

UNIVERSITE DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé UMR 7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire



Manon GERUM

soutenue le : 30 septembre 2021

pour obtenir le grade de : Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

Etude des mécanismes moléculaires et cellulaires de la sensibilisation latente à la douleur

THÈSE dirigée par :

Dr. Frédéric SIMONIN

Directeur de recherche, CNRS-Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. RIVAT Cyril Dr. BOUHASSIRA Didier Maître de conférences, Université de Montpellier Directeur de recherche, Inserm-Université Paris-Saclay

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Examinateur : Pr. POISBEAU Pierrick Strasbourg

Professeur des Universités, Université de

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, les Pr. Claire Gavériaux-Ruff et Pierrick Poisbeau ainsi que le Dr. Cyril Rivat et Didier Bouhassira pour avoir pris le temps de lire et d'apprécier mon travail de thèse.

Je remercie également mon directeur de thèse, le Dr. Frédéric Simonin, pour m'avoir accepté dans son équipe et pour toute l'autonomie qu'il m'a accordé au cours de ces trois ans de thèse.

Ma reconnaissance et ma gratitude vont également à Glenn et Raphaëlle, les grandes sœurs du labo qui m'ont tout appris (ou presque). Merci d'avoir partagé vos connaissances et votre savoir-faire, tant pour les manips et la vie de laboratoire que pour les raccourcis du parcours de la Faisanderie. Merci à Valérie U, pour ta bienveillance, ta patience et ta disponibilité face à mes nombreuses questions en tout genre (bon OK, surtout pour les commandes). Tu as su me transmettre ta passion pour la culture cellulaire et ce, malgré des SH récalcitrantes ! Je remercie également Juliette d'avoir été si matinale (ça méritait bien une ligne de remerciement...) pour m'apprendre les expériences d'hybridation *in situ*.

Puisqu'un tel travail ne pourrait voir le jour sans la collaboration et les connaissances de chacun, j'aimerais remercier tous ceux qui ont participé à ce projet de près ou de loin. Merci à Glenn et Océane de m'avoir prêté main forte dans les expériences de comportement et merci à Nathalie de reprendre le flambeau, la SLD a encore de beaux jours devant elle ! Merci au Dr. Frédéric Bihel et à Séverine Schneider, nos fournisseurs officiels en RF3286 et autres « RF… » en tout genre ; au Dr. Michaël Weber et à Michaël Dumas, pour avoir partagé leur expertise et leurs conseils avisés pour les expériences de *RNA-sequencing* ; au Dr. Dominique Massotte et à Romain Vauchelles pour m'avoir formé à l'utilisation des microscopes. Je remercie aussi Clémence Gieré, le Dr. Meggane Melchior et le Pr. Pierrick Poisbeau pour leur persévérance dans leur labo du « Nord ».

Je tiens à remercier ceux dont la présence égaye les longues journées passées au labo (et hors du labo aussi d'ailleurs), les fameux « *RCPG addicts* ». Des réunions au sommet, des soirées raclettes, des après-midis jeux de société, des balades à cheval, des pauses-cafés, des mélades (et autres mots inventés), des boutures de misère et j'en passe... Je remercie plus

particulièrement Rosine pour nos repas en tête à tête aux sujets de conversation divers et variés : gerbilles, cuisine, gerbilles, pâtisserie, gerbilles... J'espère que mes bananes mûres à point te manqueront. Juliette, tu auras su me réconcilier avec les vêtements aux motifs fleuris mais pas avec les hybridations *in situ*... C'était toujours un plaisir de partager nos frasques de laboratoire. Bon je peux te l'avouer maintenant, le café n'était qu'un prétexte pour venir papoter ! Certes, elles préfèrent les levures aux petites souris mais je remercie quand même les « ImpreSsionnistes ». Lucile, la bonne humeur du labo à la discrétion légendaire... Tu es la prochaine ! D'ici là, je compte sur toi pour ne pas oublier « d'y » rendre les assiettes. Et parce que rédiger sa thèse sous le soleil Strasbourgeois en plein confinement ça n'a pas de prix, j'aimerais également remercier Lina. Manifestement on ne se voyait pas assez souvent au labo mais nos chemins se recroiseront sûrement... Tu connais mon adresse.

Je remercie également les autres membres de l'équipe. C'était un plaisir de travailler parmi vous Sandra, Gabrielle, Renaud, Valérie K, Dorothée, Adam et Cloé. Merci à mes compagnons de bureau Emma, Stanislas et Arthur ; vos passages étaient aussi furtifs qu'agréables.

Je voudrais aussi remercier ceux sur qui « on peut toujours compter » comme on dit, dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci à toi Julie pour les patates magiques, les fous-rires passés 16h et pour ce magnifique séjour Antibois quelques jours après la rédaction de ce manuscrit. Merci à mon *« fraté »* Lucas, toujours présent pour une petite pause. Débrief' manips ou débrief' Koh-Lanta ? Bon j'aurais préféré faire de toi un marathonien pendant ma thèse mais tant pis ! Le parking, c'est pas mal aussi. J'aimerais aussi remercier mes acolytes depuis mes débuts dans les Neurosciences : Guitou pour ton soutien et ta patience à toute épreuve et Shaness, pour nos conversations sans fin et ta passion débordante pour les Sciences (et les licornes). « L'IDSN, ça rapproche », mais une thèse... Enfin, je lève également mon gobelet à Xavier. Toujours les mots justes et réconfortants... Sarcasme. Ou pas.

Je remercie également Maximilien, pour ton amour et ton soutien infaillible. Tes connaissances en informatique m'ont facilité le travail de nombreuses fois pendant ma thèse et épargné les cheveux blancs. Merci pour tes conseils avisés tout au long de la rédaction et la relecture de certains passages de ce manuscrit qui ne serait pas aussi abouti sans toi.

Je remercie mes parents et mon petit frère Nono qui m'ont toujours encouragé dans ces longues études... J'espère que vous serez fiers.

D'avance je m'excuse pour ceux que j'aurais oublié de mentionner ici, qui m'ont épaulé dans cette aventure et qui se reconnaîtront sûrement...

AC : Adénylate Cyclase ACTH : Hormone adrénocorticotrope ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien AMPA : α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4isoxazolepropionic acid AMPc : AMP cyclique ARN : Acide ribonucléique ASIC : Acid-Sensing Ion Channel ATP : Adénosine triphosphate AUC : Area Under the Curve **BDNF** : Brain-Derived Neurotrophic Factor **BRET** : Bioluminescence Resonance Energy Transfer β -FNA : β -funaltrexamine CAMKII : Calmoduline kinase II Camp : Cathelicidin antimicrobial peptide Cd177 : Antigène Cd177 CGRP : Calcitonin Gene-Related Peptide CFA : Complete Freund's Adjuvant CREB : cAMP Response Element-binding Protein CTX : Cholera toxin DAG : Diacylglycerol DAMGO : [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]enkephalin

DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern DMR : Dynamic Mass Redistribution DOR : Delta (δ) Opioid Receptor Elane : Elastase neutrophil expressed ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases FDA : Food and Drug Administration FRET : Förster Resonance Energy Transfer GABA : Gamma (y)-aminobutyric acid **GDNF** : *Glial Dependant Neurotrophic* Factor GDP : Guanosine diphosphate GIRK : *G*-protein-gated Inwardly Rectifying K^+ GnIH : Gonadotropin-Inhibitory Hormone **GRD** : Ganglion Rachidien Dorsal GRK : *G*-protein coupled Receptor Kinases GTP : *Guanosine triphosphate* HIO : Hyperalgésie Induite par les Opioïdes hNPFF1R : human Neuropeptide FF Receptor 1 hRFRP-3: RFRP-3 humain HRP : Horseradish Peroxydase HTM : High Threshold Mechanical IASP : International Association for the Study of Pain

icv : (injection) intracérébroventriculaire i.p. : (injection) intrapéritonéale IP3 : Inositol-triphosphate IL-1 β : Interleukine 1 β JNK : *c-Jun N-terminal protein Kinase* Kiss1R : Kisspeptin 1 Receptor KO: Knock-Out KOR : *Kappa* (κ) Opioid Receptor LC : Locus coeruleus LH : Hormone Luténéisante LTP: Long-Term Potentiation MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases ME : Moelle Epinière mGluR : metabotropic Glutamate Receptor MOR : $Mu(\mu)$ Opioid Receptor Mmp8 : Matrix metalloproteinase 8 Mpo : Myéloperoxydase Mrg : *Mas-related genes* MSH : Mélanocortine Nac : Noyau Accumbens NAC : N-acétylcystéine NGF : Nerve Growth Factor NK1R : Neurokinin 1 Receptor NMDA : N-Methyl-D-Aspartate NPAF : Neuropeptide AF NPFF: Neuropeptide FF NPFF1R : Neuropeptide FF 1 Receptor NPFF2R : Neuropeptide FF 2 Receptor NPY : Neuropeptide Y NTS : Noyau du Tractus Solitaire NTX : Naltrexone

N/OFQ : Nociceptine/Orphanine FQ

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAG : Periaqueducal gray

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PBS : *Phosphate Buffer Saline*

PCR : Polymerase Chain Reaction

pERK : ERK phosporylé

PIP2 : Phosphatidyl-inositol-4,5diphosphate

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PLC : Phospholipase C

POMC: Pro-opiomélanocortine

PPSE : Potentiel Post-Synaptique Excitateur

PRR : Pattern Recognition Receptors

PrRP : Prolactine Releasing Peptide

PrRP-R : PrRP Receptor

PVN : (noyau) paraventriculaire

QRFP : pyroglutamylated RF-amide peptide

QRFP-R : *QRFP Receptor*

RAGE : *Receptors for Advanced Glycation Endproducts*

RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G

RF9 : N-adamantane-1-carbonyl-Arg-Phe-NH₂ trifluoroacetate

RFRP : *RF-amide Related Peptide*

RGS : *Regulator of G-protein Signaling*

RIN : RNA Integrity Number

RT : Room Temperature

RT-qPCR : *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction* RVM : *Rostral Ventromedial Medulla* s.c. : (injection) sous-cutanée SLD : Sensibilisation Latente à la Douleur SNC : Système Nerveux Central TLR4 : *Toll Like Receptors 4* TNF-α : *Tumor Necrosis Factor α* TSA : *Tyramide Signal Amplification* TrkA : *Tyrosine receptor kinase A* TrkB : *Tyrosine receptor kinase B* TRPA1 : Transient Receptor Potential Ankyrin 1

TRPM8 : Transient Receptor Potential Melastatin 8

TRPV1 : Transient Receptor Potential Vanilloid 1

VLM : Ventrolateral medulla

VPL : (noyau) Ventro-Postéro-Latéral

VPM : (noyau) Ventro-Postéro-Médian

VTA : Ventral Tegmental Area

WDR : Wide Dynamic Range

Sommaire

Table des illustrations	15
Introduction	17
Chapitre 1 : Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)	17
1 Structure et classification des RCPG	
2 Signalisation induite par l'activation d'un RCPG	
2.1 La voie des protéines G	
2.2 Les GRK et les arrestines	
3 Quelques notions de pharmacologie	
Chapitre 2 : La douleur	
1 Définitions : douleur et nociception	
2 Le système nociceptif	
2.1 Les nocicepteurs	
2.2 La moelle épinière (ME), premier lieu d'intégration du message noci	iceptif28
2.3 La matrice de la douleur	
3 La modulation du message nociceptif	
3.1 La théorie du portillons	
3.2 Les contrôles descendants	
3.3 Le contrôle opioïdergique de la douleur	
4 Douleur aiguë et chronique	
4.1 Mécanismes à l'origine des douleurs chroniques	
4.1.1 La sensibilisation périphérique	
4.1.2 La sensibilisation centrale	
4.2 Les traitements	
Chapitre 3 : Le système opioïde endogène	
1 Les opiacés exogènes	
2 Les peptides opioïdes endogènes	
3 La pharmacologie des récepteurs opioïdes	
3.1 Le couplage aux protéines G	
3.2 La voie de signalisation des β-arrestines	45
3.3 L'activité constitutive des récepteurs opioïdes	
3.4 L'hétérodimérisation des récepteurs opioïdes	

4	R	lôles da	ns les circuits de la douleur	49
5	L	es effet	s secondaires des opiacés	53
4	5.1	Les	opiacés et l'addiction	53
4	5.2	L'hy	yperalgésie induite par les opioïdes	54
	5	.2.1	Le rôle de MOR	55
	5	.2.2	Les mécanismes neuronaux	55
Ch	api	tre 4 : I	a sensibilisation latente à la douleur (SLD)	57
> _ La	Art. teni	icle de t Pain S	revue : Behavioral Characterization, Clinical Relevance and Mechanism Sensitization	is of
Ch	api	tre 5 : I	Le système de récepteurs à peptides RF-amides	100
1	G	dénérali	tés	100
2	Ir	nplicati	ion dans la modulation de la nociception	103
4	2.1	Le s	système NPFF, NPAF et NPFF2R	103
4	2.2	Le s	ystème 26RFa, 43RFa et GPR103	104
4	2.3	Le s	système des peptides PrRP et PrRP-R	105
4	2.4	Le s	ystème des kisspeptines et Kiss1R	106
4	2.5	Le s	ystème des peptides RFRP et NPFF1R	107
	2	.5.1	Localisation du système RFRPs/NPFF1R dans les voies nociceptives	107
	2 ér	.5.2 vidence	L'implication du système RFRPs/NPFF1R dans la nociception : premi	ères 109
	2	.5.3	Développement d'un antagoniste sélectif de NPFF1R, le RF3286	110
	2	.5.4	Caractérisation du RF3286, antagoniste de NPFF1R, in vitro et in vivo	111
	2	.5.5	RFRP-3/ NPFF1R : un système anti-opioïde	112
O	bje	ectifs d	les travaux de thèse	115
Μ	até	ériels e	et méthodes non cités dans l'article	119
1 par	E c l'a	valuatio adminis	on de l'administration répétée de RF1156 sur la l'hyperalgésie et la SLD indu tration de CFA	uites 119
	1.1	Con	nposé administré	119
	1.2	Eva	luation de la sensibilité nociceptive mécanique	119
	1.3	Proc	cédure expérimentale	119
2	E	valuatio	on de la SLD induite par la carragénine chez les souris KO pour GPR103a	120
4	2.1	Les	souris KO pour GPR103a	120
4	2.2	Proc	cédure expérimenale	121
3 inc	E luit	valuatio es par la	on de l'administration répétée de paquinimod sur l'hyperalgésie et la S a carragénine	SLD 121
	3.1	Con	nposé administré	121

3.2	Procédure expérimentale	. 121
4 Qu	antification de l'expression des gènes dans la ME par RT-qPCR	. 122
4.1	Dissection de la ME	. 122
4.2	Purification d'ARN à partir des ME	. 122
4.3	Protocole de RT-qPCR	. 123
5 Vis	sualisation de l'expression de transcrits par hybridation in situ dans la ME	. 123
6 Qu	antification de l'expression des gènes dans les leucocytes par RT-qPCR	. 125
6.1	Isolement de globules blancs à partir du sang de souris	. 125
6.2	Purification d'ARN et évaluation de l'intégrité des ARN	. 125
7 Tes	st de liaison du [³⁵ S]GTPγS sur préparations membranaires de ME	. 127
7.1	Dissection des ME et préparation de membranes	. 127
7.2	Test de liaison du [³⁵ S]GTPγS	. 127
8 Tes	st de liaison du [35 S]GTP γ S sur membranes de cellules SH-S _Y 5 _Y -hNPFF1R	. 127
8.1	Culture des cellules SH-S _Y 5 _Y -hNPFF1R	. 127
8.2	Préparation de membranes à partir des cellules SH-S _Y 5 _Y -hNPFF1R	. 128
8.3	Test de liaison du [³⁵ S]GTPγS	. 128
Résult	tats	.129
Partie I	: Implication des récepteurs à peptides RF-amides dans SLD	. 129
1 Imp	plication du système 26RFa/GPR103 dans la SLD induite par une inflammation.	. 129
1.1	Résultats	. 130
1.2	Discussion	. 134
1.2	.1 L'implication de GPR103 dans l'hyperalgésie inflammatoire	. 134
1.2	.2 L'implication de GPR103 dans la SLD	. 136
2 Imp	plication du système RFRP-3/NPFF1R dans la SLD	. 137
> Artic inflamm sensitize	le en préparation : RFRP-3/NPFF1R is a pronociceptive system that contribut natory processes responsible for the establishment and maintenance of latent ation	es to pain
Partie II	I : Etude des processus inflammatoires qui sous-tendent la SLD	. 194
1 Qu s100a9	antification de l'expression des transcrits Camp, Cd177, Mmp8, Mpo, s100a dans la ME lors de la SLD par RT-qPCR	a8 et . 194
1.1	Résultats	. 196
1.2	Discussion	. 198
2 Vis hybrida	sualisation des transcrits s100a9, Cd177, Mmp8 et Mpo dans la ME lors de la SLI tion <i>in situ</i> .) par . 198
2.1	Résultats	. 200
2.2	Discussion	. 201

3 Qua les leuco	antification de l'expression des transcrits Camp, Mmp8, s100a9, IL-1β et ocytes lors de la SLD par RT-qPCR	ΓNF-α dans 203
3.1	Résultats	
3.2	Discussion	
4 Cor et le mai	nséquences du blocage pharmacologique de S100A8/S100A9 dans le déve intien de la SLD induites par la carragénine	eloppement 206
4.1	Résultats	
4.2	Discussion	
Partie II	II : Etude de l'activité constitutive de MOR in vivo et in vitro	
1 Mes	sure de l'activité constitutive de MOR dans la ME lors de la SLD	
1.1	Résultats	
1.2	Discussion	
2 Mis hNPFF1	se en évidence de l'activité constitutive de MOR dans la lignée cellulaire IR	e SH-S _Y 5 _Y - 214
2.1	Résultats	
2.2	Discussion	
Discus	sion générale	
Conclu	usion	
Bibliog	graphie	

Table des illustrations

Tableau 1 : Séquence en acides aminés des peptides opioïdes endogènes chez différentes
espèces de mammifères
Tableau 2 : Séquence en acides aminés des peptides RF-amides chez l'Homme 101
Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour les expériences de RT-qPCR dans les échantillons
d'ARN issus des ME ou des leucocytes126

Cette thèse s'intéresse à l'implication et aux adaptations à long-terme liées à la stimulation répétée des récepteurs opioïdes et à peptides RF-amides dans un modèle particulier de douleur chronique chez l'animal. Ces deux familles de récepteurs appartenant aux récepteurs couplés aux protéines G, il convient dans un premier temps de présenter les caractéristiques propres à ces récepteurs ainsi que les voies de signalisation associées. Sera ensuite abordé le processus complexe qu'est la douleur et sa modulation par le système opioïde endogène. Parmi les différents mécanismes contribuant à la chronicisation de la douleur, une attention particulière sera portée sur la sensibilisation latente à la douleur, objet d'étude de ce travail de thèse. Enfin, le système des récepteurs à peptides RF-amides sera introduit brièvement avant de détailler leur implication dans la modulation de la nociception en tant que système anti-opioïde.

Chapitre 1 : Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

La détection des variations dans le milieu extérieur est essentielle pour l'adaptation et la survie des organismes au sein de leur environnement. Pour les organismes pluricellulaires, la tâche est d'autant plus complexe puisqu'en plus d'évoluer dans le milieu environnant, les différentes cellules doivent communiquer entre elles pour coordonner plusieurs fonctions. Les cellules transmettent ces informations *via* différents types de molécules (hormones, neurotransmetteurs, facteurs de croissance) qui sont détectées par des récepteurs nucléaires ou **membranaires**. Ces derniers sont situés dans la membrane plasmique à l'interface entre le milieu intracellulaire et extracellulaire pour lier des molécules (**ligand**) ce qui entraîne une modification de leur conformation puis une succession de réactions biochimiques au sein de la cellule (**signalisation intracellulaire**) pour lui communiquer l'information. Parmi les récepteurs membranaires, on distingue :

- Les récepteurs-enzymes qui comportent une activité enzymatique intrinsèque, tels que les récepteurs à tyrosine-kinase ou sérine/thréonine-kinase (récepteurs aux facteurs de croissance par exemple).
- Les récepteurs-canaux, dont la liaison du ligand permet l'ouverture du canal pour provoquer une entrée ou une sortie rapide d'ions de la cellule (récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine).
- Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), dont l'activation permet le recrutement de protéines hétérotrimériques appelées protéines G.

Ces derniers constituent la plus grande famille de protéines membranaires chez les mammifères, avec près de 800 gènes chez l'Homme codant pour les différents RCPG (Fredriksson et al., 2003) ce qui représente plus de 1% du génome des vertébrés (Bockaert & Pin, 1999). Ils répondent à des ligands de différentes nature (photons, odeurs, nucléotides, lipides, acides aminés, peptides et protéines) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques (odorat, vision, goût, fonctions reproductrice, endocrine et cardiovasculaire) et, par conséquent, pathologiques. C'est pourquoi les recherches menées sur les RCPG sont toujours aussi importantes et ont fait l'objet de deux prix Nobel, décernés en 1994 à Alfred Gillman et Martin Rodbell pour la découverte des protéines G et leur voie de signalisation ainsi qu'en 2012 à Robert Lefkowitz et Brian Kobilka pour la résolution de la structure d'un RCPG (le récepteur β_2 adrénergique).

