANR-17-EURE-0022, EURIDOL graduate school of pain).

AUTHOR CONTRIBUTIONS - **Conceptualisation**, Y.G., F.G., V.H. ; **Methodology**, Y.G., F.G., V.H., V.A. ; **Investigation**, F.G., V.H., V.A. ; **Writing – Original Draft**, Y.G., F.G. ; **Writing – Review & Editing**, Y.G., F.G., V.H. ; **Funding Acquisition**, Y.G. ; **Resources**, Y.G. ; **Supervision**, Y.G.

COMPETING INTERESTS - The authors declare that they have no competing interests.

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

ABSTRACT

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

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

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

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

KEYWORDS

Morphine, M3G, metabolism, sex differences, UDP-glucuronosyltransferase, antinociception, antinociceptive tolerance.

ABBREVIATIONS

ACN, acetonitrile; AUC, area under the curve; AUMC, area under the first moment curve; BBB, blood-brain barrier; CI95, 95% confidence interval; CID, collision gas; Cl/F, clearance over bioavailability; C_{max} , maximal concentration reached over the time course; CNS, central nervous system; D3-morphine, morphine bearing three ^2H ; D3-M3G, M3G bearing three ^2H ; ED50, half-maximal effective dose; LC-MS/MS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; LSC, lumbar spinal cord; M3G, morphine-3-glucuronide; M6G, morphine-6-glucuronide; MOR, mu opioid receptor; MPE, maximal possible effect; MRM, multiple reaction monitoring mode; MRT, mean residence time; NCA, non-compartmental analysis; OB, olfactory bulb; OIH, opioid-induced hyperalgesia; PAG, periaqueductal gray; $T_{1/2}$, half-life; UGT, UDP-glucuronosyl-transferase; V_{dss}/F , volume of distribution at steady-state over bioavailability.

What is already known?

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

What this study adds

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

Clinical significance

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

INTRODUCTION

Pain management has become one of the most prevalent human health issues, with an increasing societal cost. Among painkillers, morphine remains the gold standard to relieve severe pain despite its numerous side effects, including nausea, opioid-induced hyperalgesia (OIH), antinociceptive tolerance, addiction and respiratory depression (Trescot, Datta, Lee & Hansen, 2008). Morphine antinociception and the development of its side effects are influenced by sex in mammals (Fullerton, Doyle & Murphy, 2018). In rodents, males show stronger antinociception than females with the same dose of morphine (Cicero, Nock, O'Connor & Meyer, 2002; Craft, 2003; Kest, Wilson & Mogil, 1999), whereas human studies have yielded more conflicting results (Cepeda &

Carr, 2003; Cepeda, Farrar, Baumgarten, Boston, Carr & Strom, 2003; Comer et al., 2010; Mogil, 2012; Sarton et al., 2000). Several mechanisms have been proposed to explain these sex differences in animal models (Fullerton, Doyle & Murphy, 2018), although human behavioural discrepancies might depend on other parameters, such as the social context, patient history and presence of comorbidities (Paller, Campbell, Edwards & Dobs, 2009).

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

Morphine metabolism involves mainly glucuronidation mediated by UDP-glucuronosyltransferase (UGT) expressed in the liver, intestines, kidneys and, to a significant extent, brain cells (Laux-Biehlmann, Mouheiche, Veriepe & Goumon, 2013). In humans, the conjugation of a glucuronide moiety by UGT2B7 on the 3-OH or 6-OH group of morphine produces two predominant metabolites: morphine-3-glucuronide (M3G, 60-70%) and morphine-6-glucuronide (M6G, 10%) (Laux-Biehlmann, Mouheiche, Veriepe & Goumon, 2013). In addition, UGT1A1, 1A3, 1A6, 1A8, 1A9, and 1A10 also account for M3G production (Stone, Mackenzie, Galetin, Houston & Miners, 2003). However, in mice, UGT2B7 is absent; therefore, no M6G is produced, while most M3G production is maintained through the action of UGT2B36 (Kurita, Miyauchi, Ikushiro, Mackenzie, Yamada & Ishii, 2017). M6G has been proposed to be an agonist at MORs, resulting in antinociception (Lotsch & Geisslinger, 2001). Conversely, M3G has

been described to antagonise morphine effects. Indeed, studies have reported strong mechanical and thermal hyperalgesia following intraperitoneal, intrathecal, or intracerebroventricular injections of M3G that could block morphine antinociception in rodents (Lewis et al., 2010; Smith, Watt & Cramond, 1990). Subsequently, many studies have suggested a role of M3G in the development of morphine-induced OIH and antinociceptive tolerance (Blomqvist et al., 2020; Due et al., 2012; Smith & Smith, 1995).

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

Taken together, numerous pieces of evidence suggest that morphine and M3G have opposing effects. Therefore, the metabolic balance between these two compounds in the periphery and the CNS might modulate morphine antinociception in acute and chronic conditions in males and females. The present article investigates the differences in such metabolic balance in the periphery and the CNS of male and female mice following acute and chronic administration of morphine.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were performed with ten weeks-old male and female C57BL/6J mice (26±4 g and 20±4 g, respectively; Charles River, L'Arbresle, France). Mice were group-housed at 5 per cage according to the sex with a 12 h light-dark cycle, at a temperature of 23°C±2°C and provided with food and water *ad libitum*. All procedures were performed following European directives (2010/63/EU) and were approved by the regional ethics committee and the French Ministry of Agriculture (license No. APAFIS# 23671-2020010713353847v5 and APAFIS#16719-2018091211572566v8 to Y.G.). The ARRIVE Guidelines has been followed for reporting experiments involving animals (Kilkenny, Browne, Cuthill, Emerson & Altman, 2010).

Experimental design

Considering the importance of sex as a biological variable, especially in pain studies (Mogil, 2020), all experiments were conducted according to a 2x2 factorial design to examine the effect of both sex and treatment, as well as their potential interaction. The number of mice used for each experiment was chosen to ensure sufficient statistical power (power of 80% and alpha of 0.05) (Charan & Kantharia, 2013). In addition, calculations were also based on a pilot study and differences already reported in the literature. All experiments were carried out in a randomised manner for each sex. The experimenter was blinded to the nature of the solutions (saline vs. morphine) used for the injections during the behavioural experiments. Due to the technical loss of several blood and lumbar spinal cord samples from male mice, the experiment in which the CNS regions were collected was duplicated only with males, and all structures were extracted. The number of samples for each structure was therefore increased in the male groups (please see the sample numbers indicated in each figure).

Behavioural assessment of morphine antinociceptive effect

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

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

Morphine half-maximal effective dose determination

Morphine half-maximal effective dose (ED₅₀) was determined in males and females using 5 doses of morphine (1 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg and 20 mg/kg). Mice were sorted by sex and randomly assigned to compose groups of 6 mice. On the day of the test, mice were weighed, tested for baseline and injected intraperitoneally (i.p.) with the right dose of morphine (w/v, Francopia, Paris, France; volume of 5 µl/g of mouse) dissolved in NaCl 0.9%. After 30 min, mice were retested to measure morphine-induced antinociceptive effect.

Induction of morphine antinociceptive tolerance

To evoke morphine antinociceptive tolerance, mice were weighed and injected i.p. with either 10 mg/kg of morphine (2 mg/ml; volume of 5 µl/g of mouse; w/v, Francopia, Paris, France) dissolved in NaCl 0.9% or with an equal volume of saline solution every morning (light phase at

10 AM) for nine consecutive days. Mice were tested before and 30 min after each injection. On day 10, all mice received an injection of 10 mg/kg of morphine before the final procedure.

Blood collection

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

Brain regions and lumbar spinal cord sampling

In a separate group of mice, on day 10, mice were euthanised by cervical dislocation 30 min following the injection of morphine, and the blood and the brain were collected. The blood was transferred to a micro-tube containing 4 µl of heparin and frozen at -20°C for later analysis. Then, the brain was placed on an ice-cold mouse brain matrix. Razor blades were used to cut the brain into 1 mm thick slices. Punchers of 1 mm and 0.5 mm diameters were used to sample the PAG and amygdala, respectively. Olfactory bulbs (OB) were extracted using forceps. For the LSC, hydraulic extrusion was performed as previously described (Richner, Jager, Siupka & Vaegter, 2017). Structures were directly transferred in micro-tubes and stored at -80°C. OB were collected because high levels of UGTs involved in morphine metabolism are present in the olfactory area (Heydel, Holsztynska, Legendre, Thiebaud, Artur & Le Bon, 2010; Ouzzine, Gulberti,

Ramalanjaona, Magdalou & Fournel-Gigleux, 2014). For each group, 20 males and 13 females were used (see *Experimental Design* section).

M3G blood-brain barrier permeability

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

Sample preparation

Blood – On the day of the analysis, blood was thawed, and 10 μ l of internal standard (IS; containing 12 pmol of D3-morphine and 10.5 pmol of D3-M3G; Sigma Aldrich) and 100 μ l of ice-cold acetonitrile (ACN; Thermo Scientific, San Jose, USA) were added. The samples were vortexed and centrifuged at 20,000 *g* for 15 min at 4°C. The supernatants were collected, dried under vacuum and suspended in 800 μ l of H₂O/0.1% formic acid (v/v; Sigma Aldrich) prior to solid-phase extraction (SPE). HyperSep PGC SPE-cartridges (1cc, 25 mg, Thermo Electron, Villebon Sur Yvette, France) were used with a positive pressure manifold (Thermo Electron). Briefly, cartridges were activated with 1 ml of ACN followed by a two-step wash with 2 ml of H₂O/0.1% formic acid (v/v). Then, samples were loaded onto the cartridges and cartridges were dried for a minute under high vacuum. They were subsequently washed with 1 ml of H₂O/0.1% formic acid (v/v) followed by 1 ml of 97.9% H₂O/2% ACN/0.1% formic acid (v/v). Elution was performed with 800 μ l of 79.9% H₂O/20% ACN/0.1% formic acid (v/v), and eluates were

centrifuged (20,000 g, 4°C for 5 min). Supernatants were dried under vacuum and resuspended in 50 µl of H₂O/0.1% formic acid (v/v) prior to LC-MS/MS analysis.

Brain regions and lumbar spinal cord – Samples were sonicated (2 x 5 s, 100 W) in 200 µl of H₂O containing 10 µl of IS (40 pmol of D3-morphine and 60 pmol of D3-M3G). After centrifugation (10 min at 10,000 g and 4°C), 10 µl of the supernatants were precipitated with 100 µl of ice-cold ACN for 30 min. Supernatants were dried under vacuum after another centrifugation (15 min at 20,000 g and 4°C) and resuspended in 20 µl of H₂O/0.1% formic acid (v/v) prior to LC-MS/MS analysis.

LC-MS/MS instrumentation and analytical conditions

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

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

Data and Statistical Analysis

Design and analysis were done in accordance with the recommendations and requirements on experimental design and analysis in pharmacology published by Curtis *et al.*, in 2018 (Curtis *et al.*, 2018).

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

Behavioural experiments

Non-linear regression with a 4-parameters logistic equation was used to define the ED_{50} of morphine and the 95% confidence intervals (CI95%) in both males and females. The two fits were compared using a nested-model comparison with the extra sum-of-squares F-test. The same analysis was applied to the data of each mouse of the tolerance experiment to extract the following parameters: the average day at which half of the MPE is left and the Hill slope coefficient. Then, the mean of each parameter was compared using an unpaired t-test with Welch's correction.

Non-compartmental analysis

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

Brain/Blood ratios

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

RESULTS

Morphine antinociceptive effect and tolerance in males and females

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

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

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

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

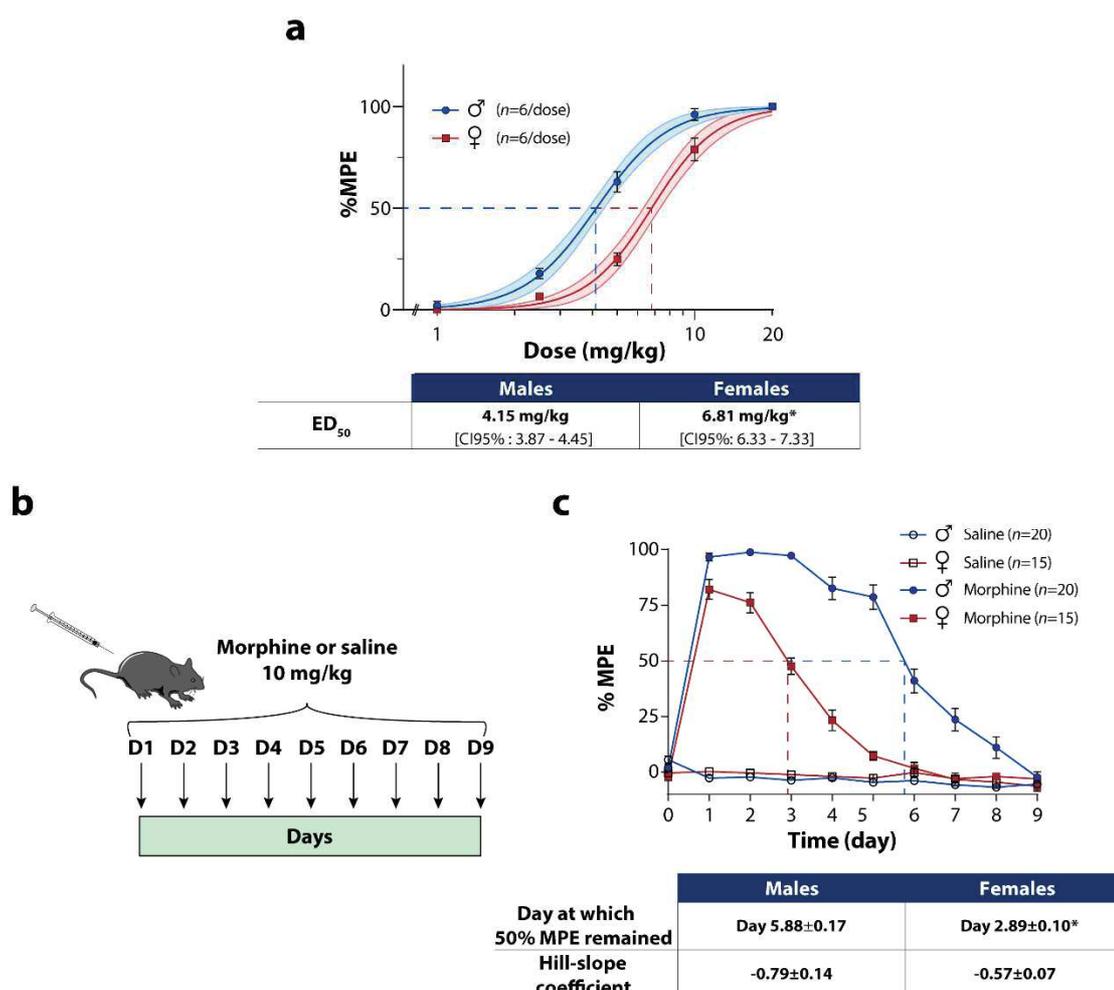


Figure 1- Antinociceptive effect of morphine and development of morphine antinociceptive tolerance in male and female mice. (a) Dose-response curves for morphine antinociceptive effect in male and female mice. Antinociception is expressed as % of maximum possible effect (%MPE). 95% confidence intervals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

Peripheral morphine metabolism

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

To assess sex differences in morphine metabolism, morphine and M3G kinetics and their metabolic ratios over time are depicted in **Figure 2b, c and d**, respectively, for control mice. Data

obtained for tolerant mice are presented in **Figure 2e, f and g**, respectively. The associated results obtained from the NCA are represented in **Table 1** and as histograms in **Figure S1**.

	Morphine			
	CT males	CT females	Tolerant males	Tolerant females
C_{max} (nmol/ml)^{§, £}	2.93 ± 0.28 (n=9)	4.24 ± 0.25^a (n=9)	3.22 ± 0.42 (n=9)	2.63 ± 0.16^d (n=10)
AUC_{0-inf} (nmol.min/ml)^{§, £}	120.12 ± 8.7 (n=8)	146.99 ± 7.7 (n=9)	116.41 ± 14.9 (n=9)	86.66 ± 52.7^d (n=10)
AUMC_{0-inf} c (µmol.min²/ml)^{#, §, £}	5.76 ± 0.37 (n=8)	6.14 ± 0.36 (n=9)	5.80 ± 0.57 (n=9)	3.37 ± 0.24^{b, d} (n=10)
MRT (min)[#]	49.10 ± 3.46 (n=8)	41.72 ± 1.09 (n=9)	52.21 ± 4.63 (n=9)	39.06 ± 2.12^b (n=10)
T_{1/2} (min)[#]	34.03 ± 2.40 (n=8)	28.91 ± 0.75 (n=9)	36.19 ± 3.21 (n=9)	27.07 ± 1.47^b (n=10)
Cl/F (L/h/kg)^{§, £}	18.31 ± 1.62 (n=8)	14.68 ± 0.91 (n=9)	20.25 ± 2.27 (n=9)	25.16 ± 1.67^d (n=10)
Vdss/F (L/kg)[§]	15.51 ± 2.61 (n=8)	10.18 ± 0.61 (n=9)	18.16 ± 2.74 (n=9)	16.44 ± 1.46 (n=10)
	M3G			
	CT males	CT females	Tolerant males	Tolerant females
C_{max} (nmol/ml)[#]	11.38 ± 0.85 (n=9)	16.35 ± 0.39^a (n=9)	11.52 ± 0.72 (n=9)	14.21 ± 0.57^b (n=10)
AUC_{0-inf} (nmol.min/ml)[#]	624.4 ± 50.3 (n=9)	959.7 ± 42.9^a (n=9)	659.1 ± 85.8 (n=9)	805.8 ± 32.2 (n=9)
AUMC_{0-inf} (µmol.min²/ml)	33.62 ± 4.1 (n=9)	47.22 ± 3.2 (n=9)	39.14 ± 12.0 (n=9)	44.90 ± 5.4 (n=9)
MRT (min)	53.12 ± 3.6 (n=9)	48.85 ± 1.4 (n=9)	53.22 ± 6.3 (n=9)	54.88 ± 4.8 (n=9)

Table 1- Pharmacokinetic parameters obtained from the NCA for morphine and M3G in the blood of male and female control and tolerant mice following an injection of 10 mg/kg of morphine at day 10. Data are expressed as mean ± SEM, *n* are indicated in the table. Two-way ANOVA was applied and followed by Tukey's multiple comparisons test only if F was significant and there was no variance homogeneity. Morphine volume of distribution at steady-state was analysed with the non-parametric approach ART ANOVA. Sex: #, *P*<0.05. Treatment: §, *P*<0.05. Interaction: £, *P*<0.05. Control males vs control females: a, *P*<0.05. Tolerant males vs tolerant females: b. Control females vs tolerant females: d, *P*<0.05.

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

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

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

Finally, significantly higher morphine clearance and volume of distribution were observed in tolerant mice compared to control mice, suggesting that chronic morphine treatment might

induce adaptations in metabolism and/or transporter expression (**Table 1**). There was no effect of treatment on any M3G parameters.

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

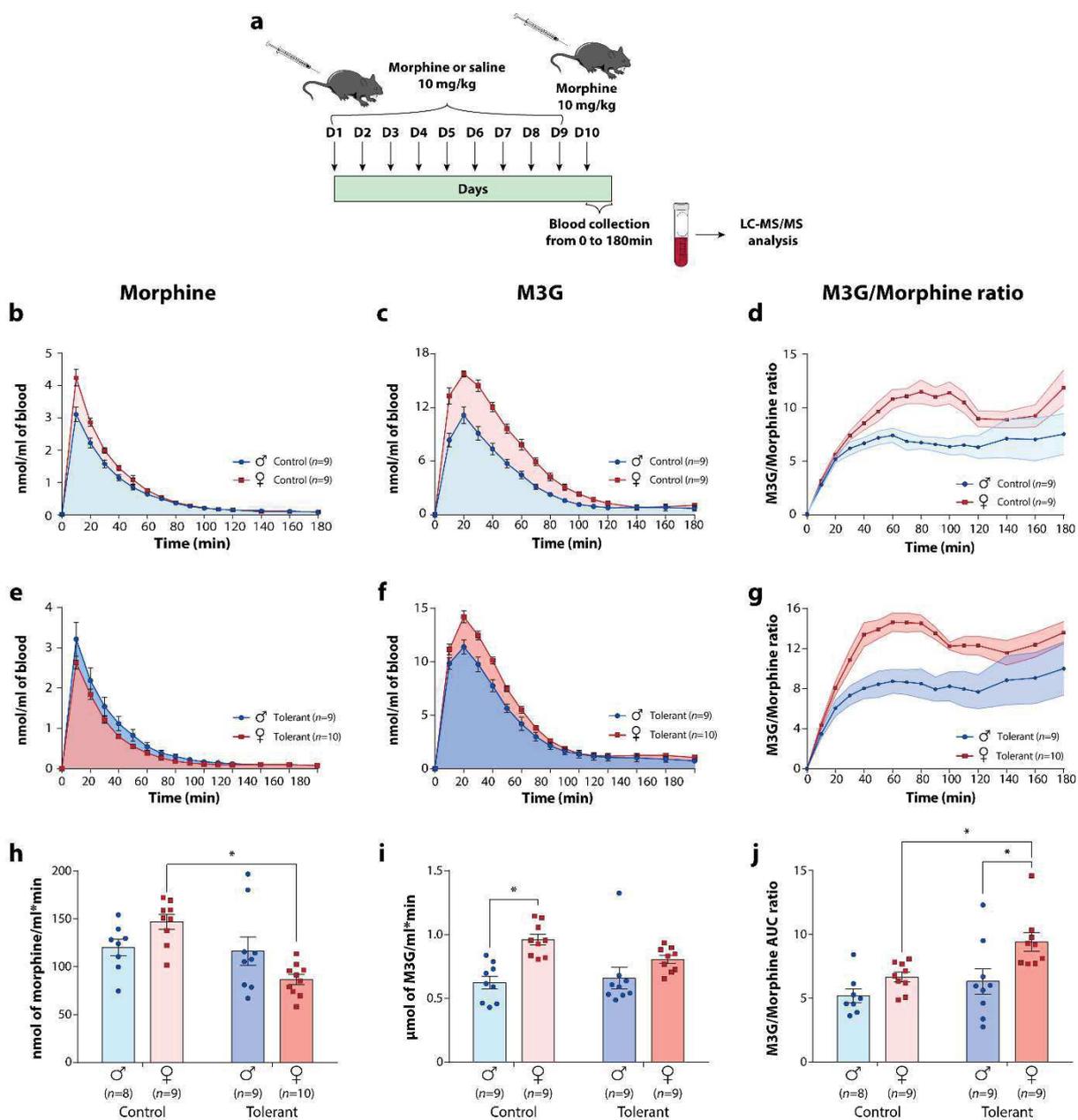


Figure 2- Morphine and M3G kinetics in the blood. (a) Protocol of induction of morphine antinociceptive tolerance across days 1 to 10 (D1-D10, 10 mg/kg morphine or saline i.p.). At day 10, blood was collected at the tail vein at different time points during 180 min. (b) Blood levels of morphine in control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

Quantification of morphine and M3G in CNS regions

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

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

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

Table 2- Levels of morphine and M3G found in the amygdala, the PAG, the LSC and the OB of male and female control and tolerant mice 30 min after an injection of 10 mg/kg of morphine at day 10. Data are expressed as mean ± SEM. *n* are indicated in the table. Two-way ANOVA was applied and followed by Tukey's multiple comparisons test only if *F* was significant and there was no variance homogeneity. Morphine and M3G in the OB were analysed with the non-parametric approach ART ANOVA. Sex: #, *P*<0.05. Treatment: \$, *P*<0.05. Control males vs control females: a, *P*<0.05. Tolerant males vs tolerant females: b, *P*<0.05. Control males vs tolerant males: c, *P*<0.05. Control females vs tolerant females: d, *P*<0.05.

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

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

LSC – Morphine and M3G concentrations were higher in the female LSC than in the male LSC (**Table 2**). However, no sex difference was observed in the metabolic ratio in the LSC (**Figure 3d**). In addition, no significant difference was found in the LSC between control and tolerant mice.

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

Taken together, these results indicate sex differences in morphine and M3G levels, as well as in their metabolic ratio, in pain-related brain regions 30 min after the injection of morphine. However, the induction of morphine tolerance did not modify the metabolic ratio. These results

suggest a limited effect of tolerance on the balance between morphine and M3G in the analysed regions. Furthermore, sex was not implicated in the differences between control and tolerant mice, as witnessed by the absence of any interactions between the two factors.

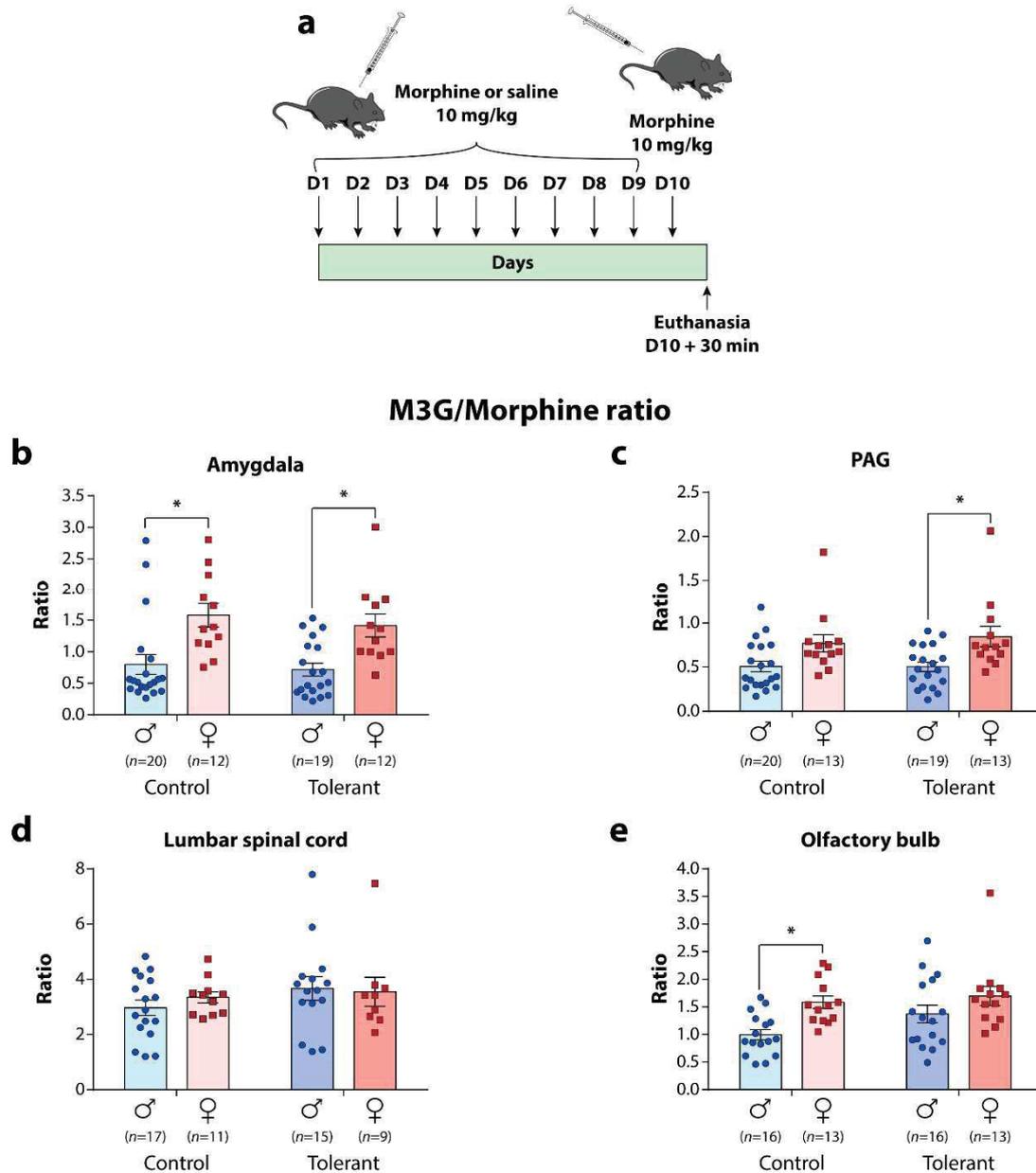


Figure 3- Levels of morphine and M3G in the different brain areas and LSC of male and female control and tolerant mice. (a) Protocol of induction of morphine antinociceptive tolerance across days 1 to 10 (D1-D10, 10 mg/kg of morphine or saline i.p.). At day 10, brain areas and lumbar spinal cord were collected 30 min after the injection of morphine and, morphine and M3G were quantified by LC-MS/MS. M3G/morphine ratios found in (b) the

amygdala, (c) PAG, (d) LSC and (e) OB. Data are expressed as means \pm SEM, *n* are indicated in the figure. Two-way ANOVA was applied and followed by Tukey's multiple comparisons test only if *F* was significant and there was no variance homogeneity. The M3G/Morphine ratio in the amygdala and morphine and M3G in the OB were analysed with the non-parametric approach ART ANOVA. Tukey's multiple comparisons results are reported as *, $P < 0.05$. Males are represented as blue circle dots and females as red square dots.

Morphine and M3G brain/blood ratios

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

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

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

PAG – Moreover, significantly higher morphine (**Figure 4d**) and M3G (**Figure 4e**) brain/blood ratios were observed in the PAG of males compared to females. Unexpectedly, tolerant mice also tended to show higher morphine brain/blood ratios than control mice. However, this effect did not

reach statistical significance (**Figure 4d**). In addition, no effect of chronic morphine treatment was observed on the M3G brain/blood ratios in the PAG (**Figure 4e**).

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

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

Overall, the M3G brain/blood ratios were 10-fold lower than those for morphine, suggesting that M3G is less BBB permeant than morphine, as already reported in the literature (Bickel, Schumacher, Kang & Voigt, 1996; Xie, Hammarlund-Udenaes, de Boer & de Lange, 1999).

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

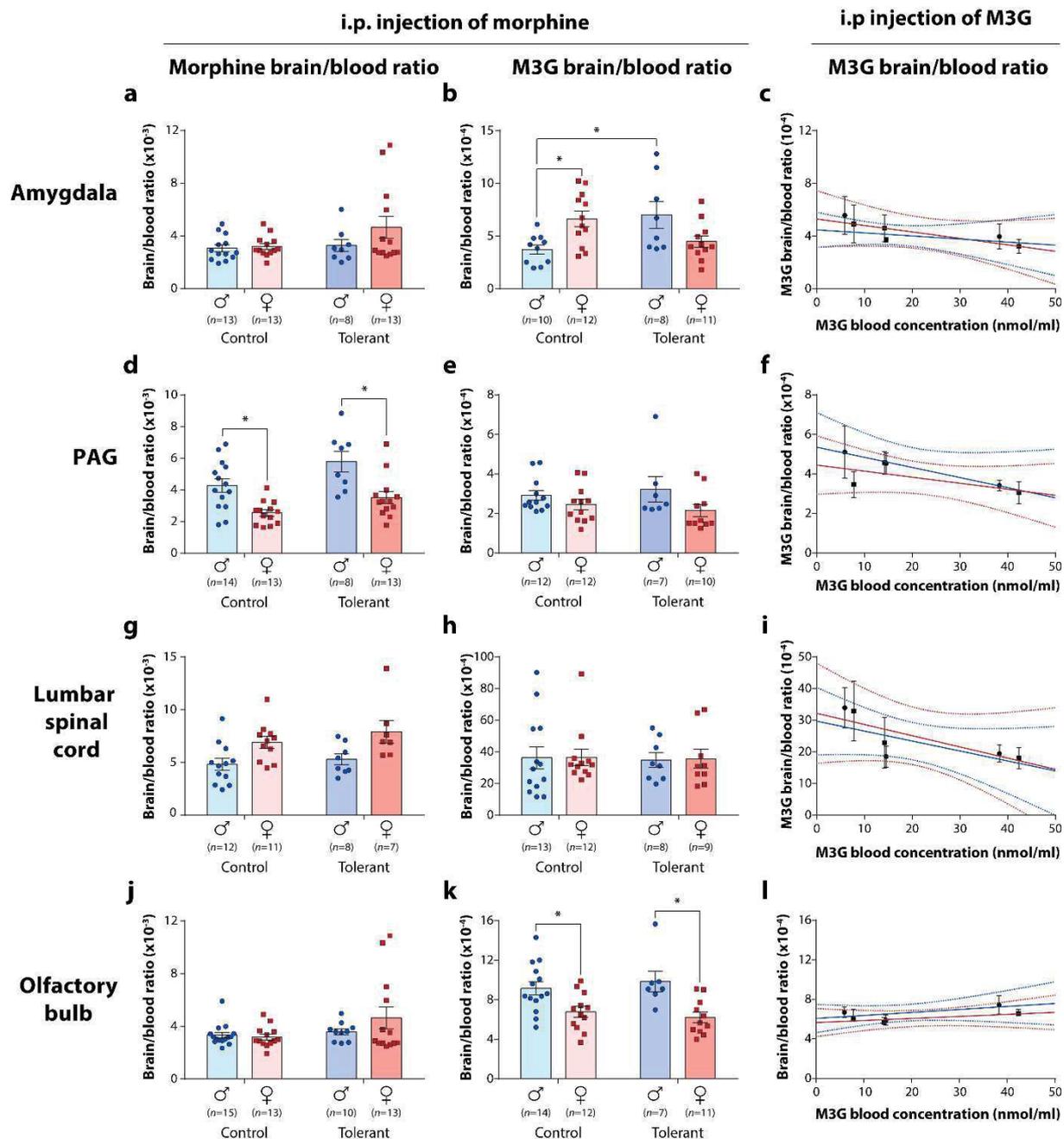


Figure 4- Brain/blood ratio of morphine and M3G in the different brain areas and lumbar spinal cord of male and female control and tolerant mice. Brain/blood ratio of (a) morphine and (b) M3G in the amygdala following an i.p injection of morphine. (c) M3G brain/blood ratio obtained in the amygdala as a function of M3G blood concentration after i.p. injections of increasing concentrations of M3G. $n = 4$ for the injection of 10mg/kg of M3G in males and females, $n = 5$ for the other conditions. Brain/blood ratio of (d) morphine and (e) M3G in the PAG following an i.p injection of morphine. (f) M3G brain/blood ratio obtained

in the PAG as a function of M3G blood concentration after i.p. injections of increasing concentrations of M3G. $n = 3$ for the injection of 10mg/kg of M3G in females, $n = 5$ for the other conditions. Brain/blood ratio of (g) morphine and (h) M3G in the LSC following an i.p injection of morphine. (i) M3G brain/blood ratio obtained in the LSC as a function of M3G blood concentration after i.p. injections of increasing concentrations of M3G. $n = 4$ for the injection of 10mg/kg of M3G in males, $n = 5$ for the other conditions. Brain/blood ratio of (j) morphine and (k) M3G in the OB following an i.p injection of morphine. (l) M3G brain/blood ratio obtained in the OB as a function of M3G blood concentration after i.p. injections of increasing concentrations of M3G. $n = 4$ for the injection of 40mg/kg of M3G in males, $n = 5$ for the other conditions. The blue and red lines represent linear curve fitting of the BBB permeability for M3G in males and females, respectively. 95% Confidence intervals are represented as dotted-line with the appropriate color. Data are expressed as means \pm SEM, n are indicated in the figure. Two-way ANOVA was applied and followed by Tukey's multiple comparisons test only if F was significant and there was no variance homogeneity. The morphine and M3G brain/blood ratio in the PAG and the M3G brain/blood ratio in the LSC were analysed with the non-parametric approach ART ANOVA. Tukey's multiple comparisons results are reported as *, $P < 0.05$. Males are represented as circle dots and females as square dots.

M3G BBB permeability in males and females

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

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

Central metabolism of morphine

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

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

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

DISCUSSION

Sex differences in morphine antinociceptive effects

The sex differences in morphine antinociceptive effects observed in our experiment were consistent with the ED50 values reported in the literature (Cicero, Nock & Meyer, 1997; Craft, Stratmann, Bartok, Walpole & King, 1999; Doyle & Murphy, 2018). Most of the studies using rodents have shown that morphine elicits weaker antinociception in females, but the origin of this sex disparity remains controversial.

Indeed, sex differences have been observed in key pharmacodynamic processes involved in morphine antinociception. For instance, differential expression of MORs in the PAG has been shown to be essential to elicit sex differences in morphine antinociception (Loyd, Wang & Murphy, 2008). Sex differences in morphine splicing and trafficking have also been observed (Enman, Reyes, Shi, Valentino & Van Bockstaele, 2019; Liu et al., 2018). On the other hand, no or only minor sex differences have been observed in morphine binding affinity and MOR-mediated G protein activation (Kepler, Standifer, Paul, Kest, Pasternak & Bodnar, 1991; Peckham, Barkley, Divin, Cicero & Traynor, 2005; Selley, Herbert, Morgan, Cook, Picker & Sim-Selley, 2003). Concomitantly, other mechanisms have also been proposed, including organisational and activational differences (Cicero, Nock, O'Connor & Meyer, 2002), functional differences in the recruited pain circuit (Loyd & Murphy, 2014), dimorphism in glial cell activation (Doyle, Eidson, Sinkiewicz & Murphy, 2017), and a potential role for drug metabolism (Soldin & Mattison, 2009).

Influence of sex on peripheral metabolism of morphine

The morphine and M3G concentrations found in the blood of control mice were consistent with the higher potency of morphine observed in male C57BL/6J mice (Kest, Wilson & Mogil, 1999). Female mice showed higher morphine metabolism, as witnessed by the 2-fold higher M3G/morphine ratio observed at several time points. These results were consistent with the

differences observed after intravenous (i.v.) injection (South, Edwards & Smith, 2009). Interestingly, no difference in morphine glucuronidation by hepatic microsomes was observed between male and female rats (Rush, Newton & Hook, 1983). In addition, sex differences have previously been shown in the distribution of glucuronide metabolites (Bond, Medinsky, Dent & Rickert, 1981). Taken together, it is possible that the distribution in the body and excretion of morphine and M3G differ between males and females, leading to higher concentrations of M3G in the blood of female mice. Nevertheless, experiments performed mainly in rats have shown that differences in the M3G/morphine plasma ratio might play a role in the sex differences observed in morphine antinociception (Baker & Ratka, 2002; Craft, 2003).

Although sex differences in mouse hepatic metabolism of morphine were observed in our experiment, Sarton *et al.* in 2000 did not observe any sex differences in morphine, M3G and M6G levels in the plasma of healthy volunteers (Sarton *et al.*, 2000). In addition, it is unlikely that sex differences in morphine BBB permeability or hepatic metabolism might fully explain the differences observed in morphine antinociception, considering that sex differences in response to morphine were observed following direct i.c.v. injections (Kest, Wilson & Mogil, 1999).

