



HAL
open science

Impact de faibles doses de cannabidiol sur la douleur neuropathique et les symptômes de type anxio-dépressifs chez la souris

Coline Sagot

► To cite this version:

Coline Sagot. Impact de faibles doses de cannabidiol sur la douleur neuropathique et les symptômes de type anxio-dépressifs chez la souris. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03633905

HAL Id: dumas-03633905

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03633905v1>

Submitted on 7 Apr 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2022

**IMPACT DU CANNABIDIOL SUR LA DOULEUR
NEUROPATHIQUE ET LES SIGNES CLINIQUES DE TYPE
ANXIO-DÉPRESSIF CHEZ LA SOURIS**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 18 février 2022

par

Coline, Marie, Thisbé SAGOT

sous la co-direction de

Fanny PILOT-STORCK et Dominique MASSOTTE

JURY

Président du jury :	M. Renaud TISSIER	Professeur à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Fanny PILOT-STORCK	Professeure à l'EnvA
Examineur :	M. Matthias KOHLHAUER	Maître de Conférences à l'EnvA
Membre invité :	Mme Dominique MASSOTTE	Directrice de recherche au CNRS

Liste des personnes intervenant dans l'enseignement



Directeur : Pr Christophe Degueurce
Directeur des formations : Pr Henry Chateau
Directrice de la scolarité et de la vie étudiante : Dr Catherine Colmin

Professeures émérites : Pr Pascal Fayolle, Pr Bernard Paragon
Directeurs honoraires : MM. les Professeurs C. Pilet, B. Toma, A.-L. Parodi, R. Moraillon, J.-P. Cotard, J.-P. Mialot & M. Gogny

Département d'Elevage et de Pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC)

Chef du département : Pr Grandjean Dominique - **Adjoint :** Pr Blot Stéphane

<p>Discipline : anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs - Pr Verwaerde Patrick</p> <p>Discipline : cardiologie - Pr Chetboul Valérie - Dr Saponaro Vittorio, Praticien hospitalier contractuel</p> <p>Discipline : nouveaux animaux de compagnie - Dr Pignon Charly, Ingénieur de recherche - Praticien hospitalier - Dr Volait Laetitia, Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Discipline : dermatologie - Dr Cochet-Faivre Noëlle, Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Discipline : ophtalmologie - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de clinique équine - Pr Audigé Fabrice - Dr Bertoni Lélia, Maître de conférences - Dr Coudry Virginie, Praticienne hospitalier contractuelle - Pr Denoix Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Ingénieure de recherche - Praticienne hospitalier - Dr Jacquet Sandrine, Ingénieure de recherche - Praticienne hospitalier - Dr Mespoulhès-Rivière Céline, Ingénieure de recherche-Praticienne hospitalier* - Dr Moiroud Claire, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Tallaj Amélie, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Tanquerel Ludovic, Chargé d'enseignement contractuel</p>	<p>Unité pédagogique de médecine et imagerie médicale - Dr Benchekroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane* - Dr Canonne-Guibert Morgane, Maître de conférences - Dr Freiche-Legros Valérie, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Maurey-Guénec Christelle, Maître de conférences - Dr Mortier Jérémy, Maître de conférences associé</p> <p>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport - Dr Cabrera Gonzales Joaquin, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Fontbonne Alain - Pr Grandjean Dominique* - Dr Maenhoudt Cindy, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Nudelmann Nicolas, Maître de conférences - Dr Ribeiro dos Santos Natalia, Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale - Dr Decambon Adeline, Maître de conférences - Pr Manassero Mathieu - Dr Maurice Emeline, Assistante d'Enseignement et de Recherche Contractuelle - Pr Viateau-Duval Véronique*</p>
---	--

Département des Productions Animales et de Santé Publique (DPASP)

Chef du département : Pr Millemann Yves - **Adjoint :** Pr Dufour Barbara

<p>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments - Dr Bolnot François, Maître de conférences* - Pr Carlier Vincent - Dr Gauthier Michel, Maître de conférences associé - Dr Mtimet Narjes, Chargée d'enseignement contractuelle</p> <p>Unité pédagogique de maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie - Dr Crozet Guillaume, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Dufour Barbara* - Dr Guétin Poirier Valentine, Chargée d'enseignement contractuelle - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia - Dr Rivière Julie, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production - Pr Adjou Karim - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences* - Dr Delsart Maxime, Maître de conférences associé - Pr Millemann Yves - Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier contractuel - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences</p>	<p>Unité pédagogique de reproduction animale - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences* - Dr Denis Marine, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr Mauffré Vincent, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale - Dr Arné Pascal, Maître de conférences - Dr Barassin Isabelle, Maître de conférences - Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences* - Pr Grimard-Ballif Bénédicte - Pr Ponter Andrew</p> <p>Rattachée DPASP - Dr Wolgust Valérie, Praticienne hospitalier contractuelle</p>
--	---

Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (DSBP)

Chef du département : Pr Desquilbet Loïc - **Adjoint :** Pr Pilot-Storck Fanny

<p>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoix Nathalie - Pr Robert Céline*</p> <p>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie - Pr Boulouis Henri-Jean - Pr Eloit Marc - Dr Lagrée Anne-Claire, Maître de conférences - Pr Le Poder Sophie - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences*</p> <p>Unité pédagogique de biochimie, biologie clinique - Pr Bellier Sylvain* - Dr Deshuillers Pierre, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques - Dr Jouvion Grégory, Professeur associé - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences*</p> <p>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Pr Desquilbet Loïc, (Biostatistique, Epidémiologie) - Dr Legrand Chantal, Maître de conférences associée - Dr Marignac Geneviève, Maître de conférences* - Dr Rose Hélène, Maître de conférences associée</p>	<p>Unité de parasitologie, mycologie - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Pr Guillot Jacques - Dr Polack Bruno, Maître de conférences* - Dr Risco-Castillo Veronica, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie - Dr Kohlhauer Matthias, Maître de conférences - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences* - Pr Tissier Renaud</p> <p>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Gilbert Caroline (Ethologie) - Pr Pilot-Storck Fanny (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Tirez Laurent (Physiologie, Pharmacologie)* - Dr Titeux Emmanuelle (Ethologie), Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Rattachée DSBP - Mme Dalaine Stéphanie, Professeur agrégée (Sciences de la Vie et de la Terre)</p> <p>* responsable d'unité pédagogique</p>
--	--

Remerciements

Au Pr Renaud Tissier, Professeur à l'École nationale vétérinaire d'Alfort, merci infiniment d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse. Merci d'accompagner avec bienveillance les étudiants vétérinaires qui souhaitent faire de la recherche.

Au Dr Dominique Massotte, Directrice de recherche au CRNS, merci infiniment de m'avoir accueillie dans votre équipe, de m'avoir supervisée pendant ce stage de Master, et d'avoir accepté de co-diriger ma thèse vétérinaire. Ce fut une expérience de vie très riche qui me portera longtemps dans mon parcours professionnel.

Au Pr Fanny Pilot-Storck, Professeur à l'École nationale vétérinaire d'Alfort, merci infiniment d'avoir accepté de co-diriger ma thèse vétérinaire. Merci tout particulièrement de m'avoir accompagnée pendant ces cinq années d'écoles, des opportunités que vous m'avez offertes, de vos précieux conseils et de nos discussions qui me resteront précieuses.

Au Dr Matthias Kohlhauer, Maître de conférence à l'École nationale vétérinaire d'Alfort, merci infiniment d'avoir accepté immédiatement d'être l'examineur de ma thèse. Merci pour tout ce que vous m'avez enseigné pendant mon parcours.

À Paul,
cette thèse t'est dédiée. J'aime penser qu'où que tu sois, tu es fier de moi et du travail que j'ai accompli. Je sais à quel point la rigueur compte pour toi. Tu me manques.

À ma famille et tous mes proches,
je ne pourrais jamais assez vous remercier pour tout votre soutien et votre amour lors de ces années d'études et pendant la rédaction de cette thèse que je n'aurais pu terminer sans vous.

Table des matières

Liste des figures	3
Liste des annexes	7
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations.....	11
Introduction	15
Première partie : bibliographie.....	17
1. La douleur neuropathique	17
1.1 Définition	17
1.2 Diagnostic	17
1.3 Comorbidités	20
1.4 Modèles animaux	21
1.5 Mécanismes	23
1.6 Traitements	27
2. Étude d'un phytocannabinoïde : le cannabidiol	29
2.1 Le cannabis et ses dérivés	29
2.2 Système endocannabinoïde	29
2.3 Produits dérivés du cannabis commercialisables.....	31
2.4 Le CBD et autres cannabinoïdes dans les études cliniques et pré-cliniques.....	33
3. Les cibles moléculaires du CBD.....	36
3.1 Le CBD et les récepteurs cannabinoïdes.....	36
3.2 CBD et ses cibles impliquées dans la douleur, l'anxiété et la dépression	38
a. Le récepteur sérotoninergique 5-HT _{1A}	38
b. Autres récepteurs connus.....	38
c. CBD et récepteur opioïde δ : une interaction trop peu étudiée.....	40
3.3 La découverte d'une nouvelle entité pharmacologique : les hétéromères δ -CB1	41
Deuxième partie : Étude expérimentale	43
1. Introduction.....	43

2. Matériels et méthodes.....	44
2.1 Démarche expérimentale.....	44
2.2 Animaux	47
2.3 Chirurgie de pose du manchon	48
2.4 Tests comportementaux	48
2.5 Traitement chronique au CBD.....	54
2.6 Analyse statistique.....	54
2.7 Étude neuroanatomique.....	54
2.8 Création des figures.....	57
3. Résultats.....	59
3.1 Étude comportementale	59
3.2 Étude neuroanatomique	96
4. Discussion	99
4.1. Étude comportementale	99
4.2 Étude neuroanatomique	104
Conclusion	107
Liste des références bibliographiques	109
Annexe 1	117
Annexe 2.....	119
Annexe 3.....	121

Liste des figures

Figure 1 : Traduction de la méthode diagnostique de la douleur neuropathique proposée dans l'article de Treede et al., (2008).	18
Figure 2 : Classifications des types de douleurs neuropathiques en fonction de leur localisation et de leurs causes, associées à des exemples de localisation neuroanatomique des sensations anormales et douloureuses, adapté de Finnerup et al., (2021).	20
Figure 3 : Schéma de la perception douloureuse en condition normale (A) et modifications en condition de neuropathie périphérique (B). (Cohen et Mao, 2014 ; Meacham et al., 2017)...25	
Figure 4 : Planche botanique de Cannabis sativa (Masclef, 1891).....	29
Figure 5 : Fonctionnement du système endocannabinoïde au sein d'une synapse (Blankman et Cravatt, 2013 ; Donvito et al., 2018).	30
Figure 6 : Exemples de ligands endo- et exogènes des récepteurs cannabinoïdes et de leur action (IUPHAR/BPS, 2021).	31
Figure 7 : Évaluation selon l'approche GRADE des effets des dérivés du cannabis présentés dans les études cliniques (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017).	33
Figure 8 : Structure moléculaire et conformation spatiale du Δ^9 -tétrahydrocannabinol (gauche) et du cannabidiol (droite) décrite par Baracović (2021).	36
Figure 9 : Action du CBD sur ses principales cibles cellulaires (Almeida et Devi, 2020 ; Most et al., 2020 ; Vitale et al., 2021).	39
Figure 10 : Suivi temporel d'apparition des signes cliniques causés par la pose d'un cuff sur le nerf sciatique de souris (Benbouzid et al., 2008 ; Yalcin et al., 2011).	44
Figure 11 : Frise temporelle du programme expérimental pour l'étude comportementale.	45
Figure 12 : Frise temporelle du programme expérimental pour l'étude neuroanatomique.	46
Figure 13 : Photographies des étapes principales de la chirurgie de pose du cuff (Benbouzid et al., 2008).	48
Figure 14 : Appareil mis en place pour effectuer le test des filaments de Von Frey (Yalcin et al., 2014).	49
Figure 15 : Mise en place du test de nesting (A) et méthode d'évaluation de la qualité de fabrication du nid (B) (Deacon, 2006).	50
Figure 16 : Méthode de réalisation du test du splash (Kremer et al., 2021).	51
Figure 17 : Méthode de réalisation du test d'interaction sociale à l'aide du logiciel éthologique ANY-maze (Faeste et al., 2019).	52
Figure 18 : Méthode de réalisation du test de la nage forcée (FST) à l'aide du logiciel éthologique ANY-maze (Yankelevitch-Yahav et al., 2015).....	53

Figure 19 : Frise temporelle de la préparation à la perfusion des souris dans le but d'extraire leur encéphale et moelle épinière.	55
Figure 20 : Schéma représentant la préparation des coupes d'encéphales et l'immunohistochimie réalisée.	56
Figure 21 : Effet de la chirurgie sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures de souris mâles.	60
Figure 22 : Effet du génotype sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures droites de souris mâles.	61
Figure 23 : Effet du traitement au CBD sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures droites de souris mâles Cuff de génotype δ -WT ou δ -KO.	62
Figure 24 : Effet du traitement sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures droites de souris mâles Cuff δ -KO.	63
Figure 25 : Effet de la chirurgie sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures de souris femelles.	64
Figure 26 : Effet du génotype sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures droites de souris femelles.	65
Figure 27 : Effet du traitement au CBD sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures droites de souris femelles Cuff de génotype δ -WT ou δ -KO.	66
Figure 28 : Effet de la chirurgie sur le temps de toilettage de souris mâles.	69
Figure 29 : Effet du génotype sur le temps de toilettage de souris mâles.	69
Figure 30 : Effet du CBD sur le temps de toilettage de souris mâles de génotype δ -KO ou δ -WT.	69
Figure 31 : Effet de la chirurgie sur le temps de toilettage de souris femelles.	71
Figure 32 : Effet du génotype sur le temps de toilettage de souris femelles.	71
Figure 33 : Effet du CBD sur le temps de toilettage de souris femelles de génotype δ -KO ou δ -WT.	71
Figure 34 : Effet de la chirurgie sur la qualité de fabrication du nid de souris mâles.	72
Figure 35 : Effet du génotype sur la qualité de fabrication du nid de souris mâles.	73
Figure 36 : Effet du traitement sur la qualité de fabrication du nid de souris mâles Cuff et de génotype δ -KO recevant la solution contrôle (A), de génotype δ -KO recevant la solution CBD (B) et de génotype δ -WT recevant la solution CBD (C).	75
Figure 37 : Effet de la chirurgie sur la qualité de fabrication du nid de souris femelles.	76
Figure 38 : Effet du génotype sur la qualité de fabrication du nid de souris femelles.	77
Figure 39 : Effet du traitement sur la qualité de fabrication du nid de souris femelles Cuff et de génotype δ -KO recevant la solution CBD (A) ou de génotype δ -WT recevant la solution CBD (B).	79

Figure 40 : Effet de la chirurgie sur le temps d'interaction sociale de souris mâles.....	81
Figure 41 : Effet du génotype sur le temps d'interaction sociale de souris mâles.....	81
Figure 42 : Effet du CBD sur le temps d'interaction sociale de souris mâles de génotype δ -KO ou δ -WT.	81
Figure 43 : Effet de la chirurgie sur le temps d'interaction sociale de souris femelles.	83
Figure 44 : Effet du génotype sur le temps d'interaction sociale de souris femelles.....	83
Figure 45 : Effet du CBD sur le temps d'interaction sociale de souris femelles de génotype δ -KO ou δ -WT.	83
Figure 46 : Effet de la chirurgie sur le temps d'immobilité de souris mâles Sham ou Cuff recevant un traitement au CBD ou à la solution contrôle dans le FST.	85
Figure 47 : Effet du génotype sur le temps d'immobilité de souris mâles Cuff.	85
Figure 48 : Effet du traitement sur le temps d'immobilité de souris mâles.....	85
Figure 49 : Effet du génotype sur le temps d'immobilité de souris femelles Cuff.....	86
Figure 50 : Effet du fonds génétique sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures droites de souris mâles Cuff.....	87
Figure 51 : Effet du fonds génétique sur le temps de toilettage de souris mâles Cuff.	88
Figure 52 : Effet du fonds génétique sur la qualité de fabrication du nid de souris mâles.	90
Figure 53 : Effet du fonds génétique sur la qualité de fabrication du nid de souris mâles δ -KO Cuff.	91
Figure 54 : Effet du fond génétique sur le temps de toilettage de souris mâles Cuff (A) et des souris mâles du groupe Cuff de génotype δ -KO et recevant un traitement au CBD (B).	93
Figure 55 : Effet du fonds génétique sur le temps d'immobilité de souris mâles Cuff traitées au CBD.	94
Figure 56 : Co-expression neuronale des récepteurs opioïde δ et CB1 dans un (A) ou plusieurs (B) neurones du bulbe rachidien rostral ventromédial.....	96
Figure 57 : Coupe sagittale d'un encéphale de souris montrant les structures dans lesquelles la co-localisation neuronale des récepteurs opioïde δ et CB1 était la plus élevée, ainsi que la principale fonction cérébrale associée à ces structures.	97

Liste des annexes

Annexe 1.1 : Schéma présentant le principe de la technique de co-immunoprécipitation. ...	117
Annexe 1.2 : Shéma présentant le principe de la technique de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (Fluorescence Resonance Energy Transfer - FRET).....	117
Annexe 1.3 : Schéma présentant le principe de la technique de test de liaison de proximité (Proximity Ligation Assay - PLA).	118
Annexe 2.1 : Programme expérimental effectué sur les différentes groupes de souris en fonction des mois de l'année 2021.	119
Annexe 2.2 : Détail de la composition des groupes de souris dans chaque groupe d'animaux en fonction des conditions expérimentales.	120
Annexe 3 : Structures cérébrales dans lesquelles les récepteurs opioïde δ et CB1 sont co-localisés au sein des neurones (Franklin et Paxinos, 2012).....	121

Liste des tableaux

Tableau 1 : Définition des symptômes associés au diagnostic de la douleur neuropathique (Haanpää et Treede, 2010).	19
Tableau 2 : Présentation de plusieurs modèles animaux associés à différentes causes de douleur neuropathique (Jaggi et al., 2011).	22
Tableau 3 : Principaux traitements de première ligne de la douleur neuropathique et leurs propriétés (Dworkin et al., 2010 ; Kremer et al., 2016).	27
Tableau 4 : Résultats de plusieurs études précliniques étudiant les effets du CBD.	35
Tableau 5 : Définitions de concepts pharmacologiques (Brown et Ragozzino, 2010 ; Atack et Lavreysen, 2010).	37
Tableau 6 : Liste des abréviations utilisées dans la figure 33 et leur structure cérébrale associée (Franklin et Paxinos, 2012).	97

Liste des abréviations

2-AG	2-Arachidonylglycérol
5-HT	5-hydroxytryptamine (sérotonine)
5HT1A	Récepteur 1A à la 5-hydroxytryptamine (sérotonine)
AA	Acide arachidonique
ACC	Cortex cingulaire antérieur
ACEA	Arachidonyl-2'-chloroéthylamide
AEA	Anandamide ou <i>N</i> -arachidonoyléthanolamine
AMPA	Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate
AMG	Amygdale
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	Analyse de la variance
ARN	Acide ribonucléique
CB1	Récepteur cannabinoïde 1
CB2	Récepteur cannabinoïde 2
CBD	Cannabidiol
CPZ	Capsazépine
CREMEAS	Comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale de strasbourg
D2	Récepteurs 2 à la dopamine
DAG	Diacylglycérol
DAGL	Lipase du diacylglycérol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DN4	Douleur Neuropathique 4 Questions
DRG	Ganglions spinaux
DSM-V	Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (5 ^e version)
eGFP	Protéine Fluorescente Verte intensifiée
EPM	<i>Elevated Plus Maze</i> , test du labyrinthe élevé en croix
FA	Formaldéhyde
FAAH	Hydrolase des amides d'acides gras
FRET	Transfert d'énergie par résonance de fluorescence
FST	Test de nage forcée (<i>forced swim test</i>)
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GlyR	Récepteurs ionotropiques à la glycine
GPR55	Récepteur 55 à la protéine G

GRADE	<i>Grading of recommendations, assessment, development and evolution</i> , soit le classement des recommandations, leur évaluation, développement et évolution
HPC	Hippocampe
HU-210	1,1-Diméthylheptyl-11-hydroxy-tétrahydrocannabinol
i.p.	Intrapéritonéale
IASP	Association internationale de l'étude de la douleur
INCI	Institut des neurosciences cellulaires et intégratives
IUPHAR	Union internationale de pharmacologie basique et clinique
LANSS	<i>Leeds assessment of neuropathic symptoms and signs</i>
MAGL	Lipase des monoacylglycérols
MAO-A	Monoamine-oxydase de type A
mGluR2	Récepteurs métabotropiques 2 au glutamate
MILDECA	Mission interministérielle de lutte contre les drogues et les conduites addictives
Nacc	Noyau accubens
NAM	Modulateur allostérique négatif
NAPE	N-arachidonoylphosphatidylethanolamine
NeuPSIG	Groupe d'Intérêt Spécial envers la Douleur Neuropathique
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
PAG	Zone Grise Périaqueducale
PB	Noyau parabrachial
PBS	Tampon phosphate salin
PBST	Tampon phosphate salin et Tween 20
PI	Phosphatidylinositol
PLA	Proximity ligation assay, test de liaison de proximité
PLC	Phospholipase C
PPAR γ	Récepteurs gamma activés par les proliférateurs de peroxyosomes
RCPG	Récepteur couplé à une protéine G
RVM	Bulbe rachidien rostral ventromédial
s.c.	Sous cutané
SEM	Erreur type à la moyenne
SERT	Transporteur membranaire sélectif de la sérotonine
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SNC	Système Nerveux Central
SNC80	4-[(R)-[(2S,5R)-2,5-diméthyl-4-prop-2-enylpiperazin-1-yl]-(3-méthoxyphényl)méthyl]-N,N-diéthylbenzamide
SNP	Système nerveux périphérique
SSNRI	Inhibiteur sélectif de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine

TCA	Antidépresseurs tricycliques
THC	Δ^9 -tétrahydrocannabinol
TRPV1	Récepteur vanilloïde 1
TST	<i>Tail suspension test</i> , test de suspension par la queue
Veh	Solution véhicule
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
δ -eGFP	Récepteur opioïde delta fusionné à la protéine fluorescente verte intensifiée
δ -KO	Récepteur opioïde delta – <i>knock-out</i>
δ -WT	Récepteur opioïde delta – <i>wild-type</i>

Introduction

Depuis une dizaine d'années, la légalisation du cannabis pour une utilisation médicale et récréative se répand en Amérique du Nord (Canada, Mexique et 11 états des États-Unis), et la question soulève de nombreux débats en Europe et en France. Et en effet, de plus en plus d'études montrent l'intérêt du cannabis notamment dans le traitement de la douleur chronique ainsi que dans l'épilepsie (Hill et Palastro, 2017). Mais cette utilisation n'est pas sans risques, comme l'indiquent les rapports de la Mission Interministérielle de Lutte contre les Drogues Et les Conduites Addictives (MILDECA) : dépendance, troubles de la cognition et troubles psychiques sont associés à une consommation fréquente de cannabis, et cette consommation est un facteur de risque pour le cancer, la schizophrénie et des troubles cardiovasculaires (MILDECA, 2017). C'est pourquoi l'attention de la société se porte sur le cannabidiol, ou CBD, un composé extrait du cannabis n'ayant pas de propriétés psychoactives.

Ce composé, dont la commercialisation est légale et très peu contrôlée, aurait des propriétés bénéfiques pour le soulagement de la douleur chronique, des crises d'épilepsie ainsi que des troubles psychologiques (Bonaccorso *et al.*, 2019 ; Boyaji *et al.*, 2020). Mais ses mécanismes d'action et ses cibles moléculaires ne sont pas entièrement élucidés. Une de ses cibles potentielles serait le récepteur opioïde δ . Ce récepteur aurait également des propriétés analgésiques, anxiolytiques et antidépressives (Filliol *et al.*, 2000 ; Pradhan *et al.*, 2011). Le CBD et ce récepteur opioïde δ interagissent-ils ? Leurs mécanismes moléculaires sont-ils liés ? Est-ce qu'une interaction entre eux, directe ou indirecte, est nécessaire pour observer ces propriétés du CBD ?

C'est à ces questions que tente de répondre ma thèse vétérinaire. L'objectif de mon travail était (1) d'identifier les effets d'un traitement chronique au CBD chez des souris (*Mus musculus*) souffrant de douleur neuropathique et de ses comorbidités (notamment les signes cliniques de type anxio-dépressif) ; (2) d'identifier l'implication potentielle du récepteur opioïde δ dans les phénomènes observés. Cette thèse a été réalisée en tant que stage de recherche de Master 2, et s'est intégrée au sein d'un projet de plus grande ampleur : la thèse universitaire de Marion Gaborit (doctorante) supervisée par Dominique Massotte de l'équipe Neuroanatomie, Douleur et Psychopathologie de l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI) de Strasbourg.

Première partie : bibliographie

1. La douleur neuropathique

1.1 Définition

Selon l'Association Internationale de l'Étude de la Douleur (IASP), la douleur est définie comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée ou ressemblant à celle associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle » (Raja *et al.*, 2020). La douleur est à différencier de la nociception qui représente le processus neural d'encodage d'un stimulus nociceptif (IASP Task Force on Taxonomy, 2017). La douleur comprend donc trois composantes : sensitive (nociception), émotionnelle et cognitive. Il existe de nombreuses manières de classer les différents types de douleur, l'un d'eux étant de prendre en compte la durée de cette expérience désagréable ; ainsi une douleur aiguë est une douleur de courte durée, ponctuelle et une douleur sera qualifiée de chronique lorsqu'elle persiste plus de trois mois (Merskey et Bogduk, 1994).

La douleur chronique peut être de trois types : douleur inflammatoire, fibromyalgie ou douleur neuropathique. La douleur neuropathique était précédemment définie comme étant « une douleur causée par une lésion primaire ou une dysfonction dans le système nerveux » (Treede *et al.*, 2008). Cependant, des lésions ou dysfonctions du système nerveux peuvent créer d'autres types de douleur tels que la douleur associée aux spasmes et à la rigidité musculaire. De plus le terme « dysfonction » ne paraissait pas approprié au Groupe d'Intérêt Spécial envers la Douleur Neuropathique (NeuPSIG) de l'IASP car il pouvait inclure une plasticité normale du système nerveux. C'est pourquoi en 2010, l'IASP a publié une définition révisée de la douleur neuropathique, la qualifiant de « douleur apparaissant en conséquence directe d'une lésion ou d'une maladie affectant le système somatosensoriel » (Treede *et al.*, 2008 ; Haanpää et Treede, 2010).

1.2 Diagnostic

La douleur neuropathique touche 7 à 8 % de la population générale, et 20 à 25 % des personnes souffrant de douleurs chroniques (van Hecke *et al.*, 2014 ; Bouhassira, 2019). La prévalence de cette affection peut varier de 1 % à 18 % selon les publications (van Hecke *et al.*, 2014). Cela est dû à la difficulté de la décrire cliniquement et à la variabilité des méthodes de diagnostic utilisées dans ce but. Le groupe NeuPSIG recommande une méthode diagnostique en deux étapes, comme décrit en figure 1, se basant sur des questionnaires,

suivi d'un examen clinique plus approfondi (Haanpää et Treede, 2010). Ces méthodes, comme par exemple l'évaluation de Leeds des signes et symptômes neuropathiques (LANSS, *Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs*) ou le Douleur Neuropathique 4 Questions (DN4) prennent en compte tout d'abord des symptômes spontanés rapportés par les patients, puis examinent les symptômes apparaissant dans l'examen clinique (Bennett, 2001 ; Bouhassira *et al.*, 2005). Ces symptômes sont regroupés dans le tableau 1.

Figure 1 : Traduction de la méthode diagnostique de la douleur neuropathique proposée dans l'article de Treede *et al.*, (2008).

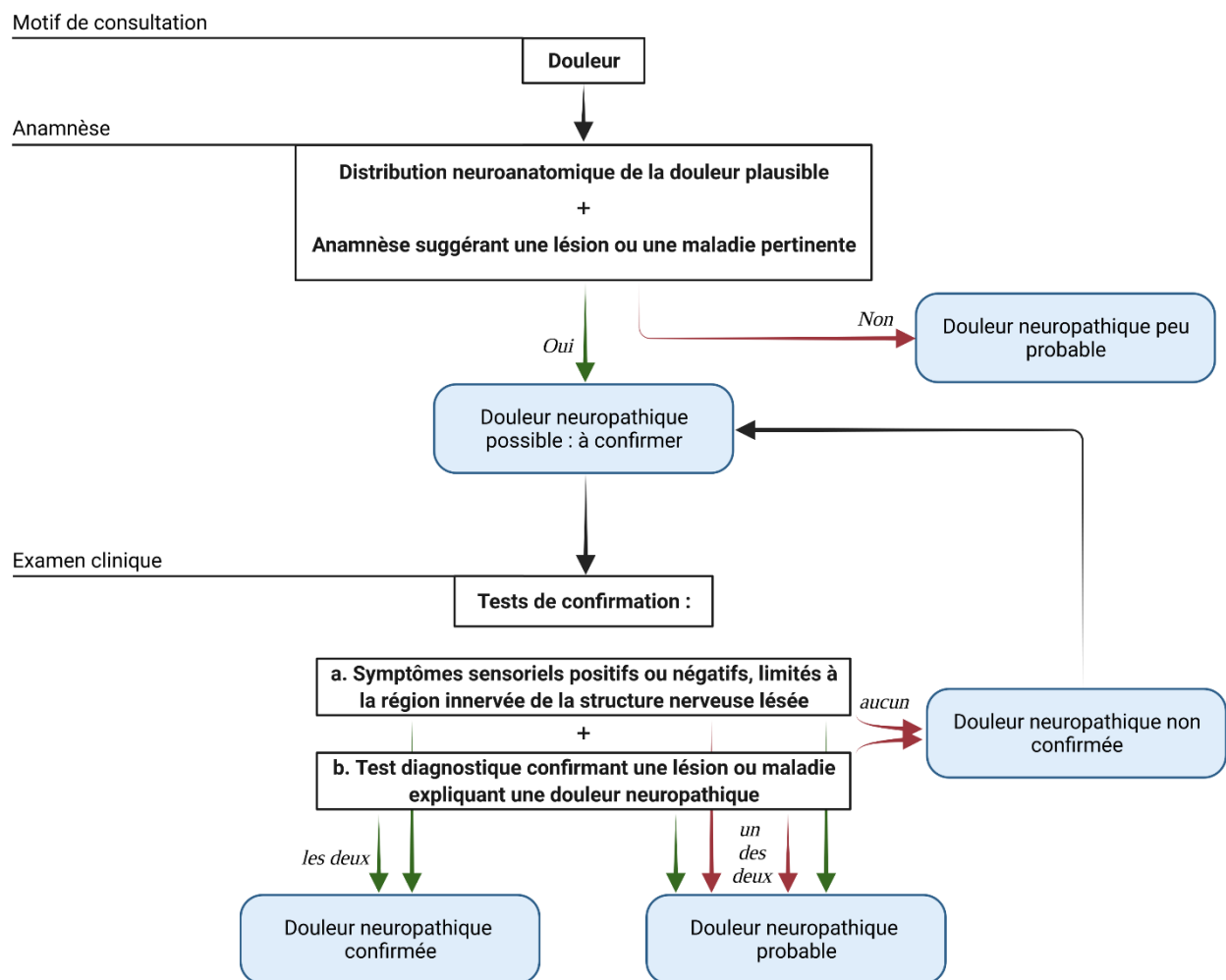


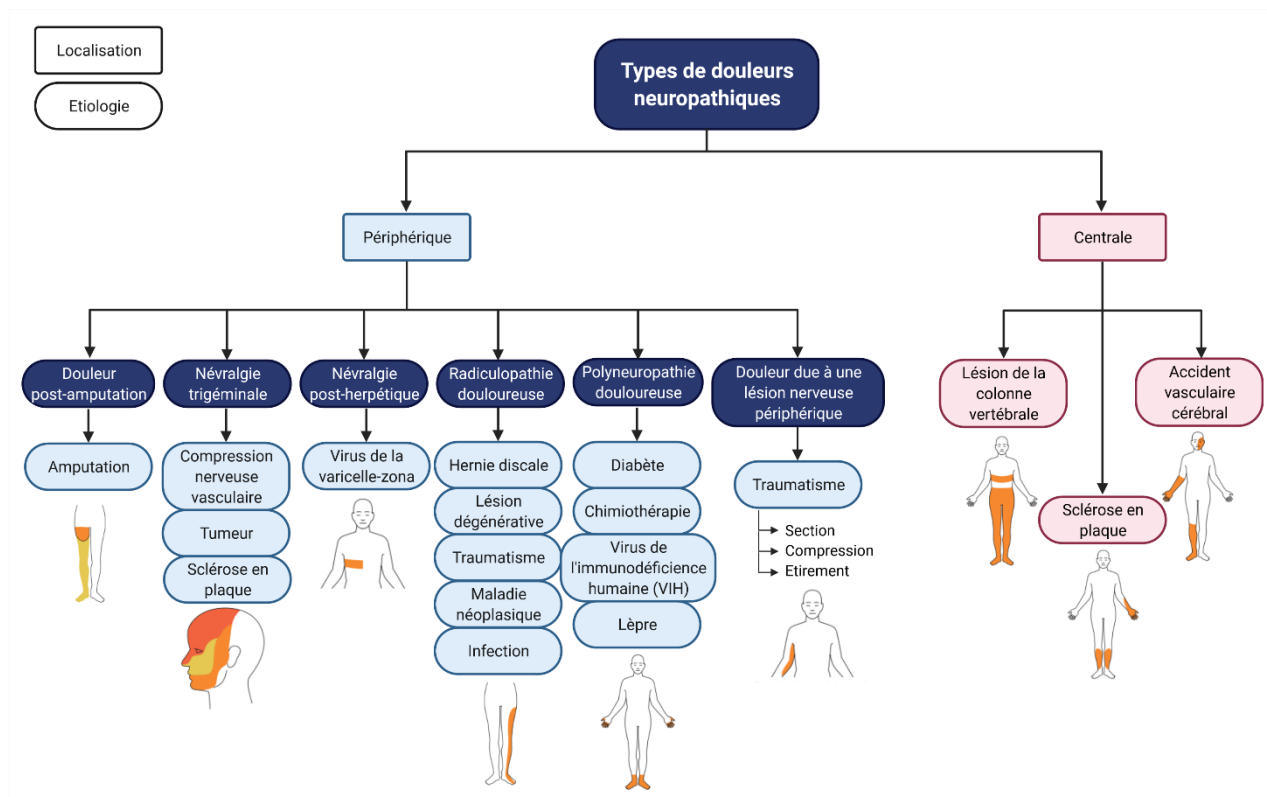
Tableau 1 : Définition des symptômes associés au diagnostic de la douleur neuropathique (Haanpää et Treede, 2010).

Symptômes	Définitions
Spontanés	
Picotements	
Fourmillements	
Chocs électriques	
Brûlures	
Provoqués	
Hypoesthésie (Fréquent)	Diminution de la sensibilité à la stimulation tactile ou thermique
Hyperesthésie (Rare)	Augmentation de la sensibilité à la stimulation tactile ou thermique
Hypoalgésie	Réponse douloureuse diminuée à un stimulus douloureux
Hyperalgésie	Réponse douloureuse augmentée à un stimulus douloureux
Allodynie	Réponse douloureuse à un stimulus normalement non nociceptif
Spontanés ou provoqués	
Paresthésie	Sensation anormale
Dysesthésie	Sensation désagréable

Les symptômes spontanés sont également classés selon leur durée d'apparition. Les sensations peuvent être soit continues (concernant en général les brûlures ou les picotements et fourmillements) soit intermittentes / paroxystiques (concernant par exemple les chocs électriques). Un symptôme isolé n'est pas pathognomonique de la douleur neuropathique mais une combinaison de plusieurs de ces symptômes oriente le diagnostic vers celle-ci.

De plus, le diagnostic de la douleur neuropathique est complexifié par la grande variabilité d'expression de cette douleur, ainsi que par ses multiples causes possibles. Ainsi, les symptômes sont un moyen de classifier les différents types de douleurs neuropathiques. Il est également possible de les classer selon leur localisation (périphérique ou centrale), et selon leur étiologie (figure 2) (Finnerup *et al.*, 2021).

Figure 2 : Classifications des types de douleurs neuropathiques en fonction de leur localisation et de leurs causes, associées à des exemples de localisation neuroanatomique des sensations anormales et douloureuses, adapté de Finnerup *et al.*, (2021).



1.3 Comorbidités

Les douleurs chroniques, incluant la douleur neuropathique, sont associées à des comorbidités qui altèrent de manière non négligeable la qualité de vie des patients qui en souffrent. Les comorbidités les plus fréquentes sont les troubles du sommeil et les troubles de l'humeur tels que l'anxiété et la dépression.

Cinquante à quatre-vingts pourcents des patients atteints de douleur chronique déclarent avoir un sommeil perturbé. La douleur neuropathique et les troubles du sommeil sont liés de manière bidirectionnelle en formant un cercle vicieux : la douleur augmente la probabilité de développer des troubles du sommeil et le manque de sommeil intensifie l'expérience douloureuse (Ferini-Strambi, 2017).

L'Association Psychiatrique Américaine définit l'anxiété comme un niveau excessif de peur et d'inquiétude et la dépression comme des épisodes d'au moins deux semaines comprenant au moins cinq symptômes parmi les suivants : humeur dépressive, anhédonie, troubles du sommeil, perte/gain de poids, perte d'énergie, concentration altérée, sentiments de dévalorisation ou culpabilité et idées suicidaires (American Psychiatric Association, 2013). La cinquième version du Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles Mentaux (DSM-V)

décrit des troubles de l'anxiété tels que les troubles de l'anxiété sociale, de l'anxiété généralisée et les troubles de panique, et des troubles dépressifs tels que les troubles dépressifs majeurs et la dysthymie (dépression persistant plus de deux ans) (American Psychiatric Association, 2013). Ces troubles de l'humeur sont présents chez 50 % des patients souffrant de douleur chronique (Bair *et al.*, 2003) et chez 30 % des patients souffrant de douleur neuropathique. La douleur neuropathique est à la fois un facteur prédictif et un facteur de complication des troubles de l'humeur, et ces derniers sont en retour également des facteurs prédictifs et des facteurs de complication de la douleur neuropathique (Maletic et Raison, 2009). Il est donc essentiel de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces maladies, de confirmer l'existence de mécanismes communs ainsi que de développer des traitements polyvalents et efficaces pour ces maladies handicapantes. Dans ce contexte, l'utilisation de modèles animaux s'avère particulièrement utile.

1.4 Modèles animaux

À ce jour, en France et dans le monde, l'étude et la compréhension des maladies humaines et animales ne peut se passer entièrement de l'utilisation de modèles animaux. En effet, l'expérimentation sur l'être humain est strictement réglementée par la législation (Ministère de la santé, 2016) ainsi que par l'éthique. La philosophie des « 3 Rs » (Remplacer, Réduire, Raffiner) impose à la recherche biomédicale de favoriser les alternatives aux modèles animaux (modèles moléculaires, cellulaires, bio-informatiques ...), de n'utiliser ces derniers que lorsqu'aucune approche alternative ne peut leur être substituée, et à réduire et optimiser cette utilisation autant que possible. Il est donc essentiel de s'assurer que le modèle choisi pour comprendre l'étiologie, la physiopathologie et les traitements de la maladie étudiée soient adaptés. Pour cela, des critères de validation ont été établis (Willner, 1984) :

- Principe d'isomorphie (*Construct validity*) : à quel point le mécanisme d'induction de la maladie dans le modèle reflète-t-il l'étiologie connue de la maladie humaine ?
- Principe de prédiction (*Predictive validity*) : à quel point le modèle prédit-il correctement les aspects encore inconnus de la maladie humaine ?
- Principe d'homologie (*Face validity*) : à quel point le modèle reproduit-il le phénotype de la maladie humaine ?

Dans le cas de la douleur neuropathique, il existe divers modèles animaux. Des exemples de modèles de douleurs neuropathiques en fonction des étiologies sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Présentation de plusieurs modèles animaux associés à différentes causes de douleur neuropathique (Jaggi *et al.*, 2011).

Nom du modèle	Principe	Espèces
Lésion nerveuse traumatique périphérique		
Lésion de constriction chronique	Quatres ligatures lâches ou pose d'un manchon de polyéthylène (<i>cuff</i>) autour du nerf sciatique.	Rongeurs
Ligature de nerf spinaux	Ligature serrée des nerfs spinaux L5, L6 ou L7.	Rongeurs, Primates
Axotomie	Section complète du nerf sciatique.	Rongeurs
Lésion induite par des agents pharmacologiques		
Chimiothérapie (paclitaxel)	Injection directe des agents causant des lésions sur le système nerveux périphérique.	Rongeurs, Lagomorphes
Lésion induite par le diabète		
Streptozotocine	Changements des nerfs causés par une hyperglycémie persistante.	Rongeurs
Génétique		
Lésion infectieuse		
Virus de l'Immunodéficience Humaine	Injection de la protéine VIH-1 gp120 dans le nerf sciatique.	Rongeurs
Virus Varicelle-Zona	Injection de cellules infectées par le virus dans les pieds.	Rongeurs

Le modèle utilisé dans le cadre de cette étude était un modèle murin consistant en la pose d'un manchon de polyéthylène (appelé « *cuff* ») autour du nerf sciatique de la patte arrière droite, et comprimant ce dernier. Ce modèle induit la mise en place d'une hyperalgésie thermique transitoire (disparition à 10 jours post-chirurgie) ainsi qu'une allodynie mécanique qui persiste environ entre deux et trois mois (Benbouzid *et al.*, 2008). De plus, des comportements de type anxieux apparaissent à partir de quatre semaines, et des comportements de type dépressif apparaissent à partir de huit semaines (Yalcin *et al.*, 2011). Ainsi ce modèle permet par une chirurgie simple d'établir des lésions standardisées et réversibles, d'observer une allodynie mécanique de longue durée et de mettre en évidence les mécanismes moléculaires induits par la lésion. Par ailleurs, il répond bien aux traitements de la douleur neuropathique et permet d'étudier les conséquences comportementales de cette maladie avec les troubles de type anxio-dépressif (Yalcin *et al.*, 2014). Il est également applicable à des lignées de souris génétiquement modifiées (Ceredig *et al.*, 2020 ; Kremer *et al.*, 2020).

1.5 Mécanismes

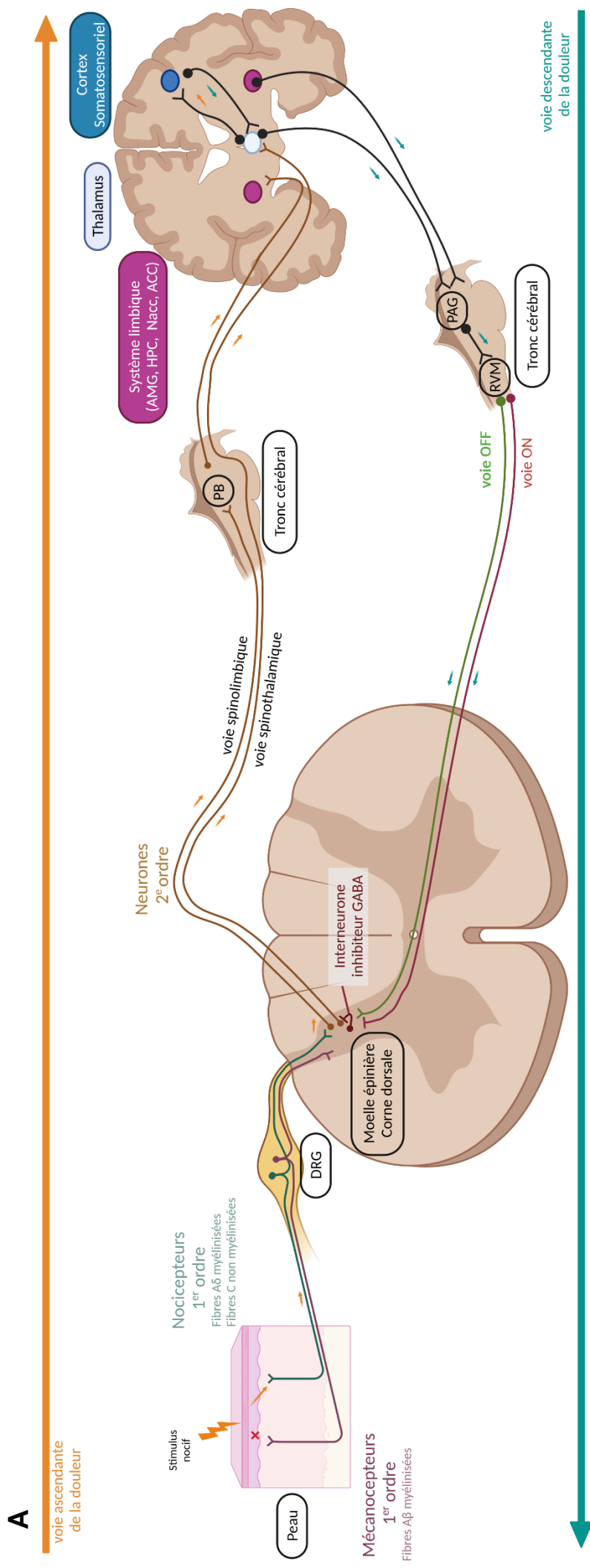
Les neuropathies périphériques causées par des lésions nerveuses ou des perturbations métaboliques représentent les deux tiers des affections neuropathiques rapportées par les patients (Kremer *et al.*, 2021). Les mécanismes physiopathologiques des maladies neuropathiques sont variés mais dans le cadre de cette thèse, le choix est fait de présenter comme exemple ceux des neuropathies périphériques liées à des lésions nerveuses. Les modèles animaux présentés précédemment ont permis de comprendre les perturbations qui se mettent en place à différentes échelles dans les neuropathies.