1 Structure et classification des RCPG

Les RCPG ou récepteur à 7 domaines transmembranaires possèdent une structure conservée et caractéristique, constituée :

- D'un domaine extracellulaire N-terminal. Ce site est la cible de modulations posttraductionnelles, comme la N-glycosylation.
- D'une longue chaine polypeptidique unique qui traverse la membrane cellulaire sept fois (les sept domaines transmembranaires, fig. 1, TM1 – TM7). Ces hélices α sont reliées entre elles par trois boucles intracellulaires et extracellulaires (fig. 1, ICL1-ICL3 et ECL1-ECL3). Les deux premières boucles extracellulaires sont liées par un pont disulfure qui sert à stabiliser la conformation du récepteur. Le site de liaison au ligand forme une poche du côté extracellulaire du récepteur et est constitué principalement de TM3, TM5, TM6 et TM7. Certains résidus des boucles extracellulaires peuvent également participer à la liaison du ligand.

 D'un domaine intracellulaire C-terminal, qui initie la signalisation intracellulaire par son interaction avec les protéines G hétérotrimériques et qui peut également être phosphorylé. L'extrémité C-terminale peut parfois s'ancrer dans la membrane plasmique *via* la palmitoylation d'une cystéine (fig. 1).



Plusieurs classifications des RCPG existent, mais celle se basant sur les homologies de séquence permet de distinguer 6 familles (Alexander et al., 2019; Bockaert & Pin, 1999) :

- La famille 1 contient la rhodopsine, premier RCPG à avoir été décrit. Cette famille représente à elle seule près de 90% des RCPG.
- La famille 2 comprend des récepteurs aux hormones peptidiques apparentés au récepteur à la sécrétine.
- La famille 3 contient les récepteurs métabotropiques du glutamate et du GABA.
- La famille 4 correspond aux récepteurs des phéromones fongiques.
- La famille 5 comprend des récepteurs de type *smoothened/frizzled* impliqués dans le développement embryonnaire.
- La famille 6 des récepteurs à l'AMP cyclique (AMPc) sont présents uniquement chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*.

Ces familles se différencient principalement par la longueur de la séquence N-terminale, la nature du ligand et la localisation du site de liaison à l'agoniste (ligand capable d'activer le récepteur). Ainsi, la famille 1 est elle-même subdivisée en 3 familles (fig. 2) : par exemple, les récepteurs de la famille 1-a possèdent une poche hydrophobe au sein des domaines transmembranaires pour lier de petites molécules (ATP, catécholamines, etc). Le site de

liaison des récepteurs de la famille 1-b et 1-c font intervenir l'extrémité N-terminale ainsi que les boucles extracellulaires 1 et 2, à la différence que les récepteurs de la famille 1-c lient de plus gros peptides. Les récepteurs de la famille 2, également activés par des neuropeptides, lient ces derniers par le domaine N-terminal avec la participation de la boucle extracellulaire 1 et du domaine transmembranaire 1. Enfin, le domaine N-terminal des récepteurs de la famille 3 est très long (environ 500 acides aminés) et se replie sur lui-même pour former une poche constituant le site de liaison (Bockaert & Pin, 1999).



2 Signalisation induite par l'activation d'un RCPG

Il existe différents effecteurs des RCPG : les **protéines G**, les **GRK** (*G-protein coupled Receptor Kinases*) et les **arrestines**. Les protéines G initient l'activation du récepteur et de manière complémentaire, les GRK et les arrestines interrompent le couplage à la protéine G.

2.1 La voie des protéines G

Comme leur nom l'indique, le principal effecteur des RCPG sont les protéines G. Ce sont des protéines hétérotrimériques constituées de 3 sous-unités : α , β et γ . A l'état inactif, la sousunité G_{α} lie une molécule de GDP. La liaison de l'agoniste au récepteur provoque un changement de conformation des segments transmembranaires (Katritch et al., 2013; Venkatakrishnan et al., 2016) et le recrutement de la protéine G (fig. 3, panel du haut). L'interaction de la protéine G avec le récepteur déclenche l'échange de GDP pour du GTP, provoquant la dissociation de la protéine G en G_{α} d'une part, et $G_{\beta\gamma}$ d'autre part. La sous-unité $G_{\beta\gamma}$ module l'activité de canaux ioniques, kinases, phospholipases et active les protéines GRK. Le complexe G_{α} lié au GTP va activer différentes voies de signalisation selon le type de sousunité G_{α} :

- G_{as}: active l'adénylate cyclase (AC), conduisant à la production d'AMPc à partir d'ATP. L'AMPc peut agir comme messager secondaire et activer la protéine kinase A (PKA).
- G_{αi/o}: inhibe l'AC et diminue donc la production d'AMPc.
 Ces deux types de sous-unités ont été identifiées grâce à leur susceptibilité à la toxine cholérique (CTX, *Cholera toxin*) qui stimule la sous-unité G_{αs} (Cassel & Selinger, 1977) et la toxine pertussique (PTX, *Pertussis toxin*) qui inhibe la sous-unité G_{αi/o} (Bokoch & Gilman, 1984).
- G_{αq}: active une enzyme membranaire, la phospholipase C (PLC) clivant le phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate (PIP₂) en inositol-triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). IP3 se lie aux canaux calciques du réticulum endoplasmique pour induire la libération de Ca²⁺ dans le cytosol, tandis que DAG active la protéine kinase (PKC) qui favorise à son tour l'ouverture de canaux calciques membranaires.
- G_{α12/13} : moins bien connue, elle active la protéine Rho-GEF.

On dénombre ainsi 21 sous-unités G_{α} réparties dans ces 4 catégories ainsi que 6 sous-unités G_{β} et 13 sous-unités G_{γ} (Milligan & Kostenis, 2006). Il existe ainsi une multitude de combinatoires possibles de sous-unités G_{α} et $G_{\beta\gamma}$ par conséquent, une grande diversité de réponses cellulaires induites par l'activation d'un RCPG. Le retour à l'état basal est initié par les protéines RGS (*Regulator of G-protein Signaling*) qui stimulent l'activité GTPase de la sous-unité G_{α} : l'hydrolyse de GTP en GDP permet à la protéine $G_{\alpha\beta\gamma}$ de se recomposer pour clore le cycle.

2.2 Les GRK et les arrestines

Les GRK et les arrestines fonctionnent de concert pour interrompre la signalisation induite par les protéines G. Les GRK phosphorylent l'extrémité C-terminale du récepteur activé ce qui empêche le couplage avec les protéines G et recrute l'arrestine. Il existe 4 isoformes d'arrestines : celles qui sont strictement impliquées dans le processus de la vision et les β -arrestines (1 et 2) « non visuelles » qui nous intéressent ici. Ces protéines cytosoliques interagissent avec l'extrémité phosphorylée du récepteur pour déclencher

l'endocytose du complexe récepteur/β-arrestine par la formation de puits tapissés de clathrines (fig. 3, panel du bas). Ce processus requiert l'aide des protéines adaptatrices AP-2 qui aident à l'assemblage des clathrines ainsi que nombreuses autres protéines accessoires (Goodman et al., 1996). Une fois le complexe internalisé dans l'endosome dit précoce, le pH acide permet de dissocier le ligand du récepteur. Le récepteur peut être ensuite adressé dans l'endosome tardif puis au lysosome pour être dégradé. De cette manière, l'endocytose entraîne une diminution du nombre de récepteurs accessibles à la membrane, participant au processus de **désensibilisation**. Sinon, le récepteur peut être adressé dans des compartiments de recyclage, où le récepteur est déphosphorylé par des phosphatases (afin qu'il retrouve une conformation de repos) avant d'être à nouveau introduit à la membrane plasmique. Ce processus de **désensibilisation** permet d'éviter qu'un trop grand nombre de récepteurs soit dégradés et donc une désensibilisation trop importante, qui rendrait la cellule incapable de répondre à de nouveaux ligands.



Figure 3 : Cycle d'activation d'un RCPG. La liaison d'un agoniste à son RCPG modifie sa conformation et recrute la protéine G (pannel du haut). Cette interaction permet à la sous-unité G_{α} d'échanger le GDP pour du GTP et de se dissocier de la sous-unité $G_{\beta\gamma}$. G_{α} et $G_{\beta\gamma}$ modulent différents effecteurs, dont respectivement l'adénylate cyclase et des canaux ioniques. La phosphorylation de l'extrémité C-terminale par les GRK (G-protein coupled Receptor Kinases) permet la liaison de l'arrestine (Arr) et de protéines (dont la protéine adaptatrice AP-2) au complexe et conduit à la formation de puits de clathrines (pannel du bas). Une fois internalisé, le récepteur peut être dégradé par les lysosomes ou déphosphorylé pour être recyclé à la membrane (Weis & Kobilka, 2018).

3 Quelques notions de pharmacologie

On désigne par ligand tout composé se liant à un récepteur. La liaison du ligand avec le RCPG est spécifique (donc saturable) et à l'origine d'un effet biologique. Ces deux variables sont quantifiables ; on parle alors respectivement de **relation ligand-récepteur** et de relation **dose-effet** qui permettent de caractériser et de déterminer la nature du ligand.

La liaison du ligand à son récepteur n'implique pas de liaisons covalentes et est donc réversible. Cela implique qu'il existe un équilibre entre le nombre de ligands [L] et de récepteurs libres [R] et le nombre de complexes ligand/récepteur [LR] et qui suit la loi d'action de masse : [L] + [R] \leftrightarrows [LR]. C'est sur ce constat que se basent les techniques de liaison au récepteur, qui permettent de déterminer expérimentalement l'**affinité** d'un ligand pour son récepteur (c'est-à-dire sa capacité à se fixer au récepteur) par son Kd (la concentration pour laquelle la moitié des récepteurs sont occupés) ou son Ki (la constante de dissociation obtenue par inhibition de la fixation d'un ligand déterminé) suivant la méthode employée. Cependant, une même substance peut se fixer à plusieurs récepteurs avec des affinités différentes. Le rapport d'affinité entre deux récepteurs définit la **sélectivité** de la substance pour un récepteur. La sélectivité est ainsi relative.

La liaison d'un ligand à son récepteur stabilise également le récepteur dans une conformation particulière pour induire ou non un effet biologique. Des tests fonctionnels sont réalisés, où cet effet biologique est évalué en présence de doses croissantes de la substance à tester (courbe dose-effet) et permettent d'établir plusieurs paramètres pour définir la nature du ligand. Un **agoniste entier** favorise la conformation du récepteur dans son état actif (fig. 4A) pour produire un effet biologique maximal E_{max}, tandis que l'**agoniste partiel** ne produira qu'un effet incomplet (fig. 4B). L'**efficacité** d'un agoniste étant déterminée par l'E_{max}, un agoniste partiel est nécessairement moins efficace qu'un agoniste complet. L'**EC50** est la concentration d'agoniste qui induit la moitié de l'effet maximal (fig. 4B) et caractérise la **puissance** de l'agoniste (plus l'EC50 est faible, plus l'agoniste est puissant). La liaison d'un **antagoniste** à son récepteur empêche celle de l'agoniste, soit parce qu'il occupe le même site de liaison (**antagoniste compétitif**), soit parce qu'il se lie sur un autre site (**antagoniste non compétitif**). Dans le second cas, l'antagoniste induit une **modulation allostérique** de la conformation du récepteur qui empêche l'agoniste de s'y lier.

Un antagoniste étant dépourvu d'effet propre, son effet est caractérisé à l'aide de courbes doses-réponses avec l'agoniste en présence de concentrations croissantes d'antagoniste. Un antagoniste compétitif décale les courbes doses-réponses de l'agoniste vers la droite (et augmente donc l'EC50, fig. 4B) et la droite de Schild obtenue à partir de ces données a une pente d'environ 1. Cette dernière permet de déterminer le **PA**₂ (logarithme négatif de la concentration de l'antagoniste pour laquelle il faut doubler la concentration d'agoniste pour obtenir le même effet) qui définit la puissance de l'antagoniste compétitif. L'antagoniste non compétitif quant à lui diminue l'efficacité de l'agoniste (fig. 4B). Enfin, il existe des récepteurs constitutivement actifs c'est-à-dire capables d'induire de la signalisation même en l'absence d'agoniste. Dans ce cas, un **agoniste inverse**, en plus d'empêcher la liaison de l'agoniste au récepteur, induit l'état inactif du récepteur et diminue donc sa signalisation basale (fig. 4A).



Figure 4 : Les différents types de ligands des RCPG et leur profil pharmacologique. L'activation d'un RCPG déclenche une réponse biologique mesurable. La liaison d'un agoniste à son récepteur induit une courbe dose-réponse de type sigmoïdale avec une efficacité maximale E_{max} alors qu'un agoniste partiel montre une efficacité réduite. Un agoniste inverse diminue la signalisation basale du récepteur en absence d'agoniste (activité constitutive). Un antagoniste compétitif induit un décalage vers la droite de la courbe-dose réponse induite par l'agoniste ce qui augmente l'EC50 (la dose d'agoniste qui provoque 50% de l'effet biologique) tandis qu'un antagoniste non compétitif en diminue l'efficacité.

Ces essais fonctionnels, notamment dans le cas des RCPG, suivent la production d'AMPc (couplage à la sous-unité $G_{\alpha s}$ ou $G_{\alpha i/o}$) ou la variation de concentration intracellulaire de Ca²⁺ (couplage à la sous-unité G_q). Plus récemment, il a été montré que la β -arrestine est capable elle aussi d'induire des voies de signalisation différentes de celles liées aux protéines G dont celle des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*). Certains agonistes recrutent plusieurs ou l'ensemble de ces voies de signalisation, tandis que les **agonistes biaisés** en activent une seule (Kenakin & Christopoulos, 2013). Le biais est en général défini en fonction de la cascade de signalisation induite par un agoniste de référence (souvent, le ligand endogène). Il peut concerner l'activation préférentielle de la signalisation induite par les protéines G par rapport

à celle induite par les β -arrestines (et inversement) ou le couplage à une protéine G différente de celle de l'agoniste de référence. Un même récepteur provoque donc différentes réponses en fonction de l'agoniste qui l'active, ce qui ajoute un niveau de complexité dans la diversité de réponses qu'il peut induire.

Actuellement, les RCPG sont la cible de près d'un tiers des médicaments (Santos et al., 2017) et les traitements pour les douleurs chroniques n'y dérogent pas. En effet, de nombreux systèmes impliquant des RCPG interviennent dans la modulation de la nociception et de la douleur, ce qui en fait des cibles thérapeutiques potentielles ou réelles (Stone & Molliver, 2009). Les traitements actuels se révèlent néanmoins insuffisant car peu efficaces ou accompagnés d'effets secondaires graves. Le développement de nouveaux composés pour lutter contre les douleurs pathologiques nécessite donc la compréhension des processus associés à la douleur aiguë ainsi qu'à sa chronicisation.

Chapitre 2 : La douleur

1 Définitions : douleur et nociception

La **douleur** est définie par l'*International Association for the Study of Pain* (IASP) comme une « expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à, ou ressemblant à celle associée à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle » (Raja et al., 2020). Elle est à différencier de la **nociception** (du latin *nocere* signifiant nuire), mécanisme par lequel le système nerveux encode, traite et intègre les stimuli préjudiciables à l'organisme. Alors que la nociception est principalement un processus spinal, la douleur désigne l'interprétation consciente de ces messages nociceptifs au niveau supraspinal, où elle sera alors perçue comme étant déplaisante et aversive. Ainsi par sa dimension psychologique, la douleur est subjective et propre à chacun selon l'expérience que nous en avons. Elle comporte trois composantes (Melzack & Casey, 1968) :

- Sensori-discriminative, par l'intermédiaire de laquelle le système sensoriel détermine la nature (brûlure, pincement, décharges électriques...), la localisation, la durée et l'intensité relative du stimulus nociceptif.
- Emotionnelle et affective, à l'origine du caractère déplaisant et aversif de la douleur, nous rappelant de ne pas solliciter excessivement la région endommagée. Ce processus permet d'aider la guérison de la blessure à l'origine de la douleur.
- **Cognitive** et **comportementale**, liée au sens qu'on attribue à la douleur en fonction du contexte et sa mémorisation, afin d'anticiper ou d'éviter les situations aversives.

La capacité à détecter les stimuli nocifs et à ressentir une douleur aiguë est essentielle pour la survie et l'intégrité de l'organisme. Elle permet de produire une réponse adaptée et protectrice (réflexe de retrait, comportements d'évitement ou d'anticipation d'une situation dangereuse) afin d'éviter toute blessure. En effet, les personnes atteintes d'une insensibilité congénitale à la douleur ont une durée de vie réduite car elles sont incapables de produire une réponse appropriée et se blessent plus fréquemment.

2 Le système nociceptif

2.1 Les nocicepteurs

Contrairement à ce que l'on pourrait croire, la nociception n'est pas liée à la stimulation excessive des récepteurs correspondant aux autres sensations. Il existe en effet un système dédié à la détection des stimuli nocifs comprenant des récepteurs et des neurones spécifiques, faisant de la nociception une sensibilité à part entière. Ces neurones, appelés **nocicepteurs**, représentent la plupart des neurones sensoriels. Ils s'activent uniquement en réponse à des stimulations intenses et possèdent donc des caractéristiques cellulaires et moléculaires différentes des fibres véhiculant des informations non nociceptives.

Les nocicepteurs sont des neurones pseudo-unipolaires en T, dont les corps cellulaires sont situés dans les **ganglions trigéminaux** et les **ganglions rachidiens dorsaux** (GRD) pour les stimuli affectant respectivement la face et le reste du corps. Leurs extrémités périphériques, formées de terminaisons libres non spécialisées sont réparties dans la peau, les muscles, les articulations et les viscères. Elles portent des récepteurs qui s'activent en réponse à des stimuli nociceptifs :

- Le récepteur TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*) détecte les stimuli thermiques au chaud,
- Les récepteurs TRPM8 (*Transient Receptor Potential Melastatin 8*) et TRPA1 (*Transient Receptor Potential Ankyrin 1*) pour les stimuli thermiques au froid,
- Les méchanorécepteurs Piezo et les canaux potassiques KCNK répondent aux stimuli mécaniques (Basbaum et al., 2009; Zhang et al., 2019).

Enfin, une large variété de récepteurs détectent les stimuli chimiques tels que les canaux *Acid-Sensing Ion Channel* (ASIC) sensibles aux variations de pH dans le milieu, TRPV1 (activé par la capsaïcine), TRPM8 (menthol et eucalyptol), TRPA1 (isothiocyanate contenu dans le wasabi). Ces récepteurs sont chargés de la **transduction** des stimuli nociceptifs en un signal électrique compréhensible par le système nerveux central (SNC), les potentiels d'action. Ces derniers sont ensuite véhiculés par les fibres afférentes, qui sont de deux types :

- Les fibres afférentes de type Aδ, qui sont peu myélinisées et à faible vitesse de conduction. Ces fibres répondent à des stimulations de type thermique et mécanique. Deux types de fibres peuvent être identifiées selon leurs propriétés électrophysiologiques (Meyer et al., 2008) :
 - Celles de type I répondent à de faibles stimulations mécaniques et à de hautes stimulations thermiques (supérieures à 50°C).

• Celles de type II, à l'inverse, répondent à de fortes stimulations mécaniques et à des stimulations thermiques plus faibles.

Ces fibres sont responsables de la douleur aiguë, rapide et très localisée à la suite d'un fort stimulus nociceptif mécanique (type I) ou thermique (type II).

Les fibres afférentes de type C qui sont non myélinisées, de faible calibre et par conséquent à très faible vitesse de conduction. La plupart d'entre elles s'activent en réponse à des stimuli mécaniques, chimiques et thermiques et sont ainsi qualifiées de polymodales. Les fibres C peptidergiques libèrent des neurotransmetteurs tels que la substance P et le *Calcitonin-Gene Related Peptide* (CGRP) et expriment TrkA (*tyrosine receptor kinase A*), le récepteur du NGF (*Nerve Growth Factor*). Les fibres C non peptidergiques expriment le récepteur neurotrophique *c-Ret* qui lie le GDNF (*Glial Dependant Neurotrophic Factor*), les récepteurs Mrg (*Mas-related genes*) ainsi que les récepteurs purinergiques P2X3. Une grande partie des fibres C non peptidergiques sont également isolectine IB4 positives. Ces fibres sont à l'origine de la seconde douleur différée, plus diffuse et peu localisée (douleur sourde) et durable (Basbaum et al., 2009).

2.2 La moelle épinière (ME), premier lieu d'intégration du message nociceptif

Le signal se propage ensuite le long des fibres *via* des canaux sodiques et potassiques voltage-dépendants (Basbaum et al., 2009) qui vont entretenir la dépolarisation du neurone jusqu'à atteindre la moelle épinière (ME). La principale projection se fait à l'étage de l'entrée nociceptive mais certaines collatérales peuvent projeter dans les segments spinaux adjacents, l'ensemble formant le tractus de Lissauer. L'extrémité centrale des nocicepteurs contacte ensuite les neurones de la substance grise de la ME. Cette dernière est subdivisée en différentes couches anatomiquement et fonctionnellement distinctes, appelées laminas de REXED (Rexed, 1952). Les laminas I, II et V situées dans la corne dorsale (laminas I à VI) sont les principales laminas impliquées dans l'intégration de la nociception.

