
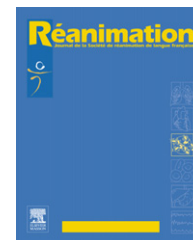




Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
www.em-consulte.com



MISE AU POINT

Mécanismes moléculaires de la tolérance aux opiacés et aux cannabinoïdes

Molecular mechanisms of tolerance to opioids and cannabinoids

N. Marie

CNRS UMR 7157, Inserm U 705, laboratoire de neuropsychopharmacologie des addictions, faculté de pharmacie, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

Reçu le 29 mai 2009 ; accepté le 17 juin 2009
Disponible sur Internet le 8 juillet 2009

MOTS CLÉS

Opioides ;
Cannabinoïdes ;
Récepteurs couplés
aux protéines G ;
Désensibilisation ;
Tolérance

KEYWORDS

Opioids;
Cannabinoids;
G protein-coupled
receptor;
Desensitization;
Tolerance

Résumé Les parallèles entre opiacés et cannabinoïdes sont nombreux. En effet, ces substances exercent leurs effets pharmacologiques sur des récepteurs couplés aux protéines G et sont capables de réguler de la même manière de nombreux effecteurs intracellulaires. De plus, l'utilisation de ces substances, en particulier dans le domaine du traitement de la douleur (depuis longtemps pour les opiacés et en plein développement pour les cannabinoïdes), se heurte à un problème majeur qui est la survenue d'une tolérance lors d'un traitement prolongé. Un des mécanismes à l'origine de cette tolérance serait l'existence d'une désensibilisation des récepteurs. Cette revue va donc s'attacher à décrire les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la désensibilisation et à montrer comment les progrès réalisés sur la compréhension de ces mécanismes ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques.

© 2009 Société de réanimation de langue française. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Summary Opioids and cannabinoids share many properties. Consistently, these compounds exert their pharmacological effects by acting on G protein-coupled receptors and regulate the same intracellular effectors. Moreover, prolonged opioid (assessed since a long time) and cannabinoid (more recently assessed) administration for analgesia may result in tolerance. Mechanisms responsible for tolerance development include receptor desensitization. This review will thus describe the molecular mechanisms of desensitization and show how better understanding the mechanisms involved in tolerance may allow new therapeutic perspectives. © 2009 Société de réanimation de langue française. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

La tolérance que l'on peut définir simplement comme la diminution des effets d'une substance chimique ou xénobiotique lors d'administrations répétées est néanmoins un phénomène complexe, aussi bien au niveau de

Adresse e-mail : nicolas.marie@parisdescartes.fr.

ses composantes que dans les mécanismes qui en sont à l'origine. En effet, lors d'un traitement prolongé par des opiacés, la tolérance analgésique peut être due à une évolution de la pathologie, à une modification du métabolisme (tolérance pharmacocinétique) ou encore à une modification du signal opioïdérique (tolérance pharmacodynamique). De plus, pour une même molécule, la tolérance diffère selon les effets observés. Alors que la tolérance aux effets respiratoires de la morphine est faible, comparée à la tolérance aux effets analgésiques, l'augmentation des doses peut conduire à une dépression respiratoire fatale. Cette revue se bornera à décrire les mécanismes moléculaires de la tolérance pharmacodynamique, illustrés par des exemples issus de travaux réalisés avec les opiacés et les cannabinoïdes.

Généralités

De nombreux points communs existent entre les opiacés et les cannabinoïdes. En effet, ce sont des substances issues de plantes, connues depuis des millénaires pour leurs propriétés analgésiques notamment. Les opiacés sont des alcaloïdes issus du *Papaver somniferum* dont le plus connu est la morphine. Les cannabinoïdes sont, quant à eux, des molécules liposolubles issues du *Cannabis sativa* (espèce majoritaire) dont le Δ 9-THC (tétrahydrocannabinol) est le composé le plus psychoactif. Les effets pharmacologiques de ces substances chez l'homme et l'animal sont obtenus grâce à leur liaison à des récepteurs spécifiques qui appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG).