La neuropathie se caractérise par un système somatosensoriel déséquilibré engendrant des douleurs excessives par rapport au stimulus sensitif initial. Une lésion chronique périphérique entraîne la mise en place de processus réparateurs et d'inflammation (libération continue de molécules inflammatoires et nociceptives telles que la substance P, les bradykinines, les prostaglandines, les cytokines et des facteurs de croissances). Elle entraîne également une modification de l'expression des canaux ioniques des nocicepteurs : une augmentation des canaux sodiques voltage-dépendants (Nav1.8 par exemple) et des canaux calciques (avec notamment la sous-unité $\alpha 2\delta$ de ces canaux) et une diminution des canaux potassiques. Cela entraîne un phénomène persistant de sensibilisation des nocicepteurs (neurones afférents primaires). Cette sensibilisation se caractérise par une baisse du seuil de décharge des membranes plasmiques neuronales expliquant les symptômes d'allodynie et d'hyperalgésie par exemple. Elle se caractérise également par des décharges ectopiques (trains de potentiels d'actions spontanés) et par une transmission éphaptique (communication non synaptique entre deux fibres nerveuses indépendantes) expliquant les symptômes de douleur spontanée (Cohen et Mao, 2014 ; Meacham *et al.*, 2017).

Au niveau des synapses, la chronicité d'une lésion entraîne une augmentation de l'expression et de l'activation des récepteurs au glutamate excitateurs (ioniques avec les récepteurs NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique) et AMPA (acide α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate) et métabotropiques avec les récepteurs métabotropiques 2 au glutamate (mGluR2) par exemple). Cela entraîne également une diminution de l'activité des transporteurs au glutamate. Ce phénomène est en partie causé par la prolifération des cellules gliales, notamment du type microglie, qui altère le fonctionnement cellulaire en libérant des molécules inflammatoires (Cohen et Mao, 2014 ; Meacham *et al.*, 2017).

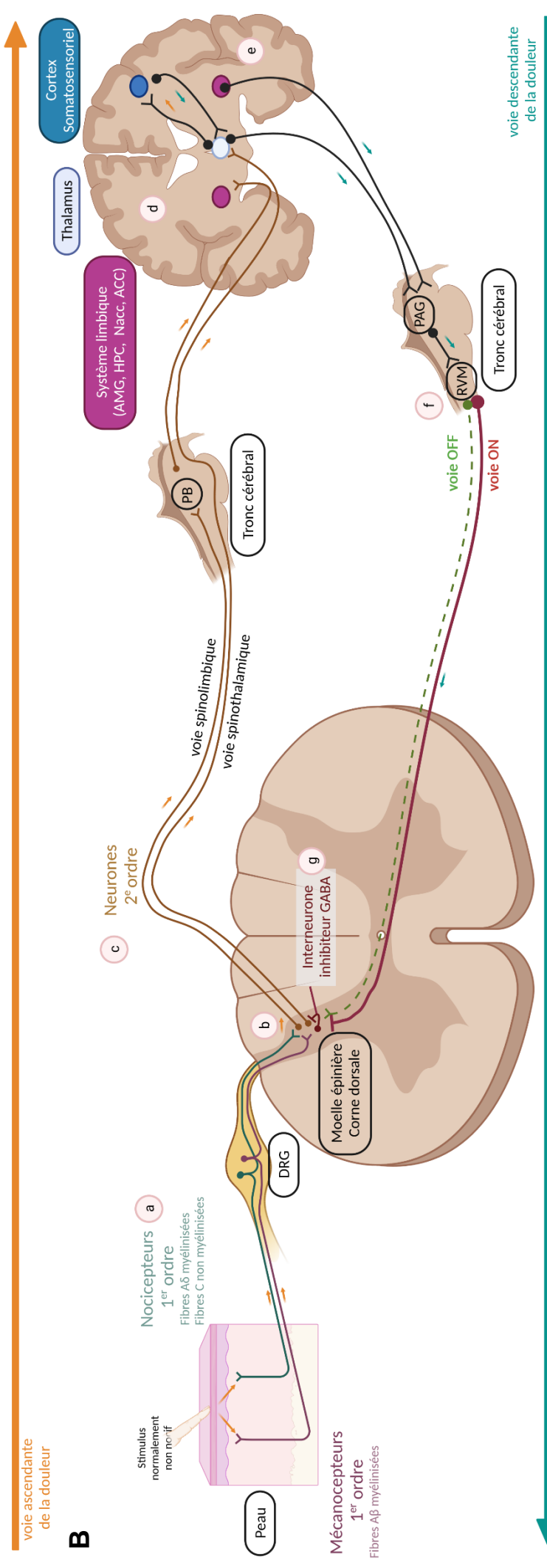
Apparaît alors le phénomène appelé *wind up* : une augmentation progressive de la transmission nociceptive, dépendante de la fréquence du signal afférent (Herrero *et al.*, 2000), devenant un phénomène de sensibilisation centrale : une augmentation de la réponse nociceptive des neurones du système nerveux central (SNC) par rapport au signal afférent (IASP Task Force on Taxonomy, 2017). Cela induit une plasticité au niveau de l'encéphale. Les perceptions nociceptives et émotionnelles sont modifiées, ainsi que la modulation descendante de la douleur, facilitant une diminution de l'inhibition nociceptive au niveau spinal (*via* l'inhibition des interneurones inhibiteurs GABA intervenant dans les synapses spinales). La figure 3 représente la transmission normale du signal nociceptif (A) ainsi que les changements provoqués en conditions neuropathiques (B).

Figure 3 : Schéma de la perception douloureuse en condition normale (A) et modifications en condition de neuropathie périphérique (B). (Cohen et Mao, 2014 ; Meacham *et al.*, 2017).



A

Un stimulus nocif est détecté par les nocicepteurs de 1^{er} ordre, puis est transmis jusqu' à la corne dorsale de la moelle épinière en passant par les ganglions spinaux (DRG). Le signal nociceptif est modulé puis transmis via les neurones de 2^e ordre par deux voies principales. La voie spinothalamique envoie le stimulus nociceptif directement au thalamus qui le transmet au cortex somatosensoriel, où il est intégré et où une réponse est déclenchée. La voie spinothalamique envoie le stimulus au noyau parabrachial (PB) du tronc cérébral, qui le transmet ensuite au système limbique comprenant notamment l' amygdale, (AMG), le noyau accubens (Nacc), l' hippocampe (HPC) et le cortex cingulaire antérieur (ACC), où l' information nociceptive est associée au contexte émotionnel. Les centres intégrateurs de l' encéphale envoient ensuite un message modulateur descendant en fonction de la réponse souhaitée à ce signal. Cette modulation descendante passe par l' aire grise périaqueducale (PAG) puis par le bulbe rachidien rostral ventromédial (RVM). Si la douleur doit être amplifiée, les neurones de la voie ON sont activés, inhibant les interneurones inhibiteurs GABA dans la corne dorsale de la moelle épinière, ce qui lève l' inhibition sur les neurones de 2^e ordre. Au contraire, si la douleur doit être atténuée, les neurones de la voie OFF sont activés, stimulant l' inhibition des neurones de 2^e ordre via les interneurones GABA.



Modifications en condition neuropathique






a	Expression & Activité	b	- axones surnuméraires - connexions collatérales - transmission ephaptique - activité ectopique - plasticité synaptique	c	Sensibilisation centrale	d	Plasticité et réorganisation cérébrale	e	Suractivité des centres de la douleur, du sommeil et de l'humeur → perturbation de la modulation descendante de la douleur	f	inhibition du contrôle négatif de la douleur ↙ voie ON ↘ voie OFF	g	Diminution du nombre d'interneurones inhibiteurs
				→ hyperexcitabilité				→ perte d'inhibition					

B En condition neuropathique, la nociception est modifiée à plusieurs échelles. À l' échelle moléculaire dans les nocicepteurs **(a)**, l' expression et l' activité des canaux ioniques Na⁺ voltage-dépendant (Na_v) et Ca²⁺ (notamment leur sous-unité α₂δ) sont augmentées et celles des canaux K⁺ sont diminuées. À l' échelle cellulaire **(b)**, la neuropathie entraîne la formation d' axones de nocicepteurs surnuméraires, la formation de synapseS entre les mécanocepteurs et les neurones de 2^e ordre, une activité électrique ectopique des nocicepteurs, une transmission ephaptique (transmission du signal nerveux par diffusion de proximité) et une plasticité des synapses. Cela entraîne une étendue du champ récepteur des nocicepteurs de 1^{er} ordre et ainsi une sensibilisation centrale des neurones de 2^e ordre **(c)**. Le tout génère une hyperexcitabilité des circuits de transmission. Au niveau de l' encéphale **(d,e)**, des modifications cellulaires des neurones et cellules gliales entraînent une hypersensibilité et accentuent la perception nociceptive et émotionnelle de la douleur. Ceci perturbe le contrôle descendant de la douleur **(e, f)** avec une atténuation de l' activation de la voie « off » anti-nociceptive et une facilitation de la voie « on » pro-nociceptive. Ainsi, au niveau de la moelle épinière dorsale, les interneurons GABA inhibiteurs **(g)** sont inhibés par la voie « on ». Cette perte d' inhibition accentue le phénomène d' hyperexcitabilité et le développement de symptômes tels que l' allodynie ou l' hyperalgie.


1.6 Traitements

Le traitement de la douleur neuropathique est un processus long et complexe. En effet les analgésiques classiques tels que les opiacés (morphine, méthadone, oxycodone) ne fonctionnent que modérément pour la douleur neuropathique. Le groupe NeuPSIG a ainsi publié en 2007 des recommandations de traitements pharmacologiques (Dworkin *et al.*, 2010). Ces recommandations proposent comme traitements de première ligne une administration chronique d'antidépresseurs tels que les antidépresseurs tricycliques (TCAs) ou les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (SSNRIs) ou d'anticonvulsivants tels que les gabapentinoïdes (tableau 3). Malheureusement, les effets indésirables de ces molécules entraînent l'arrêt du traitement chez 15 à 20 % des patients (Kremer *et al.*, 2016). Dans le cas de douleurs neuropathiques périphériques avec une localisation précise, une application topique d'analgésiques locaux tels que la lidocaïne est recommandée. Dans le cas de névralgie trigéminal, des antiépileptiques tels que la carbamazépine sont recommandés, soulageant la douleur chez 90 % des patients.

Tableau 3 : Principaux traitements de première ligne de la douleur neuropathique et leurs propriétés (Dworkin *et al.*, 2010 ; Kremer *et al.*, 2016).

Classe	Effet	Mécanismes d'actions	Doses recommandées	Durée du traitement	Effets indésirables
TCAs					
Amitriptyline	↘Allodynie mécanique ↘Hyperalgie thermique	 Transporteurs de la sérotonine et de la noradrénaline  Récepteurs adrénergiques α / β , et sérotoninergique 5-HT	25 à 150 mg/jour	6 à 8 semaines	Somnolence, vertiges, assèchement de la bouche, constipation, nausée, rétention urinaire, sudation, maux de tête, vision floue, palpitations, irritabilité et ataxie
SSNRIs					
Duloxétine	↘Hyperalgie mécanique	 Système opioïde (μ, δ)  Inflammation neurogénique	60-120 mg/jour	4 semaines	Nausée, assèchement de la bouche, maux de tête, libido réduite, vertiges, somnolence ou insomnie, appétit réduit, hypertension.
Venlafaxine	↘Allodynie mécanique		150-225 mg/jour	4 à 6 semaines	
Gabapentinoïdes					
Gabapentine	↘Allodynie mécanique	 Sous-unité $\alpha 2\delta$ des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants	100 à 1200 mg	3 à 8 semaines	Somnolence et vertiges, troubles de la cognition chez les personnes âgées
Prégabaline	↘Hyperalgie thermique		50 à 200 mg 3 fois par jour	4 semaines	

TCAs : antidépresseurs tricycliques.

 inhibe

SSNRIs : Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline.

 active

Lorsque ces traitements échouent ou ne sont plus pris par les patients, il est alors possible de leur proposer des traitements de deuxième ligne tels que le tramadol (opiacé faible), les patchs de lidocaïne ou les patchs de capsaïcine fortement concentrée. Les opiacés forts (oxycodone, morphine, méthadone) et la toxine botulinique de type A sont considérés comme des traitements de troisième ligne. Ces recommandations sont faites après une méta-analyse de la littérature pour chaque traitement, en utilisant l'approche GRADE (*Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evolution*, soit le classement des recommandations, leurs évaluation, développement et évolution) pour déterminer le niveau de qualité de résultats présentés dans les publications scientifiques, avec une gradation allant de très faible, faible, modérée à élevée (Finnerup *et al.*, 2015). D'autres traitements sont encore en cours d'étude et de développement, avec notamment des combinaisons de traitements permettant de réduire les doses (par exemple une combinaison de gabapentinoïdes et d'opiacés) ou encore les phytocannabinoïdes, ces derniers nous intéressant dans le cadre de ce travail de thèse (Dworkin *et al.*, 2010).

2. Étude d'un phytocannabinoïde : le cannabidiol

2.1 Le cannabis et ses dérivés

La première description d'une utilisation médicinale du cannabis (*Cannabis sativa*, Figure 4) se trouve dans un manuscrit datant d'environ 2350 avant J.C en Égypte Antique (Russo, 2007). Depuis, pendant des siècles, cette plante a été utilisée à travers le monde pour ses propriétés psychotropes, analgésiques, anti-inflammatoires, anticonvulsives, orexigènes et bien d'autres encore (Zuardi, 2006).

Figure 4 : Planche botanique de *Cannabis sativa* (Masclaf, 1891).



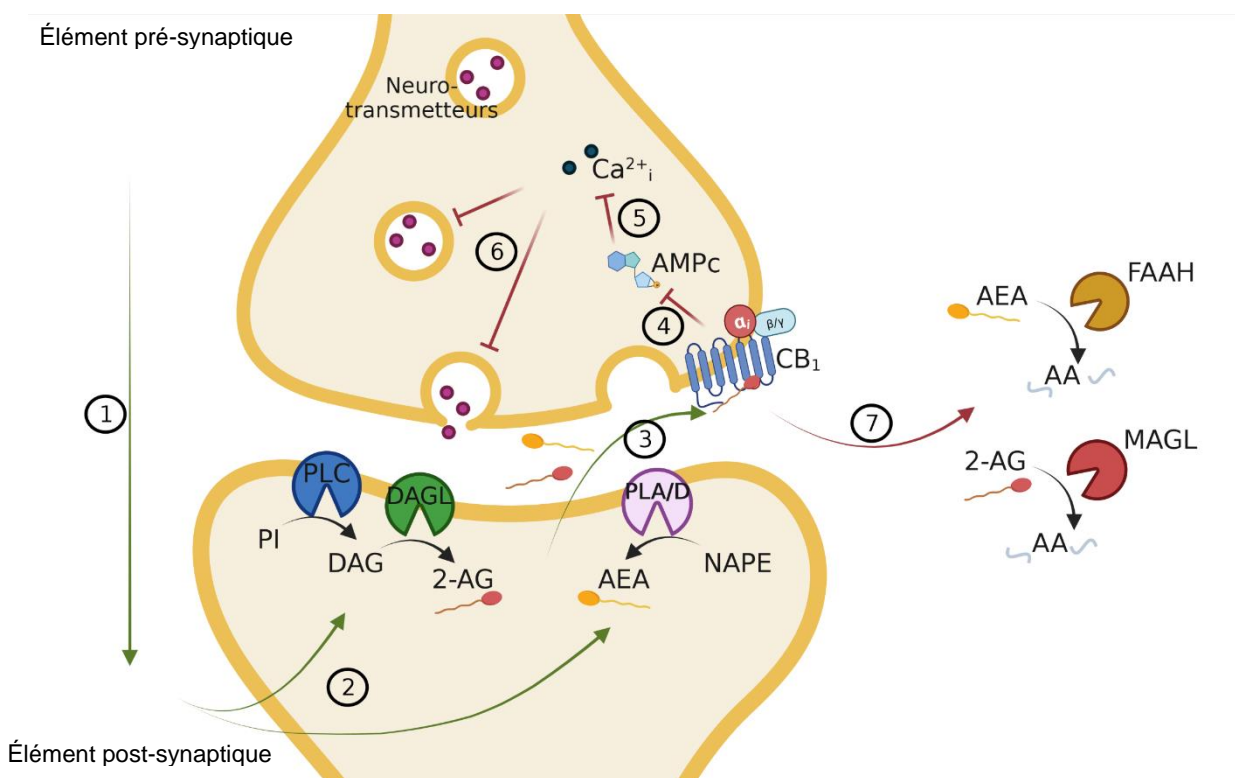
De cette plante sont extraits les phytocannabinoïdes, dont on peut citer les deux composés majoritaires : le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) et le cannabidiol (CBD). Le THC est le premier agent à avoir été découvert et étudié à la fin du XX^e siècle. C'est le composé principalement responsable des effets psychotropes du cannabis. Le CBD, molécule ne présentant pas d'effets psychotropes, a été identifié pour la première fois en 1940 par Adams et collaborateurs (1940). Toutefois ce n'est qu'à partir des années 1970 que ses propriétés pharmacologiques furent étudiées par Mechoulam et collaborateurs (Mechoulam *et al.*, 1970). C'est à cette période que l'on découvre le système endocannabinoïde.

2.2 Système endocannabinoïde

Le système endocannabinoïde est composé de deux récepteurs, CB₁ et CB₂, de deux ligands endogènes, l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG), ainsi que leurs enzymes de dégradation, l'hydroxylase d'acides gras (FAAH) et la lipase des monoacylglycérols (MAGL). Les récepteurs CB₁ et CB₂ sont des récepteurs à sept domaines

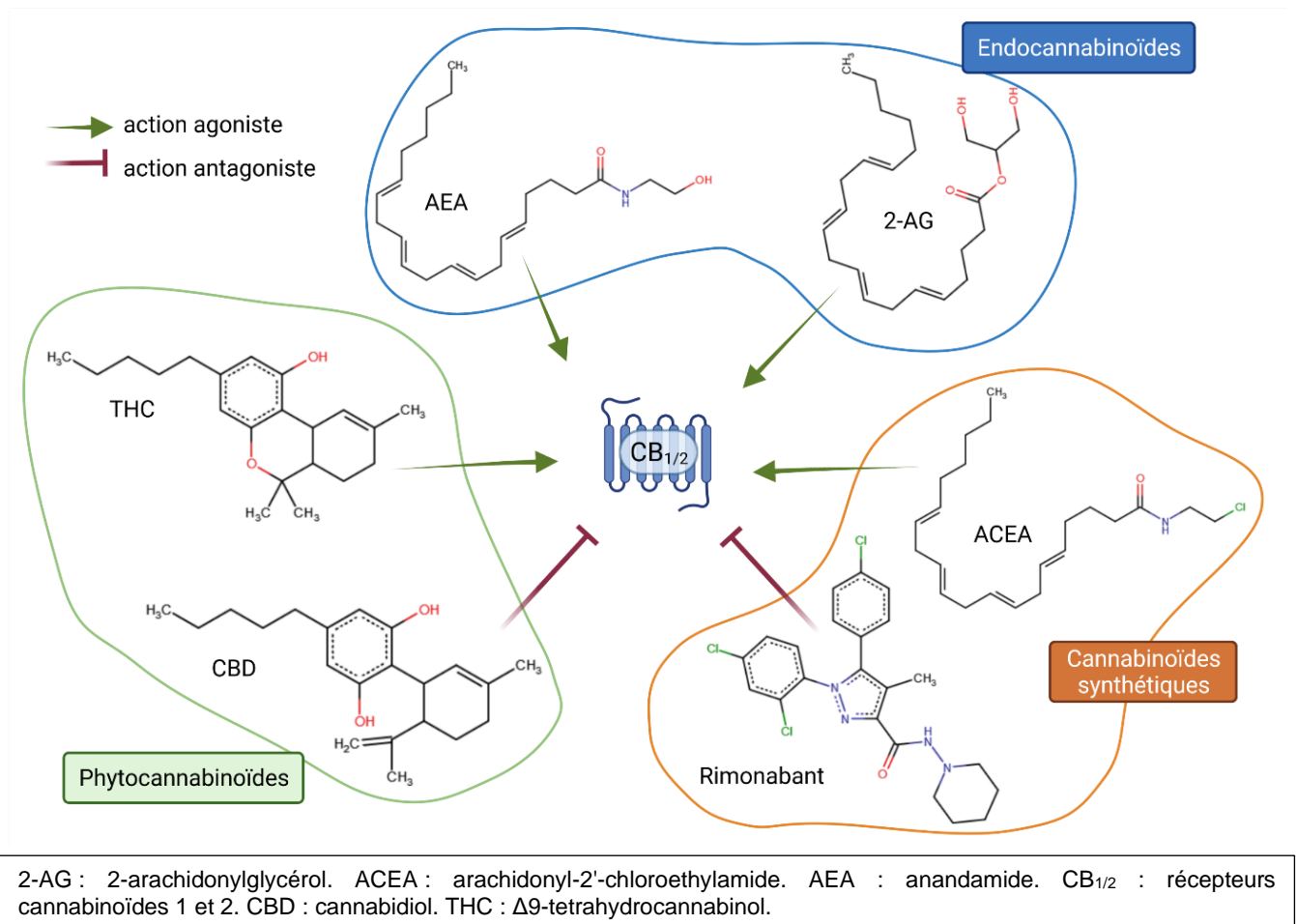
transmembranaires, couplés à des protéines G (RCPG). Le récepteur CB₁ est le récepteur majoritaire dans l'organisme. On le retrouve principalement à la membrane des structures présynaptiques des neurones présents dans le système nerveux central ainsi que périphérique ; en périphérie dans les muscles, la peau et le foie par exemple ; et très rarement à la surface de cellules immunitaires. Le récepteur CB₂ se retrouve majoritairement dans des cellules immunitaires (microgliales par exemple) mais aussi, plus rarement, dans des neurones. Leurs ligands endogènes sont des dérivés de lipides, qui sont produits à la demande à la membrane plasmique et dégradés rapidement après leur action (Pertwee, 2008 ; Donvito *et al.*, 2018). La figure 5 présente un exemple de mécanismes du système endocannabinoïde au sein d'une synapse. D'autres molécules non endogènes, extraites du cannabis ou complètement synthétiques, ont depuis été associées au système endocannabinoïde ; des exemples de ces molécules sont présentés dans la figure 6.

Figure 5 : Fonctionnement du système endocannabinoïde au sein d'une synapse (Blankman et Cravatt, 2013 ; Donvito *et al.*, 2018).



(1) Transmission synaptique. **(2)** Activation de la production d'endocannabinoïdes. Le phosphatidylinositol (PI) est transformé en diacylglycérol (DAG) par la Phospholipase C (PLC) puis en 2-arachidonoylglycérol par la diacylglycérol lipase (DAGL). Le N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine (NAPE) est transformé en anandamide par un processus encore non élucidé impliquant probablement les phospholipases A et D. **(3)** Activation du récepteur CB₁ par l'un des ligands. **(4)** Dissociation de la protéine G_{α_{i/o}} qui, par cascade de signalisation, diminue la concentration en AMP cyclique (AMPc) qui va ensuite **(5)** diminuer la concentration en calcium intracellulaire (Ca²⁺_i). **(6)** Inhibition de la libération vésiculaire de neurotransmetteurs (glutamate ou GABA) et de la transmission synaptique. **(7)** Dégradation de l'AEA en acide arachidonique (AA) par l'hydroxylase d'acides gras (FAAH) et du 2-AG par la lipase des monoacylglycérols (MAGL).

Figure 6 : Exemples de ligands endo- et exogènes des récepteurs cannabinoïdes et de leur action (IUPHAR/BPS, 2021).



2.3 Produits dérivés du cannabis commercialisables

À ce jour, les hautes autorités de santé n'ont donné leur autorisation de mise sur le marché qu'à quatre principes actifs dérivés du cannabis (NHS, 2018 ; Commissioner office of the FDA, 2020) :

- Le dronabinol (commercialisé sous le nom de MARINOL™), analogue synthétique du THC administré oralement sous forme de capsules et indiqué en tant qu'orexigène pour patients anorexiques atteints du SIDA et en tant qu'antiémétique pour des patients suivant des chimiothérapies.
- Le nabilone (commercialisé sous le nom de CESAMET™), analogue synthétique du THC administré oralement sous forme de capsules et indiqué en tant qu'antiémétique pour des patients suivant des chimiothérapies.

- Le CBD (commercialisé sous le nom de EPIDIOLEX™), solution orale contenant moins de 0,01 % de THC qui est indiquée en tant que traitement des crises épileptiques associées aux syndromes de Lennox-Gastaut, de Dravet, et de la sclérose tubéreuse de Bourneville.
- Le nabiximol (commercialisé sous le nom de SATIVEX™), un spray buccal contenant un mélange de THC et de CBD (environ 1 : 1) qui est indiqué en cas de spasticité due à la sclérose en plaque en cas d'absence de réponse à d'autres traitements.

Ainsi, le CBD n'est autorisé à la prescription médicale par les autorités que sous la forme du médicament EPIDIOLEX™. Le CBD est une molécule très liposoluble (coefficient de partition $K_{ow} = 6-7$) qui passe facilement la barrière hématoencéphalique et reste stockée dans le cerveau et les tissus adipeux. Sa biodisponibilité orale est faible (<20 %), il est donc recommandé de l'ingérer avec de la nourriture. Son temps de demi-vie dans l'organisme dépend de la voie d'administration, il est d'une à onze heures pour les spray buccaux ; de deux à cinq heures pour une administration orale chronique ; 24 heures par voie intraveineuse et jusqu'à 31 heures lorsqu'il est fumé (García-Gutiérrez *et al.*, 2020). Les principaux effets indésirables rapportés de l'EPIDIOLEX™ sont de la somnolence, des diarrhées, de la fatigue, de la nausée et des fonctions hépatiques anormales. Enfin, le CBD est un inhibiteur compétitif de certaines formes du cytochrome P450, ce qui peut induire des interactions médicamenteuses (Huestis *et al.*, 2019).

Cependant, si les effets de ce médicament sont connus, le manque de régulation à propos de la vente de produits contenant du CBD entraîne une grande variabilité de qualité dans les produits que les personnes peuvent se procurer. En effet, des entreprises commercialisent sur internet des produits à base de CBD sous de nombreuses formes (huiles, infusions, sprays, fleurs, *etc.*). Ces produits sont censés contenir uniquement du CBD avec un taux de THC inférieur à 0,2 % d'après la MILDECA (MILDECA, 2021). Une étude comparant 84 produits vendus en ligne en tant que CBD a établi que seulement 30 % étaient effectivement composés de ce que leur étiquette annonçait. Le reste surestimait ou sous-estimait la quantité de CBD présente, et la présence d'autres cannabinoïdes tels que le THC a été détectée dans 40 % des produits (Bonn-Miller *et al.*, 2017).

Cela peut être un fort biais dans les études cliniques évaluant l'effet du CBD chez des patients se le procurant par eux-mêmes. Face à la demande croissante des patients, à la diversité de formes pharmaceutiques et au manque d'informations sur les doses à prescrire, les médecins ont besoin de recommandations claires concernant le CBD pour pouvoir conseiller leurs patients. Ils peuvent toutefois déjà poser ces trois questions concernant le produit de CBD concerné (VanDolah *et al.*, 2019) : Est-ce qu'il répond aux standards de qualité

des hautes autorités de santé ? Est-ce que l'entreprise a un programme de signalisation des effets secondaires ? Est-ce que le taux de THC inférieur à 0,2 % a été testé par un laboratoire ?

2.4 Le CBD et autres cannabinoïdes dans les études cliniques et pré-cliniques.

Les Académies Nationales américaines des Sciences, de l'Ingénierie et de la Médecine ont publié en 2017 un compte rendu faisant état des preuves actuelles concernant les effets sur la santé du cannabis et des cannabinoïdes (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017). Ils rapportent les résultats de méta-analyses et de revues systématiques concernant les effets des dérivés du cannabis vis-à-vis de maladies humaines variées, notamment la méta-analyse de Whiting et collaborateurs (Whiting *et al.*, 2015). Leurs résultats sont présentés dans la figure 7.

Figure 7 : Évaluation selon l'approche GRADE des effets des dérivés du cannabis présentés dans les études cliniques (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017).

Qualité élevée de preuve d'efficacité	Qualité modérée de preuve d'efficacité	Qualité faible de preuve d'efficacité	Qualité faible de preuve d'inefficacité	Qualité très faible ou absence de preuve d'efficacité
<ul style="list-style-type: none"> • Douleur chronique chez l'adulte • Nausée et vomissements dus à la chimiothérapie • Spasticité causée par la sclérose en plaque rapportée par les patients 	<ul style="list-style-type: none"> • A court terme, troubles du sommeil causés par la douleur chronique 	<ul style="list-style-type: none"> • Anorexie due au SIDA • Spasticité causée par la sclérose en plaque mesurée par les cliniciens • Syndrome de la Tourette • Trouble de l'anxiété sociale • Stress post-traumatique 	<ul style="list-style-type: none"> • Démence • Glaucome (pression intraoculaire) • Dépression causée par la douleur chronique ou la sclérose en plaque 	<ul style="list-style-type: none"> • Cancers (dont gliomes) • Anorexie due au cancer • Syndrome de l'intestin irritable • Spasticité due à une lésion de la moelle épinière • Maladie de Huntington • Maladie de Parkinson • Schizophrénie • Troubles de l'addiction

Approche GRADE : *Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evolution*, soit le classement des recommandations, leur évaluation, développement et évolution.

Néanmoins, cette revue ne présente pas les effets du CBD seul. En effet, dans les études évaluées le CBD n'est pas la seule molécule testée mais il est souvent en combinaison avec d'autres cannabinoïdes. En 2019, White a présenté une revue centrée sur les effets thérapeutiques du CBD et leur niveau GRADE de preuve (White, 2019). Cette revue détermine que le CBD est efficace pour traiter les crises épileptiques de certains syndromes particuliers (en cohérence avec les indications d'EPIDIOLEX™) ; qu'il est prometteur (mais non prouvé

efficace) en tant que prémédication pour des événements anxiogènes et en tant que traitement chronique de la schizophrénie. Son efficacité chez l'humain pour l'anxiété chronique n'a pas encore été évaluée et les données sur la douleur, les spasmes et la maladie de Parkinson sont encore trop limitées.

Il est donc nécessaire de continuer de tester si les effets du CBD observés chez l'animal se transposent à l'humain de manière rigoureuse, à l'aide d'essais cliniques randomisés en double aveugle ayant des protocoles d'administration de CBD cohérents et des effectifs larges. En effet, si on s'intéresse particulièrement à la douleur chronique et ses comorbidités, le CBD offre des résultats prometteurs chez l'animal (Ligresti *et al.*, 2016). Par exemple, dans différents modèles de douleur neuropathiques, tels que la neuropathie induite par la chimiothérapie, une compression nerveuse chronique ou une section partielle du nerf sciatique, des injections chroniques de CBD ont induit une diminution de l'hyperalgésie thermique ou mécanique et de l'allodynie mécanique (Costa *et al.*, 2007 ; King *et al.*, 2017 ; De Gregorio *et al.*, 2019).

Concernant l'anxiété, le CBD a montré des résultats parfois mitigés mais semble dans la majorité des études présenter des propriétés anxiolytiques (Campos *et al.*, 2012). Notamment chez le rongeur, le CBD diminue l'aversion à explorer des zones très exposées et éclairées (test du labyrinthe surélevé en croix ou *elevated plus maze*, EPM) (Guimarães *et al.*, 1990 ; Onaivi *et al.*, 1990), diminue les comportements de *freezing* face à une menace de prédateur (Uribe-Mariño *et al.*, 2012) et diminue la peur conditionnée par la punition (test du conflit de Vogel) (Moreira *et al.*, 2006).

Enfin, les modèles animaux de dépression évaluent souvent ce trouble en utilisant le test de nage forcée (*forced swim test*, FST) ou de suspension par la queue (*tail suspension test*, TST) qui sont interprétés comme un renoncement face à un stress inévitable. Dans le FST, le CBD diminue les comportements de résignation mais cela n'a pas été montré pour le TST (El-Alfy *et al.*, 2010 ; Zanelati *et al.*, 2010). Il a également été montré que le CBD induisait une résistance au stress chronique imprévisible (Campos *et al.*, 2012). Néanmoins, il est important de se rappeler que ces tests et modèles ne peuvent représenter parfaitement l'anxiété et la dépression humaine et donc il faut uniquement utiliser les termes de comportements de type anxio-dépressif chez l'animal dans ce contexte. Ces études sont résumées dans le tableau 4.

Les mécanismes et effecteurs moléculaires sous-jacents à ces effets du CBD sont très étudiés et encore débattus, et ce n'est qu'en comprenant les cibles de cette molécule et à quelles doses les atteindre qu'on pourra maîtriser son utilisation thérapeutique.

Tableau 4 : Résultats de plusieurs études précliniques étudiant les effets du CBD.

Référence	Maladie modélisée	Animal	Doses et voie d'administration	Effet	Test
(Costa <i>et al.</i> , 2007)	Douleur neuropathique (compression chronique du nerf sciatique)	Rat Wistar	Chronique (7 jours) 2,5 à 20 mg/kg orale	Antihyperalgique (thermique et mécanique)	Appareil de Randall-Selitto et de Hargreaves
(King <i>et al.</i> , 2017)	Douleur neuropathique (injection d'agent de chimiothérapie paclitaxel)	Souris C57BL/6J	Chronique (1 jours sur 2, une semaine) 0,625 à 20 mg/kg i.p.	Antiallodynique (mécanique)	Test des filaments de Von Frey
(De gregorio <i>et al.</i> , 2019)	Douleur neuropathique (lésion nerveuse partielle), Anxiété	Rat Wistar	Chronique (7 jours) 5 mg/kg s.c.	Antiallodynique (mécanique) Anxiolytique	Test des filaments de Von Frey <i>Elevated Plus Maze</i> (EPM),
(Guimarães <i>et al.</i> , 1990)	Anxiété	Rat Wistar	Aigu 2,5 à 20 mg/kg i.p.	Anxiolytique	EPM
(Uribe-mariño <i>et al.</i> , 2012)	Anxiété	Souris Swiss	Aigu 0,3 à 30 mg/kg i.p.	Panicolytique	Exposition à un prédateur
(Moreira <i>et al.</i> , 2006)	Anxiété	Rat Wistar	Aigu 2,5 à 20 mg/kg i.p.	Anxiolytique	Test du Conflit de Vogel
(El-alfy <i>et al.</i> , 2010)	Dépression	Souris Swiss Webster	Aigu 200 mg/kg	Antidépresseur	<i>Forced Swim Test</i> (FST)
		Souris DBA/2	i.p.	Pas d'effet	Test de suspension par la queue
(Zanelati <i>et al.</i> , 2010)	Dépression	Souris Swiss	Aigu 0,3 à 30 mg/kg i.p.	Antidépresseur	FST

i.p. : voie intrapéritonéale, **s.c.** : voie sous cutanée. **CBD** : cannabidiol

3. Les cibles moléculaires du CBD

Plus de 76 cibles moléculaires du CBD ont été identifiées, comptant parmi elles des RCPGs, des récepteurs ionotropiques, des transporteurs, des enzymes et des facteurs nucléaires (Mlost *et al.*, 2020). On peut donc en déduire que les mécanismes d'action du CBD sont divers et complexes, et qu'il est nécessaire de mieux comprendre le rôle de ces cibles dans les effets physiologiques du CBD et leurs interactions.

3.1 Le CBD et les récepteurs cannabinoïdes

Le CBD a longtemps été décrit comme un ligand antagoniste du récepteur CB1 et un agoniste inverse du récepteur CB2 (pour les définitions des termes pharmacologiques, voir tableau 5). Cependant, des études ultérieures ont montré que le CBD était en fait un modulateur allostérique négatif (NAM) des récepteurs cannabinoïdes (Laprairie *et al.*, 2015). En effet, contrairement au THC qui a une affinité pour ces récepteurs importante (K_i d'un ordre de grandeur nanomolaire), celle du CBD est moindre (K_i d'un ordre de grandeur micromolaire). Cela peut s'expliquer par une différence de conformation : le THC est une molécule plane alors que le CBD est une molécule angulaire (figure 8), ce qui crée un encombrement stérique l'empêchant de se loger parfaitement dans le site orthostérique des récepteurs (García-Gutiérrez *et al.*, 2020). Cette faible affinité et ce rôle de NAM est l'hypothèse principale expliquant l'absence d'effets psychotropes du CBD.

Figure 8 : Structure moléculaire et conformation spatiale du Δ^9 -tétrahydrocannabinol (gauche) et du cannabidiol (droite) décrite par Baracović (2021).

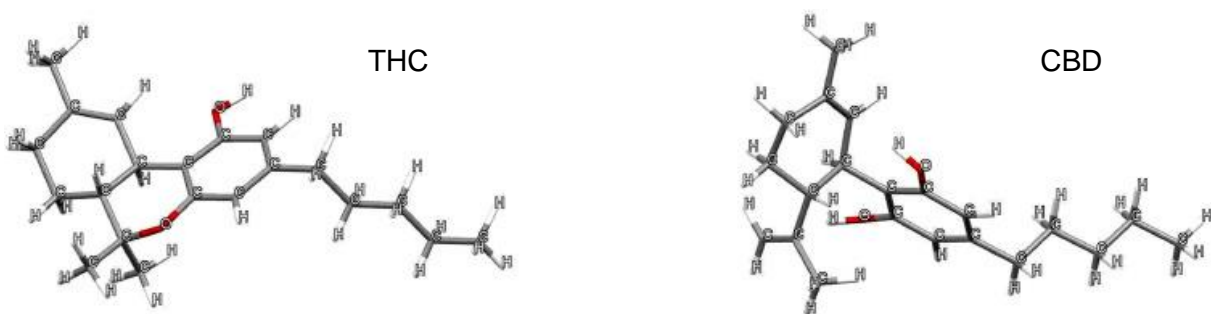


Tableau 5 : Définitions de concepts pharmacologiques (Brown et Ragozzino, 2010 ; Atack et Lavreysen, 2010).

Terme	Définition
Agoniste	Substance qui se lie à un récepteur et altère son état, résultant en une réponse biologique
Agoniste complet	Substance activant la réponse biologique maximale d'un récepteur
Agoniste partiel	Substance activant la réponse biologique d'un récepteur sans jamais atteindre sa capacité maximale
Agoniste inverse	Substance provoquant une réponse opposée à celle d'un agoniste
Antagoniste	Substance qui se lie à un récepteur mais n'altère pas son état, résultant en une absence de réponse biologique
Site orthostérique	Site d'un récepteur où se lie le ligand endogène pour produire son effet
Site allostérique	Site régulateur d'un récepteur différent du site orthostérique
Modulateur allostérique	Substance qui augmente ou diminue l'action d'un agoniste ou d'un antagoniste en se liant au site allostérique du récepteur

La littérature est mitigée sur le rôle des récepteurs cannabinoïdes dans les actions antinociceptives, anxiolytiques et antidépressives du CBD. L'utilisation d'antagonistes des récepteurs cannabinoïdes (rimonabant par exemple) ne fait disparaître l'effet du CBD que dans certains cas, suggérant que ces récepteurs ne soient pas toujours impliqués (Mlost *et al.*, 2020 ; García-Gutiérrez *et al.*, 2020 ; Almeida et Devi, 2020). Bien que le CBD soit un NAM, l'implication des récepteurs endocannabinoïdes peut s'expliquer par une activation indirecte de ces récepteurs : le CBD inhibe l'hydroxylase d'acides gras (FAAH) augmentant ainsi les taux d'anandamide qui peut activer CB₁ et CB₂ (Bisogno *et al.*, 2001). Cette modulation des taux d'endocannabinoïdes semble impliquée notamment dans l'effet anti-inflammatoire et antinociceptif du CBD (Almeida et Devi, 2020).

Il existe un RCPG orphelin, très répandu dans le SNC mais dont le rôle physiologique n'est pas encore identifié, et que la littérature propose comme un potentiel troisième récepteur cannabinoïde : le GPR55. Ce récepteur est activé par le THC, ou encore le HU210 (cannabinoïde synthétique), et le CBD en est un antagoniste (Ryberg *et al.*, 2007). D'autres études sont nécessaires pour savoir si le GPR55 est une cible moléculaire intéressante pour l'effet thérapeutique du CBD. On peut également mentionner les RCPG orphelins GPR3 et GPR6, également affiliés phylogénétiquement aux récepteurs cannabinoïdes, qui sembleraient être impliqués dans les comportements de réponse au stress et à l'anxiété, ainsi que dans l'apprentissage (Vitale *et al.*, 2021).

3.2 CBD et ses cibles impliquées dans la douleur, l'anxiété et la dépression

a. Le récepteur sérotoninergique 5-HT_{1A}

L'une des cibles moléculaires centrales des effets du CBD semble être le récepteur 5-HT_{1A}. Ce RCPG fait partie du système sérotoninergique composé de : son ligand, la sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT), synthétisée à partir du tryptophane dans le SNC dans les noyaux du raphé et en périphérie par les cellules entérochromaffines de l'intestin ; ses récepteurs, classés en 6 familles de RCPG et une famille de récepteurs ionotropiques (les 5-HT₃) ; le transporteur membranaire sélectif de la sérotonine (SERT) ; et son enzyme de dégradation, la monoamine-oxydase de type A (MAO-A). Ce système est notamment impliqué dans la régulation de l'humeur, de la mémoire, de la prise alimentaire, des comportements sexuels, de la nociception mais aussi dans des maladies (dépression, anxiété, migraine, anorexie, schizophrénie). Au sein de ce système, le récepteur 5-HT_{1A} est couplé à une protéine G_i et il peut être situé au niveau pré- et post-synaptique, permettant un rétrocontrôle négatif de la libération de 5-HT (David et Gardier, 2016).

Avec le SERT, le 5-HT_{1A} est une cible préférentielle des traitements anxiolytiques et antidépresseurs. Russo et collaborateurs ont montré que le CBD était un agoniste de ce récepteur (Russo *et al.*, 2005). Dans des modèles rongeurs, des traitements aigus ou chroniques du CBD semblent réduire les comportements de type anxieux et/ou dépressif dans des tests tels que l'EPM ou le FST (Zanelati *et al.*, 2010 ; Wright *et al.*, 2020). L'implication mécanistique du récepteur 5-HT_{1A} dans ces phénomènes a été montrée avec l'injection d'un antagoniste sélectif du récepteur, le WAY-100635, provoquant une disparition des effets du CBD (García-Gutiérrez *et al.*, 2020). De plus ce récepteur, présent dans la corne dorsale de la moelle épinière, est également impliqué dans le soulagement de la douleur chronique (Haleem, 2019). Son activation par le CBD entraîne par exemple une réduction de l'allodynie et de l'hyperalgie dans des modèles de douleur neuropathique causée par la chimiothérapie (Ward *et al.*, 2011 ; King *et al.*, 2017), le diabète (Jesus *et al.*, 2019), ou une lésion nerveuse périphérique (De Gregorio *et al.*, 2019).