Les neurones de la lamina I reçoivent uniquement des afférences des fibres nociceptives A δ et C et sont qualifiés de **neurones spécifiques** (NS, fig. 5). La lamina II, recevant des afférences des fibres C, contient uniquement des interneurones qui vont traiter et intégrer localement le message nociceptif. Ces derniers contactent les neurones de la lamina V **non spécifiques** ou à **convergence** (*WDR*, *Wide Dynamic Range*, fig. 5) car ils reçoivent, en plus des afférences des fibres A δ , des afférences des fibres A β non nociceptives (de gros diamètre et fortement myélinisées qui conduisent très rapidement les stimuli mécaniques non nocifs

comme le toucher léger). Ces neurones sont liés aux phénomènes de **douleur référée** ou **projetée** : alors qu'en condition physiologique ces neurones répondent à des stimulations somatiques uniquement ; en condition pathologique ils peuvent être également activés par des afférences viscérales. La douleur en résultant sera alors interprétée comme étant d'origine somatique comme c'est le cas lors d'un infarctus du myocarde, caractérisée par une douleur ressentie dans l'épaule et le bras gauche.



neurones spécifiques (NS) car ils reçoivent uniquement des afférences nociceptives des fibres afférentes de type $A\delta$ et C. La lamina II est constituée d'interneurones qui reçoivent des afférences de type C et qui projettent vers les neurones à convergence (WDR, Wide Dynamic Range) de la lamina V. Ces neurones WDR reçoivent des afférences nociceptives des fibres de type $A\delta$ et C et non nociceptives des fibres $A\beta$ (D'Mello & Dickenson, 2008).

D'autre part, les fibres afférentes primaires contactent et activent les motoneurones de la corne ventrale de la ME qui déclenchent le réflexe de retrait du membre atteint pour limiter les dommages tissulaires. Ces réflexes nociceptifs sont quantifiables et permettent, par extrapolation, d'observer les phénomènes d'**hyperalgésie** (une douleur plus intense à la suite d'un stimulus nociceptif, d'après l'IASP) ou d'**allodynie** (lorsqu'un stimulus non nociceptif est perçu comme douloureux, d'après l'IASP), chez l'Homme. Même si la plupart des études rapportent également des mesures d'hyperalgésie et d'allodynie chez l'animal, il faut toutefois noter que la sensation de douleur n'est pas nécessairement impliquée et ne peut pas être déduite uniquement à partir de ces réflexes moteurs.

2.3 La matrice de la douleur

Les neurones de **second ordre** ou **de projection** (neurones spécifiques et WDR) transmettent l'information nociceptive aux centres supraspinaux. Ils passent la ligne médiane (décussation) et cheminent par le cadran antéro- ou ventro-latéral de la substance blanche de la ME (fig. 6) par l'intermédiaire :

- Du faisceau paléo-spino-thalamique, qui regroupe plusieurs voies :
 - Le faisceau spino-réticulaire qui projette dans la formation réticulée du tronc cérébral, puis aux noyaux intralaminaires du thalamus et aux cortex cingulaire, insulaire et l'amygdale (apprentissage et mémorisation de la sensation douloureuse ou composante cognitive et comportementale de la douleur) ainsi qu'au cortex préfrontal (aspect désagréable et aversif de la douleur ou composante émotionnelle et affective de la douleur).
 - Le faisceau spino-mésencéphalique projette quant à lui vers la substance grise périaqueducale (PAG, *periaqueducal gray*) et le noyau parabrachial. Ce sont les principales structures des contrôles descendants qui modulent le message nociceptif.

Dans l'ensemble, ce faisceau sous-tend l'aspect émotionnel, affectif et cognitif de la douleur chez l'Homme (chez l'animal, on parle plutôt de nociception).

- Du faisceau **néo-spino-thalamique** qui projette directement au thalamus, plus précisément dans le noyau **ventro-postéro-latéral** (VPL) pour les afférences provenant du tronc et des membres et dans le noyau **ventro-postéro-médian** (VPM) pour les informations nociceptives issues de la face. Un neurone de troisième ordre, issu du thalamus, véhicule l'information jusqu'au cortex somatosensoriel primaire et secondaire. L'organisation somatotopique y est conservée au sein du thalamus et du cortex somatosensoriel, permettant ainsi de déterminer rapidement la localisation et le type de stimulus nociceptif (composante sensori-discriminative de la douleur). Ce faisceau apparaît tardivement au cours de l'évolution et est d'autant plus important que les espèces sont évoluées.



Ainsi, il n'existe pas de « cortex de la douleur » ou de structure supraspinale unique et spécialisée dans le traitement de l'information nociceptive. Au contraire, l'influx nociceptif conduit à l'activation de plusieurs régions et, bien qu'encore peu comprise, c'est la collaboration de l'ensemble de ces structures qui permet de donner naissance à cette expérience complexe et multimodale qu'est la douleur. On parle alors de **matrice de la douleur** (fig. 7). Ce concept est notamment soutenu par des données d'imagerie cérébrale fonctionnelle ayant confirmé l'activation de ces régions lors d'une stimulation nociceptive et qui ont également mis en évidence l'activation d'autres structures qui ne sont généralement pas associées à la douleur, telles que l'hippocampe, le cervelet et les ganglions de la base (Apkarian et al., 2005).





3 La modulation du message nociceptif

L'idée de l'existence de mécanismes endogènes capables de moduler la douleur est issue des observations de médecine de guerre où les soldats grièvement blessés au front ne présentaient pas ou peu de douleurs jusqu'à leur arrivée à l'hôpital (Beecher, 1956) ; preuve que l'organisme est capable d'atténuer l'intensité douloureuse lorsque cela s'avère nécessaire à la survie. Ainsi l'expérience douloureuse est dynamique et régulée (aussi bien augmentée que diminuée) en fonction du contexte, mais également d'autres facteurs comme les croyances, l'attention et l'état (anxieux, déprimé) du sujet. Plus tard, les différents processus responsables d'une telle modulation ont été identifiés et correspondent essentiellement à l'inhibition segmentaire au sein de la ME (théorie du portillon) et les contrôles descendants. L'information nociceptive peut être modulée à tous les échelons (spinal, supraspinal) de sa transmission ascendante depuis la périphérie jusqu'à l'encéphale.

3.1 La théorie du portillon

Cette théorie du *gate control* ou du portillon fondée par Melzack et Wall repose sur des interactions locales au sein de la ME entre les fibres A β véhiculant des informations du toucher léger non nociceptif et les fibres C véhiculant des informations nociceptives (Wall & Melzack, 1965). Ces fibres A β émettent des collatérales capables d'inhiber les neurones de projection de la voie antéro-latérale par l'intermédiaire d'un interneurone inhibiteur. Ainsi, l'activation simultanée des fibres A β et C peut bloquer l'influx nociceptif dès son entrée dans la ME, tel

un système de porte. Si cette théorie n'est pour le moment que partiellement démontrée, elle permet néanmoins d'expliquer la réaction naturelle mais efficace de frotter vigoureusement la zone endolorie lorsque l'on vient de se cogner.

3.2 Les contrôles descendants

Plusieurs structures supraspinales des voies spino-thalamiques et spino-réticulaires, vont également projeter directement ou indirectement dans la ME (**contrôles descendants** de la douleur). Ces connexions ciblent la terminaison centrale des fibres afférentes (pré-synaptique), les neurones de projection (post-synaptique) ou les interneurones excitateurs ou inhibiteurs de la lamina II pour en moduler l'excitabilité et donc, la transmission ascendante du message nociceptif (D'Mello & Dickenson, 2008; Millan, 2002).

La PAG, dont la stimulation produit un puissant effet analgésiant (Reynolds, 1969) est considérée comme le chef d'orchestre des contrôles descendants. Véritable carrefour, elle reçoit et intègre des informations du cortex, de l'hypothalamus et de l'amygdale et projette à son tour vers le locus coeruleus (LC) et le noyau du raphé magnus qui libèrent respectivement la noradrénaline et la sérotonine dans la ME (Millan, 2002). Suivant le type de neurones exprimant les récepteurs à la noradrénaline et à la sérotonine (excitateur ou inhibiteur) et le sous-type de récepteur lui-même, l'action de la sérotonine ou de la noradrénaline pourra être facilitatrice ou inhibitrice de la transmission nociceptive.

Une autre structure clé des contrôles descendant est la médulla rostrale ventromédiale (RVM, *Rostral Ventromedial Medulla*). Cette dernière reçoit des projections de la PAG et contient 3 types de cellules :

- les cellules « *on* », dont l'activité augmente pour amplifier l'excitabilité des neurones nociceptifs de la corne dorsale de la ME et ainsi faciliter le réflexe nociceptif (pro-algie),
- les cellules « off » dont l'activité augmente pour atténuer l'excitabilité des neurones nociceptifs de la corne dorsale de la ME et sont inhibitrices du réflexe nociceptif (analgésie),
- des cellules neutres dont l'activité n'est pas liée à la nociception (Fields, 2004).

La balance entre les cellules de type « *on* » et de type « *off* » détermine l'excitabilité neuronale des neurones nociceptifs spinaux et ainsi la sensibilité nociceptive.

3.3 Le contrôle opioïdergique de la douleur

Au vu de l'importance de l'implication du système opioïde endogène dans la douleur, le prochain chapitre (voir p. 40) sera entièrement dédié à la description de ce système.

Brièvement, on peut tout de même mentionner ici la présence du récepteur opioïde μ (MOR, principal récepteur opioïde qui est responsable de l'analgésie endogène) sur la terminaison périphérique des fibres afférentes primaires et le corps cellulaire des neurones de second ordre des laminas I et II de la corne dorsale de la ME (Besse et al., 1990; Kohno et al., 1999). L'activation de ce récepteur diminue l'excitabilité neuronale des neurones nociceptifs (selon un processus détaillé dans le chapitre suivant, voir §3.1, p. 42). Ces récepteurs sont également exprimés de nombreuses structures des contrôles descendants (Mansour et al., 1995) dont la RVM où l'activation de MOR inhibe les cellules « *on* » et désinhibe les cellules « *off* » (Fields, 2004). Ainsi, que ce soit au niveau spinal ou supraspinal, ces différentes actions de MOR ont pour conséquence d'atténuer la transmission ascendante du message nociceptif.

4 Douleur aiguë et chronique

La douleur aiguë, résultante de l'activation des circuits nociceptifs, est un mécanisme physiologique utile à la survie ; elle préserve l'intégrité du corps en l'avertissant d'une lésion tissulaire potentielle. Dans ce cas, la douleur disparaît avec la blessure ou le stimulus l'ayant déclenchée. Dans le cas contraire, lorsque la douleur persiste au-delà du temps normal de guérison, elle perd sa fonction symptomatique et protectrice et devient alors délétère pour l'organisme. En effet, ces douleurs peuvent alors se manifester spontanément, en présence d'un stimulus normalement inoffensif (**allodynie**), être exagérées à la suite d'un stimulus nociceptif (**hyperalgésie**) et s'étendre au-delà du site de lésion (**hyperalgésie secondaire**).

En clinique, une douleur est définie comme étant chronique si sa durée est supérieure à 3 mois. A noter que cette définition s'applique à tout type de douleur et ne préjuge ni de la cause, ni de l'origine ou des mécanismes sous-jacents. Néanmoins, on peut tout de même regrouper 3 grand types de douleur chroniques :

- Les douleurs par excès de nociception, liée à l'activation des voies nociceptives.
 L'excès de nociception est à l'origine de la douleur aiguë mais contribue également aux douleurs chroniques lorsqu'elles sont entretenues par des processus inflammatoires abaissant le seuil d'activation des nocicepteurs (voir §4.1.1, p. 33)
- Les douleurs neuropathiques sont causées par une lésion ou une atteinte directe des voies nociceptives (par exemple, la compression du nerf sciatique à la suite d'une hernie discale).
- Les douleurs psychogènes qui n'ont pas de causes organiques apparentes et sont à l'heure actuelle encore peu comprises.

Dans tous les cas, ces douleurs reflètent un dysfonctionnement ou une mal adaptation du système nociceptif à la suite d'une douleur aiguë. La prévalence des douleurs chroniques est estimée à environ 34% de la population adulte mondiale (Jackson et al., 2016). Ainsi, elle constitue un problème de santé publique majeur et récemment, certains types de douleurs chroniques ont d'ailleurs été reconnus comme maladie en tant que telle (Treede et al., 2019). En plus d'une sensibilité accrue à la douleur, elles sont également associées à de l'anxiété, la dépression et au manque de sommeil (Emery et al., 2014). Elles se répercutent ainsi sur la vie sociale et professionnelle du patient et altèrent sa qualité de vie. Ce critère constitue notamment la base de questionnaires destinés à diagnostiquer les douleurs chroniques chez l'Homme.

4.1 Mécanismes à l'origine des douleurs chroniques

Le système nociceptif n'est pas immuable et présente une certaine capacité à s'adapter à la suite d'un stimulus intense ou répété, appelée **plasticité**. Les propriétés de transduction des nocicepteurs vont être modifiées de sorte que leur seuil d'activation soit abaissé : c'est la **sensibilisation**. Les nocicepteurs augmentent alors leur réponse à même stimulus ou répondent à stimulus habituellement subliminal (Loeser & Treede, 2008). La sensibilisation participe ainsi au phénomène d'hyperalgésie qui permet, par son caractère désagréable, de protéger la zone atteinte et faciliter la guérison. Si elle ne devrait durer que le temps de la cicatrisation, dans certains cas la sensibilisation perdure et contribue aux douleurs pathologiques. Il existe deux types de sensibilisation : **périphérique** et **centrale**.

4.1.1 La sensibilisation périphérique

Cette sensibilisation concerne l'extrémité périphérique des fibres afférentes primaires et est étroitement liée à l'inflammation. Lors d'une lésion tissulaire, les cellules endommagées libèrent leur contenu dans le milieu extracellulaire, notamment des ions H⁺ et K⁺, qui dépolarisent directement les nocicepteurs (fig. 8). Les tissus environnants libèrent également des leucotriènes et des prostaglandines qui sensibilisent les nocicepteurs, ainsi que de l'ATP, de la bradykinine, de la sérotonine qui les activent directement en se liant à leurs récepteurs respectifs (Cook & McCleskey, 2002; Paterson et al., 2013; Ren & Dubner, 2010). De même, d'autres substances dites **algogènes** vont être libérées par les cellules du système immunitaire lors de la réaction inflammatoire : les mastocytes sécrètent de l'histamine, les plaquettes sanguines de la sérotonine, les macrophages activés des cytokines comme l'interleukine 6 (IL-6) ainsi que du NGF. L'ensemble de ces substances forme une « **soupe inflammatoire** » qui augmente l'excitabilité des fibres afférentes et par conséquent, la transmission de l'influx

nociceptif à la ME. En réponse, les nocicepteurs stimulés libèrent *via* leurs collatérales de la substance P et de la CGRP au niveau du site de lésion (**réflexe d'axone**). Ces neuropeptides favorisent la vasodilatation des vaisseaux et l'afflux de plasma, contribuant ainsi à la formation de l'œdème. La substance P provoque également l'activation de cellules non neuronales (mastocytes, neutrophiles) qui vont sécréter d'autres éléments de la soupe inflammatoire, ce qui participe à amplifier la sensation douloureuse selon un processus auto-entretenu et appelé **inflammation neurogénique** (Basbaum et al., 2009).

Puisque cette sensibilisation est due à l'exposition des terminaisons périphériques des nocicepteurs aux médiateurs de l'inflammation, elle est restreinte au site de lésion et est ainsi responsable de l'**hyperalgésie primaire**. Cette dernière concerne notamment les stimuli nociceptifs thermiques au chaud et est traitée à l'aide d'aspirine ou d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui inhibent la cyclo-oxygénase, l'enzyme responsable de la production des prostaglandines.



Figure 8 : Les différentes substances constituant la soupe inflammatoire. Lors d'une inflammation, la bradykinine, les prostaglandines, l'ATP et les ions libérés par les cellules lésées environnantes activent ou sensibilisent les nocicepteurs. Les cellules immunitaires sécrètent de l'histamine et du NGF qui participent aussi à l'augmentation de l'influx nociceptif. Les nocicepteurs libèrent de la CGRP et de la substance P par le réflexe d'axone qui favorisent la vasodilatation et l'œdème. La substance P active également les cellules immunitaires qui libèrent d'autres substances algogènes entretenant ce phénomène (Julius & Basbaum, 2001).
4.1.2 La sensibilisation centrale

Comme son nom l'indique, ce type de sensibilisation intervient au niveau central c'est-àdire à la synapse entre les fibres afférentes et le neurone de projection. Elle correspond à une augmentation de l'excitabilité neuronale des neurones nociceptifs à la suite d'un stimulus intense, répété et soutenu. Différents mécanismes sous-tendent la sensibilisation centrale :

Le *wind-up* est une facilitation progressive et fréquence-dépendante de la réponse des neurones WDR de la ME (lamina V). Elle survient lors de la stimulation répétée des fibres C à une faible fréquence. La libération soutenue de substance P et de CGRP par les fibres C provoque de lents potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE), dont la sommation temporelle provoque une dépolarisation cumulative des neurones WDR jusqu'à lever le blocage des récepteurs NMDA par les ions Mg^{2+} (Sivilotti et al., 1993; Thompson et al., 1990) et augmenter ainsi le nombre de potentiels d'action émis pour un même stimulus. Ce phénomène est dépendant des canaux Ca^{2+} de type L qui contribuent également à cette dépolarisation progressive (Morisset & Nagy, 2000). Le *wind-up* se manifeste également sur le plan comportemental, où la répétition d'un même stimulus mécanique (Staud et al., 2003) ou thermique (Price et al., 1977) est rapporté comme étant de plus en plus douloureux chez l'Homme. Néanmoins, c'est une forme de plasticité à court-terme puisqu'elle s'arrête en l'absence de stimulation.

La **potentialisation à long-terme** (*Long-Term Potentiation*, LTP), correspond à une augmentation durable de l'efficacité synaptique pour faciliter le déclenchement et l'émission de potentiels d'action subséquents. D'abord mis en évidence dans l'hippocampe en lien avec la mémoire, il a ensuite été montré que la stimulation électrique à haute fréquence des fibres C (Liu & Sandkühler, 1997, 1995) et des fibres A δ (Randic et al., 1993) induit une LTP des neurones de la lamina I de la ME, plus spécifiquement ceux exprimant le récepteur à la neurokinine 1 (Ikeda et al., 2003). La stimulation des fibres C peut aussi être due à des stimuli naturels (Sandkühler & Liu, 1998) ainsi qu'une administration de capsaïcine et formaline (Ikeda et al., 2006). Ce phénomène nécessite augmentation intracellulaire de Ca²⁺ et l'implication des récepteurs NMDA, neurokinine 1 et métabotropiques du glutamate (mGluR) (Liu & Sandkühler, 1997, 1995; Randic et al., 1993). Il est cependant difficile d'évaluer combien de temps se maintient ce phénomène pour des raisons techniques et donc sa réelle contribution aux douleurs chroniques.

Enfin, la **sensibilisation centrale activité dépendante** ou sensibilisation centrale « classique », est la forme de plasticité synaptique la plus durable. Si elle concerne beaucoup de neurones au sein de la corne dorsale de ME, il semblerait que ceux de la lamina I exprimant le récepteur de la neurokinine 1 (neurokinin 1 receptor, NK1R) soient responsables de l'hypersensibilité à la douleur. Lors d'une stimulation nociceptive intense ou répétée, les fibres afférentes primaires libèrent du glutamate, du BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), de la substance P, et du CGRP (fig. 9). L'activation de leurs récepteurs respectifs, à savoir mGluR, NMDA et AMPA pour le glutamate, NK1R pour la substance P, TrkB (Tyrosine receptor kinase B) pour le BDNF ainsi que CGRP-1 pour le CGRP, permet l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule ou la libération de Ca²⁺ depuis le réticulum endoplasmique. Cette augmentation rapide de Ca²⁺ intracellulaire active les PKA, PKC et la calmoduline kinase II (CAMKII) qui phosphorylent les récepteurs NMDA et AMPA et augmentent ainsi les propriétés de conductance de ces canaux. La PKC permet également le recrutement de récepteurs AMPA à la membrane et d'atténuer la libération de GABA et de glycine, diminuant ainsi la transmission inhibitrice tonique au sein de la ME. Ces kinases activent la voie des MAPK aboutissant à la phosphorylation de ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases) ou pERK. Ce dernier phosphoryle les canaux Kv4.2 et diminue les courants potassiques sortants. Enfin, pERK active CREB (cAMP Response Element-binding Protein) et d'autres facteurs de transcription qui induisent l'expression de différents gènes (c-fos, NK1R, TrkB et la cyclooxygénase 2) qui à leur tour, participeront au maintien de la sensibilisation centrale (Latremoliere & Woolf, 2009).