Pour les opiacés, il existe trois types de récepteurs : les récepteurs mu (μ), delta (δ) et kappa (κ) couplés principalement aux protéines $G_{i/o}$. L'activation des récepteurs opioïdes entraîne la modulation de nombreux effecteurs, comme l'adénylate cyclase (inhibition), les canaux K^+ (activation), la voie des kinases activées par les mitogènes (MAPK) (activation), les canaux Ca^{2+} (inhibition)

ou la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire. Les agonistes opioïdes vont avoir un effet négatif sur la libération des neurotransmetteurs via les canaux K^+ , en provoquant une hyperpolarisation membranaire, et les canaux Ca^{2+} , en diminuant la concentration de Ca^{2+} intracellulaire ce qui va empêcher l'exocytose des vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs. Les récepteurs opioïdes sont présents aussi bien au niveau périphérique que central et leur activation provoque de nombreuses réponses pharmacologiques telles l'analgésie, la dépression respiratoire... Au niveau physiologique, ces récepteurs peuvent être activés par des ligands endogènes peptidiques comme les enképhalines ou les dynorphines (Tableau 1).

À l'instar des récepteurs opioïdes, les récepteurs cannabinoïdes sont des RCPG couplés aux protéines $G_{i/o}$. Deux sous-types, CB1 et CB2, ont été clonés. Le récepteur CB1 est exprimé au niveau central (de tous les RCPG, il est le plus abondant) et périphérique alors que le récepteur CB2 est plutôt localisé au niveau périphérique bien que des études récentes montrent une expression centrale notamment au niveau glial. L'activation des récepteurs CB1 conduit aux mêmes types de régulation sur les effecteurs intracellulaires que les récepteurs opioïdes et va également avoir un effet inhibiteur sur la neurotransmission. Du fait de son expression dans de nombreuses structures cérébrales, l'activation du récepteur CB1 va induire de nombreux effets pharmacologiques dont les principaux sont l'analgésie, la stimulation de l'appétit ou encore l'amnésie (Tableau 1).

Mécanismes moléculaires de la tolérance

Les opiacés sont les analgésiques les plus puissants et les plus consommés dans le monde, mais leur utilisation rencontre un problème majeur, à savoir le développement d'une tolérance lors d'une utilisation prolongée. Ainsi la description des mécanismes impliqués dans la tolérance est un enjeu important dans le développement de nouvelles

Tableau 1 Systèmes opioïdes et cannabinoïdes.

	Opioïdes	Cannabinoïdes
Récepteurs	Mu (μ), delta (δ), kappa (κ)	CB1, CB2
Couplage	$G_{i/o}$ (majoritaire), G_q	$G_{i/o}$
Effecteurs	Adénylate cyclase (inhibition) Canaux K^+ et Ca^{2+} (inhibition) Mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire MAPK Phospholipase C	
Agonistes exogènes	morphine (μ), étorphine, DAMGO (μ), buprénorphine, méthadone (μ)	Δ 9-THC, WIN55,512-2, CP55,940
Agonistes endogènes	Enképhalines (μ et δ), bêta-endorphine (μ et δ), dynorphines (κ)	Anandamide 2-arachidonoyl glycérol
Antagoniste	Naloxone	SR141716A
Effets pharmacologiques	Analgésie, immunomodulation Dépression respiratoire Attachement maternel Constipation Dépendance (forte)	Orexigène Coordination motrice Perturbation mnésique Dépendance (modérée)

DAMGO : Tyr-D-Ala-Gly-Me-Phe-Gly(ol) (analogue des enképhalines) ; MAPK : kinases activées par les mitogènes.

molécules. Pour les cannabinoïdes, la situation est un peu différente puisque ces molécules n'ont reçu un intérêt pour leur potentiel thérapeutique que depuis quelques années et nous disposons de beaucoup moins de données. Cependant, il est bien établi que l'utilisation prolongée des cannabinoïdes provoque également une tolérance, notamment aux effets antinociceptifs.