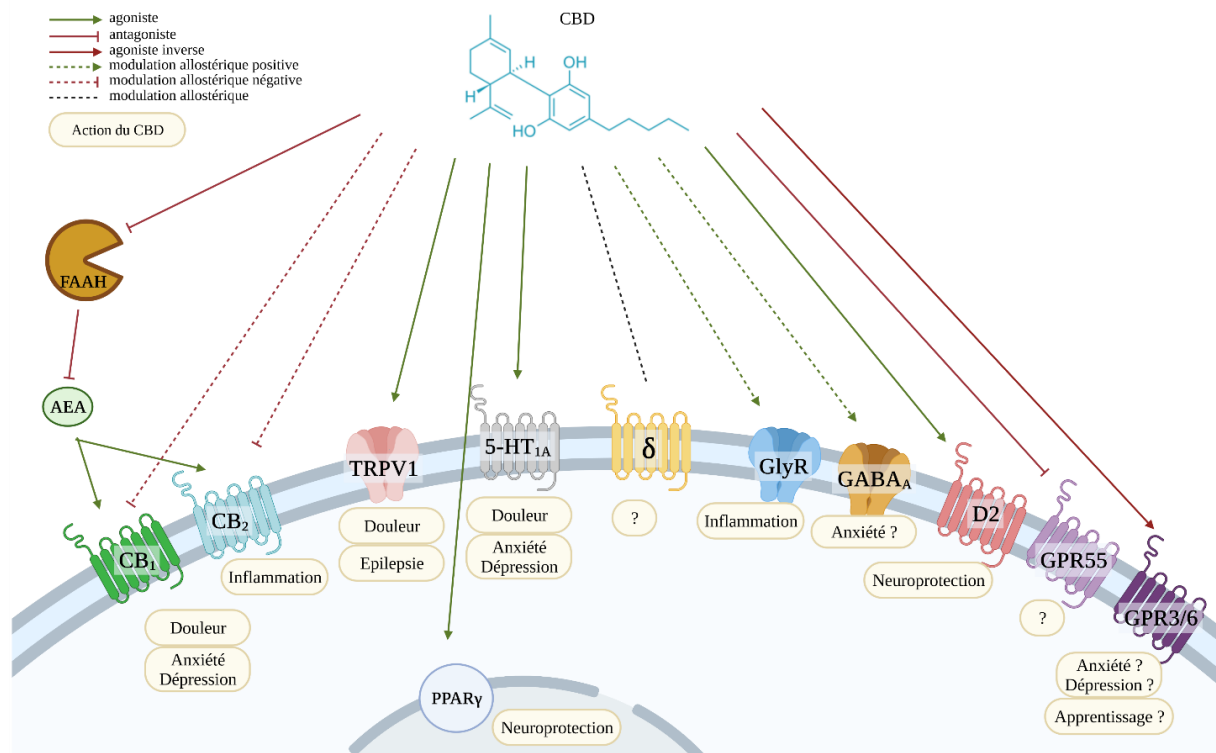
b. Autres récepteurs connus

Le récepteur vanilloïde à potentiel transitoire 1 (TRPV1 ou *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*) est l'une des autres cibles du CBD sur laquelle son effet agoniste est bien identifié. Ce récepteur ionotropique est présent notamment à la membrane des nocicepteurs des ganglions spinaux, et permet la transduction de stimuli nociceptifs après activation par une température supérieure à 34 °C, un pH acide inférieur à 5,9 et certaines molécules telles que la capsaïcine (présente dans le piment) ou l'anandamide (endocannabinoïde) (Benítez-Angelès *et al.*, 2020). Une activation par un agoniste du TRPV1 le fait passer en conformation

ouverte et laisse passer de manière non sélective les ions Na^+ et Ca^{2+} , dépolarisant la membrane et déclenchant des potentiels d'action mais étant rapidement désensibilisé ensuite (Yang et Zheng, 2017). Le CBD, et non le THC, est un agoniste de ce récepteur (Wright *et al.*, 2020). On pense que l'effet anti-épileptique du CBD passe principalement par le récepteur TRPV1 (Vitale *et al.*, 2021). De plus, dans des modèles de douleur chronique, neuropathique et d'inflammation, l'effet antinociceptif et anti-inflammatoire TRPV1-dépendant du CBD a été mis en évidence plusieurs fois, en inhibant l'effet analgésique du CBD par l'injection de capsazépine (CPZ), un antagoniste de TRPV1 (Bisogno *et al.*, 2001 ; Costa *et al.*, 2004 ; Hassan *et al.*, 2014 ; De Gregorio *et al.*, 2019).

Le CBD interagit également avec les récepteurs ionotropiques à la glycine (GlyR) en ayant une action anti-inflammatoire, avec les récepteurs ionotropiques GABA_A (action potentiellement anxiolytique) ainsi qu'avec les récepteurs à la dopamine D2 (RCPGs) et les récepteurs gamma activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR_γ), en ayant un effet neuroprotecteur potentiel (Almeida et Devi, 2020 ; Mlost *et al.*, 2020 ; Vitale *et al.*, 2021). Ces différentes cibles cellulaires et leurs actions potentielles sont présentées dans la figure 9. Il reste néanmoins une cible à mentionner : les récepteurs opioïdes.

Figure 9 : Action du CBD sur ses principales cibles cellulaires (Almeida et Devi, 2020 ; Mlost *et al.*, 2020 ; Vitale *et al.*, 2021).



Les cibles moléculaires du cannabidiol (CBD) : l'hydrolase des acides gras (FAAH), les récepteurs cannabinoïdes 1 et 2 (CB₁ et CB₂), le récepteur vanilloïde à potentiel transitoire 1 (TRPV1), le récepteur sérotoninergique 5-HT_{1A}, le récepteur opioïde delta (δ), les récepteurs à la glycine (GlyR), le récepteur à l'acide γ -aminobutyrique de type A (GABA_A), le récepteur dopaminergique 2 (D2) et le récepteur de type cannabinoïde GPR55, les récepteurs orphelins GPR3/6 et les récepteurs gammas activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR_γ). Endocannabinoïde : l'anandamide (AEA).

c. CBD et récepteur opioïde δ : une interaction trop peu étudiée

En 2006, Kathmann et collaborateurs ont montré qu'une forte dose de CBD (100 μ M) exerce une modulation allostérique sur les récepteurs opioïdes μ et δ (Kathmann *et al.*, 2006). Ces récepteurs font partie du système opioïde. Ce dernier est composé de quatre peptides opioïdes endogènes : β -endorphine, dynorphine et les enképhalines (met-enképhaline et leu-enképhaline). Ils sont synthétisés à partir de précurseurs distincts nommés, pro-opiomélanocortine, prodynorphine et proenképhaline, clivés en peptides actifs par des peptidases. Il comprend également trois récepteurs couplés à des protéines G_i , les récepteurs opioïdes mu (μ), delta (δ) et kappa (κ) (Abdallah et Gendron, 2018). Le récepteur Orphanin FQ/nociceptine est classé parmi les récepteurs opioïdes car il a une forte homologie de séquence avec les trois autres récepteurs mais a pour ligand endogène la nociceptine/orphanine FQ. Ce système régule de nombreuses fonctions telles que la douleur, la récompense et la motivation, la cognition, l'humeur ainsi que des fonctions respiratoires, gastrointestinales et immunitaires (Pradhan *et al.*, 2011).

Le récepteur opioïde δ est très largement exprimé dans le SNC principalement dans les bulbes olfactifs, le cortex, l'amygdale et le striatum mais on le retrouve également dans le tronc cérébral et en périphérie au niveau des nocicepteurs, des DRG et de la corne dorsale de la moelle épinière (Erbs *et al.*, 2015 ; Abdallah et Gendron, 2018). Ce schéma d'expression est en cohérence avec les fonctions physiologiques de ce récepteur. En effet, contrairement au récepteur μ , le récepteur opioïde δ n'est que très peu impliqué dans le contrôle de la douleur aiguë mais est un acteur principal du soulagement de la douleur chronique. Chez des souris *knock-out* (KO) pour le récepteur opioïde δ ou en présence d'un antagoniste de ce dernier, l'allodynie mécanique est atténuée. De plus, les traitements antidépresseurs pour la douleur chroniques ont également des effets diminués en absence du récepteur opioïde δ ou lorsqu'il est inactivé par un antagoniste. Il semble notamment que ce soit les récepteurs opioïdes δ périphériques exprimés dans les nocicepteurs Nav1.8⁺ (canaux sodiques voltage-dépendants) qui jouent un rôle déterminant dans ce phénomène (Gavériaux-Ruff et Kieffer, 2011 ; Ceredig *et al.*, 2020). De plus, les souris δ -KO ont des comportements de type dépressif exacerbés, permettant de montrer l'implication des récepteurs opioïdes δ dans la dépression (Filliol *et al.*, 2000). Cela fait donc de ce récepteur une cible thérapeutique de choix pour la douleur neuropathique et ses comorbidités. On peut ainsi se demander si les effets du CBD passent en partie par ce récepteur.

3.3 La découverte d'une nouvelle entité pharmacologique : les hétéromères

δ -CB₁

Les récepteurs couplés à une protéine G sont souvent présentés en tant qu'unité monomérique. Mais de plus en plus de données convergent sur le fait que ces récepteurs puissent former des oligomères. Si plusieurs récepteurs identiques se lient, on parlera d'homomères, et s'ils sont différents, d'hétéromères. Une définition plus précise d'un hétéromère indique qu'il s'agit d'au moins deux récepteurs fonctionnels différents qui interagissent physiquement et qui ont des propriétés fonctionnelles et pharmacologiques différentes des récepteurs individuels (Massotte, 2015). La formation d'hétéromères, comme par exemple l'hétéromère opioïde μ - δ , a été fréquemment observée *in vitro* (Filizola *et al.*, 2002) mais cette hétéromérisation n'est pas forcément reflétée *in vivo*. L'Union Internationale de Pharmacologie Basique et Clinique (IUPHAR) a donc établi des critères auxquels les potentiels hétéromères doivent répondre pour être acceptés en tant que tels (Pin *et al.*, 2007) :

- Preuve doit être faite d'une association physique au sein de tissus natifs
 - o Les récepteurs doivent être physiquement proches, ce qui est par exemple vérifiable par coimmunoprécipitation avec des anticorps spécifiques, par un essai de liaison de proximité (PLA) ou par un transfert par résonance d'énergie fluorescente (FRET). (Pour le détail des techniques citées précédemment, voir Annexe 1)
- Preuve doit être faite d'une modification de fonction par rapport aux récepteurs indépendants (modification pharmacologique, de la signalisation ou du trafic).
- Preuve doit être faite d'une perte de fonction significative lors de l'utilisation d'animaux *knock-out* ou d'ARN interférent.

Si au moins deux de ces critères sont remplis, alors la nouvelle unité fonctionnelle peut être qualifiée d'hétéromère. En 2012, Rozenfeld et collaborateurs ont montré que le récepteur opioïde δ et le récepteur CB₁ remplissaient ces conditions (Rozenfeld *et al.*, 2012). La même année, Bushlin et collaborateurs ont observé qu'un modèle de douleur neuropathique (ligature et transection partielle du nerf L5) chez le rat induisait des modifications de l'expression des récepteurs opioïdes δ et CB₁ ainsi qu'une augmentation des hétéromères δ -CB₁ dans le cerveau (visible *via* l'utilisation d'anticorps spécifique de cet hétéromère). Ils ont montré qu'au sein de membranes de cortex issues d'animaux neuropathiques, des doses non signalisantes de ligands du récepteurs CB₁ augmentaient l'activité des récepteurs opioïdes δ . Plus précisément, l'ajout de faibles doses d'HU-210 (agoniste de CB₁, 1 pM) ou de PF-514273 (antagoniste de CB₁, 1 μ M) à l'administration d'enképhaline synthétique (DPDPE, agoniste de δ , 10 μ M), augmentait l'activité du récepteur opioïde δ de manière plus importante que

l'enképhaline synthétique seule. Cet effet est, de plus, bloqué spécifiquement par des anticorps anti-hétéromères δ -CB₁ (Bushlin *et al.*, 2012). Dans un modèle de douleur neuropathique induite par des molécules de chimiothérapie (ici le paclitaxel) chez la souris, l'expression des hétéromères δ -CB₁ est augmentée dans la moelle épinière. De plus, l'injection d'une combinaison de faibles doses d'agoniste des récepteurs opioïdes δ et CB₁ (respectivement le SNC80 et le HU-210, 1 nM) réduit l'allodynie mécanique dans cette étude, et cet effet n'est pas visible avec les ligands administrés individuellement, ou lorsque que des anticorps anti-hétéromères δ -CB₁ sont injectés (Sierra *et al.*, 2019). Cela suggère que ces hétéromères peuvent être une cible thérapeutique intéressante pour le traitement de la douleur neuropathique.

Deuxième partie : Étude expérimentale

1. Introduction

L'étude bibliographique nous apprend que les traitements de la douleur neuropathique sont encore imparfaits et met donc en évidence le besoin de rechercher des innovations thérapeutiques. Elle nous apprend aussi que le CBD, une molécule à laquelle on attribue une multitude d'effets bénéfiques, ne remplit pas toutes ces promesses. Cependant, chez l'animal, elle fait preuve de potentiel pour le soulagement de la douleur neuropathique et de ses comorbidités. Comme mentionné précédemment, le premier objectif du projet dans lequel s'inscrit cette thèse est de comprendre l'effet d'un traitement chronique au CBD sur des souris souffrant de douleur neuropathique et de signes cliniques de type anxio-dépressif, et de déterminer l'implication potentielle du récepteur opioïde δ dans cet effet. Le second objectif est de mieux caractériser l'existence et la fonction des hétéromères δ -CB₁ dans ce contexte neuropathique. La première étape de cette caractérisation fut de cartographier la co-localisation neuronale des récepteurs opioïdes δ et CB₁.

Ainsi, les questions auxquelles j'ai tenté de répondre dans ce travail de thèses sont :

- Chez des souris neuropathiques (modèle du *cuff*), est-ce qu'un traitement chronique de CBD réduit l'allodynie mécanique ? Est-ce qu'il réduit les comportements de type anxio-dépressif ?
- Est-ce que ces effets dépendent du récepteur opioïde δ ?
- Dans quelles régions de l'encéphale sont co-localisés les récepteurs opioïde δ et CB₁ ?

Le récepteur opioïde δ étant impliqué dans la régulation de la douleur et de l'humeur, nous avons fait l'hypothèse que l'effet anti-allodynique, anxiolytique et antidépresseur du CBD ne sera pas observable (ou le sera de manière réduite) chez des souris n'exprimant pas ce récepteur. De plus, nous avons fait l'hypothèse que nous allions observer une co-localisation neuronale des récepteurs opioïdes δ et CB₁ au sein de régions impliquées dans la modulation de la douleur ainsi que de l'humeur.

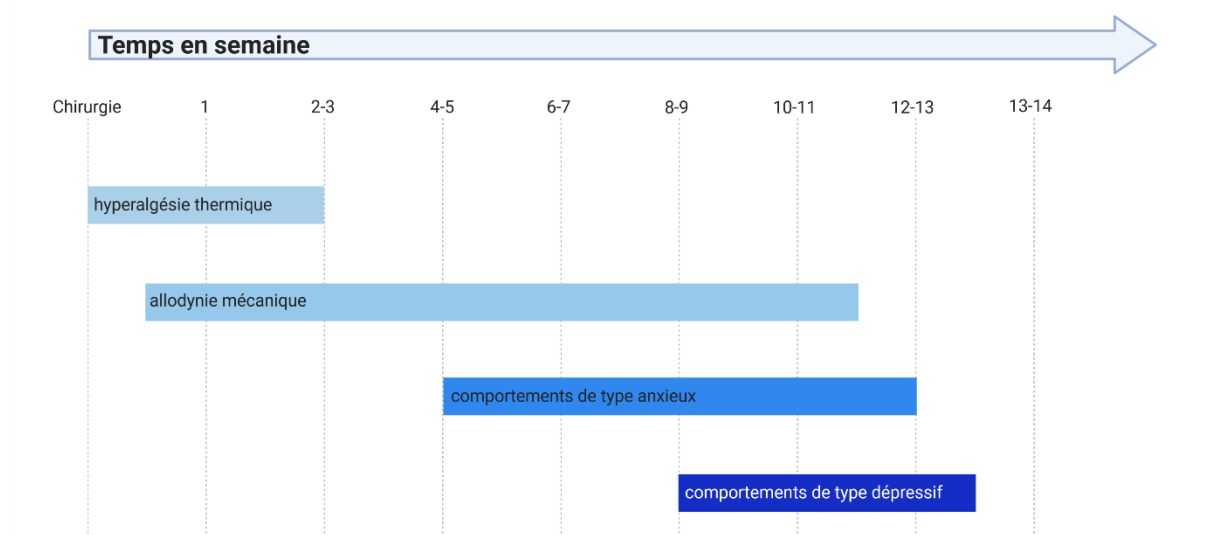
Personnellement, j'ai participé en collaboration avec Marion Gaborit au premier objectif concernant le CBD, en assistant pour la chirurgie et en effectuant ensemble tests comportementaux et traitements. Pour le second objectif, concernant la co-localisation des récepteurs, nous avons travaillé ensemble jusqu'à l'achèvement des immunohistochimies, puis j'ai analysé seule les images acquises d'encéphales. Cette analyse a été vérifiée et répliquée par Dominique Massotte.

2. Matériels et méthodes

2.1 Démarche expérimentale

Pour répondre au premier objectif, nous avons utilisé le modèle murin du *cuff*, un manchon de polyéthylène comprimant le nerf sciatique. Ce modèle, très utilisé dans ce laboratoire, entraîne une apparition rapide d'allodynie mécanique chez la souris qui persiste environ trois mois, ainsi qu'une apparition au bout de quatre et huit semaines respectivement de comportements de type anxieux et dépressif qui persistent plusieurs semaines (figure 10) (Benbouzid *et al.*, 2008 ; Yalcin *et al.*, 2011). Cela permet de tester l'effet de traitements chroniques et d'étudier les comorbidités de la douleur neuropathique.

Figure 10 : Suivi temporel d'apparition des signes cliniques causés par la pose d'un *cuff* sur le nerf sciatique de souris (Benbouzid *et al.*, 2008 ; Yalcin *et al.*, 2011).

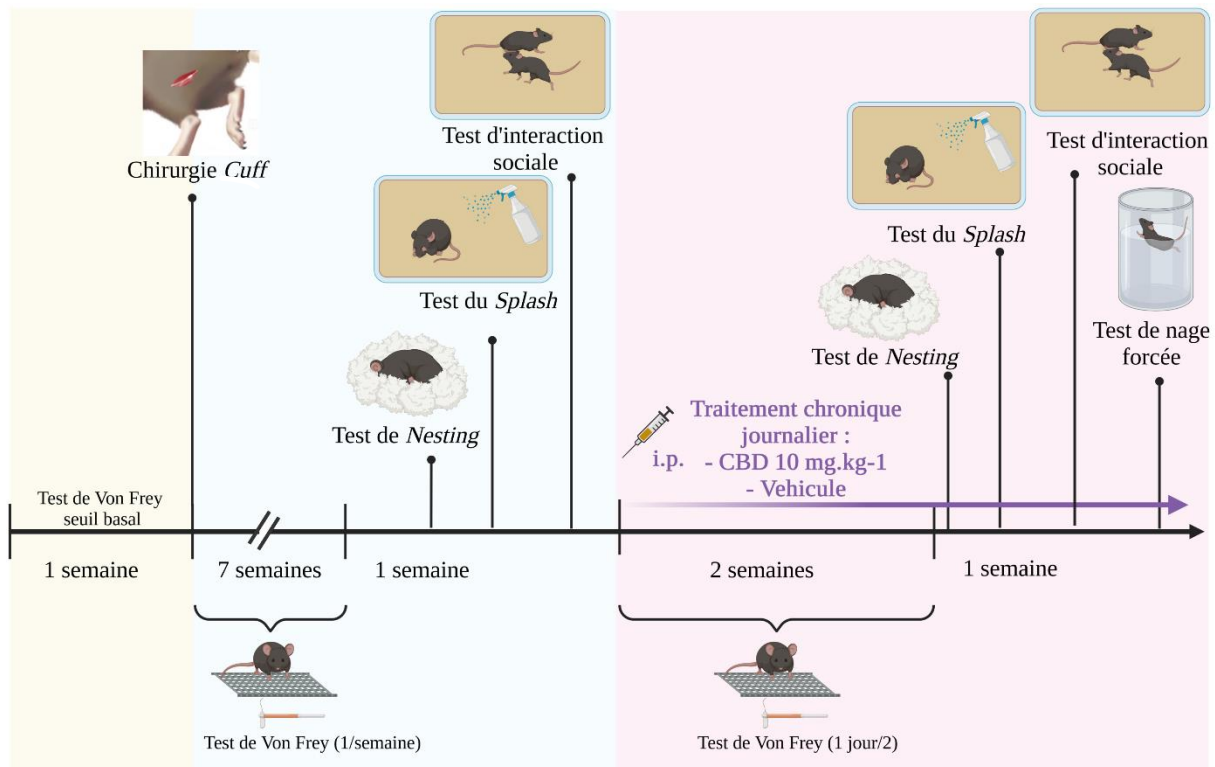


Plus précisément, cela a consisté à établir une réponse basale à un test évaluant la sensibilité des souris à un stimulus mécanique (test des filaments de Von Frey), puis de poser un *cuff* sur les pattes droites des souris (création d'un groupe lésé « *Cuff* » et d'un groupe contrôle « *Sham* »). Le choix de cette latéralisation n'a pas de justification physiologique particulière, il serait possible de le faire sur la patte gauche. Puis nous avons évalué à nouveau l'allodynie mécanique sur la patte lésée. À partir de huit semaines (date choisie pour maximiser les chances d'observer les comportements recherchés), différents tests ont été effectués (test de nidification ou *nesting* ; test d'éclaboussement ou *splash* ; test d'interaction sociale). En effet il est préférable d'associer plusieurs tests pour des résultats plus robustes. Ensuite les souris furent traitées tous les jours avec une solution de CBD ou une solution contrôle. L'évolution de l'allodynie mécanique fut été mesurée un jour sur deux pendant deux semaines.

Enfin, pendant la dernière semaine de traitement, les tests de comportements de type anxio-dépressif furent répétés, avec l'ajout du test de la nage forcée (FST). Ce test n'a pas été répété car il est trop stressant pour les souris et constitue un point limite de l'étude. Répéter les tests avant et après traitement a permis que chaque souris soit son propre contrôle. Ce protocole est présenté dans la figure 11.

Ce projet a été réalisé sur des souris mâles et femelles. Bien que ce modèle ait été développé chez les mâles et qu'il est supposé que les femelles soient plus résilientes aux comportements de type anxio-dépressif, cela n'a pas encore été démontré dans une publication pour ce modèle, justifiant notre choix d'étudier les deux sexes. De plus, les souris furent séparées en deux groupes de génotype différent : le premier étant le groupe contrôle (*wildtype*, WT) et le second étant des souris *knock-out* (KO) pour le récepteur opioïde δ .

Figure 11 : Frise temporelle du programme expérimental pour l'étude comportementale.

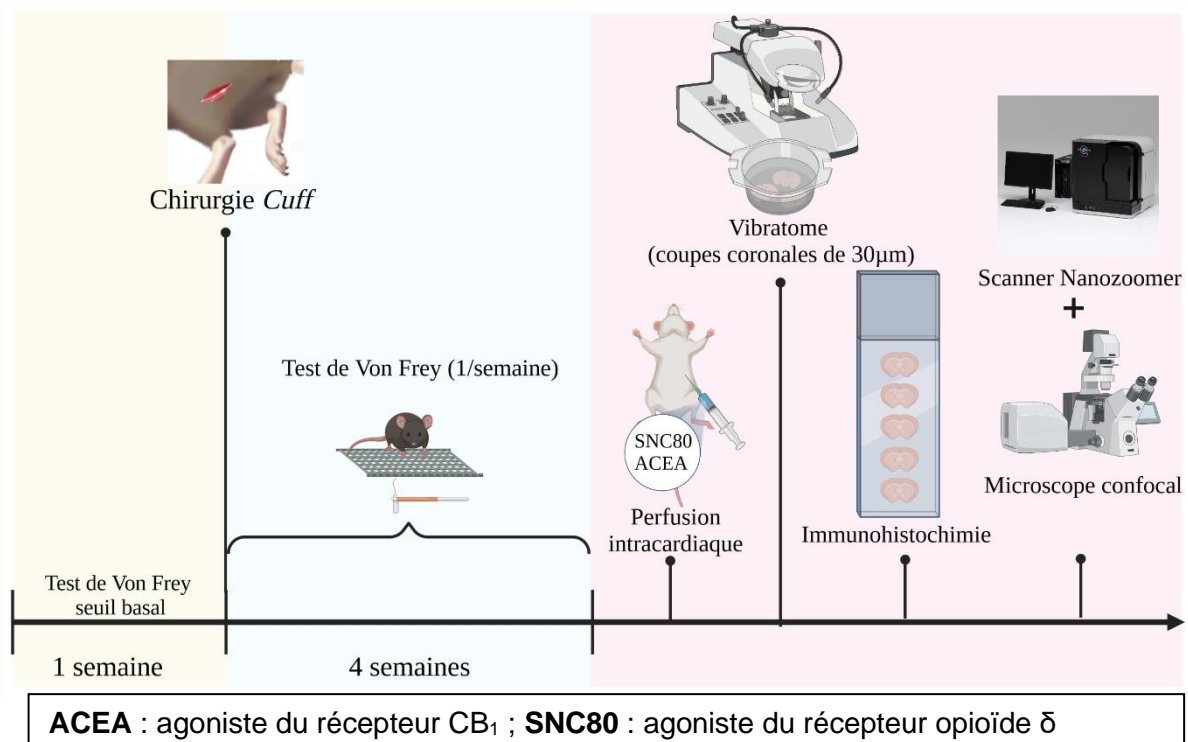


Injections i.p. : intrapéritonéales ; **CBD** : cannabidiol ; **Véhicule** : solution contrôle.

Pour répondre au second objectif, des souris mâles et femelles furent utilisées, appartenant aux groupes *Cuff* ou *Sham* pour mettre en évidence de potentielles différences de co-localisation en fonction du sexe et induites par la douleur neuropathique. Les étapes du protocole furent les suivantes : la réponse basale des souris a été testée, la chirurgie réalisée, puis la sensibilité mécanique évaluée pendant quatre semaines. Au bout de ces quatre semaines, une fois l'allodynie mécanique installée, les souris furent euthanasiées dans le but de récupérer leur encéphale.

Pour cela, nous avons injecté tout d'abord un agoniste du récepteur CB₁, l'arachidonyl-2-chloroéthylamide (ACEA) et un agoniste du récepteur opioïde δ, le SNC80. L'activation de ces deux récepteurs par leur ligand induit une internalisation de ces récepteurs vers le soma du neurone. Cette étape permet de s'assurer que les deux récepteurs sont bien co-localisés au sein d'un même neurone. Après cette injection, les souris furent perfusées avec du formaldéhyde. Ensuite, des coupes de l'encéphale furent réalisées au vibratome (des bulbes olfactifs au tronc cérébral), suivi d'une immunohistochimie. Enfin, les images furent acquises en microscopie de fluorescence et analysées. Ce protocole est résumé en figure 12.

Figure 12 : Frise temporelle du programme expérimental pour l'étude neuroanatomique.



Cette expérience a également été réalisée sur des souris mâles et femelles, la moitié étant lésée (*Cuff*) et l'autre moitié étant un groupe contrôle (*Sham*). Cela a permis de déterminer de potentielles différences d'expression et de co-localisation des récepteurs entre ces deux conditions. De plus, toutes ces souris étaient génétiquement modifiées pour exprimer le récepteur opioïde δ fusionné avec la protéine fluorescente verte intensifiée (eGFP). Ce choix a été fait car il n'existe pas d'anticorps spécifique du récepteur opioïde δ pour l'immunohistochimie.

2.2 Animaux

Les souris utilisées pour ce projet étaient des souris mâles et femelles génétiquement modifiées :

- Des souris de génotype sauvage pour les récepteurs opioïde δ (δ -WT) et des souris de génotype *knock-out* (δ -KO) de fonds génétique C57Bl/6J ou exprimant le récepteur opioïde δ en fusion avec la protéine fluorescente verte intensifiée (δ -eGFP *knock-in*) ou déficiente pour cette construction (δ -eGFP *knock-out*) de fonds génétique C57Bl/6J : 129svPas (50 : 50 %).
 - Des souris ayant un fonds génétique C57Bl/6J : 129svPas (50 : 50 %) de génotype δ -eGFP *knock-in*, qui expriment le récepteur opioïde δ en fusion avec la protéine fluorescente verte intensifiée (eGFP).
- } Étude comportementale
- } Étude neuroanatomique

Les souris débutaient le protocole lorsqu'elles atteignaient un âge entre six et huit semaines. Les effectifs ont été gérés de manière à ce que chaque condition expérimentale soit à terme représentée par un effectif minimal de six souris pour la partie comportementale et de quatre souris pour la partie neuroanatomique. Le protocole expérimental de comportement étant long (12 semaines), les animaux étaient répartis dans le temps en vagues d'environ 30 animaux selon les naissances et répartis entre les différentes conditions (le détail du programme expérimental en fonction des groupes est présenté en Annexe 2).

Les souris étaient hébergées dans une animalerie avec un cycle lumineux jour/nuit de 12 heures/12 heures, une température ambiante de 23 °C (+/- 2 °C) et une humidité de 45 % (+/- 5 %). À leur arrivée à l'animalerie, les souris furent habituées à la manipulation pendant 2 séances. Les manipulations furent réalisées en accord avec le protocole expérimental approuvé par le comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale de Strasbourg (CREMEAS) et ont reçu l'agrément ministériel APAFIS#23672-2020011418165945 v3.

2.3 Chirurgie de pose du manchon

Les souris ont été anesthésiées avec un mélange de kétamine (Zolétil®50 ; 50 mg/kg) / xylazine (Rompun® ; 20 mg/kg) dans du NaCl 0,9 %, administré en intrapéritonéal. L'absence de réflexe de retrait de la patte fut vérifiée par pincement. Une fois en condition d'asepsie, la patte postérieure droite fut rasée et une incision cutanée pratiquée au niveau de la cuisse ; à l'aide de deux cure-dents préalablement stérilisés (autoclave) le tronc commun du nerf sciatique droit fut dégagé. Un manchon de polyéthylène (longueur 2 mm, diamètre interne 0,38 mm et diamètre externe 1,09 mm) fut posé unilatéralement autour de la branche principale du nerf sciatique (figure 13). La plaie fut ensuite suturée. Les animaux ainsi opérés constituent le groupe « *Cuff* ». Les autres animaux ayant subi la même procédure chirurgicale mais sans pose du manchon constituent le groupe contrôle « *Sham* ».

Les souris furent ensuite placées sous lampe chauffante pendant la période de réveil. Un suivi post-opératoire fut mis en place où furent vérifiés quotidiennement pendant une semaine le poids des souris (point limite : une perte de poids supérieure à 20 % du poids original) ainsi que la cicatrisation de la plaie (point limite : une plaie ouverte et infectée) et l'état général des souris (point limite : abattement, poil piqué, marque de morsures). De plus, le poids et l'état général furent suivis tout le long de la procédure. Cette procédure a été réalisée par les ingénieurs de la plateforme comportement, Mélanie Kremer et Quentin Leboulleux, avec mon aide et celle de Marion Gaborit.

Figure 13 : Photographies des étapes principales de la chirurgie de pose du *cuff* (Benbouzid *et al.*, 2008).



2.4 Tests comportementaux

Les tests comportementaux permettant l'évaluation de l'allodynie mécanique et les comportements de type anxio-dépressif sont nombreux. Nous avons choisi les tests en fonction des critères suivants : la maîtrise technique du test par l'expérimentateur, ainsi que

l'aspect peu invasif du test pour les souris car nous avons besoin de tests répétables dans la durée. Des tests trop invasifs et stressants auraient potentiellement compromis les résultats.

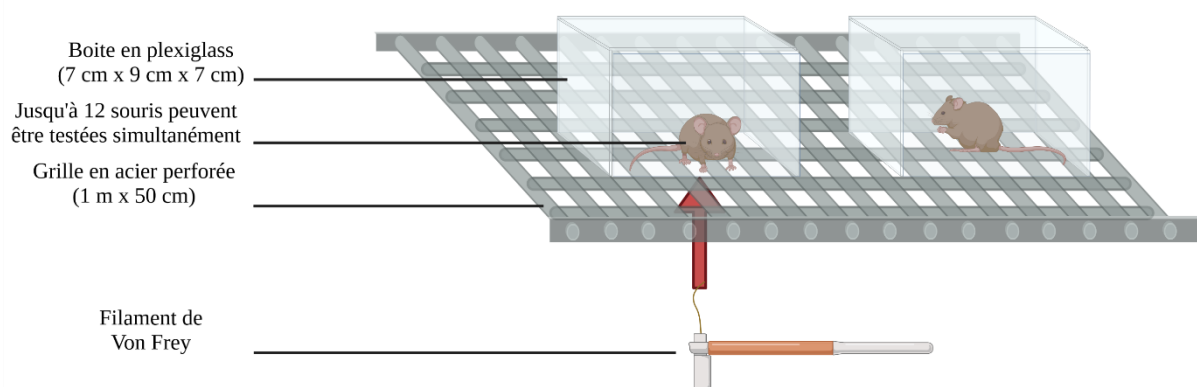
2.4.a Évaluation comportementale de la nociception mécanique

Test des filaments de Von Frey

Le test de filaments de Von Frey a été réalisé à partir de la méthode décrite dans l'article de Yalcin *et al.* (2014) : les filaments de Von Frey sont des fils en plastique de diamètre calibré (indiqué en grammes) de 5 cm de long, fixés à des applicateurs. Chez la souris, les tailles de filaments utilisées vont de 0,16 g à 10 g. Dans le cadre de ce protocole nous avons utilisé les tailles 0,4 g ; 0,6 g ; 1 g ; 1,4 g ; 2 g ; 4 g ; 6 g et 8 g.

Les souris furent tout d'abord habituées à la salle d'expérimentation pendant une heure. Elles furent ensuite placées sur l'appareil décrit en figure 14 et laissées 15 minutes pour une phase d'habituation. Ensuite, en commençant par le filament avec le diamètre le plus faible, ce dernier fut appliqué sur la surface plantaire de la patte arrière non lésée (gauche) jusqu'à ce que le filament se courbe. Cette action fut répétée trois à cinq fois puis recommencée avec la patte lésée (droite). Une fois les deux pattes testées, l'animal suivant fut testé en alternant aléatoirement la patte testée en premier. La réponse attendue est un retrait de la patte, un tressaillement ou un léchage de la patte. La réponse est considérée comme positive si on observe au moins trois réponses attendues sur cinq applications.

Figure 14 : Appareil mis en place pour effectuer le test des filaments de Von Frey (Yalcin *et al.*, 2014).



Toutes les souris furent testées avec une taille de filament, puis avec un filament de la taille supérieure, jusqu'à ce que toutes les souris eussent répondu positivement à deux filaments consécutifs. La valeur du filament avec le plus petit diamètre entre les deux est

considérée comme le seuil de retrait de la patte, soit le seuil de sensibilité mécanique. Un abaissement du seuil de la patte lésée par rapport à la patte non lésée est un signe d'allodynie mécanique. Sachant que la lecture de la réponse des souris peut être difficile pour un œil non entraîné, dans le cadre de cette thèse les tests de Von Frey sont réalisés par les ingénieurs de la plateforme comportement, Mélanie Kremer et Quentin Leboulleux. Cela nous a en outre permis d'effectuer ces tests en aveugle car ils ne connaissaient pas les conditions des groupes des souris testées.

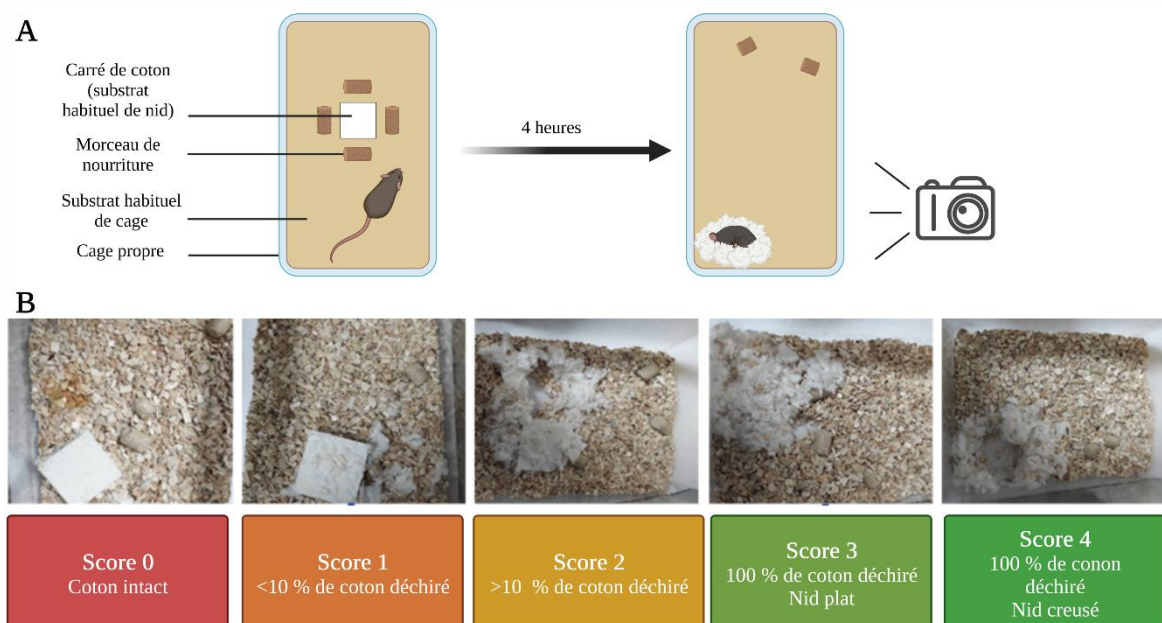
2.4.b Évaluation comportementale des états de type anxio-dépressif

Test de nidification (*nesting*)

La construction d'un nid est un comportement inné tant chez les souris mâles que chez les souris femelles. Le test du *nesting* est souvent utilisé pour évaluer les états de stress et de mal-être chez la souris (Jirkof, 2014). C'est un test facile à mettre en place, très peu stressant et non invasif pour la souris.

Les souris furent placées dans des cages individuelles pendant une heure pour l'habituation. Puis un carré de coton fut placé au centre de la cage, entouré de quatre morceaux de nourriture. Quatre heures plus tard, les souris furent retirées de la cage et une photo de l'intérieur de la cage fut prise (figure 15.A). La qualité de la fabrication du nid fut évaluée sur les photographies en aveugle par trois observateurs différents, avec l'attribution d'un score allant de zéro à quatre (figure 15.B). Une diminution de la qualité de fabrication du nid est un révélateur de mal-être (Deacon, 2006).

Figure 15 : Mise en place du test de *nesting* (A) et méthode d'évaluation de la qualité de fabrication du nid (B) (Deacon, 2006).

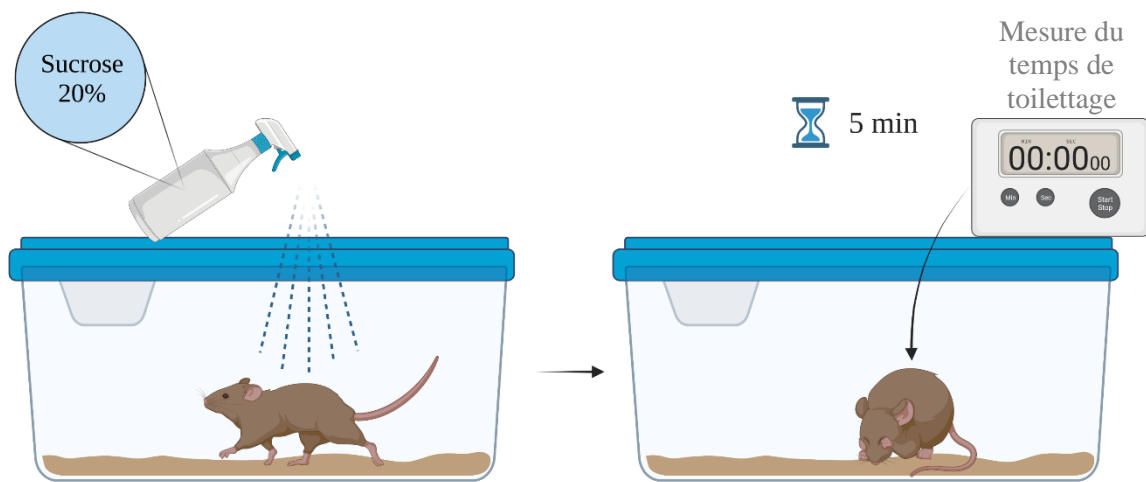


Test d'éclaboussement (*splash*)

Le toilettage est également un comportement inné chez les souris. C'est un comportement orienté vers soi, et une diminution du temps passé à se toiletter suggère un comportement de type anxio-dépressif (Kremer *et al.*, 2021).

Les souris furent placées dans la salle de test une heure avant pour l'habituation. Puis une souris fut placée dans une cage individuelle vide et une solution de 20 % de saccharose diluée dans de l'eau distillée pulvérisée sur son pelage. Le temps total passé à se toiletter la tête et le corps furent chronométrés pendant cinq minutes puis la souris fut replacée dans sa cage habituelle (figure 16). La cage de test fut changée entre deux souris.

Figure 16 : Méthode de réalisation du test du *splash* (Kremer *et al.*, 2021).



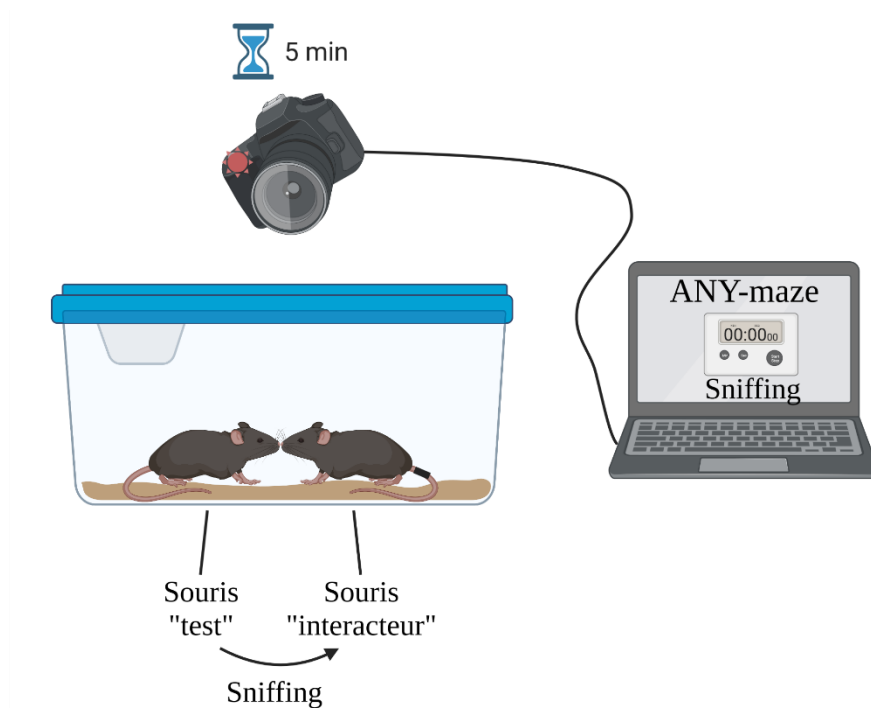
Test d'interaction sociale

L'interaction sociale est également un comportement murin inné et spontané. Une souris présentant des comportements de type anxio-dépressif aura tendance à moins interagir avec d'autres individus (Kremer *et al.*, 2021).

Pour mettre cela en évidence, l'interaction entre nos souris fut filmée (appelées souris « test ») et des souris « naïves » auxquelles elles n'avaient jamais été exposées. Ces dernières furent appelées « interacteurs ». Pour différencier les deux souris, le jour précédent la manipulation, la queue des « interacteurs » fut marquée au feutre noir par des traits. Toutes les souris furent placées dans la salle de test une heure avant pour l'habituation. Puis, comme décrit en figure 17, une souris « test » fut placée dans une cage propre simultanément avec un « interacteur » du même sexe et du même poids (pour éviter des comportements agressifs ou des relations de dominance). Immédiatement, une caméra fut déclenchée pour filmer leurs interactions pendant cinq minutes. Cette caméra fut connectée au logiciel ANY-maze

(Stoelting, UK) qui permet à un observateur de mesurer en temps réel avec un clavier éthologique certains comportements d'intérêt : ici, le temps passé par la souris « test » à renifler l'« interacteur » (ou *sniffing*). Ces vidéos étant conservées, d'autres comportements peuvent potentiellement être analysés ultérieurement. Après les cinq minutes, les souris furent remises dans leur cage d'origine et une nouvelle cage fut utilisée pour le couple de souris suivant. Le temps d'interaction pouvait être raccourci si une des deux souris exprimait des comportements d'agression envers l'autre (point limite). Enfin, comme nous n'avons pas assez de souris « interacteur » par rapport au nombre de souris « test », les « interacteurs » interagirent avec deux (voire trois exceptionnellement) souris « test ». Nous avons espacé au maximum dans le temps ces interactions (au moins 30 minutes avant que l'« interacteur » ne passe une seconde fois). L'association de deux souris « test » et « interacteur » s'est faite au hasard parmi des groupes de même sexe et de même poids. Lors de la répétition de la manipulation après le traitement au CBD, nous nous sommes assurées que les souris rencontrent un « interacteur » différent de la première fois.