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

Sex differences in morphine antinociception might rely on the central metabolism of morphine. Indeed, *in vitro* studies have shown the capability of brain homogenates and glial cells to metabolise morphine into M3G in both mice and humans (Weinsanto *et al.*, 2018; Yamada *et al.*, 2003). In addition, even though M3G displays low BBB permeability (Bickel, Schumacher, Kang & Voigt, 1996), we showed here that higher levels of M3G were present in several CNS regions following peripheral injection of morphine compared with after peripheral injection of M3G, consistent with the data reported for the brains of guinea pigs (Murphey & Olsen, 1994).

Consequently, our results suggest that morphine metabolism occurs in some areas of the CNS *in vivo*. Interestingly, the M3G brain/blood ratios were higher in females than in males, at least in the amygdala, although no sex difference in M3G BBB permeability was observed. Furthermore, even though the M3G brain/blood ratios observed in the PAG after the injection of morphine were unexpectedly lower than those reported following the injection of M3G, it should be noted that the M3G half-life reported after the injection of M3G is approximately 30 min (Handal, Grung, Skurtveit, Ripel & Morland, 2002). In contrast, we reported an MRT for M3G between 45 min and 55 min following morphine injection. Therefore, the total amount of M3G present in the blood before quantification in the CNS regions is likely much higher after administration of M3G than after administration of morphine. As we showed that the BBB permeability of M3G increases proportionally with its blood concentration, the central metabolism of morphine is probably underestimated in our experiment.

In agreement with these statements, the lower morphine levels found in the PAG and amygdala of female mice are consistent with their lower response to morphine in light of the role of these structures in morphine-induced antinociception (Jensen & Yaksh, 1986; McGaraughty & Heinricher, 2002). Moreover, several studies have described the neuroexcitatory and pronociceptive effects of M3G following intrathecal and intracerebroventricular injections (Bartlett, Cramond & Smith, 1994; Lewis et al., 2010). Alternatively, Peckmann *et al.* in 2006 reported a higher ED₅₀ in female rats than in males for several opiates that produce 3-glucuronide metabolites (Peckham & Traynor, 2006). Hence, M3G and other 3-glucuronide metabolites might act as excitatory signals, and M3G levels found in the CNS might modulate morphine antinociception in mice. However, conflicting results have been reported suggesting no pronociceptive effects of M3G (Penson, Joel, Bakhshi, Clark, Langford & Slevin, 2000; Swartjes et al., 2012).

Finally, the M3G/morphine ratios were remarkably higher in the PAG and amygdala of female mice compared to male mice. It is worth noting that there were surprisingly no differences in the M3G/morphine ratios in the LSC. Importantly, the antinociceptive effect of morphine following s.c. injection in male rats has been correlated with the M3G/morphine ratio found in the cortical extracellular fluid in a microdialysis study (Barjavel, Scherrmann & Bhargava, 1995).

Taken together, our results indicate that the metabolism of morphine occurs in the CNS *in vivo* and is differentially influenced by sex in C57BL/6J mice. This results in the modulation of morphine and M3G levels in some pain-related CNS regions. Therefore, central morphine metabolism might modulate morphine antinociception. Future studies will investigate to what extent sex differences in the central metabolism of morphine contribute to the behavioural contrast observed in morphine antinociception.

Sex differences in antinociceptive tolerance to morphine

We observed significant sex differences in the development of antinociceptive tolerance to morphine. However, the rate at which the tolerance developed remained the same between males and females, as witnessed by the absence of differences in the Hill slope coefficients. These results suggest that, in our paradigm, the sex disparities observed in the development of morphine tolerance are due to sex differences in the initial morphine effectiveness rather than to sex-specific mechanisms involved in the development of tolerance. Such findings are corroborated by a study in which differences in acute morphine potency were controlled (Barrett, Cook, Turner, Craft & Picker, 2001). Nonetheless, sexual dimorphism in antinociceptive tolerance has been previously documented, although strong discrepancies exist in the literature (Craft, Stratmann, Bartok, Walpole & King, 1999; Kest, Sarton & Dahan, 2000). Importantly, in our experiment, sex differences in the Hill-slope coefficient might have been hidden as male mice reached the cut-off

of the TIT for at least the first three days of the tolerance protocol. Indeed, if males were allowed to reach higher latencies, the Hill-slope coefficient could change.

Peripheral metabolism during antinociceptive tolerance to morphine

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

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

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

The quantification in the blood was consistent with the decreased levels of morphine observed in the amygdala and OB. However, morphine was still present and should have continued to produce an antinociceptive effect. Furthermore, M3G levels remained unchanged or even decreased in the region tested, eliminating a potential increase in its pronociceptive effect due to

higher concentrations in the CNS. Finally, the M3G/morphine ratio in the analysed CNS regions did not differ between control and tolerant mice, excluding a potential role for central metabolism in morphine tolerance.

In contrast to these pharmacokinetic findings, pharmacodynamic processes have been shown to be involved in morphine tolerance. For instance, enhanced MOR desensitisation has been observed in the PAG and locus coeruleus after chronic administration of morphine (Dang & Williams, 2004; Ingram, Macey, Fossum & Morgan, 2008). In addition, impaired recovery from desensitisation has also been observed after chronic morphine exposure and was absent in β -arrestin-2 knockout animals (Connor, Bagley, Chieng & Christie, 2015; Quillinan, Lau, Virk, von Zastrow & Williams, 2011), in agreement with behavioural studies suggesting the involvement of the GRK-arrestin system in the tolerance phenomenon (Bohn, Gainetdinov, Lin, Lefkowitz & Caron, 2000; Bohn, Lefkowitz & Caron, 2002). To what extent these mechanisms are involved in the sex differences observed in the antinociceptive tolerance to morphine remains to be investigated.

CONCLUSION

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

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

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

REFERENCES

- Aloisi AM, Ceccarelli I, Fiorenzani P, Maddalena M, Rossi A, Tomei V, *et al.* (2010). Aromatase and 5-alpha reductase gene expression: modulation by pain and morphine treatment in male rats. *Mol Pain* 6: 69.
- Bai L, Zhai C, Han K, Li Z, Qian J, Jing Y, *et al.* (2014). Toll-like receptor 4-mediated nuclear factor-kappaB activation in spinal cord contributes to chronic morphine-induced analgesic tolerance and hyperalgesia in rats. *Neurosci Bull* 30: 936-948.
- Baker L, & Ratka A (2002). Sex-specific differences in levels of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine antinociception in rats. *Pain* 95: 65-74.
- Barjavel MJ, Scherrmann JM, & Bhargava HN (1995). Relationship between morphine analgesia and cortical extracellular fluid levels of morphine and its metabolites in the rat: a microdialysis study. *Br J Pharmacol* 116: 3205-3210.
- Barrett AC, Cook CD, Turner JM, Craft RM, & Picker MJ (2001). Importance of sex and relative efficacy at the mu opioid receptor in the development of tolerance and cross-tolerance to the antinociceptive effects of opioids. *Psychopharmacology (Berl)* 158: 154-164.
- Bartlett SE, Cramond T, & Smith MT (1994). The excitatory effects of morphine-3-glucuronide are attenuated by LY274614, a competitive NMDA receptor antagonist, and by midazolam, an agonist at the benzodiazepine site on the GABAA receptor complex. *Life Sci* 54: 687-694.

Bickel U, Schumacher OP, Kang YS, & Voigt K (1996). Poor permeability of morphine 3-glucuronide and morphine 6-glucuronide through the blood-brain barrier in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 107-113.

Blomqvist KJ, Viisanen H, Ahlstrom FHG, Jokinen V, Sidorova YA, Suleymanova I, *et al.* (2020). Morphine-3-glucuronide causes antinociceptive cross-tolerance to morphine and increases spinal substance P expression. *Eur J Pharmacol* 875: 173021.

Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ, & Caron MG (2000). Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 408: 720-723.

Bohn LM, Lefkowitz RJ, & Caron MG (2002). Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in (beta)arrestin-2 knock-out mice. *J Neurosci* 22: 10494-10500.

Bond JA, Medinsky MA, Dent JG, & Rickert DE (1981). Sex-dependent metabolism and biliary excretion of [2,4-¹⁴C] dinitrotoluene in isolated perfused rat livers. *J Pharmacol Exp Ther* 219: 598-603.

Cepeda MS, & Carr DB (2003). Women experience more pain and require more morphine than men to achieve a similar degree of analgesia. *Anesth Analg* 97: 1464-1468.

Cepeda MS, Farrar JT, Baumgarten M, Boston R, Carr DB, & Strom BL (2003). Side effects of opioids during short-term administration: effect of age, gender, and race. *Clin Pharmacol Ther* 74: 102-112.

Charan J, & Kantharia ND (2013). How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother* 4: 303-306.

Cicero TJ, Nock B, & Meyer ER (1997). Sex-related differences in morphine's antinociceptive activity: relationship to serum and brain morphine concentrations. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 939-944.

Cicero TJ, Nock B, O'Connor L, & Meyer ER (2002). Role of steroids in sex differences in morphine-induced analgesia: activational and organizational effects. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 695-701.

Comer SD, Cooper ZD, Kowalczyk WJ, Sullivan MA, Evans SM, Bisaga AM, *et al.* (2010). Evaluation of potential sex differences in the subjective and analgesic effects of morphine in normal, healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 208: 45-55.

Connor M, Bagley EE, Chieng BC, & Christie MJ (2015). beta-Arrestin-2 knockout prevents development of cellular mu-opioid receptor tolerance but does not affect opioid-withdrawal-related adaptations in single PAG neurons. *Br J Pharmacol* 172: 492-500.

Craft RM (2003). Sex differences in opioid analgesia: "from mouse to man". *Clin J Pain* 19: 175-186.

Craft RM, Stratmann JA, Bartok RE, Walpole TI, & King SJ (1999). Sex differences in development of morphine tolerance and dependence in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 143: 1-7.

Curtis MJ, Alexander S, Cirino G, Docherty JR, George CH, Gjembycz MA, *et al.* (2018). Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *Br J Pharmacol* 175: 987-993.

Dang VC, & Williams JT (2004). Chronic morphine treatment reduces recovery from opioid desensitization. *J Neurosci* 24: 7699-7706.

Doyle HH, Eidson LN, Sinkiewicz DM, & Murphy AZ (2017). Sex Differences in Microglia Activity within the Periaqueductal Gray of the Rat: A Potential Mechanism Driving the Dimorphic Effects of Morphine. *J Neurosci* 37: 3202-3214.

Doyle HH, & Murphy AZ (2018). Sex-dependent influences of morphine and its metabolites on pain sensitivity in the rat. *Physiol Behav* 187: 32-41.

Due MR, Piekarz AD, Wilson N, Feldman P, Ripsch MS, Chavez S, *et al.* (2012). Neuroexcitatory effects of morphine-3-glucuronide are dependent on Toll-like receptor 4 signaling. *J Neuroinflammation* 9: 200.

Eidson LN, Inoue K, Young LJ, Tansey MG, & Murphy AZ (2017). Toll-like Receptor 4 Mediates Morphine-Induced Neuroinflammation and Tolerance via Soluble Tumor Necrosis Factor Signaling. *Neuropsychopharmacology* 42: 661-670.

Enman NM, Reyes BAS, Shi Y, Valentino RJ, & Van Bockstaele EJ (2019). Sex differences in morphine-induced trafficking of mu-opioid and corticotropin-releasing factor receptors in locus coeruleus neurons. *Brain Res* 1706: 75-85.

Fields H (2004). State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 5: 565-575.

Fullerton EF, Doyle HH, & Murphy AZ (2018). Impact of sex on pain and opioid analgesia: a review. *Curr Opin Behav Sci* 23: 183-190.

Glaum SR, Miller RJ, & Hammond DL (1994). Inhibitory actions of delta 1-, delta 2-, and mu-opioid receptor agonists on excitatory transmission in lamina II neurons of adult rat spinal cord. *J Neurosci* 14: 4965-4971.

Handal M, Grung M, Skurtveit S, Ripel A, & Morland J (2002). Pharmacokinetic differences of morphine and morphine-glucuronides are reflected in locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav* 73: 883-892.

Heydel JM, Holsztynska EJ, Legendre A, Thiebaud N, Artur Y, & Le Bon AM (2010). UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in neuro-olfactory tissues: expression, regulation, and function. *Drug Metab Rev* 42: 74-97.

Ho YS, Liu RH, Nichols AW, & Kumar SD (1990). Isotopic Analog as the Internal Standard for Quantitative-Determination - Evaluation of Mass-Spectra of Commonly Abused Drugs and Their Deuterated Analogs. *Journal of Forensic Sciences* 35: 123-132.

Ingram SL, Macey TA, Fossum EN, & Morgan MM (2008). Tolerance to repeated morphine administration is associated with increased potency of opioid agonists. *Neuropsychopharmacology* 33: 2494-2504.

Jensen TS, & Yaksh TL (1986). Comparison of antinociceptive action of morphine in the periaqueductal gray, medial and paramedial medulla in rat. *Brain Res* 363: 99-113.

Kepler KL, Standifer KM, Paul D, Kest B, Pasternak GW, & Bodnar RJ (1991). Gender effects and central opioid analgesia. *Pain* 45: 87-94.

Kest B, Sarton E, & Dahan A (2000). Gender differences in opioid-mediated analgesia: animal and human studies. *Anesthesiology* 93: 539-547.

Kest B, Wilson SG, & Mogil JS (1999). Sex differences in supraspinal morphine analgesia are dependent on genotype. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 1370-1375.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, & Altman DG (2010). Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother* 1: 94-99.

Kurita A, Miyauchi Y, Ikushiro S, Mackenzie PI, Yamada H, & Ishii Y (2017). Comprehensive Characterization of Mouse UDP-Glucuronosyltransferase (Ugt) Belonging to the Ugt2b Subfamily: Identification of Ugt2b36 as the Predominant Isoform Involved in Morphine Glucuronidation. *J Pharmacol Exp Ther* 361: 199-208.

Laux-Biehlmann A, Mouheiche J, Veriepe J, & Goumon Y (2013). Endogenous morphine and its metabolites in mammals: history, synthesis, localization and perspectives. *Neuroscience* 233: 95-117.

Lewis SS, Hutchinson MR, Rezvani N, Loram LC, Zhang Y, Maier SF, *et al.* (2010). Evidence that intrathecal morphine-3-glucuronide may cause pain enhancement via toll-like receptor 4/MD-2 and interleukin-1beta. *Neuroscience* 165: 569-583.

Liu A, Zhang H, Qin F, Wang Q, Sun Q, Xie S, *et al.* (2018). Sex Associated Differential Expressions of the Alternatively Spliced Variants mRNA of OPRM1 in Brain Regions of C57BL/6 Mouse. *Cell Physiol Biochem* 50: 1441-1459.

Lotsch J, & Geisslinger G (2001). Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clin Pharmacokinet* 40: 485-499.

Loyd DR, & Murphy AZ (2014). The neuroanatomy of sexual dimorphism in opioid analgesia. *Exp Neurol* 259: 57-63.

Loyd DR, Wang X, & Murphy AZ (2008). Sex differences in micro-opioid receptor expression in the rat midbrain periaqueductal gray are essential for eliciting sex differences in morphine analgesia. *J Neurosci* 28: 14007-14017.

Mattioli TA, Leduc-Pessah H, Skelhorne-Gross G, Nicol CJ, Milne B, Trang T, *et al.* (2014). Toll-like receptor 4 mutant and null mice retain morphine-induced tolerance, hyperalgesia, and physical dependence. *PLoS One* 9: e97361.

McGaraughty S, & Heinricher MM (2002). Microinjection of morphine into various amygdaloid nuclei differentially affects nociceptive responsiveness and RVM neuronal activity. *Pain* 96: 153-162.

Mogil JS (2012). Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nat Rev Neurosci* 13: 859-866.

Mogil JS (2020). Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nat Rev Neurosci* 21: 353-365.

Murphey LJ, & Olsen GD (1994). Diffusion of morphine-6-beta-D-glucuronide into the neonatal guinea pig brain during drug-induced respiratory depression. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 118-124.

Ouzzine M, Gulberti S, Ramalanjaona N, Magdalou J, & Fournel-Gigleux S (2014). The UDP-glucuronosyltransferases of the blood-brain barrier: their role in drug metabolism and detoxication. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8.

Paller CJ, Campbell CM, Edwards RR, & Dobs AS (2009). Sex-based differences in pain perception and treatment. *Pain Med* 10: 289-299.

Peckham EM, Barkley LM, Divin MF, Cicero TJ, & Traynor JR (2005). Comparison of the antinociceptive effect of acute morphine in female and male Sprague-Dawley rats using the long-lasting mu-antagonist methocinnamox. *Brain Res* 1058: 137-147.

Peckham EM, & Traynor JR (2006). Comparison of the antinociceptive response to morphine and morphine-like compounds in male and female Sprague-Dawley rats. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 1195-1201.

Penson RT, Joel SP, Bakhshi K, Clark SJ, Langford RM, & Slevin ML (2000). Randomized placebo-controlled trial of the activity of the morphine glucuronides. *Clin Pharmacol Ther* 68: 667-676.

Quillinan N, Lau EK, Virk M, von Zastrow M, & Williams JT (2011). Recovery from mu-opioid receptor desensitization after chronic treatment with morphine and methadone. *J Neurosci* 31: 4434-4443.

Richner M, Jager SB, Siupka P, & Vaegter CB (2017). Hydraulic Extrusion of the Spinal Cord and Isolation of Dorsal Root Ganglia in Rodents. *J Vis Exp*.

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

Rush GF, Newton JF, & Hook JB (1983). Sex differences in the excretion of glucuronide conjugates: the role of intrarenal glucuronidation. *J Pharmacol Exp Ther* 227: 658-662.

Sarton E, Olofsen E, Romberg R, den Hartigh J, Kest B, Nieuwenhuijs D, *et al.* (2000). Sex differences in morphine analgesia: an experimental study in healthy volunteers. *Anesthesiology* 93: 1245-1254; discussion 1246A.

Selley DE, Herbert JT, Morgan D, Cook CD, Picker MJ, & Sim-Selley LJ (2003). Effect of strain and sex on mu opioid receptor-mediated G-protein activation in rat brain. *Brain Res Bull* 60: 201-208.

Smith GD, & Smith MT (1995). Morphine-3-glucuronide: evidence to support its putative role in the development of tolerance to the antinociceptive effects of morphine in the rat. *Pain* 62: 51-60.

Smith MT, Watt JA, & Cramond T (1990). Morphine-3-glucuronide--a potent antagonist of morphine analgesia. *Life Sci* 47: 579-585.

Soldin OP, & Mattison DR (2009). Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet* 48: 143-157.

South SM, Edwards SR, & Smith MT (2009). Antinociception versus serum concentration relationships following acute administration of intravenous morphine in male and female Sprague-Dawley rats: differences between the tail flick and hot plate nociceptive tests. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36: 20-28.

Stone AN, Mackenzie PI, Galetin A, Houston JB, & Miners JO (2003). Isoform selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human udp-glucuronosyltransferases: evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7. *Drug Metab Dispos* 31: 1086-1089.

Swartjes M, Mooren RAG, Waxman AR, Arout C, van de Wetering K, den Hartigh J, *et al.* (2012). Morphine Induces Hyperalgesia without Involvement of mu-Opioid Receptor or Morphine-3-glucuronide. *Molecular Medicine* 18: 1320-1326.

Trescot AM, Datta S, Lee M, & Hansen H (2008). Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11: S133-153.

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

Williams JT, Ingram SL, Henderson G, Chavkin C, von Zastrow M, Schulz S, *et al.* (2013). Regulation of mu-opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol Rev* 65: 223-254.

Wobbrock JO, Findlater L, Gergle D, & Higgins JJ (2011). The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only anova procedures. *Proceedings of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems*: 143–146.

Xie R, Hammarlund-Udenaes M, de Boer AG, & de Lange EC (1999). The role of P-glycoprotein in blood-brain barrier transport of morphine: transcortical microdialysis studies in *mdr1a (-/-)* and *mdr1a (+/+)* mice. *Br J Pharmacol* 128: 563-568.

Yamada H, Ishii K, Ishii Y, Ieiri I, Nishio S, Morioka T, *et al.* (2003). Formation of highly analgesic morphine-6-glucuronide following physiologic concentration of morphine in human brain. *J Toxicol Sci* 28: 395-401.

Zhang Y, Huo M, Zhou J, & Xie S (2010). PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed* 99: 306-314.

SUPPLEMENTARY TABLES AND FIGURES LEGENDS

SUPPLEMENTARY TABLES

Table S1. LC-MS/MS conditions. LC and MS/MS conditions for the purification, detection and quantification of morphine and M3G and their respective heavy-tagged counterparts. The flow rate was set at 90 $\mu\text{l}/\text{min}$ on a ZORBAX SB-C18 column (150 x 1mm, 3.5 μm).

Ce tableau supplémentaire est présenté en Annexe 4.

Table S2. Statistical details for morphine antinociceptive effect and induction of tolerance (see Figure 1). Non-linear regression with a 4-parameters logistic equation was applied to define the ED_{50} of morphine and the 95% confidence intervals in both males and females. The two fits were compared using a nested-model comparison with the extra sum-of-the-squares F test.

For the tolerance experiment, the same analysis was applied to the data of each mouse. Then, the obtained parameters were averaged and compared with an unpaired t-test with Welch's correction. MPE, maximal possible effect.

Table S3. Statistical details for the pharmacokinetic parameters of morphine and M3G in the blood obtained from the NCA (see Figure 2). Two-way ANOVA was used to identify the differences between the pharmacokinetic parameters reported for each group. The non-parametric approach ART ANOVA (results highlighted in bold) was used for morphine volume of distribution at steady-state. C_{max} , maximal concentration reached over the time course; AUC, area under the curve; AUMC, area under the first moment curve; MRT, mean residence time; Cl/F , clearance over bioavailability; V_{dss}/F , volume of distribution at steady-state over bioavailability.

Table S4. Statistical details for the quantification of morphine and M3G in the brain and LSC (see Figure 3). Two-way ANOVA was used to identify the differences in morphine and M3G quantities between the groups. The non-parametric approach ART ANOVA (results highlighted in bold) was used for the M3G/Morphine ratio in the amygdala and morphine and M3G in the OB.

Table S5. Statistical details for morphine and M3G brain/blood ratio (see Figure 4). Two-way ANOVA was used to identify the differences in morphine and M3G brain/blood ratio between the groups. The non-parametric approach ART ANOVA (results highlighted in bold) was used for morphine and M3G brain/blood ratio in the PAG and for M3G brain/blood ratio in the LSC.

Table S6. Statistical details for M3G BBB permeability and central metabolism of morphine (see Figure 4). Linear regressions were applied and analysed through a nested-model comparison with the extra sum-of-squares F-test to compare the M3G BBB permeability between males and females, evaluate whether a significant morphine central metabolism is observed (*i.e.* comparison of the M3G brain/blood ratio fits obtained after an injection of morphine and M3G) and to compare this central metabolism between males and females (*i.e.* comparison of the M3G brain/blood ratio fits obtained after an injection of morphine in male and female mice).

Ces tableaux S2 à S6 supplémentaires sont présentés en Annexe 5.

SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1- Pharmacokinetic parameters for morphine and M3G obtained from the NCA. Values of parameters obtained for (a) Morphine C_{max} , (b) morphine AUMC, (c) morphine MRT, (d) morphine half-life, (e) morphine clearance, (f) morphine V_{dss} , (g) M3G C_{max} , (h) M3G AUMC and (i) M3G MRT. Data are expressed as means \pm SEM, n are indicated in the figure. Two-way ANOVA was applied and followed by Tukey's multiple comparisons test only if F was significant and there was no variance homogeneity. Morphine volume of distribution at steady-state was analysed with the non-parametric approach ART ANOVA. Tukey's multiple comparisons results are reported as *, $P < 0.05$. Males are represented as blue circle dots and females as red square dots.

Cette figure supplémentaire est présentée en Annexe 7.

Figure S2- Quantities of morphine and M3G in the different brain areas and lumbar spinal cord of male and female control and tolerant mice. Levels of (a) morphine and (b) M3G in the amygdala. Levels of (c) morphine and (d) M3G in the PAG. Levels of (e) morphine and (f) M3G in the LSC. Levels of (g) morphine and (h) M3G in the OB. Data are expressed as means \pm SEM, n are indicated in the figure. Two-way ANOVA was applied and followed by Tukey's multiple comparisons test only if F was significant and there was no variance homogeneity. Morphine and M3G in the OB were analysed with the non-parametric approach ART ANOVA. Tukey's multiple comparisons results are reported as *, $P < 0.05$. Males are represented as blue circle dots and females as red square dots.

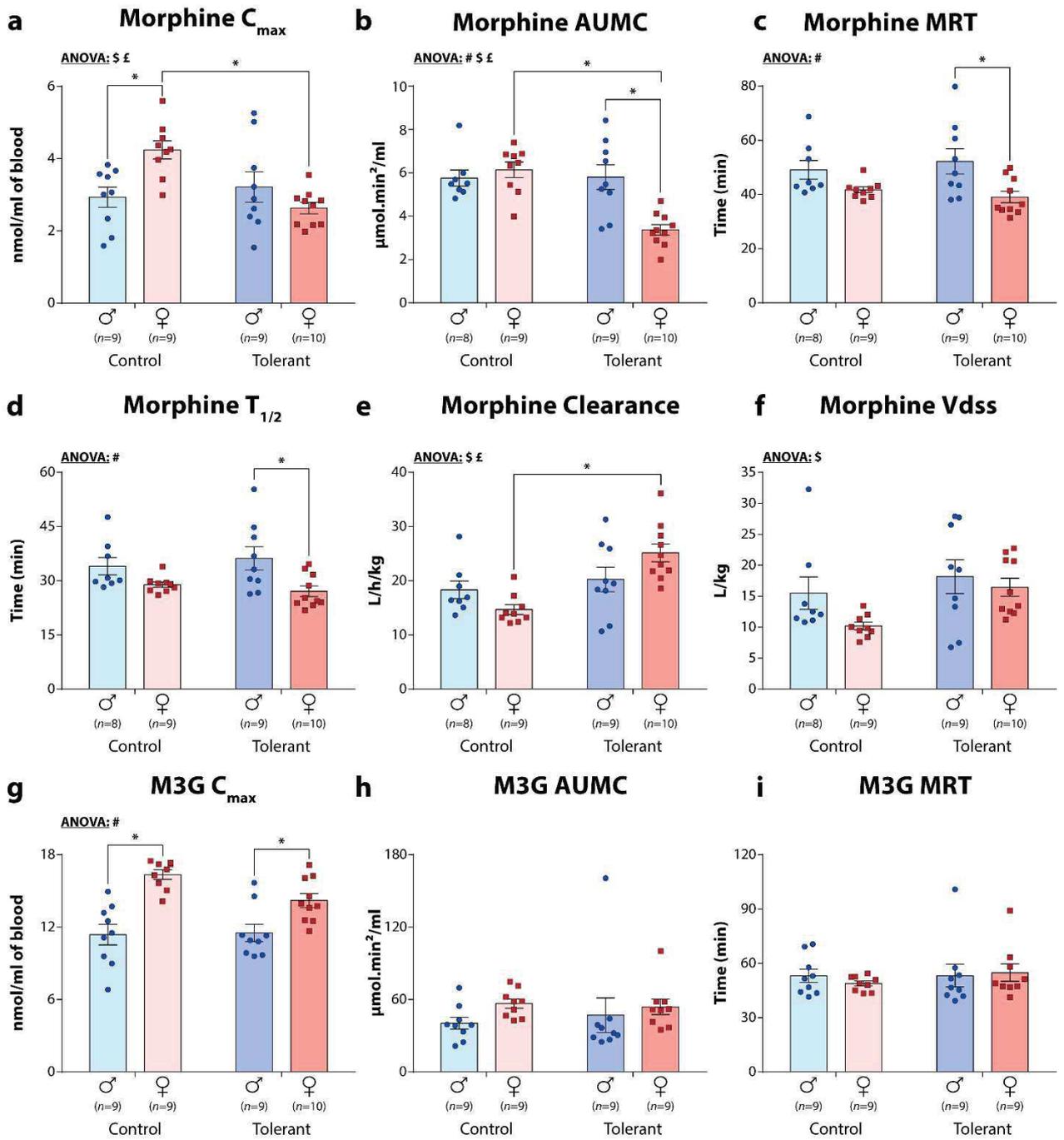
Cette figure supplémentaire est présentée en Annexe 8.

Figure S3- Quantities of M3G found in the different brain areas and lumbar spinal cord of male and female naïve mice following i.p. injection of increasing concentration of M3G. Levels of M3G found in **(a)** the amygdala following i.p. injection of 10, 20 and 40 mg/kg of M3G. $n = 4$ for the injection of 10mg/kg of M3G in males and females, $n = 5$ for the other conditions. Levels of M3G found in **(b)** the PAG following i.p. injection of 10, 20 and 40 mg/kg of M3G. $n = 3$ for the injection of 10mg/kg of M3G in females, $n = 5$ for the other conditions. Levels of M3G found in **(c)** the LSC following i.p. injection of 10, 20 and 40 mg/kg of M3G. $n = 4$ for the injection of 10mg/kg of M3G in males, $n = 5$ for the other conditions. Levels of M3G found in **(d)** the OB following i.p. injection of 10, 20 and 40 mg/kg of M3G. $n = 4$ for the injection of 40mg/kg of M3G in males, $n = 5$ for the other conditions. The blue and red lines represent linear regressions of the M3G quantities found in the brain area and LSC as a function of increasing concentration of M3G injected in males and females, respectively. Data are expressed as means \pm SEM. Males are represented as circle dots and females as square dots.

Cette figure supplémentaire est présentée en Annexe 9.

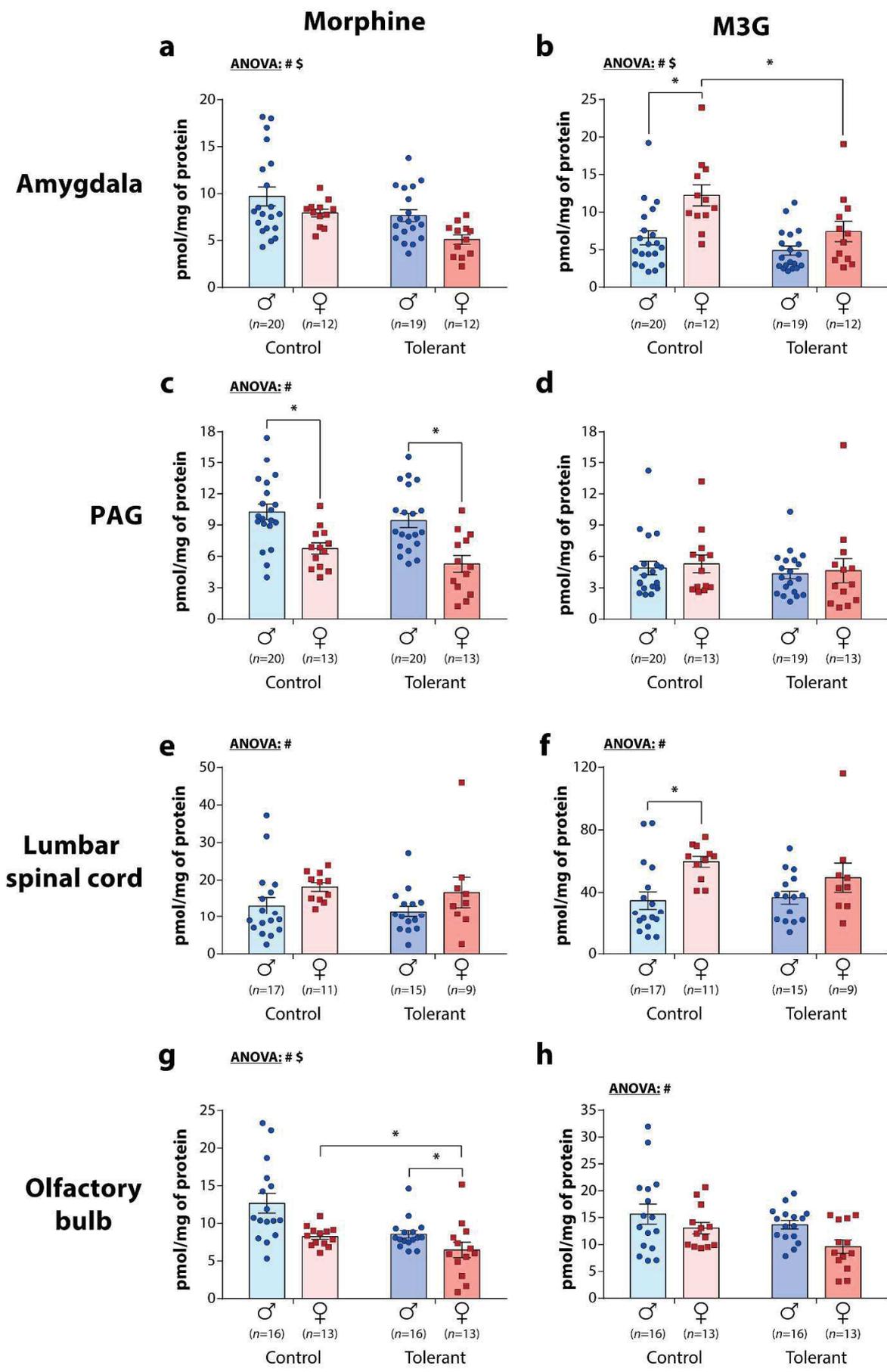
Annexe 7 : Paramètres pharmacocinétiques obtenus après l'analyse non-compartimentale pour la morphine et la M3G

Valeurs des paramètres obtenues pour (a) la concentration maximale de morphine, (b) l'AUMC de la morphine, (c) le MRT de la morphine, (d) la demi-vie terminale de la morphine, (e) la clairance de la morphine, (f) le volume de distribution de la morphine, (g) la concentration maximale de M3G, (h) l'AUMC de la M3G et (i) le MRT de la M3G. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM et les n sont indiqués dans la figure. Ces données ont été comparées avec une ANOVA à deux facteurs. Si le F obtenu était significatif et que les variances étaient homogènes, un test de comparaisons multiples de Tukey a été réalisé. Le volume de distribution de la morphine a été analysé avec l'approche non-paramétrique de l'ANOVA à deux facteurs. Sexe: #, $P < 0.05$. Traitement: \$, $P < 0.05$; *, $P < 0.05$. **AUMC**, Aire sous la courbe du moment ; **C_{max}**, concentration maximale atteinte lors de la cinétique ; **M3G**, morphine-3-glucuronide ; **MRT**, temps de résidence moyen ; **T_{1/2}**, demi-vie terminale ; **V_{dss}/F**, volume de distribution sur la biodisponibilité.



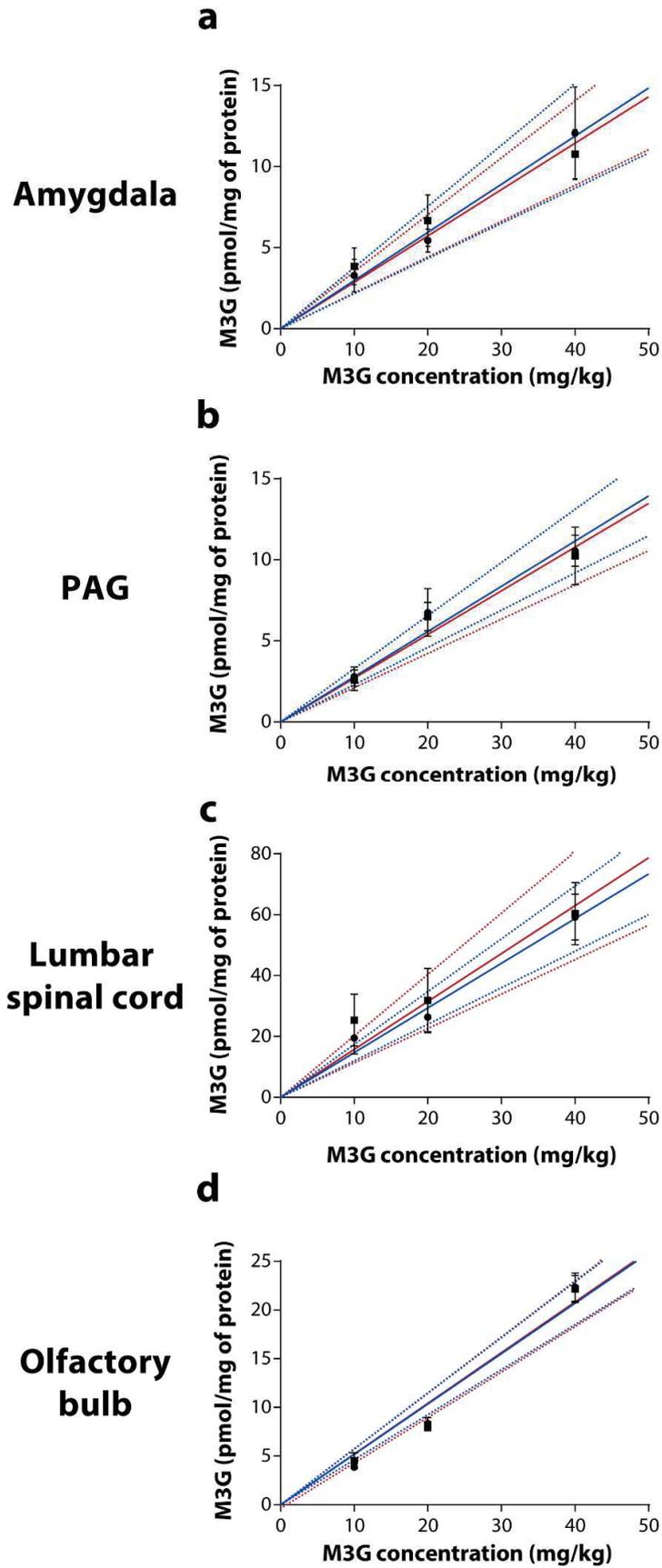
Annexe 8 : Quantités de morphine et de M3G retrouvées dans les différentes régions du SNC chez les souris mâles et femelles contrôles et tolérantes à la morphine

Quantités de (a) morphine et de (b) M3G dans l'amygdale. Quantités de (c) morphine et de (d) M3G dans la PAG. Quantités de (e) morphine et de (f) M3G dans la LSC. Quantités de (g) morphine et de (h) M3G dans le OB. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM et les n sont indiqués dans la figure. Ces données ont été comparées avec une ANOVA à deux facteurs. Si le F obtenu était significatif et que les variances étaient homogènes, un test de comparaison multiple de Tukey a été réalisé. L'approche ART ANOVA non paramétrique (indiquée en gras) a été utilisée pour le ratio M3G/Morphine dans l'amygdale et les quantités de morphine et de M3G dans le OB. Sexe: #, $P < 0.05$. Traitement: \$, $P < 0.05$. *, $P < 0.05$. **LSC**, moelle épinière lombaire ; **M3G**, morphine-3-glucuronide **OB**, bulbe olfactif ; **PAG**, substance grise périaqueducule.