Lien entre désensibilisation et tolérance

Au niveau cellulaire, la désensibilisation (mesurée sur les systèmes de seconds messagers) se caractérise par la diminution de réponse d'un récepteur suite à une stimulation prolongée. Les premiers travaux concernant la désensibilisation des récepteurs opioïdes datent des années 1980 par l'équipe de Loh sur la lignée murine NG108-15, un hybride exprimant le récepteur δ et un des rares modèles cellulaires disponibles à cette époque. Ces auteurs ont pu montrer qu'un traitement prolongé par différents agonistes induisait une désensibilisation de ces récepteurs, observée sur l'inhibition de l'adénylate cyclase [1]. À la suite de ces travaux, de nombreuses études ont pu montrer qu'une stimulation prolongée des récepteurs μ et κ provoquait une désensibilisation de ces récepteurs, observée sur l'adénylate cyclase mais également sur d'autres effecteurs comme les canaux ioniques [2]. Cependant, ce n'est qu'après 1992 et le clonage du premier récepteur opioïde [3,4] que de nombreuses équipes ont étudié les mécanismes de la désensibilisation dans des systèmes cellulaires exprimant un des trois types de récepteur opioïdes. On peut citer les lignées de cellules embryonnaires de rein humain (HEK293), de cellules rénales de singe vert africain (COS-7) ou de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO). Ces systèmes d'expression hétérologue présentent l'avantage de ne pouvoir exprimer qu'un type de récepteur et ce en quantité importante, facilitant ainsi les études biochimiques et cellulaires. Cependant, il faut toujours garder à l'esprit que dans ce cas, nous sommes alors loin des conditions physiologiques.

Concernant les récepteurs cannabinoïdes, les études sur la désensibilisation sont plus tardives, ce qui est probablement dû à l'absence de médicaments cannabinoïdiques. La première étude sur la désensibilisation du récepteur CB1 date de 1988 et a montré qu'un prétraitement par le Δ^9 -THC de cellules NG18TG2 (neuroblastome exprimant des récepteurs cannabinoïdes) induisait une réduction de la capacité de cet agoniste à inhiber l'adénylate cyclase [5].

Même s'il semble clair qu'un parallèle existe entre désensibilisation et tolérance, puisque les définitions de ces deux termes recouvrent des réalités similaires (on trouve les éléments de « traitement prolongé » et « diminution de réponse »), quels sont les arguments en faveur d'une implication de la désensibilisation dans le développement de la tolérance ?

Lorsque des rats sont traités par du Δ^9 -THC pendant 21 jours, on constate une diminution de la capacité du WIN55,212-2 à stimuler le couplage récepteur/protéine G dans diverses structures cérébrales [6]. Le même type d'observation a pu être réalisée pour la morphine, puisqu'un traitement chronique avec cet agoniste chez le rat induit une désensibilisation des récepteurs μ et δ , observée sur

l'adénylate cyclase, dans la substance grise périaqueducule et le thalamus [7]. L'utilisation de souris invalidées pour le gène codant la β -arrestine-2 a permis de montrer que cette protéine qui est connue comme impliquée dans la désensibilisation des RCPG jouait un rôle dans la tolérance à la morphine [8].

Mécanismes liés au récepteur

La plupart des mécanismes de régulation des récepteurs opioïdes et cannabinoïdes ont été obtenus par la transposition de données issues de travaux réalisés sur le récepteur β_2 adrénergique, le prototype des RCPG (Fig. 1). Le premier mécanisme clé dans la désensibilisation est la phosphorylation du récepteur. Ainsi, avec l'utilisation d'inhibiteurs de kinases, on a pu montrer que ces enzymes étaient impliquées non seulement dans la désensibilisation des récepteurs mais également dans la tolérance. Deux grands types de kinases jouent un rôle dans la désensibilisation des RCPG, les kinases spécifiques des RCPG (*G protein-coupled receptor kinase* [GRK]), d'une part, qui ont un rôle prépondérant et les autres kinases, d'autre part, comme la protéine kinase A (PKA « protéine kinase dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique »), la protéine kinase C (PKC), les CaM kinases et les tyrosines kinases.

Alors que l'activation des récepteurs opioïdes et cannabinoïdes conduit à une inhibition de l'adénylate cyclase, il est peu probable que la PKA joue un rôle dans les mécanismes de régulation à court-terme puisque cette enzyme est activée par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Cependant, lors d'un traitement chronique, la morphine comme le Δ^9 -THC sont capables d'induire une augmentation de la production d'AMPc [9,10] qui pourrait activer la PKA. L'utilisation d'inhibiteurs de PKA a permis de montrer que cette kinase pouvait être impliquée dans la tolérance aux opiacés [11] ou aux cannabinoïdes [12] mais pas dans la désensibilisation des récepteurs opioïdes [13].