Figure 17 : Méthode de réalisation du test d'interaction sociale à l'aide du logiciel éthologique ANY-maze (Faeste *et al.*, 2019).



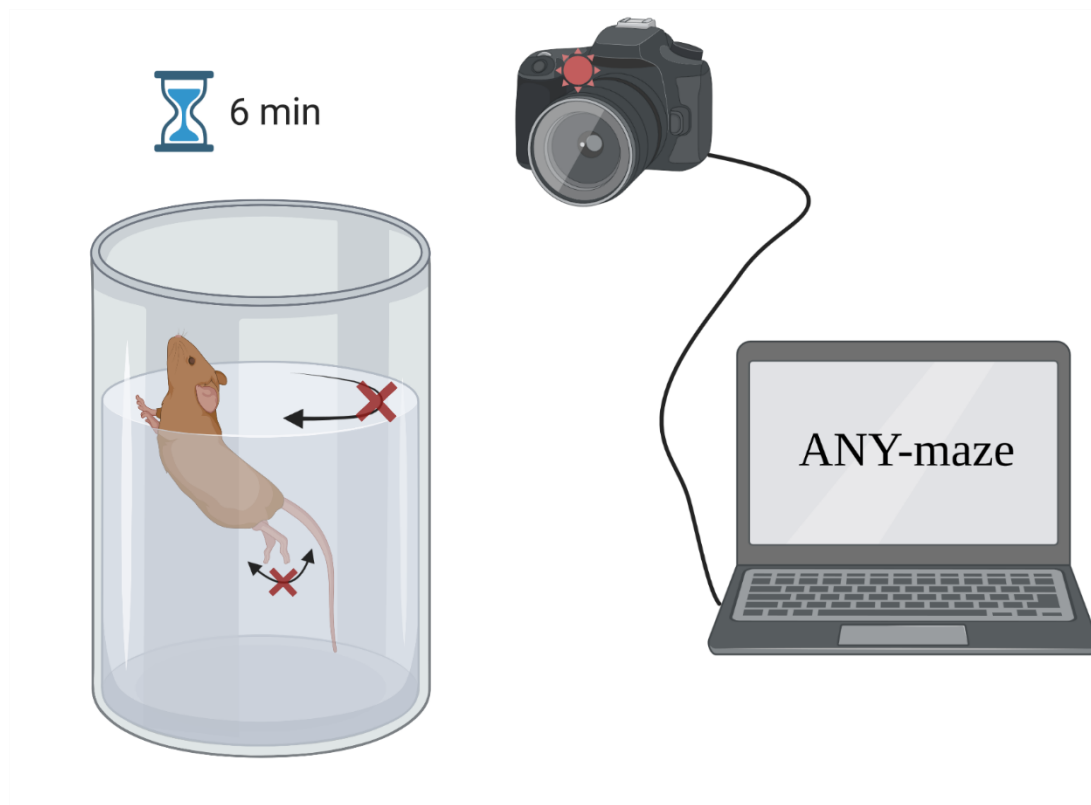
Test de la nage forcée (Forced Swim Test – FST)

Le FST est l'un des tests les plus utilisés pour évaluer l'effet antidépresseur d'un médicament. Il mesure la résilience d'un rongeur face à un stress inévitable. Face au stress d'être plongé dans de l'eau et de ne pouvoir sortir, la souris va d'abord tenter de s'échapper en nageant mais va peu à peu s'immobiliser. Cette immobilisation est interprétée comme un comportement de désespoir, de résignation face au stress. Ainsi, une augmentation de ce

temps passé immobile est révélateur de comportements de type dépressif (Yankelevitch-Yahav *et al.*, 2015 ; Kremer *et al.*, 2021). Ce test est facile à mettre en place et à analyser mais le stress provoqué chez la souris est très important. C'est pourquoi c'est le dernier test à avoir été effectué dans notre étude avant l'euthanasie et il n'a pas été répété.

Un b cher d'une contenance de deux litres fut rempli à 75 % d'eau à une température comprise entre 24 et 25  C. La souris fut plac e dans l'eau, et immédiatement film e par une caméra connect e au logiciel ANY-maze (Stoelting, UK) permettant de mesurer en temps réel avec le clavier éthologique le temps total passé immobile dans l'eau sur une durée totale de six minutes (figure 18). Le critère d'immobilité fut défini dans notre étude comme « flotter sans mouvements sauf ceux nécessaires pour garder le museau hors de l'eau » (Yankelevitch-Yahav *et al.*, 2015). La souris fut sortie du b cher, s ch e et replac e dans sa cage d'origine à proximité d'une lampe chauffante. L'eau du b cher fut chang e entre deux souris. Les souris se noyant (museau sous l'eau pendant cinq secondes) furent retir es prématurément du b cher et le test fut terminé (point limite).

Figure 18 : Méthode de réalisation du test de la nage forcée (FST)   l'aide du logiciel éthologique ANY-maze (Yankelevitch-Yahav *et al.*, 2015).



2.5 Traitement chronique au CBD

Neuf semaines après la chirurgie et pendant 21 jours, les souris ont reçu le matin une injection intrapéritonéale (i.p.) quotidienne (10 mg/kg soit un volume d'injection de 33 μ l/10g) de CBD ou de solution contrôle. Le CBD en poudre a été dissout dans une solution de NaCl 0,9 % et de 2 % de Tween 80. La solution contrôle ou véhicule est composée uniquement de NaCl 0,9 % et de 2 % de Tween 80. La latéralisation du site d'injection a été alternée tous les jours. Les tests comportementaux ont été réalisés entre 45 minutes et une heure après les injections pour respecter la cinétique d'action du CBD.

2.6 Analyse statistique

Les données ont été analysées avec le logiciel GraphPad Prism v 9.1.0 (GraphPad, San Diego, CA). Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes et d'erreurs types à la moyenne (SEM). La normalité des résultats a été vérifiée avec le test Shapiro-Wilk et les données du test des filaments de Von Frey ont été analysées par une analyse ANOVA à deux facteurs (2f) avec mesures répétées suivi d'un test *post-hoc* de Tukey ou de Sidak. Pour les données des tests d'évaluation des comportements de type anxio-dépressif, les effectifs étaient encore très faibles mais nous avons tout de même essayé de réaliser des tests t de Student pour données non appariées et ANOVA à 2f avec mesures répétées pour les tests de *splash* et d'interaction sociale ; des tests exacts de Fisher ou des tests de McNemar pour données appariées pour le test du *nesting* et enfin une ANOVA à un facteur (1f) sans mesures répétées pour le FST ; les ANOVAs ont été suivies de tests *post-hoc* de Tukey ou de Sidak selon ce qui était recommandé dans le contexte.

2.7 Étude neuroanatomique

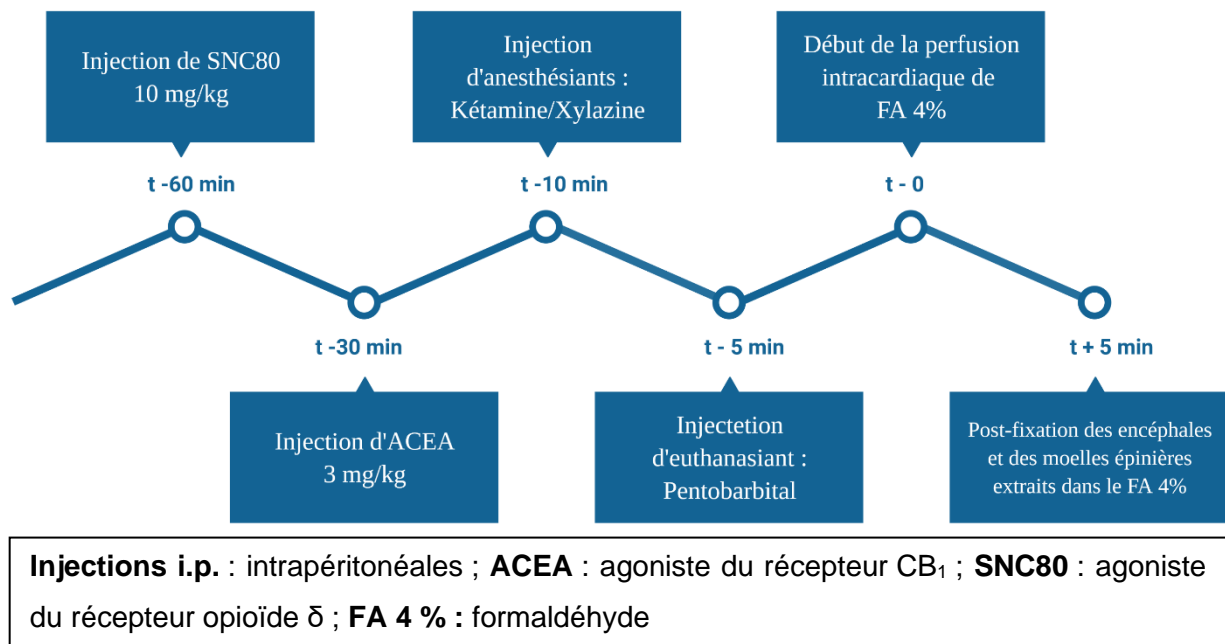
L'intérêt de cette étude est non seulement de mieux comprendre l'interaction entre CB₁ et δ et leur potentielle hétéromérisation mais aussi d'obtenir des données permettant de cartographier l'expression neuronale du récepteur CB₁ dans l'encéphale par immunohistochimie. Cette cartographie existe déjà pour le récepteur opioïde δ (ainsi que le μ) (Erbs *et al.*, 2015).

Cette manipulation a été effectuée sur des souris de fonds génétique C57Bl/6J : 129svPas (50 : 50 %), *knock-in* δ -eGFP. Un groupe de condition *Cuff* et un groupe de condition *Sham* comportaient chacun huit souris mâles (n = 4) et femelles (n = 4). Au bout de quatre semaines post-chirurgie, les souris furent isolées de l'animalerie pour l'euthanasie et la perfusion.

2.7.a Perfusion et prélèvement des encéphales

Avant de pouvoir commencer la perfusion intracardiaque, les souris ont reçu une injection i.p. de SNC80 (agoniste du récepteur δ) à 10 mg/kg et d'ACEA (agoniste du récepteur CB₁) à 3 mg/kg respectivement une heure et 30 minutes avant. Elles ont ensuite été injectées en i.p. avec un mélange de kétamine (Zolétil®50 ; 50 mg/kg) /xylazine (Rompun® ; 20 mg/kg) dans du NaCl 0,9 %, puis avec du pentobarbital (Euthasol® ; 18 mg/kg) (Centravet, France). Après vérification de l'absence totale de reflexes en pinçant les pattes, une perfusion intracardiaque a été réalisée pendant cinq minutes à 20 ml/min avec une solution de formaldéhyde à 4 % dans du tampon phosphate salin (PBS) (0,1 M ; pH 7,4) à 4 °C. Les encéphales et les moelles épinières ont été extraits et post-fixés à 4 °C dans du formaldéhyde à 4 % pendant 24 heures. Le programme d'injection et de perfusion est présenté en figure 19.

Figure 19 : Frise temporelle de la préparation à la perfusion des souris dans le but d'extraire leur encéphale et moelle épinière.

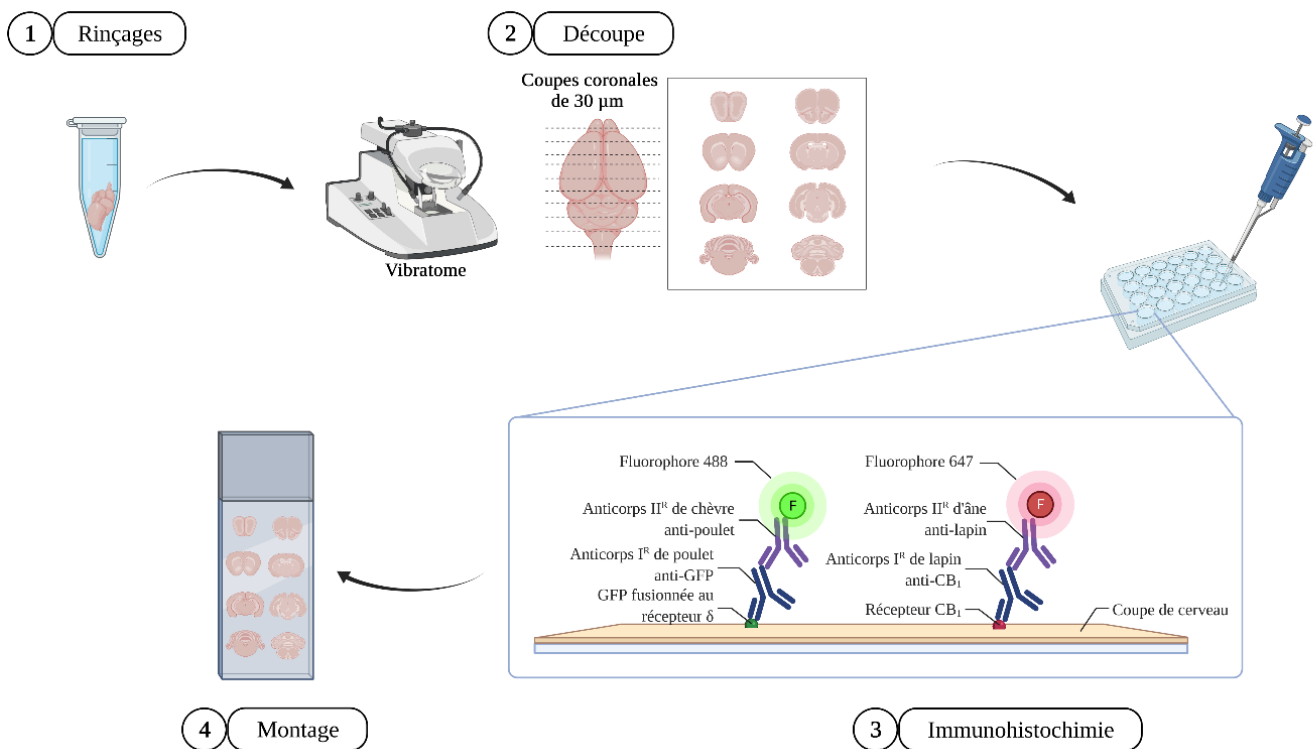


2.7.b Préparation des coupes d'encéphales : coupes et immunohistochimie

Les encéphales ont ensuite été rincés dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) puis inclus dans de l'agar (2 %). Des coupes coronales de 30 μ m d'épaisseur (taille optimale pour l'infiltration des anticorps) ont ensuite été réalisées au vibratome (Leica, Wetzlar, Allemagne) et récupérées dans du PBS dans des boîtes de 24 puits. Les coupes flottantes ont été transférées pendant une heure dans du milieu de blocage composé de PBST (PBS ; Tween 20, 0,2 %) et de sérum de chèvre (1,5 %) et d'âne (1,5 %), sous agitation à température ambiante. Les coupes ont été incubées dans la solution de blocage en présence d'un anticorps primaire de lapin anti- CB₁ (1 : 1000 ; ClonTech-10006590) et d'un anticorps primaire de poulet anti-GFP

(1 : 1000 ; AVES GFP-1020) pendant une nuit à 4 °C. Trois rinçages de 10 minutes ont ensuite été réalisés dans du PBST puis les coupes ont été incubées dans du PBST en présence d'un anticorps secondaire de chèvre anti-poulet couplé au fluorophore vert AlexaFluor 488 (1 : 2000 ; Molecular Probes – A11039) et d'un anticorps secondaire d'âne anti-lapin couplé au fluorophore rouge lointain AlexaFluor 647 (1 : 500 ; Molecular Probes – A31576) pendant deux heures à température ambiante, sous agitation et à l'abri de la lumière. Elles ont été rincées trois fois 10 minutes puis ont été transférées dans du PBS et montées entre lame et lamelle en milieu MOWIOL® 4-88 (475904, Merck, France) en ajoutant une solution de 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI ; 0,5 µg/ml ; Roche Diagnostique, Mannheim, Allemagne) pour la visualisation des noyaux. Cette démarche est représentée dans la figure 20.

Figure 20 : Schéma représentant la préparation des coupes d'encéphales et l'immunohistochimie réalisée.



GFP : Protéine fluorescente verte ; **I^R** : primaire ; **II^R** : secondaire

2.7.c Acquisition et analyse des images

L'acquisition des images a été effectuée à un grossissement 40X à l'aide du scanner de lames NanoZoomer S60 et du module de fluorescence L11600-21 (Hamamatsu Photonics, Japan) ou au microscope confocal Leica SP5 équipé d'un objectif à immersion 63X (N.A. 1.4). Les images obtenues à l'aide du scanner de lames ont été analysées avec le logiciel NDP.view 2 Pro (Hamamatsu Photonics, Japan). Chaque coupe a été analysée en identifiant les somas des neurones exprimant à la fois les récepteurs opioïdes δ (colorés en vert) et les récepteurs CB₁ (colorés en blanc). Les différentes régions de l'encéphale ont été identifiées à l'aide de l'atlas de Paxinos et Franklin (2012). Une région spécifique a été choisie pour compter le pourcentage de neurones dans lesquels récepteurs opioïdes δ et CB₁ étaient co-localisés : le bulbe rachidien rostral ventromédial (RVM). Il a été défini à partir de l'atlas de l'encéphale de souris (Bregma -5,5 à -6,5 ; incluant le noyau raphé postérieur avec les noyaux *pallidus*, *magnus*, *obscurus* et *interpositus* ; le noyau parapyramidal, la partie alpha du noyau réticulaire gigantocellulaire et le noyau paragigantocellulaire latéral) (Franklin et Paxinos, 2012 ; Pierre *et al.*, 2019). Cette région a été choisie pour son rôle dans le contrôle descendant de la douleur et son intérêt dans le cadre de la douleur neuropathique.

2.8 Création des figures

Toutes les figures ont été réalisées à l'aide du logiciel BioRender (BioRender, 2017), à part les figures 4, 8, 13 et les figures 21 à 55.

3. Résultats

Cette thèse s'étant inscrite dans un projet de plus grande envergure, les résultats présentés dans les parties suivantes sont partiels et préliminaires. Toutes les conditions expérimentales n'étant pas encore à ce jour représentées par des effectifs suffisants pour une interprétation et analyse statistique solide, nous avons fait le choix de présenter ici les premiers résultats que nous avons, avec des groupes d'au moins six animaux. Ces résultats et leur analyse seront à compléter et confirmer par les travaux encore en cours.

3.1 Étude comportementale

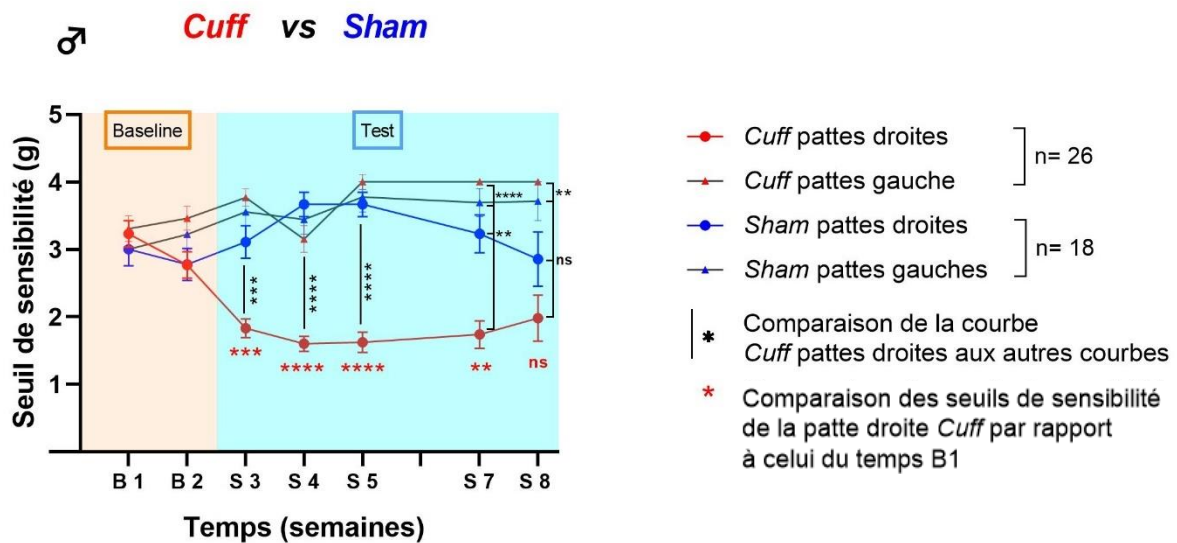
3.1.a Résultats du test des filaments de Von Frey

Le seuil de sensibilité mécanique des souris a été mesuré en aveugle par le test des filaments de Von Frey. Son évolution a été mesurée de façon hebdomadaire, séparée en une première phase pré-chirurgie nommée *baseline*, une phase post-chirurgie nommée *test* et une dernière phase nommée *traitement* où les souris ont reçu soit du CBD soit une solution contrôle dite véhicule (Veh).

3.1.a.1 Effet de la chirurgie chez les mâles

La figure 21 représente les résultats des souris mâles ayant subi la chirurgie de pose du *cuff* (courbe rouge) ou la chirurgie *sham* (courbe bleue), avant qu'ils soient traités au CBD. Chez les souris *Sham*, pour la patte gauche (non lésée) comme la patte droite (lésée), nous n'avons pas vu de différence significative dans l'évolution du seuil de sensibilité de chaque patte (seuils variant entre 3 et 4 g) ni de différence de seuil en comparant les pattes entre elles. Chez les souris *Cuff*, le seuil de sensibilité de la patte droite était significativement inférieur à celui de la patte gauche ainsi que ceux des pattes des souris *Sham*. De la troisième à la septième semaine (S3 à S7, seuil variant entre 1,4 et 2 g), le seuil de la patte droite était significativement inférieur à celui de la première semaine (*baseline* 1 ou B1, seuil d'environ 3 g) (ANOVA 2f ; interaction pattes-temps, $F_{(18, 414)} = 7,023$ et $p < 0,0001$; effet patte $F_{(3, 84)} = 77,28$ et $p < 0,0001$). Ces résultats montrent qu'après la chirurgie, une allodynie mécanique est apparue au niveau de la patte droite lésée des souris *Cuff*, mais pas sur la patte droite des souris *Sham* ni sur les pattes gauches des deux groupes.

Figure 21 : Effet de la chirurgie sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures de souris mâles.

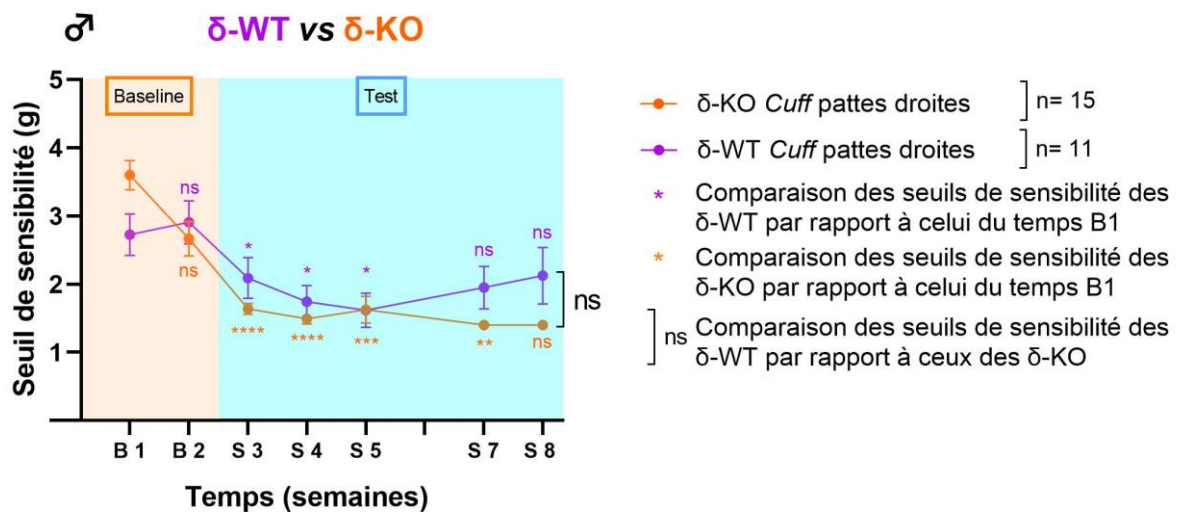


Représentation des résultats du test des filaments Von Frey mesurant l'évolution de la force (en g) du stimulus nécessaire pour induire un retrait de la patte postérieure (patte droite = patte lésée, patte gauche = patte non lésée) au cours du protocole. La moyenne \pm l'erreur type à la moyenne (SEM) est représentée. Les données sont analysées avec un test ANOVA à deux facteurs (mesures répétées), et un test *post-hoc* de Tukey.

3.1.a.2 Effet du génotype chez les mâles

La figure 22 représente les résultats des souris mâles exprimant soit un génotype δ -KO (courbe orange) soit un génotype δ -WT (courbe violette) après chirurgie et avant qu'ils ne soient traités au CBD. Les seuils nociceptifs des pattes gauches n'étaient pas significativement différents (figure 21) nous avons donc fait le choix de ne représenter que les pattes droites dans les figures suivantes. Nous avons pu observer que pour les deux génotypes, après la chirurgie, il y avait une diminution significative du seuil de sensibilité mécanique par rapport à la *baseline* (seuil de 3 g au temps B1 et variant entre 1.4 et 2 g de S3 à S5 pour les δ -WT et jusqu'à S7 pour les δ -KO). De plus, les seuils des souris δ -KO avant et après chirurgie n'étaient pas significativement différents de ceux des souris δ -WT (ANOVA 2f ; interaction génotype-temps, $F_{(6, 115)} = 2,233$ et $p = 0,0448$; effet génotype $F_{(1, 24)} = 1,241$ et $p = 0,2764$; effet temps $F_{(4, 75)} = 15,10$ et $p < 0,0001$). Ces résultats montrent qu'après la chirurgie, une allodynie mécanique est apparue au niveau de la patte droite lésée des souris *Cuff* sans effet observable du génotype présent (δ -KO ou δ -WT).

Figure 22 : Effet du génotype sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures droites de souris mâles.

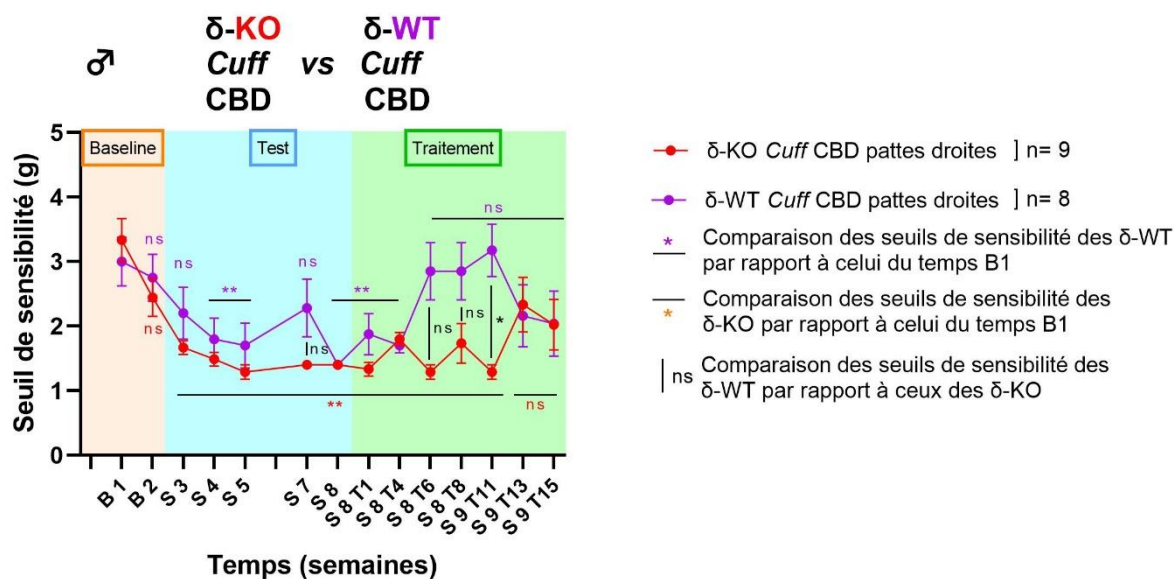


Représentation des résultats du test des filaments Von Frey mesurant l'évolution de la force (en g) du stimulus nécessaire pour induire un retrait de la patte postérieure (patte droite = patte lésée, patte gauche = patte non lésée) au cours du protocole. La moyenne \pm l'erreur type à la moyenne (SEM) est représentée. Les données sont analysées avec un test ANOVA à deux facteurs (mesures répétées), et un test *post-hoc* de Tukey.

3.1.a.3 Effet du CBD chez les mâles

La figure 23 représente les résultats des souris mâles des groupes *Cuff* ayant reçu du CBD et exprimant soit un génotype δ -KO (courbe rouge) soit un génotype δ -WT (courbe violette). On peut observer que le seuil de sensibilité des pattes droite de souris *Cuff* δ -WT a diminué de manière significative pendant la phase *test* (valeur comprise entre 1,5 et 2 g), montrant la mise en place de l'allodynie mécanique. Lors de la phase *traitement*, ce seuil a augmenté à partir du sixième jour de traitement (contrairement aux souris δ -KO où l'augmentation apparaît à T13) avec une valeur d'environ 3 g. Le seuil était significativement plus élevé que celui de la patte lésée des souris δ -KO (ANOVA 2f ; interaction génotype-temps, $F_{(5, 36)} = 3,6$ et $p = 0,0085$; effet génotype $F_{(1, 11)} = 35,0$ et $p < 0,0001$; effet temps $F_{(3, 29)} = 3,2$ et $p = 0,03$). Ces résultats suggèrent que le récepteur opioïde δ était nécessaire au soulagement de l'allodynie mécanique par le CBD. Mais cela reste à confirmer notamment avec un groupe contrôle δ -WT recevant la solution contrôle.

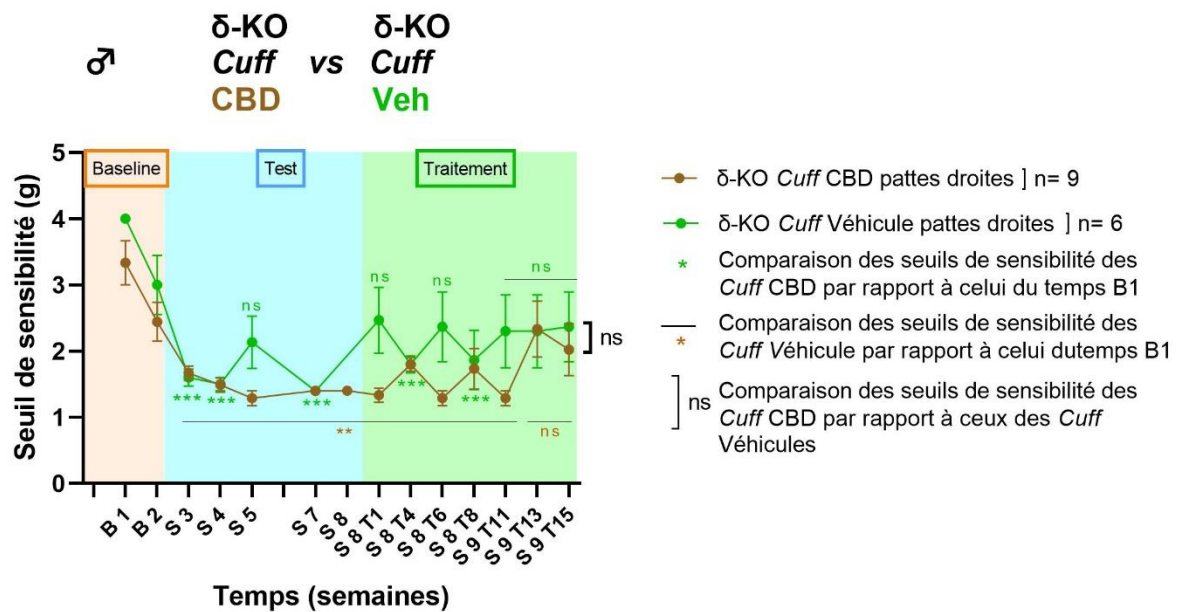
Figure 23 : Effet du traitement au CBD sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures droites de souris mâles *Cuff* de génotype δ -WT ou δ -KO.



Représentation des résultats du test des filaments Von Frey mesurant l'évolution de la force (en g) du stimulus nécessaire pour induire un retrait de la patte postérieure (patte droite = patte lésée, patte gauche = patte non lésée) au cours du protocole. La moyenne \pm l'erreur type à la moyenne (SEM) est représentée. Les données ont été analysées avec un test ANOVA à deux facteurs (mesures répétées), et un test *post-hoc* de Tukey. (CBD : cannabidiol)

La figure 24 représente les résultats des souris mâles des groupes *Cuff* exprimant un génotype δ -KO et ayant reçu soit du CBD (courbe marron) soit la solution contrôle (courbe verte). Nous avons pu observer que pendant la phase *test*, le seuil de sensibilité de la patte lésée des souris δ -KO *Cuff* traitées avec du CBD était similaire à celui de la patte lésée des souris traitées avec une solution contrôle (valeur comprise entre 1,5 et 2 g). Pendant la phase *traitement* avec la solution contrôle, ce seuil a augmenté (valeur comprise entre 1,5 et 2,5 g) de manière non significative (ANOVA 2f ; interaction traitement-temps, $F_{(33, 182)} = 3,7$ et $p < 0,0001$; effet traitement $F_{(3, 24)} = 90,3$ et $p < 0,0001$; effet temps $F_{(11, 88)} = 5,7$ et $p < 0,0001$). Ces résultats montrent que dans ces groupes-là, une allodynie mécanique s'était mise en place après la chirurgie mais nous n'avons pas pu observer de différence d'effet du traitement CBD face au Véhicule sur le seuil de sensibilité des souris δ -KO *Cuff*.

Figure 24 : Effet du traitement sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures droites de souris mâles *Cuff* δ -KO.

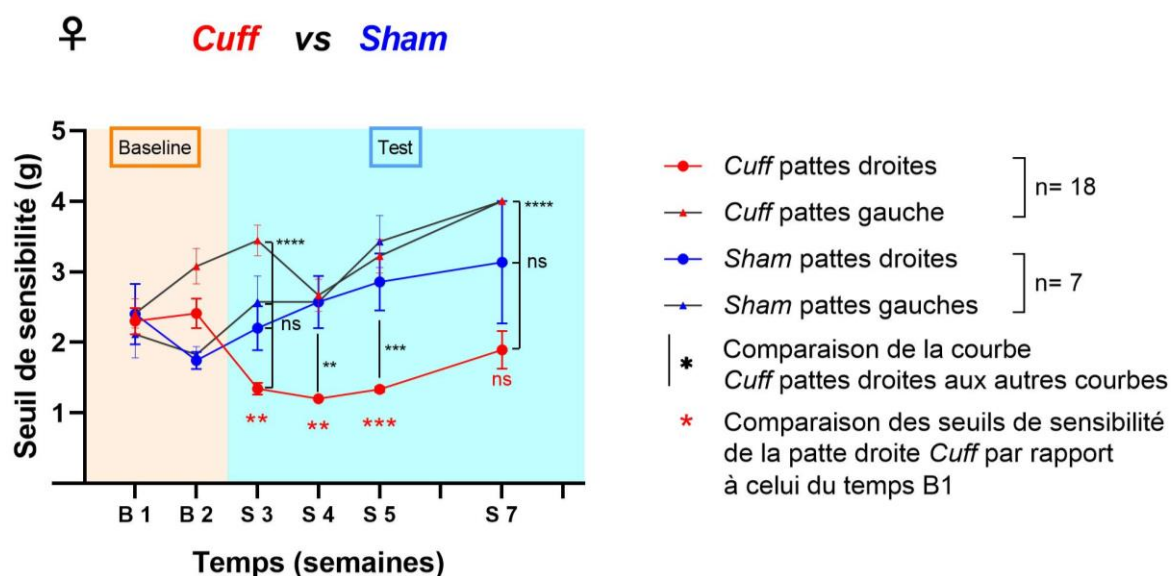


Représentation des résultats du test des filaments Von Frey mesurant l'évolution de la force (en g) du stimulus nécessaire pour induire un retrait de la patte postérieure (patte droite = patte lésée, patte gauche = patte non lésée) au cours du protocole. La moyenne \pm l'erreur type à la moyenne (SEM) est représentée. Les données sont analysées avec un test ANOVA à deux facteurs (mesures répétées), et un test *post-hoc* de Tukey. (CBD : cannabidiol, Veh : solution véhicule)

3.1.a.4 Effet de la chirurgie chez les femelles

La figure 25 représente les résultats des souris femelles ayant subi la chirurgie de pose du *cuff* (courbe rouge) ou la chirurgie *sham* (courbe bleue) avant qu'elles soient traitées au CBD. Chez les souris *Sham*, pour la patte gauche (non lésée) comme la patte droite (lésée), nous n'avons pas vu de différence significative dans l'évolution du seuil de sensibilité de chaque patte (seuils variant entre 2 et 3,5 g) ni de différence de seuil en comparant les pattes entre elles. Chez les souris *Cuff*, le seuil de sensibilité de la patte droite était significativement inférieur à celui de la patte gauche de S3 à S7 ainsi que des pattes des souris *Sham* de S4 à S5. De plus, de la troisième à la cinquième semaine (S3 à S5, seuil variant entre 1 et 1,4 g), le seuil de la patte droite était significativement inférieur à celui de la première semaine (*baseline* 1 ou B1, seuil d'environ 2,5 g) (ANOVA 2f ; interaction pattes-temps, $F_{(15, 258)} = 5,42$ et $p < 0,0001$; effet patte $F_{(3, 258)} = 50,93$ et $p < 0,0001$). En prenant en compte la différence de taille des échantillons et la variabilité des résultats du groupe *Sham*, ces résultats suggèrent qu'après la chirurgie, une allodynie mécanique est apparue au niveau de la patte droite lésée des souris *Cuff*, mais ne semblait pas apparaître sur la patte droite des souris *Sham* ni sur les pattes gauches des deux groupes.

Figure 25 : Effet de la chirurgie sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures de souris femelles.

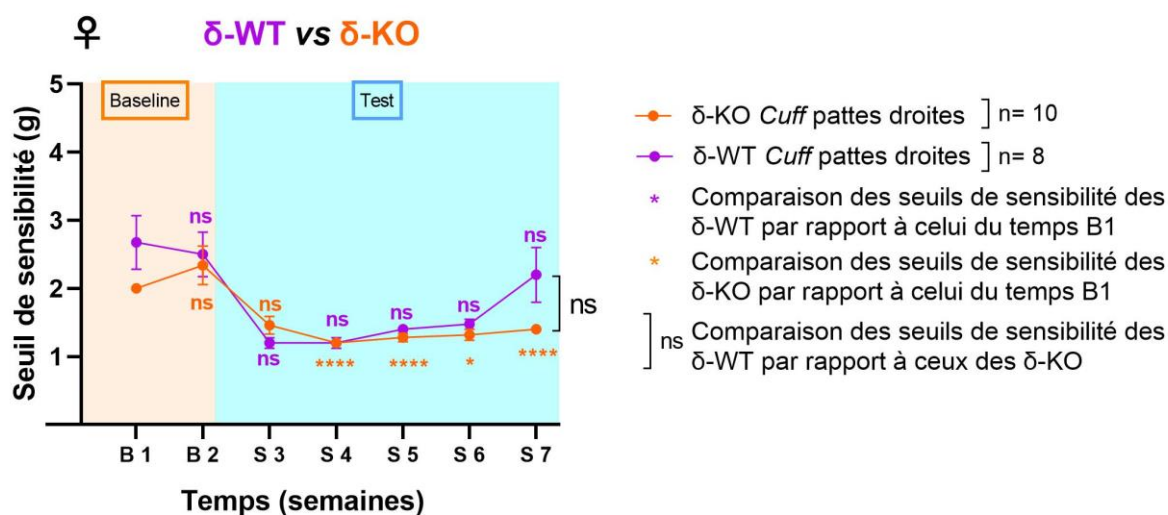


Représentation des résultats du test des filaments Von Frey mesurant l'évolution de la force (en g) du stimulus nécessaire pour induire un retrait de la patte postérieure (patte droite = patte lésée, patte gauche = patte non lésée) au cours du protocole. La moyenne \pm l'erreur type à la moyenne (SEM) est représentée. Les données ont été analysées avec un test ANOVA à deux facteurs (mesures répétées), et un test *post-hoc* de Tukey.

3.1.a.5 Effet du génotype chez les femelles

La figure 26 représente les résultats des souris femelles exprimant soit un génotype δ -KO (courbe orange) soit un génotype δ -WT (courbe violette) après chirurgie et avant qu'elles soient traitées au CBD. Les seuils nociceptifs des pattes gauches n'étaient pas significativement différents (figure 21), nous avons donc fait le choix de ne représenter que les pattes droites dans les figures suivantes. Nous avons pu observer que pour le génotype δ -KO, après la chirurgie, il y avait une diminution significative du seuil de sensibilité mécanique par rapport à la *baseline* (seuil de 2 g au temps B1 et variant entre 1 et 1,4 g de S3 à S7). Pour le génotype δ -WT, il y avait une diminution du seuil mais elle n'était pas statistiquement significative (seuil de 2,5 g au temps B1 et variant entre 1 et 1,4 g de S3 à S6 et étant à 2 g à S7). De plus, les seuils des souris δ -KO avant et après chirurgie n'étaient pas significativement différents de ceux des souris δ -WT (ANOVA 2f ; interaction génotype-temps, $F_{(6, 102)} = 1,615$ et $p = 0,1505$; effet génotype $F_{(1, 102)} = 4,55$ et $p = 0,0353$; effet temps $F_{(2, 37)} = 13,29$ et $p < 0,0001$). Nous avons donc pu conclure qu'après la chirurgie, nous n'avons pas observé d'effet du génotype sur l'allodynie mécanique.

Figure 26 : Effet du génotype sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures droites de souris femelles.

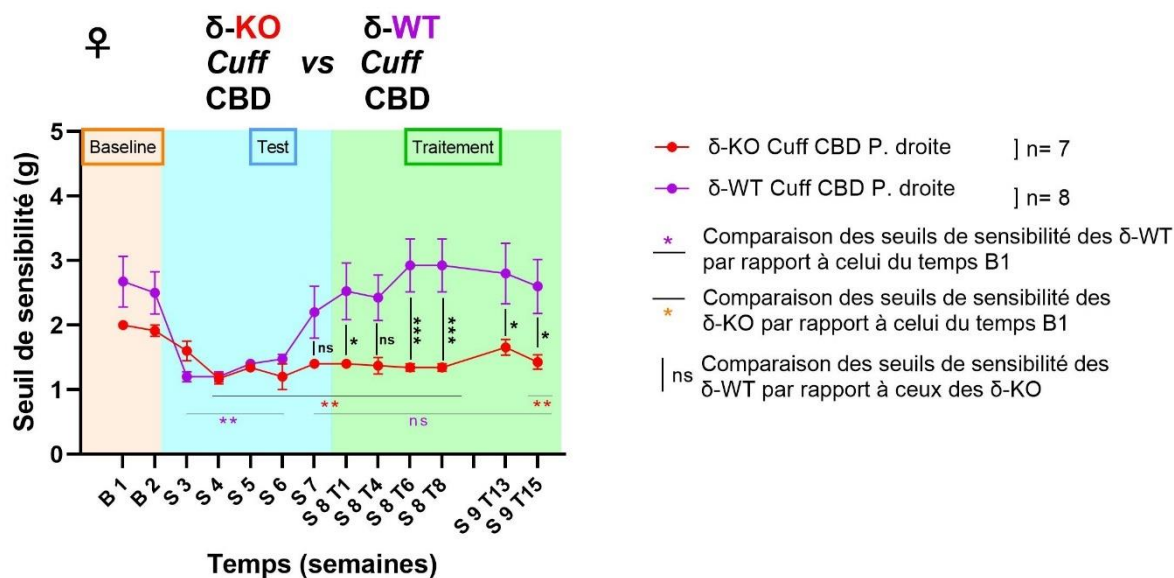


Représentation des résultats du test des filaments Von Frey mesurant l'évolution de la force (en g) du stimulus nécessaire pour induire un retrait de la patte postérieure (patte droite = patte lésée, patte gauche = patte non lésée) au cours du protocole. La moyenne \pm l'erreur type à la moyenne (SEM) est représentée. Les données ont été analysées avec un test ANOVA à deux facteurs (mesures répétées), et un test *post-hoc* de Tukey.