**Annexe 9 : Quantités de M3G retrouvées dans les différentes régions du
SNC chez des souris mâles et femelles naïves après injection de
concentrations croissantes de M3G par voie i.p.**

Quantités de M3G retrouvées dans (a) l'amygdale après l'injection de 10, 20 et 40 mg/kg de M3G. $n = 4$ pour l'injection de 10 mg/kg de M3G chez les mâles et les femelles, $n = 5$ pour toutes les autres conditions. Quantités de M3G retrouvées dans (b) la PAG après l'injection de 10, 20 et 40 mg/kg de M3G. $n = 3$ pour l'injection de 10 mg/kg de M3G chez les femelles, $n = 5$ pour toutes les autres conditions. Quantités de M3G retrouvées dans (c) la LSC après l'injection de 10, 20 et 40 mg/kg de M3G. $n = 4$ pour l'injection de 10 mg/kg de M3G chez les mâles, $n = 5$ pour toutes les autres conditions. Quantités de M3G retrouvées dans (d) le OB après l'injection de 10, 20 et 40 mg/kg de M3G. $n = 4$ pour l'injection de 40 mg/kg de M3G chez les mâles, $n = 5$ pour toutes les autres conditions. Les courbes rouges et bleues correspondent aux modélisations des quantités de M3G dans les structures d'intérêt en fonction de la concentration sanguine de M3G chez les mâles et les femelles. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. **LSC**, moelle épinière lombaire ; **M3G**, morphine-3-glucuronide **OB**, bulbe olfactif ; **PAG**, substance grise périaqueducale.



Annexe 10 : Publication - Unveiling the Impact of Morphine on Tamoxifen Metabolism in Mice in vivo

Lors de ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à un projet secondaire évaluant les interactions métaboliques entre le tamoxifène et la morphine. Ce projet a abouti à une publication dans *Frontiers in Oncology* (<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00025>).

Unveiling the Impact of Morphine on Tamoxifen Metabolism in Mice *in vivo*

Florian Gabel¹, Anne-Sophie Aubry¹, Volodya Hovhannisyann¹, Virginie Chavant^{1,2}, Ivan Weinsanto¹, Tando Maduna¹, Pascal Darbon¹ and Yannick Goumon^{1,2*}

¹ CNRS UPR3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, University of Strasbourg, Strasbourg, France, ² Mass Spectrometry Facilities of the CNRS UPR3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France

Background: Tamoxifen is used to treat breast cancer and cancer recurrences. After administration, tamoxifen is converted into two more potent antitumor compounds, 4OH-tamoxifen and endoxifen by the CYP3A4/5 and 2D6 enzymes in human. These active compounds are inactivated by the same UDP-glucuronosyltransferase isoforms as those involved in the metabolism of morphine. Importantly, cancer-associated pain can be treated with morphine, and the common metabolic pathway of morphine and tamoxifen suggests potential clinically relevant interactions.

Methods: Mouse liver microsomes were used to determine the impact of morphine on 4OH-tamoxifen metabolism *in vitro*. For *in vivo* experiments, female mice were first injected with tamoxifen alone and then with tamoxifen and morphine. Blood was collected, and LC-MS/MS was used to quantify tamoxifen, 4OH-tamoxifen, N-desmethyltamoxifen, endoxifen, 4OH-tamoxifen-glucuronide, and endoxifen-glucuronide.

Results: *In vitro*, we found increased K_M values for the production of 4OH-tamoxifen-glucuronide in the presence of morphine, suggesting an inhibitory effect on 4OH-tamoxifen glucuronidation. Conversely, *in vivo* morphine treatment decreased 4OH-tamoxifen levels in the blood while dramatically increasing the formation of inactive metabolites 4OH-tamoxifen-glucuronide and endoxifen-glucuronide.

Conclusions: Our findings emphasize the need for caution when extrapolating results from *in vitro* metabolic assays to *in vivo* drug metabolism interactions. Importantly, morphine strongly impacts tamoxifen metabolism in mice. It suggests that tamoxifen efficiency could be reduced when both drugs are co-administered in a clinical setting, e.g., to relieve pain in breast cancer patients. Further studies are needed to assess the potential for tamoxifen-morphine metabolic interactions in humans.

Keywords: Tamoxifen, 4OH-tamoxifen, endoxifen, Morphine, metabolism, CYP, UDP-glucuronosyltransferase, drug-drug interactions

Abbreviations: ACN, acetonitrile; ADME, absorption, distribution, metabolism, and/or excretion; AF, formic acid; AI, aromatase-inhibitors; CYP, cytochrome P450; ER, estrogen receptor; i.p., injected intraperitoneally; IS, internal standard; LC-MS/MS, liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry; M3G, morphine-3-glucuronide; M6G, morphine-6-glucuronide; MOR, Mu opioid receptors; SEM, standard error of the mean; SERM, selective estrogen receptor modulator; TDM, therapeutic drug monitoring; UGT, UDP-glucuronosyltransferases; SULT, sulfotransferase.

BACKGROUND

Breast cancer is the most common and deadliest cancer diagnosed in women, even though major advances in screening and treatment have been made in the last 20 years (1). In estrogen receptor (ER)-positive breast tumors, the main strategy of breast anticancer drugs is to either antagonize ER signaling or decrease estrogen synthesis to prevent cancer cell proliferation. Among those drugs, tamoxifen is a selective estrogen receptor modulator (SERM) used for decades to decrease breast cancer recurrence (2). Nowadays, tamoxifen remains one of the major treatment for breast cancer, especially in countries with limited health care resources (3).

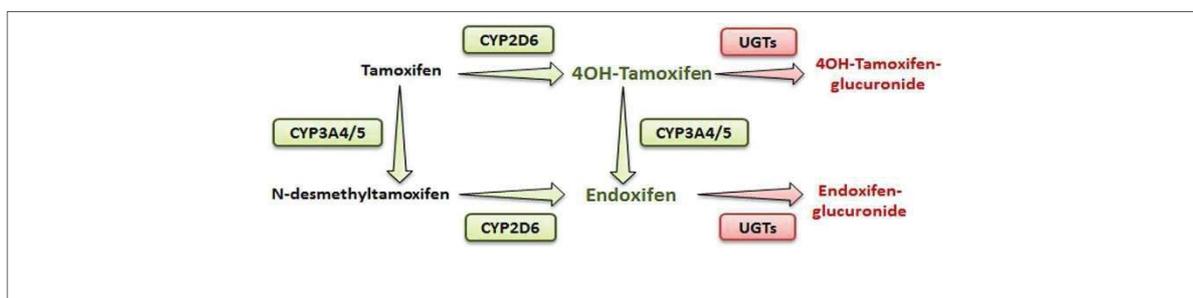


FIGURE 1 | Simplified metabolic pathway of tamoxifen in humans. Compounds in green and red are the active and inactive metabolites of tamoxifen, respectively

Tamoxifen is a pro-drug metabolized mostly in the liver by the phase I cytochrome P450 (CYP) 2D6 and 3A4/5 enzymes (4). In human, hydroxylation of tamoxifen (CYP2D6) leads to 4OH-tamoxifen that can be further processed into endoxifen (via CYP3A4/5) through N-desmethylation (**Figure 1**). These two major metabolites are 30- to 100-fold more potent than tamoxifen itself and are responsible for its anti-tumoral activity.

In addition, N-desmethylation of tamoxifen generates the N-desmethyltamoxifen intermediate (CYP3A4/5) that is further metabolized into endoxifen through CYP2D6-mediated hydroxylation.

Endoxifen is the major metabolite of tamoxifen in humans. Alternatively, in mice, even though CYP2D6 isoform is absent, 4OH-tamoxifen is the main anticancer product of tamoxifen, suggesting that other CYP2D isoforms, such as CYP2D22, could be involved in its metabolism (4, 5).

Phase II metabolizing enzymes including Uridine 5'-diphospho (UDP)-glucuronosyltransferases (UGT1A10, 1A4, 1A8, 2B7, and 2B15) convert active tamoxifen metabolites into inactive 4OH-tamoxifen-glucuronide and endoxifen- glucuronide (**Figure 1**) (6). Approximately 75% of a given dose of tamoxifen is excreted into the biliary tract as inactive glucuronides (7).

Cancer-associated pain resulting from metastases, anticancer treatment or surgery represents a major problem that is treated with analgesic drugs including morphine, codeine, and/or paracetamol (8). Morphine remains the gold standard for moderate and severe pain relief despite side effects that limit its chronic use (9). In humans, morphine acts on Mu opioid receptors (MORs) to produce analgesia. Its metabolism in the liver and brain leads mainly to the formation of morphine-3- glucuronide (M3G) (10) and morphine-6-glucuronide (M6G) (10–12). In human, morphine-glucuronidation is catalyzed by UGT2B7 and to a lower extent by a number of other UGT isoforms (UGT1A10, UGT1A1, 1A3, 1A6, 1A8, 1A9, 2A1, and UGT2B21) (9, 13, 14). However, in mice, UGT2B7 (the major enzyme involved in morphine metabolism in human) is absent but its activity is rescued by UGT2B21 and UGT2B36 (14–16).

Drug–drug interactions, resulting in either enzyme inhibition or induction, are a major limitation for the use of co-treatments (17). Usually, these drug–drug interactions are initially studied *in vitro* and then *in vivo* (18). While *in vitro* studies provide interesting results, their interpretation has proven to be complex when translated to *in vivo* drug metabolism (18).

Although anti-cancer agents share common catabolic pathways with many opiates, the impact of their co- administration on the metabolism and thus on the activity of anticancer drugs remains unexplored. These potential interactions between analgesic and anticancer drug metabolism could be used to treat more efficiently breast cancer. Therefore, as a proof of concept, we have investigated in mice whether morphine can alter tamoxifen metabolism.

METHODS

Animals

Experiments were performed with 11- to 29-week-old female C57BL/6J mice (23 ± 4 g; Charles River, L'Arbresle, France). Animals were housed according to a 12-h light–dark cycle, at a temperature of $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and provided with food and water *ad libitum*. All procedures were performed in accordance with European directives (2010/63/EU) and were approved by the regional ethics committee and the French Ministry of Agriculture (license no. APAFIS#16827-2018092113192911 v4 to YG).

Blood Collection

The tail of the mouse was anesthetized locally with a cutaneous application of lidocaine/prilocaine 5% (Zentiva, Paris, France). After 5 min, a small incision was performed at the end of the tail and 10 μl of blood was collected using a calibrated capillary (Minicaps End-to-End 10 μl ; Hischmann, Eberstadt Germany).

Tamoxifen and Morphine Injections

Female mice were injected intraperitoneally (i.p., calibrated Hamilton syringe) with 10 mg/kg of tamoxifen (in 90% olive oil/10% ethanol, v/v; Sigma Aldrich, Lyon, France), and then with NaCl 0.9% at 0, 1, and 2 h following tamoxifen administration (**Figure 2**). Blood was collected by tail vein sampling (see above) just before and at 1, 2, 4, 8, 24, and 48 h after tamoxifen injection (**Figure 2**). A second injection of tamoxifen was then performed at 48 h and immediately followed by an injection of either 10 mg/kg of morphine–HCl (diluted in 0.9% NaCl; Francopia, Paris, France) or saline solution (0.9% NaCl only). Mice then received two additional injections of morphine or saline at 1 and 2 h after the second tamoxifen dose. Blood was collected at 1, 2, 4, 8, 24, and 48 h after the second tamoxifen injection (**Figure 2**).

Sample Preparation

The blood was transferred from the capillary into a microtube containing 10 μ l of heparin and frozen at -20°C . On the next day, blood was thawed and 10 μ l of an internal standard (IS; see below) and 100 μ l of ice-cold acetonitrile (ACN; Thermo Scientific, San Jose, USA) were added. The samples were next vortexed and centrifuged at 20,000 g during 15 min at 4°C . The supernatants were collected, dried under vacuum, and suspended in 15 μ l of 50% methanol/0.1% formic acid (v/v; Sigma Aldrich) prior to LC-MS/MS analysis.

Microsome Preparation

Liver tissues were collected from 10-week-old male C57/BL6J mice. Samples were pooled and homogenized with an Ultra Turrax instrument (Ika, Staufen, Germany) in 10 ml of extraction buffer (100 mM Na phosphate buffer, pH 7.4, 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, protease inhibitor cOmplete Mini, EDTA-free, Roche, Basel, Switzerland). The homogenate was then sonicated (2×10 s, 100 W) and centrifuged for 12 min at 2,000 g (4°C). The supernatant was transferred into polycarbonate ultracentrifuge tubes (Beckman Instruments, Palo Alto, USA), completed with extraction buffer and centrifuged 40 min at 10,000 g and 4°C in a type-70 Ti Rotor (Beckman Coulter, Brea, USA). The resulting supernatant was then centrifuged for 130 min at 130,000 g (4°C), and the pellet obtained was suspended in 800 μ l of storage buffer (100 mM Na phosphate buffer, pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 20% glycerol; Sigma Aldrich) and frozen. Protein concentration was determined using the Bradford method (Protein Assay, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Enzymatic Activity Assay

One hundred micrograms of liver microsomes were used to perform 4OH-tamoxifen glucuronidation assays. First, increasing concentrations of 4OH-tamoxifen (10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 125, 150, 200, 250, and 300 μM ; LGC Standard, Molsheim, France) with a fixed concentration of morphine (500 μM) were dried under vacuum. Morphine was suspended in 4 mM MgCl_2 adjusted with H_2O , and each 4OH-tamoxifen concentration was diluted with 69 μ l of the morphine-containing mix.

Microsomes were incubated for 15 min at 4°C in the presence of alamethicin (30 µg/mg of protein; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) and Tris–HCl buffer (400 mM) adjusted with H₂O. Then, 75 µl of microsome were added to each 4OH-tamoxifen concentration and tubes were equilibrated at 37°C during 5 min. The enzymatic reactions were started with the addition of 6 µl of UDPGA to a final concentration of 5 mM. Reactions were stopped 20 s later with 900 µl of cold 100% methanol. Samples were then diluted (1:5), and an IS (see below) was added to each sample. Samples were centrifuged for 15 min at 20,000 g, and 4°C and the supernatants were dried under vacuum and then suspended in 45 µl of 50% methanol/0.1% formic acid (v/v) prior to LC-MS/MS analysis. K_m and V_{max} were obtained with a Michaelis-Menten plot following a non-linear curve fit with the least-squares method (GraphPad Prism 6 software).

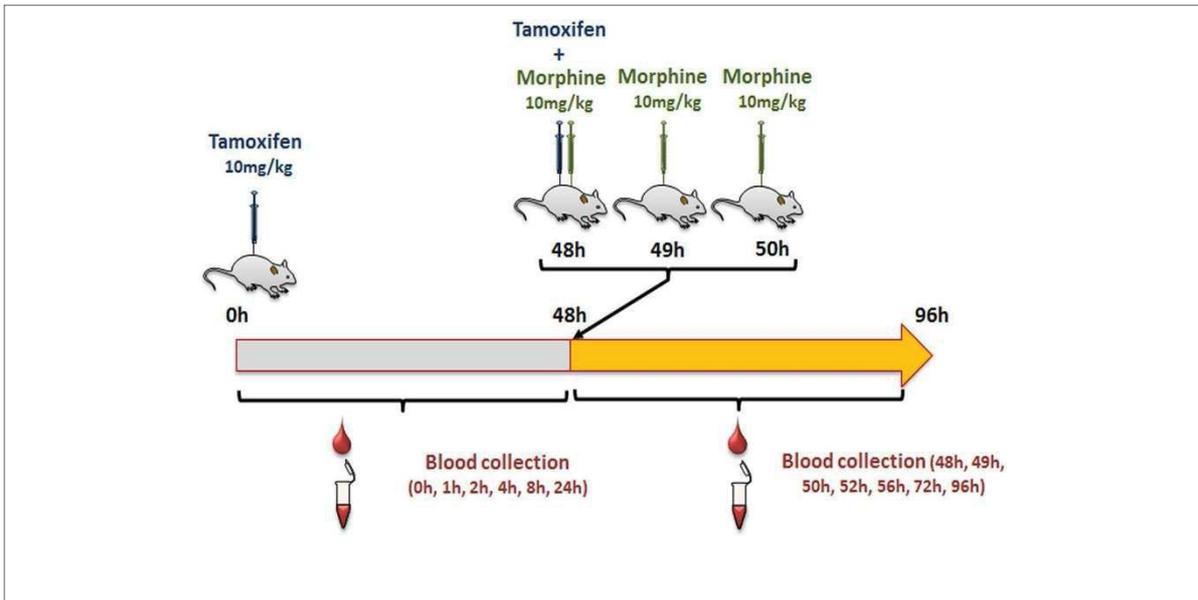


FIGURE 2 | Protocol used to study tamoxifen–morphine drug–drug interactions.

LC-MS/MS Instrumentation and Analytical Conditions

Analyses were performed with a Dionex Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Scientific) coupled with a triple quadrupole Endura mass spectrometer. Xcalibur v2.0 software was used to control the system (Thermo Electron, Villebon Sur Yvette, France). Samples were loaded onto an Accucore RP-MS column (150 × 1 mm, 2 μm, flow of 90 μl/min; Thermo Electron) heated at 40°C. Buffer A was 1% ACN/98.9% H₂O/0.1% formic acid (v/v/v), whereas buffer B was 99.9% ACN/0.1% formic acid (v/v). The gradient used is detailed in **Supplementary Table 1**.

Electrospray ionization was achieved in the positive mode with the spray voltage set at 3,500 V. Nitrogen was used as the nebulizer gas, and the ionization source was heated to 250°C. Desolvation (nitrogen) sheath gas was set to 18 Arb and Aux gas was set to 7 Arb. Ion transfer tube was heated at 297°C. Q1 and Q2 resolutions were set at 0.7 FWHM, whereas collision gas (CID, argon) was set to 2 mTorr. Identification of the compounds was based on precursor ion, selective fragment ions, and retention times. Selection of the monitored transitions and optimization of collision energy and RF Lens parameters were manually determined (see **Supplementary Table 1** for details). Qualification and quantification were performed in MRM mode using Quan Browser software (Thermo Scientific).

Statistics

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 Software. Results were presented as mean values ± standard error of the mean (SEM). Groups were compared using multiple *t*-tests.

RESULTS

Enzymatic Study *in vitro*

As 4OH-tamoxifen is the major active metabolite of tamoxifen in mice, *in vitro* experiments were performed on mouse liver microsomes to study the impact of 500 μM of morphine on the glucuronidation of 4OH-tamoxifen. Morphine was used at 500 μM to determine the K_M of the glucuronidation of 4OH-tamoxifen as this concentration corresponds to the K_M previously determined for morphine glucuronidation in mice (12, 19). As shown in **Figure 3**, morphine significantly affects the production of 4OH-tamoxifen-glucuronide. Specifically, morphine significantly reduced the production of 4OH-tamoxifen-glucuronide when 10 to 50 μM and 70 μM of tamoxifen were used. K_M values for the production of 4OH-tamoxifen-glucuronide in the absence and presence of morphine, as determined by the Michaelis-Menten equation, were 68 and 98.6 μM (+45%), respectively. These results indicate that morphine reduces 4OH-tamoxifen glucuronidation *in vitro*.

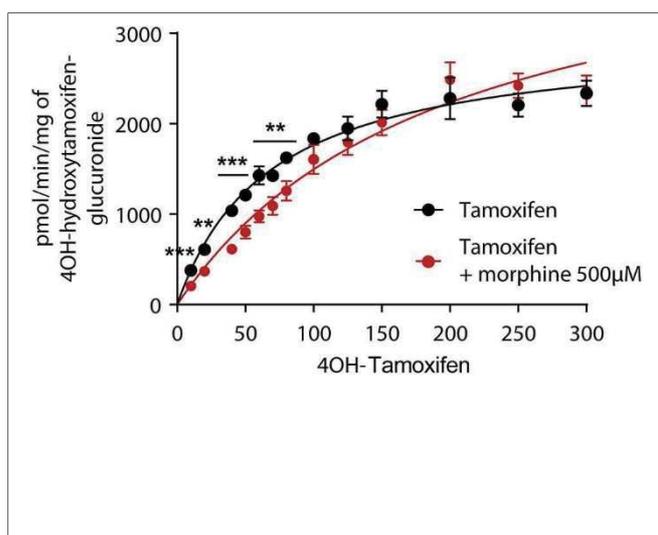


FIGURE 3 | Morphine (500 μM) inhibits the formation of 4OH-tamoxifen-glucuronide *in vitro*. A t-test using the Holm–Sidak method was performed to compare each concentration of 4OH-tamoxifen. $n = 7$ for tamoxifen alone and $n = 5$ in the presence of morphine; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Values are means \pm SEM.

Study of Tamoxifen Metabolism *in vivo*

First, we determined whether multiple injections of tamoxifen would alter its own metabolism (**Figures 2, 4A**). Blood was collected before and 1, 2, 4, 8, 24, and 48 h after the first (**Figure 4A**, white part) and the second injection of tamoxifen (**Figure 4A**, gray part). Tamoxifen, 4OH-tamoxifen, and endoxifen-glucuronide concentrations in the blood did not vary significantly at any time point between the two tamoxifen injections (**Figure 4B**). In contrast, a significant increase in the concentrations of 4OH-tamoxifen-glucuronide, N-desmethyltamoxifen and endoxifen was observed. Accordingly, drug metabolic ratios (i.e., the concentration ratio of a metabolite compared to its parent molecule) were significantly altered at different time points (**Figures 5A–F**). The ratio of endoxifen/N-desmethyltamoxifen was significantly elevated at 4 and 8 h compared to the first injection suggesting an increase in endoxifen synthesis (**Figure 5C**). In a more dramatic manner, 4OH-tamoxifen glucuronidation was increased by 1.5- to 2-fold at all time points compared to the first injection (**Figure 5F**). Similarly, the $t = 2$ h ratio of endoxifen-glucuronide to its parent molecule endoxifen showed a 3-fold increase compared to the first injection (**Figure 5E**). On the other hand, no difference was observed for 4OH-tamoxifen/tamoxifen (**Figure 5A**), N-desmethyltamoxifen/tamoxifen (**Figure 5B**), and endoxifen/4OH-tamoxifen ratios (**Figure 5D**). Together, these results indicate that tamoxifen metabolism is slightly potentiated following two subsequent injections of the drug.

As morphine has a short half-life in mice (30 min), we have performed three injections of morphine to reach adequate concentrations in the blood (**Supplementary Figure 1**). The highest concentrations of morphine and M3G in the blood were reached after 2 h ($1,599 \pm 336$ pmol/ml and $9,773 \pm 1,274$ pmol/ml, respectively). Morphine was still present after 8 h, allowing a long-lasting competition with tamoxifen metabolism.

Then, female mice were injected twice with tamoxifen (at 0 and 48 h) in addition to morphine (at 48, 49, and 50 h) and blood samples were collected (**Figure 6A**). Following morphine injections, the blood concentrations of tamoxifen, 4OH-tamoxifen, 4OH-tamoxifen-glucuronide, endoxifen, and endoxifen-glucuronide were significantly increased compared to the first injection of tamoxifen (**Figure 6B**). Only a tendency was observed for N-desmethyltamoxifen. More importantly, ratios between 4OH-tamoxifen/tamoxifen (**Figure 7A**) were significantly decreased by 1/2- to 1/5-fold 1, 2, and 8 h after the injection of morphine,

suggesting that 4OH-tamoxifen was processed into its metabolites at a faster rate in the presence of morphine. Indeed, the ratios of 4OH-tamoxifenglucuronide/4OH-tamoxifen showed a significant increase (2- to 3-fold) at every time point (Figure 7F). Similarly, endoxifenglucuronide/endoxifen ratios (Figure 7E) were dramatically increased (1.5- to 4-fold) at 2, 4, and 8 h after the injection of morphine. On the other hand, the ratios of N-desmethyltamoxifen/tamoxifen (Figure 7B), endoxifen/Ndesmethyltamoxifen (Figure 7C) and endoxifen/4OH-tamoxifen (Figure 7D) were not altered by morphine administration. Together, these results indicate that the inactivation of tamoxifen and its active metabolites is exacerbated in the presence of equimolar amounts of morphine.

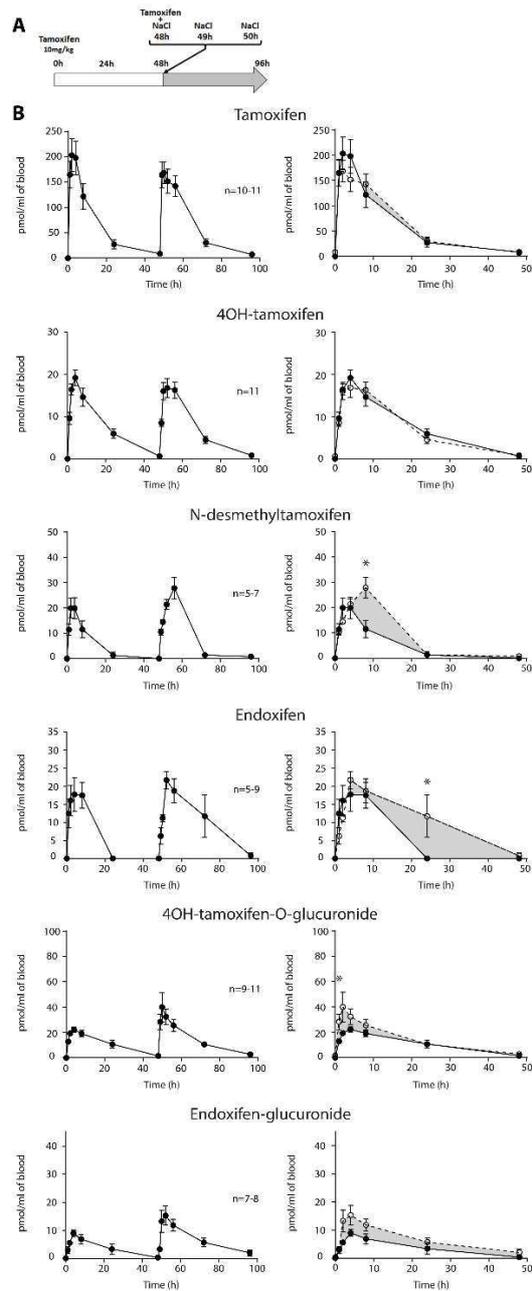


FIGURE 4 | N-desmethyltamoxifen, endoxifen, 4OH-tamoxifen-glucuronide, and endoxifen-glucuronide during 96 h. Right panels correspond to the superimposition of the first 0–48 h (white area) and last 48–96 h (gray area). The gray area corresponds to an increase in the quantity of the corresponding molecule after the second injection (48–96 h). Multiple t-tests with the Holm–Sidak correction were applied. Values are means \pm SEM. * $p < 0.05$.

DISCUSSION

Repeated Tamoxifen Treatment Potentiates Glucuronide Formation in vivo

Our results show that the blood formation pattern of Ndesmethyltamoxifen and endoxifen is slightly modified in vivo after two subsequent tamoxifen treatments. Indeed, we observed a higher peak concentration in the case of Ndesmethyltamoxifen and a slower elimination for endoxifen upon the second administration of tamoxifen. Furthermore, analysis of metabolic ratios revealed an increase in 4OHTamoxifen-glucuronide and endoxifen-glucuronide formation compared to their parent drugs when animals received a second injection of tamoxifen. Such an increase of glucuronidation can be related to induction of the expression of UGTs present in the liver occurring 48 h after the first injection of tamoxifen. Indeed, it has been described that several xenobiotics are able to promote UGT expression by acting on regulatory elements in the cell (20). Tamoxifen acts as a selective modulator on the ER, which, in turn, modulates the activity of numerous transcription factors implicated in the regulation of gene expression. Importantly, tamoxifen has been shown to increase the expression of CYP enzymes involved in its own metabolism, such as CYP3A4 (21).

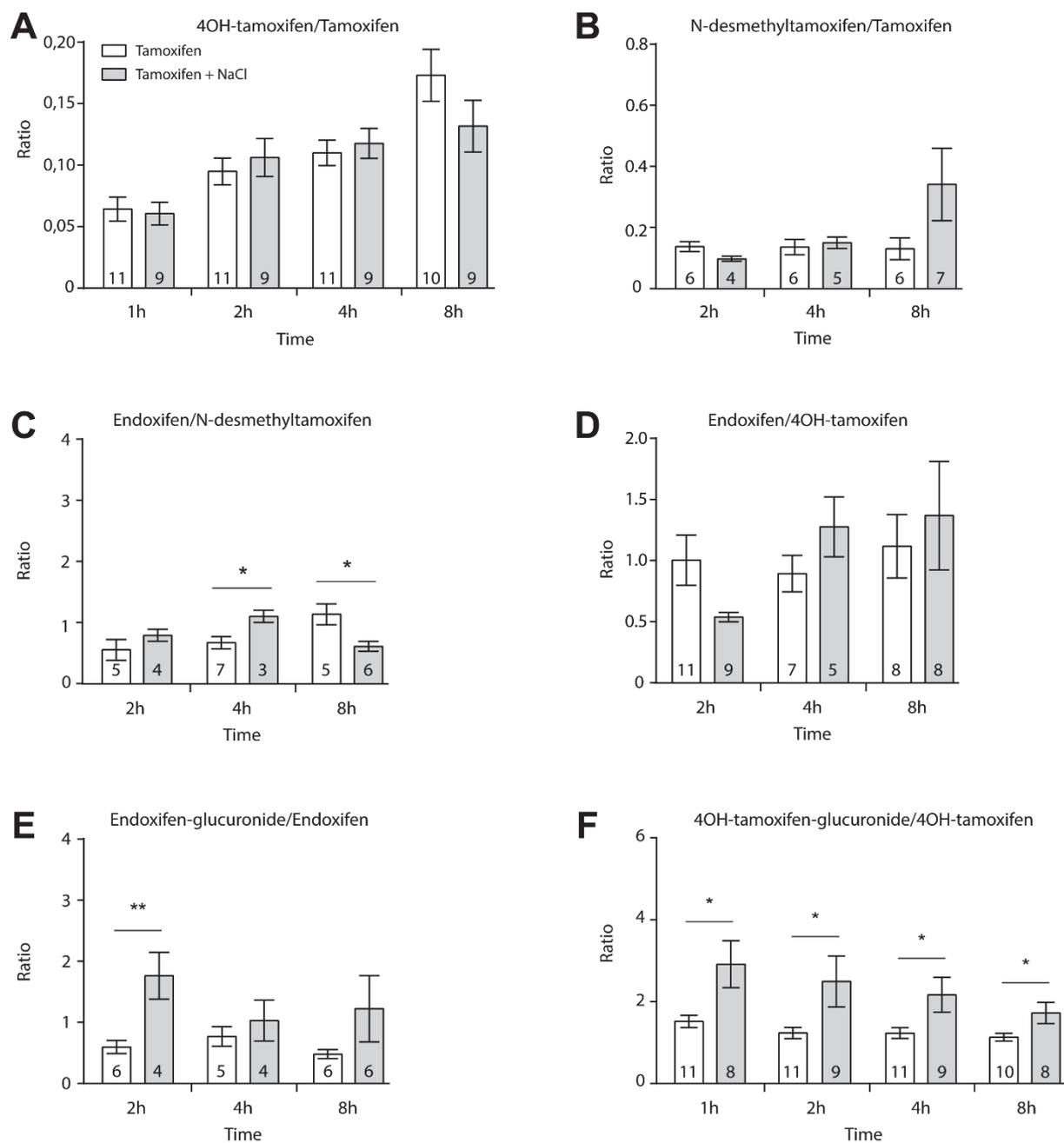


FIGURE 5 | Tamoxifen potentiates its own metabolism. Ratio between metabolites and parent compounds. (A) 4OH-tamoxifen/tamoxifen, (B) N-desmethyltamoxifen/tamoxifen, (C) endoxifen/N-desmethyltamoxifen, (D) endoxifen/4OH-tamoxifen, (E) endoxifen-glucuronide/endoxifen, and (F) 4OH-tamoxifen-glucuronide/4OH-tamoxifen. N are indicated within columns. Values are means \pm SEM. t-tests; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

In the same manner, one may hypothesize that the first injection of tamoxifen induced the expression of UGTs, resulting in a potentiation of 4OH-tamoxifen and endoxifen glucuronidation upon the second treatment. Surprisingly, despite an increase in tamoxifen glucuronidation, we observed no concurrent decrease in the concentrations of 4OH-tamoxifen or endoxifen. The main degradation pathway of tamoxifen is glucuronidation, but significant amounts of its two active metabolites are eliminated through sulfation. Several sulfotransferase (SULT) isoforms (1A1, 1E1, and 2A1) have been implicated in the degradation of 4OH-tamoxifen (22). In addition, it has been shown *in vitro* that tamoxifen metabolites are able to inhibit SULT2A1 through mixed or non-competitive inhibition (23). Therefore, it is possible that our first tamoxifen administration inhibited SULT expression toward 4OH-tamoxifen and endoxifen. Thus, the balance between glucuronidation and sulfation could be modified without affecting 4OH-tamoxifen or endoxifen levels. Nevertheless, this hypothesis remains to be tested.

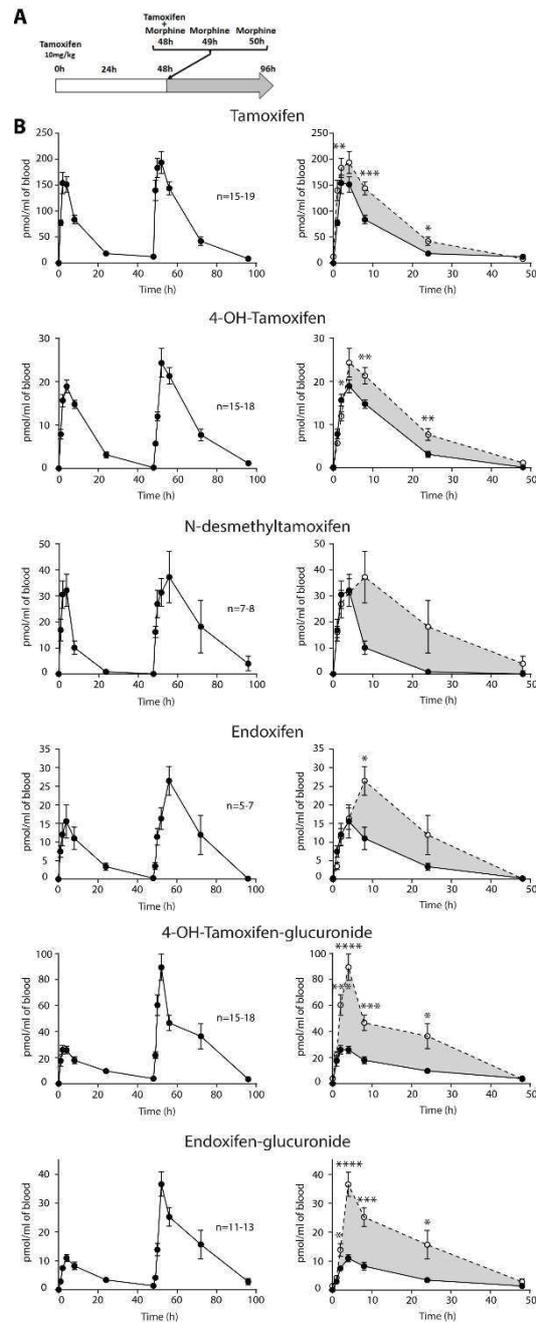


FIGURE 6 | Injections of NaCl 0.9% at 0, 1, and 2 h are not represented. (B) Left panels, levels of tamoxifen, 4OH-tamoxifen, N-desmethyltamoxifen, endoxifen, 4OH-tamoxifen-glucuronide, and endoxifen-glucuronide during 96 h. Right panels correspond to the superimposition of the first 0–48 h (white area) and last 48–96 h (gray area). Gray area corresponds to an increase of the quantity of the corresponding molecule after the second injection (48–96 h). Values are means \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Morphine Increases Glucuronidation of Tamoxifen Active Metabolites

Morphine was expected to reduce the glucuronidation of tamoxifen active metabolites through direct competition on the UGT-binding site as observed *in vitro*. Surprisingly, our results showed a dramatic increase in the levels of all active and inactive metabolites of tamoxifen when morphine was co-administered. The significant elevated levels of tamoxifen found in the blood after the coinjection with morphine may explain the increase observed for all compounds. This increase is likely to rely on differences of absorption due to drug–drug interactions with morphine rather than variability in tamoxifen injections. This point is strengthened by the fact that 19 mice were injected using a calibrated Hamilton syringe. Ratio between metabolites and their corresponding parent molecules were established to normalize the metabolite production with the tamoxifen injections. Analysis of the ratio revealed that morphine dramatically decreased the amount of 4OH-tamoxifen relative to that of its prodrug in the blood of tamoxifentreated mice. This decrease is likely related to the concurrent massive increase of the glucuronidation of 4OH-tamoxifen and endoxifen.

It seems improbable that morphine would act as a cofactor of UGTs, allowing faster glucuronidation since it did not occur in our *in vitro* experiments. A potential impact of morphine on the entry of tamoxifen in hepatocytes is also unlikely because tamoxifen is known to cross the cell membrane passively (7), whereas morphine influx relies on transporters including organic cation transporter 1 (OCT1) (24). The last type of common molecular targets in the metabolism of tamoxifen and morphine are MRP (multidrug resistance-associated protein) and MDR (multidrug resistant protein) transporters driving M3G, 4OH-tamoxifen, endoxifen, 4OH-tamoxifen-glucuronide, and endoxifen-glucuronide out of the cell (7, 16, 25, 26). One hypothesis involving those transporters may be that morphine decreases the efflux rate of tamoxifen active metabolites (and thus increases their glucuronidation rate). Additional studies are needed to decipher the molecular mechanism underlying this atypical change in tamoxifen metabolism.

In conclusion, co-administration of morphine in mice appears to promote the inactivation of the potent 4OH-tamoxifen and endoxifen metabolites. In light of these findings, we hypothesize that morphine could reduce the potency of tamoxifen anticancer treatment in

mice. Further studies should determine if the impact of morphine on tamoxifen metabolism is sufficient to result in changes in anticancer activity at therapeutic doses.