Dans l'ensemble, ces différentes voies de signalisation contribuent à augmenter l'excitabilité membranaire, l'efficacité synaptique entre neurones nociceptifs et à réduire l'inhibition au sein de la circuiterie nociceptive. En conséquence, le seuil d'activation de ces neurones diminue et leur activité spontanée augmente expliquant ainsi les phénomènes d'hyperalgésie primaire, secondaire et de douleur spontanée. L'expansion des champs récepteurs cutanés des fibres afférentes primaires est quant à elle à l'origine de la conversion de neurones nociceptifs spécifiques en neurones WDR (qui répondent à des stimuli nociceptifs et non nociceptifs) qui sous-tend l'allodynie tactile mécanique (Latremoliere & Woolf, 2009).



Figure 9: Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la sensibilisation centrale. Le glutamate, la substance P et le BDNF libérés par les terminaisons afférentes primaires activent leurs récepteurs respectifs et provoque une augmentation massive de Ca²⁺ intracellulaire dans les neurones de la corne dorsale de la ME. Ceci active la calmoduline kinase II (CAMKII), les protéines kinases A (PKA) et C (PKC) qui augmentent la conductance des récepteurs AMPA et NMDA en les phosphorylant et permet l'insertion de récepteurs AMPA supplémentaires à la membrane. La PKC active également ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases) qui diminue les courants potassiques sortants en phosphorylant les canaux Kv4.2 (Ji et al., 2003).

Dernièrement une forme silencieuse de sensibilisation centrale, nommée **sensibilisation latente à la douleur** (SLD) a été mise en évidence dans différents modèles animaux (Campillo et al., 2011; Célèrier et al., 2001; Corder et al., 2013). Ce phénomène, auquel s'intéresse cette thèse, traduit une mal adaptation du système opioïde endogène (entre autres) à la suite de la résolution de l'hyperalgésie primaire. Ainsi, le fonctionnement physiologique du système opioïde endogène fera l'objet du chapitre 3 (voir p. 40) puis la SLD sera détaillée au chapitre 4 (voir p. 55).

4.2 Les traitements

On désigne par antalgique toute substance visant à atténuer la sensation douloureuse, tandis que les analgésiques permettent de l'abolir complètement. Les traitements actuels contre la douleur sont définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) par paliers en fonction de l'intensité douloureuse :

1^{er} palier : pour des douleurs légères à modérées, le paracétamol ou les AINS (ibuprofène, aspirine) qui inhibent l'enzyme de production des prostaglandines (la cyclo-oxygénase) sont recommandés.

- 2^e palier : correspondant à des douleurs modérées à sévères, traitées à l'aide d'opioïdes faibles, comme la codéine et le tramadol.
- 3^e palier : pour des douleurs sévères les opioïdes forts seront préconisés, tels que la morphine ou l'oxycodone.

Néanmoins, les opioïdes ont une efficacité encore débattue à long-terme (Chou et al., 2015) et leur usage s'avère limité en raison de la tolérance analgésique (diminution de l'effet analgésique) qui se développe avec la prise du traitement. Ceci nécessite l'accroissement des doses pour soulager la douleur qui s'accompagne de l'augmentation de nombreux effets indésirables (constipation, nausées, dépression respiratoire) et plus particulièrement, le risque de dépendance. En dépit de ces constats, l'augmentation de la prescription d'opioïdes pour soulager les douleurs chroniques et l'usage non contrôlé de ces substances a provoqué une augmentation rapide de leur utilisation atteignant le stade qualifié d'épidémie ou de **crise des opiacés** aux Etats-Unis. Ainsi, le nombre d'overdoses liées aux opioïdes a été multiplié par 6 depuis 1999 (*CDC WONDER*, 2020) et parmi les 70 000 décès par overdose aux Etats-Unis en 2019, 70% d'entre eux étaient dus à un opiacé (Mattson et al., 2021).

En ce qui concerne les douleurs neuropathiques, qui répondent peu aux antalgiques des trois paliers, les traitements de première ligne sont les antidépresseurs tricycliques (amitryptiline, imipramine) ainsi que les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (venlafaxine, duloxetine). Ces derniers produisent leur effet analgésique en potentialisant les contrôles descendants inhibiteurs. Les anticonvulsivants (gabapentine, prégabaline) qui diminuent la libération de neurotransmetteurs excitateurs au sein de la ME peuvent également être utilisés. Les traitements de seconde intention regroupent les patchs de capsaïcine (qui désensibilisent les fibres de type C), les patchs de lidocaïne (qui induisent une anesthésie locale par le blocage des canaux sodiques voltage-dépendants) et le tramadol (agoniste de MOR et inhibiteur de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine). Les opiacés forts n'arrivent qu'en troisième ligne (Attal, 2019).

Moins bien répandus, des traitements non médicamenteux de la douleur existent également, comme la stimulation médullaire ou cérébrale profonde qui consistent à placer une électrode dans ces structures pour moduler la transmission nociceptive. Moins invasives, la stimulation magnétique transcrânienne répétitive permet de stimuler par un champ électromagnétique le cortex moteur et de diminuer le seuil nociceptif par un mécanisme encore peu compris ; et la stimulation nerveuse électrique transcutanée des fibres non nociceptives cutanées inhibe les fibres nociceptives (principe de la théorie du portillon). Enfin, la physiothérapie et la thérapie comportementale permettent d'accompagner le patient dans la gestion de sa douleur au quotidien afin de maintenir une qualité de vie malgré sa condition (Hylands-White et al., 2017).

Dans tous les cas, une approche interdisciplinaire est recommandée pour prendre en charge les différents aspects (physique, psychologique) de l'expérience douloureuse. Malgré ce panel de traitements disponibles, la plupart ont une efficacité limitée à long-terme ou ne confère qu'un soulagement partiel de la douleur (Borsook et al., 2014). De nombreux patients se retrouvent alors dans une impasse thérapeutique, c'est pourquoi il est nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires associés aux douleurs chroniques ainsi que sa modulation par le système opioïde endogène afin de développer des traitements plus adaptés.

Chapitre 3 : Le système opioïde endogène

Avant de procéder à la description du système opioïde endogène, il convient de distinguer le terme opiacé du terme opioïde. Les opiacés désignent toute substance issue de l'opium du pavot tandis qu'opioïde est un terme plus générique pour toute substance (naturelle ou synthétique) qui se lie aux récepteurs aux opioïdes et qui n'est pas dérivée de l'opium.

L'usage de l'opium pour ses effets euphorisants était déjà connu dans l'Antiquité sumérienne (environ 3000 ans avant J.C) avant d'être décrit comme remède contre la douleur dans le Papyrus d'Ebers (environ -1500 ans avant J.C) pour les actes chirurgicaux (Brownstein, 1993). Pourtant, ce n'est que dans les années 1970 que les sites de liaisons pour les opiacés ont été identifiés dans le cerveau des mammifères (Pert & Snyder, 1973; Simon et al., 1973; Terenius, 1973) : le récepteur μ -opioïde (MOR), δ -opioïde (DOR), κ -opioïde (KOR), suivi de l'identification de leurs ligands endogènes respectifs : les endorphines, les enképhalines et les dynorphines. Le clonage de DOR (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992) puis de MOR et de KOR (Chen et al., 1993; Yasuda et al., 1993) ont permis d'identifier un quatrième récepteur, le récepteur à la nociceptine/orphanine FQ (NOR ou ORL-1) dont le ligand endogène est la Nociceptine/Orphanine FQ (Mollereau et al., 1994).

1 Les opiacés exogènes

Les opiacés sont isolés à partir du latex séché (opium) du pavot *Papaver somniferum* qui est récolté à l'aide d'une incision dans la capsule. L'opium contient un mélange de **morphine**, **codéine**, **thébaïne** ainsi qu'une vingtaine d'autres alcaloïdes (papavérine, noscapine) dépourvus d'effets sur le SNC humain et qui ne sont donc pas considérés comme étant des opiacés.

La **morphine** fut la première à être isolée à partir de l'opium par Friedrich Sertürner en 1804. Il l'a nommé ainsi en référence à la déesse Grecque du sommeil Morphée en raison de ses propriétés somnifères. C'est également un antalgique puissant, qui est le plus utilisé actuellement en clinique. Néanmoins comme les autres opiacés, il induit de nombreux effets secondaires tels que l'euphorie, nausées, vomissement, constipation, sédation, dépression respiratoire, ainsi qu'un fort risque de dépendance physique qui provoque, en cas d'arrêt brutal du traitement, un syndrome de sevrage.

La codéine a été extraite de l'opium plus tard, en 1832. Pour être active, elle doit être déméthylée en morphine par le cytochrome CYP2D6. Les propriétés analgésiques de la

codéine sont directement liées à l'activité enzymatique de ce cytochrome, pour lequel il existe un polymorphisme génétique important : les individus métabolisant lentement la codéine mentionnent de faibles effets antalgiques tandis que ceux qui la métabolisent plus rapidement rapportent plus d'effets indésirables (Kirchheiner et al., 2007).

La **thébaïne** n'est pas utilisée en thérapeutique mais sert à la synthèse d'autres opiacés (hydrocodone, oxycodone, buprénorphine, naloxone). En effet, les opiacés peuvent également être synthétisés. Par exemple, l'**héroïne** (ou diacétylmorphine) est qualifiée de semisynthétique car elle est produite à partir de la morphine. Elle est plus lipophile et pénètre mieux la barrière hématoencéphalique que la morphine (Klous et al., 2005), ce qui lui confère un pouvoir addictif plus grand, alors qu'elle a été initialement développée pour ne pas induire de dépendance. En revanche le **fentanyl**, également d'origine synthétique, n'est pas considéré comme un opiacé car structurellement parlant, il diffère des constituants de l'opium et de ses dérivés. C'est un agoniste entier de MOR, dont l'effet analgésique est estimé de 80 à 100 fois supérieur à la morphine, mais il provoque également les effets indésirables communs aux opiacés.

Ces composés présentent un risque de dépendance plus ou moins important et sont tous classées comme stupéfiants. Malgré les nombreux efforts pour développer une substance antalgique aussi puissante, non addictive et dépourvue d'effets indésirables, il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement de substitution à la morphine qui reste ainsi un traitement de référence pour les douleurs sévères aiguës et certains types de douleur chroniques (douleurs cancéreuses notamment).

2 Les peptides opioïdes endogènes

Les opioïdes endogènes sont des peptides issus de la maturation d'un précurseur protéique (prépropeptide) clivé en peptides opioïdes actifs par l'action de peptidases. Les enképhalines, qui sont les premières à avoir été identifiées, sont issues de la pro-enképhaline qui est clivée en met- et leu-enképhaline. Ce sont les ligands endogènes de DOR mais ils se lient également à MOR avec une bonne affinité. La pro-opiomélanocortine (POMC) est le précurseur de la β -endorphine ainsi que d'autres neuropeptides non opioïdes tels que l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et les mélanocortines (MSH). La β -endorphine lie préférentiellement MOR. Les dynorphines A et B sont issus de la pro-dynorphine et ont une plus grande affinité pour KOR. Enfin, la pro-nociceptine est à l'origine de la nociceptine/orphanine FQ (N/OFQ), le ligand endogène de NOR. Son administration intracérébroventriculaire (icv) chez la souris provoque une diminution du seuil nociceptif à

laquelle elle doit son nom de « nociceptine » (Meunier et al., 1995). Le nom « orphanine FQ » fait référence à la désorphanisation du récepteur NOR et car sa séquence est comprise entre une Phe et une Gln (FQ) (Reinscheid et al., 1995).

Tous les peptides opioïdes endogènes partagent la séquence Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu en leur extrémité N-terminale (motif opioïde) à l'exception de la N/OFQ pour laquelle la tyrosine (Tyr), résidu nécessaire à la liaison aux autres récepteurs opioïdes (Lapalu et al., 1997, 1998), est remplacée la phénylalanine (Phe). Découvertes plus récemment, les endomorphines (endomorphine-1 et -2) présentent une forte sélectivité envers MOR. Ces tétrapeptides ne sont pas apparentés aux autres peptides opioïdes endogènes et leurs précurseurs ne sont pour le moment pas connus (Zadina et al., 1997).

Précurseur	Peptide endogène	Séquence peptidique	Récepteur
Pro- opiomélanocortine	β-endorphine	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met -Thr-Ser-Glu-Lys-Ser- Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn- Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu	MOR
Pro-enképhaline	Met-enképhaline Leu-euképhaline	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	DOR
Pro-dynorphine	Dynorphine A Dynorphine B	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro- Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys- Val-Val-Thr	KOR
Pro-nociceptine	Nociceptine	Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser- Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln	NOR
Inconnu	Endomorphine 1 Endomorphine 2	Tyr-Pro-Trp-Phe Tyr-Pro-Phe-Phe	MOR

Tableau 1 : Séquence en acides aminés des peptides opioïdes endogènes chez différentes espèces de mammifères. Le motif opioïde commun Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu est indiqué en rouge (Fichna et al., 2007).

3 La pharmacologie des récepteurs opioïdes

3.1 Le couplage aux protéines G

Les opioïdes endogènes et exogènes induisent leurs effets *via* quatre récepteurs : MOR, DOR, KOR, et NOR. Chacun de ces récepteurs est codé par un gène unique (respectivement *Oprm1*, *Oprd1*, *Oprk1*, *Oprl1*) et dont la séquence en amino-acides est commune à 60% (Chen et al., 1993). Ce sont des RCPG de la famille 1, couplés à des protéines $G_{\alpha i/o}$ inhibitrices.

- Au niveau présynaptique, la sous-unité $G_{\alpha i/o}$ inhibe l'AC, à l'origine d'une diminution de la production d'AMPc (Minneman & Iversen, 1976). La sous-unité $G_{\beta\gamma}$ inhibe les canaux calcium voltage-dépendants de type N, diminuant l'entrée de calcium dans le

neurone et par conséquent la fusion des vésicules présynaptiques induisant la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Rusin et al., 1997).

- Au niveau postsynaptique, la sous-unité $G_{\beta\gamma}$ active des canaux potassiques à rectification entrante GIRK (*G-protein-gated Inwardly Rectifying K*⁺) induisant une entrée de potassium dans le neurone et son hyperpolarisation (Torrecilla et al., 2002). Ce processus joue un rôle non négligeable dans l'action analgésique des opioïdes puisque des souris génétiquement déficientes pour ces canaux GIRK manifestent moins d'antinociception induite par les opioïdes (Luján et al., 2014; Nagi & Pineyro, 2014).

L'ensemble de ces actions a pour conséquence d'induire une inhibition de l'excitabilité neuronale des fibres afférentes primaires et des neurones de la corne dorsale de la ME et donc d'atténuer la transmission ascendante du message nociceptif.



Figure 10 : Les voies de signalisation intracellulaire induites par l'activation des récepteurs aux opioïdes. En conditions basales (à gauche), les canaux calciques voltage-dépendants sont ouverts et l'entrée de calcium facilite la libération de neurotransmetteurs. Ils activent ensuite leurs récepteurs et provoque la dépolarisation du neurone postsynaptique. L'activation des récepteurs opioïdes diminue la production d'AMPc en inhibant l'adénylate cyclase via la sous-unité $G_{\mu\nu}$ et inhibe l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants (en jaune) via la sous-unité $G_{\mu\nu}$ ce qui résulte en une diminution de la libération de neurotransmetteurs. En postsynaptique, l'activation des récepteurs opioïdes provoque une hyperpolarisation du neurone en favorisant l'ouverture des canaux potassiques à rectification entrante (en vert, Corder et al., 2018).

3.2 La voie de signalisation des β-arrestines

En plus de la voie de la signalisation induite par les protéines G, les récepteurs opioïdes sont également capables de recruter la β -arrestine. En effet, cette dernière n'est pas seulement impliquée dans le recyclage de ces récepteurs mais est un effecteur à part entière : le complexe RCPG/ β -arrestine phosphorylé active la voie des MAPK (plus particulièrement les kinases ERK1/2, JNK1-3 (*c-Jun N-terminal protein kinase 1-3*) et p38) pour réguler différents canaux

ioniques, facteurs de transcription et neurotransmetteurs, la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose et la synthèse protéique (Raman et al., 2007).

L'étude de l'interaction entre MOR et les β -arrestines a gagné de l'importance ces dernières années puisque l'une des hypothèses proposées pour expliquer la tolérance analgésique est celle de la désensibilisation de MOR (hypothèse de la tolérance cellulaire). En effet, tout comme les autres RCPG, les récepteurs opioïdes sont également phosphorylés ce qui recrute la β -arrestine et déclenche l'internalisation du récepteur. Ainsi, une internalisation et donc une désensibilisation trop importante diminuerait le nombre de récepteurs présents à la membrane d'où une réponse cellulaire réduite suite à l'activation de MOR par un agoniste.

En outre, il a également été proposé que le recrutement de la voie des protéines Gai serait lié à l'effet analgésique des opiacés alors que la voie de signalisation de la β-arrestine serait responsable des effets indésirables (tolérance analgésique, dépression respiratoire, constipation). La tolérance analgésique est effectivement abolie chez des souris délétées pour la β-arrestine 2 (Bohn et al., 2000) tout comme la constipation et la dépression respiratoire (Raehal et al., 2005b). De plus, l'analgésie induite par la morphine est également potentialisée chez ces souris (Bohn et al., 1999). Prenant avantage de ce constat, la recherche de traitement substitutifs aux opiacés s'orientent à présent vers le développement d'agonistes biaisés (pouvant préférentiellement activer une voie de signalisation par rapport à une autre). L'idée étant qu'un agoniste biaisé vers la voie de signalisation induite par les protéines G réduirait la douleur avec un minimum d'effets indésirables. En ce sens, le PZM21 et le TRV130 (oliceridine) ont été développés. Ce sont de puissants analgésiques (comparables à la morphine) et qui n'induisent pas de constipation ni de dépression respiratoire chez le rongeur (DeWire et al., 2013; Manglik et al., 2016). Le TRV130, commercialisé par Trevena (OLINVYKTM), a été validé récemment en août 2020 par la Food and Drug Administration pour le traitement des douleurs sévères chez l'Homme. Cependant, l'activité améliorée de ces composés et l'idée que la β-arrestine serait responsable de la majeure partie des effets secondaires des opiacés ont été sérieusement remises en cause ces dernières années (Araldi et al., 2018; Hill et al., 2018; Kliewer et al., 2019).

3.3 L'activité constitutive des récepteurs opioïdes

Classiquement, l'activation d'un RCPG est déclenchée par la liaison d'un agoniste mais certains récepteurs peuvent acquérir une conformation spécifique où ils sont actifs intrinsèquement (c'est-à-dire capables d'induire la signalisation via les protéines G) même en l'absence d'agoniste, c'est ce qu'on appelle l'**activité constitutive** (Kenakin, 2004).

DOR est d'ailleurs le premier récepteur pour lequel l'activité constitutive a pu être mise en évidence *in vitro* en identifiant des ligands « à activité intrinsèque négative » qui diminuent l'activité GTPase de ce récepteur en conditions basales (Costa & Herz, 1989). Renommés par la suite **agonistes inverses** (Kenakin, 2004), ces ligands constituent un outil pour mettre en évidence l'activité constitutive, par opposition aux **antagonistes** « **neutres** » qui se lient au récepteur mais exercent aucun effet sur la signalisation basale du récepteur. On a pu ainsi montrer que l'activité constitutive de DOR est augmentée après un prétraitement des cellules aux opiacés (Liu & Prather, 2002) mais son existence et les conséquences d'une telle activité *in vivo* ont été peu explorées. L'activité constitutive de KOR, également rapportée *in vitro* (Wang et al., 2007) diminue dans le cortex préfrontal médian avec l'âge chez le rat (Sirohi & Walker, 2015) et augmente dans l'aire tegmentale ventrale (*Ventral Tegmental Area*, VTA) à la suite d'un stress aigu. Cette signalisation basale se répercute au niveau comportemental puisque l'administration d'un agoniste inverse de KOR prévient le comportement de recherche de drogue induit par le stress (Polter et al., 2017).

L'activité constitutive de MOR a été plus largement étudiée. Elle a d'abord été mise en évidence dans différentes lignées cellulaires (Wang et al., 2004, 1994) puis dans le cerveau de souris (Wang et al., 2004). Un prétraitement prolongé aux opiacés augmente l'activité constitutive de MOR in vitro (Liu & Prather, 2001). De même, l'administration de morphine ou de DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin) induit une augmentation du nombre de récepteurs constitutivement actifs dans le cerveau d'animaux dépendants (Sadée et al., 2005; Walker & Sterious, 2005; Wang et al., 2001a). Ce phénomène est amplifié par la libération d'enképhalines dans le cerveau (Shoblock & Maidment, 2007). Une des hypothèses pour expliquer l'addiction serait que l'activité constitutive de MOR contribuerait à préserver la dépendance physique et psychologique (Liu & Prather, 2001; Meye et al., 2012; Shoblock & Maidment, 2006; Wang et al., 2004, 1994). L'activité constitutive de MOR est également responsable de la sensibilisation locomotrice induite par la méthamphétamine (Chiu et al., 2006). De nombreuses études ont ainsi identifié des antagonistes neutres et des agonistes inverses de MOR. Le 6β-natrexol, qui est dépourvu d'activité intrinsèque sur des tissus issus d'animaux dépendants, prévient l'effet des agonistes inverses et est donc considéré comme antagoniste neutre (Bilsky et al., 1996; Kenakin, 2001; Lam et al., 2011; Navani et al., 2011; Raehal et al., 2005a; Sirohi et al., 2009; Wang et al., 2004, 2007, 1994). La naltrexone et la naloxone acquièrent des propriétés d'agoniste inverse lorsque les cellules sont prétraitées avec des opiacés ou lorsque les tissus sont issus d'animaux rendus dépendants (Raehal et al., 2005a; Sadée et al., 2005; Sirohi et al., 2009; Wang et al., 2001a, 2004).