3.1.a.6 Effet du CBD chez les femelles

N'ayant pas de groupe Véhicule avec des effectifs suffisamment grands pour les comparer avec les groupes recevant du CBD, nous ne pouvons pas conclure sur l'effet du CBD sur l'allodynie mécanique chez les femelles par rapport au contrôle. La figure 27 représente cependant les résultats des souris femelles des groupes *Cuff* ayant reçu du CBD et exprimant soit un génotype δ -KO (courbe rouge) soit un génotype δ -WT (courbe violette). On peut observer que le seuil de sensibilité des pattes droite de souris *Cuff* δ -WT a diminué de manière significative jusqu'à la sixième semaine de la phase *test* (valeur comprise entre 1 et 1,4 g), montrant la mise en place de l'allodynie mécanique. Elle a augmenté de manière non significative à la septième semaine. Lors de la phase *traitement*, ce seuil a augmenté à partir du premier jour de traitement (contrairement aux souris δ -KO chez lesquelles nous n'avons pas observé d'augmentation du seuil) avec une valeur qui variait entre 2,5 et 3 g et n'était pas significativement différente du seuil de B1. Les seuils des pattes lésées des souris δ -WT étaient significativement plus élevés que ceux de la patte lésée des souris δ -KO (ANOVA 2f ; interaction génotype-temps, $F_{(12, 146)} = 2,931$ et $p = 0,0011$; effet génotype $F_{(1, 13)} = 16,48$ et $p = 0,0014$; effet temps $F_{(3, 31)} = 4,43$ et $p = 0,0144$). Ces résultats suggèrent que chez les femelles, le récepteur opioïde δ serait également nécessaire au soulagement de l'allodynie mécanique par le CBD (dans l'hypothèse où le CBD aurait un effet par rapport au contrôle). Mais cela reste à confirmer notamment avec des groupes δ -KO et δ -WT recevant la solution contrôle.

Figure 27 : Effet du traitement au CBD sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures droites de souris femelles *Cuff* de génotype δ -WT ou δ -KO.



Représentation des résultats du test des filaments Von Frey mesurant l'évolution de la force (en g) du stimulus nécessaire pour induire un retrait de la patte postérieure (patte droite = patte lésée, patte gauche = patte non lésée) au cours du protocole. La moyenne \pm l'erreur type à la moyenne (SEM) est représentée. Les données ont été analysées avec un test ANOVA à deux facteurs (mesures répétées), et un test *post-hoc* de Tukey. (CBD : cannabidiol)

Pour résumer, la chirurgie de pose du *Cuff* a effectivement entraîné chez les souris l'apparition d'une allodynie mécanique sur les pattes lésées et ce, indifféremment du sexe ou de la présence ou non du récepteur δ . L'allodynie n'a pas été soulagée chez les souris mâles et femelles δ -KO recevant le traitement au CBD. En revanche, une diminution de l'allodynie a été observée chez les souris δ -WT mâles et femelles recevant un traitement au CBD, suggérant la nécessité de l'expression du récepteur opioïde δ pour observer l'effet anti-allodynique du CBD.

3.1.b Résultats du test du splash

Les comportements de type anxio-dépressif ont été évalués par la mesure du temps de toilettage dans le test du *splash* (une diminution du temps de toilettage est interprétée comme un signe de comportements de type anxio-dépressif). Ce paramètre a été évalué une fois avant le traitement (CBD ou Véhicule) et une fois après le traitement.

3.1.b.1 Effet de la chirurgie chez les mâles

La figure 28 représente les résultats des souris mâles ayant reçu la chirurgie de pose du *cuff* (rouge) ou la chirurgie *sham* (bleu), avant qu'ils soient traités au CBD. Nous avons pu remarquer que les souris *Cuff* avaient un temps de toilettage moyen de 87 ± 6 secondes. Ce temps moyen était significativement inférieur à celui des souris *Sham* (109 ± 6 secondes) (test t de Student non apparié, $p = 0,0167$). Ces résultats suggèrent que la chirurgie semblait diminuer le temps de toilettage chez les souris mâles et donc entraîner un comportement de type anxio-dépressif.

3.1.b.2 Effet du génotype chez les mâles

La figure 29 représente les résultats des souris *Cuff* mâles exprimant soit un génotype δ -KO (orange) soit un génotype δ -WT (violet) après chirurgie et avant qu'ils soient traités au CBD. Nous avons pu remarquer que les souris δ -KO *Cuff* avaient un temps de toilettage moyen de 84 ± 8 secondes. Ce temps moyen était inférieur à celui des souris δ -WT *Cuff* (92 ± 10 secondes), de manière statistiquement non significative (test t de Student non apparié, $p = 0,5107$). Ces résultats suggèrent que le génotype ne semblait pas avoir d'effet observable sur le temps de toilettage chez les souris mâles *Cuff* après la chirurgie.

3.1.b.3 Effet du CBD chez les mâles

La figure 30 représente les résultats des souris *Cuff* mâles exprimant soit un génotype δ -KO (vert et rouge) soit un génotype δ -WT (violet) avant et après traitement au CBD (rouge et violet) ou à la solution contrôle (vert). Nous avons pu remarquer que pour les trois groupes, après traitement, le temps de toilettage augmentait de manière non significative : les temps moyens étaient, respectivement avant et après traitement, de 91 ± 15 secondes et de 103 ± 10 secondes pour les souris δ -KO Véhicules ; de 79 ± 9 secondes et de 89 ± 9 secondes pour les souris δ -KO CBD et de 102 ± 10 secondes et de 108 ± 8 secondes pour les souris δ -WT CBD (ANOVA 2f, interaction traitement-temps, $F_{(2, 20)} = 0,07$ et $p = 0,9306$; effet traitement $F_{(2, 20)} = 1,92$ et $p = 0,1726$). Ces résultats suggèrent que le test du *splash* n'a pas révélé d'effet significatif du CBD sur les comportements de type anxio-dépressif chez les mâles.

Figure 28 : Effet de la chirurgie sur le temps de toilettage de souris mâles.

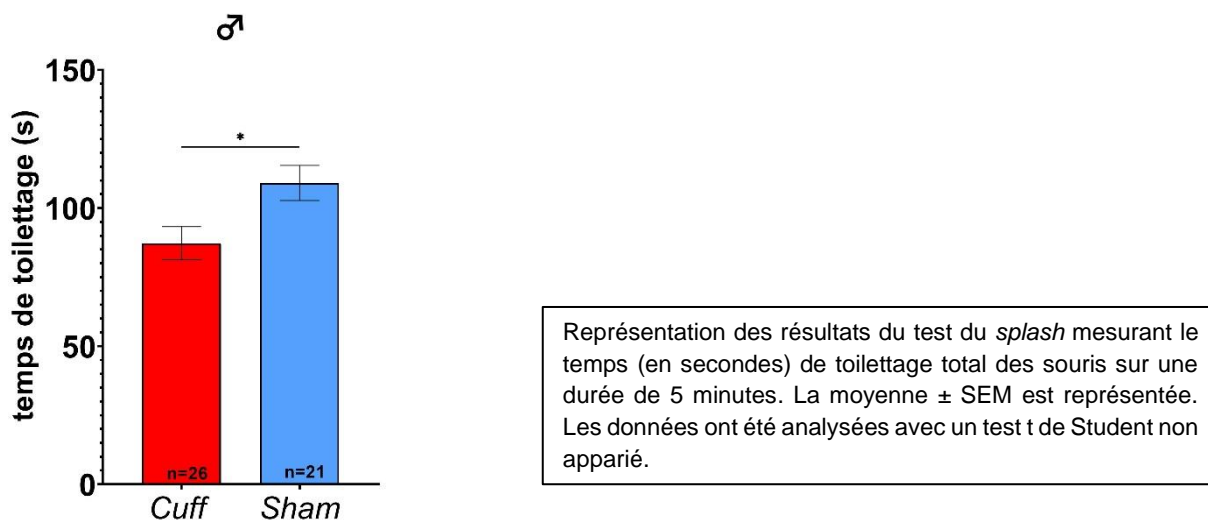


Figure 29 : Effet du génotype sur le temps de toilettage de souris mâles.

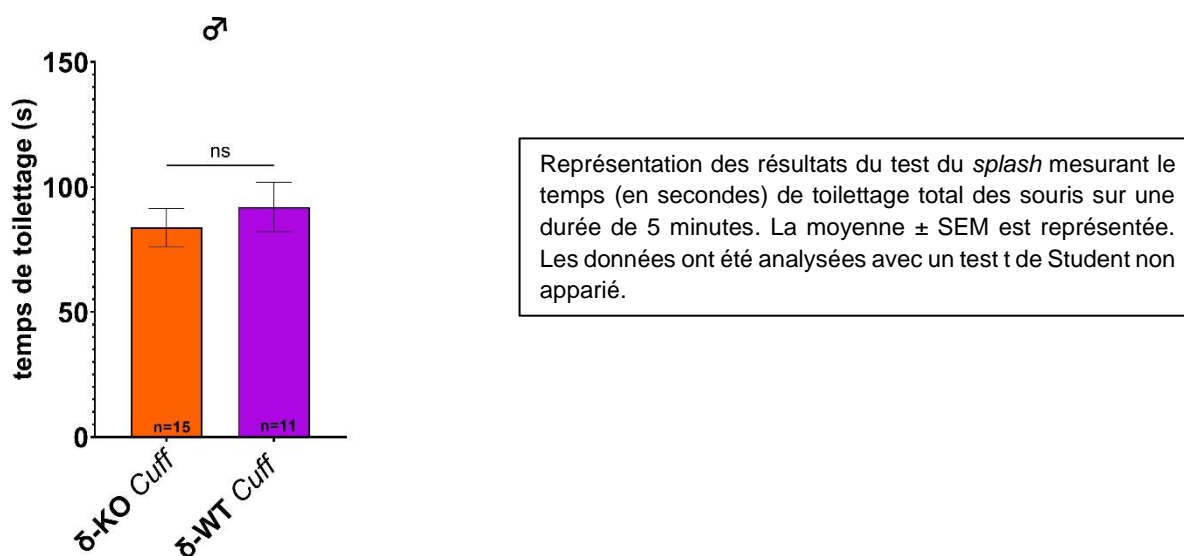
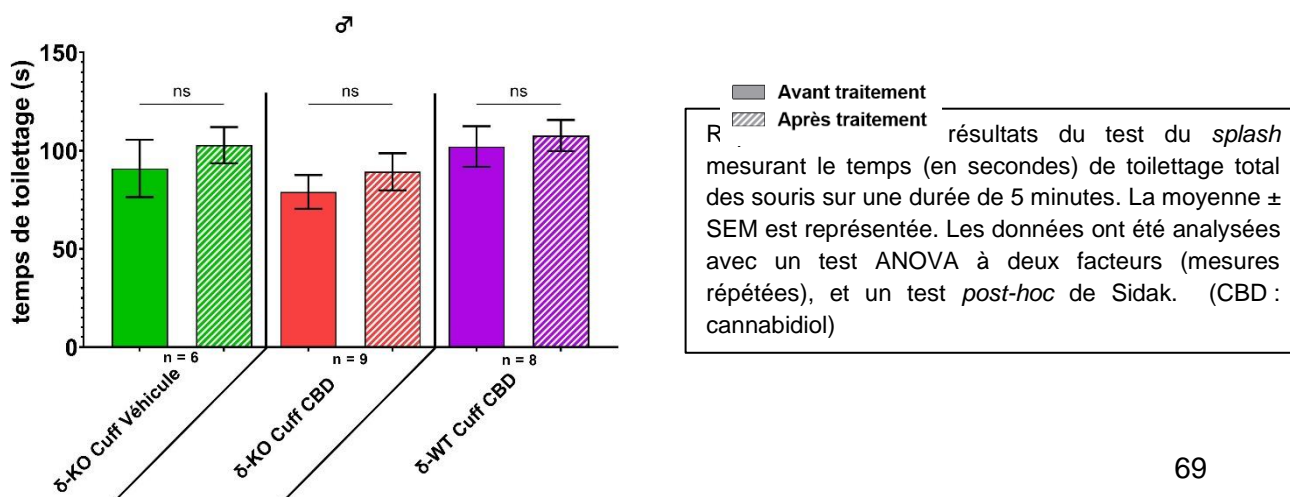


Figure 30 : Effet du CBD sur le temps de toilettage de souris mâles de génotype δ -KO ou δ -WT.



3.1.b.4 Effet de la chirurgie chez les femelles

La figure 31 représente les résultats des souris femelles ayant subi la chirurgie de pose du *cuff* (rouge) ou la chirurgie *sham* (bleu), avant qu'elles soient traitées au CBD. Nous avons pu remarquer que les souris *Cuff* avaient un temps de toilettage moyen de 93 ± 7 secondes. Ce temps moyen était inférieur à celui des souris *Sham* de manière non significative (111 ± 18 secondes) (test t de Student non apparié, $p = 0,2516$). Ces résultats suggèrent que la chirurgie ne semblait pas avoir d'effet sur le temps de toilettage chez les souris femelles.

3.1.b.5 Effet du génotype chez les femelles

La figure 32 représente les résultats des souris *Cuff* femelles de génotype δ -KO (orange) ou δ -WT (violet) après chirurgie et avant qu'elles soient traitées au CBD. Nous avons pu remarquer que les souris δ -KO *Cuff* avaient un temps de toilettage moyen de 103 ± 9 secondes. Ce temps moyen était supérieur à celui des souris δ -WT *Cuff* (80 ± 7 secondes), de manière statistiquement significative (test de Student non apparié, $p = 0,025$). Ces résultats suggèrent que le génotype semblait avoir un effet observable sur le temps de toilettage chez les souris femelles *Cuff* après la chirurgie et que les femelles δ -WT *Cuff* se toilettaient moins que les femelles δ -KO *Cuff*.

3.1.b.6 Effet du CBD chez les femelles

La figure 33 représente les résultats des souris *Cuff* femelles exprimant soit un génotype δ -KO (rouge) soit un génotype δ -WT (violet) avant et après traitement au CBD. Nous avons pu remarquer que chez les femelles δ -KO *Cuff* recevant du CBD, le temps moyen de toilettage diminuait non significativement après traitement, passant de 115 ± 9 secondes à 90 ± 11 secondes. Les femelles δ -WT *Cuff* recevant du CBD avaient un temps moyen augmenté (non significativement) après traitement, passant de 80 ± 7 secondes à 97 ± 5 secondes (ANOVA 2f, effet traitement $F_{(1, 13)} = 2,84$ et $p = 0,1158$). Nous n'avons donc pas pu conclure sur l'effet du CBD chez les femelles dans le contexte du test du *splash* et des comportements de type anxio-dépressif associés.

Pour résumer, le test du *splash* a révélé l'apparition significative de comportements de type anxio-dépressif chez les souris mâles *Cuff* mais pas chez les souris femelles. Chez les femelles, le génotype δ -WT semblait être associé à une augmentation de comportements de type anxio-dépressif et cette association n'a pas été observée chez les mâles. Le traitement au CBD n'a pas été associé avec une modification significative du temps de toilettage.

Figure 31 : Effet de la chirurgie sur le temps de toilettage de souris femelles.

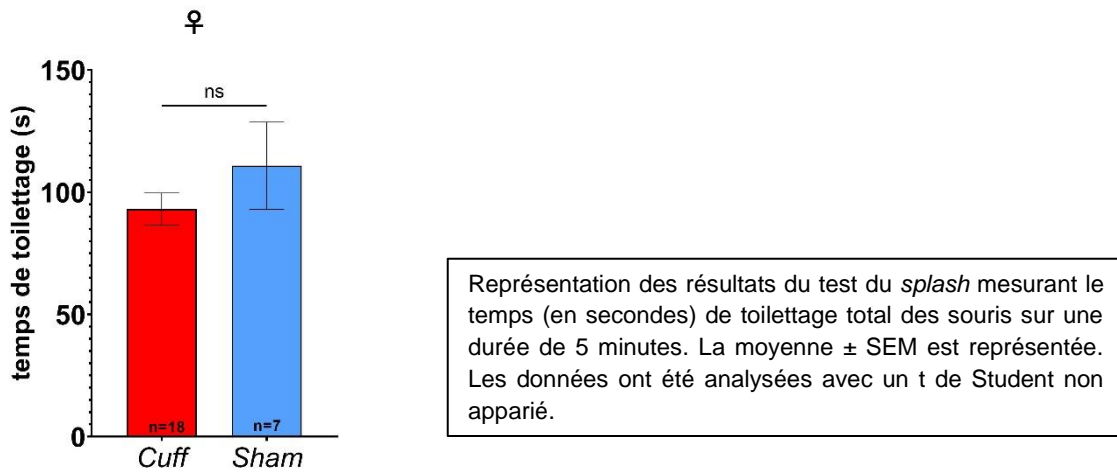


Figure 32 : Effet du génotype sur le temps de toilettage de souris femelles.

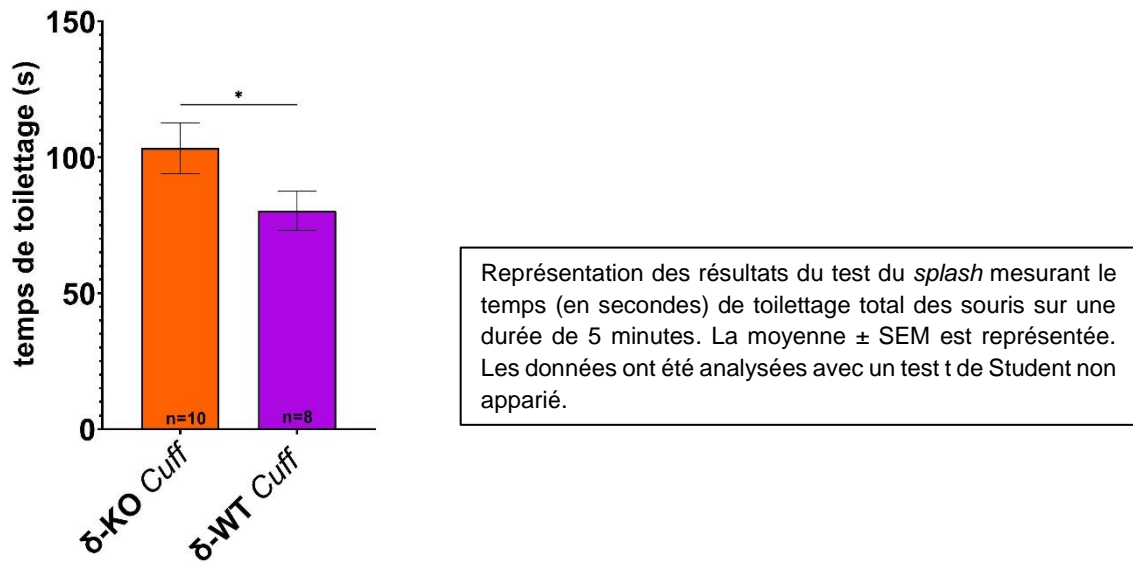
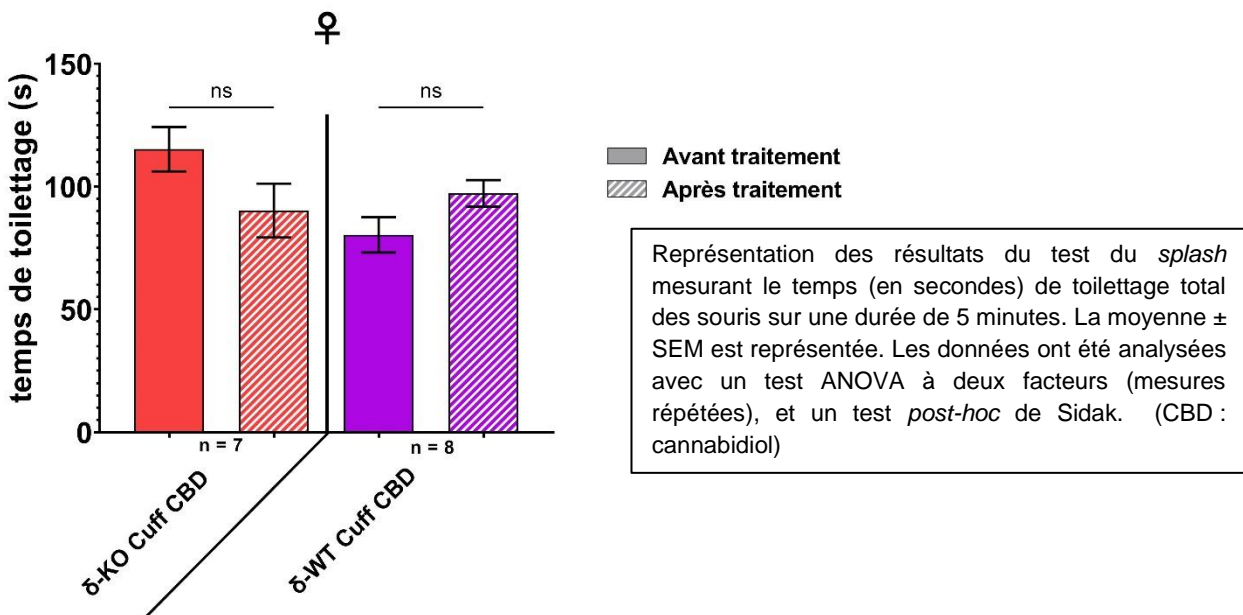


Figure 33 : Effet du CBD sur le temps de toilettage de souris femelles de génotype δ -KO ou δ -WT.



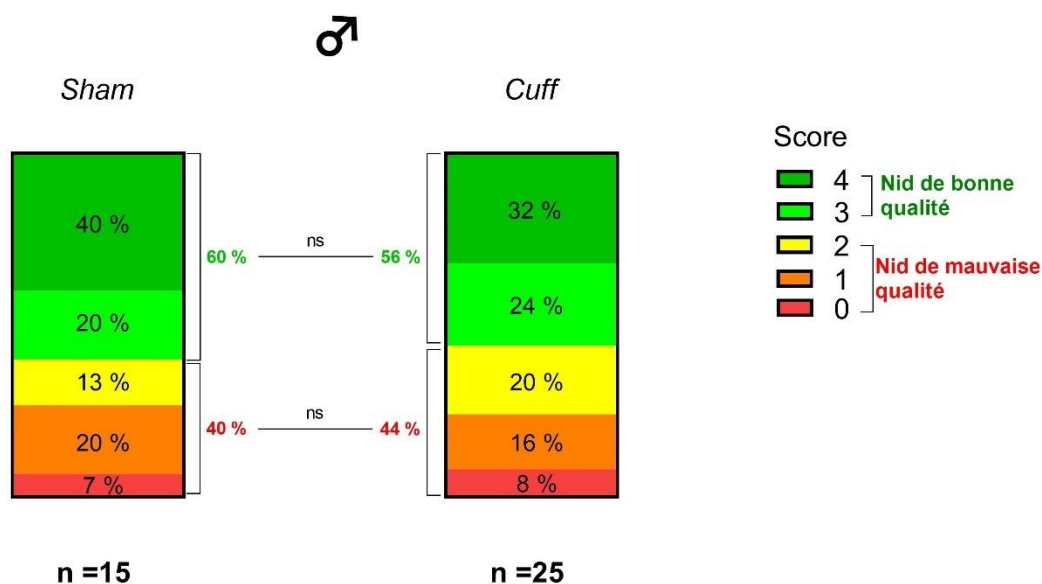
3.1.c Résultats du test du nesting

L'état de bien-être a été évalué en utilisant la qualité de fabrication du nid dans le test de *nesting* (un score faible étant le reflet d'un état de mal-être). Le score allait de 0 à 4 et nous avons décidé de qualifier de « nid de bonne qualité » les nids qui avaient reçu des scores de 3 ou 4 et de « nid de mauvaise qualité » les nids qui avaient reçu des scores de 0 à 2. Ce paramètre a été évalué une fois avant le traitement (CBD ou Véhicule) et une fois après le traitement.

3.1.c.1 Effet de la chirurgie chez les mâles

La figure 34 représente les résultats des souris mâles ayant subi la chirurgie de pose du *cuff* (droite) ou la chirurgie *sham* (gauche), avant qu'ils ne soient traités au CBD. Nous avons pu observer que la proportion des mâles *Sham* faisant des nids de bonne qualité était de 9/15 (60 %), équivalente à celle des mâles *Cuff* qui était de 14/25 (56 %) ; la différence entre ces pourcentages n'était pas significative (test exact de Fisher, $p > 0,9999$). Ces résultats suggèrent qu'il ne semblait pas y avoir d'association entre la chirurgie et la qualité de fabrication du nid chez les mâles.

Figure 34 : Effet de la chirurgie sur la qualité de fabrication du nid de souris mâles.

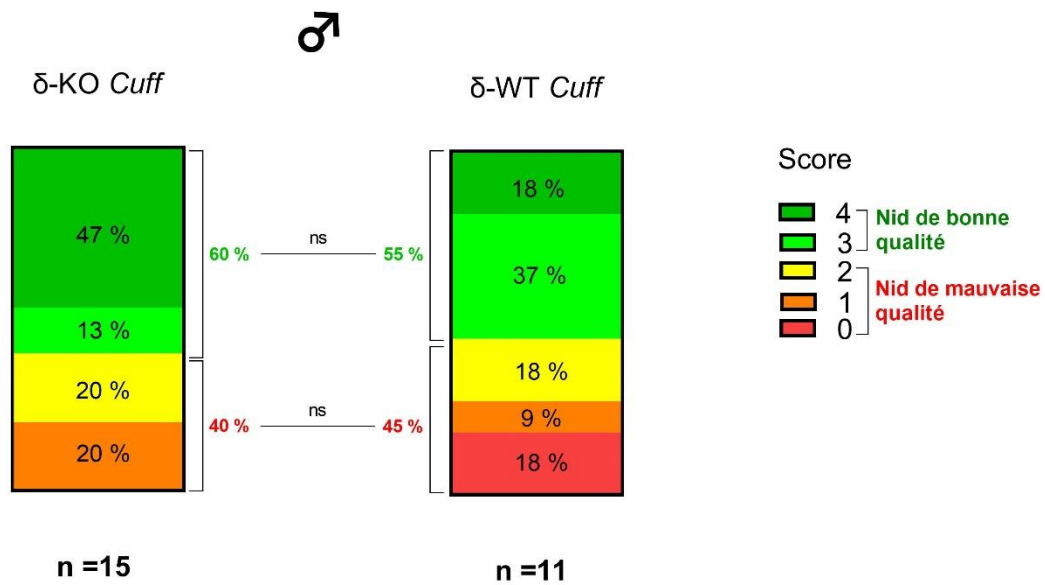


Représentation des résultats du test de *nesting* mesurant le score de qualité du nid des souris. Les pourcentages d'animaux en fonction du score, ainsi que les pourcentages globaux de la qualité des nids au sein des groupes sont représentées. Les données sont analysées avec un test exact de Fisher.

3.1.c.2 Effet du génotype chez les mâles

La figure 35 représente les résultats des souris mâles ayant subi la chirurgie de pose du *cuff*, de génotype δ -KO (gauche) ou δ -WT (droite), avant qu'ils ne soient traités au CBD. Nous avons pu observer que la proportion des mâles δ -KO *Cuff* faisant des nids de bonne qualité était de 9/15 (60 %), équivalente à celle des mâles δ -WT *Cuff* qui était de 6/11 (55 %) ; la différence entre ces pourcentages n'était pas significative (test exact de Fisher, $p > 0,9999$). Ces résultats suggèrent qu'il ne semblait pas y avoir d'association entre le génotype et la qualité de fabrication du nid chez les mâles.

Figure 35 : Effet du génotype sur la qualité de fabrication du nid de souris mâles.



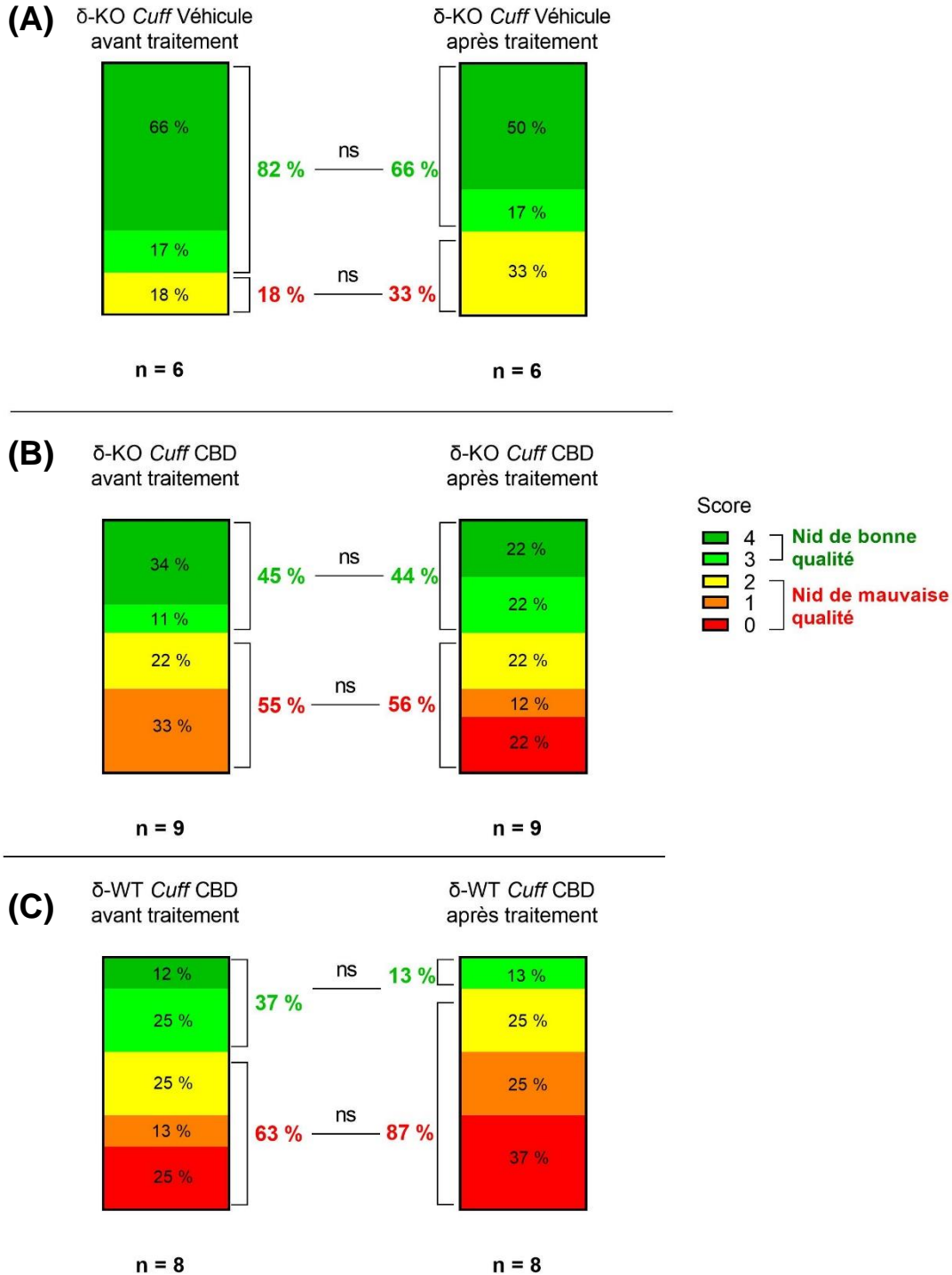
Représentation des résultats du test de *nesting* mesurant le score de qualité du nid des souris. Les pourcentages d'animaux en fonction du score, ainsi que les pourcentages globaux de la qualité des nids au sein des groupes sont représentées. Les données sont analysées avec un test exact de Fisher.

3.1.c.3 Effet du traitement chez les mâles

La figure 36 représente les résultats avant et après traitement des souris mâles *Cuff* de génotype δ -KO recevant la solution contrôle (A), de génotype δ -KO recevant la solution CBD (B) et de génotype δ -WT recevant la solution CBD (C). Nous avons pu observer en (A) que la proportion avant traitement des mâles δ -KO faisant des nids de bonne qualité était de 5/6 (82 %), supérieure à celle après traitement qui était de 4/6 (66 %) ; cependant la différence entre ces pourcentages n'était pas significative (test de McNemar, $p > 0,9999$). En (B), la proportion avant traitement des mâles δ -KO faisant des nids de bonne qualité était de 4/9 (45 %), équivalente à celle après traitement qui était de 4/9 (44 %) ; cependant la différence entre ces pourcentages n'était pas significative (test de McNemar, $p > 0,9999$). En (C), la proportion avant traitement des mâles δ -WT faisant des nids de bonne qualité était de 3/8 (37 %), supérieure à celle après traitement qui était de 1/8 (13 %) ; cependant la différence entre ces pourcentages n'était pas significative (test de McNemar, $p > 0,9999$). Ces résultats suggèrent qu'il ne semblait pas y avoir d'association entre le traitement au CBD et la qualité de fabrication du nid chez les mâles.

De plus, nous pouvons observer une différence de qualité de nid avant traitement pour les souris δ -KO *Cuff* Véhicule (82% de bons nids) et les souris δ -KO *Cuff* CBD (45% de bons nids). Or, avant traitement, ces pourcentages devraient être similaires pour des souris δ -KO *Cuff*. Mais comme expliqué dans le matériel et méthode, nous avons utilisé des souris de deux fonds génétiques différents, et il se trouve que le groupe de souris présenté en (A) est composé de souris qui avaient un fonds génétique différent de celui du groupe de souris présenté en (B). Nous avons étudié l'influence de ce paramètre et les résultats sont présentés dans le chapitre 3.1.f.

Figure 36 : Effet du traitement sur la qualité de fabrication du nid de souris mâles *Cuff* et de génotype δ -KO recevant la solution contrôle (A), de génotype δ -KO recevant la solution CBD (B) et de génotype δ -WT recevant la solution CBD (C).

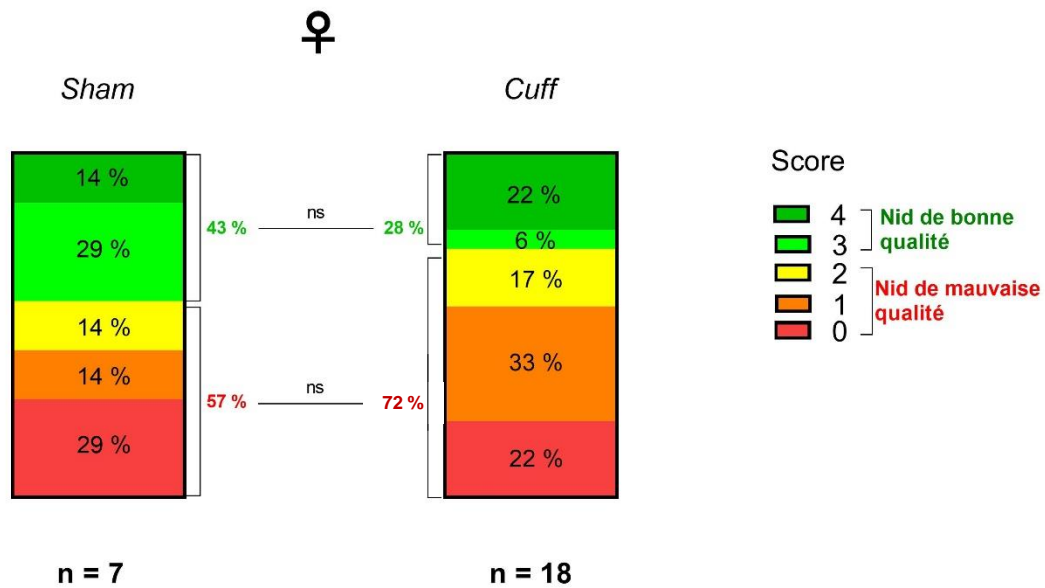


Représentations des résultats du test de *nesting* mesurant le score de qualité du nid des souris. Les pourcentages d'animaux en fonction du score, ainsi que les pourcentages globaux de la qualité des nids au sein des groupes sont représentées. Les données sont analysées avec un test de McNemar. (CBD = cannabidiol)

3.1.c.4 Effet de la chirurgie chez les femelles

La figure 37 représente les résultats des souris femelles ayant subi la chirurgie de pose du *cuff* (droite) ou la chirurgie *sham* (gauche), avant qu'elles ne soient traitées au CBD. Nous avons pu observer que la proportion des femelles *Sham* faisant des nids de bonne qualité était de 3/7 (43 %), supérieure à celle des femelles *Cuff* qui était de 5/18 (28 %) ; cependant la différence entre ces pourcentages n'était pas significative (test exact de Fisher, $p = 0,6396$). Ces résultats suggèrent qu'il ne semblait pas y avoir d'association entre la chirurgie et la qualité de fabrication du nid chez les femelles.

Figure 37 : Effet de la chirurgie sur la qualité de fabrication du nid de souris femelles.

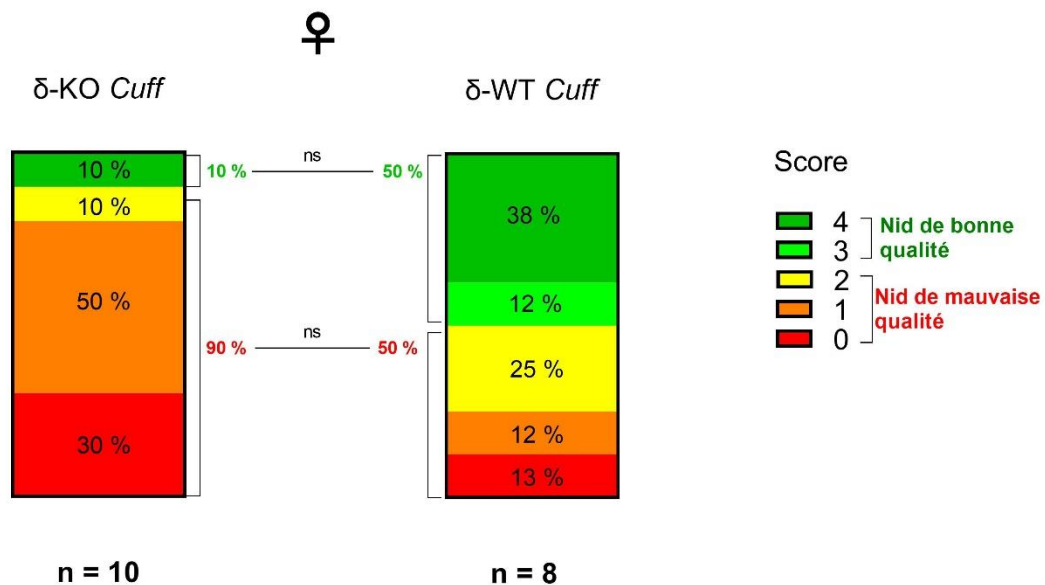


Représentation des résultats du test de *nesting* mesurant le score de qualité du nid des souris. Les pourcentages d'animaux en fonction du score, ainsi que les pourcentages globaux de la qualité des nids au sein des groupes sont représentées. Les données sont analysées avec un test exact de Fisher.

3.1.c.5 Effet du génotype chez les femelles

La figure 38 représente les résultats des souris femelles ayant subi la chirurgie de pose du *cuff*, de génotype δ -KO (gauche) ou δ -WT (droite), avant qu'elles soient traitées au CBD. Nous avons pu observer que la proportion des femelles δ -KO *Cuff* faisant des nids de bonne qualité était de 1/10 (10 %), inférieure à celle des femelles δ -WT *Cuff* qui était de 4/8 (50 %), et les proportions de femelles faisant des nids de mauvaise qualité étaient respectivement de 9/10 (90 %) et de 4/8 (50 %) ; la différence entre ces pourcentages n'était pas significative (test exact de Fisher, $p = 0,1176$). Ces résultats suggèrent qu'il ne semblait pas y avoir d'association entre le génotype et la qualité de fabrication du nid chez les mâles.

Figure 38 : Effet du génotype sur la qualité de fabrication du nid de souris femelles.

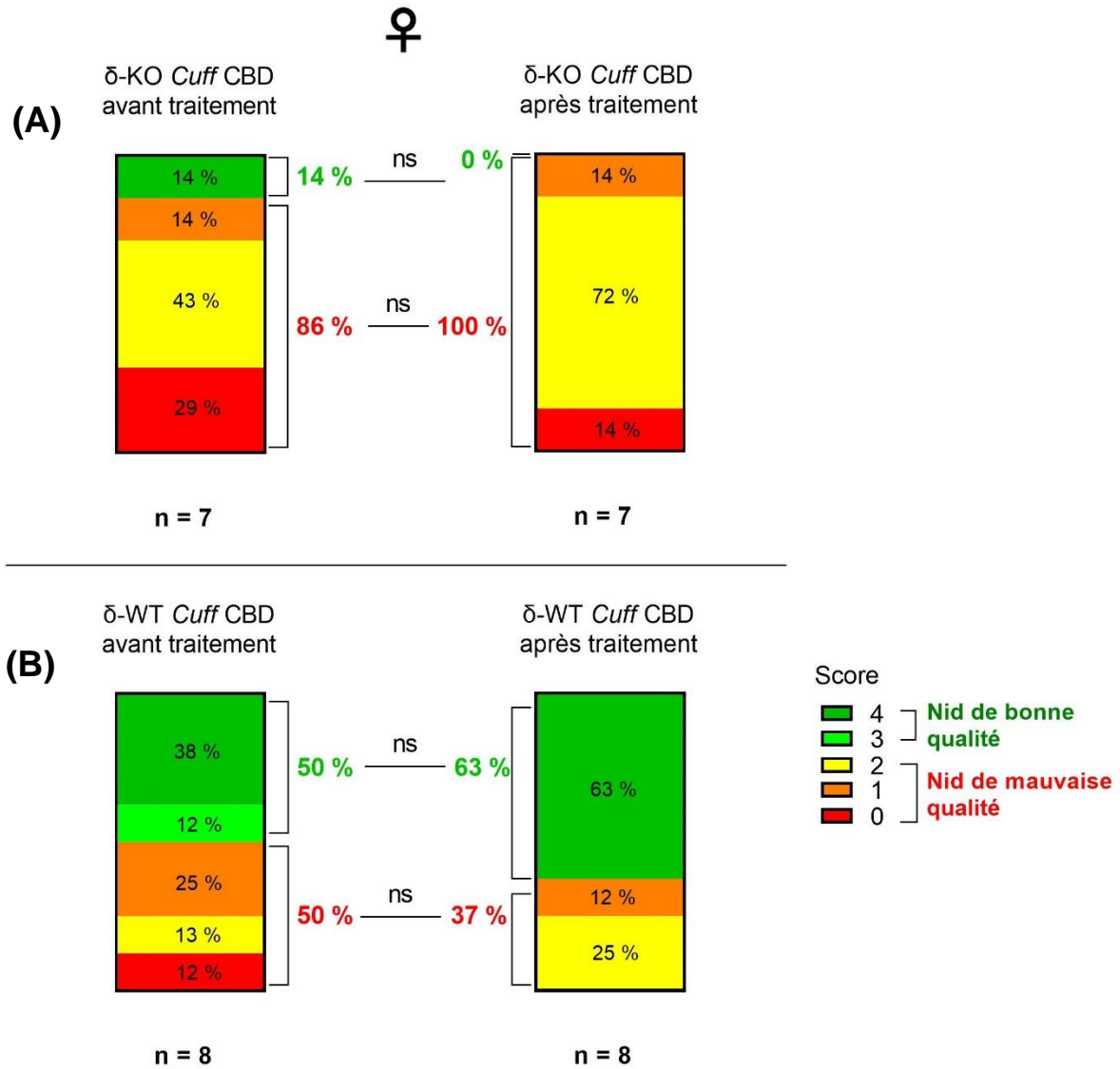


Représentation des résultats du test de *nesting* mesurant le score de qualité du nid des souris. Les pourcentages d'animaux en fonction du score, ainsi que les pourcentages globaux de la qualité des nids au sein des groupes sont représentées. Les données sont analysées avec un test exact de Fisher.