Les protéines kinases C regroupent une famille de serine/thréonine kinases comprenant plus d'une dizaine de membres et dont certains peuvent être activés par le calcium [14]. Les opioïdes étant capables d'augmenter le calcium intracellulaire, de nombreux travaux ont recherché un rôle de cette kinase dans la phosphorylation et la désensibilisation des récepteurs opioïdes. Ainsi, par des approches utilisant entre autres des inhibiteurs ou activateurs chimiques des PKC, il a été montré que cette enzyme était impliquée dans la désensibilisation [15], la phosphorylation [16] et la tolérance [17] induits par les opiacés. D'autres études ont, en revanche, pu montrer que la PKC serait plutôt impliquée dans la désensibilisation hétérologue des récepteurs opioïdes. La désensibilisation hétérologue ou désensibilisation croisée se caractérise par une désensibilisation de plusieurs RCPG après l'activation prolongée d'un seul [2].

Les kinases qui jouent le rôle le plus important dans la phosphorylation et la désensibilisation des RCPG sont les GRK et en particulier les GRK2 et GRK3, dont l'expression est ubiquitaire à la différence des autres isoformes qui sont exprimés de manière tissu-spécifique [18]. Ces enzymes sont des serine/thréonine kinases capables de phosphoryler le récepteur activé par son agoniste. L'héparine, un