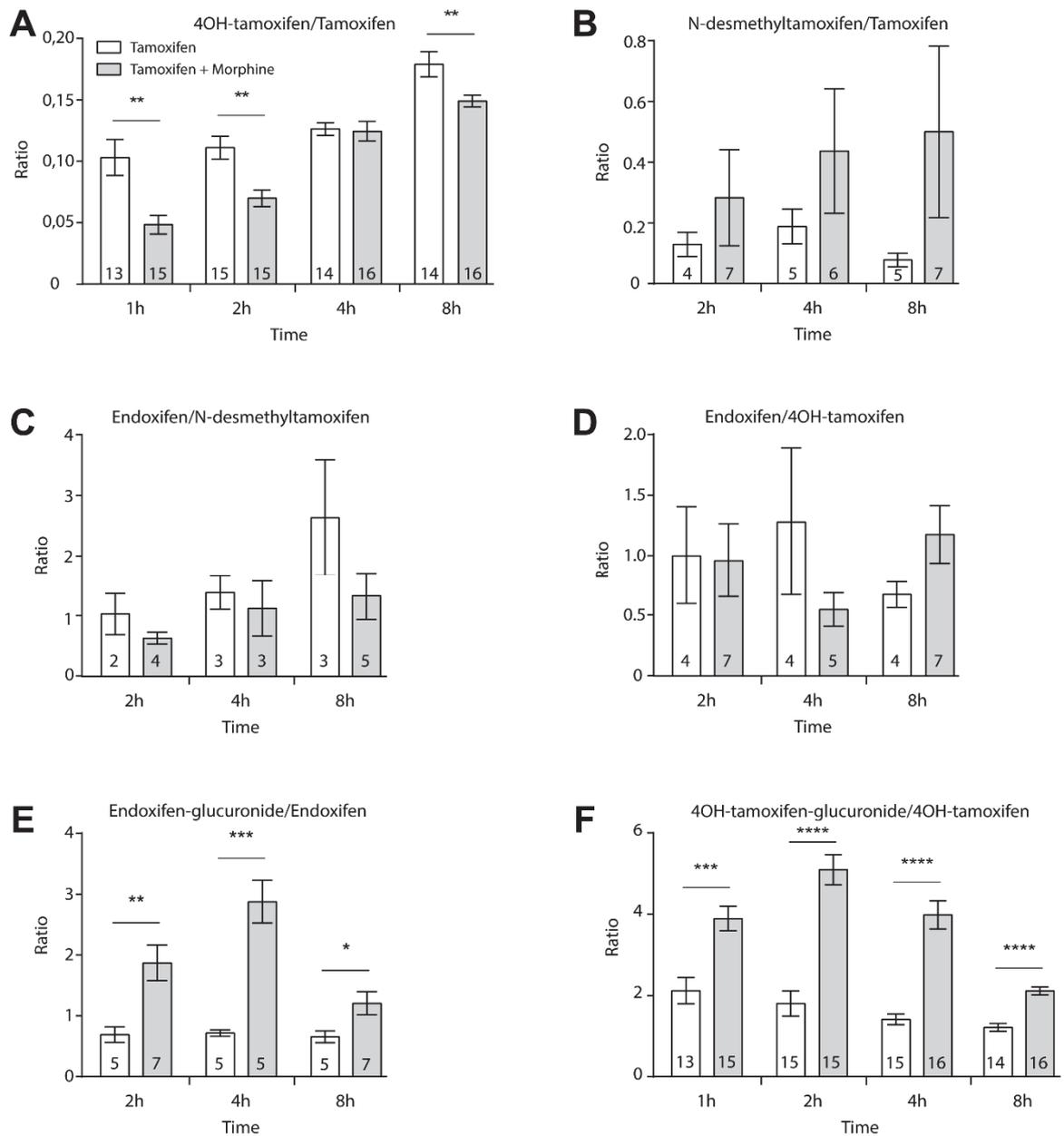


FIGURE 7 | Morphine promotes the inactivation of tamoxifen through increased glucuronidation. Effect of three injections of morphine (10 mg/kg i.p.) on the ratio between metabolites and parent compounds. (A) 4OH-tamoxifen/tamoxifen, (B) N-desmethyltamoxifen/tamoxifen, (C) endoxifen/N-desmethyltamoxifen, (D) endoxifen/4OH-tamoxifen, (E) endoxifen-glucuronide/endoxifen, and (F) 4OH-tamoxifen-glucuronide/4OH-tamoxifen. N are indicated within columns. t-tests; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Strengths and Limitations

We chose to associate morphine with tamoxifen to develop our methodology as it was expected to be a simple model focusing primarily on the glucuronidation process. Morphine is mainly metabolized by UGTs and was not expected to impact CYP activity. Morphine and tamoxifen co-treatments are given after surgeries or in the case of severe cancer pain (27). Otherwise, codeine and/or paracetamol are widely prescribed (8). In human, these two compounds are metabolized by the same CYPs (6D6/3A4) and UGTs (1A10, 1A4, 1A8, 2B7, and 2B15) (28, 29) as tamoxifen and might have a more complex impact on tamoxifen metabolic pathways (30, 31).

A main limitation of our study is that tamoxifen and morphine metabolisms differ in mice compared to humans. 4OH-tamoxifen is the major active mouse metabolite whereas endoxifen is found at greater concentrations in human serum. However, our approach using the isotopic dilution allowed us to observe non-negligible levels of both endoxifen and endoxifen-glucuronide in the blood of tamoxifen-treated mice. In mice, the Cyp2d gene cluster displays nine functional genes (Cyp2d9, Cyp2d10, Cyp2d11, Cyp2d12, Cyp2d13, Cyp2d22, Cyp2d26, Cyp2d34, and Cyp2d40), whereas humans only have one (CYP2D6) (4). Therefore, the presence of endoxifen suggests that CYP2D6 activity is rescued by an alternative CYP.

In addition, morphine is only metabolized into M3G in mice vs. M3G and M6G in humans (32, 33). Nevertheless, both species eliminate tamoxifen and morphine predominantly through glucuronidation. UGT2B7 (15), the main UGT involved in morphine metabolism in humans, is absent in mice. However, morphine and tamoxifen glucuronidation could be compensated by other enzymes including the mouse homologs of human UGT2B6, 2C9, 2C19, 3A4/5 (34), UGT2B36, and UGT2B21 (14, 15). These differences lead to a tamoxifen half-life of 27 h in humans and 6.8 h in mice (4), as well as a morphine half-life of 30 min in mice and 2 h in humans (32, 33). Despite the existence of mouse equivalents to human CYP and UGT isoforms, major differences in isoform sequence and expression patterns limit the extrapolation of mouse data to humans. The development of humanized mouse models for CYP and UGT genes will allow overcoming such issues (34, 35).

Drug–drug interactions can lead to severe adverse effects and predicting these interactions in vivo is challenging. Thus, the Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA) are frequently publishing new guidelines regarding in vitro and in vivo drug–drug interaction studies (36). We have used an in vivo methodology to monitor modulations of tamoxifen metabolism. Intraperitoneal injections of tamoxifen were used instead of oral administration (the typical route of administration in humans) in order to better control the given amounts of tamoxifen and morphine (37). Indeed, the most used method is intraperitoneal injection, because the amount of administered compound can be better controlled, but delivery by oral gavage is also possible. However, oral administration suffers from significant first-pass metabolism (38), which limits absorption (39) and introduces inter-individual variability in drug metabolism (40). The pharmacokinetics of tamoxifen were obtained by quantification of tamoxifen and its metabolites following an initial injection (10 mg/kg). Then, a second injection was used to determine its pharmacokinetics in the absence or the presence of the competing drug morphine. Therefore, it was possible to accurately compare tamoxifen pharmacokinetics in the same animal to assess its potential interaction with morphine in vivo. It is however important to determine whether an injection of the drug of interest can induce adaptive processes responsible for differences in its metabolism following a second injection or chronic treatment.

CONCLUSIONS

In this study, we have investigated the effects of morphine on tamoxifen metabolism in vitro and in vivo. We have shown that in vitro morphine inhibits 4OH-tamoxifen glucuronidation. Conversely, morphine reduced the blood levels of 4OHTamoxifen in mice, while the inactivation of tamoxifen active compounds through glucuronidation greatly increased. Our results suggest that morphine co-treatment could dramatically affect tamoxifen efficacy and emphasize the need to test more common analgesics (e.g., codeine or paracetamol) in humans to re-evaluate the impact of pain treatments on anti-cancer drug metabolism and pharmacological activity.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

All animal procedures were performed in accordance with European directives (2010/63/EU) and were approved by the regional ethics committee and the French Ministry of Agriculture (license No. APAFIS#16827-2018092113192911 v4 to YG).

CONSENT FOR PUBLICATION

All authors have approved the manuscript for submission.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: FG, VC, IW, and YG. Methodology: FG, VC, IW, PD, and YG. Investigation: FG, VC, IW, VH, TM, and A-SA. Writing—original draft: YG, FG, and PD. Writing—review and editing: YG, FG, A-SA, VH, TM, and PD. Funding acquisition, resources, and supervision: YG.

FUNDING

This work was funded by Fondation Alsace Contre le Cancer (YG), ITMO Cancer (YG), Inserm (YG), CNRS (YG), University of Strasbourg (YG), and Ministère Délégué à la Recherche et à l'Enseignement Supérieur (Ph.D. fellowship to IW and FG).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.00025/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnani M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. (2019) 5:66. doi: [10.1038/s41572-019-0111-2](https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2)
- Gail MH, Costantino JP, Bryant J, Croyle R, Freedman L, Helzlsouer K, et al. Weighing the risks and benefits of tamoxifen treatment for preventing breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. (1999) 91:1829–46. doi: [10.1093/jnci/91.21.1829](https://doi.org/10.1093/jnci/91.21.1829)
- Kantelhardt EJ, Hanson C, Albert US, Wacker J. Breast cancer in countries of limited resources. *Breast Care*. (2008) 3:10–6. doi: [10.1159/000114409](https://doi.org/10.1159/000114409)
- Reid JM, Goetz MP, Buhrow SA, Walden C, Safgren SL, Kuffel MJ, et al. Pharmacokinetics of endoxifen and tamoxifen in female mice: implications for comparative *in vivo* activity studies. *Cancer Chemother Pharmacol*. (2014) 74:1271–8. doi: [10.1007/s00280-014-2605-7](https://doi.org/10.1007/s00280-014-2605-7)
- Blume N, Leonard J, Xu ZJ, Watanabe O, Remotti H, Fishman J. Characterization of Cyp2d22, a novel cytochrome P450 expressed in mouse mammary cells. *Arch Biochem Biophys*. (2000) 381:191–204. doi: [10.1006/abbi.2000.1978](https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1978)
- Wu B, Kulkarni K, Basu S, Zhang S, Hu M. First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *J Pharm Sci*. (2011) 100:3655–81. doi: [10.1002/jps.22568](https://doi.org/10.1002/jps.22568)
- Klein DJ, Thorn CF, Desta Z, Flockhart DA, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: tamoxifen pathway, pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics*. (2013) 23:643–7. doi: [10.1097/FPC.0b013e3283656bc1](https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283656bc1)
- Lee SK, Dawson J, Lee JA, Osman G, Levitin MO, Guzel RM, et al. Management of cancer pain: 1. Wider implications of orthodox analgesics. *Int J Gen Med*. (2014) 7:49–58. doi: [10.2147/IJG.M.S42187](https://doi.org/10.2147/IJG.M.S42187)
- Laux-Biehlmann A, Mouheiche J, Veriepe J, Goumon Y. Endogenous morphine and its metabolites in mammals: history, synthesis, localization and perspectives. *Neuroscience*. (2013) 233:95–117. doi: [10.1016/j.neuroscience.2012.12.013](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.013)
- Grace PM, Ramos KM, Rodgers KM, Wang X, Hutchinson MR, Lewis MT, et al. Activation of adult rat CNS endothelial cells by opioid-induced Toll-like receptor 4 (Tlr4) signaling induces proinflammatory, biochemical, morphological, and behavioral sequelae. *Neuroscience*. (2014) 280:299–317. doi: [10.1016/j.neuroscience.2014.09.020](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.020)
- Lotsch J, Geisslinger G. Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clin Pharmacokinet*. (2001) 40:485–99. doi: [10.2165/00003088-200140070-00001](https://doi.org/10.2165/00003088-200140070-00001)
- Weinsanto I, Laux-Biehlmann A, Mouheiche J, Maduna T, Delalande F, Chavant V, et al. Stable isotope-labelled morphine to study *in vivo* central and peripheral morphine glucuronidation and brain transport in tolerant mice. *Br J Pharmacol*. (2018) 175:3844–56. doi: [10.1111/bph.14454](https://doi.org/10.1111/bph.14454)
- Depriest AZ, Puet BL, Holt AC, Roberts A, Cone EJ. Metabolism and disposition of prescription opioids: a review. *Forensic Sci Rev*. (2015) 27:115–45.
- Ishii Y, Miyoshi A, Watanabe R, Tsuruda K, Tsuda M, Yamaguchi-Nagamatsu Y, et al. Simultaneous expression of guinea pig UDP-glucuronosyltransferase 2B21 and 2B22 in COS-7 cells enhances UDP-glucuronosyltransferase 2B21-catalyzed morphine-6-glucuronide formation. *Mol Pharmacol*. (2001) 60:1040–8. doi: [10.1124/mol.60.5.1040](https://doi.org/10.1124/mol.60.5.1040)
- Kurita A, Miyauchi Y, Ikushiro SI, Mackenzie PI, Yamada H, Ishii Y. Comprehensive characterization of mouse UDP-glucuronosyltransferase (Ugt) belonging to the Ugt2b subfamily: identification of Ugt2b36 as the predominant isoform involved in morphine glucuronidation. *J Pharmacol Exp Ther*. (2017) 361:199–208. doi: [10.1124/jpet.117.240382](https://doi.org/10.1124/jpet.117.240382)
- Zelcer N, van de Wetering K, Hillebrand M, Sarton E, Kuil A, Wielinga PR, et al. Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2005) 102:7274–9. doi: [10.1073/pnas.0502530102](https://doi.org/10.1073/pnas.0502530102)
- Beijnen JH, Schellens JH. Drug interactions in oncology. *Lancet Oncol*. (2004) 5:489–96. doi: [10.1016/S1470-2045\(04\)01528-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01528-1)
- Waters NJ. Evaluation of drug-drug interactions for oncology therapies: *in vitro-in vivo* extrapolation model-based risk assessment. *Br J Clin Pharmacol*. (2015) 79:946–58. doi: [10.1111/bcp.12563](https://doi.org/10.1111/bcp.12563)
- Shiratani H, Katoh M, Nakajima M, Yokoi T. Species differences in UDP-glucuronosyltransferase activities in mice and rats. *Drug Metab Dispos*. (2008) 36:1745–52. doi: [10.1124/dmd.108.021469](https://doi.org/10.1124/dmd.108.021469)
- Mackenzie PI, Hu DG, Gardner-Stephen DA. The regulation of UDP-glucuronosyltransferase genes by tissue-specific and ligand-activated transcription factors. *Drug Metab Rev*. (2010) 42:99–109. doi: [10.3109/03602530903209544](https://doi.org/10.3109/03602530903209544)
- Johanning J, Kroner P, Thomas M, Zanger UM, Norenberg A, Eichelbaum M, et al. The formation of estrogen-like tamoxifen metabolites and their influence on enzyme activity and gene expression of ADME genes. *Arch Toxicol*. (2018) 92:1099–112. doi: [10.1007/s00204-017-2147-y](https://doi.org/10.1007/s00204-017-2147-y)
- Falany JL, Pilloff DE, Leyh TS, Falany CN. Sulfation of raloxifene and 4-hydroxytamoxifen by human cytosolic sulfotransferases. *Drug Metab Dispos*. (2006) 34:361–8. doi: [10.1124/dmd.105.006551](https://doi.org/10.1124/dmd.105.006551)
- Squirewell EJ, Qin X, Duffel MW. Endoxifen and other metabolites of tamoxifen inhibit human hydroxysteroid sulfotransferase 2A1 (hSULT2A1). *Drug Metab Dispos*. (2014) 42:1843–50. doi: [10.1124/dmd.114.059709](https://doi.org/10.1124/dmd.114.059709)
- Tzvetkov MV, dos Santos Pereira JN, Meineke I, Saadatmand AR, Stingl JC, Brockmüller J. Morphine is a substrate of the organic cation transporter OCT1 and polymorphisms in OCT1 gene affect morphine pharmacokinetics after codeine administration. *Biochem Pharmacol*. (2013) 86:666–78. doi: [10.1016/j.bcp.2013.06.019](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.06.019)
- Iusuf D, Teunissen SF, Wagenaar E, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH. P-glycoprotein (ABCB1) transports the primary active tamoxifen metabolites endoxifen and 4-hydroxytamoxifen and restricts their brain penetration. *J Pharmacol Exp Ther*. (2011) 337:710–7. doi: [10.1124/jpet.110.178301](https://doi.org/10.1124/jpet.110.178301)
- Teft WA, Mansell SE, Kim RB. Endoxifen, the active metabolite of tamoxifen, is a substrate of the efflux transporter P-glycoprotein (multidrug resistance 1). *Drug Metab Dispos*. (2011) 39:558–62. doi: [10.1124/dmd.110.036160](https://doi.org/10.1124/dmd.110.036160) Swarn RA, Paice JA, Anghelescu DL, Are M, Bruce JY, Buga S, et al. Adult cancer pain, Version 3.2019, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Cancer Netw*. (2019) 17:977–1007. doi: [10.6004/jnccn.2019.0038](https://doi.org/10.6004/jnccn.2019.0038) Vree TB, Verwey-van Wissen CP. Pharmacokinetics and metabolism of codeine in humans. *Biopharm Drug Dispos*. (1992) 13:445–60. doi: [10.1002/bdd.2510130607](https://doi.org/10.1002/bdd.2510130607)

28. Mutlib AE, Goosen TC, Bauman JN, Williams JA, Kulkarni S, Kostrubsky S. Kinetics of acetaminophen glucuronidation by UDP-glucuronosyltransferases 1A1, 1A6, 1A9 and 2B15. Potential implications in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol.* (2006) 19:701–9. doi: [10.1021/tx05_0317i](https://doi.org/10.1021/tx05_0317i)
29. Goss PE, Strasser K. Aromatase inhibitors in the treatment and prevention of breast cancer. *J Clin Oncol.* (2001) 19:881–94. doi: [10.1200/JCO.2001.19.3.881](https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.3.881)
30. Linardi A, Damiani D, Longui CA. The use of aromatase inhibitors in boys with short stature: what to know before prescribing? *Arch Endocrinol Metab.* (2017) 61:391–7. doi: [10.1590/2359-3997000000284](https://doi.org/10.1590/2359-3997000000284)
31. Hasselstrom J, Sawe J. Morphine pharmacokinetics and metabolism in humans. Enterohepatic cycling and relative contribution of metabolites to active opioid concentrations. *Clin Pharmacokinet.* (1993) 24:344–54. doi: [10.2165/00003088-199324040-00007](https://doi.org/10.2165/00003088-199324040-00007)
32. Handal M, Grung M, Skurtveit S, Ripel A, Morland J. Pharmacokinetic differences of morphine and morphine-glucuronides are reflected in locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav.* (2002) 73:883–92. doi: [10.1016/S0091-3057\(02\)00925-5](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)00925-5)
33. Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, et al. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst.* (2003) 95:1758–64. doi: [10.1093/jnci/djg108](https://doi.org/10.1093/jnci/djg108)
34. MacLeod AK, McLaughlin LA, Henderson CJ, Wolf CR. Application of Mice Humanized for CYP2D6 to the study of tamoxifen metabolism and drug-drug interaction with antidepressants. *Drug Metab Dispos.* (2017) 45:17–22. doi: [10.1124/dmd.116.073437](https://doi.org/10.1124/dmd.116.073437)
35. Prueksaritanont T, Chu X, Gibson C, Cui D, Yee KL, Ballard J, et al. Drug-drug interaction studies: regulatory guidance and an industry perspective. *AAPS J.* (2013) 15:629–45. doi: [10.1208/s12248-013-9470-x](https://doi.org/10.1208/s12248-013-9470-x)
36. Whitfield J, Littlewood T, Soucek L. Tamoxifen administration to mice. *Cold Spring Harb Protoc.* (2015) 2015:269–71. doi: [10.1101/pdb.prot077966](https://doi.org/10.1101/pdb.prot077966)
37. Shin SC, Choi JS, Li X. Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. *Int J Pharm.* (2006) 313:144–9. doi: [10.1016/j.ijpharm.2006.01.028](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.01.028)
38. Buchanan CM, Buchanan NL, Edgar KJ, Little JL, Malcolm MO, Ruble KM, et al. Pharmacokinetics of tamoxifen after intravenous and oral dosing of tamoxifen-hydroxybutenyl-beta-cyclodextrin formulations. *J Pharm Sci.* (2007) 96:644–60. doi: [10.1002/jps.20709](https://doi.org/10.1002/jps.20709)
39. Undevia SD, Gomez-Abuin G, Ratain MJ. Pharmacokinetic variability of anticancer agents. *Nat Rev Cancer.* (2005) 5:447–58. doi: [10.1038/nrc1629](https://doi.org/10.1038/nrc1629)

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

Copyright © 2020 Gabel, Aubry, Hovhannisyan, Chavant, Weinsanto, Maduna, Darbon and Goumon. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 11 : Liste de publications scientifiques

Liste des travaux publiés :

2020, *Frontiers in Oncology*, Unveiling the Impact of Morphine on Tamoxifen Metabolism in Mice in vivo, **Florian Gabel**, Anne-Sophie Aubry, Volodya Hovhannisyan, Virginie Chavant, Ivan Weinsanto, Tando Maduna, Pascal Darbon and Yannick Goumon

2018, *British Journal Of Pharmacology*, Stable Isotope-Labelled Morphine to Study in vivo Central and Peripheral Morphine Glucuronidation and Brain Transport in Tolerant Mice, Ivan Weinsanto, Alexis Laux-Biehlmann, Jinane Mouheiche, Tando Maduna, François Delalande, Virginie Chavant, **Florian Gabel**, Pascal Darbon, Alexandre Charlet, Pierrick Poisbeau, Marc Lamshöft, Alain Van Dorsselaer, Sarah Cianferani, Marie-Odile Parat and Yannick Goumon.

Dans cette publication, j'ai participé à la réflexion et à la relecture de l'article.

2018, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Morphine Binds Creatine Kinase B and Inhibits Its Activity, Ivan Weinsanto, Jinane Mouheiche, Alexis Laux-Biehlmann, François Delalande, Arnaud Marquette, Virginie Chavant, **Florian Gabel**, Sarah Cianferani, Alexandre Charlet, Marie-Odile Parat and Yannick Goumon

Dans cette publication, j'ai participé à la réflexion et à la relecture de l'article.

Liste des travaux en cours :

2021, *British Journal Of Pharmacology*, Central metabolism as a potential origin of sex differences in morphine analgesia but not in the induction of analgesic tolerance in mice, **Florian Gabel**, Volodya Hovhannisyan, Virginie Andry and Yannick Goumon : **Article en révision.**

Review en cours d'écriture : Morphine-3-glucuronide : physiology and behaviour **Florian Gabel**, Volodya Hovhannisyan and Yannick Goumon

Liste des communications :

19 au 21 Mai 2021, Neurofrance, congrès virtuel. Central metabolism as a potential origin of sex differences in morphine analgesia but not in the induction of analgesic tolerance in mice, **Florian Gabel**, Volodya Hovhannisyan, Virginie Andry and Yannick Goumon : **Présentation d'un poster.**

9 au 11 Novembre 2021, SFN, congrès virtuel. Central metabolism as a potential origin of sex differences in morphine analgesia but not in the induction of analgesic tolerance in mice, **Florian Gabel**, Volodya Hovhannisyan, Virginie Andry and Yannick Goumon : **Présentation d'un poster.**

9 Novembre 2021, 21e Journée Scientifique de la Ligue contre le cancer. Unveiling the Impact of Morphine on Tamoxifen Metabolism in Mice in vivo. **Florian Gabel**, Anne-Sophie Aubry, Volodya Hovhannisyan, Virginie Chavant, Ivan Weinsanto, Tando Maduna, Pascal Darbon and Yannick Goumon : **Présentation d'un poster.**

Bibliographie

- Aasmundstad, T. A., Morland, J., & Paulsen, R. E. (1995). Distribution of morphine 6-glucuronide and morphine across the blood-brain barrier in awake, freely moving rats investigated by in vivo microdialysis sampling. *J Pharmacol Exp Ther*, 275(1), 435-441.
- Abbott, F. V., & Franklin, K. B. (1991). Morphine-6-glucuronide contributes to rewarding effects of opiates. *Life Sci*, 48(12), 1157-1163. doi:10.1016/0024-3205(91)90453-i
- Abbott, F. V., & Palmour, R. M. (1988). Morphine-6-glucuronide: analgesic effects and receptor binding profile in rats. *Life Sci*, 43(21), 1685-1695. doi:10.1016/0024-3205(88)90479-1
- Abildskov, K., Weldy, P., & Garland, M. (2010). Molecular cloning of the baboon UDP-glucuronosyltransferase 2B gene family and their activity in conjugating morphine. *Drug Metab Dispos*, 38(4), 545-553. doi:10.1124/dmd.109.030635
- Achour, B., Russell, M. R., Barber, J., & Rostami-Hodjegan, A. (2014). Simultaneous quantification of the abundance of several cytochrome P450 and uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferase enzymes in human liver microsomes using multiplexed targeted proteomics. *Drug Metab Dispos*, 42(4), 500-510. doi:10.1124/dmd.113.055632
- Ahmad, F., Rossen, LM, Sutton, P. (2021, 13 octobre 2021). Provisional drug overdose death counts. Retrieved from <https://www.cdc.gov/nchs/nvss/vsrr/drug-overdose-data.htm>
- Aicher, S. A., Punnoose, A., & Goldberg, A. (2000). mu-Opioid receptors often colocalize with the substance P receptor (NK1) in the trigeminal dorsal horn. *J Neurosci*, 20(11), 4345-4354.
- Aicher, S. A., Sharma, S., Cheng, P. Y., Liu-Chen, L. Y., & Pickel, V. M. (2000). Dual ultrastructural localization of mu-opiate receptors and substance p in the dorsal horn. *Synapse*, 36(1), 12-20. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(200004)36:1<12::AID-SYN2>3.0.CO;2-E
- Al-Hasani, R., & Bruchas, M. R. (2011). Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*, 115(6), 1363-1381. doi:10.1097/ALN.0b013e318238bba6
- Allette, Y. M., Kim, Y., Randolph, A. L., Smith, J. A., Ripsch, M. S., & White, F. A. (2017). Decoy peptide targeted to Toll-IL-1R domain inhibits LPS and TLR4-active metabolite morphine-3 glucuronide sensitization of sensory neurons. *Sci Rep*, 7(1), 3741. doi:10.1038/s41598-017-03447-9
- Alnouti, Y. M., Shelby, M. K., Chen, C., & Klaassen, C. D. (2007). Influence of phenobarbital on morphine metabolism and disposition: LC-MS/MS determination of morphine (M) and morphine-3-glucuronide (M3G) in Wistar-Kyoto rat serum, bile, and urine. *Curr Drug Metab*, 8(1), 79-89. doi:10.2174/138920007779315026
- Aloisi, A. M., Ceccarelli, I., Fiorenzani, P., Maddalena, M., Rossi, A., Tomei, V., . . . Giordano, A. (2010). Aromatase and 5-alpha reductase gene expression: modulation by pain and morphine treatment in male rats. *Mol Pain*, 6, 69. doi:10.1186/1744-8069-6-69
- Andersen, G., Christrup, L. L., Sjøgren, P., Hansen, S. H., & Jensen, N. H. (2002). Changing M3G/M6G ratios and pharmacodynamics in a cancer patient during long-term morphine treatment. *J Pain Symptom Manage*, 23(2), 161-164. doi:10.1016/s0885-3924(01)00398-0
- Andersson, M., Bjorkhem-Bergman, L., Ekstrom, L., Bergqvist, L., Lagercrantz, H., Rane, A., & Beck, O. (2014). Detection of morphine-3-sulfate and morphine-6-sulfate in human urine and plasma, and formation in liver cytosol. *Pharmacol Res Perspect*, 2(6), e00071. doi:10.1002/prp2.71
- Antonijevic, I., Mousa, S. A., Schafer, M., & Stein, C. (1995). Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. *J Neurosci*, 15(1 Pt 1), 165-172.

- Antonilli, L., De Carolis, L., Brusadin, V., Togna, A. R., Dovizio, M., Togna, G. I., . . . Nencini, P. (2012). Repeated exposure to codeine alters morphine glucuronidation by affecting UGT gene expression in the rat. *Eur J Pharmacol*, *693*(1-3), 7-14. doi:10.1016/j.ejphar.2012.07.045
- Apkarian, A. V., Bushnell, M. C., Treede, R. D., & Zubieta, J. K. (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain*, *9*(4), 463-484. doi:10.1016/j.ejpain.2004.11.001
- Aquilante, C. L., Letrent, S. P., Pollack, G. M., & Brouwer, K. L. (2000). Increased brain P-glycoprotein in morphine tolerant rats. *Life Sci*, *66*(4), PL47-51. doi:10.1016/s0024-3205(99)00599-8
- AROUT, C. A., Caldwell, M., McCloskey, D. P., & Kest, B. (2014). C-Fos activation in the periaqueductal gray following acute morphine-3beta-D-glucuronide or morphine administration. *Physiol Behav*, *130*, 28-33. doi:10.1016/j.physbeh.2014.02.056
- Arttamangkul, S., Quillinan, N., Low, M. J., von Zastrow, M., Pintar, J., & Williams, J. T. (2008). Differential activation and trafficking of micro-opioid receptors in brain slices. *Mol Pharmacol*, *74*(4), 972-979. doi:10.1124/mol.108.048512
- Asai, Y., Sakakibara, Y., Onouchi, H., Nadai, M., & Katoh, M. (2017). Characterization of beta-Estradiol 3-Glucuronidation in Rat Brain. *Biol Pharm Bull*, *40*(9), 1556-1560. doi:10.1248/bpb.b17-00089
- Aubrun, F., Langeron, O., Quesnel, C., Coriat, P., & Riou, B. (2003). Relationships between measurement of pain using visual analog score and morphine requirements during postoperative intravenous morphine titration. *Anesthesiology*, *98*(6), 1415-1421. doi:10.1097/00000542-200306000-00017
- Aubrun, F., Salvi, N., Coriat, P., & Riou, B. (2005). Sex- and age-related differences in morphine requirements for postoperative pain relief. *Anesthesiology*, *103*(1), 156-160. doi:10.1097/00000542-200507000-00023
- Ayoo, K., Mikhaeil, J., Huang, A., & Wasowicz, M. (2020). The opioid crisis in North America: facts and future lessons for Europe. *Anaesthesiol Intensive Ther*, *52*(2), 139-147. doi:10.5114/ait.2020.94756
- Baber, M., Bapat, P., Nichol, G., & Koren, G. (2016). The pharmacogenetics of opioid therapy in the management of postpartum pain: a systematic review. *Pharmacogenomics*, *17*(1), 75-93. doi:10.2217/pgs.15.157
- Bader, M. F., Taupenot, L., Ulrich, G., Aunis, D., & Ciesielski-Treska, J. (1994). Bacterial endotoxin induces [Ca²⁺]_i transients and changes the organization of actin in microglia. *Glia*, *11*(4), 336-344. doi:10.1002/glia.440110406
- Baggesgaard Rasmussen, H., & Berger J. (1955). On the Graphic Formula of Morphine and a Rational Nomenclature of Morphine Derivatives *Bulletin on Narcotics*, *6*(3), 30-32.
- Bagley, E. E., Chieng, B. C., Christie, M. J., & Connor, M. (2005). Opioid tolerance in periaqueductal gray neurons isolated from mice chronically treated with morphine. *Br J Pharmacol*, *146*(1), 68-76. doi:10.1038/sj.bjp.0706315
- Bai, L., Zhai, C., Han, K., Li, Z., Qian, J., Jing, Y., . . . Xu, J. T. (2014). Toll-like receptor 4-mediated nuclear factor-kappaB activation in spinal cord contributes to chronic morphine-induced analgesic tolerance and hyperalgesia in rats. *Neurosci Bull*, *30*(6), 936-948. doi:10.1007/s12264-014-1483-7
- Bai, X., Wang, C., Zhang, X., Feng, Y., & Zhang, X. (2020). The role of testosterone in mu-opioid receptor expression in the trigeminal ganglia of opioid-tolerant rats. *Neurosci Lett*, *723*, 134868. doi:10.1016/j.neulet.2020.134868
- Bailey, C. P., Llorente, J., Gabra, B. H., Smith, F. L., Dewey, W. L., Kelly, E., & Henderson, G. (2009). Role of protein kinase C and mu-opioid receptor (MOPr) desensitization in

- tolerance to morphine in rat locus coeruleus neurons. *Eur J Neurosci*, 29(2), 307-318. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06573.x
- Baker, L., & Ratka, A. (2002). Sex-specific differences in levels of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine antinociception in rats. *Pain*, 95(1-2), 65-74. doi:10.1016/s0304-3959(01)00376-1
- Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*, 16(1), 1-13. doi:10.1016/j.nbd.2003.12.016
- Bao, B. Y., Chuang, B. F., Wang, Q., Sartor, O., Balk, S. P., Brown, M., . . . Lee, G. S. (2008). Androgen receptor mediates the expression of UDP-glucuronosyltransferase 2 B15 and B17 genes. *Prostate*, 68(8), 839-848. doi:10.1002/pros.20749
- Bardoni, R., Tawfik, V. L., Wang, D., Francois, A., Solorzano, C., Shuster, S. A., . . . Scherrer, G. (2014). Delta opioid receptors presynaptically regulate cutaneous mechanosensory neuron input to the spinal cord dorsal horn. *Neuron*, 81(6), 1312-1327. doi:10.1016/j.neuron.2014.01.044
- Barjavel, M., Sandouk, P., Plotkine, M., & Scherrmann, J. M. (1994). Morphine and morphine metabolite kinetics in the rat brain as assessed by transcortical microdialysis. *Life Sci*, 55(16), 1301-1308. doi:10.1016/0024-3205(94)90069-8
- Barjavel, M. J., Scherrmann, J. M., & Bhargava, H. N. (1995). Relationship between morphine analgesia and cortical extracellular fluid levels of morphine and its metabolites in the rat: a microdialysis study. *Br J Pharmacol*, 116(8), 3205-3210. doi:10.1111/j.1476-5381.1995.tb15125.x
- Baron, R., Binder, A., & Wasner, G. (2010). Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol*, 9(8), 807-819. doi:10.1016/S1474-4422(10)70143-5
- Barreau, M., Chenaf C, Kabore JL, Bertin C, Delorme J, Riquelme-Arbre M, Eschalier A, Ardid D, Delage N, & Authier N. (2017). Pharmacoépidémiologie de l'usage des antalgiques opioïdes en France. *Trends in opioid analgesic use in France*, 31(4), 110-112.
- Barrett, A. C., Cook, C. D., Terner, J. M., Craft, R. M., & Picker, M. J. (2001). Importance of sex and relative efficacy at the mu opioid receptor in the development of tolerance and cross-tolerance to the antinociceptive effects of opioids. *Psychopharmacology (Berl)*, 158(2), 154-164. doi:10.1007/s002130100821
- Bartlett, S. E., Cramond, T., & Smith, M. T. (1994). The excitatory effects of morphine-3-glucuronide are attenuated by LY274614, a competitive NMDA receptor antagonist, and by midazolam, an agonist at the benzodiazepine site on the GABAA receptor complex. *Life Sci*, 54(10), 687-694. doi:10.1016/0024-3205(94)00552-4
- Bartlett, S. E., Dodd, P. R., & Smith, M. T. (1994). Pharmacology of morphine and morphine-3-glucuronide at opioid, excitatory amino acid, GABA and glycine binding sites. *Pharmacol Toxicol*, 75(2), 73-81. doi:10.1111/j.1600-0773.1994.tb00327.x
- Bartlett, S. E., & Smith, M. T. (1995). The apparent affinity of morphine-3-glucuronide at mu1-opioid receptors results from morphine contamination: demonstration using HPLC and radioligand binding. *Life Sci*, 57(6), 609-615. doi:10.1016/0024-3205(95)00311-s
- Bartlett, S. E., & Smith, M. T. (1996). Effects of morphine-3-glucuronide and morphine on the K+-evoked release of [3H]-glutamic acid and [14C]-gamma-aminobutyric acid from rat brain synaptosomes. *Life Sci*, 58(5), 447-454. doi:10.1016/0024-3205(95)02310-0
- Bartok, R. E., & Craft, R. M. (1997). Sex differences in opioid antinociception. *J Pharmacol Exp Ther*, 282(2), 769-778.
- Bederson, J. B., Fields, H. L., & Barbaro, N. M. (1990). Hyperalgesia during naloxone-precipitated withdrawal from morphine is associated with increased on-cell activity in