3.1.c.6 Effet du traitement chez les femelles

La figure 39 représente les résultats avant et après traitement des souris femelles *Cuff* recevant la solution CBD de génotype δ -KO (A), ou de génotype δ -WT (B). Nous avons pu observer en (A) que la proportion avant traitement des femelles faisant des nids de bonne qualité était de 1/7 (14 %), inférieure à celle après traitement qui était de 0/7 (0 %) ; la différence entre ces pourcentages n'était pas significative (test de McNemar, $p > 0,9999$). En (B), la proportion avant traitement des femelles faisant des nids de bonne qualité était de 4/8 (50 %), inférieure à celle après traitement qui était de 5/8 (63 %), et les proportions de femelles faisant des nids de mauvaise qualité étaient respectivement de 4/8 (50 %) et de 3/8 (37 %) ; la différence entre ces pourcentages n'était pas significative (test de McNemar, $p > 0,9999$). Ces résultats suggèrent qu'il ne semblait pas y avoir d'association entre le traitement au CBD et la qualité de fabrication du nid chez les femelles

Figure 39 : Effet du traitement sur la qualité de fabrication du nid de souris femelles *Cuff* et de génotype δ -KO recevant la solution CBD (A) ou de génotype δ -WT recevant la solution CBD (B).



Représentations des résultats du test de *nesting* mesurant le score de qualité du nid des souris. Les pourcentages d'animaux en fonction du score, ainsi que les pourcentages globaux de la qualité des nids au sein des groupes sont représentées. Les données sont analysées avec un test de McNemar. (CBD = cannabidiol)

3.1.d Résultats du test de l'interaction sociale

Les comportements de type anxio-dépressif ont également été évalués en estimant le temps de reniflement (ou *sniffing*) dans un test d'interaction sociale (une diminution du temps étant associé à une anhédonie, un marqueur de comportement de type anxio-dépressif). Ce paramètre a été évalué une fois avant le traitement (à la solution CBD ou contrôle) et une fois après le traitement.

3.1.d.1 Effet de la chirurgie chez les mâles

La figure 40 représente les résultats des souris mâles ayant reçu la chirurgie de pose du *cuff* (rouge) ou la chirurgie *sham* (bleu), avant qu'ils ne soient traités au CBD. Nous avons observé que le pourcentage moyen de temps de *sniffing* des souris *Cuff* ($13,7 \pm 2$ %) était supérieur à celui des souris *Sham* ($11,5 \pm 1$ %) mais de manière non statistiquement significative (test de Student non apparié, $p = 0,3112$). Ces résultats suggèrent que la chirurgie ne semblait pas provoquer de modification significative de l'interaction sociale chez les mâles.

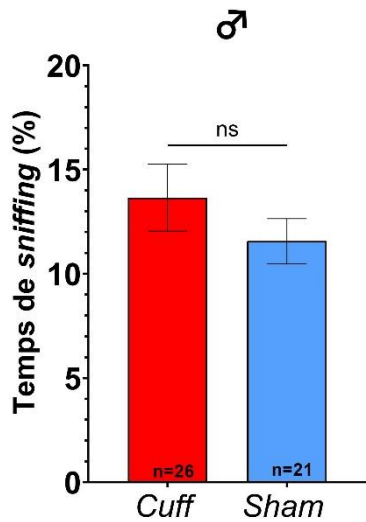
3.1.d.2 Effet du génotype chez les mâles

La figure 41 représente les résultats des souris *Cuff* mâles exprimant soit un génotype δ -KO (orange) soit un génotype δ -WT (violet) après chirurgie et avant qu'ils ne soient traités au CBD. Nous avons observé que le pourcentage moyen de temps de *sniffing* des souris δ -KO ($14,7 \pm 2$ %) était supérieur à celui des souris δ -WT ($12,2 \pm 3$ %) mais de manière non statistiquement significative (test de Student non apparié, $p = 0,4485$). Ces résultats suggèrent que le génotype ne semblait pas provoquer de modification significative de l'interaction sociale chez les mâles.

3.1.d.3 Effet du traitement chez les mâles

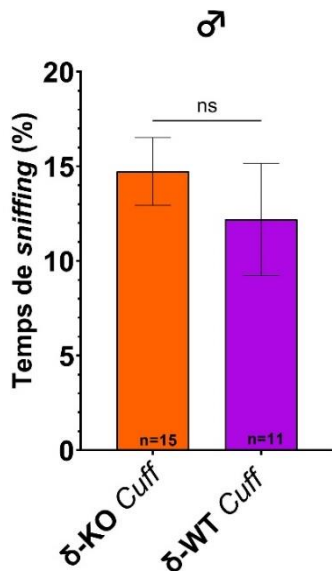
La figure 42 représente les résultats des souris *Cuff* mâles exprimant soit un génotype δ -KO (vert et rouge) soit un génotype δ -WT (violet) avant et après traitement au CBD (rouge et violet) ou à la solution contrôle (vert). Nous avons observé qu'entre avant et après traitement, le pourcentage moyen de temps de *sniffing* des souris δ -KO *Cuff* recevant du véhicule diminuait (passant de $13,6 \pm 4$ % à $10,7 \pm 3$ %), celui des souris δ -KO *Cuff* recevant du CBD restait constant (passant de $15,5 \pm 2$ % à $15,4 \pm 2$ %) et celui des souris δ -WT *Cuff* recevant du CBD diminuait (passant de $9,8 \pm 3$ % à $5,4 \pm 1$ %). Ces évolutions n'étaient pas statistiquement significatives (ANOVA 2f, effet traitement $F_{(1, 43)} = 1,60$ et $p = 0,2130$). Ces résultats suggèrent que le test de l'interaction sociale n'a pas révélé d'effet significatif du CBD sur les comportements de type anxio-dépressif chez les mâles.

Figure 40 : Effet de la chirurgie sur le temps d'interaction sociale de souris mâles.



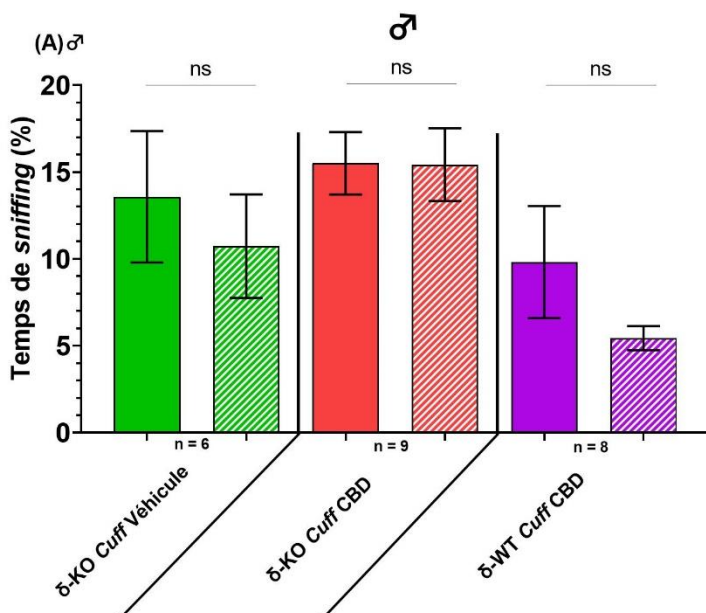
Représentation des résultats du test d'interaction sociale mesurant le pourcentage de temps passé par une souris à interagir (*sniffing*) avec une souris inconnue. La moyenne \pm SEM est représentée. Les données ont été analysées avec un test t de Student non apparié.

Figure 41 : Effet du génotype sur le temps d'interaction sociale de souris mâles.



Représentation des résultats du test d'interaction sociale mesurant le pourcentage de temps passé par une souris à interagir (*sniffing*) avec une souris inconnue. La moyenne \pm SEM est représentée. Les données ont été analysées avec un test t de Student non apparié.

Figure 42 : Effet du CBD sur le temps d'interaction sociale de souris mâles de génotype δ -KO ou δ -WT.



■ Avant traitement
 ▨ Après traitement

Représentation des résultats du test d'interaction sociale mesurant le pourcentage de temps passé par une souris à interagir (*sniffing*) avec une souris inconnue. La moyenne \pm SEM est représentée. Les données ont été analysées avec un test ANOVA à deux facteurs (mesures répétées), et un test *post-hoc* de Tukey. (CBD : cannabidiol)

3.1.d.4 Effet de la chirurgie chez les femelles

La figure 43 représente les résultats des souris femelles ayant subi la chirurgie de pose du *cuff* (rouge) ou la chirurgie *sham* (bleu), avant qu'elles ne soient traitées au CBD. Nous avons observé que le pourcentage moyen de temps de *sniffing* des souris *Cuff* ($8,9 \pm 2 \%$) n'était pas différent de celui des souris *Sham* ($8,5,5 \pm 3 \%$), la différence de moyenne entre les deux groupes était non statistiquement significative (test de Student non apparié, $p = 0,9165$). Ces résultats suggèrent que la chirurgie ne semblait pas provoquer de modification significative de l'interaction sociale chez les femelles.

3.1.d.5 Effet du génotype chez les femelles

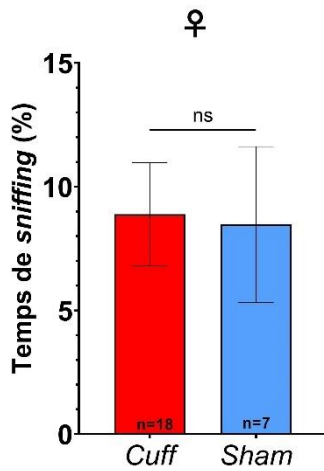
La figure 44 représente les résultats des souris *Cuff* femelles exprimant soit un génotype δ -KO (orange) soit un génotype δ -WT (violet) après chirurgie et avant qu'elles soient traitées au CBD. Nous avons observé que le pourcentage moyen de temps de *sniffing* des souris δ -KO ($4,9 \pm 0,7 \%$) était significativement inférieur à celui des souris δ -WT ($13,9 \pm 4 \%$) (test de Student non apparié, $p = 0,0255$). Ces résultats suggèrent que chez les femelles, les souris avec le génotype δ -KO sont caractérisées par une interaction sociale moindre par rapport à celles au génotype δ -WT.

3.1.d.6 Effet du traitement chez les femelles

La figure 45 représente les résultats des souris *Cuff* femelles exprimant soit un génotype δ -KO (rouge) soit un génotype δ -WT (violet) avant et après traitement au CBD. Nous avons observé qu'entre avant et après traitement, le pourcentage moyen de temps de *sniffing* des souris δ -KO *Cuff* recevant du CBD augmentait légèrement (passant de $5 \pm 1 \%$ à $6,4 \pm 1 \%$) et celui des souris δ -WT *Cuff* recevant du CBD diminuait (passant de $13,9 \pm 4 \%$ à $8,1 \pm 3 \%$). Ces évolutions n'étaient pas statistiquement significatives (ANOVA 2f, effet traitement $F_{(1, 13)} = 0,87$ et $p = 0,3666$). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus chez les mâles. Ces résultats suggèrent que le test de l'interaction sociale n'a pas révélé d'effet significatif du CBD chez les femelles.

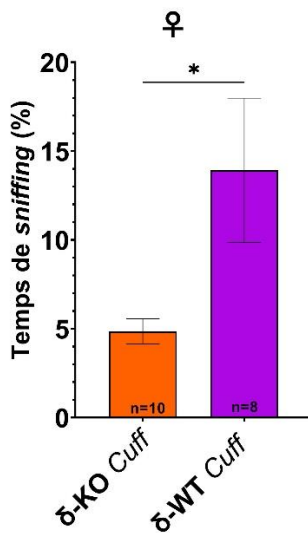
Pour résumer, le test d'interaction sociale n'a pas révélé d'apparition significative de comportements de type anxio-dépressif chez les souris mâles et les souris femelles *Cuff* après la chirurgie. Nous n'avons pas observé de différence de comportement entre les mâles de génotype WT ou KO, alors que pour les femelles, le génotype δ -KO semblait associé à une diminution des comportements sociaux. Le traitement au CBD n'a pas été associé avec une modification significative du temps de *sniffing* chez les mâles comme chez les femelles.

Figure 43 : Effet de la chirurgie sur le temps d'interaction sociale de souris femelles.



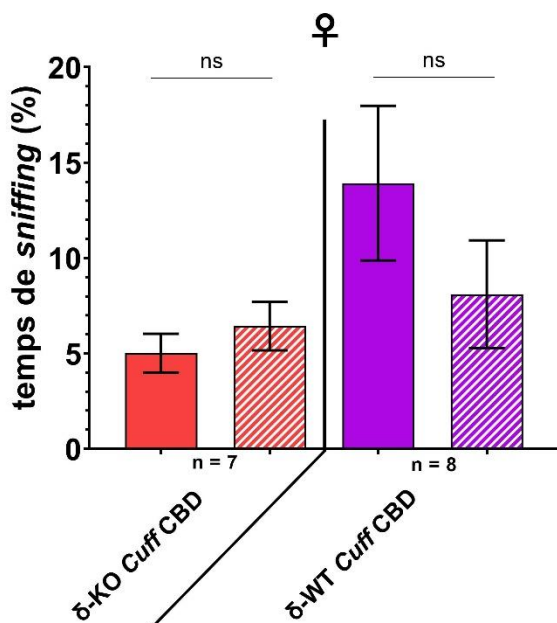
Représentation des résultats du test d'interaction sociale mesurant le pourcentage de temps passé par une souris à interagir (*sniffing*) avec une souris inconnue. La moyenne \pm SEM est représentée. Les données ont été analysées avec un test t de Student non apparié.

Figure 44 : Effet du génotype sur le temps d'interaction sociale de souris femelles.



Représentation des résultats du test d'interaction sociale mesurant le pourcentage de temps passé par une souris à interagir (*sniffing*) avec une souris inconnue. La moyenne \pm SEM est représentée. Les données ont été analysées avec un test t de Student non apparié.

Figure 45 : Effet du CBD sur le temps d'interaction sociale de souris femelles de génotype δ -KO ou δ -WT.



■ Avant traitement
 ▨ Après traitement

Représentation des résultats du test d'interaction sociale mesurant le pourcentage de temps passé par une souris à interagir (*sniffing*) avec une souris inconnue. La moyenne \pm SEM est représentée. Les données ont été analysées avec un test ANOVA à deux facteurs (mesures répétées), et un test *post-hoc* de Tukey. (CBD : cannabidiol)

3.1.e Résultats du test de la nage forcée (FST)

Les comportements de type dépressif ont été évalués en utilisant la résignation face à un stress inévitable, modélisée par le temps d'immobilité pendant le test de FST (une augmentation du temps reflétant un comportement de type dépressif). Ce paramètre n'a été évalué qu'après le traitement (à la solution CBD ou contrôle).

3.1.e.1 Effet de la chirurgie chez les mâles

La figure 46 représente les résultats des souris mâles ayant subi la chirurgie de pose du *cuff* (vert et rouge) ou la chirurgie *sham* (rose et bleu), après le traitement au CBD ou avec la solution contrôle. Nous avons observé que les souris mâles δ -KO traitées avec la solution contrôle et ayant reçu la chirurgie *sham* (en rose) avaient un temps moyen d'immobilité de 156 ± 10 secondes, plus élevé que celui des mâles *Cuff* ayant reçu le même traitement contrôle (en vert) de 138 ± 10 secondes, cette différence n'était pas significative (test de Student non apparié, $p = 0,2251$). Les souris mâles δ -KO traitées avec le CBD et ayant reçu la chirurgie *sham* (en bleu) avaient un temps moyen d'immobilité de 116 ± 13 secondes, plus élevé que celui des mâles *Cuff* ayant reçu le même traitement au CBD (rouge) de 102 ± 18 secondes, cette différence n'était pas significative (test de Student non apparié, $p = 0,536$). Ces résultats suggèrent que la chirurgie ne semblait pas associée avec une modification des comportements de type dépressifs dans le contexte du FST.

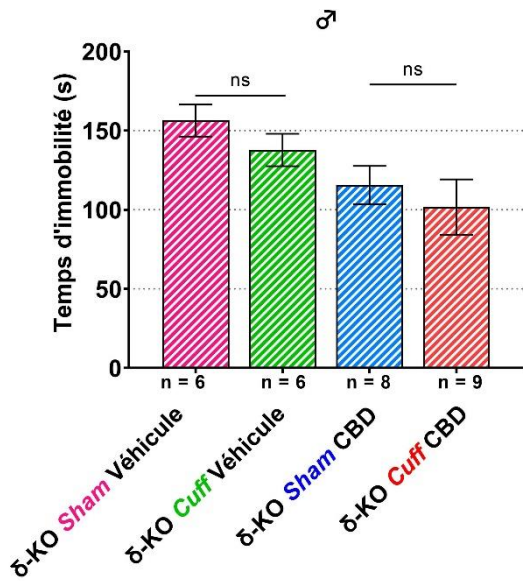
3.1.e.2 Effet du génotype chez les mâles

La figure 47 représente les résultats des souris *Cuff* mâles de génotype δ -KO (rouge) ou δ -WT (violet) après chirurgie le traitement au CBD. Nous avons observé que les souris mâles δ -KO *Cuff* traitées au CBD (en rouge) avaient un temps moyen d'immobilité de 102 ± 18 secondes, moins élevé que celui des souris mâles δ -WT *Cuff* traitées au CBD (en vert) de 145 ± 8 secondes, cet écart de moyenne était significativement différent (test de Student non apparié, $p = 0,0488$). Ces résultats suggèrent que le génotype δ -KO semblait associé à une diminution des comportements de type dépressif dans ce contexte.

3.1.e.3 Effet du traitement chez les mâles

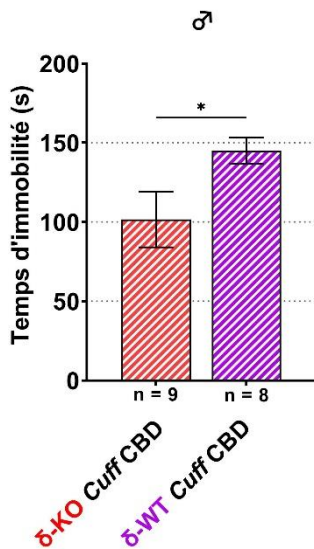
La figure 48 représente les résultats des souris *Cuff* mâles de génotype δ -KO après traitement au CBD (rouge) ou à la solution contrôle (vert). Nous avons observé que les souris mâles δ -KO *Cuff* traitées au CBD (en rouge) avaient un temps moyen d'immobilité de 102 ± 18 secondes, moins élevé que celui des souris mâles δ -KO *Cuff* traitées à la solution contrôle (en vert) de 138 ± 10 secondes, cet écart de moyenne n'étant pas significativement différent (test de Student non apparié, $p = 0,1442$). Nous n'avons donc pas observé d'association entre le traitement au CBD et les comportements de type dépressif dans ce contexte.

Figure 46 : Effet de la chirurgie sur le temps d'immobilité de souris mâles *Sham* ou *Cuff* recevant un traitement au CBD ou à la solution contrôle dans le FST.



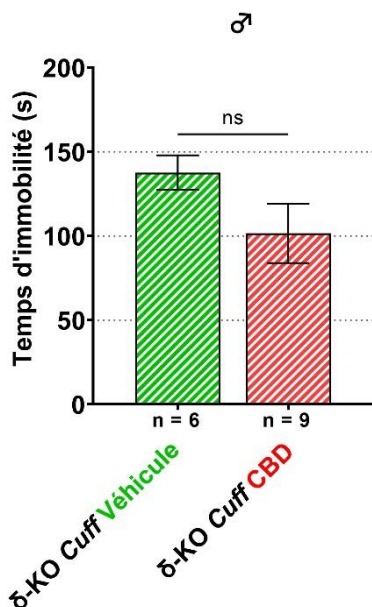
Représentation des résultats du test de la nage forcée (FST) mesurant le temps d'immobilité (en seconde) passé par une souris au lieu de nager, sur une durée de 6 minutes. La moyenne \pm SEM est représentée, les points noirs représentant les données individuelles des animaux. Les données ont été analysées avec un test t de Student non apparié. (CBD : cannabidiol)

Figure 47 : Effet du génotype sur le temps d'immobilité de souris mâles *Cuff*.



Représentation des résultats du test de la nage forcée (FST) mesurant le temps d'immobilité (en seconde) passé par une souris au lieu de nager, sur une durée de 6 minutes. La moyenne \pm SEM est représentée, les points noirs représentant les données individuelles des animaux. Les données ont été analysées avec un test t de Student non apparié. (CBD : cannabidiol)

Figure 48 : Effet du traitement sur le temps d'immobilité de souris mâles.

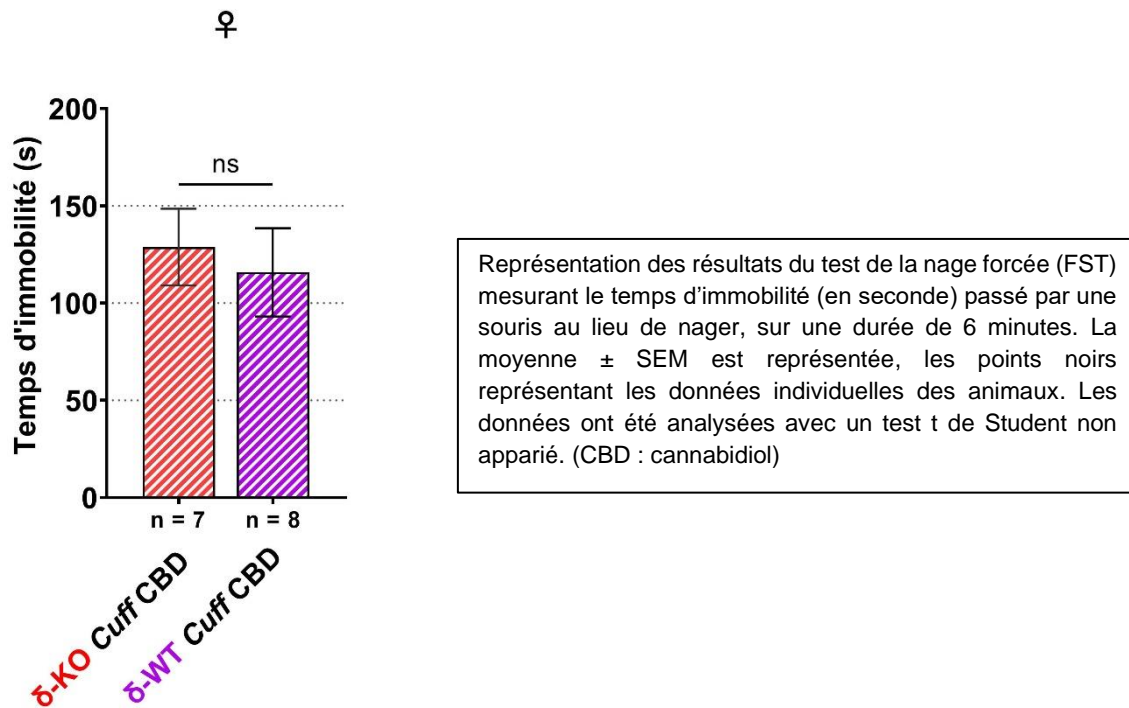


Représentation des résultats du test de la nage forcée (FST) mesurant le temps d'immobilité (en seconde) passé par une souris au lieu de nager, sur une durée de 6 minutes. La moyenne \pm SEM est représentée, les points noirs représentant les données individuelles des animaux. Les données ont été analysées avec un test t de Student non apparié. (CBD : cannabidiol)

3.1.e.4 Effet du génotype chez les femelles

La figure 49 représente les résultats des souris *Cuff* femelles de génotype δ -KO (rouge) ou δ -WT (violet) après chirurgie le traitement au CBD. Nous avons observé que les souris femelles δ -KO *Cuff* traitées au CBD (en rouge) avaient un temps moyen d'immobilité de 129 ± 20 secondes, plus élevé que celui des souris femelles δ -WT *Cuff* traitées au CBD (en violet) de 115 ± 23 secondes, cet écart de moyenne n'était pas significativement différent (test de Student non apparié, $p = 0,6765$). Nous avons donc pu en conclure que chez les femelles le génotype ne semblait pas associé à une modification des comportements de type dépressif dans ce contexte.

Figure 49 : Effet du génotype sur le temps d'immobilité de souris femelles *Cuff*.



Pour résumer, le test du FST n'a pas révélé d'apparition significative de comportements de type dépressif chez les souris mâles. Chez les mâles *Cuff*, le génotype δ -KO était associé à des comportements de type dépressifs moins marqués (contrairement à ce qu'on attendait), mais ce phénomène n'a pas été observé chez les femelles. Le traitement au CBD n'a pas été associé à une modification significative du temps d'immobilité mais il serait intéressant de vérifier son effet chez les souris n'exprimant pas le récepteur opioïde δ avec une expérience qui a plus de puissance statistique.

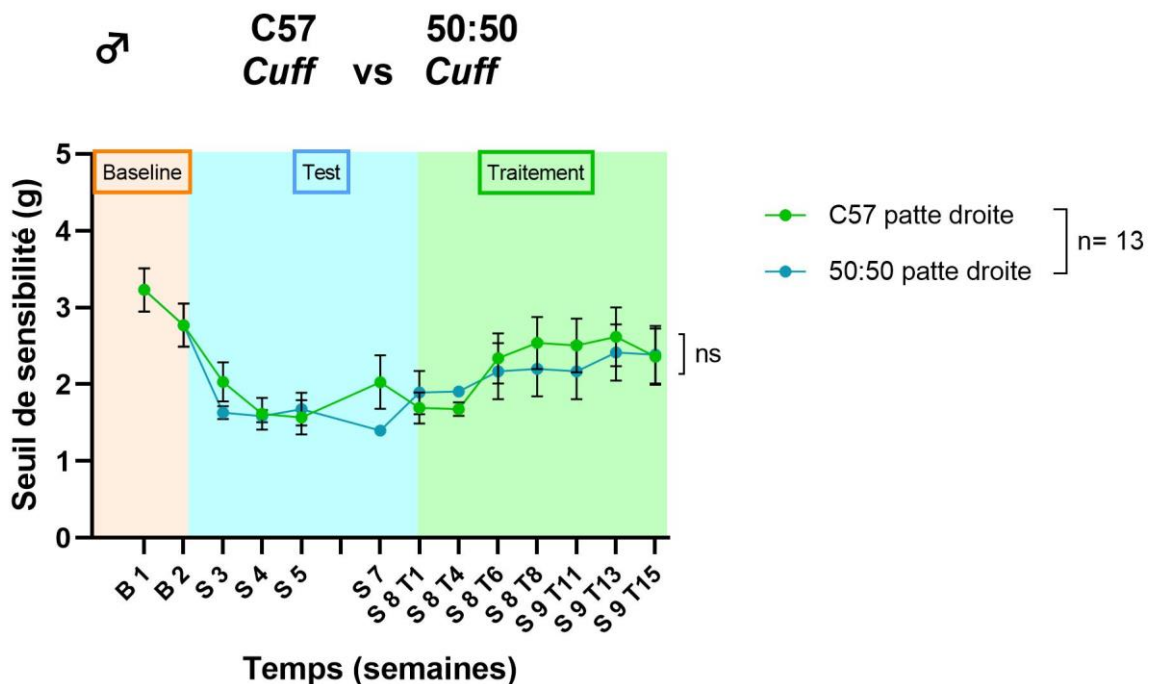
3.1.f Effet du fonds génétique sur les résultats des tests comportementaux des souris mâles.

Parmi les souris utilisées, il y avait des souris de deux fonds génétiques : des souris « C57 » avec un fonds C57Bl/6J et des souris « 50 : 50 » avec un fonds C57Bl/6J : 129svPas (50 : 50 %). Nous avons donc souhaité déterminer la potentielle influence du fonds génétique sur nos résultats.

3.1.f.1 Test des filaments de Von Frey

La figure 50 représente les résultats de souris mâles *Cuff* « C57 » (courbe verte) de souris mâles *Cuff* « 50 : 50 » (courbe bleue). On observe que le seuil de sensibilité des pattes droites entre elles n'était pas significativement différent (seuils variant entre 1,5 et 2,5 g). (ANOVA 2f ; effet fonds génétique $F_{(2, 24)} = 41,5$ et $p = 0,5484$). Ainsi, on peut conclure que dans ce contexte et pour le groupe mâle *Cuff*, nous n'avons pas observé d'association entre le fonds génétique et le seuil de sensibilité mécanique.

Figure 50 : Effet du fonds génétique sur le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures droites de souris mâles *Cuff*.

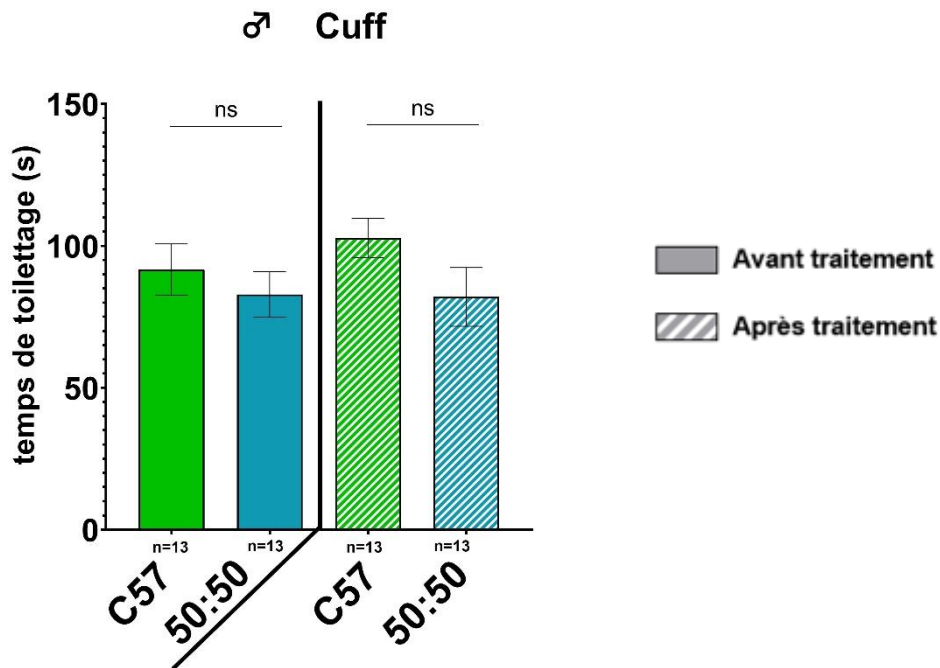


Représentation des résultats du test des filaments Von Frey mesurant l'évolution de la force (en g) du stimulus nécessaire pour induire un retrait de la patte postérieure (Patte droite = patte lésée) au cours du protocole. La moyenne \pm SEM est représentée. Les données ont été analysées avec un test ANOVA à deux facteurs (mesures répétées), et un test *post-hoc* de Tukey. (C57 : fonds génétique C57Bl/6J ; 50:50 : fonds génétique C57Bl/6J : 129svPas)

3.1.f.2 Test du *splash*

La figure 51 représente les résultats de souris mâles *Cuff* « C57 » (en vert) et de souris mâles *Cuff* « 50 : 50 » (en bleu). Avant traitement, les souris mâles *Cuff* « C57 » avaient un temps de toilettage de 92 ± 9 secondes, et les mâles *Cuff* « 50 : 50 » avaient un temps de toilettage de 82 ± 8 secondes. Après traitement, les « C57 » avaient un temps de toilettage de 103 ± 7 secondes et les « 50 : 50 » avaient un temps de toilettage de 82 ± 10 secondes. Ainsi le temps de toilettage des souris « 50 : 50 » était plus faible que celui des « C57 », avant et après traitement mais cette différence n'était pas significative (ANOVA 2f, interaction traitement – fonds génétique $F_{(1, 24)} = 0,89$ et $p = 0,355$; effet traitement $F_{(1, 24)} = 0,66$ et $p = 0,426$; effet fonds génétique $F_{(1, 24)} = 1,97$ et $p = 0,173$). Ainsi, le fonds génétique ne semblait pas être associé à des modifications du temps de toilettage des souris mâles *Cuff*.

Figure 51 : Effet du fonds génétique sur le temps de toilettage de souris mâles *Cuff*.



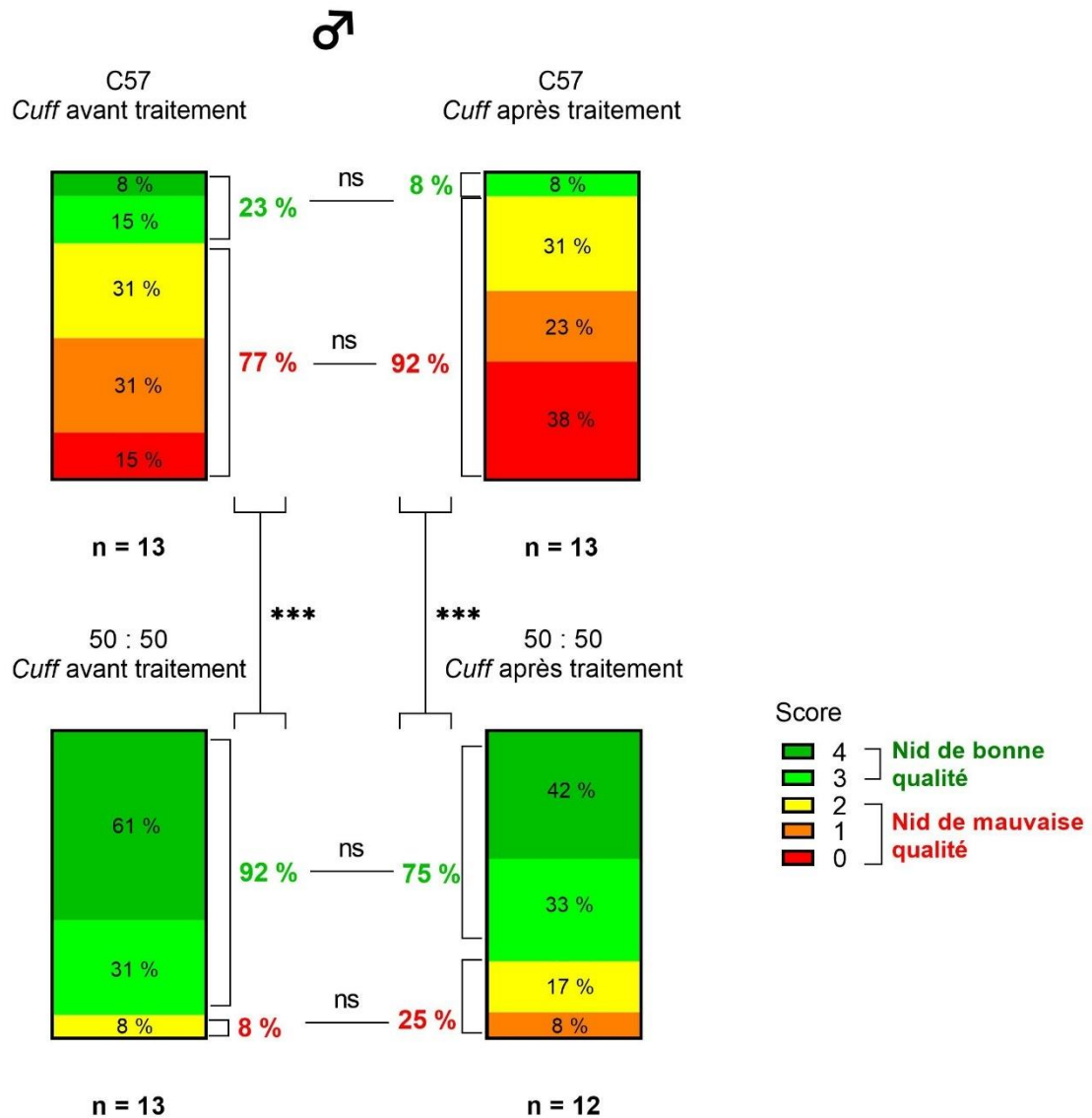
Représentation des résultats du test du *splash* mesurant le temps (en secondes) de toilettage total des souris sur une durée de 5 minutes. La moyenne \pm SEM est représentée, les points noirs représentant les données individuelles des animaux. Les données ont été analysées avec un test ANOVA à deux facteurs (mesures répétées). (C57 : fond génétique C57Bl/6J ; 50:50 : fond génétique C57Bl/6J : 129svPas)

3.1.f.3 Test du *nesting*

La figure 52 représente les résultats de souris mâles *Cuff* « C57 » (en haut) et de souris mâles *Cuff* « 50 : 50 » (en bas) avant et après traitement. Nous avons pu observer que la proportion des mâles « C57 » *Cuff* faisant des nids de bonne qualité avant traitement était de 3/13 (23 %), supérieure à celle observée après traitement qui était de 1/13 (8 %), et les proportions de mâles « C57 » *Cuff* faisant des nids de mauvaise qualité étaient respectivement de 10/13 (77 %) et de 12/13 (92 %) ; la différence entre ces pourcentages n'était pas significative (test de McNemar, $p = 0,4795$). De même nous avons pu observer que la proportion des mâles « 50 : 50 » *Cuff* faisant des nids de bonne qualité avant traitement était de 12/13 (92 %), supérieure à celle observée après traitement qui était de 9/13 (75 %), et les proportions de mâles « 50 : 50 » *Cuff* faisant des nids de mauvaise qualité étaient respectivement de 1/13 (8 %) et de 3/13 (25 %) ; la différence entre ces pourcentages n'était pas significative (test de McNemar, $p = 0,4795$). Ces résultats suggèrent qu'il n'y avait pas d'association entre le traitement et la qualité de fabrication du nid chez les souris « C57 » comme chez les « 50 : 50 », ce qui est en cohérence avec nos résultats trouvés précédemment. Cependant, nous avons également observé qu'avant traitement, la proportion de mâles *Cuff* faisant des nids de bonnes qualités des souris « 50 : 50 » (92 %) était significativement supérieure à celle chez les souris « C57 » (23 %) et de même après traitement (75 % contre 8 %) (test exact de Fisher, $p = 0,001$). Nous en avons donc conclu que le fonds génétique « 50 : 50 » était associé à une meilleure qualité de fabrication des nids.

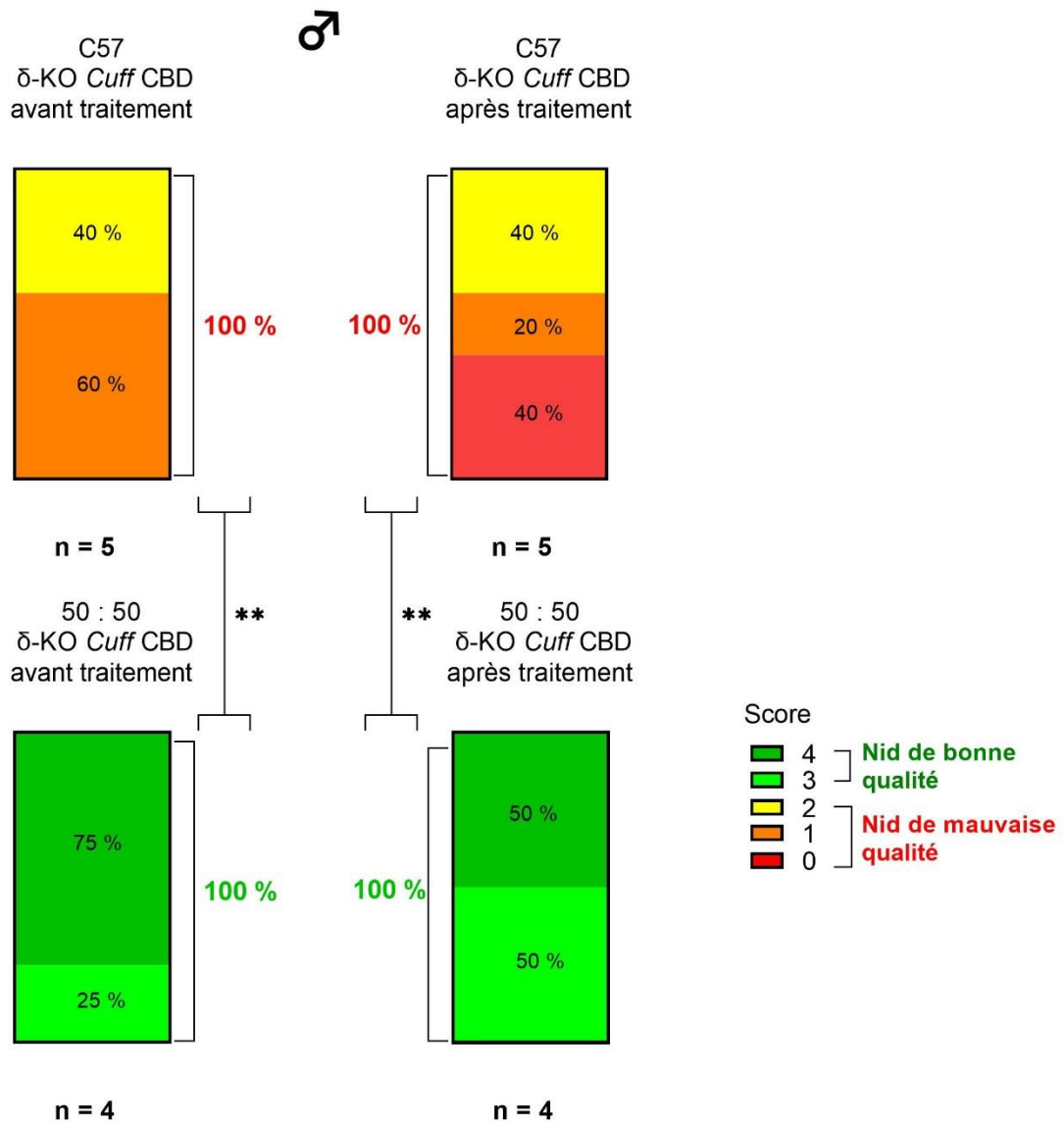
Nous avons voulu vérifier ce résultat avec le groupe de souris mâles δ -KO *Cuff* recevant du CBD (figure 53). Nous avons pu observer que 5/5 (100 %) des souris « C57 » δ -KO *Cuff* faisaient des nids de mauvaise qualité avant et après traitement et que 4/4 (100 %) des souris « 50 : 50 » δ -KO *Cuff* faisaient des nids de bonne qualité avant et après traitement. De plus, avant et après traitement, la proportion de mâles δ -KO *Cuff* faisant des nids de bonne qualité chez les souris « 50 : 50 » (100 %) était significativement supérieure à celle des souris « C57 » (0 %) (test exact de Fisher, $p = 0,0079$). Cela confirme les résultats présentés en figure 52.

Figure 52 : Effet du fonds génétique sur la qualité de fabrication du nid de souris mâles.



Représentations des résultats du test de *nesting* mesurant le score de qualité du nid des souris. Les pourcentages d'animaux en fonction du score, ainsi que les pourcentages globaux de la qualité des nids au sein des groupes sont représentées. Les données sont analysées avec un test de McNemar pour la comparaison des pourcentages avant et après traitement et avec un test exact de Fisher pour la comparaison des fonds génétiques entre eux avant traitement puis après traitement. (C57 : fonds génétique C57Bl/6J ; 50:50 : fonds génétique C57Bl/6J ; 129svPas ; CBD : cannabidiol)

Figure 53 : Effet du fonds génétique sur la qualité de fabrication du nid de souris mâles δ -KO *Cuff* CBD.