Les mécanismes de mise en place et de maintien de cette activité constitutive des récepteurs opioïdes restent à élucider. Dans le cas de MOR, il a été montré que lors d'une exposition chronique aux opiacés, la phosphorylation de ce récepteur pouvait le rendre constitutivement actif (Liu & Prather, 2001; Wang et al., 2004). La β -arrestine et la tyrosine kinase c-Src qui régulent l'activité constitutive de MOR dans les neurones de GRD (Walwyn et al., 2007), pourraient également être impliquées même si des modifications de densité de ces récepteurs ou des modulations des sites allostériques ne peuvent pas être exclues. Dans tous les cas, il semblerait que l'élément déclenchant soit une exposition prolongée aux agonistes (traitement aux opiacés exogènes ou libération soutenue de peptides opioïdes endogènes).

3.4 L'hétérodimérisation des récepteurs opioïdes

Tout comme de nombreux autres RCPG, les récepteurs opioïdes sont capables de former des homodimères (dimère de deux RCPG identiques) et des hétérodimères (dimère de RCPG différents). Ces derniers peuvent être visualisés par des expériences de coimmunoprécipitation, de FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) ou de BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*). Différents hétérodimères entre récepteurs opioïdes ont ainsi pu être mis en évidence *in vitro* et *in vivo* : MOR-DOR, MOR-KOR, DOR-KOR, MOR-NOR (Fujita et al., 2015).

Le plus étudié reste le dimère MOR-DOR. L'affinité des ligands pour l'hétérodimère est diminuée en comparaison à celle pour chacun des monomères (George et al., 2000) mais celleci est augmentée en présence d'agonistes ou d'antagonistes sélectifs de l'un ou l'autre des récepteurs (Gomes et al., 2000) en raison d'une modulation allostérique (Gomes et al., 2011). La liaison d'un ligand d'un des récepteurs potentialise la signalisation induite par l'activation de l'autre (Gomes et al., 2000). Alors que MOR et DOR sont couplés à la protéine Gai, l'hétérodimère MOR-DOR recrute la β-arrestine 2 (Rozenfeld & Devi, 2007). Ainsi l'hétérodimère MOR-DOR est fonctionnellement différent des récepteurs MOR et DOR et créée un nouveau « sous-type » pharmacologique. In vivo, il peut être mis en évidence par immunoprécipitation de la ME de souris sauvage mais pas de souris KO (Knock-Out) pour DOR (Gomes et al., 2004). Ces hétérodimères sont également retrouvés dans de nombreuses régions supraspinales impliquées dans la nociception (Erbs et al., 2015) ainsi que les GRD (Tiwari et al., 2020). Leur expression est augmentée lors d'un traitement chronique à la morphine dans certaines aires supraspinales (Gupta et al., 2010) et modulée dans les différents GRD à la suite d'un atteinte nerveuse (Tiwari et al., 2020). Le CYM51010, un agoniste biaisé (vers la voie de signalisation de la β -arrestine 2) du dimère MOR-DOR, provoque une analgésie similaire à celle de la morphine mais son administration chronique induit moins de tolérance analgésique (Gomes et al., 2013). Ce même agoniste est également anti-allodynique et anti-hyperalgésique dans un modèle de douleur neuropathique (Tiwari et al., 2020). Enfin, l'administration intrathécale d'un peptide capable de dissocier l'hétérodimère potentialise l'analgésie morphinique et induit moins de tolérance analgésique à la morphine (He et al., 2011). Dans l'ensemble, l'hétérodimère MOR-DOR a des propriétés anti-nociceptives, ce qui est également le cas des dimères MOR-DOR, MOR-KOR, DOR-KOR, MOR-NOR (Fujita et al., 2015).

Les récepteurs opioïdes forment également des hétérodimères avec d'autres RCPG non opioïdes, tels que le récepteur à la galanine GalR1, le récepteur cannabinoïde CB1, les récepteurs adrénergiques α_{2A} et β_2 , les récepteurs aux chimiokines CXCR4 et CCR5, le récepteur métabotropique au glutamate mGluR₅ et NK1R (Fujita et al., 2015). En raison de l'absence d'outils spécifiques permettant de cibler ces hétéromères *in vivo* (ligands, anticorps, lignées de souris rapportrices ou déficientes pour l'hétérodimère), les conséquences physiologiques d'une telle hétérodimérisation ne sont pas toujours connues et l'existence de certains hétérodimères reste à prouver en conditions natives. Dans tous les cas, les hétérodimères ont des propriétés pharmacologiques différentes que chacun des monomères qui le composent (liaison du ligand, transduction du signal, l'internalisation et resensibilisation des hétérodimères), ce qui ajoute encore un niveau de complexité et de diversité dans les réponses induites par l'activation d'un récepteur opioïde et dans la compréhension des effets indésirables qui y sont associés.

4 Rôles dans les circuits de la douleur

Les récepteurs aux opioïdes sont exprimés tout au long du chemin qu'emprunte le message nociceptif (fig. 11) : les terminaisons périphériques et centrales des fibres afférentes primaires ainsi que leur corps cellulaires contenus dans les GRD, les neurones de la corne dorsale de la ME (Besse et al., 1990; Heinke et al., 2011; Kohno et al., 1999; Marker et al., 2005; Scherrer et al., 2009; Spike et al., 2002) ainsi que de nombreuses structures supraspinales impliquées dans la modulation de la nociception (Erbs et al., 2015; Mansour et al., 1995).

L'absence d'analgésie morphinique chez des souris génétiquement délétées pour **MOR** (Matthes et al., 1996) a permis d'identifier rapidement ce récepteur comme étant la cible principale des opiacés exogènes *in vivo*. Cet outil génétique a par la suite facilité la compréhension du rôle de MOR dans la modulation de la nociception.

Exprimé dans les nocicepteurs TRPV1+ des GRD (Vetter et al., 2006), les neurones de la lamina I et II, et les interneurones excitateurs de la corne dorsale de la ME (Aicher et al., 2000; Spike et al., 2002), il exerce un effet anti-nociceptif par une action à la fois pré- et postsynaptique. MOR agit principalement au niveau supraspinal, où c'est un important contributeur des contrôles descendants. Il est exprimé dans la RVM et la PAG, où la microinjection d'agoniste de ce récepteur produit une analgésie (al-Rodhan et al., 1992; Rossi et al., 1994). Plus précisément, les neurones « on » pro-nociceptifs et « off » anti-nociceptifs de la RVM sont sous le contrôle opioïdergique : les opioïdes inhibent les cellules « on » qui expriment le récepteur MOR et désinhibent indirectement les cellules « off » (dépourvues du récepteur). La résultante de ces deux actions est à l'origine des propriétés anti-nociceptives des opioïdes. La nature de ces neurones « on » et « off » a été caractérisée récemment : les cellules « off » correspondraient fonctionnellement à des neurones qui coexpriment le GABA (neurotransmetteur inhibiteur) et la preproenképhaline (pENK, fig. 11). Ces neurones GABA/pENK+ projettent directement aux terminaisons des fibres afférentes de la corne dorsale de la ME pour inhiber la transmission ascendante du message nociceptif (Zhang et al., 2015). Les neurones « on », également GABAergiques et exprimant MOR, contactent des interneurones pENK+ qui projettent à leur tour sur les mécanorécepteurs. La libération d'opioïdes entraîne une levée d'inhibition des interneurones pENK+ qui inhibent les mécanorécepteurs pour atténuer la sensation douloureuse (François et al., 2017). Enfin, MOR n'est pas seulement impliqué dans l'analgésie induite par les opiacés, mais également celle provoquée par un stress aigu (LaBuda et al., 2000).



Figure 11 : La modulation de l'influx nociceptif par le récepteur opioïde μ (MOR). A l'extrémité périphérique du nocicepteur primaire, les récepteurs opioïdes peuvent être activés par l'administration d'opioïdes exogènes (morphine par exemple) ou les endogènes libérés par les cellules du système immunitaire. A l'extrémité centrale, l'activation des récepteurs opioïdes est liée à la libération d'opioïdes endogènes par les neurones de la RVM (Rostral Ventromedial Medulla). Les neurones GABA/enképhalinergiques (de type « off ») provoquent une réduction de la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. L'activation des interneurones spinaux. Ces derniers atténuent la transmission de l'information nociceptive par une action présynaptique et postsynaptique (hyperpolarisation membranaire ; Corder et al., 2018).

Le rôle de **DOR** dans l'analgésie est moins clair. Certaines études montrent un effet analgésique des agonistes DOR (Porreca et al., 1987) mais qui est largement moins efficace que celui de la morphine (Gallantine & Meert, 2005; Scherrer et al., 2004). En effet, en conditions physiologiques il y a peu de récepteurs DOR ancrés à la membrane neuronale ce qui explique son faible pouvoir analgésique. Une inflammation persistante permet cependant la migration de récepteurs intracellulaires à la membrane dans la corne dorsale de la ME, causant une augmentation du nombre de récepteurs à la membrane qui sont ainsi accessibles aux agonistes (Cahill et al., 2003, 2007). En lien avec ces observations, DOR exerce des effets anti-allodynique et anti-hyperalgésique dans des modèles de douleur inflammatoire et neuropathique (Gavériaux-Ruff et al., 2008; Gavériaux-Ruff & Kieffer, 2011; Pradhan et al., 2013). DOR et MOR étaient longtemps considérés comme exprimés dans les mêmes neurones des GRD (Chen & Pan, 2008), mais des études récentes de RNA-sequencing à l'échelle de la cellule unique et l'étude de la lignée de souris knock-in DOR-GFP ont montré que ce récepteur est plutôt exprimé dans les mécanorécepteurs (Bardoni et al., 2014; Scherrer et al., 2009; Usoskin et al., 2015) suggérant son implication dans la nociception mécanique. La distribution de DOR dans les GRD de différentes espèces reste cependant débattue (François & Scherrer, 2017; Gendron et al., 2015). Dans la corne dorsale de la ME, MOR et DOR sont coexprimés dans les mêmes types cellulaires (Wang et al., 2018a) où ils exercent ensemble une action anti-nociceptive. DOR est également présent dans la RVM (Harasawa et al., 2000) et dans la PAG.

Les effets médiés par **KOR** sont plus complexes. De nombreuses études rapportent que l'administration centrale ou périphérique d'agonistes de KOR est analgésiante (Porreca et al., 1987; Simonin et al., 1995; Vanderah et al., 2008). En accord avec ces observations, les souris génétiquement déficientes pour ce récepteur sont hypersensibles dans le *writhing test*, indiquant les propriétés anti-nociceptives de KOR dans la douleur viscérale (Simonin et al., 1998). Cependant le rôle de KOR dans la douleur neuropathique est moins consistant puisqu'il s'est révélé à la fois pro-nociceptif (Liu et al., 2019; Meade et al., 2020; Wang et al., 2001b; Xu, 2004) et anti-nociceptif (Wang et al., 2001b; Xu, 2004). Enfin, l'activation de KOR antagonise celle de MOR en bloquant l'analgésie et l'hyperalgésie induite par l'activation de ce dernier (Pan et al., 1997; Wang et al., 2001b).

KOR est exprimé majoritairement par des nocicepteurs peptidergiques CGRP+ (Snyder et al., 2018) et présent dans les neurones de la corne dorsale de la ME, mais dont le type reste à identifier (Eckert & Light, 2002). Une forme phosphorylée de KOR a aussi été mise en évidence dans les astrocytes et des interneurones spinaux (Xu et al., 2007). Enfin, KOR est présent dans toutes les structures supraspinales de la matrice de la douleur (Wang et al., 2010).

Les traitements substitutifs aux agonistes MOR contre les douleurs chroniques se sont dirigées vers les agonistes KOR, qui présentent l'avantage de ne pas induire de dépression respiratoire et d'avoir un potentiel d'abus plus limité. Cependant l'activation centrale de KOR induit des effets hallucinogènes et dysphoriques (Pfeiffer et al., 1986) ce qui limite le développement d'agonistes de ce récepteur pour le traitement de la douleur. Actuellement, les recherches s'orientent donc vers le développement d'agonistes de ce récepteur pour le traitement de la ce récepteur restreint à la périphérie afin de traiter les douleurs viscérales (Kivell & Prisinzano, 2010; Vanderah, 2010)

Bien qu'homologue aux récepteurs opioïdes (Mollereau et al., 1994), **NOR** présente des caractéristiques pharmacologiques différentes, ce qui lui vaut parfois de ne pas être classé comme récepteur opioïde. Par exemple, ce récepteur ne lie pas les autres peptides opioïdes (Mollereau et al., 1994; Reinscheid et al., 1995) ni la naloxone qui est un antagoniste général des autres récepteurs opioïdes. Contrairement aux autres récepteurs de la famille, NOR est dépourvu de pont salin (Thompson et al., 2012) ce qui induit un décalage dans sa conformation et diminue l'affinité des peptides opioïdes endogènes pour son domaine extracellulaire. De

même, la N/OFQ présente une faible affinité pour les autres récepteurs opioïdes (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995).

NOR et son ligand sont largement exprimés au sein du SNC, dont certaines structures impliquées dans la nociception telles que le thalamus, la PAG, la corne dorsale de la ME et les GRD (Mollereau & Mouledous, 2000). La création d'une lignée de souris *knock-in* NOR-eGFP a permis de préciser plus encore la distribution de NOR au sein des fibres afférentes de type C, certains mécanorécepteurs et dans les laminas I-III de la ME (Ozawa et al., 2015). Découvert plus récemment, le récepteur NOR est moins bien caractérisé que les autres récepteurs opioïdes classiques et son rôle dans la modulation de la nociception est encore controversé. L'administration icv de la N/OFQ chez la souris prévient l'analgésie induite par l'activation des récepteurs NOR supraspinaux ont donc une action anti-opioïde qui s'étendent jusqu'à la composante opioïdergique de l'analgésie induite par le stress. A l'inverse, son administration intrathécale est anti-nociceptive (Xu et al., 1996) et potentialise l'analgésie morphinique (Tian et al., 1997). Il existe donc une interaction complexe entre le système NOR-N/OFQ et les récepteurs opioïdes qui semble différer selon le site d'injection.

5 Les effets secondaires des opiacés

5.1 Les opiacés et l'addiction

Le système opioïde tient un rôle central dans le traitement de la douleur mais il module également autres fonctions physiologiques telles que l'humeur, les réponses liées au stress, le transit gastro-intestinal, la respiration, la mémoire, les fonctions endocrine et immunitaire (Bodnar, 2020). Surtout, les opiacés sont impliqués dans les processus d'addiction et de récompense. Par conséquent, l'exposition prolongée aux opiacés induit une dépendance physique et psychique.

L'implication des récepteurs opioïdes dans l'addiction est connue depuis longtemps et a largement été investigué. On sait maintenant que MOR et KOR exercent des effets opposés sur la libération de dopamine au sein du circuit de la récompense. MOR est exprimé par les interneurones GABAergiques de la VTA (Gysling & Wang, 1983; Johnson & North, 1992) et du noyau rostromédial tegmental (Matsui et al., 2014) qui projettent sur les neurones dopaminergiques du noyau accumbens. L'activation de MOR induit une levée d'inhibition des neurones dopaminergiques et provoque la libération de dopamine à l'origine des propriétés récompensantes et euphorisantes des agonistes de MOR qui contribuent à en faire un usage récréatif et des drogues d'abus. KOR est présent à l'extrémité synaptique de ces

neurones dopaminergiques et son activation induit l'inhibition de ces neurones (Bals-Kubik et al., 1993; Spanagel et al., 1992), d'où les effets dysphoriques décrits pour les agonistes de KOR. Enfin, si NOR inhibe également la libération de dopamine induit par une substance addictive dans le noyau accumbens (Nac), peu d'études ont rapporté l'implication de DOR dans l'addiction (Darcq & Kieffer, 2018).

D'un point de vue mécanistique, l'addiction présente certaines similarités avec la SLD (détaillée au chapitre 4, voir p.55). Toutes les deux se mettent en place à la suite d'un traitement prolongé aux opiacés et peuvent être précipitées par un stress aigu (« rechute »). En ce qui concerne l'addiction, l'activation répétée des récepteurs opioïdes par les opiacés exogènes induit une augmentation de l'activité constitutive de MOR dans le cerveau (voir §3.3, p. 44) et contribue à la dépendance physique. De la même manière pour la SLD, les lésions tissulaires induisent l'activation précoce des systèmes opioïdes pour contrer l'hyperalgésie ce qui provoque également l'augmentation de l'activité constitutive de MOR dans la ME pour protéger de la chronicisation de la douleur (Corder et al., 2013). L'organisme devient alors dépendant de cette activité constitutive qui permet d'éviter l'apparition d'un nouvel épisode douloureux. Dans ce cadre-là, il a été ainsi proposé que si l'addiction est une dépendance aux opiacés exogènes, la SLD représenterait un état équivalent de dépendance aux opiacés endogènes (Taylor & Corder, 2014). En accord avec cette théorie, l'administration de naltrexone après résolution de la phase d'hyperalgésie induite par le CFA (Complete Freud's Adjuvant) précipite un syndrome de sevrage, signe de la mise en place de la dépendance physique dans ce modèle de douleur inflammatoire (Corder et al., 2013). Cette hypothèse de dépendance aux opioïdes endogènes est soutenue par des études montrant que l'augmentation du tonus opioïdergique endogène suite à un stress répété ou à l'administration d'inhibiteurs d'enképhalinases est suffisante pour produire un syndrome de sevrage (Christie & Chesher, 1982; Morley & Levine, 1980; Noble et al., 1994).

5.2 L'hyperalgésie induite par les opioïdes

Bien que les opiacés soient de puissants analgésiques, un traitement prolongé peut paradoxalement mener à une hypersensibilité à la douleur, appelée **hyperalgésie induite par les opioïdes** (HIO). En effet, il est depuis longtemps connu que l'hypersensibilité à la douleur est associée au sevrage aux opioïdes (Rossbach, 1880) comme l'un des symptômes les plus courants (Himmelsbach, 1941) ce qui en fait l'un des critères permettant de diagnostiquer le syndrôme de sevrage (American Psychiatric Association, 2013). L'HIO a ensuite été généralisée au contexte de gestion de la douleur, notamment les douleurs post-opératoires

(Fletcher & Martinez, 2014) et cancéreuses (Carullo et al., 2015), remettant ainsi en cause l'utilisation des opiacés pour le soulagement de la douleur. Également mise en évidence chez l'animal (Célèrier et al., 2000b, 2001), l'HIO est notamment le premier modèle préclinique de douleur dans laquelle la SLD a été observée. Les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'HIO sont détaillés dans une revue récente du laboratoire (Roeckel et al., 2016) et ne seront donc que brièvement abordés ici.

5.2.1 Le rôle de MOR

MOR est la cible principale des opiacés utilisés en clinique (Matthes et al., 1996). Il existe plusieurs variants d'épissage de ce récepteur, dont celui à 6 domaines transmembranaires, qui se révèle être couplé à la protéine $G_{\alpha s}$ (Gris et al., 2010), au lieu de $G_{\alpha i}$ pour le variant à 7 domaines transmembranaires. Or, $G_{\alpha s}$ favorise l'excitabilité neuronale (contrairement à $G_{\alpha i}$) et contribuerait de cette manière à l'hyperalgésie. Cette hypothèse est validée par l'observation que des souris génétiquement déficientes pour ce variant développent peu d'hyperalgésie induite par la morphine (Convertino et al., 2015; Oladosu et al., 2015).

5.2.2 Les mécanismes neuronaux

Une LTP entre les fibres nociceptives de type C et les neurones de la corne dorsale de la ME se met en place suite à un traitement prolongé aux opiacés (Drdla et al., 2009; Drdla-Schutting et al., 2012). La LTP permet un renforcement durable de la synapse (voir §4.1.2, p. 35) et est considérée comme contribuant au maintien de l'HIO. En effet, la LTP et l'HIO partagent de nombreux effecteurs intracellulaires tels que la CaMKII, la PKC, la PKA et la PLC (Chen & Huang, 1991; Drdla et al., 2009; Yang et al., 2004). De plus, le BDNF, libéré par les cellules gliales, est connu pour contribuer à la fois à la LTP (Zhou et al., 2010) et à l'HIO (Ferrini et al., 2013). Il en est de même pour l'IL-1 β (l'interleukine-1 β) et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), également sécrétés par les cellules gliales et qui favorisent les PPSE (Zhang et al., 2011) contribuant à l'excitabilité neuronale au sein de la ME (et donc, à l'HIO et à la LTP). Ces deux processus sont tous les deux prévenus par l'administration d'antagonistes des récepteurs NMDA comme la kétamine (Benrath et al., 2005; Haugan et al., 2008) et le MK-801 (Frankiewicz et al., 1996; Li et al., 2001), indiquant l'implication des récepteurs NMDA dans ces deux phénomènes. L'exposition prolongée aux opiacés provoque l'activation des récepteurs NMDA présynaptiques par l'intermédiaire de la PKC qui induit une levée du bouchon magnésium (Zhao et al., 2012). La morphine a également pour conséquence de diminuer le nombre de transporteurs au glutamate EEAC1 à la membrane augmentant ainsi la quantité de la glutamate dans fente synaptique ce qui contribue à stimuler la synapse et la mise en place de la LTP (Mao et al., 2002).