- the rostral ventromedial medulla. *Somatosens Mot Res*, 7(2), 185-203. doi:10.3109/08990229009144706
- Beitz, A. J., Mullett, M. A., & Weiner, L. L. (1983). The periaqueductal gray projections to the rat spinal trigeminal, raphe magnus, gigantocellular pars alpha and paragigantocellular nuclei arise from separate neurons. *Brain Res*, 288(1-2), 307-314. doi:10.1016/0006-8993(83)90108-7
- Bennett, M. I., Rayment, C., Hjermstad, M., Aass, N., Caraceni, A., & Kaasa, S. (2012). Prevalence and aetiology of neuropathic pain in cancer patients: a systematic review. *Pain*, 153(2), 359-365. doi:10.1016/j.pain.2011.10.028
- Benovic, J. L., Pike, L. J., Cerione, R. A., Staniszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J., . . . Lefkowitz, R. J. (1985). Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem*, 260(11), 7094-7101.
- Berger, A. C., & Whistler, J. L. (2010). How to design an opioid drug that causes reduced tolerance and dependence. *Ann Neurol*, 67(5), 559-569. doi:10.1002/ana.22002
- Bernal, S. A., Morgan, M. M., & Craft, R. M. (2007). PAG mu opioid receptor activation underlies sex differences in morphine antinociception. *Behav Brain Res*, 177(1), 126-133. doi:10.1016/j.bbr.2006.10.028
- Bhargava, H. N., Villar, V. M., Rahmani, N. H., & Larsen, A. K. (1992). Distribution of morphine in brain regions, spinal cord and serum following intravenous injection to morphine tolerant rats. *Brain Res*, 595(2), 228-235. doi:10.1016/0006-8993(92)91054-i
- Bhargava, H. N., Villar, V. M., Rahmani, N. H., & Larsen, A. K. (1993). Time course of the distribution of morphine in brain regions, spinal cord and serum following intravenous injection to rats of differing ages. *Pharmacology*, 47(1), 13-23. doi:10.1159/000139073
- Bian, J. T., & Bhargava, H. N. (1996). Effects of morphine-3-glucuronide on the antinociceptive activity of peptide and nonpeptide opioid receptor agonists in mice. *Peptides*, 17(8), 1415-1419. doi:10.1016/s0196-9781(96)00215-x
- Bickel, U., Schumacher, O. P., Kang, Y. S., & Voigt, K. (1996). Poor permeability of morphine 3-glucuronide and morphine 6-glucuronide through the blood-brain barrier in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 278(1), 107-113.
- Bidlack, J. M. (2000). Detection and function of opioid receptors on cells from the immune system. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7(5), 719-723. doi:10.1128/CDLI.7.5.719-723.2000
- Bijur, P. E., Esses, D., Birnbaum, A., Chang, A. K., Schechter, C., & Gallagher, E. J. (2008). Response to morphine in male and female patients: analgesia and adverse events. *Clin J Pain*, 24(3), 192-198. doi:10.1097/AJP.0b013e31815d3619
- Binning, A. R., Przesmycki, K., Sowinski, P., Morrison, L. M., Smith, T. W., Marcus, P., . . . Dahan, A. (2011). A randomised controlled trial on the efficacy and side-effect profile (nausea/vomiting/sedation) of morphine-6-glucuronide versus morphine for post-operative pain relief after major abdominal surgery. *Eur J Pain*, 15(4), 402-408. doi:10.1016/j.ejpain.2010.09.007
- Bjorkman, S., Akeson, J., Helfer, M., Fyge, A., & Gustafsson, L. L. (1995). Cerebral uptake of morphine in the pig calculated from arterio-venous plasma concentration gradients: an alternative to tissue microdialysis. *Life Sci*, 57(25), 2335-2345. doi:10.1016/0024-3205(95)02228-b
- Blanchet, C., & Luscher, C. (2002). Desensitization of mu-opioid receptor-evoked potassium currents: initiation at the receptor, expression at the effector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(7), 4674-4679. doi:10.1073/pnas.072075399

- Blomqvist, K. J., Viisanen, H., Ahlstrom, F. H. G., Jokinen, V., Sidorova, Y. A., Suleymanova, I., . . . Lilius, T. O. (2020). Morphine-3-glucuronide causes antinociceptive cross-tolerance to morphine and increases spinal substance P expression. *Eur J Pharmacol*, 875, 173021. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173021
- Bobeck, E. N., Chen, Q., Morgan, M. M., & Ingram, S. L. (2014). Contribution of adenylyl cyclase modulation of pre- and postsynaptic GABA neurotransmission to morphine antinociception and tolerance. *Neuropsychopharmacology*, 39(9), 2142-2152. doi:10.1038/npp.2014.62
- Bobeck, E. N., Haseman, R. A., Hong, D., Ingram, S. L., & Morgan, M. M. (2012). Differential development of antinociceptive tolerance to morphine and fentanyl is not linked to efficacy in the ventrolateral periaqueductal gray of the rat. *J Pain*, 13(8), 799-807. doi:10.1016/j.jpain.2012.05.005
- Bodd, E., Jacobsen, D., Lund, E., Ripel, A., Morland, J., & Wiik-Larsen, E. (1990). Morphine-6-glucuronide might mediate the prolonged opioid effect of morphine in acute renal failure. *Hum Exp Toxicol*, 9(5), 317-321. doi:10.1177/0960327190000900509
- Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R., Lin, F. T., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (2000). Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature*, 408(6813), 720-723. doi:10.1038/35047086
- Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (2002). Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in (beta)arrestin-2 knock-out mice. *J Neurosci*, 22(23), 10494-10500.
- Bolander, H., Kourtopoulos, H., Lundberg, S., & Persson, S. A. (1983). Morphine concentrations in serum, brain and cerebrospinal fluid in the rat after intravenous administration of a single dose. *J Pharm Pharmacol*, 35(10), 656-659. doi:10.1111/j.2042-7158.1983.tb02860.x
- Bond, J. A., Medinsky, M. A., Dent, J. G., & Rickert, D. E. (1981). Sex-dependent metabolism and biliary excretion of [2,4-14C] dinitrotoluene in isolated perfused rat livers. *J Pharmacol Exp Ther*, 219(3), 598-603.
- Bostrom, E., Hammarlund-Udenaes, M., & Simonsson, U. S. (2008). Blood-brain barrier transport helps to explain discrepancies in in vivo potency between oxycodone and morphine. *Anesthesiology*, 108(3), 495-505. doi:10.1097/ALN.0b013e318164cf9e
- Bouhassira, D., Lanteri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B., & Touboul, C. (2008). Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*, 136(3), 380-387. doi:10.1016/j.pain.2007.08.013
- Bourasset, F., Cisternino, S., Temsamani, J., & Scherrmann, J. M. (2003). Evidence for an active transport of morphine-6-beta-d-glucuronide but not P-glycoprotein-mediated at the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 86(6), 1564-1567. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01990.x
- Bouw, M. R., Gardmark, M., & Hammarlund-Udenaes, M. (2000). Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of morphine transport across the blood-brain barrier as a cause of the antinociceptive effect delay in rats--a microdialysis study. *Pharm Res*, 17(10), 1220-1227. doi:10.1023/a:1026414713509
- Bouw, M. R., Xie, R., Tunblad, K., & Hammarlund-Udenaes, M. (2001). Blood-brain barrier transport and brain distribution of morphine-6-glucuronide in relation to the antinociceptive effect in rats--pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling. *Br J Pharmacol*, 134(8), 1796-1804. doi:10.1038/sj.bjp.0704406
- Boyer, J. S., Morgan, M. M., & Craft, R. M. (1998). Microinjection of morphine into the rostral ventromedial medulla produces greater antinociception in male compared to female rats. *Brain Res*, 796(1-2), 315-318. doi:10.1016/s0006-8993(98)00353-9

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Brands, A., Munzel, P. A., & Bock, K. W. (2000). In situ hybridization studies of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 expression in rat testis and brain. *Biochem Pharmacol*, 59(11), 1441-1444. doi:10.1016/s0006-2952(00)00274-4
- Breivik, H., Eisenberg, E., O'Brien, T., & Openminds. (2013). The individual and societal burden of chronic pain in Europe: the case for strategic prioritisation and action to improve knowledge and availability of appropriate care. *BMC Public Health*, 13, 1229. doi:10.1186/1471-2458-13-1229
- Brodin, E., Ernberg, M., & Olgard L. (2016). Neurobiology: General considerations – from acute to chronic pain. *Nor Tannlegeforening Tid*(126), 28–33.
- Brook, K., Bennett, J., & Desai, S. P. (2017). The Chemical History of Morphine: An 8000-year Journey, from Resin to de-novo Synthesis. *J Anesth Hist*, 3(2), 50-55. doi:10.1016/j.janh.2017.02.001
- Bruchas, M. R., & Roth, B. L. (2016). New Technologies for Elucidating Opioid Receptor Function. *Trends Pharmacol Sci*, 37(4), 279-289. doi:10.1016/j.tips.2016.01.001
- Buckley, D. B., & Klaassen, C. D. (2007). Tissue- and gender-specific mRNA expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in mice. *Drug Metab Dispos*, 35(1), 121-127. doi:10.1124/dmd.106.012070
- Budai, D., & Fields, H. L. (1998). Endogenous opioid peptides acting at mu-opioid receptors in the dorsal horn contribute to midbrain modulation of spinal nociceptive neurons. *J Neurophysiol*, 79(2), 677-687. doi:10.1152/jn.1998.79.2.677
- Callaghan, R., & Riordan, J. R. (1993). Synthetic and natural opiates interact with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *J Biol Chem*, 268(21), 16059-16064.
- Campion, K. N., Saville, K. A., & Morgan, M. M. (2016). Relative contribution of the dorsal raphe nucleus and ventrolateral periaqueductal gray to morphine antinociception and tolerance in the rat. *Eur J Neurosci*, 44(9), 2667-2672. doi:10.1111/ejn.13378
- Candido, J., Lutfy, K., Billings, B., Sierra, V., Duttaroy, A., Inturrisi, C. E., & Yoburn, B. C. (1992). Effect of adrenal and sex hormones on opioid analgesia and opioid receptor regulation. *Pharmacol Biochem Behav*, 42(4), 685-692. doi:10.1016/0091-3057(92)90015-8
- Cann, C., Curran, J., Milner, T., & Ho, B. (2002). Unwanted effects of morphine-6-glucuronide and morphine. *Anaesthesia*, 57(12), 1200-1203. doi:10.1046/j.1365-2044.2002.02624_2.x
- Carlin, M. G., Dean, J. R., & Ames, J. M. (2020). Opium Alkaloids in Harvested and Thermally Processed Poppy Seeds. *Front Chem*, 8, 737. doi:10.3389/fchem.2020.00737
- Carrupt, P. A., Testa, B., Bechalany, A., el Tayar, N., Descas, P., & Perrissoud, D. (1991). Morphine 6-glucuronide and morphine 3-glucuronide as molecular chameleons with unexpected lipophilicity. *J Med Chem*, 34(4), 1272-1275. doi:10.1021/jm00108a005
- Cataldo, G., Bernal, S., Markowitz, A., Ogawa, S., Ragnauth, A., Pfaff, D. W., & Bodnar, R. J. (2005). Organizational manipulation of gonadal hormones and systemic morphine analgesia in female rats: effects of adult ovariectomy and estradiol replacement. *Brain Res*, 1059(1), 13-19. doi:10.1016/j.brainres.2005.08.003
- Cepeda, M. S., & Carr, D. B. (2003). Women experience more pain and require more morphine than men to achieve a similar degree of analgesia. *Anesth Analg*, 97(5), 1464-1468. doi:10.1213/01.ANE.0000080153.36643.83
- Cepeda, M. S., Farrar, J. T., Baumgarten, M., Boston, R., Carr, D. B., & Strom, B. L. (2003). Side effects of opioids during short-term administration: effect of age, gender, and race. *Clin Pharmacol Ther*, 74(2), 102-112. doi:10.1016/S0009-9236(03)00152-8

- Chaves, C., Remiao, F., Cisternino, S., & Decleves, X. (2017). Opioids and the Blood-Brain Barrier: A Dynamic Interaction with Consequences on Drug Disposition in Brain. *Curr Neuropharmacol*, *15*(8), 1156-1173. doi:10.2174/1570159X15666170504095823
- Che, T., Majumdar, S., Zaidi, S. A., Ondachi, P., McCorvy, J. D., Wang, S., . . . Roth, B. L. (2018). Structure of the Nanobody-Stabilized Active State of the Kappa Opioid Receptor. *Cell*, *172*(1-2), 55-67 e15. doi:10.1016/j.cell.2017.12.011
- Chen, S. R., & Pan, H. L. (2006). Blocking mu opioid receptors in the spinal cord prevents the analgesic action by subsequent systemic opioids. *Brain Res*, *1081*(1), 119-125. doi:10.1016/j.brainres.2006.01.053
- Chen, X. Y., Zhao, L. M., & Zhong, D. F. (2003). A novel metabolic pathway of morphine: formation of morphine glucosides in cancer patients. *Br J Clin Pharmacol*, *55*(6), 570-578. doi:10.1046/j.1365-2125.2003.01794.x
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J. A., & Yu, L. (1993). Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol*, *44*(1), 8-12.
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., & Yu, L. (1993). Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem J*, *295* (Pt 3), 625-628. doi:10.1042/bj2950625
- Chen, Y. P., Chen, S. R., & Pan, H. L. (2005). Systemic morphine inhibits dorsal horn projection neurons through spinal cholinergic system independent of descending pathways. *J Pharmacol Exp Ther*, *314*(2), 611-617. doi:10.1124/jpet.105.085563
- Chen, Z. R., Irvine, R. J., Somogyi, A. A., & Bochner, F. (1991). Mu receptor binding of some commonly used opioids and their metabolites. *Life Sci*, *48*(22), 2165-2171. doi:10.1016/0024-3205(91)90150-a
- Chenaf, C., Delorme, J., Delage, N., Ardid, D., Eschalier, A., & Authier, N. (2018). Prevalence of chronic pain with or without neuropathic characteristics in France using the capture-recapture method: a population-based study. *Pain*, *159*(11), 2394-2402. doi:10.1097/j.pain.0000000000001347
- Chia, Y. Y., Chow, L. H., Hung, C. C., Liu, K., Ger, L. P., & Wang, P. N. (2002). Gender and pain upon movement are associated with the requirements for postoperative patient-controlled iv analgesia: a prospective survey of 2,298 Chinese patients. *Can J Anaesth*, *49*(3), 249-255. doi:10.1007/BF03020523
- Chieng, B., & Christie, M. D. (1996). Local opioid withdrawal in rat single periaqueductal gray neurons in vitro. *J Neurosci*, *16*(22), 7128-7136.
- Chieng, B., & Christie, M. J. (1994). Hyperpolarization by opioids acting on mu-receptors of a sub-population of rat periaqueductal gray neurones in vitro. *Br J Pharmacol*, *113*(1), 121-128. doi:10.1111/j.1476-5381.1994.tb16183.x
- Cho, S. J., Ning, M., Zhang, Y., Rubin, L. H., & Jeong, H. (2016). 17beta-Estradiol up-regulates UDP-glucuronosyltransferase 1A9 expression via estrogen receptor alpha. *Acta Pharm Sin B*, *6*(5), 504-509. doi:10.1016/j.apsb.2016.04.005
- Christensen, C. B., & Jorgensen, L. N. (1987). Morphine-6-glucuronide has high affinity for the opioid receptor. *Pharmacol Toxicol*, *60*(1), 75-76. doi:10.1111/j.1600-0773.1987.tb01724.x
- Christie, M. J. (2008). Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol*, *154*(2), 384-396. doi:10.1038/bjp.2008.100
- Christie, M. J., Williams, J. T., & North, R. A. (1987). Cellular mechanisms of opioid tolerance: studies in single brain neurons. *Mol Pharmacol*, *32*(5), 633-638.
- Christrup, L. L., Sjogren, P., Jensen, N. H., Banning, A. M., Elbaek, K., & Ersboll, A. K. (1999). Steady-state kinetics and dynamics of morphine in cancer patients: is sedation related to the absorption rate of morphine? *J Pain Symptom Manage*, *18*(3), 164-173. doi:10.1016/s0885-3924(99)00068-8

- Chu, L. F., Angst, M. S., & Clark, D. (2008). Opioid-induced hyperalgesia in humans: molecular mechanisms and clinical considerations. *Clin J Pain*, 24(6), 479-496. doi:10.1097/AJP.0b013e31816b2f43
- Chu, W. G., Wang, F. D., Sun, Z. C., Ma, S. B., Wang, X., Han, W. J., . . . Luo, C. (2020). TRPC1/4/5 channels contribute to morphine-induced analgesic tolerance and hyperalgesia by enhancing spinal synaptic potentiation and structural plasticity. *FASEB J*, 34(6), 8526-8543. doi:10.1096/fj.202000154RR
- Chuang, L. F., Chuang, T. K., Killam, K. F., Jr., Chuang, A. J., Kung, H. F., Yu, L., & Chuang, R. Y. (1994). Delta opioid receptor gene expression in lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 202(3), 1291-1299. doi:10.1006/bbrc.1994.2071
- Chuang, L. F., Chuang, T. K., Killam, K. F., Jr., Qiu, Q., Wang, X. R., Lin, J. J., . . . et al. (1995). Expression of kappa opioid receptors in human and monkey lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 209(3), 1003-1010. doi:10.1006/bbrc.1995.1597
- Chuang, T. K., Killam, K. F., Jr., Chuang, L. F., Kung, H. F., Sheng, W. S., Chao, C. C., . . . Chuang, R. Y. (1995). Mu opioid receptor gene expression in immune cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 216(3), 922-930. doi:10.1006/bbrc.1995.2709
- Chun, B. J., Stewart, B. D., Vaughan, D. D., Bachstetter, A. D., & Kekenos-Huskey, P. M. (2019). Simulation of P2X-mediated calcium signalling in microglia. *J Physiol*, 597(3), 799-818. doi:10.1113/JP277377
- Cicero, T. J., Nock, B., & Meyer, E. R. (1996). Gender-related differences in the antinociceptive properties of morphine. *J Pharmacol Exp Ther*, 279(2), 767-773.
- Cicero, T. J., Nock, B., & Meyer, E. R. (1997). Sex-related differences in morphine's antinociceptive activity: relationship to serum and brain morphine concentrations. *J Pharmacol Exp Ther*, 282(2), 939-944.
- Cicero, T. J., Nock, B., O'Connor, L., & Meyer, E. R. (2002). Role of steroids in sex differences in morphine-induced analgesia: activational and organizational effects. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(2), 695-701. doi:10.1124/jpet.300.2.695
- Claff, T., Yu, J., Blais, V., Patel, N., Martin, C., Wu, L., . . . Stevens, R. C. (2019). Elucidating the active delta-opioid receptor crystal structure with peptide and small-molecule agonists. *Sci Adv*, 5(11), eaax9115. doi:10.1126/sciadv.aax9115
- Clark, J. D., Shi, X., Li, X., Qiao, Y., Liang, D., Angst, M. S., & Yeomans, D. C. (2007). Morphine reduces local cytokine expression and neutrophil infiltration after incision. *Mol Pain*, 3, 28. doi:10.1186/1744-8069-3-28
- Coffman, B. L., Kearney, W. R., Goldsmith, S., Knosp, B. M., & Tephly, T. R. (2003). Opioids bind to the amino acids 84 to 118 of UDP-glucuronosyltransferase UGT2B7. *Mol Pharmacol*, 63(2), 283-288. doi:10.1124/mol.63.2.283
- Coffman, B. L., King, C. D., Rios, G. R., & Tephly, T. R. (1998). The glucuronidation of opioids, other xenobiotics, and androgens by human UGT2B7Y(268) and UGT2B7H(268). *Drug Metab Dispos*, 26(1), 73-77.
- Coffman, B. L., Rios, G. R., King, C. D., & Tephly, T. R. (1997). Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation. *Drug Metab Dispos*, 25(1), 1-4.
- Coffman, B. L., Rios, G. R., & Tephly, T. R. (1996). Purification and properties of two rat liver phenobarbital-inducible UDP-glucuronosyltransferases that catalyze the glucuronidation of opioids. *Drug Metab Dispos*, 24(3), 329-333.
- Comer, S. D., Cooper, Z. D., Kowalczyk, W. J., Sullivan, M. A., Evans, S. M., Bisaga, A. M., & Vosburg, S. K. (2010). Evaluation of potential sex differences in the subjective and analgesic effects of morphine in normal, healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*, 208(1), 45-55. doi:10.1007/s00213-009-1703-4
- Commons, K. G., Aicher, S. A., Kow, L. M., & Pfaff, D. W. (2000). Presynaptic and postsynaptic relations of mu-opioid receptors to gamma-aminobutyric acid-

- immunoreactive and medullary-projecting periaqueductal gray neurons. *J Comp Neurol*, 419(4), 532-542. doi:10.1002/(sici)1096-9861(20000417)419:4<532::aid-cne8>3.0.co;2-6
- Connor, M., Bagley, E. E., Chieng, B. C., & Christie, M. J. (2015). beta-Arrestin-2 knockout prevents development of cellular mu-opioid receptor tolerance but does not affect opioid-withdrawal-related adaptations in single PAG neurons. *Br J Pharmacol*, 172(2), 492-500. doi:10.1111/bph.12673
- Connor, M., Borgland, S. L., & Christie, M. J. (1999). Continued morphine modulation of calcium channel currents in acutely isolated locus coeruleus neurons from morphine-dependent rats. *Br J Pharmacol*, 128(7), 1561-1569. doi:10.1038/sj.bjp.0702922
- Corder, G., Castro, D. C., Bruchas, M. R., & Scherrer, G. (2018). Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. *Annu Rev Neurosci*, 41, 453-473. doi:10.1146/annurev-neuro-080317-061522
- Corder, G., Tawfik, V. L., Wang, D., Sypek, E. I., Low, S. A., Dickinson, J. R., . . . Scherrer, G. (2017). Loss of mu opioid receptor signaling in nociceptors, but not microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesia. *Nat Med*, 23(2), 164-173. doi:10.1038/nm.4262
- Court, M. H. (2005). Isoform-selective probe substrates for in vitro studies of human UDP-glucuronosyltransferases. *Methods Enzymol*, 400, 104-116. doi:10.1016/S0076-6879(05)00007-8
- Court, M. H., Krishnaswamy, S., Hao, Q., Duan, S. X., Patten, C. J., Von Moltke, L. L., & Greenblatt, D. J. (2003). Evaluation of 3'-azido-3'-deoxythymidine, morphine, and codeine as probe substrates for UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) in human liver microsomes: specificity and influence of the UGT2B7*2 polymorphism. *Drug Metab Dispos*, 31(9), 1125-1133. doi:10.1124/dmd.31.9.1125
- Craft, R. M. (2003). Sex differences in opioid analgesia: "from mouse to man". *Clin J Pain*, 19(3), 175-186. doi:10.1097/00002508-200305000-00005
- Craft, R. M., Stratmann, J. A., Bartok, R. E., Walpole, T. I., & King, S. J. (1999). Sex differences in development of morphine tolerance and dependence in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 143(1), 1-7. doi:10.1007/s002130050911
- Craft, R. M., Tseng, A. H., McNeil, D. M., Furness, M. S., & Rice, K. C. (2001). Receptor-selective antagonism of opioid antinociception in female versus male rats. *Behav Pharmacol*, 12(8), 591-602. doi:10.1097/00008877-200112000-00003
- Craft, R. M., Ulibarri, C., Leitzl, M. D., & Sumner, J. E. (2008). Dose- and time-dependent estradiol modulation of morphine antinociception in adult female rats. *Eur J Pain*, 12(4), 472-479. doi:10.1016/j.ejpain.2007.07.014
- Cruz, S. L., & Granados-Soto, V. (2016). Opioids and Opiates: Pharmacology, Abuse, and Addiction. In D. W. Pfaff & N. D. Volkow (Eds.), *Neuroscience in the 21st Century* (pp. 1-33). New York, NY: Springer New York.
- Csala, M., Staines, A. G., Banhegyi, G., Mandl, J., Coughtrie, M. W., & Burchell, B. (2004). Evidence for multiple glucuronide transporters in rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 68(7), 1353-1362. doi:10.1016/j.bcp.2004.05.055
- Cui, Y., Chen, Y., Zhi, J. L., Guo, R. X., Feng, J. Q., & Chen, P. X. (2006). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia mediates morphine antinociceptive tolerance. *Brain Res*, 1069(1), 235-243. doi:10.1016/j.brainres.2005.11.066
- Cui, Y., Liao, X. X., Liu, W., Guo, R. X., Wu, Z. Z., Zhao, C. M., . . . Feng, J. Q. (2008). A novel role of minocycline: attenuating morphine antinociceptive tolerance by inhibition of p38 MAPK in the activated spinal microglia. *Brain Behav Immun*, 22(1), 114-123. doi:10.1016/j.bbi.2007.07.014

- Curtis, M. J., Alexander, S., Cirino, G., Docherty, J. R., George, C. H., Giembycz, M. A., . . . Ahluwalia, A. (2018). Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *Br J Pharmacol*, *175*(7), 987-993. doi:10.1111/bph.14153
- Curtis, M. J., Bond, R. A., Spina, D., Ahluwalia, A., Alexander, S. P., Giembycz, M. A., . . . McGrath, J. C. (2015). Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP. *Br J Pharmacol*, *172*(14), 3461-3471. doi:10.1111/bph.12856
- Dafny, N., Dong, W. Q., Prieto-Gomez, C., Reyes-Vazquez, C., Stanford, J., & Qiao, J. T. (1996). Lateral hypothalamus: site involved in pain modulation. *Neuroscience*, *70*(2), 449-460. doi:10.1016/0306-4522(95)00358-4
- Dahan, A., & Lotsch, J. (2015). Morphine is not a prodrug. *Br J Anaesth*, *114*(6), 1005-1006. doi:10.1093/bja/aev125
- Dahan, A., Sarton, E., Teppema, L., & Olievier, C. (1998). Sex-related differences in the influence of morphine on ventilatory control in humans. *Anesthesiology*, *88*(4), 903-913. doi:10.1097/0000542-199804000-00009
- Dahlstrom, B. E., Paalzow, L. K., Segre, G., & Agren, A. J. (1978). Relation between morphine pharmacokinetics and analgesia. *J Pharmacokinetic Biopharm*, *6*(1), 41-53. doi:10.1007/BF01066062
- Dalesio, N. M., Hendrix, C. W., McMichael, D. H., Thompson, C. B., Lee, C. K., Pho, H., . . . Schwartz, A. R. (2016). Effects of Obesity and Leptin Deficiency on Morphine Pharmacokinetics in a Mouse Model. *Anesth Analg*, *123*(6), 1611-1617. doi:10.1213/ANE.0000000000001578
- Dang, V. C., Chieng, B., Azriel, Y., & Christie, M. J. (2011). Cellular morphine tolerance produced by betaarrestin-2-dependent impairment of mu-opioid receptor resensitization. *J Neurosci*, *31*(19), 7122-7130. doi:10.1523/JNEUROSCI.5999-10.2011
- Dang, V. C., & Williams, J. T. (2005). Morphine-Induced mu-opioid receptor desensitization. *Mol Pharmacol*, *68*(4), 1127-1132. doi:10.1124/mol.105.013185
- Darcq, E., & Kieffer, B. L. (2018). Opioid receptors: drivers to addiction? *Nat Rev Neurosci*, *19*(8), 499-514. doi:10.1038/s41583-018-0028-x
- DeHaven-Hudkins, D. L., Burgos, L. C., Cassel, J. A., Daubert, J. D., DeHaven, R. N., Mansson, E., . . . Yaksh, T. (1999). Loperamide (ADL 2-1294), an opioid antihyperalgesic agent with peripheral selectivity. *J Pharmacol Exp Ther*, *289*(1), 494-502.
- Depaulis, A., Morgan, M. M., & Liebeskind, J. C. (1987). GABAergic modulation of the analgesic effects of morphine microinjected in the ventral periaqueductal gray matter of the rat. *Brain Res*, *436*(2), 223-228. doi:10.1016/0006-8993(87)91665-9
- Derouiche, L., & Massotte, D. (2019). G protein-coupled receptor heteromers are key players in substance use disorder. *Neurosci Biobehav Rev*, *106*, 73-90. doi:10.1016/j.neubiorev.2018.09.026
- Disease, G. B. D., Injury, I., & Prevalence, C. (2017). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, *390*(10100), 1211-1259. doi:10.1016/S0140-6736(17)32154-2
- Donica, C. L., Awwad, H. O., Thakker, D. R., & Standifer, K. M. (2013). Cellular mechanisms of nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) peptide (NOP) receptor regulation and heterologous regulation by N/OFQ. *Mol Pharmacol*, *83*(5), 907-918. doi:10.1124/mol.112.084632

- Doyle, H. H., Eidson, L. N., Sinkiewicz, D. M., & Murphy, A. Z. (2017). Sex Differences in Microglia Activity within the Periaqueductal Gray of the Rat: A Potential Mechanism Driving the Dimorphic Effects of Morphine. *J Neurosci*, *37*(12), 3202-3214. doi:10.1523/JNEUROSCI.2906-16.2017
- Doyle, H. H., & Murphy, A. Z. (2018). Sex-dependent influences of morphine and its metabolites on pain sensitivity in the rat. *Physiol Behav*, *187*, 32-41. doi:10.1016/j.physbeh.2017.11.030
- DSM5. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5*. Arlington, VA: American Psychiatric Association.
- Due, M. R., Piekarz, A. D., Wilson, N., Feldman, P., Ripsch, M. S., Chavez, S., . . . White, F. A. (2012). Neuroexcitatory effects of morphine-3-glucuronide are dependent on Toll-like receptor 4 signaling. *J Neuroinflammation*, *9*, 200. doi:10.1186/1742-2094-9-200
- Due, M. R., Yang, X. F., Allette, Y. M., Randolph, A. L., Ripsch, M. S., Wilson, S. M., . . . White, F. A. (2014). Carbamazepine potentiates the effectiveness of morphine in a rodent model of neuropathic pain. *PLoS One*, *9*(9), e107399. doi:10.1371/journal.pone.0107399
- Dzierlenga, A. L., Clarke, J. D., Hargraves, T. L., Ainslie, G. R., Vanderah, T. W., Paine, M. F., & Cherrington, N. J. (2015). Mechanistic basis of altered morphine disposition in nonalcoholic steatohepatitis. *J Pharmacol Exp Ther*, *352*(3), 462-470. doi:10.1124/jpet.114.220764
- Eckersell, C. B., Popper, P., & Micevych, P. E. (1998). Estrogen-induced alteration of mu-opioid receptor immunoreactivity in the medial preoptic nucleus and medial amygdala. *J Neurosci*, *18*(10), 3967-3976.
- Edwards, R. R., Bingham, C. O., 3rd, Bathon, J., & Haythornthwaite, J. A. (2006). Catastrophizing and pain in arthritis, fibromyalgia, and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*, *55*(2), 325-332. doi:10.1002/art.21865
- Eidson, L. N., Inoue, K., Young, L. J., Tansey, M. G., & Murphy, A. Z. (2017). Toll-like Receptor 4 Mediates Morphine-Induced Neuroinflammation and Tolerance via Soluble Tumor Necrosis Factor Signaling. *Neuropsychopharmacology*, *42*(3), 661-670. doi:10.1038/npp.2016.131
- Eidson, L. N., & Murphy, A. Z. (2013a). Blockade of Toll-like receptor 4 attenuates morphine tolerance and facilitates the pain relieving properties of morphine. *J Neurosci*, *33*(40), 15952-15963. doi:10.1523/JNEUROSCI.1609-13.2013
- Eidson, L. N., & Murphy, A. Z. (2013b). Persistent peripheral inflammation attenuates morphine-induced periaqueductal gray glial cell activation and analgesic tolerance in the male rat. *J Pain*, *14*(4), 393-404. doi:10.1016/j.jpain.2012.12.010
- Eidson, L. N., & Murphy, A. Z. (2019). Inflammatory mediators of opioid tolerance: Implications for dependency and addiction. *Peptides*, *115*, 51-58. doi:10.1016/j.peptides.2019.01.003
- Eisenstein, T. K. (2019). The Role of Opioid Receptors in Immune System Function. *Front Immunol*, *10*, 2904. doi:10.3389/fimmu.2019.02904
- Eisenstein, T. K., Meissler, J. J., Jr., Rogers, T. J., Geller, E. B., & Adler, M. W. (1995). Mouse strain differences in immunosuppression by opioids in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, *275*(3), 1484-1489.
- Ekblom, M., Gardmark, M., & Hammarlund-Udenaes, M. (1993). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of morphine-3-glucuronide in rats and its influence on the antinociceptive effect of morphine. *Biopharm Drug Dispos*, *14*(1), 1-11. doi:10.1002/bdd.2510140102

- Elhabazi, K., Ayachi, S., Ilien, B., & Simonin, F. (2014). Assessment of morphine-induced hyperalgesia and analgesic tolerance in mice using thermal and mechanical nociceptive modalities. *J Vis Exp*(89), e51264. doi:10.3791/51264
- Ellis, A., Grace, P. M., Wieseler, J., Favret, J., Springer, K., Skarda, B., . . . Watkins, L. R. (2016). Morphine amplifies mechanical allodynia via TLR4 in a rat model of spinal cord injury. *Brain Behav Immun*, 58, 348-356. doi:10.1016/j.bbi.2016.08.004
- Enman, N. M., Reyes, B. A. S., Shi, Y., Valentino, R. J., & Van Bockstaele, E. J. (2019). Sex differences in morphine-induced trafficking of mu-opioid and corticotropin-releasing factor receptors in locus coeruleus neurons. *Brain Res*, 1706, 75-85. doi:10.1016/j.brainres.2018.11.001
- Erbs, E., Faget, L., Scherrer, G., Matifas, A., Filliol, D., Vonesch, J. L., . . . Massotte, D. (2015). A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Struct Funct*, 220(2), 677-702. doi:10.1007/s00429-014-0717-9
- Evans, C. J., Keith, D. E., Jr., Morrison, H., Magendzo, K., & Edwards, R. H. (1992). Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*, 258(5090), 1952-1955. doi:10.1126/science.1335167
- Farber, K., & Kettenmann, H. (2006). Functional role of calcium signals for microglial function. *Glia*, 54(7), 656-665. doi:10.1002/glia.20412
- Faura, C. C., Collins, S. L., Moore, A. R., & McQuay, H. J. (1998). Systematic review of factors affecting the ratios of morphine and its major metabolites. *Pain*, 74(1), 43-53. doi:10.1016/S0304-3959(97)00142-5
- Faura, C. C., Olaso, J. M., Cabanes, C. G., & Horga, J. F. (1996). Lack of morphine-6-glucuronide antinociception after morphine treatment. Is morphine-3-glucuronide involved? *Pain*, 65(1), 25-30. doi:10.1016/0304-3959(95)00198-0
- Faura, C. C., Olaso, M. J., & Horga, J. F. (1997). Morphine-3-glucuronide prevents tolerance to morphine-6-glucuronide in mice. *Eur J Pain*, 1(2), 161-164. doi:10.1016/s1090-3801(97)90074-4
- Fields, H. (2004). State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci*, 5(7), 565-575. doi:10.1038/nrn1431
- Fields, H. L., & Margolis, E. B. (2015). Understanding opioid reward. *Trends Neurosci*, 38(4), 217-225. doi:10.1016/j.tins.2015.01.002
- Fillingim, R. B., King, C. D., Ribeiro-Dasilva, M. C., Rahim-Williams, B., & Riley, J. L., 3rd. (2009). Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain*, 10(5), 447-485. doi:10.1016/j.jpain.2008.12.001
- Fillingim, R. B., Ness, T. J., Glover, T. L., Campbell, C. M., Hastie, B. A., Price, D. D., & Staud, R. (2005). Morphine responses and experimental pain: sex differences in side effects and cardiovascular responses but not analgesia. *J Pain*, 6(2), 116-124. doi:10.1016/j.jpain.2004.11.005
- Fladvad, T., Klepstad, P., Langaas, M., Dale, O., Kaasa, S., Caraceni, A., & Skorpen, F. (2013). Variability in UDP-glucuronosyltransferase genes and morphine metabolism: observations from a cross-sectional multicenter study in advanced cancer patients with pain. *Pharmacogenet Genomics*, 23(3), 117-126. doi:10.1097/FPC.0b013e32835ce485
- Foster, R. S., Jenden, D. J., & Lomax, P. (1967). A comparison of the pharmacologic effects of morphine and N-methyl morphine. *J Pharmacol Exp Ther*, 157(1), 185-195.
- Frances, B., Gout, R., Monsarrat, B., Cros, J., & Zajac, J. M. (1992). Further evidence that morphine-6 beta-glucuronide is a more potent opioid agonist than morphine. *J Pharmacol Exp Ther*, 262(1), 25-31.
- Franken, L. G., Masman, A. D., de Winter, B. C., Koch, B. C., Baar, F. P., Tibboel, D., . . . Mathot, R. A. (2016). Pharmacokinetics of Morphine, Morphine-3-Glucuronide and

- Morphine-6-Glucuronide in Terminally Ill Adult Patients. *Clin Pharmacokinet*, 55(6), 697-709. doi:10.1007/s40262-015-0345-4
- Fujita, K., Ando, Y., Yamamoto, W., Miya, T., Endo, H., Sunakawa, Y., . . . Sasaki, Y. (2010). Association of UGT2B7 and ABCB1 genotypes with morphine-induced adverse drug reactions in Japanese patients with cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 65(2), 251-258. doi:10.1007/s00280-009-1029-2
- Fukagawa, H., Koyama, T., Kakuyama, M., & Fukuda, K. (2013). Microglial activation involved in morphine tolerance is not mediated by toll-like receptor 4. *J Anesth*, 27(1), 93-97. doi:10.1007/s00540-012-1469-4
- Fuller, G. N., Lin, S. N., Caprioli, R. M., Wiggins, R. C., & Dafny, N. (1988). Dose-related differential accumulation of morphine in specific regions of rat brain determined by mass fragmentography. *Int J Neurosci*, 38(1-2), 31-38. doi:10.3109/00207458809000479
- Fullerton, E. F., Doyle, H. H., & Murphy, A. Z. (2018). Impact of sex on pain and opioid analgesia: a review. *Curr Opin Behav Sci*, 23, 183-190. doi:10.1016/j.cobeha.2018.08.001
- Gabra, B. H., Bailey, C. P., Kelly, E., Smith, F. L., Henderson, G., & Dewey, W. L. (2008). Pre-treatment with a PKC or PKA inhibitor prevents the development of morphine tolerance but not physical dependence in mice. *Brain Res*, 1217, 70-77. doi:10.1016/j.brainres.2008.04.036
- Gaillard, P., Pierre-Alain, C., & Testa, B. (1994). The conformation-dependent lipophilicity of morphine glucuronides as calculated from their molecular lipophilicity potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 4(5), 737-742. doi:[https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80191-8](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80191-8)
- Gambaro, S. E., Robert, M. C., Tiribelli, C., & Gazzin, S. (2016). Role of brain cytochrome P450 mono-oxygenases in bilirubin oxidation-specific induction and activity. *Arch Toxicol*, 90(2), 279-290. doi:10.1007/s00204-014-1394-4
- Gardmark, M., Karlsson, M. O., Jonsson, F., & Hammarlund-Udenaes, M. (1998). Morphine-3-glucuronide has a minor effect on morphine antinociception. Pharmacodynamic modeling. *J Pharm Sci*, 87(7), 813-820. doi:10.1021/js980056f
- Gatchel, R. J., Peng, Y. B., Peters, M. L., Fuchs, P. N., & Turk, D. C. (2007). The biopsychosocial approach to chronic pain: scientific advances and future directions. *Psychol Bull*, 133(4), 581-624. doi:10.1037/0033-2909.133.4.581
- Gaveriaux-Ruff, C., Matthes, H. W., Peluso, J., & Kieffer, B. L. (1998). Abolition of morphine-immunosuppression in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11), 6326-6330. doi:10.1073/pnas.95.11.6326
- Gaveriaux, C., Peluso, J., Simonin, F., Laforet, J., & Kieffer, B. (1995). Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells. *FEBS Lett*, 369(2-3), 272-276. doi:10.1016/0014-5793(95)00766-3
- Glare, P. A., & Walsh, T. D. (1991). Clinical pharmacokinetics of morphine. *Ther Drug Monit*, 13(1), 1-23. doi:10.1097/00007691-199101000-00001
- Glaum, S. R., Miller, R. J., & Hammond, D. L. (1994). Inhibitory actions of delta 1-, delta 2-, and mu-opioid receptor agonists on excitatory transmission in lamina II neurons of adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 14(8), 4965-4971.
- Gold, S. J., Han, M. H., Herman, A. E., Ni, Y. G., Pudiak, C. M., Aghajanian, G. K., . . . Nestler, E. J. (2003). Regulation of RGS proteins by chronic morphine in rat locus coeruleus. *Eur J Neurosci*, 17(5), 971-980. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02529.x
- Gong, Q. L., Hedner, T., Hedner, J., Bjorkman, R., & Nordberg, G. (1991). Antinociceptive and ventilatory effects of the morphine metabolites: morphine-6-glucuronide and