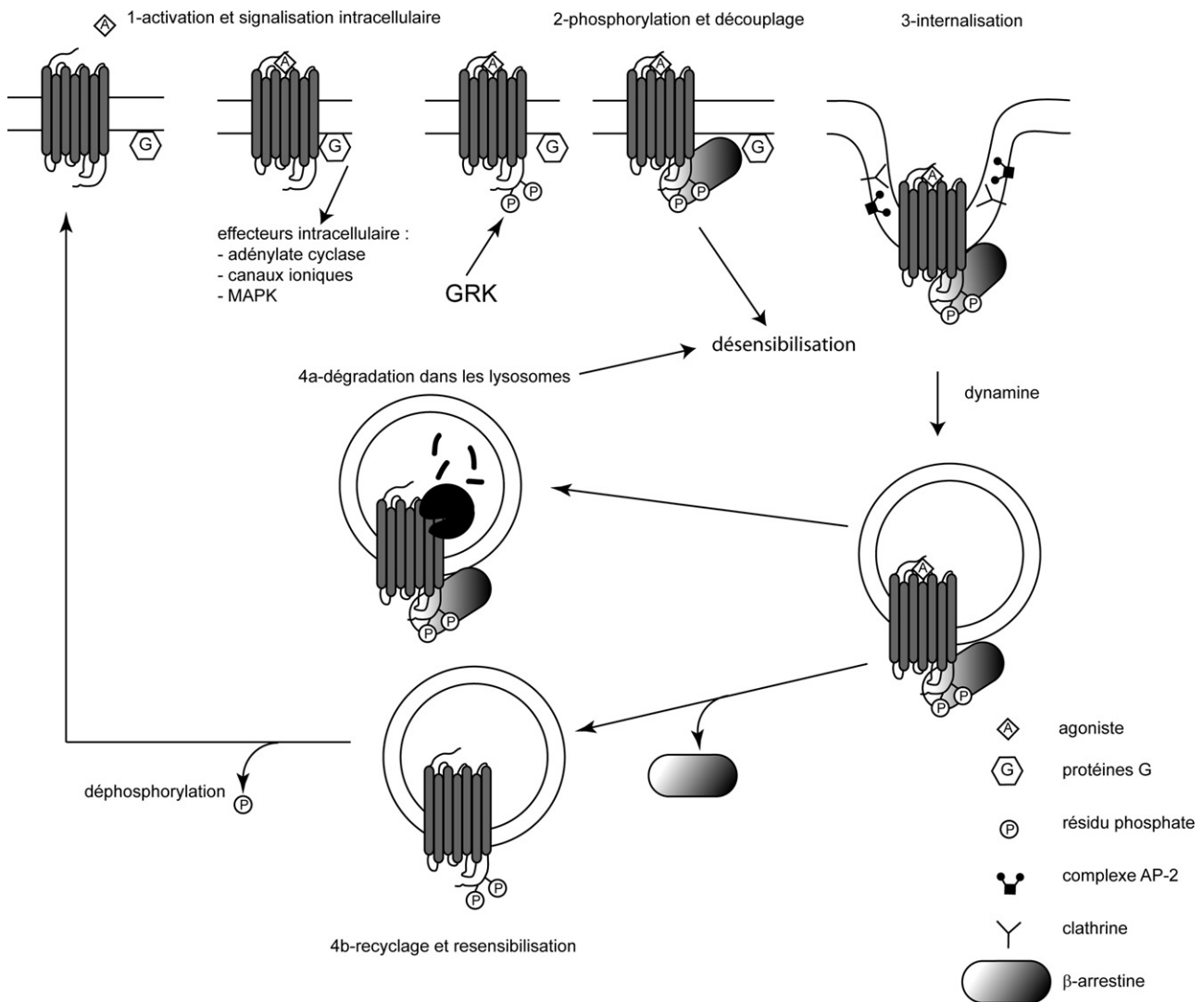


Figure 1 Régulation des récepteurs couplés aux protéines G.

La fixation de l'agoniste sur son récepteur entraîne un changement de conformation qui permet l'activation des protéines G qui vont aller moduler différents effecteurs intracellulaires (étape 1). Le récepteur activé par son agoniste est ensuite phosphorylé par une kinase spécifique des RCPG (GRK) et devient substrat pour la β -arrestine. La fixation de cette protéine au récepteur va non seulement provoquer un découplage fonctionnel récepteur/protéine G permettant la désensibilisation (étape 2), mais aussi l'internalisation du récepteur en assurant le recrutement de protéines comme la clathrine et le complexe AP-2 (étape 3). L'endocytose nécessite l'intervention de la dynamine qui grâce à son activité GTPasique va permettre la fermeture du puits de clathrine. Une fois internalisés, les récepteurs sont, soit dirigés dans les lysosomes où ils seront dégradés (étape 4a), soit dirigés dans les endosomes pour y être déphosphorylés puis recyclés dans un état actif à la membrane plasmique (étape 4b). En plus des facteurs mentionnés dans le texte, l'affinité récepteur/ β -arrestine jouerait un rôle dans la destinée post-internalisation [43–45].

inhibiteur non spécifique des GRK, est capable d'inhiber la phosphorylation et la désensibilisation du récepteur opioïde δ humain, exprimé de manière endogène dans la lignée de neuroblastome SK-N-BE [19]. L'utilisation d'un mutant dominant négatif de la GRK2, le GRK2-K220R, ou la surexpression de la protéine sauvage a permis de montrer que cette kinase était impliquée dans la phosphorylation et la désensibilisation du récepteur opioïde μ [16,20]. En utilisant un système d'expression hétérologue, l'oocyte de xénope, l'équipe de Mackie a pu montrer que la désensibilisation du récepteur CB1 impliquait la GRK3 [21].

En comparant les cinétiques de phosphorylation des récepteurs μ et δ à leur désensibilisation observée sur l'adénylate cyclase, l'équipe de Loh a montré que lorsque la phosphorylation est maximale à 5–10 minutes, aucune désensibilisation ne peut être mesurée [22]. Ces données suggèrent que la phosphorylation n'est pas le seul événement responsable de la désensibilisation. En effet, l'intervention d'une protéine de la famille des arrestines est nécessaire à l'inactivation du récepteur activé et phosphorylé. Cette famille de protéines est composée de quatre membres dont les β -arrestines-1 et 2 sont impliquées dans la régulation des RCPG et ce dans 3 événements en

particulier (Fig. 1) :

- la désensibilisation, puisqu'en se fixant au récepteur phosphorylé par la GRK, la β -arrestine va provoquer le découplage fonctionnel entre le récepteur et ses protéines G ;
- l'internalisation, grâce au recrutement de protéines accessoires comme la clathrine et le complexe AP-2 ;
- le devenir post-internalisation du récepteur, qui peut être une dégradation dans les lysosomes ou un recyclage à la membrane plasmique dans un état actif.

Des approches similaires à celles utilisées pour les GRK, à savoir la surexpression d'une β -arrestine sauvage ou de son mutant dominant négatif ont montré que ces protéines étaient impliquées dans la désensibilisation des récepteurs opioïdes [2] et cannabinoïdes [23]. In vivo, l'invalidation du gène codant pour la β -arrestine-2 inhibe non seulement la désensibilisation des récepteurs μ suite à un traitement à la morphine mais également la tolérance aux effets antinociceptifs [8].