Les récepteurs TRPV1 (activés par les stimuli nociceptifs thermiques au chaud et la capsaïcine) contribuent également à l'HIO puisque cette dernière est abolie chez des souris génétiquement délétées pour ce récepteur (Vardanyan et al., 2009) ou par l'administration d'antagonistes (Chen & Pan, 2008; Vardanyan et al., 2009; Zhou et al., 2010). L'homéostasie chlorique est également modifiée lors d'un traitement prolongé aux opiacés. Le BDNF issu des cellules gliales active le récepteur TrkB et entraîne la diminution l'expression du canal KCC2 des neurones de la LI (Ferrini et al., 2013). Ceci dérégule la quantité d'ions chlorure dans la cellule et le GABA qui devient alors un neurotransmetteur excitateur eparticipe au maintien de l'hyperalgésie (Coull et al., 2005). Des modifications des contrôles descendants provenant de la PAG et de la RVM augmentent également l'excitabilité neuronale dans la ME lors de l'HIO (Rivat et al., 2009). Enfin, l'amorçage hyperalgésique *(hyperalgesic priming)*, dont les mécanismes moléculaires sont décrits dans la revue portant sur la SLD (voir §6.2, p. 76), sensibilisent sur le long-terme les nocicepteurs aux médiateurs de l'inflammation (Aley et al., 2000).

En outre les modifications des propriétés des récepteurs aux opioïdes et une altération des circuits neuronaux de la nociception, une dernière hypothèse a été avancée pour expliquer l'HIO, et qui est celle étudiée par le laboratoire. L'administration répétée d'opiacés sensibiliserait en contre-partie les systèmes pro-nociceptifs anti-opioïdes (Célèrier et al., 2000; Simonnet & Rivat, 2003), qui libèrent à leur tour des peptides anti-opioïdes. Parmi eux, on retrouve la cholécystokinine, le neuropeptide FF, la nociceptine/orphanine FQ (N/OFQ) et la dynorphine (Quillet et al., 2016; Roeckel et al., 2016; Toll et al., 2016). Ces derniers activent leurs récepteurs respectifs et sont alors responsables de l'HIO et de la tolérance analgésique. Surtout lorsque l'activation de ces récepteurs perdure au-delà de la résolution de cette hyperalgésie, ils contribuent au phénomène de SLD (Marvizon et al., 2015).

Chapitre 4 : La sensibilisation latente à la douleur (SLD)

La SLD est un phénomène qui a été mis en évidence dans de nombreux modèles animaux de douleurs chroniques (Campillo et al., 2011; Célèrier et al., 2001; Corder et al., 2013). Ce modèle établi par l'équipe de G. Simonnet (Célèrier et al., 2001), postule que lorsque les animaux récupèrent leur seuil nociceptif basal, ils ne retournent pas dans leur état physiologique initial mais dans un état allostasique. L'allostasie représente un nouvel équilibre de suractivation entre les systèmes pro- et anti-nociceptifs. Il en résulte un état d'hyperalgésie durable masqué et compensé par l'activité des systèmes anti-nociceptifs malgré la résolution de la phase d'hyperalgésie primaire (Célèrier et al., 2001), rendant ainsi ces animaux plus enclins à développer une nouvelle phase d'hyperalgésie transitoire. En effet, la douleur chronique ne peut être réduite à une douleur aigüe prolongée et résulte de contreadaptations du système nociceptif dans le traitement de l'information nociceptive, à l'origine des douleurs intermittentes ou spontanées. En cela, la SLD a été proposée comme étant à la fois un modèle et une hypothèse pouvant expliquer la chronicisation de la douleur (Marvizon et al., 2015).

Devant l'importance que prend l'étude ce phénomène ces dernières années et en l'absence d'article de revue récent à ce sujet, nous avons rédigé une revue faisant le point sur les connaissances de la SLD. Intitulée « *Behavioral Characterization, Clinical Relevance and Mechanisms of Latent Pain Sensitization* », cette revue est soumise et acceptée pour publication dans le journal « *Pharmacology and Therapeutics* ».

Behavioral Characterization, Clinical Relevance and Mechanisms of Latent Pain Sensitization

Manon Gerum and Frédéric Simonin*

Affiliation : Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR7242 CNRS, Université de Strasbourg, Institut du Médicament de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France.

* Corresponding author:

Frédéric Simonin, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR7242 CNRS / Université de Strasbourg, 300 boulevard Sébastien Brant, CS 10413, 67412 Illkirch-Graffenstaden, Cedex, France. +33-368854875; simonin@unistra.fr

Abstract

Chronic pain is a debilitating disorder characterized by painful episodes that alternates with bouts of remission and occurs despite healing of the primary insult. Those episodes are often triggered by stressful events. Recently, a similar situation has been highlighted in a wide variety of rodent models (including inflammatory pain, neuropathy and opioid-induced hyperalgesia) where animals develop a chronic latent hyperalgesia that silently persists after behavioral signs of pain resolution. This state, referred as latent pain sensitization, is due to the compensatory activation of antinociceptive systems, such as the opioid system or NPY and its receptors. A transitory phase of hyperalgesia can then be reinstated by pharmacological or genetic blockade of these antinociceptive systems or by submitting animals to acute stress. Those observations reveal that there is a constant endogenous analgesia responsible for chronic pain inhibition that might paradoxically contribute to maintain this maladaptive state and could then held the transition from acute to chronic pain. Thus, this model of latent pain sensitization is of particular interest to unravel mechanisms underlying chronic pain and help identify new therapeutic strategies and targets. This present review aims to recapitulate behavioral expression, cellular mechanisms and intracellular signaling pathway involved so far in latent pain sensitization.

Keywords: latent pain sensitization - chronic pain - hyperalgesia – spinal cord – opioid – antiopioid

Abbreviations:

AC1 : Adenylate Cyclase type 1; AMPA : α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4isoxazolepropionic acid ; α 2A : α 2 Adrenergic; cAMP : cyclic adenosine monophosphate; CFA : Complete Freund's Adjuvant; CPEB : cytoplasmic polyadenylation element binding protein; CRF : Corticotropin Releasing Factor; DAMGO : D-Ala2, N-Me-Phe4, Gly5-ol]-Enkephalin acetate salt; DOR : Delta Opioid Receptor; Epac1 : Exchange Protein directly Activated by cAMP Type 1; Epac2 : Exchange Protein directly Activated by cAMP Type 2; ERK : Extracellular signal Regulated Kinase; IL-6 : interleukin-6; KOR : Kappa Opioid Receptor; MOR : Mu Opioid Receptor; NGF : Nerve Growth Factor; NMDA : N-Methyl-Daspartate; NMDA-R : N-Methyl-D-aspartate Receptor; Nor-BNI : Nor-binaltorphimine; NPY : Neuropeptide Y; pERK : phospho Extracellular signal-Regulated Kinases; PGE₂ : prostaglandin E2; PKA : Protein Kinase A; SFK : Src Family Kinase; TLR4 : Toll Like Receptor 4; TRPA1 : Transient Receptor Potential Ankyrin 1; TRPV1 : Transient Receptor Potential Vanilloid type 1

Table of contents

1	Iı	ntroduction	63
2	Р	Pain homeostasis model	64
3	Е	Behavioral characterization	65
	3.1	Animal models of latent pain sensitization	65
	3.2	A stress sensitive model	66
	3.3	Clinical relevance	67
4	S	Spinal mechanisms of latent pain sensitization	68
	4.1	Anti-nociceptive systems	68
	4	4.1.1 Opioid receptors	68
		4.1.1.1 Mu Opioid Receptor (MOR)	68
		4.1.1.2 Delta Opioid Receptor (DOR) and Kappa Opioid Receptor (KOR)	70
	4	4.1.2 Other receptors involved	71
		4.1.2.1 α 2 Adrenergic receptor (α_{2A})	71
		4.1.2.2 Neuropeptide Y (NPY) and its Y1 -Y2 receptors	72
		4.1.2.3 CRF, CRF1 and CRF2 receptors	72
		4.1.2.4 Cannabinoid receptors	73
	4.2	Pro-nociceptive systems	73
	4	A.2.1 N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptors	73
	4	A.2.2 Calcium permeable AMPA receptor	75
	4	A.2.3 Neurokinin 1 receptor (NK1R)	75
	4	4.2.4 Src Family Kinase (SFK)	76
5	S	Supraspinal mechanisms of latent pain sensitization	77
6	Р	Peripheral mechanisms of latent pain sensitization	77
	6.1	Peripheral mechanisms considered as relevant for latent pain sensitization	77
	6.2	Hyperalgesic priming	78

7	Non neuronal mechanisms of latent pain sensitization		
8	Other re	levant factors in the establishment of latent pain sensitization	
8	3.1 Gene	tic factors	82
	8.1.1	Strain and species	
	8.1.2	Sex	
8	8.2 Envi	ronmental factors	83
9	Conclus	ion	
10	Referen	ces	89

1 Introduction

In the last decades chronic pain disorders have become a major health care problem with 34% of the adult population suffering worldwide (Jackson et al., 2016). Chronic pain can persist despite injury healing and often occurs in episodes, generally triggered or intensified by acute stress. It is debilitating and regularly associated with sleep deprivation, depression, and anxiety (Emery et al., 2014). Opiates are the most powerful analgesics to alleviate acute pain, but prolonged exposure leads to severe adverse side effects including respiratory depression, addiction, tolerance, and opioid-induced hyperalgesia thus limiting the use of these compounds in the treatment of chronic pain (Busserolles et al., 2020; Eriksen et al., 2006; Simonnet & Rivat, 2003). In the US, the constant increase in opioid prescription for chronic pain over the last 15 years have led to a concomitant dramatic increase of death while several studies have shown that in humans chronic opioid treatments are often poorly effective (Busserolles et al., 2020). Concerning neuropathic pain, alternative first-line treatments exist, such as tricyclic antidepressant and serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors but they are also poorly efficient in the long-term (Kremer et al., 2016). Novel therapeutic strategies for the treatment of chronic pain are therefore urgently needed.

In line with this statement, animal models of chronic pain have been developed to improve pain management and better understand pain chronification. It is now acknowledged that central sensitization, defined by the International Association for the Study of Pain as "an increased responsiveness of nociceptive neurons in the central nervous system to their normal or subthreshold afferent input" (Loeser & Treede, 2008), contributes to development and maintenance of chronic pain. Different cellular processes including loss of inhibitory transmission, enhancement in membrane excitability and increased synaptic strength result in central sensitization (Latremoliere & Woolf, 2009) but whether those neuroplastic changes are sustained after hyperalgesia disappearance to confer long-term pain susceptibility is unknown.

More recently, a new form of central sensitization, which silently persists following behavioral signs of pain has subsided, has been highlighted in various rodent pain models (Campillo et al., 2011; Célèrier et al., 2001; Corder et al., 2013). This so-called latent pain sensitization reproduces the episodic nature (Campillo et al., 2011) and sensitivity to stress (Rivat et al., 2007) of human chronic pain. This phenomenon is thought to be the result of a long-lasting up-regulation of pro-nociceptive systems that outlasts hypersensitivity resolution and is actively masked by anti-nociceptive systems activity. Consequently, whenever anti-nociceptive systems fail to repress the hyperalgesic state, a new transitory hyperalgesia state

occurs (Célèrier et al., 2001). This way, latent pain sensitization confers a long-lasting vulnerability to subsequent noxious or stressful stimuli and could underlie the transition from acute to chronic pain. Latent pain sensitization could then represent both a model and a hypothesis of chronic pain development (Marvizón et al., 2015) so its study is particularly interesting. Yet, latent pain sensitization establishment and maintenance are still poorly understood. The present review focuses on the behavioral characterization of latent pain sensitization, its clinical relevance and current knowledge on the molecular and cellular mechanisms underlying this process.

2 Pain homeostasis model

Latent pain sensitization was initially evidenced following prolonged exposure to heroin (Célèrier et al., 2001). Because hypersensitivity to pain is an opioid withdrawal symptom (Kim et al., 1990) and pro-nociceptive systems are responsible for heroin-induced hyperalgesia (Larcher et al., 1998; Laulin et al., 1998), Simonnet and colleagues evaluated their contribution to delayed hyperalgesia after opioid-induced hyperalgesia has resolved. Based on their results, the authors suggested that animals that returned to their pre-drug nociceptive threshold are in a new biological state where hyperalgesia is sustained but repressed by the endogenous opioid system, according to the process shown in Figure 1.

In their model, Célérier and collaborators hypothesized that the basal nociceptive threshold results from a homeostatic equilibrium between pro-nociceptive and antinociceptive systems activity (McNally, 1999; Rothman, 1992). In physiological conditions, both systems are balanced and poorly activated. This is the homeostatic state, responsible for the basal nociceptive threshold. Chronic opioids, inflammation, or neuropathy stimulate pronociceptive systems, which leads to a decrease of the nociceptive threshold (named hyperalgesia) that counteracts the net analgesic effect of the exogenous opioid, explaining apparent tolerance (progressive decrease of the analgesic properties caused by a repeated administration of a fixed dose of an opiate). When opioid treatment stops or the noxious stimulation resolves, the endogenous opioid system activates to counterbalance the sensitization of pro-nociceptive systems, according to the opponent-process theory (Simonnet & Rivat, 2003) and animals return gradually to their basal nociceptive threshold until complete hyperalgesia resolution, so that pro- and anti-nociceptive systems are now equally and tonically active (allostasis). This state of allostasis is at equilibrium but differs from the initial homeostasis. Indeed, allostasis is a sustained state of hypersensitivity under the inhibitory control of anti-nociceptive systems. This pro-nociceptive system sensitization, qualified as *latent*, can be visualized by interfering with the balance and reveals the abnormal and persistent activation of the endogenous opioid system (Célèrier et al., 2001) and other antinociceptive systems, as it was demonstrated thereafter (Solway et al., 2011; Walwyn et al., 2016). In rodent, latent pain sensitization is usually assessed as it follows:

- Exaggerated sensitivity to the same noxious stimulus, with an extended magnitude and/or duration of hyperalgesia or allodynia response compared to the first one (Bessière et al., 2007; Rivat et al., 2002, 2008).
- Responsiveness to a non-noxious stimulus, manifested as a transitory phase of hyperalgesia following anti-nociceptive systems disruption, either pharmacologically or genetically (Campillo et al., 2011; Corder et al., 2013; Solway et al., 2011; Walwyn et al., 2016).
- Responsiveness following a stimulus that normally induces analgesia, like stress (stress-induced hyperalgesia) or an ultra-low dose of opioid (Bessière et al., 2007; Le Roy et al., 2011; Rivat et al., 2007, 2008).

Importantly, pain sensitivity is not reinstated in naïve animals. This new equilibrium can be sustained for a long time after the nociceptive stimulation and confers a long-term vulnerability to new pain episodes. Therefore, latent pain sensitization could explain how pain switches from being acute to chronic and could represent a model for chronic pain disorders mechanisms (Marvizón et al., 2015).

3 Behavioral characterization

3.1 Animal models of latent pain sensitization

Latent pain sensitization was first evidenced in a model of chronic heroin treatment but the concept was rapidly generalized to other opioids including fentanyl (Laulin et al., 2002; Rivat et al., 2002), remiferitanil (Cabañero et al., 2009), morphine (Lian et al., 2010; Roeckel et al., 2017) and D-Ala2, N-Me-Phe4, Gly5-ol]-Enkephalin (DAMGO; Araldi et al., 2017) in agreement with the pain homeostasis model (Célèrier et al., 2001).

Recently, latent pain sensitization was identified in other well-established models of persistent pain, as paw plantar incision (Campillo et al., 2011; Romero-Alejo et al., 2016b), nerve injury (Chen & Marvizón, 2020a, 2020b; Fu et al., 2020; Solway et al., 2011), carrageenan- (Le Roy et al., 2011) or Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced inflammatory pain (Araldi et al., 2017; Chen et al., 2018b; Chen & Marvizón, 2020b, 2020a; Corder et al., 2013; Feehan & Zadina, 2019; Marvizón et al., 2015; Severino et al., 2018;

Solway et al., 2011; Taylor et al., 2019; Walwyn et al., 2016) and Nerve Growth Factor (NGF) induced non-specific low back pain (Zhang et al., 2017). Thus, nociceptive inputs can also indirectly stimulate endogenous opioid system to initiate sustained latent sensitization to pain. More importantly, this indicates common mechanisms across different models of chronic pain, either elicited by noxious stimuli or exogenous opioid exposure. Interestingly, when nociceptive inputs and opioid exposure are combined, they seem to have synergistic effects. The combination carrageenan/fentanyl (Bessière et al., 2007; Laboureyras et al., 2009; Richebé et al., 2005; Rivat et al., 2007, 2008; Romero et al., 2011), fentanyl/plantar incision (Rivat et al., 2008) and remifentanil/plantar incision (Cabañero et al., 2009; Campillo et al., 2011; Romero et al., 2011, 2017) produced an enhanced temporary hyperalgesia during remission compared to the noxious stimuli alone. Hence, exogenous opioids facilitate the development of latent pain sensitization induced by nociceptive stimuli. Similar observations were made in a study using two opioids, where fentanyl-induced latent pain sensitization was enhanced by an ultra-low dose of morphine, incapable of inducing latent pain sensitization by itself (Laulin et al., 2002).

Finally, this latent sensitization to pain was also evidenced in models of irritable bowel syndrome (Lian et al., 2010) and ocular neuropathy (Kopruszinski et al., 2020), suggesting that the neuroadaptive processes leading to latent pain sensitization are not restricted to the somatic nociceptive system but also extend to the trigeminal and visceral nociceptive systems.

3.2 A stress sensitive model

According to the model suggested by G. Simonnet and colleagues (Célèrier et al., 2001), whenever this fragile balance is impaired, a new transitory phase of hyperalgesia ensues. The pharmacological blockade of anti-nociceptive receptors is usually used to disrupt this equilibrium, but some studies showed that stress leads to the same result. An environmental stress that consists in placing the animals in a new experiment room with bright light source, reinstated hyperalgesia in fentanyl- and carrageenan treated rats. The duration of this stress-induced hyperalgesia increases with the number of stress sessions. Importantly, the same stress procedure induces analgesia in naive rats that is prevented by administration of the general antagonist of opioid receptors naltrexone (Rivat et al., 2007). Altogether, those results indicate that a low level of endogenous opioids might be released during stress. Since latent pain sensitization induces opioid system adaptations, these opioids do not induce analgesia anymore but rather enhances the long-term vulnerability to pain. In support of this hypothesis, an ultra-low dose of fentanyl is analgesic in naïve rats whereas it induces hyperalgesia in

opioid and pain-experienced rats (Rivat et al., 2007). The mechanisms by which stress interferes with pain inhibitory control by the endogenous opioid system are still elusive, but a recent study argues that stress-induced hyperalgesia is mediated by the release of Corticotropin Releasing Factor (CRF) that maintains behavioral signs of hypersensitivity (Chen et al., 2018b). Further studies are needed to confirm this hypothesis.

Conversely, a stress performed before the opioid or the inflammatory pain experience can facilitate long-term hypersensitivity to pain. Pre-stressed rats show an enhancement of carrageenan-induced hyperalgesia compared to non-stressed rats (Le Roy et al., 2011). This exaggerated inflammatory hyperalgesia was prevented by an administration of naltrexone before the stress, suggesting that stress induced-endogenous opioids release is sufficient to induce latent pain sensitization. Accordingly, the higher the number of stress sessions, the more the exacerbation of inflammatory pain (Le Roy et al., 2011).

3.3 Clinical relevance

As discussed in the previous section, stress-induced hyperalgesia can be compared to stressful events as a common trigger of a painful period in humans. Importantly, human chronic pain is episodic, another specificity found in latent pain sensitization. It has been demonstrated that behavioral signs of hypersensitivity can be reinstated until 150 days after remission of a postoperative pain (Campillo et al., 2011) and 105 days after resolution of inflammatory pain (Corder et al., 2013) by a pharmacological blockade of anti-nociceptive systems. Likewise, stress-induced hyperalgesia is still present four months after the nociceptive stimuli (Rivat et al., 2007). Latent pain sensitization is then a long-lasting phenomenon that might last indefinitely and that reproduces both episodic nature and stresssensitivity of human chronic pain. As latent pain sensitization shares some features with chronic pain, a few studies used the general opioid receptor antagonist naloxone to investigate whether this process occurs in humans. A first study reported no naloxone-induced hyperalgesia following resolution of a first-degree burn (Pereira et al., 2013). This negative result was thought to be due to an insufficient dose of naloxone rather than an absence of latent pain sensitization in humans. Indeed, further investigation showed that hyperalgesia was effectively reinstated with a higher dose of naloxone using the same model (Pereira et al., 2015a). However, only 4 of 12 volunteers developed latent pain sensitization and those where the subjects that developed the largest hyperalgesia area induced by thermal injury. So latent pain sensitization would seem to occur in humans but only in "high sensitizers", underlining individual differences to pain. A large-scale study selected and compared if those "high

sensitizers" are more susceptible to develop latent pain sensitization than "low sensitizers" (Springborg et al., 2016) but no difference could be systematically evidenced neither between naloxone and placebo infusion nor between "high" and "low" sensitizers (Springborg et al., 2020). Even if other receptors than opioid ones participate in latent pain sensitization and the use of naloxone here could be questioned, the authors also raised concerns concerning the heterogeneity of the cohort and pain model (cutaneous heat injury) used in this study. Therefore, while latent pain sensitization does exist in humans, it is not as prevalent as in rodent models. It is noteworthy that these studies were performed on healthy subjects with experimentally-induced pain but a phase II clinical trial is currently ongoing to assess latent pain sensitization in postsurgical patients (Pereira et al., 2015b).