- morphine-3-glucuronide. *Eur J Pharmacol*, 193(1), 47-56. doi:10.1016/0014-2999(91)90199-z
- Gonzales, K. L., Chapleau, J. D., Pierce, J. P., Kelter, D. T., Williams, T. J., Torres-Reveron, A., . . . Milner, T. A. (2011). The influences of reproductive status and acute stress on the levels of phosphorylated mu opioid receptor immunoreactivity in rat hippocampus. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2(18). doi:10.3389/fendo.2011.00018
- Gordon, N. C., Gear, R. W., Heller, P. H., Paul, S., Miaskowski, C., & Levine, J. D. (1995). Enhancement of morphine analgesia by the GABAB agonist baclofen. *Neuroscience*, 69(2), 345-349. doi:10.1016/0306-4522(95)00335-g
- Goucke, R. C., Hackett, P. L., & Ilett, K. F. (1994). Concentrations of morphine, morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide in serum and cerebrospinal fluid following morphine administration to patients with morphine-resistant pain. *Pain*, 56(2), 145-149. doi:10.1016/0304-3959(94)90088-4
- Goudas, L. C., Langlade, A., Serrie, A., Matson, W., Milbury, P., Thurel, C., . . . Carr, D. B. (1999). Acute decreases in cerebrospinal fluid glutathione levels after intracerebroventricular morphine for cancer pain. *Anesth Analg*, 89(5), 1209-1215.
- Grace, D., & Fee, J. P. (1996). A comparison of intrathecal morphine-6-glucuronide and intrathecal morphine sulfate as analgesics for total hip replacement. *Anesth Analg*, 83(5), 1055-1059. doi:10.1097/00000539-199611000-00027
- Grace, P. M., Ramos, K. M., Rodgers, K. M., Wang, X., Hutchinson, M. R., Lewis, M. T., . . . Watkins, L. R. (2014). Activation of adult rat CNS endothelial cells by opioid-induced toll-like receptor 4 (TLR4) signaling induces proinflammatory, biochemical, morphological, and behavioral sequelae. *Neuroscience*, 280, 299-317. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.09.020
- Gradinaru, D., Minn, A. L., Artur, Y., Minn, A., & Heydel, J. M. (2012). Effect of oxidative stress on UDP-glucuronosyltransferases in rat astrocytes. *Toxicol Lett*, 213(3), 316-324. doi:10.1016/j.toxlet.2012.07.014
- Granier, S., Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2012). Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature*, 485(7398), 400-404. doi:10.1038/nature11111
- Greenspan, J. D., Craft, R. M., LeResche, L., Arendt-Nielsen, L., Berkley, K. J., Fillingim, R. B., . . . Pain, S. I. G. o. t. I. (2007). Studying sex and gender differences in pain and analgesia: a consensus report. *Pain*, 132 Suppl 1, S26-S45. doi:10.1016/j.pain.2007.10.014
- Groer, C. E., Schmid, C. L., Jaeger, A. M., & Bohn, L. M. (2011). Agonist-directed interactions with specific beta-arrestins determine mu-opioid receptor trafficking, ubiquitination, and dephosphorylation. *J Biol Chem*, 286(36), 31731-31741. doi:10.1074/jbc.M111.248310
- Guajardo, H. M., Snyder, K., Ho, A., & Valentino, R. J. (2017). Sex Differences in mu-Opioid Receptor Regulation of the Rat Locus Coeruleus and Their Cognitive Consequences. *Neuropsychopharmacology*, 42(6), 1295-1304. doi:10.1038/npp.2016.252
- Guerlais, V. C., Lauzeille D, Baumevieille M, Boucher A, Chevallier C, Deheul S, Eiden C, Fouilhé N, Gibaja V, Le Boisselier R, PainBarc S, Pochard L, Haramburu F, Daveluy A, Roussin A. (2018). Consommations problématiques des antalgiques codéinés en automédication : résultats de l'étude DANTE (une Décennie d'ANTalgiques En France). *Therapies*, 73(6), 561.
- Guo, J., & Friedman, S. L. (2010). Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 3, 21. doi:10.1186/1755-1536-3-21

- Hagen, N., & Swanson, R. (1997). Strychnine-like multifocal myoclonus and seizures in extremely high-dose opioid administration: treatment strategies. *J Pain Symptom Manage*, *14*(1), 51-58. doi:10.1016/S0885-3924(97)00001-8
- Halliday, A. J., Bartlett, S. E., Colditz, P., & Smith, M. T. (1999). Brain region-specific studies of the excitatory behavioral effects of morphine-3-glucuronide. *Life Sci*, *65*(2), 225-236. doi:10.1016/s0024-3205(99)00239-8
- Hamabe, W., Maeda, T., Kiguchi, N., Yamamoto, C., Tokuyama, S., & Kishioka, S. (2007). Negative relationship between morphine analgesia and P-glycoprotein expression levels in the brain. *J Pharmacol Sci*, *105*(4), 353-360. doi:10.1254/jphs.fp0071287
- Hamilton, G. R., & Baskett, T. F. (2000). In the arms of Morpheus the development of morphine for postoperative pain relief. *Can J Anaesth*, *47*(4), 367-374. doi:10.1007/BF03020955
- Hand, C. W., Blunnie, W. P., Claffey, L. P., McShane, A. J., McQuay, H. J., & Moore, R. A. (1987). Potential analgesic contribution from morphine-6-glucuronide in CSF. *Lancet*, *2*(8569), 1207-1208. doi:10.1016/s0140-6736(87)91341-9
- Handal, M., Grung, M., Skurtveit, S., Ripel, A., & Morland, J. (2002). Pharmacokinetic differences of morphine and morphine-glucuronides are reflected in locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav*, *73*(4), 883-892. doi:10.1016/s0091-3057(02)00925-5
- Hanna, M. H., Elliott, K. M., & Fung, M. (2005). Randomized, double-blind study of the analgesic efficacy of morphine-6-glucuronide versus morphine sulfate for postoperative pain in major surgery. *Anesthesiology*, *102*(4), 815-821. doi:10.1097/00000542-200504000-00018
- Hanna, M. H., Peat, S. J., Woodham, M., Knibb, A., & Fung, C. (1990). Analgesic efficacy and CSF pharmacokinetics of intrathecal morphine-6-glucuronide: comparison with morphine. *Br J Anaesth*, *64*(5), 547-550. doi:10.1093/bja/64.5.547
- Harada, S., Nakamoto, K., & Tokuyama, S. (2013). The involvement of midbrain astrocyte in the development of morphine tolerance. *Life Sci*, *93*(16), 573-578. doi:10.1016/j.lfs.2013.08.009
- Hasegawa, Y., Kishimoto, S., Takahashi, H., Inotsume, N., Takeuchi, Y., & Fukushima, S. (2009). Altered expression of MRP2, MRP3 and UGT2B1 in the liver affects the disposition of morphine and its glucuronide conjugate in a rat model of cholestasis. *J Pharm Pharmacol*, *61*(9), 1205-1210. doi:10.1211/jpp/61.09.0010
- Hashiguchi, Y., Molina, P. E., & Abumrad, N. N. (1995). Modulation of metabolic effects of morphine-6-glucuronide by morphine-3-glucuronide. *Brain Res Bull*, *38*(4), 325-329. doi:10.1016/0361-9230(95)00104-m
- Hasselstrom, J., Berg, U., Lofgren, A., & Sawe, J. (1989). Long lasting respiratory depression induced by morphine-6-glucuronide? *Br J Clin Pharmacol*, *27*(4), 515-518. doi:10.1111/j.1365-2125.1989.tb05401.x
- Hasselstrom, J., & Sawe, J. (1993). Morphine pharmacokinetics and metabolism in humans. Enterohepatic cycling and relative contribution of metabolites to active opioid concentrations. *Clin Pharmacokinet*, *24*(4), 344-354. doi:10.2165/00003088-199324040-00007
- He, L., Fong, J., von Zastrow, M., & Whistler, J. L. (2002). Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization. *Cell*, *108*(2), 271-282. doi:10.1016/s0092-8674(02)00613-x
- Helmstetter, F. J., & Bellgowan, P. S. (1993). Lesions of the amygdala block conditional hypoalgesia on the tail flick test. *Brain Res*, *612*(1-2), 253-257. doi:10.1016/0006-8993(93)91669-j
- Helmstetter, F. J., Bellgowan, P. S., & Poore, L. H. (1995). Microinfusion of mu but not delta or kappa opioid agonists into the basolateral amygdala results in inhibition of the tail flick reflex in pentobarbital-anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther*, *275*(1), 381-388.

- Helmstetter, F. J., Bellgowan, P. S., & Tershner, S. A. (1993). Inhibition of the tail flick reflex following microinjection of morphine into the amygdala. *Neuroreport*, *4*(5), 471-474. doi:10.1097/00001756-199305000-00002
- Hemstapat, K., Monteith, G. R., Smith, D., & Smith, M. T. (2003). Morphine-3-glucuronide's neuro-excitatory effects are mediated via indirect activation of N-methyl-D-aspartic acid receptors: mechanistic studies in embryonic cultured hippocampal neurones. *Anesth Analg*, *97*(2), 494-505. doi:10.1213/01.ANE.0000059225.40049.99
- Hervera, A., Negrete, R., Leanez, S., Martin-Campos, J. M., & Pol, O. (2011). Peripheral effects of morphine and expression of mu-opioid receptors in the dorsal root ganglia during neuropathic pain: nitric oxide signaling. *Mol Pain*, *7*, 25. doi:10.1186/1744-8069-7-25
- Hescheler, J., Rosenthal, W., Trautwein, W., & Schultz, G. (1987). The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels. *Nature*, *325*(6103), 445-447. doi:10.1038/325445a0
- Heurtaux, T., Benani, A., Moulin, D., Muller, N., Netter, P., & Minn, A. (2006). Induction of UGT1A6 isoform by inflammatory conditions in rat astrocytes. *Neuropharmacology*, *50*(3), 317-328. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.09.007
- Hewett, K., Dickenson, A. H., & McQuay, H. J. (1993). Lack of effect of morphine-3-glucuronide on the spinal antinociceptive actions of morphine in the rat: an electrophysiological study. *Pain*, *53*(1), 59-63. doi:10.1016/0304-3959(93)90056-U
- Heydel, J. M., Holsztynska, E. J., Legendre, A., Thiebaud, N., Artur, Y., & Le Bon, A. M. (2010). UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in neuro-olfactory tissues: expression, regulation, and function. *Drug Metab Rev*, *42*(1), 74-97. doi:10.3109/03602530903208363
- Hoffman, M., Xu, J. C., Smith, C., Fanelli, C., Pascal, V., Degaetano, C., . . . Citron, M. (1997). A pharmacodynamic study of morphine and its glucuronide metabolites after single morphine dosing in cancer patients with pain. *Cancer Invest*, *15*(6), 542-547. doi:10.3109/07357909709047595
- Hoffmann, A., Kann, O., Ohlemeyer, C., Hanisch, U. K., & Kettenmann, H. (2003). Elevation of basal intracellular calcium as a central element in the activation of brain macrophages (microglia): suppression of receptor-evoked calcium signaling and control of release function. *J Neurosci*, *23*(11), 4410-4419.
- Holtman, J. R., Jr., & Wala, E. P. (2005). Characterization of morphine-induced hyperalgesia in male and female rats. *Pain*, *114*(1-2), 62-70. doi:10.1016/j.pain.2004.11.014
- Hori, Y., Endo, K., & Takahashi, T. (1992). Presynaptic inhibitory action of enkephalin on excitatory transmission in superficial dorsal horn of rat spinal cord. *J Physiol*, *450*, 673-685. doi:10.1113/jphysiol.1992.sp019149
- Hoskin, P. J., Hanks, G. W., Aherne, G. W., Chapman, D., Littleton, P., & Filshie, J. (1989). The bioavailability and pharmacokinetics of morphine after intravenous, oral and buccal administration in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, *27*(4), 499-505. doi:10.1111/j.1365-2125.1989.tb05399.x
- Hua, X. Y., Moore, A., Malkmus, S., Murray, S. F., Dean, N., Yaksh, T. L., & Butler, M. (2002). Inhibition of spinal protein kinase Calpha expression by an antisense oligonucleotide attenuates morphine infusion-induced tolerance. *Neuroscience*, *113*(1), 99-107. doi:10.1016/s0306-4522(02)00157-4
- Huang, W., Manglik, A., Venkatakrisnan, A. J., Laeremans, T., Feinberg, E. N., Sanborn, A. L., . . . Kobilka, B. K. (2015). Structural insights into micro-opioid receptor activation. *Nature*, *524*(7565), 315-321. doi:10.1038/nature14886
- Hurwitz, A., Sztern, M. I., Looney, G. A., & Ben-Zvi, Z. (1994). Loperamide effects on hepatobiliary function, intestinal transit and analgesia in mice. *Life Sci*, *54*(22), 1687-1698. doi:10.1016/0024-3205(94)00609-1

- Hutchinson, M. R., Coats, B. D., Lewis, S. S., Zhang, Y., Sprunger, D. B., Rezvani, N., . . . Watkins, L. R. (2008). Proinflammatory cytokines oppose opioid-induced acute and chronic analgesia. *Brain Behav Immun*, 22(8), 1178-1189. doi:10.1016/j.bbi.2008.05.004
- Hutchinson, M. R., Lewis, S. S., Coats, B. D., Skyba, D. A., Crysedale, N. Y., Berkelhammer, D. L., . . . Johnson, K. W. (2009). Reduction of opioid withdrawal and potentiation of acute opioid analgesia by systemic AV411 (ibudilast). *Brain Behav Immun*, 23(2), 240-250. doi:10.1016/j.bbi.2008.09.012
- Hutchinson, M. R., Zhang, Y., Shridhar, M., Evans, J. H., Buchanan, M. M., Zhao, T. X., . . . Watkins, L. R. (2010). Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain Behav Immun*, 24(1), 83-95. doi:10.1016/j.bbi.2009.08.004
- Igawa, Y., Westerling, D., Mattiasson, A., & Andersson, K. E. (1993). Effects of morphine metabolites on micturition in normal, unanaesthetized rats. *Br J Pharmacol*, 110(1), 257-262. doi:10.1111/j.1476-5381.1993.tb13802.x
- INCB. (2020). *Supply of Opiate Raw Materials and Demand for Opiates for Medical and Scientific Purposes*. Retrieved from
- Ingram, S. L., Macey, T. A., Fossum, E. N., & Morgan, M. M. (2008). Tolerance to repeated morphine administration is associated with increased potency of opioid agonists. *Neuropsychopharmacology*, 33(10), 2494-2504. doi:10.1038/sj.npp.1301634
- Inserm. (2017, 28/06/21). Douleur - Un symptôme fréquent, parfois vécue comme une fatalité. Retrieved from <https://www.inserm.fr/dossier/douleur/>
- Islam, A. K., Cooper, M. L., & Bodnar, R. J. (1993). Interactions among aging, gender, and gonadectomy effects upon morphine antinociception in rats. *Physiol Behav*, 54(1), 45-53. doi:10.1016/0031-9384(93)90042-e
- Jackson, M. R., Nilsson, T., & Peterson, P. A. (1990). Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 9(10), 3153-3162.
- Jacquet, Y. F., & Lajtha, A. (1976). The periaqueductal gray: site of morphine analgesia and tolerance as shown by 2-way cross tolerance between systemic and intracerebral injections. *Brain Res*, 103(3), 501-513. doi:10.1016/0006-8993(76)90448-0
- Javed, R. R., Dewey, W. L., Smith, P. A., & Smith, F. L. (2004). PKC and PKA inhibitors reverse tolerance to morphine-induced hypothermia and supraspinal analgesia in mice. *Eur J Pharmacol*, 492(2-3), 149-157. doi:10.1016/j.ejphar.2004.03.061
- Jedlitschky, G., Cassidy, A. J., Sales, M., Pratt, N., & Burchell, B. (1999). Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem J*, 340 (Pt 3), 837-843.
- Jeftinija, S. (1988). Enkephalins modulate excitatory synaptic transmission in the superficial dorsal horn by acting at mu-opioid receptor sites. *Brain Res*, 460(2), 260-268. doi:10.1016/0006-8993(88)90371-x
- Ji, Y., Murphy, A. Z., & Traub, R. J. (2006). Sex differences in morphine-induced analgesia of visceral pain are supraspinally and peripherally mediated. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291(2), R307-314. doi:10.1152/ajpregu.00824.2005
- Joels, C. S., Mostafa, G., Matthews, B. D., Kercher, K. W., Sing, R. F., Norton, H. J., & Heniford, B. T. (2003). Factors affecting intravenous analgesic requirements after colectomy. *J Am Coll Surg*, 197(5), 780-785. doi:10.1016/S1072-7515(03)00671-9
- Johnston, I. N., Milligan, E. D., Wieseler-Frank, J., Frank, M. G., Zapata, V., Campisi, J., . . . Watkins, L. R. (2004). A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine. *J Neurosci*, 24(33), 7353-7365. doi:10.1523/JNEUROSCI.1850-04.2004

- Juni, A., Klein, G., & Kest, B. (2006). Morphine hyperalgesia in mice is unrelated to opioid activity, analgesia, or tolerance: evidence for multiple diverse hyperalgesic systems. *Brain Res*, *1070*(1), 35-44. doi:10.1016/j.brainres.2005.11.054
- Juni, A., Klein, G., Kowalczyk, B., Ragnauth, A., & Kest, B. (2008). Sex differences in hyperalgesia during morphine infusion: effect of gonadectomy and estrogen treatment. *Neuropharmacology*, *54*(8), 1264-1270. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.04.004
- Juni, A., Klein, G., Pintar, J. E., & Kest, B. (2007). Nociception increases during opioid infusion in opioid receptor triple knock-out mice. *Neuroscience*, *147*(2), 439-444. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.04.030
- Kabli, N., Nguyen, T., Balboni, G., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2014). Antidepressant-like and anxiolytic-like effects following activation of the mu-delta opioid receptor heteromer in the nucleus accumbens. *Mol Psychiatry*, *19*(9), 986-994. doi:10.1038/mp.2013.115
- Kalapurakkal, S., Carpino, E. A., Lebel, A., & Simons, L. E. (2015). "Pain Can't Stop Me": Examining Pain Self-Efficacy and Acceptance as Resilience Processes Among Youth With Chronic Headache. *J Pediatr Psychol*, *40*(9), 926-933. doi:10.1093/jpepsy/jsu091
- Kanarek, R. B., & Homoleski, B. (2000). Modulation of morphine-induced antinociception by palatable solutions in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav*, *66*(3), 653-659. doi:10.1016/s0091-3057(00)00251-3
- Karami, R., Hosseini, M., Khodabandehloo, F., Khatami, L., & Tairani, Z. (2011). Different effects of L-arginine on morphine tolerance in sham and ovariectomized female mice. *J Zhejiang Univ Sci B*, *12*(12), 1016-1023. doi:10.1631/jzus.B1100029
- Kasson, B. G., & George, R. (1984). Endocrine influences on the actions of morphine: IV. Effects of sex and strain. *Life Sci*, *34*(17), 1627-1634. doi:10.1016/0024-3205(84)90633-7
- Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *53*, 531-556. doi:10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923
- Kemp, T., Spike, R. C., Watt, C., & Todd, A. J. (1996). The mu-opioid receptor (MOR1) is mainly restricted to neurons that do not contain GABA or glycine in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience*, *75*(4), 1231-1238. doi:10.1016/0306-4522(96)00333-8
- Kepler, K. L., Kest, B., Kiefel, J. M., Cooper, M. L., & Bodnar, R. J. (1989). Roles of gender, gonadectomy and estrous phase in the analgesic effects of intracerebroventricular morphine in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, *34*(1), 119-127. doi:10.1016/0091-3057(89)90363-8
- Kepler, K. L., Standifer, K. M., Paul, D., Kest, B., Pasternak, G. W., & Bodnar, R. J. (1991). Gender effects and central opioid analgesia. *Pain*, *45*(1), 87-94. doi:10.1016/0304-3959(91)90168-W
- Kest, B., Palmese, C., & Hopkins, E. (2000). A comparison of morphine analgesic tolerance in male and female mice. *Brain Res*, *879*(1-2), 17-22. doi:10.1016/s0006-8993(00)02685-8
- Kest, B., Wilson, S. G., & Mogil, J. S. (1999). Sex differences in supraspinal morphine analgesia are dependent on genotype. *J Pharmacol Exp Ther*, *289*(3), 1370-1375.
- Kharasch, E. D., Hoffer, C., Whittington, D., & Sheffels, P. (2003). Role of P-glycoprotein in the intestinal absorption and clinical effects of morphine. *Clin Pharmacol Ther*, *74*(6), 543-554. doi:10.1016/j.clpt.2003.08.011
- Kibaly, C., Xu, C., Cahill, C. M., Evans, C. J., & Law, P. Y. (2019). Non-nociceptive roles of opioids in the CNS: opioids' effects on neurogenesis, learning, memory and affect. *Nat Rev Neurosci*, *20*(1), 5-18. doi:10.1038/s41583-018-0092-2

- Kiefel, J. M., Rossi, G. C., & Bodnar, R. J. (1993). Medullary mu and delta opioid receptors modulate mesencephalic morphine analgesia in rats. *Brain Res*, 624(1-2), 151-161. doi:10.1016/0006-8993(93)90073-v
- Kieffer, B. L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C., & Hirth, C. G. (1992). The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(24), 12048-12052. doi:10.1073/pnas.89.24.12048
- Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*, 8(6), e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412
- Kim, J. A., Bartlett, S., He, L., Nielsen, C. K., Chang, A. M., Kharazia, V., . . . Whistler, J. L. (2008). Morphine-induced receptor endocytosis in a novel knockin mouse reduces tolerance and dependence. *Curr Biol*, 18(2), 129-135. doi:10.1016/j.cub.2007.12.057
- Kimura, Y., Shibata, M., Tamada, M., Ozaki, N., & Arai, K. (2017). Pharmacokinetics of Morphine in Rats with Adjuvant-induced Arthritis. *In Vivo*, 31(5), 811-817. doi:10.21873/invivo.11134
- King, C. D., Rios, G. R., Assouline, J. A., & Tephly, T. R. (1999). Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Arch Biochem Biophys*, 365(1), 156-162. doi:10.1006/abbi.1999.1155
- King, C. D., Rios, G. R., Green, M. D., MacKenzie, P. I., & Tephly, T. R. (1997). Comparison of stably expressed rat UGT1.1 and UGT2B1 in the glucuronidation of opioid compounds. *Drug Metab Dispos*, 25(2), 251-255.
- Klimas, R., & Mikus, G. (2014). Morphine-6-glucuronide is responsible for the analgesic effect after morphine administration: a quantitative review of morphine, morphine-6-glucuronide, and morphine-3-glucuronide. *Br J Anaesth*, 113(6), 935-944. doi:10.1093/bja/aeu186
- Kline, R. H. t., & Wiley, R. G. (2008). Spinal mu-opioid receptor-expressing dorsal horn neurons: role in nociception and morphine antinociception. *J Neurosci*, 28(4), 904-913. doi:10.1523/JNEUROSCI.4452-07.2008
- Kobayashi, T., Sleeman, J. E., Coughtrie, M. W., & Burchell, B. (2006). Molecular and functional characterization of microsomal UDP-glucuronic acid uptake by members of the nucleotide sugar transporter (NST) family. *Biochem J*, 400(2), 281-289. doi:10.1042/BJ20060429
- Koch, T., & Holtt, V. (2008). Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. *Pharmacol Ther*, 117(2), 199-206. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.10.003
- Kohno, T., Kumamoto, E., Higashi, H., Shimoji, K., & Yoshimura, M. (1999). Actions of opioids on excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord. *J Physiol*, 518 (Pt 3), 803-813. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.0803p.x
- Komatsu, T., Katsuyama, S., Nagase, H., Mizoguchi, H., Sakurada, C., Tsuzuki, M., . . . Sakurada, T. (2016). Intrathecal morphine-3-glucuronide-induced nociceptive behavior via Delta-2 opioid receptors in the spinal cord. *Pharmacol Biochem Behav*, 140, 68-74. doi:10.1016/j.pbb.2015.10.010
- Komatsu, T., Sakurada, S., Kohno, K., Shiohira, H., Katsuyama, S., Sakurada, C., . . . Sakurada, T. (2009). Spinal ERK activation via NO-cGMP pathway contributes to nociceptive behavior induced by morphine-3-glucuronide. *Biochem Pharmacol*, 78(8), 1026-1034. doi:10.1016/j.bcp.2009.06.106
- Konstantatos, A. H., Imberger, G., Angliss, M., Cheng, C. H., Meng, A. Z., & Chan, M. T. (2012). A prospective cohort study comparing early opioid requirement between Chinese from Hong Kong and Caucasian Australians after major abdominal surgery. *Br J Anaesth*, 109(5), 797-803. doi:10.1093/bja/aes261

- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry*, 3(8), 760-773. doi:10.1016/S2215-0366(16)00104-8
- Kronenberg, M. F., Laimer, I., Rifici, C., Saltuari, L., Bramanti, P., Moriggl, U., . . . Kofler, A. (1998). Epileptic seizure associated with intracerebroventricular and intrathecal morphine bolus. *Pain*, 75(2-3), 383-387. doi:10.1016/s0304-3959(97)00173-5
- Krzanowska, E. K., & Bodnar, R. J. (1999). Morphine antinociception elicited from the ventrolateral periaqueductal gray is sensitive to sex and gonadectomy differences in rats. *Brain Res*, 821(1), 224-230. doi:10.1016/s0006-8993(98)01364-x
- Krzanowska, E. K., Ogawa, S., Pfaff, D. W., & Bodnar, R. J. (2002). Reversal of sex differences in morphine analgesia elicited from the ventrolateral periaqueductal gray in rats by neonatal hormone manipulations. *Brain Res*, 929(1), 1-9. doi:10.1016/s0006-8993(01)03350-9
- Kuhlmann, I., Hjelmar Petersen, R., Overgaard, M., Dornonville de la Cour, K., Zwisler, S., Bjerregaard Stage, T., . . . Brosen, K. (2021). No significant influence of OCT1 genotypes on the pharmacokinetics of morphine in adult surgical patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. doi:10.1111/bcpt.13667
- Kuo, C. K., Hanioka, N., Hoshikawa, Y., Oguri, K., & Yoshimura, H. (1991). Species difference of site-selective glucuronidation of morphine. *J Pharmacobiodyn*, 14(4), 187-193. doi:10.1248/bpb1978.14.187
- Kurita, A., Miyauchi, Y., Ikushiro, S., Mackenzie, P. I., Yamada, H., & Ishii, Y. (2017). Comprehensive Characterization of Mouse UDP-Glucuronosyltransferase (Ugt) Belonging to the Ugt2b Subfamily: Identification of Ugt2b36 as the Predominant Isoform Involved in Morphine Glucuronidation. *J Pharmacol Exp Ther*, 361(2), 199-208. doi:10.1124/jpet.117.240382
- Kutsuno, Y., Hirashima, R., Sakamoto, M., Ushikubo, H., Michimae, H., Itoh, T., . . . Fujiwara, R. (2015). Expression of UDP-Glucuronosyltransferase 1 (UGT1) and Glucuronidation Activity toward Endogenous Substances in Humanized UGT1 Mouse Brain. *Drug Metab Dispos*, 43(7), 1071-1076. doi:10.1124/dmd.115.063719
- Labella, F. S., Pinsky, C., & Havlicek, V. (1979). Morphine derivatives with diminished opiate receptor potency show enhanced central excitatory activity. *Brain Res*, 174(2), 263-271. doi:10.1016/0006-8993(79)90849-7
- Lalanne, L., Ayranci, G., Kieffer, B. L., & Lutz, P. E. (2014). The kappa opioid receptor: from addiction to depression, and back. *Front Psychiatry*, 5, 170. doi:10.3389/fpsy.2014.00170
- Lamberts, J. T., & Traynor, J. R. (2013). Opioid receptor interacting proteins and the control of opioid signaling. *Curr Pharm Des*, 19(42), 7333-7347. doi:10.2174/138161281942140105160625
- Lamont, L. A., Tranquilli, W. J., & Grimm, K. A. (2000). Physiology of pain. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 30(4), 703-728, v. doi:10.1016/s0195-5616(08)70003-2
- Lane, D. A., Patel, P. A., & Morgan, M. M. (2005). Evidence for an intrinsic mechanism of antinociceptive tolerance within the ventrolateral periaqueductal gray of rats. *Neuroscience*, 135(1), 227-234. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.06.014
- Lane, D. A., Tortorici, V., & Morgan, M. M. (2004). Behavioral and electrophysiological evidence for tolerance to continuous morphine administration into the ventrolateral periaqueductal gray. *Neuroscience*, 125(1), 63-69. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.01.023
- Larijani, G. E., Goldberg, M. E., Gratz, I., & Warshal, D. P. (2004). Analgesic and hemodynamic effects of a single 7.5-mg intravenous dose of morphine in patients with moderate-to-severe postoperative pain. *Pharmacotherapy*, 24(12), 1675-1680. doi:10.1592/phco.24.12.1675.52335

- Lau, B. K., & Vaughan, C. W. (2014). Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. *Curr Opin Neurobiol*, 29, 159-164. doi:10.1016/j.conb.2014.07.010
- Laugwitz, K. L., Offermanns, S., Spicher, K., & Schultz, G. (1993). mu and delta opioid receptors differentially couple to G protein subtypes in membranes of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuron*, 10(2), 233-242. doi:10.1016/0896-6273(93)90314-h
- Laux-Biehlmann, A., Mouheiche, J., Veriepe, J., & Goumon, Y. (2013). Endogenous morphine and its metabolites in mammals: history, synthesis, localization and perspectives. *Neuroscience*, 233, 95-117. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.12.013
- Lee, J. Y., Ye, J., Gao, Z., Youn, H. S., Lee, W. H., Zhao, L., . . . Hwang, D. H. (2003). Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*, 278(39), 37041-37051. doi:10.1074/jbc.M305213200
- Lefkowitz, R. J., & Shenoy, S. K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 308(5721), 512-517. doi:10.1126/science.1109237
- Legrain, V., Iannetti, G. D., Plaghki, L., & Mouraux, A. (2011). The pain matrix reloaded: a salience detection system for the body. *Prog Neurobiol*, 93(1), 111-124. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.10.005
- Lehnardt, S., Lachance, C., Patrizi, S., Lefebvre, S., Follett, P. L., Jensen, F. E., . . . Vartanian, T. (2002). The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci*, 22(7), 2478-2486. doi:20026268
- LeVier, D. G., McCay, J. A., Stern, M. L., Harris, L. S., Page, D., Brown, R. D., . . . Munson, A. E. (1994). Immunotoxicological profile of morphine sulfate in B6C3F1 female mice. *Fundam Appl Toxicol*, 22(4), 525-542. doi:10.1006/faat.1994.1060
- Lewis, S. S., Hutchinson, M. R., Frick, M. M., Zhang, Y., Maier, S. F., Sammakia, T., . . . Watkins, L. R. (2015). Select steroid hormone glucuronide metabolites can cause toll-like receptor 4 activation and enhanced pain. *Brain Behav Immun*, 44, 128-136. doi:10.1016/j.bbi.2014.09.004
- Lewis, S. S., Hutchinson, M. R., Rezvani, N., Loram, L. C., Zhang, Y., Maier, S. F., . . . Watkins, L. R. (2010). Evidence that intrathecal morphine-3-glucuronide may cause pain enhancement via toll-like receptor 4/MD-2 and interleukin-1beta. *Neuroscience*, 165(2), 569-583. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.10.011
- Lewis, S. S., Hutchinson, M. R., Zhang, Y., Hund, D. K., Maier, S. F., Rice, K. C., & Watkins, L. R. (2013). Glucuronic acid and the ethanol metabolite ethyl-glucuronide cause toll-like receptor 4 activation and enhanced pain. *Brain Behav Immun*, 30, 24-32. doi:10.1016/j.bbi.2013.01.005
- Lewis, V. A., & Gebhart, G. F. (1977). Morphine-induced and stimulation-produced analgesias at coincident periaqueductal central gray loci: evaluation of analgesic congruence, tolerance, and cross-tolerance. *Exp Neurol*, 57(3), 934-955. doi:10.1016/0014-4886(77)90119-4
- Lian, H., Roy, E., & Zheng, H. (2016). Protocol for Primary Microglial Culture Preparation. *Bio Protoc*, 6(21). doi:10.21769/BioProtoc.1989
- Liang, Y., Chu, H., Jiang, Y., & Yuan, L. (2016). Morphine enhances IL-1beta release through toll-like receptor 4-mediated endocytic pathway in microglia. *Purinergic Signal*, 12(4), 637-645. doi:10.1007/s11302-016-9525-4
- Liddelov, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., . . . Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481-487. doi:10.1038/nature21029

- Limiroli, E., Gaspani, L., Panerai, A. E., & Sacerdote, P. (2002). Differential morphine tolerance development in the modulation of macrophage cytokine production in mice. *J Leukoc Biol*, 72(1), 43-48.
- Lipa, S. M., & Kavaliers, M. (1990). Sex differences in the inhibitory effects of the NMDA antagonist, MK-801, on morphine and stress-induced analgesia. *Brain Res Bull*, 24(4), 627-630. doi:10.1016/0361-9230(90)90169-z
- Lipkowski, A. W., Carr, D. B., Langlade, A., Osgood, P. F., & Szyfelbein, S. K. (1994). Morphine-3-glucuronide: silent regulator of morphine actions. *Life Sci*, 55(2), 149-154. doi:10.1016/0024-3205(94)90106-6
- Liu, A., Zhang, H., Qin, F., Wang, Q., Sun, Q., Xie, S., . . . Lu, Z. (2018). Sex Associated Differential Expressions of the Alternatively Spliced Variants mRNA of OPRM1 in Brain Regions of C57BL/6 Mouse. *Cell Physiol Biochem*, 50(4), 1441-1459. doi:10.1159/000494644
- Liu, Y., & Coughtrie, M. W. H. (2017). Revisiting the Latency of Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferases (UGTs)-How Does the Endoplasmic Reticulum Membrane Influence Their Function? *Pharmaceutics*, 9(3). doi:10.3390/pharmaceutics9030032
- Lloret-Linares, C., Miyauchi, E., Luo, H., Labat, L., Bouillot, J. L., Poitou, C., . . . Decleves, X. (2016). Oral Morphine Pharmacokinetic in Obesity: The Role of P-Glycoprotein, MRP2, MRP3, UGT2B7, and CYP3A4 Jejunal Contents and Obesity-Associated Biomarkers. *Mol Pharm*, 13(3), 766-773. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00656
- Lockwood, L. L., Silbert, L. H., Fleshner, M., Laudenslager, M. L., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (1994). Morphine-induced decreases in in vivo antibody responses. *Brain Behav Immun*, 8(1), 24-36. doi:10.1006/brbi.1994.1003
- Loggia, M. L., Mogil, J. S., & Bushnell, M. C. (2008). Empathy hurts: compassion for another increases both sensory and affective components of pain perception. *Pain*, 136(1-2), 168-176. doi:10.1016/j.pain.2007.07.017
- Loser, S. V., Meyer, J., Freudenthaler, S., Sattler, M., Desel, C., Meineke, I., & Gundert-Remy, U. (1996). Morphine-6-O-beta-D-glucuronide but not morphine-3-O-beta-D-glucuronide binds to mu-, delta- and kappa- specific opioid binding sites in cerebral membranes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 354(2), 192-197. doi:10.1007/BF00178720
- Lotsch, J., & Geisslinger, G. (2001). Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clin Pharmacokinet*, 40(7), 485-499. doi:10.2165/00003088-200140070-00001
- Lotsch, J., Kobal, G., Stockmann, A., Brune, K., & Geisslinger, G. (1997). Lack of analgesic activity of morphine-6-glucuronide after short-term intravenous administration in healthy volunteers. *Anesthesiology*, 87(6), 1348-1358. doi:10.1097/00000542-199712000-00014
- Lotsch, J., Schmidt, R., Vetter, G., Schmidt, H., Niederberger, E., Geisslinger, G., & Tegeder, I. (2002). Increased CNS uptake and enhanced antinociception of morphine-6-glucuronide in rats after inhibition of P-glycoprotein. *J Neurochem*, 83(2), 241-248. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01177.x
- Lotsch, J., Stockmann, A., Kobal, G., Brune, K., Waibel, R., Schmidt, N., & Geisslinger, G. (1996). Pharmacokinetics of morphine and its glucuronides after intravenous infusion of morphine and morphine-6-glucuronide in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*, 60(3), 316-325. doi:10.1016/S0009-9236(96)90058-2
- Lotsch, J., Weiss, M., Ahne, G., Kobal, G., & Geisslinger, G. (1999). Pharmacokinetic modeling of M6G formation after oral administration of morphine in healthy volunteers. *Anesthesiology*, 90(4), 1026-1038. doi:10.1097/00000542-199904000-00016
- Loyd, D. R., Morgan, M. M., & Murphy, A. Z. (2007). Morphine preferentially activates the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the male rat: a potential