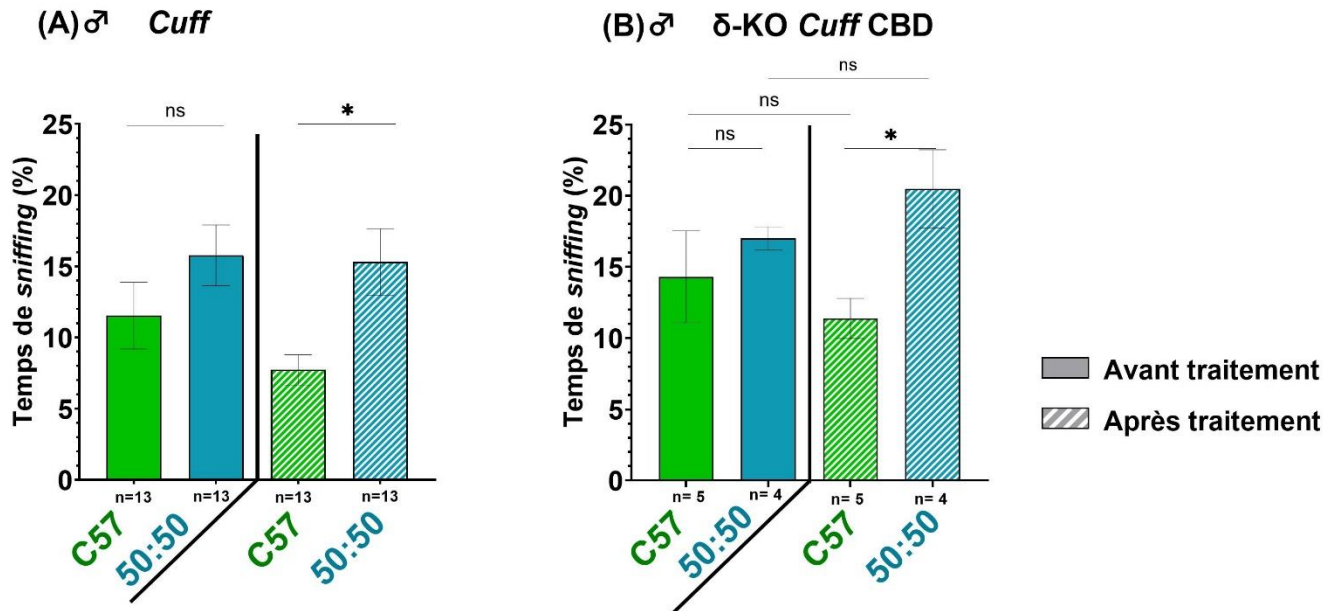
Représentations des résultats du test de *nesting* mesurant le score de qualité du nid des souris. Les pourcentages d'animaux en fonction du score, ainsi que les pourcentages globaux de la qualité des nids au sein des groupes sont représentées. Les données sont analysées avec un test exact de Fisher pour la comparaison des fonds génétiques entre eux avant traitement puis après traitement. (C57 : fonds génétique C57Bl/6J ; 50:50 : fonds génétique C57Bl/6J : 129svPas ; CBD : cannabidiol)

3.1.f.4 Test de l'interaction sociale

La figure 54.A représente les résultats de la comparaison de mâles *Cuff* de fonds génétique différents avant et après traitement. Avant traitement, les souris mâles *Cuff* « C57 » (en vert) avaient un pourcentage de temps de *sniffing* moyen de $11,5 \pm 2 \%$, inférieur à celui des mâles *Cuff* « 50 : 50 » (en bleu, $15,8 \pm 2\%$). Cette différence n'était pas significative (ANOVA 2f (modèle d'effet mixtes), effet du fonds génétique : $p = 0,0086$; test *post-hoc* de Sidak : $p_{\text{avant traitement}} = 0,239$). Après traitement, ils avaient respectivement des moyennes de $7,7 \pm 1 \%$ et de $15,3 \pm 2 \%$. Cette différence était significative (ANOVA 2f (modèle d'effet mixtes), effet du fonds génétique : $p = 0,0086$; test *post-hoc* de Sidak : $p_{\text{après traitement}} = 0,028$). Nous avons donc observé une association significative entre le fonds génétique et le temps d'interaction sociale après traitement au CBD. Ainsi les souris C57Bl/6J : 129svPas passaient globalement plus de temps à interagir avec leurs congénères que les souris C57Bl/6J.

Nous avons donc voulu étudier le temps d'interaction sociale de souris mâles δ -KO *Cuff* CBD en prenant en compte le fonds génétique pour voir si cela modifiait les résultats (figure 54.B). On peut voir que le pourcentage moyen d'interaction sociale des souris « C57 » avant traitement ($14,3 \pm 3 \%$) était inférieur (de manière non significative) à celui des souris « 50 : 50 » ($17 \pm 1 \%$), et que le pourcentage moyen des souris « C57 » après traitement ($11,4 \pm 1 \%$) était inférieur (de manière significative) à ceux des souris « 50 : 50 » ($20,5 \pm 3 \%$), (ANOVA 2f, effet fonds génétique $F_{(1, 7)} = 9,2$ et $p = 0,019$; test *post-hoc* de Sidak : $p_{\text{avant traitement}} = 0,678$ et $p_{\text{après traitement}} = 0,033$). Cela était cohérent avec les résultats trouvés en figure 46.A. On observe également qu'après traitement le pourcentage de temps de *sniffing* des souris « C57 » et des souris « 50 : 50 » variaient peu et ces évolutions n'étaient pas statistiquement significatives (ANOVA 2f, effet traitement $F_{(1, 7)} = 0,01$ et $p = 0,92$). Ces résultats suggèrent que le fonds génétique était associé avec une modification de l'interaction sociale chez les mâles *Cuff* (les souris « 50 : 50 » interagissant plus avec leurs congénères après traitement au CBD) et il s'agit donc là d'un paramètre qui doit être pris en compte dans l'analyse des résultats.

Figure 54 : Effet du fond génétique sur le temps de toilette de souris mâles *Cuff* (A) et des souris mâles du groupe *Cuff* de génotype δ -KO et recevant un traitement au CBD (B).

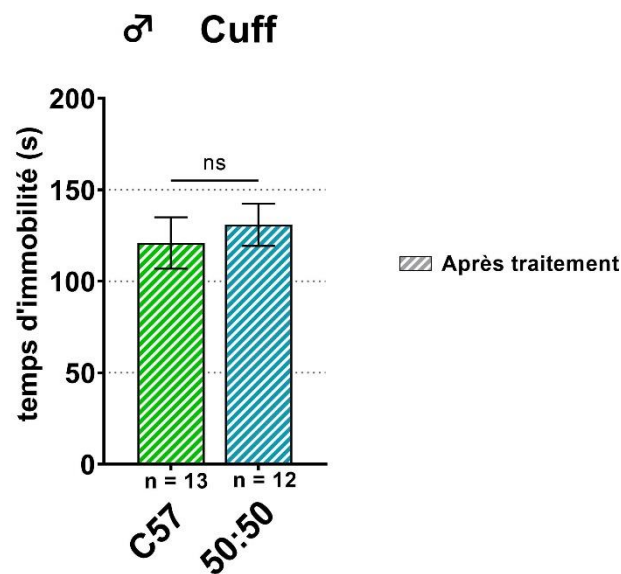


(*sniffing*) avec une souris inconnue. La moyenne \pm SEM est représentée, les points noirs représentant les données individuelles des animaux. Les données ont été analysées avec un test ANOVA à deux facteurs (mesures répétées) et un test *post-hoc* de Sidak. (C57 : fond génétique C57Bl/6J ; 50:50 : fond génétique C57Bl/6J : 129svPas ; CBD : cannabidiol)

3.1.f.5 Test du FST

La figure 55 représente les résultats de la comparaison de mâles *Cuff* de fonds génétiques différents après traitement. Nous avons pu observer qu'il n'y avait pas de différence significative entre le temps moyen d'immobilité des mâles *Cuff* de fonds génétique « C57 » (en vert, 121 ± 14 secondes) et celui des mâles *Cuff* de fonds génétique « 50 : 50 » (en bleu, 131 ± 12), (test t de Student non apparié : $p = 0,591$) après traitement au CBD. Ainsi, le fonds génétique ne semblait pas avoir d'effet significatif sur le temps d'immobilité des souris mâles *Cuff*.

Figure 55 : Effet du fonds génétique sur le temps d'immobilité de souris mâles *Cuff* traitées au CBD.



Représentation des résultats du test de la nage forcée (FST) mesurant le temps d'immobilité (en seconde) passé par une souris au lieu de nager, sur une durée de 6 minutes. La moyenne \pm SEM est représentée, les points noirs représentant les données individuelles des animaux. Les données ont été analysées avec un test ANOVA à un facteur. (C57 : fonds génétique C57Bl/6J ; 50:50 : fonds génétique C57Bl/6J : 129svPas ; CBD : cannabidiol)

Pour résumer, les résultats des tests des filaments de Von Frey, du *splash* et du FST ne semblaient pas être modifiés par des différences de fonds génétique. Par contre, les souris avec un fonds génétique pur C57Bl/6J faisaient des nids de moins bonne qualité avant et après traitement et avaient moins d'interactions sociales après traitement que les souris de fonds génétique C57Bl/6J : 129svPas. C'est donc un paramètre à prendre en compte et à contrôler pour de futurs protocoles comportementaux dans ce contexte.

Pour conclure l'analyse des résultats de l'étude comportementale, nous pouvons dire que :

- la chirurgie de pose du *cuff* entraînait une allodynie mécanique, et le soulagement de celle-ci semblait avoir été associé au traitement au CBD uniquement chez les mâles et les femelles exprimant le récepteur opioïde δ , suggérant la nécessité de l'expression du récepteur opioïde δ pour observer l'effet anti-allodynique du CBD ;

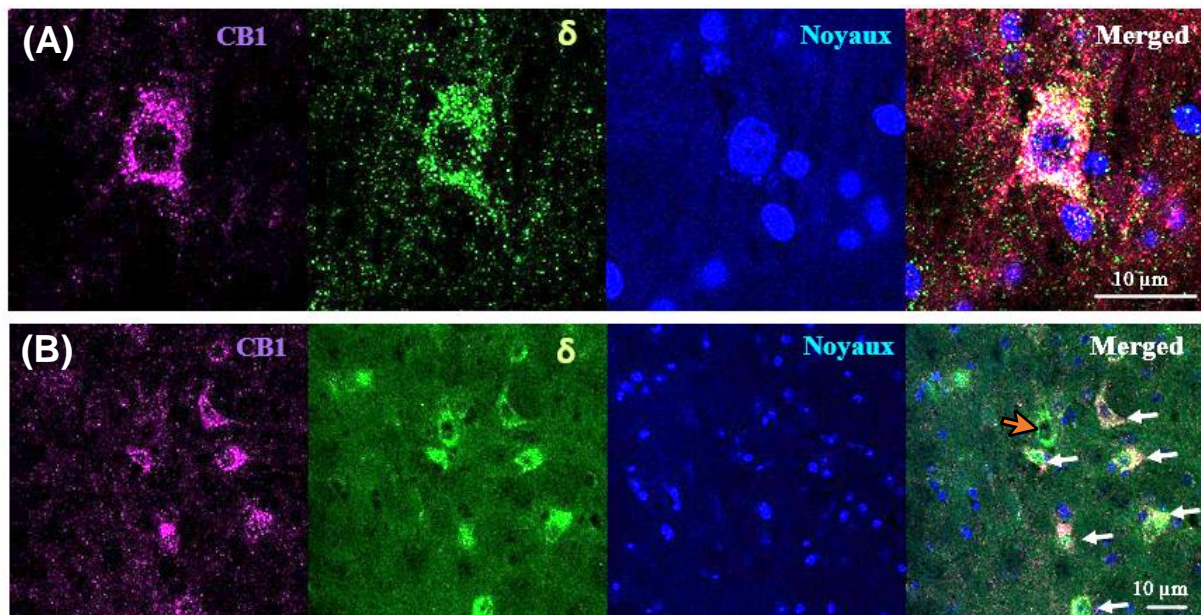
- les tests des comportements de type anxio-dépressif ne semblaient pas révéler l'apparition de ces signes cliniques chez les souris *Cuff* avant le traitement à part chez les mâles dans le test du *splash*, et l'expression du récepteur opioïde δ ainsi que le traitement au CBD n'ont pas été associés significativement à des modifications de ces comportements dans un sens ou dans l'autre ;

- le test du *nesting* et le test de l'interaction sociale semblaient avoir été influencés par le fonds génétique des souris, avec des souris C57Bl/6J :129svPas qui avaient des nids de meilleure qualité et qui interagissaient plus que leurs congénères C57Bl/6J.

3.2 Étude neuroanatomique

Afin de mieux comprendre les interactions entre les récepteurs CB₁ et δ dans un contexte de douleur neuropathique, nous avons cartographié les structures cérébrales dans lesquelles ces deux récepteurs sont co-localisés au niveau neuronal par immunohistochimie chez des souris montrant des signes d'allodynie mécanique à quatre semaines post-chirurgie, (*Cuff*, n = 4 mâles et 4 femelles) et des souris contrôles (*Sham*, n = 4 mâles et 4 femelles). Les figures 56.A et 56.B représentent des images de co-localisation neuronale visualisées dans les encéphales de souris analysés.

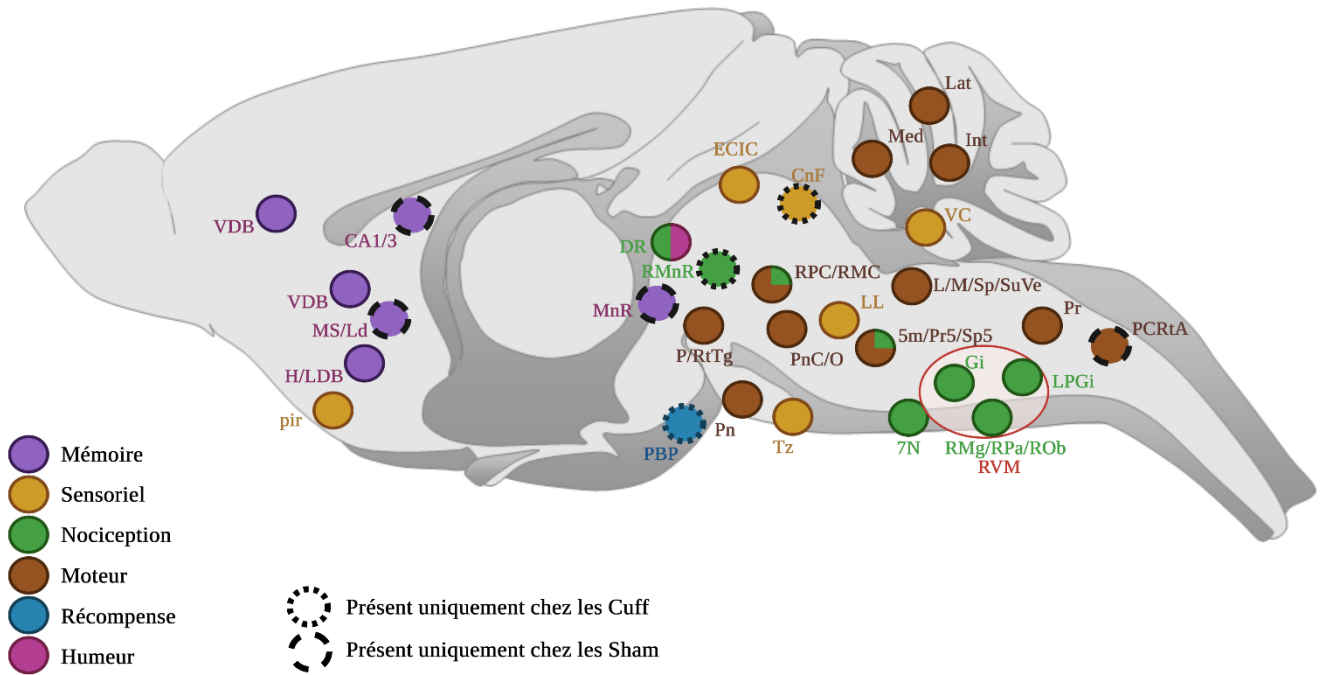
Figure 56 : Co-expression neuronale des récepteurs opioïde δ et CB₁ dans un (A) ou plusieurs (B) neurones du bulbe rachidien rostral ventromédial.



Images confocales montrant la co-localisation des deux récepteurs au sein du soma de neurones. Les noyaux sont marqués à l'aide du DAPI. En (B), les flèches blanches indiquent les neurones coexprimant les récepteurs opioïde δ et CB₁ et la flèche orange désigne un neurone exprimant uniquement le récepteur δ . **Merged** : superposition des trois images.

Deux encéphales de souris *Cuff* et deux encéphales de souris *Sham* (un mâle et une femelle à chaque fois) ont été analysés. Une appréciation qualitative de la quantité de neurones dans lesquels les récepteurs CB₁ et δ étaient co-localisés a été réalisée, en fonction des différentes structures cérébrales. Nous avons arbitrairement décidé de qualifier la co-localisation de faible (+, moins de cinq neurones dans la structure d'une coupe), modérée (++, entre cinq à dix neurones) ou élevée (+++, plus de dix neurones). Les résultats exhaustifs sont présentés en annexe (Annexe 3, tableau supplémentaire 1). Pour plus de clarté, les résultats présentés en figure 57 et tableau 6 correspondent aux structures cérébrales où la co-localisation entre les récepteurs opioïdes δ et CB₁ était la plus importante.

Figure 57 : Coupe sagittale d'un encéphale de souris montrant les structures dans lesquelles la co-localisation neuronale des récepteurs opioïde δ et CB₁ était la plus élevée, ainsi que la principale fonction cérébrale associée à ces structures.



La co-localisation a été estimée comme élevée si elle était détectée dans plus de 10 neurones de la structure sur une coupe. Analyse effectuée sur deux encéphales *Cuff* (patte postérieure lésée) et deux encéphales Sham (patte postérieure non lésée).

Tableau 6 : Liste des abréviations utilisées dans la figure 33 et leur structure cérébrale associée (Franklin et Paxinos, 2012).

Structure cérébrale	Abréviation	Structure cérébrale	Abréviation
Cortex		Noyau duraphé rostromédian	RMnR
Cortex piriforme	pir	<i>Noyau rouge</i>	
Prosencéphale		Noyau rouge (partie magno- parvocellulaire)	RMC/RPC
Noyau ventral de la bande diagonale de Broca	VDB	<i>Formation réticulée</i>	
Noyau horizontal de la bande diagonale de Broca	HDB	Noyau cunéiforme	CnF
Noyau latéral de la bande diagonale	LDB	Noyau réticulaire du pont (partie orale/caudale)	PnO/C
Noyau septal médial	MS	Noyau réticulé parvocellulaire	PcRtA
Zone septale lambdaïde	Ld	Noyau gigantocellulaire	Gi
Formation hippocampale		Noyau paragigantocellulaire latéral	LPGi
Champs CA1 et 3 de l'hippocampe	CA1/3	<i>Tectum</i>	
Tronc cérébral		Cortex externe du collicule inférieur	ECIC
<i>Système auditif</i>		<i>Tegmentum</i>	
Noyau cochléaire ventral	VC	Noyau réticulotegmental du pont	RtTg
Lemnisque latéral	LL	Noyau tegmental pedonculopontin	PTg
Noyau du corps trapézoïde	Tz	<i>Trigéminé</i>	
<i>Noyaux des nerfs crâniens</i>		Noyau trigéminé principal/spinal	5m /Pr5/Sp5
Noyau facial	7N	<i>Vestibulaire</i>	
<i>Oculomoteur</i>		Noyau vestibulaire médial/latéral/spinal/supérieur	M/L/Sp/SuVe
Noyau préposé	Pr	Cervelet	
Noyau parabrachial pigmenté	PBP	Noyau latéral (denté) du cervelet	Lat
<i>Raphé</i>		Noyau médial du cervelet	Med
Noyau du raphé magnus, obscurus, pallidus	RMg/Ob/Pa	Noyau interposé du cervelet	Int
Noyau du raphé dorsal	DR	Autres	
Noyau du raphé médian	MnR	Noyaux du pont	Pn
		Bulbe rachidien rostral ventromédial.	RVM

Parmi ces structures cérébrales, nous avons identifié la RVM, impliquée notamment dans les voies descendantes de la douleur. Une première estimation indiquait que 50 % des neurones CB₁ exprimaient également le récepteur opioïde δ et qu'environ 30 % des neurones δ exprimaient le récepteur CB₁. Les autres régions incluaient les noyaux du pont, les noyaux de la bande diagonale de Broca, l'hippocampe, les noyaux du raphé, les noyaux du cervelet, le noyau rouge (système sensorimoteur), ainsi que des noyaux des systèmes vestibulaire, trigéminal et auditif. Lors de cette cartographie, nous n'avons pas observé de différence marquante entre mâle et femelle. Les encéphales en attente d'analyse nous permettront de mieux évaluer une possible influence du sexe sur la co-localisation des récepteurs opioïdes δ et CB₁.

De plus, la plupart des structures où les récepteurs étaient co-localisés chez les souris *Cuff* étaient similaires chez les souris *Sham* avec quelques exceptions : la zone septale et le noyau septal, l'hippocampe, le noyau du raphé médian (fonction de mémorisation) et le noyau réticulé parvicellulaire (fonction motrice) étaient des structures où la co-localisation était élevée uniquement chez les *Sham* ; le noyau parabrachial pigmenté (fonction de récompense), le noyau du raphé rostromédian (fonction nociceptive) et le noyau cunéiforme (fonction sensorielle) étaient des structures où la co-localisation était élevée uniquement chez les *Cuff*. L'analyse des quatre encéphales restants apportera sans doute plus d'information et de précision sur cette analyse qualitative de la co-localisation des récepteurs opioïdes δ et CB₁.

4. Discussion

4.1. Étude comportementale

4.1.a. Allodynie mécanique

Le premier objectif de cette thèse était de déterminer l'effet d'un traitement chronique au CBD sur l'allodynie mécanique, et de déterminer la potentielle implication du récepteur opioïde δ dans cet effet.

Effet des paramètres étudiés sur l'allodynie mécanique

Les premiers résultats obtenus suggèrent que l'allodynie mécanique apparaissait au niveau des pattes lésées après la chirurgie, tant pour les mâles que pour les femelles. Ce résultat est cohérent avec ce qui est connu du modèle du *Cuff* (Benbouzid *et al.*, 2008 ; Yalcin *et al.*, 2011), mais aussi d'autres modèles de lésion du nerf sciatique (Jaggi *et al.*, 2011) où une allodynie mécanique apparaît rapidement et persiste au moins deux mois. Ils suggèrent également que l'absence du récepteur opioïde δ n'empêche pas la mise en place de cette allodynie post-chirurgicale chez les mâles comme les femelles, ce qui est cohérent avec le fait que ce récepteur n'est pas impliqué dans la transmission nociceptive mais plutôt dans sa modulation (Abdallah et Gendron, 2018). De plus nos résultats suggéraient de manière non statistiquement significative que l'allodynie mécanique tendait à être plus marquée en l'absence du récepteur opioïde δ par rapport au génotype sauvage, ce qui est cohérent avec ce qui a été décrit dans la littérature (Gavériaux-Ruff et Kieffer, 2011)

Nos résultats suggèrent que le traitement chronique au CBD soulageait l'allodynie mécanique causée par la compression du nerf sciatique chez les mâles et les femelles exprimant le récepteur opioïde δ (δ -WT). Ceci est en accord avec la littérature. En effet, l'administration systémique de CBD a diminué l'allodynie mécanique dans un modèle de lésion partielle du nerf sciatique chez le rat mâle (De Gregorio *et al.*, 2019) et le CBD a prévenu l'apparition de l'allodynie mécanique chez des souris femelles traitées avec une molécule de chimiothérapie (Ward *et al.*, 2011). Néanmoins, Woller et collaborateurs (2015) ont montré que les femelles pouvaient avoir un soulagement de l'allodynie mécanique plus précoce que les mâles, il est donc nécessaire de contrôler nos résultats avec un groupe de mâles et de femelles WT recevant la solution contrôle.

De plus, l'étude de De Gregorio et collaborateurs ne mentionnent que l'implication des récepteurs 5HT_{1A} et TRPV1 dans cet effet du CBD. Nos résultats suggèrent cependant que le récepteur opioïde δ serait également impliqué dans cet effet anti-allodynique car nous n'avons pas observé de soulagement de l'allodynie mécanique chez les souris de génotype δ -KO recevant du CBD. Cela va dans le sens d'autres études montrant l'implication de ce récepteur dans les mécanismes d'actions de molécules anti-allodyniques tels que les antidépresseurs (duloxetine) ou les bêta-mimétiques (formoterol) (Gavériaux-Ruff et Kieffer, 2011 ; Ceredig *et al.*, 2018 ; Ceredig *et al.*, 2020).

Limitations méthodologiques

Ces résultats n'étant que préliminaires, ils sont à relativiser. Ils doivent bien entendu être confirmés par le reste des groupes contrôles ainsi que des effectifs plus importants. En effet, il manque particulièrement le groupe des souris δ -WT recevant la solution contrôle, pour vérifier si on observe une persistance de l'allodynie mécanique pendant le traitement. Seulement dans ce cas-là pourrions nous conclure que le CBD a bien un effet anti-allodynique. Concernant l'aspect technique, ces résultats ayant été obtenus en aveugle par des techniciens de laboratoire très habitués au test et à la lecture des réactions des souris, le risque de biais technique a été réduit.

4.1.b. Comportements de type anxio-dépressif

Le deuxième objectif de cette thèse était de déterminer l'effet d'un traitement chronique au CBD sur les comportements de type anxio-dépressif liés à la douleur neuropathique, et de déterminer la potentielle implication du récepteur opioïde δ dans cet effet.

Effet des paramètres étudiés sur les comportements de type anxio-dépressif

Les résultats des différents tests réalisés exceptés ceux du *splash* ne nous permettent pas de conclure que les souris atteintes de douleur neuropathique ont exprimé les comportements de type anxio-dépressif attendus après la chirurgie. Cela n'est pas en cohérence avec la littérature, notamment avec les travaux précédents sur le modèle du *cuff* de notre laboratoire (Benbouzid *et al.*, 2008 ; Yalcin *et al.*, 2011 ; Kremer *et al.*, 2021), dans lesquels les tests utilisés dans notre protocole ont montré une apparition de comportements de type anxio-dépressif associés à une douleur neuropathique.

De plus, nos résultats préliminaires, avec leurs effectifs limités, n'ont pas montré chez les mâles d'association entre la présence ou non du récepteur opioïde δ et des changements dans les comportements de type anxio-dépressif. Ceci diffère des résultats obtenus dans l'étude de Filliol et collaborateurs (2000). Cet article a montré que les souris déficientes pour le récepteur opioïde δ exprimaient plus de comportements de type anxio-dépressif que les souris δ -WT, dans les tests de l'*elevated plus maze*, *light-dark box test* et du FST. Ce récepteur est impliqué dans la fonction de régulation de l'humeur (Pradhan *et al.*, 2011) mais les premiers résultats de cette thèse ne suffisent pas pour pouvoir conclure que ce rôle du récepteur opioïde δ soit lié aux mécanismes d'action du CBD.

Nos résultats chez les femelles suggèrent que le génotype δ -KO était associé à un temps d'interaction plus faible et à des nids de moins bonne qualité que ceux des δ -WT mais à un temps de toilettage plus élevé que celui des δ -WT. Néanmoins cela ne nous permet pas de conclure clairement sur les comportements de type anxio-dépressif chez les souris femelles. Il est difficile de comparer ces résultats à la littérature car trop peu d'études incluent des femelles dans les tests réalisés. Il est pourtant communément admis que chez l'humain, les troubles anxio-dépressifs sont plus fréquents et plus sévères chez la femme (Cover *et al.*, 2014). L'utilisation majoritaire de souris mâles dans les protocoles entraîne l'un des plus gros biais des études précliniques sur l'anxiété et la dépression. Dans les études testant les deux sexes, le niveau d'anxiété des femelles est généralement plus bas que celui des mâles (Lovick et Zangrossi, 2021). Ces auteurs font l'hypothèse que ce niveau est plus bas car les femelles expriment peut-être différemment leurs états d'anxiété, d'une manière qui n'est pas détectée par les tests comportementaux développés et conçus pour les mâles. L'influence du cycle hormonal sur ces tests est également très débattue. Le problème réside dans le fait qu'il n'existe pas encore de méthode uniformément utilisée pour prendre en compte ce paramètre dans les protocoles anxio-dépressifs. Il est néanmoins essentiel de continuer d'inclure les femelles dans ces tests pour que le modèle animal puisse être considéré comme valide et réellement représentatif des troubles psychiatriques humains.

Enfin, nos résultats actuels n'ont pas non plus montré d'association du CBD avec une variation de comportement de nos souris. De Gregorio et collaborateurs (2019) avaient pourtant observé un effet anxiolytique du CBD dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat (*Spared nerve injury*), notamment dans le test de l'*elevated plus maze* ou du *novelty-suppressed feeding test*.

Limitations méthodologiques

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer que nous ne puissions pas tirer de conclusions certaines à propos de nos résultats préliminaires. Déterminer un comportement de type anxio-dépressif chez la souris n'est pas une tâche simple, et il n'existe pas un unique test parfait. Il faut souvent une combinaison de plusieurs tests pour pouvoir être confiant dans ses conclusions. Il existe de nombreux tests à la disposition des chercheurs pour étudier ce type de comportement. Nous avons fait le choix des tests du *nesting*, du *splash* et de l'interaction sociale parce que ces tests impliquent des comportements innés de la souris, sont facilement répétables et ne sont pas les plus stressants. Ce point était important car notre protocole était long et chaque souris devait passer de nombreux tests. Nous avons fait le choix du FST plutôt que du test de suspension par la queue pour des raisons éthiques principalement. Une hypothèse est que nos souris n'exprimaient réellement pas de comportements de type anxio-dépressif ; une autre est que les tests n'ont pas réussi à les révéler ou bien révélaient autre chose. Par exemple, le test de *nesting* est généralement considéré comme un révélateur du mal-être de l'animal (Jirkof, 2014). Ainsi, la qualité du nid est diminuée chez les animaux souffrant de douleur postopératoire et s'améliore après injection d'analgésiques (Oliver *et al.*, 2018). Néanmoins, une amélioration du score de *nesting* chez les mâles a également été observée dans notre équipe dans un protocole d'exposition à la mycotoxine déoxyynivalénol, une molécule induisant entre autres des comportements de type anxio-dépressif (Faeste *et al.*, 2019). Dans nos conditions, ce test pourrait donc avoir préférentiellement reflété des comportements différents tels qu'une activité compulsive, comme décrit par Greene-Schlosser et collaborateurs (2011). Dans le futur, une possibilité sera de tester les souris avec l'*elevated plus maze* ou le test de clair-obscur (*light-dark box test*) et de voir si on observe d'autres résultats.

Une autre explication à nos résultats non concluants repose sur des facteurs expérimentaux et environnementaux. En effet les tests de comportement sont très sensibles à l'environnement et aux conditions dans lesquels ils sont réalisés. Nos souris n'étaient pas en cycle inversé. Nous les avons testées au maximum le matin (entre 8h et 11h) mais parfois la logistique nous en empêchait. Le fait que certains tests aient été réalisés pendant leur phase habituelle de sommeil peut amener un biais. De plus lors de la période de manipulation, il y a eu parfois des passages inhabituels au sein de la zone d'animalerie et des salles de tests, perturbant l'environnement de calme nécessaire et augmentant le stress des souris. Il faut aussi prendre en compte le biais de l'expérimentateur : comme nous étions deux à réaliser les tests, malgré les précautions que nous avons prises, cela a pu être un élément perturbateur. Nous avons analysé les tests en aveugle lorsque c'était possible (utilisation de vidéos analysées une fois en direct pendant le test puis a posteriori par quelqu'un d'autre) mais le

splash par exemple n'a pas pu être évalué en aveugle, ce qui apporte un biais supplémentaire. Enfin, la durée de notre protocole était longue (entre neuf et onze semaines). Or, le modèle du *cuff* induit des signes cliniques transitoires qui disparaissent spontanément au bout d'un certain temps (figure 11, (Yalcin *et al.*, 2011)). Il se peut que lors de la seconde semaine de tests pendant le traitement chronique, on soit arrivé à la période où les signes cliniques sont réduits.

4.1.c. Effet du fonds génétique

Les circonstances logistiques du laboratoire nous ont conduit à travailler avec des souris de deux fond génétique différents. Nous avons donc voulu vérifier l'influence de ce paramètre sur nos résultats. Nous n'avons pas observé de différence de niveau d'allodynie mécanique entre le fonds « C57 » et le fonds « 50 : 50 ». Pourtant, des études décrivent le fonds génétique C57 comme plus sensible à la nociception thermique et chimique, mais comme moins sensible que le fonds 129 à l'allodynie mécanique. De plus, les souris C57 seraient moins sensibles aux molécules analgésiques que les souris 129 (Mogil, 1999 ; Lariviere *et al.*, 2001). Des études précédentes dans notre laboratoire ont montré un effet anti-allodynique des antidépresseurs et des bêta-mimétiques chez des souris de fonds génétique « 50 : 50 », justifiant notre choix d'utiliser ce fond génétique dans notre étude (Ceredig *et al.*, 2018 ; Ceredig *et al.*, 2020).

Nous n'avons pas observé de différence significative de toilettage entre les deux fonds génétiques, mais la diminution non significative du temps moyen de toilettage des souris « 50 : 50 » tendait à aller dans le sens de l'étude de (Kalueff et Tuohimaa, 2004), qui indique que les souris 129 montraient une activité de toilettage réduite par rapport aux C57. Néanmoins, nos résultats suggèrent que les « 50 : 50 » faisaient des meilleurs nids et interagissaient plus que les « C57 », ce qui laisse penser qu'elles exprimeraient moins de mal-être et d'anxiété. Cela contraste avec la littérature qui décrit les souris 129 comme plus anxieuses notamment dans les test de l'*elevated plus maze* et du test clair-obscur (Rodgers *et al.*, 2002a ; Rodgers *et al.*, 2002b). Il est intéressant de noter que dans ces deux études, les souris 129 ont également montré une résistance aux molécules anxiolytiques. Cette différence de résultat peut peut-être s'expliquer par le fait que les souris « 50 : 50 » ne soient pas d'un fonds génétique 129 « pur » et que leur profil éthologique soit moins typique que les fonds C57 ou 129. En tout cas, le fonds génétique est un paramètre capital à prendre en compte dans les études comportementales sur la douleur neuropathique car c'est un facteur de biais.

4.2 Étude neuroanatomique

Le troisième objectif de cette thèse était de cartographier la co-localisation neuronale des récepteurs opioïdes δ et CB₁ pour identifier les structures cérébrales dans lesquelles ces récepteurs pourraient s'hétéromériser.

4.2.a Structures et leurs fonctions

Nous avons cartographié la co-localisation neuronale des récepteurs opioïdes δ et CB₁ dans l'encéphale de deux souris souffrant de douleur neuropathique. La co-localisation était particulièrement visible dans les noyaux de la bande diagonale de Broca qui servent de relais bidirectionnel entre le cortex et l'hippocampe, le thalamus, l'hypothalamus, l'amygdale et le tronc cérébral (Semba, 2000). La co-localisation neuronale était également importante dans les structures impliquées dans le système auditif, vestibulaire (rôle dans la posture et l'équilibre), ainsi que dans le système trigéminal, les noyaux du pont et le cervelet, impliqués dans le contrôle sensorimoteur (Watson *et al.*, 2012). De plus, elle était présente dans le noyau rouge, principalement impliqué dans la posture et la motricité volontaire. Ce dernier reçoit de nombreuses afférences (cortex, cervelet, noyaux du raphé, noyaux parabrachiaux) et émet des projections rubro-olivaires, rubro-spinales et sur les noyaux précérébelleux (Watson *et al.*, 2012). Le noyau rouge aurait également une fonction anti-nociceptive car sa stimulation électrique provoquerait de l'analgésie chez le rat (Peschanski et Mantyh, 1983 ; Kumar *et al.*, 1995), et le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) jouerait un rôle à la fois pro et anti-nociceptif dans ce noyau (Wang *et al.*, 2015). Quant au noyau parabrachial pigmenté, il joue notamment un rôle dans la nociception et dans le système de la récompense (Yamamoto *et al.*, 2009). Enfin, une autre structure d'intérêt était le noyau du raphé dorsal, au centre du système sérotoninergique et jouant un rôle important dans la régulation de l'humeur (notamment l'anxiété et la dépression) (Michelsen *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 2019) ; le fait que nos deux récepteurs d'intérêt colocalisent dans cette région serait peut-être associé à leurs éventuelles fonctions anxiolytique et antidépressive.

La co-localisation neuronale des récepteurs CB₁ et opioïde δ était particulièrement abondante dans le noyau gigantocellulaire et les noyaux du raphé postérieur de la RVM. Cette région est impliquée dans le contrôle descendant de la douleur. Elle reçoit des afférences de l'aire grise périaqueducale, du thalamus, du noyau parabrachial et du locus coeruleus et envoie des efférences au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Ossipov *et al.*, 2014). La RVM module positivement ou négativement la douleur, via respectivement une activité sérotoninergique et noradrénergique. De plus, la libération de peptides opioïdes

endogènes (β -endorphine et met-enképhaline) dans cette région supprime l'allodynie mécanique en conditions neuropathiques (De Felice *et al.*, 2011 ; Stagg *et al.*, 2011).

En résumé, les récepteurs CB₁ et opioïde δ étaient colocalisés dans des régions impliquées dans des fonctions sensorielles, liées à la régulation de l'équilibre et de la motricité, ainsi que dans des fonctions nociceptives et émotionnelles. Nos résultats de cartographie ont identifié par exemple les noyaux de la zone septale, les noyaux latéral, médial et interposé du cervelet ou encore des noyaux spécifiques des structures tegmentales, trigéminées et vestibulaire du tronc cérébral. Ces résultats concordent avec l'étude de Bushlin et collaborateurs (2012), qui ont identifié des hétéromères δ -CB₁ chez des rats atteints de douleur neuropathique dans le cervelet, l'hypothalamus et le tronc cérébral à l'aide d'anticorps spécifiques. Nous avons retrouvé ces mêmes régions ainsi que d'autres structures de l'encéphale. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les auteurs ont étudié moins de régions mais ont vérifié la présence d'hétéromères, alors que notre cartographie est plus étendue mais nous n'avons vérifié que la co-localisation. Par la suite nous devons également vérifier la co-localisation des récepteurs dans la corne dorsale de la moelle épinière où Sierra et collaborateurs (2019) ont détecté l'hétéromérisation des récepteurs opioïdes δ et CB₁ chez la souris en conditions neuropathiques. Nous devons vérifier l'hétéromérisation des récepteurs (par un test de liaison de proximité (PLA) par exemple).

4.2.b Effet de la chirurgie et du sexe

Nous n'avons pas détecté de différence mâles et femelles pour l'instant ; et la plupart des régions trouvées chez les *Cuff* étaient similaires à celles identifiées chez les *Sham*, à l'exception par exemple du noyau parabrachial pigmenté où la co-localisation n'était visible que chez les *Cuff* et l'hippocampe où la co-localisation était principalement visible chez les *Sham*. Il faudra attendre l'analyse des quatre cerveaux restant pour voir si d'autres différences émergent. De plus, les cerveaux ayant été récoltés quatre semaines après la chirurgie, tous les comportements de type anxio-dépressif n'ont pas eu le temps d'apparaître. Il serait intéressant de voir s'il y a des différences dans des cerveaux fixés huit semaines après la chirurgie, notamment dans les structures impliquées dans les troubles du comportement.

4.2.c Limitations méthodologiques

Nous avons analysé des encéphales entre mâles et femelles, ainsi que *Sham* et *Cuff* dans le but d'identifier des différences de co-localisation. Tout d'abord, le signal fluorescent associé aux CB₁ était d'intensité variable selon les régions : essentiellement présynaptique et très visible dans le cortex ou l'hippocampe, il était beaucoup plus faible dans le cerveau postérieur rendant difficile l'identification des neurones positifs. De plus, l'objectif était de faire une cartographie complète allant des bulbes olfactifs à la fin du tronc cérébral et du cervelet. Sur un encéphale individuel, il se peut qu'une structure n'ait pas été visible sur les coupes. La réplication de l'analyse sur huit encéphales en tout devrait réduire ce biais. Enfin, l'étude se poursuit déjà par la quantification dans l'hippocampe et la RVM du nombre de neurones co-localisant les deux récepteurs.

Conclusion

Ce travail de thèse vétérinaire aura donc permis d'apporter des éléments de réponses préliminaires aux objectifs de notre projet.

En effet, concernant l'effet d'un traitement chronique au CBD sur la douleur neuropathique, on a vu que chez des souris exprimant le récepteur opioïde δ , le seuil de sensibilité mécanique (représentatif de l'allodynie mécanique) est passé d'un seuil bas après lésion du nerf sciatique (retrait de la patte après un stimulus de 1,4 g) à un seuil plus élevé (environ 3 g), similaire à celui des pattes non lésées, à partir de quatre jours de traitement quotidien au CBD. Cette augmentation du seuil n'était pas visible chez les souris n'exprimant pas le récepteur opioïde δ . Cela suggère une nécessité de la présence de ce récepteur pour l'action antinociceptive du CBD. Par contre, les tests comportementaux évaluant les états de type anxio-dépressif n'ont pas été concluants. Ils n'ont pas révélé d'apparition des signes cliniques recherchés et le traitement au CBD n'a pas été associé significativement à des variations de comportements.

La suite de ce projet prévoit de poursuivre les manipulations et les analyses pour les groupes contrôles restants. L'implication des récepteurs opioïdes δ centraux ou périphériques dans la réponse antinociceptive sera déterminée en les bloquant par un traitement préalable avec l'antagoniste naloxone méthiodide, qui ne passe pas la barrière hématoencéphalique. Les travaux antérieurs du laboratoire ont en effet montré dans notre modèle que l'effet antinociceptif des antidépresseurs (duloxétine) ou des bêta-mimétiques (formotérol) implique exclusivement les récepteurs opioïdes δ périphériques (Gavériaux-Ruff et Kieffer, 2011 ; Ceredig *et al.*, 2018 ; Ceredig *et al.*, 2020). Enfin dans un projet futur, il serait intéressant de vérifier l'effet anxiolytique du CBD avec les tests du champ ouvert, de clair-obscur ou du labyrinthe en croix surélevé.

Deuxièmement, la cartographie de la co-localisation neuronale des récepteurs opioïdes δ et CB₁ a révélé la présence de cette co-localisation au sein de régions impliquées dans des fonctions sensorielles, liées à la régulation de l'équilibre et de la motricité, ainsi que dans des fonctions nociceptives et émotionnelles. Cette co-localisation dans des régions d'intérêt pour les signes cliniques de la douleur neuropathique est prometteuse pour l'étude des hétéromères et du CBD en tant que cible thérapeutique. Leur présence devra maintenant être confirmée et leur inactivation dans des structures cérébrales spécifiques que nous avons identifiées nous permettra de mieux comprendre les phénomènes qui se mettent en place en cas de douleur neuropathique et ses comorbidités.

Notre étude se poursuivra donc par l'analyse des encéphales restants. Notre analyse qualitative pourra être complétée par une quantification des neurones co-exprimant les récepteurs dans les régions d'intérêt telles que la RVM et par l'identification de la nature de ces neurones à l'aide de marqueurs neuronaux. L'interaction physique entre les deux récepteurs, paramètre nécessaire à l'hétéromérisation, devra également être confirmée notamment par co-immunoprécipitation ou PLA. Enfin, nous pourrions déterminer la co-localisation et l'interaction des récepteurs opioïdes δ et CB_1 dans la moelle épinière et les ganglions spinaux pour creuser l'hypothèse du rôle des récepteurs périphériques. Pour finir, je ne m'attendais pas au niveau important de co-localisation des deux récepteurs dans de nombreuses structures à fonction sensorimotrice. Notre modèle induisant une lésion nerveuse chronique sur une patte postérieure, un autre axe de recherche intéressant serait de déterminer si cette co-localisation δ - CB_1 est modifiée dans les structures cérébrales sensorimotrices des souris neuropathiques, et si cela se reflète concrètement par des changements du contrôle de la motricité.