4 Spinal mechanisms of latent pain sensitization

As latent pain sensitization is considered a silent form of central sensitization, most of the studies explored central mechanisms involved in this process.

4.1 Anti-nociceptive systems

4.1.1 **Opioid receptors**

The opioid system was the first identified to maintain endogenous analgesia during latent pain sensitization. Pharmacological blockade of opioid receptors with naloxone, a non-selective opioid receptor antagonist, precipitated hyperalgesia following chronic heroin exposure (Célèrier et al., 2001). Similar observations were made in fentanyl-treated rats (Laulin et al., 2002), postoperative pain (Campillo et al., 2011; Richebé et al., 2005; Romero-Alejo et al., 2016a, 2016b; Romero et al., 2011, 2013, 2017) and partial nerve injury (Guan et al., 2010). Taken together, these behavioral studies indicate that a sustained endogenous opioids release (in the spinal cord) provides long-lasting hyperalgesia relief and underlies latent pain sensitization.

4.1.1.1 Mu Opioid Receptor (MOR)

The contribution of each opioid receptor subtype to latent pain sensitization was then studied individually, beginning with MOR, the main target of exogenous opioids.

Global MOR knockout (KO) mice show only a partial recovery from CFA-induced hyperalgesia (Walwyn et al., 2016), confirming the hypothesis that MOR compensatory activation underlies remission from hyperalgesia (Célèrier et al., 2001). Additional experiments confirmed MOR sustained activity during latent pain sensitization and further argue that it is caused by an increase of its constitutive activity (Corder et al., 2013; Walwyn

et al., 2016). Receptor constitutive activity is a specific conformational state with spontaneous receptor signaling in the absence of the endogenous ligand. Importantly, only inverse agonists can block constitutive activity, whereas ligand-induced activation of a receptor is blocked both by a neutral antagonist and an inverse agonist. Since opiates prolonged exposure is known to promote MOR constitutive activity in models of drug dependence (Meye et al., 2012; Wang et al., 2004), it was extensively studied in latent pain sensitization by using naltrexone that has been shown to display MOR inverse agonist activity (Wang et al., 2001). First, naltrexone but not the MOR neutral antagonist 6β-naltrexol reinstates pain sensitivity in CFA sensitized mice (Corder et al., 2013) and rats (Walwyn et al., 2016). Importantly, 6\beta-naltrexol administration is sufficient to abolish naltrexone induced hyperalgesia (Corder et al., 2013; Walwyn et al., 2016). Pro-dynorphin, Pro-enkephalin, and Pro-opiomelanocortin KO mice recover from acute hyperalgesia and display « normal » latent pain sensitization as evidenced by a naltrexone challenge (Walwyn et al., 2016) indicating that in the absence of endogenous opioid peptides, MOR is still activated to maintain long-lasting inhibition of hyperalgesia. Basal $[^{35}S]$ -guanosine 5'-[γ -thio]triphosphate ($[^{35}S]$ -GTP γ S) binding dose-dependently decreases with the MOR selective inverse agonist β-funaltrexamine in the dorsal horn of CFAsensitized mice (Corder et al., 2013), supporting MOR signaling in the absence of ligands. Besides, no MOR internalization (usually triggered by endogenous opioid release) was reported during remission in the spinal cord of CFA-treated rats (Walwyn et al., 2016). In the same model, spinal MOR immunoprecipitation shows increased phosphorylation in Src Family Kinase (SFK) and MOR-SFK recruitment by β -arrestin 2 is involved in the constitutive activity of this receptor (Walwyn et al., 2016). Finally, MOR inhibits voltagegated Ca2+ channels in dorsal root ganglia neurons of CFA sensitized mice in a ligandindependent manner since it is disrupted with naltrexone but not 6β-naltrexol (Walwyn et al., 2016). Naltrexone-induced hyperalgesia after recovery from CFA administration was reproduced several times in different labs (Chen & Marvizón, 2020a, 2020b; Corder et al., 2013; Feehan & Zadina, 2019; Severino et al., 2018; Taylor et al., 2019; Walwyn et al., 2016) and then extended to chronic morphine (Roeckel et al., 2017) and postoperative (Feehan & Zadina, 2019) pain models. Naltrexone also induces signs of spontaneous and affective pain as assessed by the grimace scale score and conditioned place preference paradigm (Corder et al., 2013). Those results support the hypothesis that MOR long-lasting signaling is sustained by its constitutive activity in a model latent pain sensitization and that its involvement is not restricted to the sensory component of pain. However, a recent study reported that MOR selective antagonist CTOP (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂) can dosedependently reveal latent pain sensitization in a model of postsurgical pain induced by a plantar incision (Custodio-Patsey et al., 2020), suggesting that endogenous opioids release might also account in MOR sustained activation. Further experiments in different models of latent pain sensitization are now necessary to test this hypothesis.

MOR is broadly expressed throughout the nociceptive pathway, including supraspinal areas of pain integration (Mansour et al., 1995), central terminals of primary afferents and LI-LII of the dorsal horn spinal cord (Besse et al., 1990; Kohno et al., 1999). In order to investigate in which region of the central nervous system MOR is important for latent pain sensitization, mice genetically engineered to decrease MOR expression in primary afferents were shown to display weak pain reinstatement by naltrexone following CFA-induced hyperalgesia resolution (Severino et al., 2018). This result suggests that MOR located on primary nociceptors is important for the establishment and/or maintenance of latent pain sensitization, but it does not allow to discriminate between MOR expressed on central or peripheral terminals. A few lines of evidence suggests that MOR expressed on central terminals could be involved since peripherally restricted MOR antagonists reinstate hypersensitivity during remission when they are administered intrathecally but not subcutaneously (Campillo et al., 2011; Corder et al., 2013). Besides, hypersensitivity is bilaterally reinstated when MOR is pharmacologically blocked or either with stress-induced hyperalgesia (Corder et al., 2013; Rivat et al., 2007), indicative of central mechanisms. Studies specifically designed to address this question are needed.

4.1.1.2 Delta Opioid Receptor (DOR) and Kappa Opioid Receptor (KOR)

Because DOR and KOR are also expressed on supraspinal sites involved in pain modulation (Mansour et al., 1995), on central terminals of nociceptors and in the dorsal horn spinal cord (Besse et al., 1990; Kohno et al., 1999), their role in latent pain sensitization was investigated.

The DOR selective antagonist naltrindole reinstates a slight transitory phase of hyperalgesia in CFA inflammatory pain model in rats either injected subcutaneously or intrathecally (Walwyn et al., 2016). Subcutaneous naltrindole induced-hypersensitivity is more robust in CFA sensitized-mice (Walwyn et al., 2016). In contrast, intrathecal naltrindole and TIPP Ψ (Tyr-Tic-Phe-Phe Ψ , another DOR antagonist) reinstated mechanical hyperalgesia in paw incision model in mice only at high doses that induce adverse side effects (Custodio-Patsey et al., 2020) so that off-target effects cannot be excluded. More studies are required to

determine whether DOR contributes to delayed hyperalgesia inhibition responsible for latent pain sensitization.

The effectiveness of a subcutaneous injection of KOR antagonist nor-binaltorphimine (nor-BNI) to precipitate hypersensitivity in mice that had recovered from postsurgical pain (Campillo et al., 2011) indicates that KOR might also be involved in latent pain sensitization. In a CFA inflammatory pain model, hyperalgesia reinstatement by intrathecally administered nor-BNI in rats and subcutaneously administered JTiDC in mice has also been reported (Walwyn et al., 2016). Similar results were found with LY2456302, another KOR antagonist recently characterized (Rorick-Kehn et al., 2013, 2015). When intrathecally delivered during the remission state, it induces not only dose-dependent pain hyperresponsiveness but also increases touch-evoked phospho-Extracellular signal-Regulated Kinases (pERK) expression (a central sensitization hallmark) in LI-LII and LII-LV neurons of paw incision-sensitized mice (Custodio-Patsey et al., 2020). Therefore, KOR mediated suppression of hyperalgesia is common to different chronic pain models, further supporting its anti-nociceptive role in latent pain sensitization. More studies are warranted to determine if only KOR localized in the spinal cord are involved or if supraspinal and peripheral KOR also participate to this process. Nevertheless, KOR-mediated signaling during latent pain sensitization is still unknown. Genetically deficient Pro-dynorphin mice display "normal" behavioral hypersensitivity following subcutaneous administration of JDTiC, suggesting that KOR contributes to latent pain sensitization even in the absence of dynorphin (Walwyn et al., 2016). In line with this observation, no increase in spinal dynorphin levels was reported following subcutaneous naloxone injection in mice that had recovered from postoperative pain (Campillo et al., 2011). It is therefore unlikely that KOR signaling during the remission state is due to a release of dynorphin. KOR might act via an increase of its constitutive activity, but further experiments designed to address this specific question are required.

4.1.2 Other receptors involved

4.1.2.1 α2 Adrenergic receptor (α_{2A})

Noradrenergic descending pathways mediate analgesic effects through α_{2A} receptors (Pertovaara, 2006) expressed in central terminals of primary afferents (Stone et al., 1997). Their contribution to sustained hyperalgesia suppression was then evaluated. A few studies showed reinstatement of transitory hyperalgesia with α_{2A} receptor antagonist BRL44408 administered intrathecally in rats (Walwyn et al., 2016) and subcutaneously in mice (Severino et al., 2018; Walwyn et al., 2016), suggesting that spinal α_{2A} receptors exert a tonic inhibitory

control responsible for latent pain sensitization, but involvement of supraspinal and peripheral receptors cannot be excluded.

4.1.2.2 Neuropeptide Y (NPY) and its Y1 -Y2 receptors

NPY and its Y1 and Y2 receptors are expressed in the dorsal root ganglia and the dorsal horn of the spinal cord (Brumovsky et al., 2005; Gibson et al., 1984; Kopp et al., 2002). This neuropeptide shows anti-nociceptive activities (Intondi et al., 2008) and is upregulated following nerve damage and inflammation in the dorsal root ganglia (Wakisaka et al., 1992) for 24 weeks (Intondi et al., 2010), making NPY a potential candidate for opposing long-lasting hyperalgesia during latent pain sensitization.

Using genetic approaches, Taylor and colleagues showed that conditional NPY depletion in the dorsal root ganglia and the dorsal horn precipitates behavioral hypersensitivity in CFA and nerve-injured sensitized mice. An intrathecal injection of NPY was sufficient to reverse this transitory hyperalgesic state (Solway et al., 2011). In accordance with these results, intrathecally administered Y1 and Y2 receptors antagonists (BIBO3304 and BIIE0246, respectively) reveal latent hyperalgesia dose-dependently in the same model (Solway et al., 2011). Taken together, those results confirm that NPY-Y1 and NPY-Y2 signaling in the spinal cord exert a sustained inhibitory pain control after the resolution of injury. This signaling is likely mediated by an endogenous NPY release within the spinal cord that activates spinal Y1 and Y2 receptors. Whether NPY is released by the dorsal root ganglia or the descending inhibitory pain control needs to be clarified. NPY seems also to repress hallmarks of central sensitization. Y2 (but not Y1) antagonist induces pERK and c-fos upregulation in LI-LII spinal laminae following CFA-induced hyperalgesia resolution (Solway et al., 2011), confirming its role as an anti-nociceptive system. Finally, NPY involvement in latent pain sensitization is not restricted to nociception and extends to the affective component of pain, as assessed in a conditioned place paradigm following intrathecal administration of Y1 antagonist and in NPY conditional knock-down (Fu et al., 2020).

4.1.2.3 CRF, CRF1 and CRF2 receptors

Because acute stressors display hyperalgesic properties in animals with latent pain sensitization, the contribution of CRF and its receptors, which are important mediators of the stress response, were studied.

Mice genetically deleted for CRF1 receptor subtype showed an enhanced naloxoneinduced hyperalgesia compared to wild type littermates in a model of postsurgical pain (Romero et al., 2017) indicating that CRF1 is part of the anti-nociceptive systems providing
long-lasting suppression of hyperalgesia. Another study showed that an intracerebroventricular injection of CRF reinstates behavioral signs of pain in CFA-sensitized rats (Chen et al., 2018b). Therefore, stress-induced hyperalgesia during latent pain sensitization might be due to a release of CRF, which is inconsistent with the anti-hyperalgesic properties of CRF1 receptor. Opposite effects of CRF on its CRF1 and CRF2 receptors have been reported in amygdala neurons (Fu & Neugebauer, 2008; Ji & Neugebauer, 2008; Rouwette et al., 2012). The CRF pro-nociceptive effect observed by Marvizon and colleagues (Chen et al., 2018b) could therefore be mediated via CRF2 receptors in the amygdala. Further investigations are required to distinguish the respective role of CRF1 and CRF2 receptor subtypes and explore the potential interaction between opioid and CRF systems during latent pain sensitization.

4.1.2.4 Cannabinoid receptors

Cannabinoids are more and more used to provide migraine pain relief (Baron, 2015) and a recent study evaluated their ability to induce paradoxical long-term pain vulnerability just like opioids. In a model of medication overuse headache, the cannabinoid 1 receptor agonists WIN55,212-2 (full agonist) and Δ -9-Tetrahydrocannabinol (partial agonist) were shown to cause latent pain sensitization as assessed by bright light stress-induced hyperalgesia following headache resolution (Kopruszinski et al., 2020).

4.2 **Pro-nociceptive systems**

4.2.1 N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor

As NMDA receptors were already identified as a pro-nociceptive system responsible for opioid-induced hyperalgesia (Célèrier et al., 1999, 2000; Larcher et al., 1998; Laulin et al., 1998), its involvement in latent pain sensitization was quickly investigated.

Pre-emptive blockade of NMDA receptor with MK-801 prevents delayed hyperalgesia induced by chronic heroin treatment (Célèrier et al., 2001). Ketamine pretreatment partially blocks naloxone-precipitated hyperalgesia in fentanyl-treated rats (Laulin et al., 2002) and fentanyl enhancement of carrageenan-induced hyperalgesia (Richebé et al., 2005; Rivat et al., 2002). In the same model, ketamine, BN2572 (a NMDA antagonist) and N₂O (a gas with anti-NMDA properties) also prevent stress-induced hyperalgesia (Bessière et al., 2007, 2010; Rivat et al., 2007). Exaggerated hyperalgesia in pre-stressed rats is in part prevented by NMDA antagonists ketamine and BN2572 (Le Roy et al., 2011). Lastly, a polyamine deficient diet (that negatively modulates NMDA receptors activity) prevented hyperalgesia exacerbation induced by a second inflammation and stress-induced hyperalgesia in pain and opioid

experienced rats (Rivat et al., 2008). Interestingly, a polyamine deficient diet not only opposed the development of latent pain sensitization but also reverses it. Indeed, stress-induced hyperalgesia was blocked in rats fed with a polyamine deficient diet right after carrageenaninduced hyperalgesia has resolved (Rivat et al., 2008). Consequently, NMDA receptor activation was found across different models of latent pain sensitization using various strategies aiming to decrease or abolish its signaling, which supports its role as a pronociceptive system that silently maintains the hyperalgesic state during remission.

The NMDA receptor signaling pathway was then characterized by Corder an collaborators in their model of CFA-induced latent pain sensitization in mice (Corder et al., 2013). They demonstrated that NMDA receptor elicits an Adenylate Cyclase type 1 (AC1)-dependent pathway under the tonic inhibitory control of MOR (Figure 2 middle panel). During the posthyperalgesic state, naltrexone increases glutamate-evoked intracellular Ca²⁺ in the spinal cord, which is abolished by MK-801, indicating that this rise in Ca²⁺ is NMDA-dependent. In the same way, naltrexone-mediated cyclic adenosine monophosphate (cAMP) upregulation in the spinal cord is blocked by MK-801 in CFA-sensitized mice, suggesting that NMDA receptor activation leads to a spinal cAMP increase. This NMDA-cAMP pathway is mediated by AC1, since intrathecally delivered NMDA and forskolin increase nociceptive behaviors and cAMP overshoot in the spinal cord. In line with these results, the genetic deletion or pharmacological inhibition of AC1 prevents both naltrexone induced hyperalgesia and cAMP upregulation in the spinal cord. Altogether, those experiments demonstrate that MOR represses behavioral hypersensitivity via a tonic inhibition of a NMDA receptor (NMDA-R) \Rightarrow Ca²⁺ \Rightarrow AC1 \Rightarrow cAMP pathway in the spinal cord (Figure 2 lower panel).

More recent studies showed that the molecular pathway under the inhibitory control of the NPY / Y1 receptor system also comprises NMDA receptor. Unmasking CFA-induced latent pain sensitization with the Y1 antagonist is prevented by MK-801, AC1 inhibitor, Protein Kinase A (PKA) inhibitor, Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) and Transient Receptor Potential Vanilloid type 1 (TRPV1) channel blockers, and by inhibitors of Exchange Protein directly Activated by cAMP Type 1 (Epac1) and type 2 (Epac2) (Fu et al., 2019). Latent pain sensitization was also absent in genetically deficient AC1 mice, leading the authors to conclude that NPY acts on Y1 receptors to tonically silence NMDA-R \rightarrow AC1 \rightarrow PKA \rightarrow TRPA1 / TRPV1 at the central terminals of nociceptors (Figure 2 middle panel) and NMDA-R \rightarrow AC1 \rightarrow Epac1/2 pathways in NPY receptor-expressing interneurons in the dorsal horn (Figure 2 lower panel). Accordingly, PKA and Epac activators increase pERK immunoreactivity in the dorsal horn, and precipitate the hyperalgesic state, so that PKA and

Epac are sufficient to reveal latent pain sensitization (Fu et al., 2019). Downstream effectors of Epac1/2 remain to be identified. This NMDA-R - TRPA1 / TRPV1 signaling pathway is also involved in affective pain dimension reinstatement. Indeed, conditioned place aversion induced by Y1 antagonist or in NPY conditional knock-down mice is blocked by MK-801, AC1 inhibitor, TRPA1, and TRPV1 channel blocker and is absent in AC1 -/- mice in a model of nerve injury (Fu et al., 2020).

These results go further than previous findings of Corder and collaborators (Corder et al., 2013) and extend them to the neuropathic pain model. NMDA-R-AC1 pathway is involved in various models of latent pain sensitization, in both sensory and emotional aspects of pain and is silenced by MOR and Y1 receptor, making this cascade a key component of latent pain sensitization. This raises the possibility that other anti-nociceptive receptors might repress this pathway during the remission state. Notably, MK-801 prevented nor-BNI induced-hyperalgesia in a postsurgical incision pain model (Romero et al., 2011), suggesting that NMDA-R-AC1 might also be under the inhibitory control of KOR.

4.2.2 Calcium permeable AMPA receptor

As numerous studies demonstrated an upregulation of spinal calcium-permeable AMPA receptor in the early onset of acute pain in different pain models (Cabañero et al., 2013; Chen et al., 2013; Wigerblad et al., 2017), its contribution once hyperalgesia has resolved was explored. Supported by electrophysiological and calcium imaging experiments, an increase of AMPA receptor-induced Ca^{2+} permeability in the LII neurons has been reported in a CFA inflammatory pain model (Taylor et al., 2019). This AMPA receptor plasticity is silenced by MOR, as blockade of MOR by naltrexone increases AMPA-receptor mediated Ca^{2+} . Consistent with these observations, IEM-1460 (a calcium-permeable AMPA-receptor antagonist) dose-dependently blocked naltrexone induced hyperalgesic state (Taylor et al., 2019). Therefore, AMPA receptor-induced Ca^{2+} permeability enhances synaptic strength in LII neurons and begets long-lasting hypersensitivity to pain that is masked by the inhibitory control of MOR. Mechanisms by which MOR drives AMPA receptor plasticity are still unknown.

4.2.3 Neurokinin 1 receptor (NK1R)

NMDA receptor, adenylate cyclase and protein kinase A, three key elements that contributes to latent pain sensitization (Célèrier et al., 2001; Corder et al., 2013; Fu et al., 2019) are also known to mediate substance P release by primary afferent fibers in the spinal cord dorsal horn (Chen et al., 2018a; Marvizón et al., 1997). Besides, presynaptic MOR

inhibits substance P release (Chen et al., 2018a) and is responsible for endogenous analgesia in latent pain sensitization (Chen & Marvizón, 2020a, 2020b; Corder et al., 2013; Feehan & Zadina, 2019; Roeckel et al., 2017; Severino et al., 2018; Walwyn et al., 2016). Indeed, loss of MOR in central terminal of primary afferents in Nav1.8cre/flMOR mice abolished both MOR inhibition of NMDA receptor induced substance P release and latent pain sensitization (Severino et al., 2018). Altogether, these experiments indicate that NK1R activation by substance P might also be involved in latent pain sensitization.