La fixation de la β -arrestine au récepteur activé et phosphorylé va permettre l'internalisation (appelé également séquestration ou endocytose). Cette internalisation a pu être observée dans des cellules transfectées avec les récepteurs opioïdes [24–26] ou cannabinoïdes [27] mais aussi dans des cellules exprimant naturellement ces récepteurs [28,29]. L'utilisation d'inhibiteurs plus ou moins spécifiques de l'endocytose a montré que les récepteurs opioïdes et cannabinoïdes étaient internalisés majoritairement par la voie de la clathrine [30,31]. Il est important de noter qu'il existe des différences dans la capacité des agonistes à induire une internalisation des récepteurs. Ainsi, de nombreuses études ont pu montrer que la morphine contrairement aux ligands peptidiques endogènes ou au Tyr-D-Ala-Gly-Me-Phe-Gly(ol), analogue stable des enképhalines (DAMGO) est incapable de provoquer une internalisation du récepteur μ , à la fois in vitro [24] et in vivo [32]. Plus récemment, des études ont montré que dans d'autres conditions, la morphine induisait une endocytose des récepteurs μ dans des cultures de neurones striataux [33]. Cela pourrait s'expliquer par des différences quantitatives et qualitatives dans les protéines régulant l'internalisation comme par exemple les GRK, les arrestines ou plus récemment la phospholipase D2 [34].

Une fois le récepteur internalisé, il peut être dirigé vers les lysosomes pour y être dégradé augmentant ainsi la désensibilisation par réduction du nombre total de récepteurs actifs. Mais, le récepteur peut aussi être dirigé vers des endosomes de recyclage pour y être déphosphorylé puis relocalisé à la surface cellulaire dans un état actif, freinant ainsi la désensibilisation [35]. Divers paramètres vont influencer sur le devenir post-internalisation des récepteurs. On peut par exemple citer la nature de l'agoniste, puisqu'en présence d'un agoniste alcaloïde, l'étorphine, le récepteur δ est préférentiellement recyclé alors qu'en présence d'agonistes peptidiques, ce récepteur est dégradé dans les lysosomes provoquant ainsi une désensibilisation plus importante [36]. Le cas de la morphine est ici très intéressant puisque les travaux de Whistler et al. ont pu montrer que bien que cet alcaloïde induisait une forte tolérance et une absence d'internalisation du récepteur μ , la co-administration de DAMGO à faible concentration induit une internalisation des

récepteurs μ et réduit la tolérance [37]. Plus récemment, cette même équipe a démontré que des souris, chez lesquelles s'exprime un récepteur μ capable d'être internalisé et recyclé en présence de morphine [38], présentaient une tolérance aux effets analgésiques de la morphine moins importante comparée à des souris exprimant le récepteur sauvage [39].

L'interaction du récepteur avec des protéines accessoires peut aussi moduler son devenir après internalisation. En effet, le récepteur CB1 activé par le WIN55-512,2 est capable de se lier à une protéine, dénommée *G-protein-coupled receptor-associated sorting protein 1* (GASP1), qui va diriger le récepteur vers les lysosomes pour y être dégradé [40]. De plus, l'inhibition de l'interaction GASP1/récepteur CB1 réduit la tolérance aux effets analgésiques suite à un traitement au WIN55-512,2 en redirigeant le récepteur vers le recyclage [41] et donc probablement vers la resensibilisation.

Conclusions

Cette revue montre combien les mécanismes de la tolérance sont complexes, même en ne décrivant que ceux qui concernent directement le récepteur. En effet, d'autres processus existent, probablement bien plus complexes, comme la modification des niveaux d'expression de certaines protéines de signalisation (protéines G ou adénylate cyclase), la mise en jeu de systèmes opposants (systèmes glutamatergiques, systèmes « anti-opioïdes ») qui vont aussi contribuer à la mise en place de la tolérance. Cependant, il faut souligner les nombreux progrès réalisés depuis une dizaine d'années dans la compréhension des mécanismes de régulation des récepteurs opioïdes notamment, et en particulier le lien entre le trafic du récepteur et sa fonctionnalité, qui pourra à terme permettre de proposer de nouvelles voies thérapeutiques. Ainsi, on peut très bien imaginer une co-administration de morphine avec des molécules permettant l'internalisation/recyclage des récepteurs pour limiter la tolérance aux effets antinociceptifs. Enfin, on peut regretter le peu d'étude sur les mécanismes moléculaires de régulation des récepteurs cannabinoïdes, mais il y a fort à parier que ce manque va se combler rapidement au vu des intérêts grandissants de la médecine pour le « cannabis médicament », entre autres pour le traitement de la douleur [42].