- mechanism for sex differences in antinociception. *Neuroscience*, 147(2), 456-468. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.03.053
- Loyd, D. R., Morgan, M. M., & Murphy, A. Z. (2008). Sexually dimorphic activation of the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary circuit during the development of tolerance to morphine in the rat. *Eur J Neurosci*, 27(6), 1517-1524. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06100.x
- Loyd, D. R., & Murphy, A. Z. (2006). Sex differences in the anatomical and functional organization of the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the rat: a potential circuit mediating the sexually dimorphic actions of morphine. *J Comp Neurol*, 496(5), 723-738. doi:10.1002/cne.20962
- Loyd, D. R., Wang, X., & Murphy, A. Z. (2008). Sex differences in micro-opioid receptor expression in the rat midbrain periaqueductal gray are essential for eliciting sex differences in morphine analgesia. *J Neurosci*, 28(52), 14007-14017. doi:10.1523/JNEUROSCI.4123-08.2008
- Lueptow, L. M., Fakira, A. K., & Bobeck, E. N. (2018). The Contribution of the Descending Pain Modulatory Pathway in Opioid Tolerance. *Front Neurosci*, 12, 886. doi:10.3389/fnins.2018.00886
- Machelska, H., & Celik, M. O. (2020). Opioid Receptors in Immune and Glial Cells- Implications for Pain Control. *Front Immunol*, 11, 300. doi:10.3389/fimmu.2020.00300
- Madariaga-Mazon, A., Marmolejo-Valencia, A. F., Li, Y., Toll, L., Houghten, R. A., & Martinez-Mayorga, K. (2017). Mu-Opioid receptor biased ligands: A safer and painless discovery of analgesics? *Drug Discov Today*, 22(11), 1719-1729. doi:10.1016/j.drudis.2017.07.002
- Maduna, T., Audouard, E., Dembele, D., Mouzaoui, N., Reiss, D., Massotte, D., & Gaveriaux-Ruff, C. (2018). Microglia Express Mu Opioid Receptor: Insights From Transcriptomics and Fluorescent Reporter Mice. *Front Psychiatry*, 9, 726. doi:10.3389/fpsyt.2018.00726
- Magdalou, J., Fournel-Gigleux, S., & Ouzzine, M. (2010). Insights on membrane topology and structure/function of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev*, 42(1), 159-166. doi:10.3109/03602530903209270
- Maier, C., Hildebrandt, J., Klinger, R., Henrich-Eberl, C., Lindena, G., & Group, M. S. (2002). Morphine responsiveness, efficacy and tolerability in patients with chronic non-tumor associated pain - results of a double-blind placebo-controlled trial (MONTAS). *Pain*, 97(3), 223-233. doi:10.1016/S0304-3959(02)00020-9
- Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Mathiesen, J. M., Sunahara, R. K., . . . Granier, S. (2012). Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, 485(7398), 321-326. doi:10.1038/nature10954
- Manning, B. H., & Mayer, D. J. (1995). The central nucleus of the amygdala contributes to the production of morphine antinociception in the formalin test. *Pain*, 63(2), 141-152. doi:10.1016/0304-3959(95)00027-P
- Margaillan, G., Rouleau, M., Fallon, J. K., Caron, P., Villeneuve, L., Turcotte, V., . . . Guillemette, C. (2015). Quantitative profiling of human renal UDP-glucuronosyltransferases and glucuronidation activity: a comparison of normal and tumoral kidney tissues. *Drug Metab Dispos*, 43(4), 611-619. doi:10.1124/dmd.114.062877
- Matos, F. F., Rollema, H., & Basbaum, A. I. (1992). Simultaneous measurement of extracellular morphine and serotonin in brain tissue and CSF by microdialysis in awake rats. *J Neurochem*, 58(5), 1773-1781. doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb10053.x

- Matos, F. F., Rollema, H., Taiwo, Y. O., Levine, J. D., & Basbaum, A. I. (1995). Relationship between analgesia and extracellular morphine in brain and spinal cord in awake rats. *Brain Res*, 693(1-2), 187-195. doi:10.1016/0006-8993(95)00742-9
- Matthes, H. W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., . . . Kieffer, B. L. (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature*, 383(6603), 819-823. doi:10.1038/383819a0
- Mattioli, T. A., Leduc-Pessah, H., Skelhorne-Gross, G., Nicol, C. J., Milne, B., Trang, T., & Cahill, C. M. (2014). Toll-like receptor 4 mutant and null mice retain morphine-induced tolerance, hyperalgesia, and physical dependence. *PLoS One*, 9(5), e97361. doi:10.1371/journal.pone.0097361
- Mazoit, J. X., Butscher, K., & Samii, K. (2007). Morphine in postoperative patients: pharmacokinetics and pharmacodynamics of metabolites. *Anesth Analg*, 105(1), 70-78. doi:10.1213/01.ane.0000265557.73688.32
- Mazoit, J. X., Sandouk, P., Scherrmann, J. M., & Roche, A. (1990). Extrahepatic metabolism of morphine occurs in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 48(6), 613-618. doi:10.1038/clpt.1990.203
- McDonough, P. C., Levine, B., Vorce, S., Jufer, R. A., & Fowler, D. (2008). The detection of hydromorphone in urine specimens with high morphine concentrations. *J Forensic Sci*, 53(3), 752-754. doi:10.1111/j.1556-4029.2008.00730.x
- McGaraughty, S., Farr, D. A., & Heinricher, M. M. (2004). Lesions of the periaqueductal gray disrupt input to the rostral ventromedial medulla following microinjections of morphine into the medial or basolateral nuclei of the amygdala. *Brain Res*, 1009(1-2), 223-227. doi:10.1016/j.brainres.2004.02.048
- McGaraughty, S., & Heinricher, M. M. (2002). Microinjection of morphine into various amygdaloid nuclei differentially affects nociceptive responsiveness and RVM neuronal activity. *Pain*, 96(1-2), 153-162. doi:10.1016/s0304-3959(01)00440-7
- McGuire, D. B. (2004). Occurrence of cancer pain. *J Natl Cancer Inst Monogr*(32), 51-56. doi:10.1093/jncimonographs/lgh015
- McMillan, D. M., & Tyndale, R. F. (2015). Nicotine Increases Codeine Analgesia Through the Induction of Brain CYP2D and Central Activation of Codeine to Morphine. *Neuropsychopharmacology*, 40(7), 1804-1812. doi:10.1038/npp.2015.32
- McQuay, H. J., Carroll, D., Faura, C. C., Gavaghan, D. J., Hand, C. W., & Moore, R. A. (1990). Oral morphine in cancer pain: influences on morphine and metabolite concentration. *Clin Pharmacol Ther*, 48(3), 236-244. doi:10.1038/clpt.1990.145
- Meech, R., Hu, D. G., McKinnon, R. A., Mubarakah, S. N., Haines, A. Z., Nair, P. C., . . . Mackenzie, P. I. (2019). The UDP-Glycosyltransferase (UGT) Superfamily: New Members, New Functions, and Novel Paradigms. *Physiol Rev*, 99(2), 1153-1222. doi:10.1152/physrev.00058.2017
- Meineke, I., Freudenthaler, S., Hofmann, U., Schaeffeler, E., Mikus, G., Schwab, M., . . . Brockmoller, J. (2002). Pharmacokinetic modelling of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in plasma and cerebrospinal fluid of neurosurgical patients after short-term infusion of morphine. *Br J Clin Pharmacol*, 54(6), 592-603. doi:10.1046/j.1365-2125.2002.t01-1-01689.x
- Meissner, W. (1819). Ueber ein neues Pflanzenalkali (Alkaloid). *Chemie und Physik*, 25, 379-391.
- Meng, F., Xie, G. X., Thompson, R. C., Mansour, A., Goldstein, A., Watson, S. J., & Akil, H. (1993). Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(21), 9954-9958. doi:10.1073/pnas.90.21.9954

- Merighi, S., Gessi, S., Varani, K., Fazzi, D., Stefanelli, A., & Borea, P. A. (2013). Morphine mediates a proinflammatory phenotype via mu-opioid receptor-PKCvarepsilon-Akt-ERK1/2 signaling pathway in activated microglial cells. *Biochem Pharmacol*, *86*(4), 487-496. doi:10.1016/j.bcp.2013.05.027
- Merlin, M. D. (2003). Archaeological evidence for the tradition of psychoactive plant use In the old world. *Economic Botany*, *57*(3), 295-323. doi:10.1663/0013-0001(2003)057[0295:AEFTTO]2.0.CO;2
- Merskey. (1979). Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain*, *6*(3), 249.
- Micevych, P. E., Rissman, E. F., Gustafsson, J. A., & Sinchak, K. (2003). Estrogen receptor-alpha is required for estrogen-induced mu-opioid receptor internalization. *J Neurosci Res*, *71*(6), 802-810. doi:10.1002/jnr.10526
- Mignat, C., Jansen, R., & Ziegler, A. (1995). Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of morphine and morphine glucuronides in rabbits receiving single and repeated doses of morphine. *J Pharm Pharmacol*, *47*(2), 171-175. doi:10.1111/j.2042-7158.1995.tb05772.x
- Mignat, C., Wille, U., & Ziegler, A. (1995). Affinity profiles of morphine, codeine, dihydrocodeine and their glucuronides at opioid receptor subtypes. *Life Sci*, *56*(10), 793-799. doi:10.1016/0024-3205(95)00010-4
- Mika, J., Wawrzczak-Bargiela, A., Osikowicz, M., Makuch, W., & Przewlocka, B. (2009). Attenuation of morphine tolerance by minocycline and pentoxifylline in naive and neuropathic mice. *Brain Behav Immun*, *23*(1), 75-84. doi:10.1016/j.bbi.2008.07.005
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, *66*(6), 355-474. doi:10.1016/s0301-0082(02)00009-6
- Miller, P. L., & Ernst, A. A. (2004). Sex differences in analgesia: a randomized trial of mu versus kappa opioid agonists. *South Med J*, *97*(1), 35-41. doi:10.1097/01.smj.0000085743.68121.a9
- Milne, R. W., Nation, R. L., & Somogyi, A. A. (1996). The disposition of morphine and its 3- and 6-glucuronide metabolites in humans and animals, and the importance of the metabolites to the pharmacological effects of morphine. *Drug Metab Rev*, *28*(3), 345-472. doi:10.3109/03602539608994011
- Miners, J. O., Lillywhite, K. J., & Birkett, D. J. (1988). In vitro evidence for the involvement of at least two forms of human liver UDP-glucuronosyltransferase in morphine 3-glucuronidation. *Biochem Pharmacol*, *37*(14), 2839-2845. doi:10.1016/0006-2952(88)90048-2
- Mitrovic, I., Margeta-Mitrovic, M., Bader, S., Stoffel, M., Jan, L. Y., & Basbaum, A. I. (2003). Contribution of GIRK2-mediated postsynaptic signaling to opiate and alpha 2-adrenergic analgesia and analgesic sex differences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(1), 271-276. doi:10.1073/pnas.0136822100
- Mjanger, E., & Yaksh, T. L. (1991). Characteristics of dose-dependent antagonism by beta-funaltrexamine of the antinociceptive effects of intrathecal mu agonists. *J Pharmacol Exp Ther*, *258*(2), 544-550.
- Mogil, J. S. (2012). Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nat Rev Neurosci*, *13*(12), 859-866. doi:10.1038/nrn3360
- Mogil, J. S. (2020). Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nat Rev Neurosci*, *21*(7), 353-365. doi:10.1038/s41583-020-0310-6
- Mogil, J. S., Chesler, E. J., Wilson, S. G., Juraska, J. M., & Sternberg, W. F. (2000). Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. *Neurosci Biobehav Rev*, *24*(3), 375-389. doi:10.1016/s0149-7634(00)00015-4

- Mojaverian, P., Fedder, I. L., Vlasses, P. H., Rotmensch, H. H., Rocci, M. L., Jr., Swanson, B. N., & Ferguson, R. K. (1982). Cimetidine does not alter morphine disposition in man. *Br J Clin Pharmacol*, *14*(6), 809-813. doi:10.1111/j.1365-2125.1982.tb02041.x
- Moller, T. C., Pedersen, M. F., van Senten, J. R., Seiersen, S. D., Mathiesen, J. M., Bouvier, M., & Brauner-Osborne, H. (2020). Dissecting the roles of GRK2 and GRK3 in mu-opioid receptor internalization and beta-arrestin2 recruitment using CRISPR/Cas9-edited HEK293 cells. *Sci Rep*, *10*(1), 17395. doi:10.1038/s41598-020-73674-0
- Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J. L., Moisand, C., Chalon, P., . . . Meunier, J. C. (1994). ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett*, *341*(1), 33-38. doi:10.1016/0014-5793(94)80235-1
- Monzon, E., & Richard, N. (2019). *État des lieux de la consommation des antalgiques opioïdes et leurs usages problématiques*. Retrieved from
- Moran, T. D., & Smith, P. A. (2002). Morphine-3beta-D-glucuronide suppresses inhibitory synaptic transmission in rat substantia gelatinosa. *J Pharmacol Exp Ther*, *302*(2), 568-576. doi:10.1124/jpet.102.035626
- Moreau, J. L., & Fields, H. L. (1986). Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons that modulate nociceptive transmission. *Brain Res*, *397*(1), 37-46. doi:10.1016/0006-8993(86)91367-3
- Morgan, M. M., Clayton, C. C., & Boyer-Quick, J. S. (2005). Differential susceptibility of the PAG and RVM to tolerance to the antinociceptive effect of morphine in the rat. *Pain*, *113*(1-2), 91-98. doi:10.1016/j.pain.2004.09.039
- Morgan, M. M., Fossum, E. N., Levine, C. S., & Ingram, S. L. (2006). Antinociceptive tolerance revealed by cumulative intracranial microinjections of morphine into the periaqueductal gray in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, *85*(1), 214-219. doi:10.1016/j.pbb.2006.08.003
- Morgan, M. M., Reid, R. A., & Saville, K. A. (2014). Functionally selective signaling for morphine and fentanyl antinociception and tolerance mediated by the rat periaqueductal gray. *PLoS One*, *9*(12), e114269. doi:10.1371/journal.pone.0114269
- Moriwaki, A., Wang, J. B., Svingos, A., van Bockstaele, E., Cheng, P., Pickel, V., & Uhl, G. R. (1996). mu Opiate receptor immunoreactivity in rat central nervous system. *Neurochem Res*, *21*(11), 1315-1331. doi:10.1007/BF02532373
- Morley, J. S., Miles, J. B., Wells, J. C., & Bowsher, D. (1992). Paradoxical pain. *Lancet*, *340*(8826), 1045. doi:10.1016/0140-6736(92)93067-w
- Morton, C. R., Duggan, A. W., & Zhao, Z. Q. (1984). The effects of lesions of medullary midline and lateral reticular areas on inhibition in the dorsal horn produced by periaqueductal grey stimulation in the cat. *Brain Res*, *301*(1), 121-130. doi:10.1016/0006-8993(84)90408-6
- Motamed, C., Mazoit, X., Ghanouchi, K., Guirimand, F., Abhay, K., Lieutaud, T., . . . Duvaldestin, P. (2000). Preemptive intravenous morphine-6-glucuronide is ineffective for postoperative pain relief. *Anesthesiology*, *92*(2), 355-360. doi:10.1097/00000542-200002000-00015
- Mousavi, Z., Shafaghi, B., Kobarfard, F., & Jorjani, M. (2007). Sex differences and role of gonadal hormones on glutamate level in the nucleus accumbens in morphine tolerant rats: a microdialysis study. *Eur J Pharmacol*, *554*(2-3), 145-149. doi:10.1016/j.ejphar.2006.10.010
- Muraca, M., & Fevery, J. (1984). Influence of sex and sex steroids on bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase activity of rat liver. *Gastroenterology*, *87*(2), 308-313.

- Murphey, L. J., & Olsen, G. D. (1994). Diffusion of morphine-6-beta-D-glucuronide into the neonatal guinea pig brain during drug-induced respiratory depression. *J Pharmacol Exp Ther*, *271*(1), 118-124.
- Nagano, E., Yamada, H., & Oguri, K. (2000). Characteristic glucuronidation pattern of physiologic concentration of morphine in rat brain. *Life Sci*, *67*(20), 2453-2464. doi:10.1016/s0024-3205(00)00825-0
- Nair, P. C., Meech, R., Mackenzie, P. I., McKinnon, R. A., & Miners, J. O. (2015). Insights into the UDP-sugar selectivities of human UDP-glycosyltransferases (UGT): a molecular modeling perspective. *Drug Metab Rev*, 1-11.
- Nakamura, A., Nakajima, M., Yamanaka, H., Fujiwara, R., & Yokoi, T. (2008). Expression of UGT1A and UGT2B mRNA in human normal tissues and various cell lines. *Drug Metab Dispos*, *36*(8), 1461-1464. doi:10.1124/dmd.108.021428
- Nam, M. H., Han, K. S., Lee, J., Bae, J. Y., An, H., Park, S., . . . Lee, C. J. (2018). Expression of micro-Opioid Receptor in CA1 Hippocampal Astrocytes. *Exp Neurobiol*, *27*(2), 120-128. doi:10.5607/en.2018.27.2.120
- Newton, P. M., Kim, J. A., McGeehan, A. J., Paredes, J. P., Chu, K., Wallace, M. J., . . . Messing, R. O. (2007). Increased response to morphine in mice lacking protein kinase C epsilon. *Genes Brain Behav*, *6*(4), 329-338. doi:10.1111/j.1601-183X.2006.00261.x
- Nielsen, L. M., Olesen, A. E., Branford, R., Christrup, L. L., Sato, H., & Drewes, A. M. (2015). Association Between Human Pain-Related Genotypes and Variability in Opioid Analgesia: An Updated Review. *Pain Pract*, *15*(6), 580-594. doi:10.1111/papr.12232
- Niesters, M., Dahan, A., Kest, B., Zacny, J., Stijnen, T., Aarts, L., & Sarton, E. (2010). Do sex differences exist in opioid analgesia? A systematic review and meta-analysis of human experimental and clinical studies. *Pain*, *151*(1), 61-68. doi:10.1016/j.pain.2010.06.012
- North, R. A., Williams, J. T., Surprenant, A., & Christie, M. J. (1987). Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(15), 5487-5491. doi:10.1073/pnas.84.15.5487
- Obeng, S., Wilkerson, J. L., Leon, F., Reeves, M. E., Restrepo, L. F., Gamez-Jimenez, L. R., . . . Hiranita, T. (2021). Pharmacological Comparison of Mitragynine and 7-Hydroxymitragynine: In Vitro Affinity and Efficacy for mu-Opioid Receptor and Opioid-Like Behavioral Effects in Rats. *J Pharmacol Exp Ther*, *376*(3), 410-427. doi:10.1124/jpet.120.000189
- Oguri, K., Hanioka, N., & Yoshimura, H. (1990). Species differences in metabolism of codeine: urinary excretion of codeine glucuronide, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in mice, rats, guinea pigs and rabbits. *Xenobiotica*, *20*(7), 683-688. doi:10.3109/00498259009046884
- Ohno, S., Kawana, K., & Nakajin, S. (2008). Contribution of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 and 1A8 to morphine-6-glucuronidation and its kinetic properties. *Drug Metab Dispos*, *36*(4), 688-694. doi:10.1124/dmd.107.019281
- Oluyomi, A. O., Hart, S. L., & Smith, T. W. (1992). Differential antinociceptive effects of morphine and methyldorphine in the formalin test. *Pain*, *49*(3), 415-418. doi:10.1016/0304-3959(92)90249-B
- Osborne, P. B., Chieng, B., & Christie, M. J. (2000). Morphine-6 beta-glucuronide has a higher efficacy than morphine as a mu-opioid receptor agonist in the rat locus coeruleus. *Br J Pharmacol*, *131*(7), 1422-1428. doi:10.1038/sj.bjp.0703697
- Osborne, P. B., Vaughan, C. W., Wilson, H. I., & Christie, M. J. (1996). Opioid inhibition of rat periaqueductal grey neurones with identified projections to rostral ventromedial medulla in vitro. *J Physiol*, *490* (Pt 2), 383-389. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021152

- Osborne, R., Joel, S., Grebenik, K., Trew, D., & Slevin, M. (1993). The pharmacokinetics of morphine and morphine glucuronides in kidney failure. *Clin Pharmacol Ther*, *54*(2), 158-167. doi:10.1038/clpt.1993.127
- Osborne, R., Joel, S., Trew, D., & Slevin, M. (1990). Morphine and metabolite behavior after different routes of morphine administration: demonstration of the importance of the active metabolite morphine-6-glucuronide. *Clin Pharmacol Ther*, *47*(1), 12-19. doi:10.1038/clpt.1990.2
- Osborne, R., Thompson, P., Joel, S., Trew, D., Patel, N., & Slevin, M. (1992). The analgesic activity of morphine-6-glucuronide. *Br J Clin Pharmacol*, *34*(2), 130-138. doi:10.1111/j.1365-2125.1992.tb04121.x
- Osborne, R. J., Joel, S. P., & Slevin, M. L. (1986). Morphine intoxication in renal failure: the role of morphine-6-glucuronide. *Br Med J (Clin Res Ed)*, *292*(6535), 1548-1549. doi:10.1136/bmj.292.6535.1548
- Ouellet, D. M., & Pollack, G. M. (1997). Effect of prior morphine-3-glucuronide exposure on morphine disposition and antinociception. *Biochem Pharmacol*, *53*(10), 1451-1457. doi:10.1016/s0006-2952(97)00086-5
- Ouzzine, M., Gulberti, S., Ramalanjaona, N., Magdalou, J., & Fournel-Gigleux, S. (2014). The UDP-glucuronosyltransferases of the blood-brain barrier: their role in drug metabolism and detoxication. *Front Cell Neurosci*, *8*, 349. doi:10.3389/fncel.2014.00349
- Paller, C. J., Campbell, C. M., Edwards, R. R., & Dobs, A. S. (2009). Sex-based differences in pain perception and treatment. *Pain Med*, *10*(2), 289-299. doi:10.1111/j.1526-4637.2008.00558.x
- Pan, Z. Z., Williams, J. T., & Osborne, P. B. (1990). Opioid actions on single nucleus raphe magnus neurons from rat and guinea-pig in vitro. *J Physiol*, *427*, 519-532. doi:10.1113/jphysiol.1990.sp018185
- Pasternak, G. W. (2014). Opioids and their receptors: Are we there yet? *Neuropharmacology*, *76 Pt B*, 198-203. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.03.039
- Pasternak, G. W., Bodnar, R. J., Clark, J. A., & Inturrisi, C. E. (1987). Morphine-6-glucuronide, a potent mu agonist. *Life Sci*, *41*(26), 2845-2849. doi:10.1016/0024-3205(87)90431-0
- Pasternak, G. W., & Pan, Y. X. (2013). Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacol Rev*, *65*(4), 1257-1317. doi:10.1124/pr.112.007138
- Paul, D., Standifer, K. M., Inturrisi, C. E., & Pasternak, G. W. (1989). Pharmacological characterization of morphine-6 beta-glucuronide, a very potent morphine metabolite. *J Pharmacol Exp Ther*, *251*(2), 477-483.
- Pavlovic, Z. W., & Bodnar, R. J. (1998). Opioid supraspinal analgesic synergy between the amygdala and periaqueductal gray in rats. *Brain Res*, *779*(1-2), 158-169. doi:10.1016/s0006-8993(97)01115-3
- Peckham, E. M., Barkley, L. M., Divin, M. F., Cicero, T. J., & Traynor, J. R. (2005). Comparison of the antinociceptive effect of acute morphine in female and male Sprague-Dawley rats using the long-lasting mu-antagonist methocinnamox. *Brain Res*, *1058*(1-2), 137-147. doi:10.1016/j.brainres.2005.07.060
- Peckham, E. M., & Traynor, J. R. (2006). Comparison of the antinociceptive response to morphine and morphine-like compounds in male and female Sprague-Dawley rats. *J Pharmacol Exp Ther*, *316*(3), 1195-1201. doi:10.1124/jpet.105.094276
- Peluso, J., LaForge, K. S., Matthes, H. W., Kreek, M. J., Kieffer, B. L., & Gaveriaux-Ruff, C. (1998). Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells. *J Neuroimmunol*, *81*(1-2), 184-192. doi:10.1016/s0165-5728(97)00178-1

- Penson, R. T., Joel, S. P., Bakhshi, K., Clark, S. J., Langford, R. M., & Slevin, M. L. (2000). Randomized placebo-controlled trial of the activity of the morphine glucuronides. *Clin Pharmacol Ther*, *68*(6), 667-676. doi:10.1067/mcp.2000.111934
- Penson, R. T., Joel, S. P., Clark, S., Gloyne, A., & Slevin, M. L. (2001). Limited phase I study of morphine-3-glucuronide. *J Pharm Sci*, *90*(11), 1810-1816. doi:10.1002/jps.1131
- Piltonen, M., Krokhotin, A., Parisien, M., Berube, P., Djambazian, H., Sladek, R., . . . Diatchenko, L. (2021). Alternative Splicing of Opioid Receptor Genes Shows a Conserved Pattern for 6TM Receptor Variants. *Cell Mol Neurobiol*, *41*(5), 1039-1055. doi:10.1007/s10571-020-00971-7
- Piltonen, M., Parisien, M., Gregoire, S., Chabot-Dore, A. J., Jafarnejad, S. M., Berube, P., . . . Diatchenko, L. (2019). Alternative Splicing of the Delta-Opioid Receptor Gene Suggests Existence of New Functional Isoforms. *Mol Neurobiol*, *56*(4), 2855-2869. doi:10.1007/s12035-018-1253-z
- Pisanu, C., Franconi, F., Gessa, G. L., Mameli, S., Pisanu, G. M., Campesi, I., . . . Agabio, R. (2019). Sex differences in the response to opioids for pain relief: A systematic review and meta-analysis. *Pharmacol Res*, *148*, 104447. doi:10.1016/j.phrs.2019.104447
- Portenoy, R. K., Foley, K. M., Stulman, J., Khan, E., Adelhardt, J., Layman, M., . . . Inturrisi, C. E. (1991). Plasma morphine and morphine-6-glucuronide during chronic morphine therapy for cancer pain: plasma profiles, steady-state concentrations and the consequences of renal failure. *Pain*, *47*(1), 13-19. doi:10.1016/0304-3959(91)90005-I
- Portenoy, R. K., Thaler, H. T., Inturrisi, C. E., Friedlander-Klar, H., & Foley, K. M. (1992). The metabolite morphine-6-glucuronide contributes to the analgesia produced by morphine infusion in patients with pain and normal renal function. *Clin Pharmacol Ther*, *51*(4), 422-431. doi:10.1038/clpt.1992.42
- Posillico, C. K., Terasaki, L. S., Bilbo, S. D., & Schwarz, J. M. (2015). Examination of sex and minocycline treatment on acute morphine-induced analgesia and inflammatory gene expression along the pain pathway in Sprague-Dawley rats. *Biol Sex Differ*, *6*, 33. doi:10.1186/s13293-015-0049-3
- Poulain, P., Ribon, M. A., Hanks, G. W., Hoskin, P. J., Aherne, G. W., & Chapman, D. J. (1990). CSF concentrations of morphine-6-glucuronide after oral administration of morphine. *Pain*, *41*(1), 115-116. doi:10.1016/0304-3959(90)91116-Z
- Pradhan, A. A., Befort, K., Nozaki, C., Gaveriaux-Ruff, C., & Kieffer, B. L. (2011). The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol Sci*, *32*(10), 581-590. doi:10.1016/j.tips.2011.06.008
- Prather, P. L., McGinn, T. M., Claude, P. A., Liu-Chen, L. Y., Loh, H. H., & Law, P. Y. (1995). Properties of a kappa-opioid receptor expressed in CHO cells: interaction with multiple G-proteins is not specific for any individual G alpha subunit and is similar to that of other opioid receptors. *Brain Res Mol Brain Res*, *29*(2), 336-346. doi:10.1016/0169-328x(94)00264-f
- Premont, R. T., & Gainetdinov, R. R. (2007). Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol*, *69*, 511-534. doi:10.1146/annurev.physiol.69.022405.154731
- Przewlocki, R., & Almeida, O. F. X. (2017). 1.08 - Stress and Opioid Systems. In D. W. Pfaff & M. Joëls (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior (Third Edition)* (pp. 225-260). Oxford: Academic Press.
- Pud, D., Yarnitsky, D., Sprecher, E., Rogowski, Z., Adler, R., & Eisenberg, E. (2006). Can personality traits and gender predict the response to morphine? An experimental cold pain study. *Eur J Pain*, *10*(2), 103-112. doi:10.1016/j.ejpain.2005.01.010
- Qian-Ling, G., Hedner, J., Bjorkman, R., & Hedner, T. (1992). Morphine-3-glucuronide may functionally antagonize morphine-6-glucuronide induced antinociception and

- ventilatory depression in the rat. *Pain*, 48(2), 249-255. doi:10.1016/0304-3959(92)90065-J
- Quillinan, N., Lau, E. K., Virk, M., von Zastrow, M., & Williams, J. T. (2011). Recovery from mu-opioid receptor desensitization after chronic treatment with morphine and methadone. *J Neurosci*, 31(12), 4434-4443. doi:10.1523/JNEUROSCI.4874-10.2011
- Raghavendra, V., Rutkowski, M. D., & DeLeo, J. A. (2002). The role of spinal neuroimmune activation in morphine tolerance/hyperalgesia in neuropathic and sham-operated rats. *J Neurosci*, 22(22), 9980-9989.
- Raghavendra, V., Tanga, F. Y., & DeLeo, J. A. (2004). Attenuation of morphine tolerance, withdrawal-induced hyperalgesia, and associated spinal inflammatory immune responses by propentofylline in rats. *Neuropsychopharmacology*, 29(2), 327-334. doi:10.1038/sj.npp.1300315
- Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., . . . Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9), 1976-1982. doi:10.1097/j.pain.0000000000001939
- Raja, S. N., Meyer, R. A., & Campbell, J. N. (1988). Peripheral mechanisms of somatic pain. *Anesthesiology*, 68(4), 571-590. doi:10.1097/00000542-198804000-00016
- Ratka, A., & Simpkins, J. W. (1991). Effects of estradiol and progesterone on the sensitivity to pain and on morphine-induced antinociception in female rats. *Horm Behav*, 25(2), 217-228. doi:10.1016/0018-506x(91)90052-j
- Reiss, D., Maduna, T., Maurin, H., Audouard, E., & Gaveriaux-Ruff, C. (2020). Mu opioid receptor in microglia contributes to morphine analgesic tolerance, hyperalgesia, and withdrawal in mice. *J Neurosci Res*. doi:10.1002/jnr.24626
- Revesz, K., Toth, B., Staines, A. G., Coughtrie, M. W., Mandl, J., & Csala, M. (2013). Luminal accumulation of newly synthesized morphine-3-glucuronide in rat liver microsomal vesicles. *Biofactors*, 39(3), 271-278. doi:10.1002/biof.1067
- Richie, C. (2019). Sex, not gender. A plea for accuracy. *Exp Mol Med*, 51(11), 1. doi:10.1038/s12276-019-0341-0
- Richner, M., Jager, S. B., Siupka, P., & Vaegter, C. B. (2017). Hydraulic Extrusion of the Spinal Cord and Isolation of Dorsal Root Ganglia in Rodents. *J Vis Exp*(119). doi:10.3791/55226
- Riley, J., Ross, J. R., Rutter, D., Wells, A. U., Goller, K., du Bois, R., & Welsh, K. (2006). No pain relief from morphine? Individual variation in sensitivity to morphine and the need to switch to an alternative opioid in cancer patients. *Support Care Cancer*, 14(1), 56-64. doi:10.1007/s00520-005-0843-2
- Rivero, G., Llorente, J., McPherson, J., Cooke, A., Mundell, S. J., McArdle, C. A., . . . Kelly, E. (2012). Endomorphin-2: a biased agonist at the mu-opioid receptor. *Mol Pharmacol*, 82(2), 178-188. doi:10.1124/mol.112.078659
- Robinson, D. R., & Gebhart, G. F. (2008). Inside information: the unique features of visceral sensation. *Mol Interv*, 8(5), 242-253. doi:10.1124/mi.8.5.9
- Roeckel, L. A., Le Coz, G. M., Gaveriaux-Ruff, C., & Simonin, F. (2016). Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. *Neuroscience*, 338, 160-182. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.06.029
- Roeckel, L. A., Utard, V., Reiss, D., Mouheiche, J., Maurin, H., Robe, A., . . . Gaveriaux-Ruff, C. (2017). Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. *Sci Rep*, 7(1), 10406. doi:10.1038/s41598-017-11120-4

- Rojavin, M., Szabo, I., Bussiere, J. L., Rogers, T. J., Adler, M. W., & Eisenstein, T. K. (1993). Morphine treatment in vitro or in vivo decreases phagocytic functions of murine macrophages. *Life Sci*, 53(12), 997-1006. doi:10.1016/0024-3205(93)90122-j
- Romberg, R., van Dorp, E., Hollander, J., Kruit, M., Binning, A., Smith, T., & Dahan, A. (2007). A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of IV morphine-6-glucuronide for postoperative pain relief after knee replacement surgery. *Clin J Pain*, 23(3), 197-203. doi:10.1097/AJP.0b013e31802b4f6a
- Ropero-Miller, J. D., & Speaker, P. J. (2019). The hidden costs of the opioid crisis and the implications for financial management in the public sector. *Forensic Sci Int Synerg*, 1, 227-238. doi:10.1016/j.fsisyn.2019.09.003
- Rowland, A., Mackenzie, P. I., & Miners, J. O. (2015). Transporter-mediated uptake of UDP-glucuronic acid by human liver microsomes: assay conditions, kinetics, and inhibition. *Drug Metab Dispos*, 43(1), 147-153. doi:10.1124/dmd.114.060509
- Roy, S., Cain, K. J., Chapin, R. B., Charboneau, R. G., & Barke, R. A. (1998). Morphine modulates NF kappa B activation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 245(2), 392-396. doi:10.1006/bbrc.1998.8415
- Roy, S., Chapin, R. B., Cain, K. J., Charboneau, R. G., Ramakrishnan, S., & Barke, R. A. (1997). Morphine inhibits transcriptional activation of IL-2 in mouse thymocytes. *Cell Immunol*, 179(1), 1-9. doi:10.1006/cimm.1997.1147
- Rozan, J. P., Kahn, C. H., & Warfield, C. A. (1995). Epidural and intravenous opioid-induced neuroexcitation. *Anesthesiology*, 83(4), 860-863. doi:10.1097/00000542-199510000-00027
- Rush, G. F., Newton, J. F., & Hook, J. B. (1983). Sex differences in the excretion of glucuronide conjugates: the role of intrarenal glucuronidation. *J Pharmacol Exp Ther*, 227(3), 658-662.
- Ruzicka, B. B., & Akil, H. (1997). The interleukin-1beta-mediated regulation of proenkephalin and opioid receptor messenger RNA in primary astrocyte-enriched cultures. *Neuroscience*, 79(2), 517-524. doi:10.1016/s0306-4522(96)00669-0
- Sabetkasaei, M., Masoudnia, F., Khansefid, N., & Behzadi, G. (2007). Opioid receptors of the central amygdala and morphine-induced antinociception. *Iran Biomed J*, 11(2), 75-80.
- Sabolovic, N., Heurtaux, T., Humbert, A. C., Krisa, S., & Magdalou, J. (2007). cis- and trans-Resveratrol are glucuronidated in rat brain, olfactory mucosa and cultured astrocytes. *Pharmacology*, 80(2-3), 185-192. doi:10.1159/000104149
- Sacerdote, P., Manfredi, B., Mantegazza, P., & Panerai, A. E. (1997). Antinociceptive and immunosuppressive effects of opiate drugs: a structure-related activity study. *Br J Pharmacol*, 121(4), 834-840. doi:10.1038/sj.bjp.0701138
- Sadeque, A. J., Usmani, K. A., Palamar, S., Cerny, M. A., & Chen, W. G. (2012). Identification of human UDP-glucuronosyltransferases involved in N-carbamoyl glucuronidation of lorcaserin. *Drug Metab Dispos*, 40(4), 772-778. doi:10.1124/dmd.111.043448
- Sakamoto, M., Itoh, T., Tukey, R. H., & Fujiwara, R. (2015). Nicotine regulates the expression of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) in humanized UGT1 mouse brain. *Drug Metab Pharmacokinet*, 30(4), 269-275. doi:10.1016/j.dmpk.2015.04.004
- Salem, A., & Hope, W. (1997). Role of morphine glucuronide metabolites in morphine dependence in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 57(4), 801-807. doi:10.1016/s0091-3057(96)00471-6
- Samineni, V. K., Grajales-Reyes, J. G., Copits, B. A., O'Brien, D. E., Trigg, S. L., Gomez, A. M., . . . Gereau, R. W. t. (2017). Divergent Modulation of Nociception by Glutamatergic and GABAergic Neuronal Subpopulations in the Periaqueductal Gray. *eNeuro*, 4(2). doi:10.1523/ENEURO.0129-16.2017

- Samuelsson, H., Hedner, T., Venn, R., & Michalkiewicz, A. (1993). CSF and plasma concentrations of morphine and morphine glucuronides in cancer patients receiving epidural morphine. *Pain*, *52*(2), 179-185. doi:10.1016/0304-3959(93)90129-D
- Sandouk, P., Serrie, A., Scherrmann, J. M., Langlade, A., & Bourre, J. M. (1991). Presence of morphine metabolites in human cerebrospinal fluid after intracerebroventricular administration of morphine. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet, Spec No 3*, 166-171.
- Sarton, E., Olofsen, E., Romberg, R., den Hartigh, J., Kest, B., Nieuwenhuijs, D., . . . Dahan, A. (2000). Sex differences in morphine analgesia: an experimental study in healthy volunteers. *Anesthesiology*, *93*(5), 1245-1254; discussion 1246A. doi:10.1097/00000542-200011000-00018
- Sarton, E., Teppema, L., & Dahan, A. (1999). Sex differences in morphine-induced ventilatory depression reside within the peripheral chemoreflex loop. *Anesthesiology*, *90*(5), 1329-1338. doi:10.1097/00000542-199905000-00017
- Sato, M., & Takagi, H. (1971). Enhancement by morphine of the central descending inhibitory influence on spinal sensory transmission. *Eur J Pharmacol*, *14*(1), 60-65. doi:10.1016/0014-2999(71)90122-1
- Sawe, J. (1986). High-dose morphine and methadone in cancer patients. Clinical pharmacokinetic considerations of oral treatment. *Clin Pharmacokinet*, *11*(2), 87-106. doi:10.2165/00003088-198611020-00001
- Sawe, J., Dahlstrom, B., Paalzow, L., & Rane, A. (1981). Morphine kinetics in cancer patients. *Clin Pharmacol Ther*, *30*(5), 629-635. doi:10.1038/clpt.1981.214
- Scherrer, G., Imamachi, N., Cao, Y. Q., Contet, C., Mennicken, F., O'Donnell, D., . . . Basbaum, A. I. (2009). Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell*, *137*(6), 1148-1159. doi:10.1016/j.cell.2009.04.019
- Schinkel, A. H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C. A., & Borst, P. (1995). Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest*, *96*(4), 1698-1705. doi:10.1172/JCI118214
- Schneider, S. P., Eckert, W. A., 3rd, & Light, A. R. (1998). Opioid-activated postsynaptic, inward rectifying potassium currents in whole cell recordings in substantia gelatinosa neurons. *J Neurophysiol*, *80*(6), 2954-2962. doi:10.1152/jn.1998.80.6.2954
- Schuller, A. G., King, M. A., Zhang, J., Bolan, E., Pan, Y. X., Morgan, D. J., . . . Pintar, J. E. (1999). Retention of heroin and morphine-6 beta-glucuronide analgesia in a new line of mice lacking exon 1 of MOR-1. *Nat Neurosci*, *2*(2), 151-156. doi:10.1038/5706
- Schwindinger, W. F., Borrell, B. M., Waldman, L. C., & Robishaw, J. D. (2009). Mice lacking the G protein gamma3-subunit show resistance to opioids and diet induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *297*(5), R1494-1502. doi:10.1152/ajpregu.00308.2009
- Sedqi, M., Roy, S., Ramakrishnan, S., Elde, R., & Loh, H. H. (1995). Complementary DNA cloning of a mu-opioid receptor from rat peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, *209*(2), 563-574. doi:10.1006/bbrc.1995.1538
- Selley, D. E., Herbert, J. T., Morgan, D., Cook, C. D., Picker, M. J., & Sim-Selley, L. J. (2003). Effect of strain and sex on mu opioid receptor-mediated G-protein activation in rat brain. *Brain Res Bull*, *60*(3), 201-208. doi:10.1016/s0361-9230(03)00014-5
- Sertürner, F. (1806). Darstellung der reinen Mohnsäure (Opiumsäure) nebst einer Chemischen Untersuchung des Opiums mit vorzüglicher Hinsicht auf einendarin neu entdeckten Stoff und die dahin gehörigen Bemerkungen. *Journal der Pharmazie für Ärzte, Apotheker und Chemisten*(14), 47-93.
- Sertürner, F. (1817). Ueber das Morphinum, eine neue salzfähige Grundlage, und die Mekonsäure, als Hauptbestandtheile des Opiums. *Annalen der physik*, *55*(1), 56-89.