Liste des références bibliographiques

- ABDALLAH K., GENDRON L. (2018) The Delta Opioid Receptor in Pain Control. *Handb. Exp. Pharmacol.* 247, 147-177
- ADAMS R., HUNT M., CLARK J. (1940) Structure of cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of Minnesota wild hemp. *J Am Chem Soc* 62, 196-200
- ALMEIDA D.L., DEVI L.A. (2020) Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacol. Res. Perspect.* 8(6), e00682
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (Éd.) (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5, 5^e ed. Washington, D.C, American Psychiatric Publishing
- ATAK J., LAVREYSEN H. (2010) Agonist. In *Encyclopedia of Psychopharmacology*. Ed. Stolerman, I. Berlin, Springer, pp 45-45
- BAIR M.J., ROBINSON R.L., KATON W., KROENKE K. (2003) Depression and Pain Comorbidity: A Literature Review. *Arch. Intern. Med.* 163(20), 2433
- BARANOVIĆ G. (2021) Understanding the conformational, electronic and vibrational properties of Tetrahydrocannabinol (THC) and Cannabidiol (CBD). Pharmacophoric similarities and differences. *J. Mol. Struct.* 1244, 130945
- BENBOUZID M., PALLAGE V., RAJALU M., *et al.* (2008) Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *Eur. J. Pain* 12(5), 591-599
- BENÍTEZ-ANGELES M., MORALES-LÁZARO S.L., JUÁREZ-GONZÁLEZ E., ROSENBAUM T. (2020) TRPV1: Structure, Endogenous Agonists, and Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 21(10), 3421
- BENNETT M. (2001) The LANSS Pain Scale: the Leeds assessment of neuropathic symptoms and signs. *Pain* 92(1-2), 147-157
- BioRender. (2017) [Logiciel], Toronto, Biorender
- BISOGNO T., HANUŠ L., DE PETROCELLIS L., *et al.* (2001) Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br. J. Pharmacol.* 134(4), 845-852
- BLANKMAN J.L., CRAVATT B.F. (2013) Chemical probes of endocannabinoid metabolism. *Pharmacol. Rev.* 65(2), 849-871
- BONACCORSO S., RICCIARDI A., ZANGANI C., CHIAPPINI S., SCHIFANO F. (2019) Cannabidiol (CBD) use in psychiatric disorders: A systematic review. *Neurotoxicology* 74, 282-298
- BONN-MILLER M.O., LOFLIN M.J.E., THOMAS B.F., *et al.* (2017) Labeling Accuracy of Cannabidiol Extracts Sold Online. *JAMA* 318(17), 1708-1709
- BOUHASSIRA D., ATTAL N., ALCHAAR H., *et al.* (2005) Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). *Pain* 114(1-2), 29-36
- BOUHASSIRA D. (2019) Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology. *Rev. Neurol. (Paris)* 175(1-2), 16-25
- BOYAJI S., MERKOW J., ELMAN R.N.M., *et al.* (2020) The Role of Cannabidiol (CBD) in Chronic Pain Management: An Assessment of Current Evidence. *Curr. Pain Headache Rep.* 24(2), 4
- BROWN H.D., RAGOZZINO M.E. (2010) Orthosteric Site. In *Encyclopedia of Psychopharmacology*. Ed Stolerman, I. Berlin, Springer, pp 942-942
- BUSHLIN I., GUPTA A., STOCKTON S.D., MILLER L.K., DEVI L.A. (2012) Dimerization with Cannabinoid Receptors Allosterically Modulates Delta Opioid Receptor Activity during Neuropathic Pain. *PLoS One* 7(12), e49789

- CAMPOS A.C., MOREIRA F.A., GOMES F.V., DEL BEL E.A., GUIMARÃES F.S. (2012) Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367(1607), 3364-3378
- CEREDIG R.A., PIERRE F., DORIDOT S., *et al.* (2018) Peripheral delta opioid receptors mediate duloxetine antiallodynic effect in a mouse model of neuropathic pain. *Eur. J. Neurosci.* 48(5), 2231-2246
- CEREDIG R.A., PIERRE F., DORIDOT S., *et al.* (2020) Peripheral Delta Opioid Receptors Mediate Formoterol Anti-allodynic Effect in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Front. Mol. Neurosci.* 12, 234
- COHEN S.P., MAO J. (2014) Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ* 348, f7656
- COMMISSIONER OFFICE OF THE FDA (2020) FDA Approves New Indication for Drug Containing an Active Ingredient Derived from Cannabis to Treat Seizures in Rare Genetic Disease. In FDA FDA. [<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-indication-drug-containing-active-ingredient-derived-cannabis-treat-seizures-rare>] (consulté le 19/09/2021).
- COSTA B., GIAGNONI G., FRANKE C., TROVATO A.E., COLLEONI M. (2004) Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 143(2), 247-250
- COSTA B., TROVATO A.E., COMELLI F., GIAGNONI G., COLLEONI M. (2007) The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 556(1-3), 75-83
- COVER K.K., MAENG L.Y., LEBRÓN-MILAD K., MILAD M.R. (2014) Mechanisms of estradiol in fear circuitry: implications for sex differences in psychopathology. *Transl. Psychiatry* 4(8), e422
- DAVID D.J., GARDIER A.M. (2016) The pharmacological basis of the serotonin system: Application to antidepressant response. *L'Encephale* 42(3), 255-263
- DE FELICE M., SANOJA R., WANG R., *et al.* (2011) Engagement of Descending Inhibition from the Rostral Ventromedial Medulla Protects Against Chronic Neuropathic Pain. *Pain* 152(12), 2701-2709
- DE GREGORIO D., MCLAUGHLIN R.J., POSA L., *et al.* (2019) Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain* 160(1), 136-150
- DEACON R.M.J. (2006) Assessing nest building in mice. *Nat. Protoc.* 1(3), 1117-1119
- DONVITO G., NASS S.R., WILKERSON J.L., *et al.* (2018) The Endogenous Cannabinoid System: A Budding Source of Targets for Treating Inflammatory and Neuropathic Pain. *Neuropsychopharmacology* 43(1), 52-79
- DWORKIN R.H., O'CONNOR A.B., AUDETTE J., *et al.* (2010) Recommendations for the Pharmacological Management of Neuropathic Pain: An Overview and Literature Update. *Mayo Clin. Proc.* 85(3), S3-S14
- EL-ALFY A.T., IVEY K., ROBINSON K., *et al.* (2010) Antidepressant-like effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95(4), 434-442
- ERBS E., FAGET L., SCHERRER G., *et al.* (2015) A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Struct. Funct.* 220(2), 677-702

- FAESTE C.K., PIERRE F., IVANOVA L., SAYYARI A., MASSOTTE D. (2019) Behavioural and metabolomic changes from chronic dietary exposure to low-level deoxynivalenol reveal impact on mouse well-being. *Arch. Toxicol.* 93(7), 2087-2102
- FERINI-STRAMBI L. (2017) Neuropathic Pain and Sleep: A Review. *Pain Ther.* 6(Suppl 1), 19-23
- FILIZOLA M., OLMEA O., WEINSTEIN H. (2002) Prediction of heterodimerization interfaces of G-protein coupled receptors with a new subtractive correlated mutation method. *Protein Eng.* 15(11), 881-885
- FILLIOL D., GHOZLAND S., CHLUBA J., *et al.* (2000) Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat. Genet.* 25(2), 195-200
- FINNERUP N.B., ATTAL N., HAROUTOUNIAN S., *et al.* (2015) Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: systematic review, meta-analysis and updated NeuPSIG recommendations. *Lancet Neurol.* 14(2), 162-173
- FINNERUP N.B., KUNER R., JENSEN T.S. (2021) Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment. *Physiol. Rev.* 101(1), 259-301
- FRANKLIN K., PAXINOS G. (2012) Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 5^e ed. Oxford, Academic Press
- GARCÍA-GUTIÉRREZ M.S., NAVARRETE F., GASPARYAN A., *et al.* (2020) Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders. *Biomolecules* 10(11), E1575
- GAVÉRIAUX-RUFF C., KIEFFER B.L. (2011) Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behav. Pharmacol.* 22(5-6), 405-414
- GREENE-SCHLOESSER D.M., VAN DER ZEE E.A., SHEPPARD D.K., *et al.* (2011) Predictive validity of a non-induced mouse model of compulsive-like behavior. *Behav. Brain Res.* 221(1), 55-62
- GUIMARÃES F.S., CHIARETTI T.M., GRAEFF F.G., ZUARDI A.W. (1990) Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl.)* 100(4), 558-559
- HAANPÄÄ M.L., TREEDE R.-D. (2010) Diagnosis and Classification of Neuropathic Pain - IASP. [<https://www.iasp-pain.org/PublicationsNews/NewsletterIssue.aspx?ItemNumber=2083>] (consulté le 17/04/2021).
- HALEEM D.J. (2019) Targeting Serotonin1A Receptors for Treating Chronic Pain and Depression. *Curr. Neuropharmacol.* 17(12), 1098-1108
- HASSAN S., ELDEEB K., MILLNS P.J., *et al.* (2014) Cannabidiol enhances microglial phagocytosis via transient receptor potential (TRP) channel activation. *Br. J. Pharmacol.* 171(9), 2426-2439
- HERRERO J.F., LAIRD J.M.A., LOPEZ-GARCIA J.A. (2000) Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog. Neurobiol.* 61(2), 169-203
- HILL K.P., PALASTRO M.D. (2017) Medical cannabis for the treatment of chronic pain and other disorders: misconceptions and facts. *Pol. Arch. Intern. Med.* 127(11), 785-789
- HUANG K.W., OCHANDARENA N.E., PHILSON A.C., *et al.* (2019) Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. *eLife* 8, e46464
- HUESTIS M.A., SOLIMINI R., PICHINI S., *et al.* (2019) Cannabidiol Adverse Effects and Toxicity. *Curr. Neuropharmacol.* 17(10), 974-989

- IASP TASK FORCE ON TAXONOMY (2017) Terminology | International Association for the Study of Pain. *In Iasp-Pain.Org*. [<https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>] (consulté le 09/09/2021).
- IUPHAR/BPS (2021) The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY complete ligand list. *In Guidetopharmacology.org*. [<https://www.guidetopharmacology.org/index.jsp>] (consulté le 18/09/2021).
- JAGGI A.S., JAIN V., SINGH N. (2011) Animal models of neuropathic pain. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 25(1), 1-28
- JESUS C.H.A., REDIVO D.D.B., GASPARIN A.T., *et al.* (2019) Cannabidiol attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats via serotonergic system activation through 5-HT_{1A} receptors. *Brain Res.* 1715, 156-164
- JIRKOF P. (2014) Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *J. Neurosci. Methods* 234, 139-146
- KALUEFF A.V., TUOHIMAA P. (2004) Contrasting grooming phenotypes in C57Bl/6 and 129S1/SvImJ mice. *Brain Res.* 1028(1), 75-82
- KATHMANN M., FLAU K., REDMER A., TRÄNKLE C., SCHLICKER E. (2006) Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 372(5), 354-361
- KING K.M., MYERS A.M., SOROKA-MONZO A.J., *et al.* (2017) Single and combined effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.* 174(17), 2832-2841
- KREMER M., SALVAT E., MULLER A., YALCIN I., BARROT M. (2016) Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. *Neuroscience* 338, 183-206
- KREMER M., MEGAT S., BOHREN Y., *et al.* (2020) Delta opioid receptors are essential to the antiallodynic action of B₂-mimetics in a model of neuropathic pain. *Mol. Pain* 16, 1744806920912931
- KREMER M., BECKER L.J., BARROT M., YALCIN I. (2021) How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? *Eur. J. Neurosci.* 53(1), 236-270
- KUMAR A., RAGHUBIR R., DHAWAN B.N. (1995) Possible involvement of nitric oxide in red nucleus stimulation-induced analgesia in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 279(1), 1-5
- LAPRAIRIE R.B., BAGHER A.M., KELLY M.E.M., DENO VAN-WRIGHT E.M. (2015) Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB₁ receptor. *Br. J. Pharmacol.* 172(20), 4790-4805
- LARIVIERE W.R., CHESLER E.J., MOGIL J.S. (2001) Transgenic studies of pain and analgesia: mutation or background genotype? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297(2), 467-473
- LIGRESTI A., DE PETROCELLIS L., DI MARZO V. (2016) From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiol. Rev.* 96(4), 1593-1659
- LOVICK T.A., ZANGROSSI H. (2021) Effect of Estrous Cycle on Behavior of Females in Rodent Tests of Anxiety. *Front. Psychiatry* 12, 711065
- MALETIC V., RAISON C.L. (2009) Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 5291-5338
- MASCLEF A. (1891) Atlas des plantes de France. France, Belin
- MASSOTTE D. (2015) In vivo opioid receptor heteromerization: where do we stand? *Br. J. Pharmacol.* 172(2), 420-434
- MEACHAM K., SHEPHERD A., MOHAPATRA D.P., HAROUTOUNIAN S. (2017) Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Curr. Pain Headache Rep.* 21(6), 28

- MECHOULAM R., SHANI A., EDERY H., GRUNFELD Y. (1970) Chemical basis of hashish activity. *Science* 169(3945), 611-612
- MERSKEY H., BOGDUK N. (1994) Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. In *Classification of Chronic Pain, IASP Task Force on Taxonomy, Second Edition*. Seattle, IASP Press, pp pp 209-214
- MICHELSSEN K.A., SCHMITZ C., STEINBUSCH H.W.M. (2007) The dorsal raphe nucleus—From silver stainings to a role in depression. *Brain Res. Rev.*, 55(2), 329-342
- MILDECA (2017) Cannabis. In *drogues.gouv.fr*. [<https://www.drogues.gouv.fr/comprendre/les-produits/cannabis>] (consulté le 05/10/2021).
- MILDECA (2021) CBD : notification du projet de nouvel arrêté. In *drogues.gouv.fr*. [<https://www.drogues.gouv.fr/actualites/cbd-notification-projet-de-nouvel-arrete>] (consulté le 19/09/2021).
- MINISTÈRE DE LA SANTÉ (2016) Article L1121-1 du chapitre traitant les principes généraux relatifs aux recherches impliquant la personne humaine du Code de la santé publique. In *Légifrance*. [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000032722870/] (consulté le 15/09/2021).
- MLOST J., BRYK M., STAROWICZ K. (2020) Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. *Int. J. Mol. Sci.* 21(22), E8870
- MOGIL J.S. (1999) The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(14), 7744-7751
- MOREIRA F.A., AGUIAR D.C., GUIMARÃES F.S. (2006) Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30(8), 1466-1471
- NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE (Éd.) (2017) The Health Effects of Cannabis and Cannabinoids: The Current State of Evidence and Recommendations for Research, *The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health*. Washington (DC), National Academies Press (US)
- NATIONAL HEALTH SERVICE (2018) Medical cannabis (cannabis oil). In *Nhs.Uk*. [<https://www.nhs.uk/conditions/medical-cannabis/>] (consulté le 19/09/2021).
- OLIVER V.L., THURSTON S.E., LOFGREN J.L. (2018) Using Cageside Measures to Evaluate Analgesic Efficacy in Mice (*Mus musculus*) after Surgery. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 57(2), 186-201
- ONAIWI E.S., GREEN M.R., MARTIN B.R. (1990) Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *Pharmacol. Charact. Cannabinoids Elev. Plus Maze* 253(3), 1002-1009
- OSSIPOV M.H., MORIMURA K., PORRECA F. (2014) Descending pain modulation and chronification of pain. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care* 8(2), 143-151
- PERTWEE R.G. (2008) The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.* 153(2), 199-215
- PESCHANSKI M., MANTYH P.W. (1983) Efferent connections of the subfascicular area of the mesodiencephalic junction and its possible involvement in stimulation-produced analgesia. *Brain Res.* 263(2), 181-190
- PIERRE F., UGUR M., FAIVRE F., *et al.* (2019) Morphine-dependent and abstinent mice are characterized by a broader distribution of the neurons co-expressing mu and delta opioid receptors. *Neuropharmacology* 152, 30-41

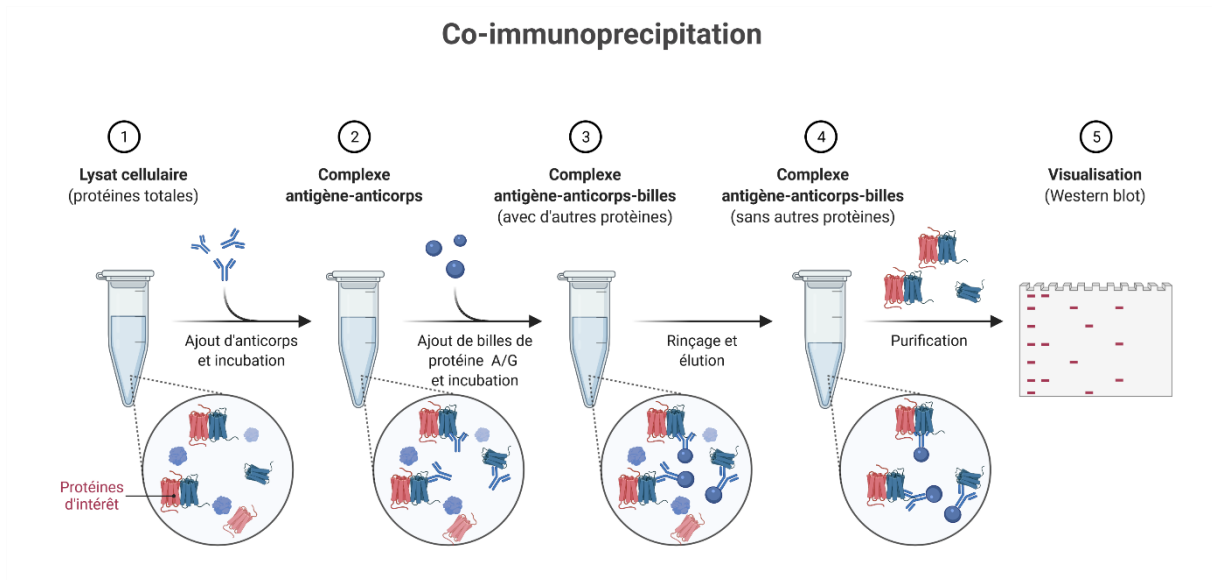
- PIN J.-P., NEUBIG R., BOUVIER M., *et al.* (2007) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol. Rev.* 59(1), 5-13
- PRADHAN A.A., BEFORT K., NOZAKI C., GAVÉRIAUX-RUFF C., KIEFFER B.L. (2011) The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 32(10), 581-590
- RAJA S.N., CARR D.B., COHEN M., *et al.* (2020) The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* 161(9), 1976-1982
- RODGERS R.J., BOULLIER E., CHATZIMICHALAKI P., COOPER G.D., SHORTEN A. (2002a) Contrasting phenotypes of C57BL/6JOLA^{Hsd}, 129S2/Sv^{Hsd} and 129/SvEv mice in two exploration-based tests of anxiety-related behaviour. *Physiol. Behav.* 77(2-3), 301-310
- RODGERS R.J., DAVIES B., SHORE R. (2002b) Absence of anxiolytic response to chlordiazepoxide in two common background strains exposed to the elevated plus-maze: importance and implications of behavioural baseline. *Genes Brain Behav.* 1(4), 242-251
- ROZENFELD R., BUSHLIN I., GOMES I., *et al.* (2012) Receptor heteromerization expands the repertoire of cannabinoid signaling in rodent neurons. *PLoS One* 7(1), e29239
- RUSSO E.B., BURNETT A., HALL B., PARKER K.K. (2005) Agonistic Properties of Cannabidiol at 5-HT_{1A} Receptors. *Neurochem. Res.* 30(8), 1037-1043
- RUSSO E.B. (2007) History of Cannabis and Its Preparations in Saga, Science, and Sobriquet. *Chem. Biodivers.* 4(8), 1614-1648
- RYBERG E., LARSSON N., SJÖGREN S., *et al.* (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* 152(7), 1092-1101
- SEMBA K. (2000) Multiple output pathways of the basal forebrain: organization, chemical heterogeneity, and roles in vigilance. *Behav. Brain Res.* 115(2), 117-141
- SIERRA S., GUPTA A., GOMES I., *et al.* (2019) Targeting Cannabinoid 1 and Delta Opioid Receptor Heteromers Alleviates Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* 2(4), 219-229
- STAGG N.J., MATA H.P., IBRAHIM M.M., *et al.* (2011) Regular Exercise Reverses Sensory Hypersensitivity in a Rat Neuropathic Pain Model. *Anesthesiology* 114(4), 940-948
- TREUDE R.-D., JENSEN T.S., CAMPBELL J.N., *et al.* (2008) Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 70(18), 1630-1635
- URIBE-MARIÑO A., FRANCISCO A., CASTIBLANCO-URBINA M.A., *et al.* (2012) Anti-Aversive Effects of Cannabidiol on Innate Fear-Induced Behaviors Evoked by an Ethological Model of Panic Attacks Based on a Prey vs the Wild Snake *Epicrates cenchria crassus* Confrontation Paradigm. *Neuropsychopharmacology* 37(2), 412-421
- VANDOLAH H.J., BAUER B.A., MAUCK K.F. (2019) Clinicians' Guide to Cannabidiol and Hemp Oils. *Mayo Clin. Proc.* 94(9), 1840-1851
- VAN HECKE O., AUSTIN S.K., KHAN R.A., SMITH B.H., TORRANCE N. (2014) Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain* 155(4), 654-662
- VITALE R.M., IANNOTTI F.A., AMODEO P. (2021) The (Poly)Pharmacology of Cannabidiol in Neurological and Neuropsychiatric Disorders: Molecular Mechanisms and Targets. *Int. J. Mol. Sci.* 22(9), 4876
- WANG J., YU J., DING C.-P., *et al.* (2015) Transforming growth factor-beta in the red nucleus plays antinociceptive effect under physiological and pathological pain conditions. *Neuroscience* 291, 37-45

- WARD S.J., RAMIREZ M.D., NEELAKANTAN H., WALKER E.A. (2011) Cannabidiol prevents the development of cold and mechanical allodynia in paclitaxel-treated female C57Bl6 mice. *Anesth. Analg.* 113(4), 947-950
- WATSON C., PAXINOS G., PUELLES L. (2012) *The Mouse Nervous System*. London, UK, Academic Press
- WHITE C.M. (2019) A Review of Human Studies Assessing Cannabidiol's (CBD) Therapeutic Actions and Potential. *J. Clin. Pharmacol.* 59(7), 923-934
- WHITING P.F., WOLFF R.F., DESHPANDE S., *et al.* (2015) Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 313(24), 2456-2473
- WILLNER P. (1984) The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl.)* 83(1), 1-16
- WOLLER S.A., CORR M., YAKSH T.L. (2015) Differences in cisplatin-induced mechanical allodynia in male and female mice. *Eur. J. Pain* 19(10), 1476-1485
- WRIGHT M., DI CIANO P., BRANDS B. (2020) Use of Cannabidiol for the Treatment of Anxiety: A Short Synthesis of Pre-Clinical and Clinical Evidence. *Cannabis Cannabinoid Res.* 5(3), 191-196
- YALCIN I., BOHREN Y., WALTISPERGER E., *et al.* (2011) A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. *Biol. Psychiatry* 70(10), 946-953
- YALCIN I., MEGAT S., BARTHAS F., *et al.* (2014) The Sciatic Nerve Cuffing Model of Neuropathic Pain in Mice. *J. Vis. Exp.* 89, 51608
- YAMAMOTO T., TAKEMURA M., INUI T., *et al.* (2009) Functional Organization of the Rodent Parabrachial Nucleus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1170(1), 378-382
- YANG F., ZHENG J. (2017) Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin. *Protein Cell* 8(3), 169-177
- YANKELEVITCH-YAHAV R., FRANKO M., HULY A., DORON R. (2015) The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J. Vis. Exp.* 97, 52587
- ZANELATI T., BIOJONE C., MOREIRA F., GUIMARÃES F., JOCA S. (2010) Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. *Br. J. Pharmacol.* 159(1), 122-128
- ZUARDI A.W. (2006) History of cannabis as a medicine: a review. *Bras. J. Psiquiatria.* 28(2), 153-157

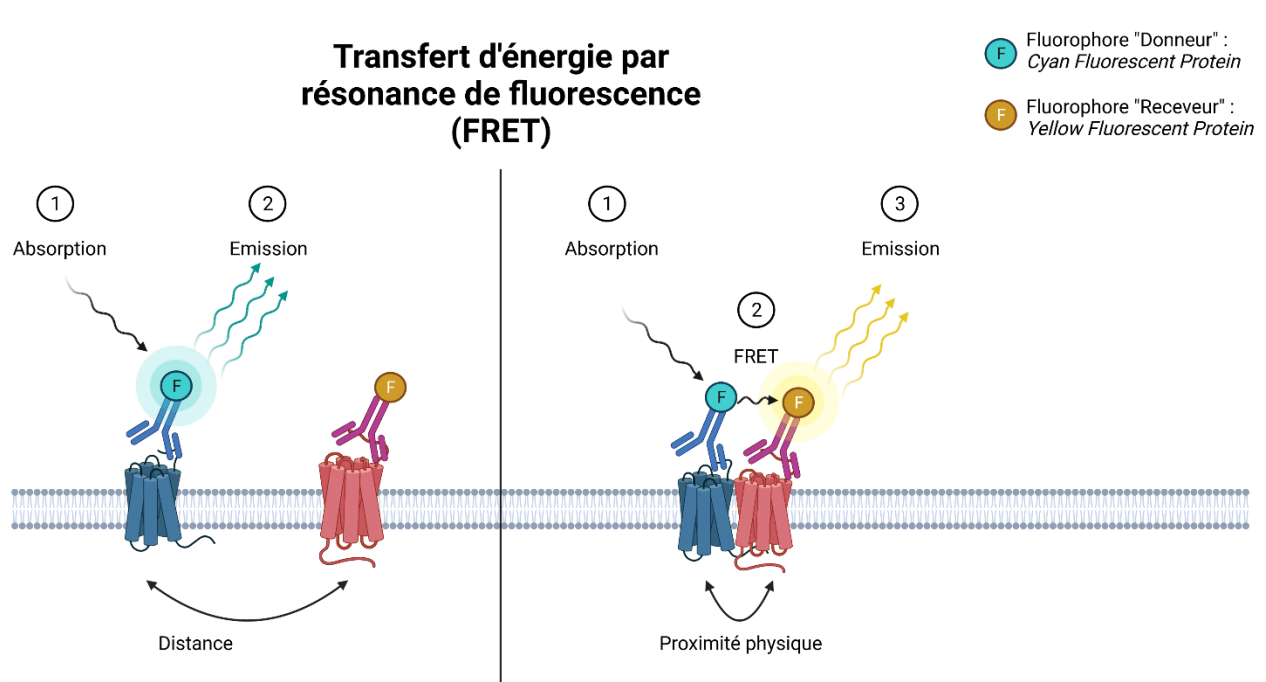
Annexe 1

(Schémas personnels)

Annexe 1.1 : Schéma présentant le principe de la technique de co-immunoprécipitation.

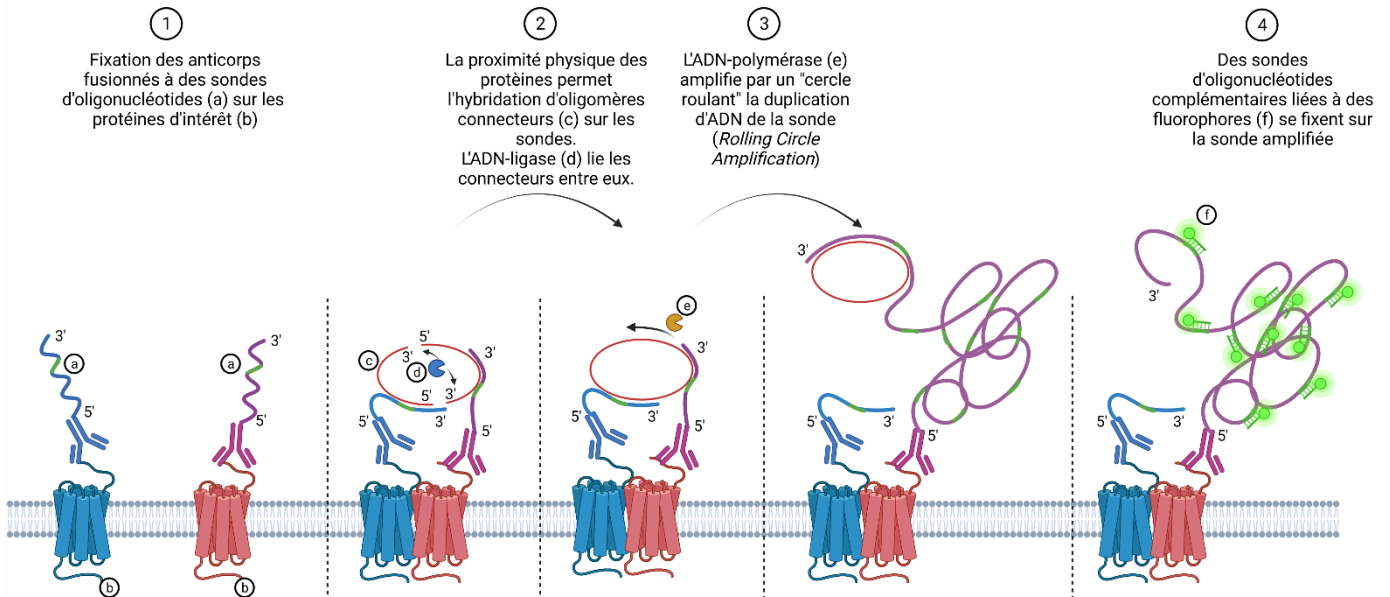


Annexe 1.2 : Schéma présentant le principe de la technique de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (*Fluorescence Resonance Energy Transfer - FRET*).



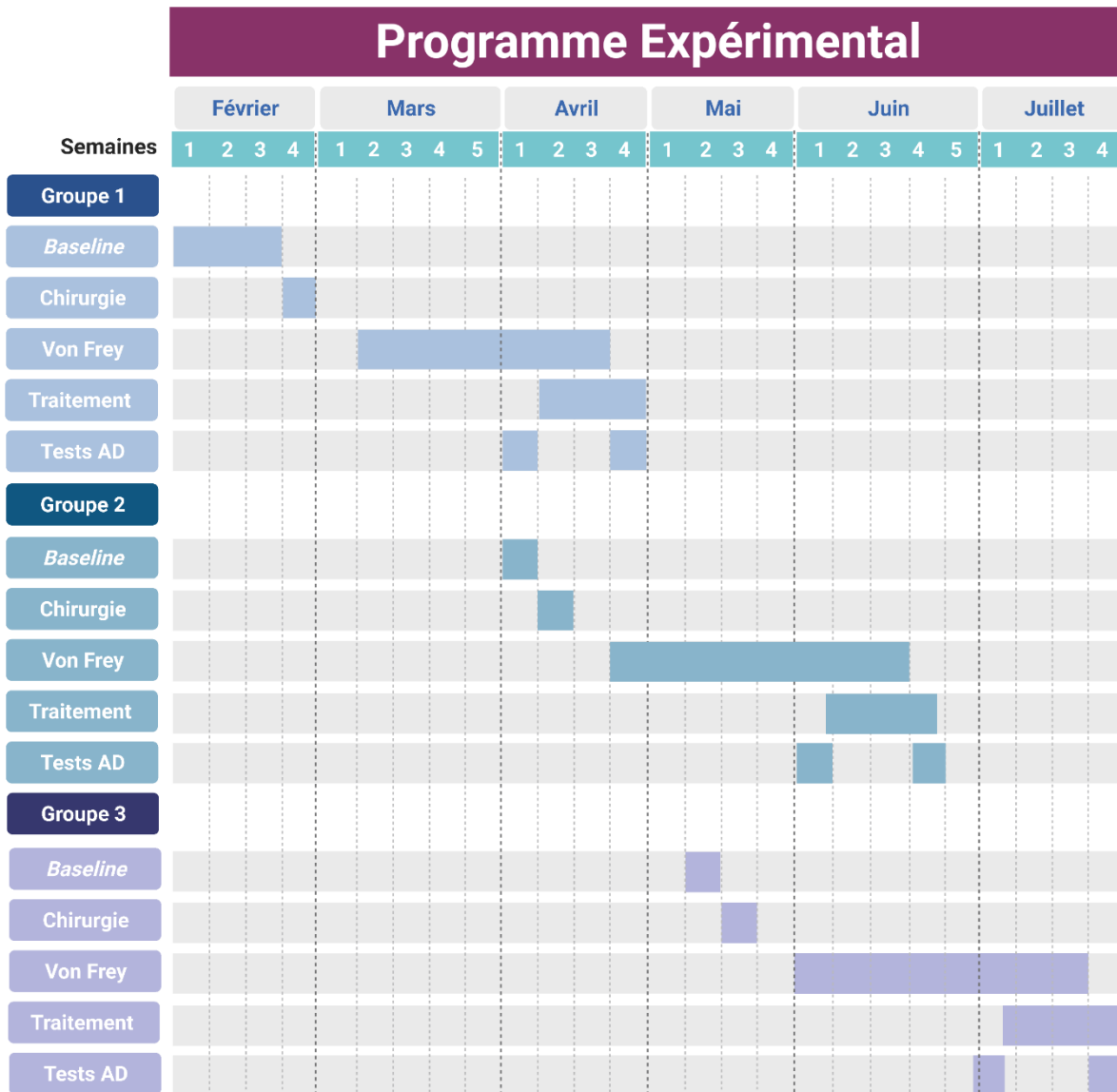
Annexe 1.3 : Schéma présentant le principe de la technique de test de liaison de proximité (*Proximity Ligation Assay - PLA*).

**Test de liaison de proximité
(PLA)**



Annexe 2

Annexe 2.1 : Programme expérimental effectué sur les différents groupes de souris en fonction des mois de l'année 2021.



Le détail de la composition des groupes est présenté dans la figure supplémentaire 5.

Baseline : établissement de la réponse basale des souris au test des filaments de Von Frey. **Chirurgie** : pose du *cuff*. **Von Frey** : test des filaments de Von Frey réalisé une fois par semaine puis un jour sur deux pendant le traitement. **Traitement** : traitement quotidien au CBD (10 mg/kg) ou à une solution contrôle (véhicule). **Tests AD** : tests des comportements de type anxio-dépressif (*nesting*, *splash*, interaction sociale, test de la nage forcée (FST)).

Annexe 2.2 : Détail de la composition des groupes de souris dans chaque groupe d'animaux en fonction des conditions expérimentales.

				Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	TOTAL
Mâles	δ -WT	Sham	Véhicule			n = 4	n = 4
			CBD			n = 3	n = 3
	Cuff		Véhicule			n = 3	n = 3
			CBD	n = 3		n = 5	n = 8
	δ -KO	Sham	Véhicule		n = 3	n = 3	n = 6
			CBD	n = 5	n = 3		n = 8
Cuff		Véhicule	n = 3	n = 3		n = 6	
		CBD	n = 7		n = 2	n = 9	
TOTAL				n = 18	n = 12	n = 20	

				Groupe 1	Groupe 2	Vague 3	TOTAL
Femelles	δ -WT	Sham	Véhicule				n = 0
			CBD				n = 0
	Cuff		Véhicule				n = 0
			CBD		n = 4	n = 4	n = 8
	δ -KO	Sham	Véhicule		n = 3		n = 3
			CBD	n = 4			n = 4
Cuff		Véhicule		n = 3		n = 3	
		CBD	n = 5	n = 2		n = 7	
TOTAL				n = 9	n = 12	n = 4	

δ -WT : souris exprimant le récepteur opioïde δ . **δ -KO** : souris n'exprimant pas le récepteur opioïde δ . **Sham** : pendant la chirurgie, souris ayant eu le nerf sciatique mis à nu sans pose d'un cuff. **Cuff** : pendant la chirurgie, souris ayant eu le nerf sciatique comprimé par la pose d'un cuff. **Véhicule** : groupe de souris ayant reçu comme traitement une solution contrôle. **CBD** : groupe de souris ayant reçu comme traitement une solution de CBD (10 mg/kg). **n** : effectif des groupes.

Annexe 3

Annexe 3 : Structures cérébrales dans lesquelles les récepteurs opioïde δ et CB₁ sont co-localisés au sein des neurones (Franklin et Paxinos, 2012).

Co-localisation faible (+, moins de 5 neurones dans la structure d'une coupe), modérée (++, entre 5 à 10 neurones) et élevée (+++, plus de 10 neurones) ; *Cuff* : groupe avec la patte postérieure droite lésée ; *Sham* : groupe avec la patte postérieure droite non lésée.

Structure cérébrale	Abréviation	Co-localisation δ et CB ₁	
		<i>Cuff</i>	<i>Sham</i>
<u>Cortex cérébral</u>			
Aire motrice 2	M2	+	
Cortex piriforme	pir		+
Cortex insulaire granulaire et dysgranulaire	GI/DI		+
<u>Téencéphale basal</u>			
Noyau de la bande diagonale, branche verticale	VBD	+++	+
Noyau de la bande diagonale, branche horizontale	HDB	+++	+
Noyau latéral de la bande diagonale	LDB	+++	+
Noyau septal médial	MS		+
Zone septale lambdaïde	Ld		+
<u>Amygdale étendue</u>			
Noyau interstitiel de la branche postérieure de la commissure antérieure	IPAC	+	
<u>Formation hippocampale</u>			
Champs CA1 de l'hippocampe, couche <i>lacunosul moleculare</i>	CA1 Imol		+
Champs CA3 de l'hippocampe couche <i>lacunosul moleculare</i> et <i>oriens</i>	CA3 Imol/or	+	+/+
<u>Thalamus ventral</u>			
Noyau thalamique réticulaire	Rt	++	
<u>Hypothalamus</u>			
Noyaux mamillaires latéral, médial et retromamillaire	L/R/MM	++	
Aire hypothalamique latérale	LH	++	
Noyau hypothalamique périventriculaire	Pe	+	
<u>Cervelet</u>			
Noyau latéral (denté) du cervelet	Lat	+++	+
Noyau interposé du cervelet	Int		+
Noyau médial du cervelet	Med	+++	+
<u>Tronc cérébral</u>			
<i>Système auditif</i>			
Noyau périolivaire médioventral/latéroventral	MV/LV/PO	+++	
Noyau paraolivaire supérieur	SPO	++	
Noyau intermédiaire/ventral du lemnisque latéral	I/VLL	+++	++
Noyau paralemniscal	PL	++	
Noyau du corps trapézoïde	Tz	+++	+
Noyau cochléaire ventral antérieur	VCA	++	++
<i>Noyaux des nerfs crâniens</i>			
Noyau facial	7N	++	++
Sous-noyau dorsal du noyau facial	7D		++
Racine du nerf vestibulocochléaire	8N	+	
Noyau interpédonculaire	IP	++	
<i>Oculomoteur</i>			
Noyau oculomoteur	3N	++	
Noyau paratrochléaire	Pa4	+	
Noyau préposé	Pr	+	+

Annexe 3 (suite) : Structures cérébrales dans lesquelles les récepteurs opioïde δ et CB₁ sont co-localisés au sein des neurones (Franklin et Paxinos, 2012).

Structure cérébrale	Abréviation	Co-localisation δ et CB ₁	
		Cuff	Sham
<i>Aire grise périaqueducale</i>			
Aire grise périaqueducale ventrolatérale	VLPAG	+	
<i>Noyau parabrachial</i>			
Noyau parabrachial médian	MPB	++	
<i>Raphé</i>			
Noyau du raphé magnus, obscurus	RMg/Ob	+++	+/+
Noyau du raphé pallidus, interpositus	RPa/Ip	+/+	+
Partie caudale/dorsale du noyau du raphé dorsal	DRC/D	+/+++	+
Noyau du raphé médian	MnR		++
Noyau raphé rostromédian	RMnR	++	
<i>Noyau rouge</i>			
Noyau rouge partie magno/parvocellulaire	RMC/RPC	+++	+
<i>Formation réticulée</i>			
Noyau (pré)cunéiforme	(Pr)CnF	+	
Noyau réticulaire du pont (partie orale et caudale)	PnO/C	+/+++	+/+
Noyau réticulaire parvocellulaire	PcRtA		+
Noyau réticulaire latéral	LRt		+
Noyau réticulaire médullaire, partie ventrale	MdV		+
Noyau gigantocellulaire (partie alpha)	Gi(A)	+++	+
Noyau paragigantocellulaire latéral	LPGi		+
<i>Tectum</i>			
Noyau prétectal antérieur	APT	+	
Noyau prétectal médial	MPT		+
Couche intermédiaire grise/blanche du collicule supérieur	InG/Wh	+	
Couche profonde grise du collicule supérieur	DpG	+	
Cortex externe du collicule inférieur	ECIC	+	+
Noyau subbrachial	SubB	++	
<i>Tegmentum</i>			
Noyaux tegmentaux antérieur et ventral	A/VTg	+++	
Noyau tegmental latérodorsal	LDTg		+
Noyau réticulotegmental du pons	RtTg	+++	++
Noyau tegmental microcellulaire	MiTg	++	
Noyau tegmental pedonculopontin	PTg		+
Aire tegmentale dorsomédiale	DMTg	+	
<i>Trigéminé</i>			
Noyau mésencéphalique trigéminé	Me5	+++	+
Noyau trigéminé principal/partie dorsomédiale	Pr5/Pr5DM	+	+/+
Noyau trigéminé spinal/partie dorsomédiale	Sp5/Sp5DM	++	+/+
Noyau trigéminé interfasciculaire	IF5		+
<i>Vestibulaire</i>			
Noyau vestibulaire médial magno/parvocellulaire	MVeMC/PC	++/+++	+/+
Noyau vestibulaire supérieur	SuVe	+++	+
Noyau vestibulaire spinal	SpVe		+
Noyau vestibulaire latéral	LVe		+
Autres			
Noyaux du pont	Pn	+++	+

IMPACT DU CANNABIDIOL SUR LA DOULEUR NEUROPATHIQUE ET LES SIGNES CLINIQUES DE TYPE ANXIO-DÉPRESSIF CHEZ LA SOURIS

AUTEUR : Coline SAGOT

RÉSUMÉ :

La douleur neuropathique est définie comme une douleur persistante causée par une lésion ou une maladie du système somatosensoriel. Elle est associée à de nombreuses comorbidités telles que des troubles anxio-dépressifs. Les traitements de première ligne échouant chez 15 à 20 % des patients à cause des effets indésirables, la recherche de traitements alternatifs est donc essentielle.

Le cannabidiol (CBD) possède des propriétés analgésiques, anxiolytiques et antidépressives, mais ses mécanismes d'actions ne sont pas tous élucidés. Dans ce contexte, cette thèse vétérinaire s'inscrit dans le projet de thèse universitaire de Marion Gaborit, avec deux objectifs. Le premier est de déterminer si le récepteur opioïde δ est nécessaire à l'observation de ces propriétés chez la souris souffrant de douleur neuropathique (modèle de compression du nerf sciatique) en utilisant des souris mâles et femelles génétiquement modifiées pour exprimer ou non ce récepteur. Des tests comportementaux furent réalisés pour mesurer l'allodynie mécanique et les comportements de type anxio-dépressif. Le second objectif était de cartographier par immunohistochimie la co-localisation neuronale des récepteurs opioïde δ et cannabinoïde CB₁ dans des cerveaux de souris neuropathiques afin de mieux comprendre leurs interactions fonctionnelles dans ce contexte neuropathique.

Nos résultats préliminaires chez les mâles suggèrent que l'effet analgésique du CBD nécessiterait le récepteur opioïde δ car l'effet n'était pas observable en son absence. Nous ne pouvons conclure à ce jour sur l'effet du CBD sur les comportements de type anxio-dépressif. Enfin, nous avons observé une co-localisation des récepteurs opioïdes δ et cannabinoïde CB₁ au sein notamment de la moelle rostrale ventromédiale (RVM), une structure impliquée dans la modulation descendante de la douleur, et du noyau dorsal du raphé impliqué dans la régulation de l'humeur.

MOTS CLÉS :

NEUROSCIENCES, SOURIS, DOULEUR NEUROPATHIQUE, CANNABIDIOL, RÉCEPTEUR OPIOÏDE DELTA, ANXIÉTÉ, DÉPRESSION, IMMUNOHISTOCHIMIE, COMPORTEMENT

JURY :

Président : Pr Renaud TISSIER

Directrice de thèse : Pr Fanny PILOT-STORCK

Examinateur : Dr Matthias KOHLHAUER

Invitée : Dr Dominique MASSOTTE

IMPACT OF CANNABIDIOL ON NEUROPATHIC PAIN AND ANXIODEPRESSIVE-LIKE SYMPTOMS IN MICE

AUTHOR: Coline SAGOT

SUMMARY:

Neuropathic pain is defined as a long-lasting pain caused by an injury or a disease of the somatosensory system. It is associated with numerous comorbidities such as anxiety and depressive disorders. First-line treatments fail in 15-20 % of patients due to adverse effects, so the search for alternative treatments is essential.

Cannabidiol (CBD) has analgesic, anxiolytic and antidepressant properties, but the mechanisms of action are not fully elucidated. In this context, this veterinary thesis is part of Marion Gaborit's university thesis, a project with two objectives. The first goal was to determine whether the δ -opioid receptor is required to observe these properties in mice suffering from neuropathic pain (sciatic nerve compression model) using genetically modified male and female mice expressing this receptor or not. Behavioral tests were performed to measure mechanical allodynia and anxi-depressive-like behaviors. The second goal was to map by immunohistochemistry the neuronal co-localization of the δ -opioid and CB₁-cannabinoid receptors in neuropathic mouse brains. This will provide a better understanding of their functional interactions in the neuropathic context.

Our preliminary results in males suggest that the analgesic effect of CBD requires the δ -opioid receptor because the effect was not observable in its absence. For now, we cannot conclude whether CBD has an effect on anxi-depressive-like behaviors or not. Finally, we observed co-localized δ and CB₁ receptors in the rostral ventromedial medulla (RVM), a structure involved in the descending modulation of pain, and in the dorsal raphe nucleus, involved in mood regulation.

KEYWORDS:

NEUROSCIENCES, MICE, NEUROPATHIC PAIN, CANNABIDIOL, DELTA OPIOID RECEPTOR, ANXIETY, DEPRESSION, IMMUNOHISTOCHEMISTRY, BEHAVIOR

JURY:

Chairperson: Pr Renaud TISSIER
Thesis Director: Pr Fanny PILOT-STORCK
Reviewer: Dr Matthias KOHLHAUER
Guest: Dr Dominique MASSOTTE