Conflits d'intérêts

Pas de conflit d'intérêt.

Remerciements

Je tiens à remercier Florence Noble (laboratoire de neuropsychopharmacologie des addictions, CNRS UMR 7157, Inserm U 705) et Stéphane Allouche (laboratoire de biochimie, CHU de Caen) pour la relecture critique de ce manuscrit.

Références

- [1] Law PY, Hom DS, Loh HH. Opiate receptor down-regulation and desensitization in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells are two separate cellular adaptation processes. *Mol Pharmacol* 1983;24:413–4.
- [2] Marie N, Aguila B, Allouche S. Tracking the opioid receptors on the way of desensitization. *Cell Signal* 2006;18:1815–33.
- [3] Evans CJ, Keith Jr DE, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 1992;258:1952–5.
- [4] Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:12048–52.
- [5] Dill JA, Howlett AC. Regulation of adenylate cyclase by chronic exposure to cannabimimetic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;244:1157–63.
- [6] Sim LJ, Hampson RE, Deadwyler SA, Childers SR. Effects of chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci* 1996;16:8057–66.
- [7] Noble F, Cox BM. Differential desensitization of mu- and delta-opioid receptors in selected neural pathways following chronic morphine treatment. *Br J Pharmacol* 1996;117:161–9.
- [8] Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG. Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 2000;408:720–3.
- [9] Ammer H, Schulz R. Alterations in the expression of G-proteins and regulation of adenylate cyclase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells chronically exposed to low-efficacy mu-opioids. *Biochem J* 1993;295:263–71.
- [10] Rhee MH, Nevo I, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z. Differential superactivation of adenylate cyclase isozymes after chronic activation of the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 2000;57:746–52.
- [11] Bernstein MA, Welch SP. Effects of spinal versus supraspinal administration of cyclic nucleotide-dependent protein kinase inhibitors on morphine tolerance in mice. *Drug Alcohol Depend* 1997;44:41–6.
- [12] Lee MC, Smith FL, Stevens DL, Welch SP. The role of several kinases in mice tolerant to delta 9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305:593–9.
- [13] Chakrabarti S, Law PY, Loh HH. Distinct differences between morphine- and [D-Ala2,N-MePhe4,Gly-ol5]-enkephalin-mu-opioid receptor complexes demonstrated by cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation. *J Neurochem* 1998;71:231–9.
- [14] Churchill E, Budas G, Vallentin A, Koyanagi T, Mochly-Rosen D. PKC isozymes in chronic cardiac disease: possible therapeutic targets? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:569–99.
- [15] Chen Y, Yu L. Differential regulation by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C of the mu opioid receptor coupling to a G protein-activated K+ channel. *J Biol Chem* 1994;269:7839–42.
- [16] Johnson EA, Oldfield S, Braksator E, Gonzalez-Cuello A, Couch D, Hall KJ, et al. Agonist-selective mechanisms of mu-opioid receptor desensitization in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* 2006;70:676–85.
- [17] Narita M, Narita M, Mizoguchi H, Tseng LF. Inhibition of protein kinase C, but not of protein kinase A, blocks the development of acute antinociceptive tolerance to an intrathecally administered mu-opioid receptor agonist in the mouse. *Eur J Pharmacol* 1995;280:R1–3.
- [18] Ribas C, Penela P, Murga C, Salcedo A, Garcia-Hoz C, Jurado-Pueyo M, et al. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768:913–22.
- [19] Hasbi A, Polastron J, Allouche S, Stanasila L, Massotte D, Jauzac P. Desensitization of the delta-opioid receptor correlates with its phosphorylation in SK-N-BE cells: involvement of a G protein-coupled receptor kinase. *J Neurochem* 1998;70:2129–38.
- [20] Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Bodduluri SR, Laporte SA, Law PY, et al. Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7157–62.
- [21] Jin W, Brown S, Roche JP, Hsieh C, Celver JP, Kooor A, et al. Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. *J Neurosci* 1999;19:3773–80.
- [22] El Kouhen R, Kouhen OM, Law PY, Loh HH. The absence of a direct correlation between the loss of [D-Ala2, MePhe4, Gly5-ol]Enkephalin inhibition of adenylate cyclase activity and agonist-induced mu-opioid receptor phosphorylation. *J Biol Chem* 1999;274:9207–15.
- [23] Kouznetsova M, Kelley B, Shen M, Thayer SA. Desensitization of cannabinoid-mediated presynaptic inhibition of neurotransmission between rat hippocampal neurons in culture. *Mol Pharmacol* 2002;61:477–85.
- [24] Arden JR, Segredo V, Wang Z, Lameh J, Sadee W. Phosphorylation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged mu-opioid receptor expressed in HEK 293 cells. *J Neurochem* 1995;65:1636–45.
- [25] Li JG, Luo LY, Krupnick JG, Benovic JL, Liu-Chen LY. U50, 488H-induced internalization of the human kappa opioid receptor involves a beta-arrestin- and dynamin-dependent mechanism. Kappa receptor internalization is not required for mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 1999;274:12087–94.
- [26] Trapaidze N, Keith DE, Cvejic S, Evans CJ, Devi LA. Sequestration of the delta opioid receptor. Role of the C terminus in agonist-mediated internalisation. *J Biol Chem* 1996;271:29279–85.
- [27] Rinaldi-Carmona M, Le Duigou A, Oustric D, Barth F, Bouaboula M, Carayon P, et al. Modulation of CB1 cannabinoid receptor functions after a long-term exposure to agonist or inverse agonist in the Chinese hamster ovary cell expression system. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287:1038–47.
- [28] Coutts AA, Anavi-Goffer S, Ross RA, MacEwan DJ, Mackie K, Pertwee RG, et al. Agonist-induced internalization and trafficking of cannabinoid CB1 receptors in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2001;21:2425–33.
- [29] Hasbi A, Allouche S, Sichel F, Stanasila L, Massotte D, Landemore G, et al. Internalization and recycling of delta-opioid receptor are dependent on a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293:237–47.
- [30] Hsieh C, Brown S, Derleth C, Mackie K. Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurochem* 1999;73:493–501.
- [31] Keith DE, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, Kang L, et al. Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J Biol Chem* 1996;271:19021–4.
- [32] He L, Fong J, von Zastrow M, Whistler JL. Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization. *Cell* 2002;108:271–82.
- [33] Haberstock-Debic H, Kim KA, Yu YJ, von Zastrow M. Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons. *J Neurosci* 2005;25:7847–57.
- [34] Koch T, Brandenburg LO, Schulz S, Liang Y, Klein J, Holtt V. ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D2 activation is required for agonist-induced mu-opioid receptor endocytosis. *J Biol Chem* 2003;278:9979–85.