- Sharma, S. K., Klee, W. A., & Nirenberg, M. (1977). Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(8), 3365-3369. doi:10.1073/pnas.74.8.3365
- Sharpe, L. G., Garnett, J. E., & Cicero, T. J. (1974). Analgesia and hyperreactivity produced by intracranial microinjections of morphine into the periaqueductal gray matter of the rat. *Behav Biol*, 11(3), 303-313. doi:10.1016/s0091-6773(74)90548-3
- Shavit, Y., Wolf, G., Goshen, I., Livshits, D., & Yirmiya, R. (2005). Interleukin-1 antagonizes morphine analgesia and underlies morphine tolerance. *Pain*, 115(1-2), 50-59. doi:10.1016/j.pain.2005.02.003
- Shekunova, E. V., & Bepalov, A. Y. (2006). Effects of memantine on estrogen-dependent acute tolerance to the morphine analgesia in female rats. *Eur J Pharmacol*, 535(1-3), 78-85. doi:10.1016/j.ejphar.2006.02.020
- Shelby, M. K., Cherrington, N. J., Vansell, N. R., & Klaassen, C. D. (2003). Tissue mRNA expression of the rat UDP-glucuronosyltransferase gene family. *Drug Metab Dispos*, 31(3), 326-333. doi:10.1124/dmd.31.3.326
- Sheng, Y., Yang, H., Wu, T., Zhu, L., Liu, L., & Liu, X. (2021). Alterations of Cytochrome P450s and UDP-Glucuronosyltransferases in Brain Under Diseases and Their Clinical Significances. *Front Pharmacol*, 12, 650027. doi:10.3389/fphar.2021.650027
- Shimomura, K., Kamata, O., Ueki, S., Ida, S., Oguri, K., Yoshimura, H., & Tsukamoto, H. (1971). Analgesic effect of morphine glucuronides. *Tohoku J Exp Med*, 105(1), 45-52. doi:10.1620/tjem.105.45
- Shin, M. S., & Helmstetter, F. J. (2005). Antinociception following application of DAMGO to the basolateral amygdala results from a direct interaction of DAMGO with Mu opioid receptors in the amygdala. *Brain Res*, 1064(1-2), 56-65. doi:10.1016/j.brainres.2005.09.065
- Siuciak, J. A., & Advokat, C. (1987). Tolerance to morphine microinjections in the periaqueductal gray (PAG) induces tolerance to systemic, but not intrathecal morphine. *Brain Res*, 424(2), 311-319. doi:10.1016/0006-8993(87)91476-4
- Sjogren, P., Dragsted, L., & Christensen, C. B. (1993). Myoclonic spasms during treatment with high doses of intravenous morphine in renal failure. *Acta Anaesthesiol Scand*, 37(8), 780-782. doi:10.1111/j.1399-6576.1993.tb03809.x
- Sjogren, P., Thunedborg, L. P., Christrup, L., Hansen, S. H., & Franks, J. (1998). Is development of hyperalgesia, allodynia and myoclonus related to morphine metabolism during long-term administration? Six case histories. *Acta Anaesthesiol Scand*, 42(9), 1070-1075. doi:10.1111/j.1399-6576.1998.tb05378.x
- Smirnova, O. V. (2012). [Sex differences in drug action: the role of multidrug-resistance proteins (MRPs)]. *Fiziol Cheloveka*, 38(3), 124-136.
- Smith, F. L., Lohmann, A. B., & Dewey, W. L. (1999). Involvement of phospholipid signal transduction pathways in morphine tolerance in mice. *Br J Pharmacol*, 128(1), 220-226. doi:10.1038/sj.bjp.0702771
- Smith, G. D., Pranker, R. J., & Smith, M. T. (1997). Biochemical synthesis, purification and preliminary pharmacological evaluation of normorphine-3-glucuronide. *Life Sci*, 61(2), 95-104. doi:10.1016/s0024-3205(97)00364-0
- Smith, G. D., & Smith, M. T. (1995). Morphine-3-glucuronide: evidence to support its putative role in the development of tolerance to the antinociceptive effects of morphine in the rat. *Pain*, 62(1), 51-60. doi:10.1016/0304-3959(94)00228-7
- Smith, H. S. (2008). Variations in opioid responsiveness. *Pain Physician*, 11(2), 237-248.
- Smith, M. T., Watt, J. A., & Cramond, T. (1990). Morphine-3-glucuronide--a potent antagonist of morphine analgesia. *Life Sci*, 47(6), 579-585. doi:10.1016/0024-3205(90)90619-3
- Smith, M. T., Wright, A. W., Williams, B. E., Stuart, G., & Cramond, T. (1999). Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine-

- 6-glucuronide in patients before and after initiation of intracerebroventricular morphine for cancer pain management. *Anesth Analg*, 88(1), 109-116.
- Smith, T. W., Binning, A. R., & Dahan, A. (2009). Efficacy and safety of morphine-6-glucuronide (M6G) for postoperative pain relief: a randomized, double-blind study. *Eur J Pain*, 13(3), 293-299. doi:10.1016/j.ejpain.2008.04.015
- Smith, T. W., Buchan, P., Parsons, D. N., & Wilkinson, S. (1982). Peripheral antinociceptive effects of N-methyl morphine. *Life Sci*, 31(12-13), 1205-1208. doi:10.1016/0024-3205(82)90343-5
- Song, P., & Zhao, Z. Q. (2001). The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. *Neurosci Res*, 39(3), 281-286. doi:10.1016/s0168-0102(00)00226-1
- South, S. M., Edwards, S. R., & Smith, M. T. (2009). Antinociception versus serum concentration relationships following acute administration of intravenous morphine in male and female Sprague-Dawley rats: differences between the tail flick and hot plate nociceptive tests. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 36(1), 20-28. doi:10.1111/j.1440-1681.2008.05019.x
- South, S. M., Wright, A. W., Lau, M., Mather, L. E., & Smith, M. T. (2001). Sex-related differences in antinociception and tolerance development following chronic intravenous infusion of morphine in the rat: modulatory role of testosterone via morphine clearance. *J Pharmacol Exp Ther*, 297(1), 446-457.
- Stain-Textier, F., Boschi, G., Sandouk, P., & Scherrmann, J. M. (1999). Elevated concentrations of morphine 6-beta-D-glucuronide in brain extracellular fluid despite low blood-brain barrier permeability. *Br J Pharmacol*, 128(4), 917-924. doi:10.1038/sj.bjp.0702873
- Stain, F., Barjavel, M. J., Sandouk, P., Plotkine, M., Scherrmann, J. M., & Bhargava, H. N. (1995). Analgesic response and plasma and brain extracellular fluid pharmacokinetics of morphine and morphine-6-beta-D-glucuronide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 274(2), 852-857.
- Stanski, D. R., Greenblatt, D. J., & Lowenstein, E. (1978). Kinetics of intravenous and intramuscular morphine. *Clin Pharmacol Ther*, 24(1), 52-59. doi:10.1002/cpt197824152
- Stoffel, E. C., Ulibarri, C. M., & Craft, R. M. (2003). Gonadal steroid hormone modulation of nociception, morphine antinociception and reproductive indices in male and female rats. *Pain*, 103(3), 285-302. doi:10.1016/s0304-3959(02)00457-8
- Stone, A. N., Mackenzie, P. I., Galetin, A., Houston, J. B., & Miners, J. O. (2003). Isoform selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human udp-glucuronosyltransferases: evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7. *Drug Metab Dispos*, 31(9), 1086-1089. doi:10.1124/dmd.31.9.1086
- Strassburg, C. P., Kneip, S., Topp, J., Obermayer-Straub, P., Barut, A., Tukey, R. H., & Manns, M. P. (2000). Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem*, 275(46), 36164-36171. doi:10.1074/jbc.M002180200
- Strassburg, C. P., Manns, M. P., & Tukey, R. H. (1998). Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. *J Biol Chem*, 273(15), 8719-8726. doi:10.1074/jbc.273.15.8719
- Strassburg, C. P., Strassburg, A., Nguyen, N., Li, Q., Manns, M. P., & Tukey, R. H. (1999). Regulation and function of family 1 and family 2 UDP-glucuronosyltransferase genes (UGT1A, UGT2B) in human oesophagus. *Biochem J*, 338 (Pt 2), 489-498.
- Strasser, S. I., Smid, S. A., Mashford, M. L., & Desmond, P. V. (1997). Sex hormones differentially regulate isoforms of UDP-glucuronosyltransferase. *Pharm Res*, 14(9), 1115-1121. doi:10.1023/a:1012130118186

- Stratoulis, V., Venero, J. L., Tremblay, M. E., & Joseph, B. (2019). Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *EMBO J*, 38(17), e101997. doi:10.15252/embj.2019101997
- Su, W., & Pasternak, G. W. (2013). The role of multidrug resistance-associated protein in the blood-brain barrier and opioid analgesia. *Synapse*, 67(9), 609-619. doi:10.1002/syn.21667
- Suleman, F. G., Abid, A., Gradinaru, D., Daval, J. L., Magdalou, J., & Minn, A. (1998). Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch Biochem Biophys*, 358(1), 63-67. doi:10.1006/abbi.1998.0842
- Suleman, F. G., Ghersi-Egea, J. F., Leininger-Muller, B., & Minn, A. (1993). Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase activities in rat brain microsomes. *Neurosci Lett*, 161(2), 219-222. doi:10.1016/0304-3940(93)90298-y
- Sullivan, A. F., McQuay, H. J., Bailey, D., & Dickenson, A. H. (1989). The spinal antinociceptive actions of morphine metabolites morphine-6-glucuronide and normorphine in the rat. *Brain Res*, 482(2), 219-224. doi:10.1016/0006-8993(89)91184-0
- Suzuki, N., Kalso, E., & Rosenberg, P. H. (1993). Intrathecal morphine-3-glucuronide does not antagonize spinal antinociception by morphine or morphine-6-glucuronide in rats. *Eur J Pharmacol*, 249(2), 247-250. doi:10.1016/0014-2999(93)90441-j
- Swartjes, M., Mooren, R. A., Waxman, A. R., Arout, C., van de Wetering, K., den Hartigh, J., . . . Dahan, A. (2012). Morphine induces hyperalgesia without involvement of mu-opioid receptor or morphine-3-glucuronide. *Mol Med*, 18, 1320-1326. doi:10.2119/molmed.2012.00244
- Tan, T., Kuramoto, M., Takahashi, T., Nakamura, H., Nakanishi, Y., Imasato, Y., & Yoshimura, H. (1989). Characteristics of the gastrointestinal absorption of morphine in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 37(1), 168-173. doi:10.1248/cpb.37.168
- Tang, N. K. Y., Salkovskis, P. M., Hodges, A., Wright, K. J., Hanna, M., & Hester, J. (2008). Effects of mood on pain responses and pain tolerance: an experimental study in chronic back pain patients. *Pain*, 138(2), 392-401. doi:10.1016/j.pain.2008.01.018
- Terner, J. M., Lomas, L. M., & Picker, M. J. (2005). Influence of estrous cycle and gonadal hormone depletion on nociception and opioid antinociception in female rats of four strains. *J Pain*, 6(6), 372-383. doi:10.1016/j.jpain.2005.01.354
- Tershner, S. A., & Helmstetter, F. J. (2000). Antinociception produced by mu opioid receptor activation in the amygdala is partly dependent on activation of mu opioid and neurotensin receptors in the ventral periaqueductal gray. *Brain Res*, 865(1), 17-26. doi:10.1016/s0006-8993(00)02179-x
- Thomas, P. T., Bhargava, H. N., & House, R. V. (1995). Immunomodulatory effects of in vitro exposure to morphine and its metabolites. *Pharmacology*, 50(1), 51-62. doi:10.1159/000139266
- Thompson, A. A., Liu, W., Chun, E., Katritch, V., Wu, H., Vardy, E., . . . Stevens, R. C. (2012). Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature*, 485(7398), 395-399. doi:10.1038/nature11085
- Thompson, P. I., Joel, S. P., John, L., Wedzicha, J. A., Maclean, M., & Slevin, M. L. (1995). Respiratory depression following morphine and morphine-6-glucuronide in normal subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 40(2), 145-152.
- Thompson, S. J., Koszdin, K., & Bernards, C. M. (2000). Opiate-induced analgesia is increased and prolonged in mice lacking P-glycoprotein. *Anesthesiology*, 92(5), 1392-1399. doi:10.1097/00000542-200005000-00030

- Tiseo, P. J., Thaler, H. T., Lapin, J., Inturrisi, C. E., Portenoy, R. K., & Foley, K. M. (1995). Morphine-6-glucuronide concentrations and opioid-related side effects: a survey in cancer patients. *Pain*, *61*(1), 47-54. doi:10.1016/0304-3959(94)00148-8
- Tjolsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., & Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, *51*(1), 5-17. doi:10.1016/0304-3959(92)90003-T
- Toce, M. S., Kim, H., Chung, S., & Krauss, B. S. (2019). Prolonged central apnoea after intravenous morphine administration in a 12-year-old male with a UGT1A1 loss-of-function polymorphism. *Br J Clin Pharmacol*, *85*(1), 258-262. doi:10.1111/bcp.13779
- Togna, A. R., Antonilli, L., Dovizio, M., Salemme, A., De Carolis, L., Togna, G. I., . . . Nencini, P. (2013). In vitro morphine metabolism by rat microglia. *Neuropharmacology*, *75*, 391-398. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.08.019
- Torres-Reveron, A., Williams, T. J., Chapleau, J. D., Waters, E. M., McEwen, B. S., Drake, C. T., & Milner, T. A. (2009). Ovarian steroids alter mu opioid receptor trafficking in hippocampal parvalbumin GABAergic interneurons. *Exp Neurol*, *219*(1), 319-327. doi:10.1016/j.expneurol.2009.06.001
- Tortorici, V., Robbins, C. S., & Morgan, M. M. (1999). Tolerance to the antinociceptive effect of morphine microinjections into the ventral but not lateral-dorsal periaqueductal gray of the rat. *Behav Neurosci*, *113*(4), 833-839. doi:10.1037//0735-7044.113.4.833
- Toutain, P. L., & Bousquet-Melou, A. (2004). Plasma terminal half-life. *J Vet Pharmacol Ther*, *27*(6), 427-439. doi:10.1111/j.1365-2885.2004.00600.x
- Treede, R. D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M. I., Benoliel, R., . . . Wang, S. J. (2015). A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain*, *156*(6), 1003-1007. doi:10.1097/j.pain.000000000000160
- Treillet, E., Laurent, S., & Hadjiat, Y. (2018). Practical management of opioid rotation and equianalgesia. *J Pain Res*, *11*, 2587-2601. doi:10.2147/JPR.S170269
- Trescot, A. M., Helm, S., Hansen, H., Benyamin, R., Glaser, S. E., Adlaka, R., . . . Manchikanti, L. (2008). Opioids in the management of chronic non-cancer pain: an update of American Society of the Interventional Pain Physicians' (ASIPP) Guidelines. *Pain Physician*, *11*(2 Suppl), S5-S62.
- Trujillo, K. A., & Akil, H. (1991). Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science*, *251*(4989), 85-87. doi:10.1126/science.1824728
- Tsou, K., & Jang, C. S. (1964). Studies on the Site of Analgesic Action of Morphine by Intracerebral Micro-Injection. *Sci Sin*, *13*, 1099-1109.
- Turk, D. C., & Okifuji, A. (2002). Psychological factors in chronic pain: evolution and revolution. *J Consult Clin Psychol*, *70*(3), 678-690. doi:10.1037//0022-006x.70.3.678
- Turk, D. C., & Wilson, H. D. (2010). Fear of pain as a prognostic factor in chronic pain: conceptual models, assessment, and treatment implications. *Curr Pain Headache Rep*, *14*(2), 88-95. doi:10.1007/s11916-010-0094-x
- Tzvetkov, M. V., dos Santos Pereira, J. N., Meineke, I., Saadatmand, A. R., Stingl, J. C., & Brockmoller, J. (2013). Morphine is a substrate of the organic cation transporter OCT1 and polymorphisms in OCT1 gene affect morphine pharmacokinetics after codeine administration. *Biochem Pharmacol*, *86*(5), 666-678. doi:10.1016/j.bcp.2013.06.019
- Umeda, M., & Kim, Y. (2019). Gender Differences in the Prevalence of Chronic Pain and Leisure Time Physical Activity Among US Adults: A NHANES Study. *Int J Environ Res Public Health*, *16*(6). doi:10.3390/ijerph16060988
- Urban, J. D., Clarke, W. P., von Zastrow, M., Nichols, D. E., Kobilka, B., Weinstein, H., . . . Mailman, R. B. (2007). Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*, *320*(1), 1-13. doi:10.1124/jpet.106.104463

- Urban, M. O., & Smith, D. J. (1994). Nuclei within the rostral ventromedial medulla mediating morphine antinociception from the periaqueductal gray. *Brain Res*, 652(1), 9-16. doi:10.1016/0006-8993(94)90311-5
- Valentino, R. J., & Volkow, N. D. (2018). Untangling the complexity of opioid receptor function. *Neuropsychopharmacology*, 43(13), 2514-2520. doi:10.1038/s41386-018-0225-3
- van Bree, J. B., de Boer, A. G., Danhof, M., Ginsel, L. A., & Breimer, D. D. (1988). Characterization of an "in vitro" blood-brain barrier: effects of molecular size and lipophilicity on cerebrovascular endothelial transport rates of drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 247(3), 1233-1239.
- Van Crugten, J. T., Sallustio, B. C., Nation, R. L., & Somogyi, A. A. (1991). Renal tubular transport of morphine, morphine-6-glucuronide, and morphine-3-glucuronide in the isolated perfused rat kidney. *Drug Metab Dispos*, 19(6), 1087-1092.
- van Crugten, J. T., Somogyi, A. A., Nation, R. L., & Reynolds, G. (1997). Concentration-effect relationships of morphine and morphine-6 beta-glucuronide in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 24(5), 359-364. doi:10.1111/j.1440-1681.1997.tb01202.x
- van Dongen, R. T., Crul, B. J., Koopman-Kimenai, P. M., & Vree, T. B. (1994). Morphine and morphine-glucuronide concentrations in plasma and CSF during long-term administration of oral morphine. *Br J Clin Pharmacol*, 38(3), 271-273. doi:10.1111/j.1365-2125.1994.tb04352.x
- Van Eeckhaut, A., Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I., & Michotte, Y. (2009). Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877(23), 2198-2207. doi:10.1016/j.jchromb.2009.01.003
- Vaughan, C. W., & Christie, M. J. (1997). Presynaptic inhibitory action of opioids on synaptic transmission in the rat periaqueductal grey in vitro. *J Physiol*, 498 (Pt 2), 463-472. doi:10.1113/jphysiol.1997.sp021872
- Vaughan, C. W., Ingram, S. L., Connor, M. A., & Christie, M. J. (1997). How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature*, 390(6660), 611-614. doi:10.1038/37610
- Verscheijden, L. F. M., Litjens, C. H. C., Koenderink, J. B., Mathijssen, R. H. J., Verbeek, M. M., de Wildt, S. N., & Russel, F. G. M. (2021). Physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic model for the prediction of morphine brain disposition and analgesia in adults and children. *PLoS Comput Biol*, 17(3), e1008786. doi:10.1371/journal.pcbi.1008786
- Vetulani, J., Melzacka, M., Adamus, A., & Danek, L. (1983). Changes in morphine pharmacokinetics in nervous and peripheral tissues following different schedules of administration. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 265(2), 180-191.
- Viani, A., Temellini, A., Tusini, G., & Pacifici, G. M. (1990). Human brain sulphotransferase and glucuronyltransferase. *Hum Exp Toxicol*, 9(2), 65-69. doi:10.1177/096032719000900201
- Villemure, C., & Bushnell, M. C. (2009). Mood influences supraspinal pain processing separately from attention. *J Neurosci*, 29(3), 705-715. doi:10.1523/JNEUROSCI.3822-08.2009
- Viscusi, E. R., & Viscusi, A. R. (2020). Blood-brain barrier: mechanisms governing permeability and interaction with peripherally acting mu-opioid receptor antagonists. *Reg Anesth Pain Med*, 45(9), 688-695. doi:10.1136/rapm-2020-101403
- Wahlstrom, A., Hammar, L., Lundin, L. G., & Rane, A. (1986). Morphine metabolism in mouse brain. *NIDA Res Monogr*, 75, 603-606.
- Wahlstrom, A., Pacifici, G. M., Lindstrom, B., Hammar, L., & Rane, A. (1988). Human liver morphine UDP-glucuronyl transferase enantioselectivity and inhibition by opioid

- congeners and oxazepam. *Br J Pharmacol*, 94(3), 864-870. doi:10.1111/j.1476-5381.1988.tb11598.x
- Wahlstrom, A., Winblad, B., Bixo, M., & Rane, A. (1988). Human brain metabolism of morphine and naloxone. *Pain*, 35(2), 121-127. doi:10.1016/0304-3959(88)90219-9
- Wang, D., Tawfik, V. L., Corder, G., Low, S. A., Francois, A., Basbaum, A. I., & Scherrer, G. (2018). Functional Divergence of Delta and Mu Opioid Receptor Organization in CNS Pain Circuits. *Neuron*, 98(1), 90-108 e105. doi:10.1016/j.neuron.2018.03.002
- Wang, H., Huang, M., Wang, W., Zhang, Y., Ma, X., Luo, L., . . . Xu, T. (2021). Microglial TLR4-induced TAK1 phosphorylation and NLRP3 activation mediates neuroinflammation and contributes to chronic morphine-induced antinociceptive tolerance. *Pharmacol Res*, 165, 105482. doi:10.1016/j.phrs.2021.105482
- Wang, H., Zhang, Y., Ma, X., Wang, W., Xu, X., Huang, M., . . . Xu, T. (2020). Spinal TLR4/P2X7 Receptor-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation Contributes to the Development of Tolerance to Morphine-Induced Antinociception. *J Inflamm Res*, 13, 571-582. doi:10.2147/JIR.S266995
- Wang, J. B., Imai, Y., Eppler, C. M., Gregor, P., Spivak, C. E., & Uhl, G. R. (1993). mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(21), 10230-10234. doi:10.1073/pnas.90.21.10230
- Wang, J. K., Nauss, L. A., & Thomas, J. E. (1979). Pain relief by intrathecally applied morphine in man. *Anesthesiology*, 50(2), 149-151. doi:10.1097/00000542-197902000-00013
- Wang, K., Wang, J., Liu, T., Yu, W., Dong, N., Zhang, C., . . . Ren, X. (2021). Morphine-3-glucuronide upregulates PD-L1 expression via TLR4 and promotes the immune escape of non-small cell lung cancer. *Cancer Biol Med*, 18(1), 155-171. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0442
- Wang, X., Loram, L. C., Ramos, K., de Jesus, A. J., Thomas, J., Cheng, K., . . . Yin, H. (2012). Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(16), 6325-6330. doi:10.1073/pnas.1200130109
- Wang, X., Traub, R. J., & Murphy, A. Z. (2006). Persistent pain model reveals sex difference in morphine potency. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291(2), R300-306. doi:10.1152/ajpregu.00022.2006
- Watkins, L. R., Hutchinson, M. R., Johnston, I. N., & Maier, S. F. (2005). Glia: novel counter-regulators of opioid analgesia. *Trends Neurosci*, 28(12), 661-669. doi:10.1016/j.tins.2005.10.001
- Watkins, L. R., Wiertelak, E. P., & Maier, S. F. (1993). The amygdala is necessary for the expression of conditioned but not unconditioned analgesia. *Behav Neurosci*, 107(2), 402-405. doi:10.1037//0735-7044.107.2.402
- Watkins, L. R., Young, E. G., Kinscheck, I. B., & Mayer, D. J. (1983). The neural basis of footshock analgesia: the role of specific ventral medullary nuclei. *Brain Res*, 276(2), 305-315. doi:10.1016/0006-8993(83)90738-2
- Weibel, R., Reiss, D., Karchewski, L., Gardon, O., Matifas, A., Filliol, D., . . . Gaveriaux-Ruff, C. (2013). Mu opioid receptors on primary afferent nav1.8 neurons contribute to opiate-induced analgesia: insight from conditional knockout mice. *PLoS One*, 8(9), e74706. doi:10.1371/journal.pone.0074706
- Weinsanto, I., Laux-Biehlmann, A., Mouheiche, J., Maduna, T., Delalande, F., Chavant, V., . . . Goumon, Y. (2018). Stable isotope-labelled morphine to study in vivo central and peripheral morphine glucuronidation and brain transport in tolerant mice. *Br J Pharmacol*, 175(19), 3844-3856. doi:10.1111/bph.14454
- Westerling, D., Persson, C., & Hoglund, P. (1995). Plasma concentrations of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine-6-glucuronide after intravenous and oral

- administration to healthy volunteers: relationship to nonanalgesic actions. *Ther Drug Monit*, 17(3), 287-301. doi:10.1097/00007691-199506000-00013
- Whistler, J. L., Enquist, J., Marley, A., Fong, J., Gladher, F., Tsuruda, P., . . . Von Zastrow, M. (2002). Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science*, 297(5581), 615-620. doi:10.1126/science.1073308
- Whistler, J. L., & von Zastrow, M. (1998). Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(17), 9914-9919. doi:10.1073/pnas.95.17.9914
- Wilde, M., Pichini, S., Pacifici, R., Tagliabracci, A., Busardo, F. P., Auwarter, V., & Solimini, R. (2019). Metabolic Pathways and Potencies of New Fentanyl Analogs. *Front Pharmacol*, 10, 238. doi:10.3389/fphar.2019.00238
- Williams, J. T., Ingram, S. L., Henderson, G., Chavkin, C., von Zastrow, M., Schulz, S., . . . Christie, M. J. (2013). Regulation of mu-opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol Rev*, 65(1), 223-254. doi:10.1124/pr.112.005942
- Willoughby, S. G., Hailey, B. J., Mulkana, S., & Rowe, J. (2002). The effect of laboratory-induced depressed mood state on responses to pain. *Behav Med*, 28(1), 23-31. doi:10.1080/08964280209596395
- Wobbrock, J. O., Findlater, L., Gergle, D., & Higgins, J. J. (2011). *The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only anova procedures*. Paper presented at the Proceedings of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems, Vancouver, BC, Canada. <https://doi.org/10.1145/1978942.1978963>
- Wolff, T., Samuelsson, H., & Hedner, T. (1995). Morphine and morphine metabolite concentrations in cerebrospinal fluid and plasma in cancer pain patients after slow-release oral morphine administration. *Pain*, 62(2), 147-154. doi:10.1016/0304-3959(94)00268-J
- Wolff, T., Samuelsson, H., & Hedner, T. (1996). Concentrations of morphine and morphine metabolites in CSF and plasma during continuous subcutaneous morphine administration in cancer pain patients. *Pain*, 68(2-3), 209-216. doi:10.1016/s0304-3959(96)03102-8
- Woolf, C. J. (1981). Intrathecal high dose morphine produces hyperalgesia in the rat. *Brain Res*, 209(2), 491-495. doi:10.1016/0006-8993(81)90176-1
- Wright, A. W., Mather, L. E., & Smith, M. T. (2001). Hydromorphone-3-glucuronide: a more potent neuro-excitant than its structural analogue, morphine-3-glucuronide. *Life Sci*, 69(4), 409-420. doi:10.1016/s0024-3205(01)01133-x
- Wu, D., Kang, Y. S., Bickel, U., & Pardridge, W. M. (1997). Blood-brain barrier permeability to morphine-6-glucuronide is markedly reduced compared with morphine. *Drug Metab Dispos*, 25(6), 768-771.
- Wu, H., Wacker, D., Mileni, M., Katritch, V., Han, G. W., Vardy, E., . . . Stevens, R. C. (2012). Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JD1c. *Nature*, 485(7398), 327-332. doi:10.1038/nature10939
- Wu, H. E., Sun, H. S., Cheng, C. W., Terashvili, M., & Tseng, L. F. (2006). dextro-Naloxone or levo-naloxone reverses the attenuation of morphine antinociception induced by lipopolysaccharide in the mouse spinal cord via a non-opioid mechanism. *Eur J Neurosci*, 24(9), 2575-2580. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05144.x
- Xie, N., Gomes, F. P., Deora, V., Gregory, K., Vithanage, T., Nassar, Z. D., . . . Parat, M. O. (2017). Activation of mu-opioid receptor and Toll-like receptor 4 by plasma from morphine-treated mice. *Brain Behav Immun*, 61, 244-258. doi:10.1016/j.bbi.2016.12.002

- Xie, R., Bouw, M. R., & Hammarlund-Udenaes, M. (2000). Modelling of the blood-brain barrier transport of morphine-3-glucuronide studied using microdialysis in the rat: involvement of probenecid-sensitive transport. *Br J Pharmacol*, *131*(8), 1784-1792. doi:10.1038/sj.bjp.0703759
- Xie, R., Hammarlund-Udenaes, M., de Boer, A. G., & de Lange, E. C. (1999). The role of P-glycoprotein in blood-brain barrier transport of morphine: transcortical microdialysis studies in *mdr1a* (-/-) and *mdr1a* (+/+) mice. *Br J Pharmacol*, *128*(3), 563-568. doi:10.1038/sj.bjp.0702804
- Yaksh, T. L., & Harty, G. J. (1988). Pharmacology of the allodynia in rats evoked by high dose intrathecal morphine. *J Pharmacol Exp Ther*, *244*(2), 501-507.
- Yaksh, T. L., Harty, G. J., & Onofrio, B. M. (1986). High dose of spinal morphine produce a nonopiate receptor-mediated hyperesthesia: clinical and theoretic implications. *Anesthesiology*, *64*(5), 590-597. doi:10.1097/00000542-198605000-00008
- Yaksh, T. L., Yeung, J. C., & Rudy, T. A. (1976). Systematic examination in the rat of brain sites sensitive to the direct application of morphine: observation of differential effects within the periaqueductal gray. *Brain Res*, *114*(1), 83-103. doi:10.1016/0006-8993(76)91009-x
- Yamada, H., Ishii, K., Ishii, Y., Ieiri, I., Nishio, S., Morioka, T., & Oguri, K. (2003). Formation of highly analgesic morphine-6-glucuronide following physiologic concentration of morphine in human brain. *J Toxicol Sci*, *28*(5), 395-401. doi:10.2131/jts.28.395
- Yang, Z., Li, L., Hu, H., Xu, M., Gu, J., Wang, Z. J., . . . Zeng, S. (2016). Reverse of Acute and Chronic Morphine Tolerance by Lithocholic Acid via Down-Regulating UGT2B7. *Front Pharmacol*, *7*, 404. doi:10.3389/fphar.2016.00404
- Yang, Z. Z., Li, L., Wang, L., Xu, M. C., An, S., Jiang, C., . . . Zeng, S. (2016). siRNA capsulated brain-targeted nanoparticles specifically knock down OATP2B1 in mice: a mechanism for acute morphine tolerance suppression. *Sci Rep*, *6*, 33338. doi:10.1038/srep33338
- Yeh, S. Y., Gorodetzky, C. W., & Krebs, H. A. (1977). Isolation and identification of morphine 3- and 6-glucuronides, morphine 3,6-diglucuronide, morphine 3-ethereal sulfate, normorphine, and normorphine 6-glucuronide as morphine metabolites in humans. *J Pharm Sci*, *66*(9), 1288-1293. doi:10.1002/jps.2600660921
- Yoshimura, H., Ida, S., Oguri, K., & Tsukamoto, H. (1973). Biochemical basis for analgesic activity of morphine-6-glucuronide. I. Penetration of morphine-6-glucuronide in the brain of rats. *Biochem Pharmacol*, *22*(12), 1423-1430. doi:10.1016/0006-2952(73)90320-1
- Yue, Q., von Bahr, C., Odar-Cederlof, I., & Sawe, J. (1990). Glucuronidation of codeine and morphine in human liver and kidney microsomes: effect of inhibitors. *Pharmacol Toxicol*, *66*(3), 221-226. doi:10.1111/j.1600-0773.1990.tb00737.x
- Zeitz, K. P., Malmberg, A. B., Gilbert, H., & Basbaum, A. I. (2001). Reduced development of tolerance to the analgesic effects of morphine and clonidine in PKC gamma mutant mice. *Pain*, *94*(3), 245-253. doi:10.1016/S0304-3959(01)00353-0
- Zelcer, N., van de Wetering, K., Hillebrand, M., Sarton, E., Kuil, A., Wielinga, P. R., . . . Borst, P. (2005). Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(20), 7274-7279. doi:10.1073/pnas.0502530102
- Zeng, J., Thomson, L. M., Aicher, S. A., & Terman, G. W. (2006). Primary afferent NMDA receptors increase dorsal horn excitation and mediate opiate tolerance in neonatal rats. *J Neurosci*, *26*(46), 12033-12042. doi:10.1523/JNEUROSCI.2530-06.2006
- Zhang, P., Yang, M., Chen, C., Liu, L., Wei, X., & Zeng, S. (2020). Toll-Like Receptor 4 (TLR4)/Opioid Receptor Pathway Crosstalk and Impact on Opioid Analgesia, Immune

- Function, and Gastrointestinal Motility. *Front Immunol*, *11*, 1455. doi:10.3389/fimmu.2020.01455
- Zhang, X. Y., Dou, Y. N., Yuan, L., Li, Q., Zhu, Y. J., Wang, M., & Sun, Y. G. (2020). Different neuronal populations mediate inflammatory pain analgesia by exogenous and endogenous opioids. *Elife*, *9*. doi:10.7554/eLife.55289
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., & Xie, S. (2010). PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed*, *99*(3), 306-314. doi:10.1016/j.cmpb.2010.01.007
- Zhou, H. Y., Chen, S. R., Chen, H., & Pan, H. L. (2010). Opioid-induced long-term potentiation in the spinal cord is a presynaptic event. *J Neurosci*, *30*(12), 4460-4466. doi:10.1523/JNEUROSCI.5857-09.2010
- Zhu, P., Ye, Z., Guo, D., Xiong, Z., Huang, S., Guo, J., . . . Shu, Y. (2018). Irinotecan Alters the Disposition of Morphine Via Inhibition of Organic Cation Transporter 1 (OCT1) and 2 (OCT2). *Pharm Res*, *35*(12), 243. doi:10.1007/s11095-018-2526-y
- Zhu, Y., Hsu, M. S., & Pintar, J. E. (1998). Developmental expression of the mu, kappa, and delta opioid receptor mRNAs in mouse. *J Neurosci*, *18*(7), 2538-2549.
- Zjawiony, J. K., Machado, A. S., Menegatti, R., Ghedini, P. C., Costa, E. A., Pedrino, G. R., . . . Fajemiroye, J. O. (2019). Cutting-Edge Search for Safer Opioid Pain Relief: Retrospective Review of Salvinorin A and Its Analogs. *Front Psychiatry*, *10*, 157. doi:10.3389/fpsy.2019.00157
- Zong, J., & Pollack, G. M. (2000). Morphine antinociception is enhanced in *mdr1a* gene-deficient mice. *Pharm Res*, *17*(6), 749-753. doi:10.1023/a:1007546719287

Etude du lien entre le dimorphisme sexuel observé dans le métabolisme et l'effet antinociceptif de la morphine

Résumé

Les effets de la morphine sont influencés par le sexe. Chez le rongeur, son métabolisme implique sa glucuronidation en morphine-3-glucuronide (M3G). La M3G provoque une hyperalgésie qui pourrait s'opposer aux effets antinociceptifs de la morphine. Nous avons constaté que l'antinociception induite par la morphine est plus forte chez la souris mâle et que la tolérance antinociceptive se développe plus rapidement chez la souris femelle. La M3G possède un effet pronociceptif qui ne semble pas dépendre du sexe. Nous avons quantifié la morphine et la M3G dans le sang et dans des régions cérébrales impliquées dans le contrôle de la douleur après une injection de morphine, et nous avons constaté que les ratios métaboliques M3G/morphine étaient largement supérieurs chez les femelles. Nous avons également observé un métabolisme central de la morphine *in vivo*. Nous avons conclu que le métabolisme périphérique et central était influencé par le sexe et que le métabolisme central de la morphine pourrait participer aux différences d'antinociception liées au sexe. Cependant, son implication dans la tolérance antinociceptive semble limitée.

Résumé en anglais

Morphine effects are influenced by sex. In rodents, morphine metabolism involves its glucuronidation to morphine-3-glucuronide (M3G). Interestingly, M3G has been shown to produce hyperalgesia. M3G pronociceptive effect could oppose morphine-induced antinociception. Morphine potency was higher in males than females and morphine antinociceptive tolerance developed earlier in females during the protocol. M3G pronociceptive effect did not seem to be influenced by sex. Morphine and M3G were quantified in the blood and some pain-related brain regions after morphine injection. The M3G/morphine metabolic ratios were dramatically higher in females than in males. *In vivo* central metabolism of morphine was observed. To conclude, peripheral and central metabolism of morphine are influenced by sex and central metabolism could participate in the sex differences observed in morphine antinociception. However, its implication seems limited during the induction of morphine antinociceptive tolerance.