- [35] Moore CA, Milano SK, Benovic JL. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* 2007;69:451–82.
- [36] Marie N, Lecoq I, Jauzac P, Allouche S. Differential sorting of human delta-opioid receptors after internalization by peptide and alkaloid agonists. *J Biol Chem* 2003;278:22795–804.
- [37] He L, Whistler JL. An opiate cocktail that reduces morphine tolerance and dependence. *Curr Biol* 2005;15:1028–33.
- [38] Finn AK, Whistler JL. Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal. *Neuron* 2001;32:829–39.
- [39] Kim JA, Bartlett S, He L, Nielsen CK, Chang AM, Kharazia V, et al. Morphine-induced receptor endocytosis in a novel knockin mouse reduces tolerance and dependence. *Curr Biol* 2008;18:129–35.
- [40] Martini L, Waldhoer M, Pusch M, Kharazia V, Fong J, Lee JH, et al. Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1. *Faseb J* 2007;21:802–11.
- [41] Tappe-Theodor A, Agarwal N, Katona I, Rubino T, Martini L, Swiercz J, et al. A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids. *J Neurosci* 2007;27:4165–77.
- [42] Kogan NM, Mechoulam R. Cannabinoids in health and disease. *Dialogues Clin Neurosci* 2007;9:413–30.
- [43] Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* 1999;274:32248–57.
- [44] Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J Biol Chem* 2001;276:19452–60.
- [45] Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* 2000;275:17201–10.