A study tested this hypothesis using RP67580, a NK1R antagonist, in CFA or tibial spared nerve injury pain models (Chen & Marvizón, 2020b). Blockade of naltrexone-induced allodynia was maintained 5 days after the last administration of RP6758NK1R suggesting that NK1R is not only involved in the expression but also in the maintenance of latent pain sensitization. Substance P release, measured *in situ* as NK1R internalization in spinal cord laminae I, was shown to be higher in CFA-sensitized rats than in control rats and was increased by naltrexone administration in the posthyperalgesic state (Chen & Marvizón, 2020b). In accordance with a previous study (Severino et al., 2018), those results confirm that substance P mediates hyperalgesia during latent pain sensitization via NK1R that is repressed by MOR activation in primary afferent fibers (Figure 2 middle panel).

4.2.4 Src Family Kinase (SFK)

NMDA receptors are modulated and phosphorylated by SFK (Abe et al., 2005; Chen et al., 2010; Guo et al., 2002) a process that was shown to be critical in models of chronic pain (Appel et al., 2017; Hildebrand et al., 2016; Lai et al., 2016), so that involvement of SFK in latent pain sensitization was explored. Naltrexone-induced hyperalgesia was eliminated 15 min after a single intrathecal administration of PP2 (a SKF inhibitor) and 5 days following a 3 days-treatment with PP2. Thus, blockade of naltrexone-induced hyperalgesia is long lasting, suggesting that SFK contributes to both expression and maintenance of latent pain sensitization, indicating common mechanisms across these different models (Chen & Marvizón, 2020a). Of note, the combination of Src and MAPK inhibitors (SU 6656 and U0126 respectively) suppresses CFA-induced latent pain sensitization expression when co-administered with naltrexone. The effect of a Src inhibitor alone was not evaluated in this study (Araldi et al., 2017). Finally, co-immunoprecipitation of SFK with MOR show higher levels of SFK in the spinal cord of CFA sensitized rats compared to unsensitized animals (Walwyn et al., 2016), indicating that SKF signaling pathway might be recruited by MOR

during latent pain sensitization. Further studies are needed to confirm this hypothesis and contribution of other receptors than MOR remains to be determined.

5 Supraspinal mechanisms of latent pain sensitization

Most of the research mentioned above focuses on neuroadaptive processes occurring in the spinal cord. However, numerous experiments noticed pain reinstatement on both ipsilateral and contralateral paws (Bessière et al., 2007; Corder et al., 2013; Laboureyras et al., 2009; Rivat et al., 2002, 2007) indicating that descending inhibitory controls might be necessary to maintain the suppression of hyperalgesia. In agreement with this hypothesis, spinal blockade of descending inhibitory controls precipitates hyperalgesia bilaterally in CFAsensitized rats (Chen et al., 2018b). This does not exclude the participation of descending facilitatory controls but further studies are needed to determine precisely which pathway is involved. Of note, naloxone causes glucose metabolism changes in the pain matrix in a postoperative pain model, especially in opioid-related pathways (Romero et al., 2011), suggesting that latent pain sensitization induces long-lasting neuroplastic adaptations both in spinal and supraspinal areas.

6 Peripheral mechanisms of latent pain sensitization

6.1 Peripheral mechanisms considered as relevant for latent pain sensitization

Several studies also argue that peripheral mechanisms might be considered in latent pain sensitization maintenance. In a model of partial nerve injury, systemic or intraplantar administration of naloxone methiodide (opioid receptors antagonist that does not cross the blood brain barrier) induces a transitory phase of allodynia (Guan et al., 2010). Similarly, intradermal administration of naloxone reinstates the hyperalgesic state in animals that received at the same site intradermal repeated administrations of DAMGO (Araldi et al., 2017). Then, it seems like peripheral opioid receptors might also participate in latent pain sensitization, but which opioid receptor(s) is (are) contributing in latent pain sensitization remains to be determined. It is unlikely that peripheral MOR are involved as only intrathecally (and not subcutaneously) administered peripherally-restricted MOR antagonists precipitate behavioral signs of pain during remission (Campillo et al., 2011; Corder et al., 2013). Involvement of KOR and DOR and maybe other receptors in latent pain sensitization needs to be confirmed.

6.2 Hyperalgesic priming

Another form of chronic latent hypersensitivity to pain referred to as hyperalgesic priming involves primary nociceptors and shares some features with latent pain sensitization. It was originally found in inflammatory mediated pain models and largely characterized (for review, see Kandasamy & Price, 2015; Reichling & Levine, 2009). Hyperalgesic priming type I was defined by Levine and collaborators as "a neuroplastic change in the primary afferent nociceptor that causes prostaglandin E2 (PGE₂)-induced hyperalgesia to last at least 24 h and to become dependent on Protein Kinase C epsilon (PKC ε)" (Reichling & Levine, 2009). Indeed once carrageenan-induced hyperalgesia has resolved, administration of an inflammatory cytokine PGE₂ in the same paw is able to induce a 24h-hyperalgesia while the same PGE₂-induced hyperalgesia lasts less than 4h in naïve animals (Aley et al., 2000). Similarly, hyperalgesic priming can also be induced by interleukin-6 (IL-6; Dina et al., 2008), the 5-HT_{1B/D} agonist sumatriptan (Araldi et al., 2016b), high and low doses of morphine (Ferrari et al., 2019), NGF and Glial cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF; Ferrari et al., 2010) and can be reinstated with serotonin and A2 receptor agonists (Aley et al., 2000).

This primed state is linked with changes in intracellular signaling pathways. PGE₂ activates PKA via AC in naïve animals, since it is attenuated by PKA antagonist (Aley & Levine, 1999). However in primed animals, PGE₂ additionally stimulates AC to induce cAMP production (Parada et al., 2005) and Epac recruitment, which in turn activates PKC ϵ (Hucho et al., 2005). Thus, PGE₂ (Dina et al., 2009) and other receptors of inflammatory mediators, switch from inhibitory G to stimulatory G-coupled protein (Khasar et al., 2008). PGE₂ also stimulates phospholipase C β (Joseph et al., 2007), which can in turn activate PKC ϵ .

PKC ε is mandatory for hyperalgesic priming maintenance, as PGE₂ induced hyperalgesia is blocked by inhibitors of PKC ε (Aley et al., 2000) and antisense oligodeoxynucleotides to PKC ε (Parada et al., 2003b). Conversely, PKC ε is sufficient to express and maintain the primed state since its agonist \Box ε RACK is also able to induce hyperalgesic priming (Aley et al., 2000), even at low doses incapable to trigger the primary hyperalgesia (Parada et al., 2003b). The selective lesion of isolectin B4-positive nociceptors (a subtype of small diameter C-fibers) abrogates PGE₂ reinstatement of hyperalgesia (despite \Box ε RACK-induced hyperalgesia) suggesting that the switch in signaling pathway underlying hyperalgesic priming occurs in those neurons (Joseph & Levine, 2010).

Importantly, this priming state can persist for several weeks (Aley et al., 2000; Ferrari et al., 2010; Parada et al., 2003a). Since G protein switch cannot be maintained long enough to sustain this primed state due to the intracellular protein turnover, it is more likely that these

changes in intracellular signaling are the result of local protein translation adaptations. Translation can be quickly regulated by kinases cascades, particularly mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and extracellular signal regulated kinase (ERK), which have been shown to modulate IL6- and NGF-induced hyperalgesic priming (Melemedjian et al., 2010, 2014). Accordingly, their final effector, the Eukaryotic Initiation Factor 4F (eIF4F) complex (known to enhance translation), is also involved in hyperalgesic priming since blockade of its formation by 4EGI-1 prevents the hyperalgesic priming (Asiedu et al., 2011). In line with these results, mice lacking a phosphorylation site on eIF4E (part of the eIF4F complex) fail to develop hyperalgesic priming (Moy et al., 2017, 2018). Conversely, adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) that is able to decrease ERK, mTORC1 and eIF4F formation in nociceptors (Melemedjian et al., 2011; Tillu et al., 2012) prevents establishment of priming when activated by resveratrol (Tillu et al., 2012).

Another piece of evidence supporting translation modifications is the use of protein synthesis inhibitors. The co-administration of anisomycin with IL-6 prevents (but not reverse) the induction of hyperalgesic priming in mice (Asiedu et al., 2011) whereas in rats, rapamycin and cordycepin reverse it (Ferrari et al., 2013a). Thus, protein translation is mandatory for both development and maintenance of hyperalgesic priming. Further studies then demonstrated that cytoplasmic polyadenylation element binding protein (CPEB), a binding RNA protein that once phosphorylated induces an elongation of polyA to improve translation efficiency, is also a target of PKC ε (Bogen et al., 2012). Accordingly, decrease in CPEB using antisense oligodeoxynucleotide prevents (but not reverse) hyperalgesic priming (Bogen et al., 2012). Ca²⁺/calmodulin-activated protein kinase II α (CaMKII α), that phosphorylates CPEB, was also shown to be involved because its activation induces priming and its inhibition prevents it (Ferrari et al., 2013b).

Although the name might imply it, hyperalgesic priming does not require an initial phase of hyperalgesia to be triggered. Indeed, exposure to unpredictable sound stress (Khasar et al., 2008) or repeated opioid administrations (Joseph et al., 2010) were also shown to elicit this primed state. Finally, this PKC ϵ dependent priming shows sexual dimorphism in rats where in primed female PGE₂ fails to precipitate hyperalgesia because of the presence of estrogen (Joseph et al., 2003).

More recently, a second type of hyperalgesic priming was described. This so called hyperalgesic priming type II is more rapidly induced than type I, is dependent on PKA (instead of PKCε), occurs in isolectin B4-negative nociceptors and develops in both male and female rats (Araldi et al., 2015, 2018b). While hyperalgesic priming type I is reversed by protein

synthesis inhibitors, type II priming is reversed by co-administrations of Src and MAPK inhibitors (Araldi et al., 2017).

Except for one study reporting hyperalgesic priming type II establishment following adenosine A1 receptor activation (Araldi et al., 2016a), this process was mostly evidenced in models of opioid-induced hyperalgesia. Repeated administrations of DAMGO at the primary fibers peripheral terminals produced an enhancement of PGE₂-induced hyperalgesia (Araldi et al., 2015, 2017, 2018b) that was abolished, as expected, by isolectin B4-negative nociceptors depletion and by knocking down MOR using antisense oligodeoxynucleotides (Araldi et al., 2018b). PGE₂ challenge also demonstrated that fentanyl, another MOR agonist, causes hyperalgesic priming type II (Araldi et al., 2018c; Khomula et al., 2021).

Intradermal, intrathecal or systemic acute fentanyl is able to elicit both types of priming: type I at the peripheral terminal and type II at the central terminal of nociceptors as assessed by reversion by protein translation inhibitors and Src and MAPK inhibitors, respectively (Araldi et al., 2018c; Khomula et al., 2021). The communication between central and peripheral terminals is mediated by intracellular Ca^{2+} since fentanyl-induced priming is prevented by administration of dantrolene (that blocks endoplasmic reticulum Ca²⁺ release) at either terminal. In accordance with these results, fentanyl induced intracellular Ca²⁺ increase in dorsal root ganglia is blocked by dantrolene. Using deletion of isolectin B4-positive (non peptidergic) and isolectin B4-negative (peptidergic) nociceptors alone or in combination, the authors determined that intradermal fentanyl induces type II priming of peptidergic fibers and type I in peptidergic and non peptidergic nociceptors. As for intrathecally administered fentanyl, type II priming occurs in both types of nociceptors but type I in none of them, indicating that a third type of nociceptors might be involved (Araldi et al., 2018c). Similarly, hyperalgesic priming induced by systemic fentanyl is partially decreased by cordycepin (a protein translation inhibitor) or the combination of Src and mitogen activated protein kinase inhibitors. Those adaptations are held in weakly isolectin B4-positive and isolectin B4negative nociceptors, since the increase in sensitizing effect of low doses of PGE₂ (another key characteristic of priming) was observed in those neurons (Khomula et al., 2021). Finally, local or systemic administration of PZM21 and TRV130 (two MOR biased agonists) induces a marked prolonged PGE₂ hyperalgesia that is reversed neither by protein translation inhibitors nor by Src and MAPK inhibitors, so that other mechanisms might be responsible for the maintenance of this priming (Araldi et al., 2018a). Altogether, those observations show that the division between type I (reversed by protein translation inhibitors and dependent on isolectin B4-positive nociceptors) and type II priming (reversed by Src and MAPK inhibitors

and occurring in isolectin B4-negtive nociceptors) induced by opioids is not straightforward and seems to depend on MOR agonists and the administration mode used. However, hyperalgesic priming type II initiation requires MOR activation since knocking down this receptor with antisense oligodeoxynucleotides prevents it, a statement that seems consistent across those different models (Araldi et al., 2018b, 2018a, 2018c).

From a behavioral point of view, latent pain sensitization and hyperalgesic priming share some features. Both express as a long-lasting exacerbation in duration and/or magnitude of hyperalgesia in response to a subthreshold stimulus due to a primary insult or a stress. If latent pain sensitization comprises mainly mechanisms of central origin (pre- and post-synaptic neurons in the dorsal horn), hyperalgesic priming I is restricted to nociceptors peripheral endings and so far mechanisms underlying those models are quite different (Marvizón et al., 2015). However, hyperalgesic priming type II can also occur at primary fibers central terminals (Araldi et al., 2017), so that the relationship between this primed state and latent pain sensitization remains unclear. Levine and collaborators (Araldi et al., 2017) argue that latent pain sensitization is a form of hyperalgesic priming type II, since both are initiated by MOR activation (Araldi et al., 2018c; Célèrier et al., 2001) and reversed by the combination of Src and MAPK inhibitors (Araldi et al., 2017), so that they seem to involve similar intracellular signaling pathways. However, those observations were only made in CFAsensitized animals and need to be extended to other models of latent pain sensitization. They also show that intradermal repeated DAMGO administrations, a model of hyperalgesic priming type II, also elicits latent pain sensitization as evidenced by naloxone-induced hyperalgesia (Araldi et al., 2017). Thus, those processes might partly overlap so that future studies should evaluate the presence of latent pain sensitization in models of hyperalgesic priming and vice versa to address this question. An interesting hypothesis is that these processes could represent successive steps toward pain chronification, where hyperalgesic priming (type I and perhaps type II) first sensitizes primary fibers and spreads to the spinal cord dorsal horn neurons (latent pain sensitization), to silently contribute and maintain the hyperalgesic state.

7 Non neuronal mechanisms of latent pain sensitization

It is now acknowledged that glia, in addition to neurons, contributes to pathophysiological mechanisms of chronic pain. Recent studies have also shown the role of glial cells in latent pain sensitization. It has been reported that both microglia and astrocytes are activated in the spinal cord and the dorsal root ganglia during the hyperalgesic phase, but only astrocytes can

be reactivated by naloxone administration (Romero et al., 2013). Thus, activated microglia contribute to early stages of latent pain sensitization development and activated astrocytes contribute to its maintenance. In agreement with these results, preventive (but not curative) blockade of microglial activation blocks latent pain sensitization while simultaneous blockade of both microglia and astrocytes reverses it in a model of non-specific low back pain (Zhang et al., 2017). Another study suggests that the preventive effects of ketamine and gabapentin treatment in latent pain sensitization could be partially mediated through activation of astrocytes following postoperative pain (Romero-Alejo et al., 2016b). In the same model, tramadol partially prevents naloxone induced-hyperalgesia without preventing astrocyte reactivation (Romero-Alejo et al., 2016a), suggesting that blockade of latent pain sensitization does not involve activated astrocytes. Consequently, their participation does not seem mandatory for latent pain sensitization maintenance. Interestingly, astrocytes are reactivated by both (-) naloxone (binds to neuronal opioid receptors and Toll Like Receptor 4 (TLR4)) and (+) naloxone (binds to TLR4 only), indicating that activated astrocytes contribution to latent pain sensitization is mediated indirectly by TLR4 (Romero et al., 2013). More investigations are needed to characterize the molecular mechanisms driving astrocytes activation and how they interact with neurons.

8 Other relevant factors in the establishment of latent pain sensitization

8.1 Genetic factors

8.1.1 Strain and species

As mentioned before, long-term pain vulnerability is a common phenomenon found in mouse, rats and humans (Pereira et al., 2015a). If it was evidenced in different mouse strains including Swiss CD1 (Cabañero et al., 2009) and C57Bl6 mice (Corder et al., 2013), rats' studies were only performed with Sprague-Dawley rats. Indeed, a study compared latent pain sensitization development in various strains of rats and reported that Fischer rats do not show long-term pain hypersensitivity since they do not develop opioid-induced hyperalgesia (Laboureyras et al., 2014). Although establishment of latent pain sensitization in Fisher rats was not investigated in chronic pain models, these data most likely reflect variability in behavioral signs of pain between strains that are already known in acute pain (Larivière et al., 2001). Consequently, latent pain sensitization could be a useful model that recapitulates both genetic background and individual histories that might contribute to the disparity in developing chronic pain in humans.

8.1.2 Sex

Most of the studies mentioned above were performed on male rodents but latent pain sensitization has also been demonstrated in females (Corder et al., 2013; Custodio-Patsey et al., 2020; Severino et al., 2018). From a behavioral point of view, latent pain sensitization occurs similarly in both sexes, but mechanisms underlying this process are slightly different. In males, tonic inhibition of pain is sustained by MOR localized in primary afferents whereas in females spinal or supraspinal MOR might contribute too, as attested by the weak naltrexone induced hyperalgesia in female mice depleted for MOR in primary nociceptors (Severino et al., 2018). Besides, blockade of KOR with LY2456302 slightly enhanced the hyperalgesic state and the number of pERK+ neurons in the dorsal horn of females compared to males (Custodio-Patsey et al., 2020), pointing out a more pronounced KOR-sustained suppression of hyperalgesia in females. Sex is then an important factor in the neuroadaptive processes leading to latent pain sensitization, at least concerning opioid receptors. Consequently, the question of sex differences for the other anti-nociceptive receptors (such as DOR, α_{2A} , NPY and CRF receptor) arises and further studies should be performed on both sexes to systematically assess those differences.

8.2 Environmental factors

Chronic pain disorders are sensitive to external factors. Notably, stressful events play a role in the pathophysiology of pain. Similarly, stress seems to enhance long-lasting pain vulnerability. In fentanyl-carrageenan treated rats, the length of the hyperalgesic phase increases with the number of stress sessions (Le Roy et al., 2011). Thus, latent pain sensitization could be considered as a model of chronic pain that integrates prior life events. Importantly, this process is also impacted by diet, as polyamine deficient food (aiming to negatively modulate NMDA receptors) can oppose to the development of latent pain sensitization in carrageenan/fentanyl and incision/fentanyl rats (Rivat et al., 2008).

9 Conclusion

Pain resolution is not a mere return to the basal state but is associated with the progressive and compensatory activation of opioid, α_{2A} , NPY, CRF and cannabinoid receptors. They exert a sustained repression of the hyperalgesia mediated by the NMDA-AC1 pathway, AMPA and NK1 receptors. Pain silently persists but is restricted within a state of apparent remission. Those adaptations, first aiming to protect from acute pain, paradoxically lead to a long-term vulnerability to "relapse" following anti-nociceptive systems disruption. Interestingly, pain episodes can also be triggered by acute stress, similarly to chronic pain disorders in humans. Latent pain sensitization is then both a model and a hypothesis for pain chronification and further studies are needed to determine more precisely its underlying molecular mechanisms. This would provide new insights on therapeutic strategies design by identifying new targets. Notably, further chronic pain treatment developed should display not only analgesic but also anti-hyperalgesic properties that could prevent the transition from acute to chronic pain such as ZH853 (Feehan and Zadina, 2019) or nefopam (Laboureyras et al., 2009).

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS and Université de Strasbourg. It has been published within the LABEX Medalis/Institut du Médicament de Strasbourg and received financial support from the French government managed by "Agence National de la Recherche" under "Programme d'investissement d'avenir" (ANR-10-LABX-0034 and ANR-17-EURE-0022, EURIDOL graduate school of pain).

The present manuscript has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere.

Figure 1







Figure legends

Figure 1. Pro-nociceptive and anti-nociceptive systems balance hypothesis. A. At the basal state, called homeostasia, anti- and pro-nociceptive systems are balanced and poorly activated. B. Inflammation, nerve injury or repeated administrations of opioids stimulate pro-nociceptive systems that promotes hypersensitivity to pain or hyperalgesia. C. Endogenous anti-nociceptive systems (including opioid system) activate to compensate pro-nociceptive systems activity, which results in a progressive return to basal nociceptive systems are now highly actived but at the equilibrium, this state is referred as latent pain sensitization. D. Once this new equilibrium is disrupted by a stress or with antagonists of antinociceptive systems. This highlights the abnormal and sustained activation of pronociceptive systems underlying latent pain sensitization. *Adapted from Célérier et al., 2001.*

Figure 2. Receptors and signaling pathways involved in latent pain sensitization. In nociceptor central terminals (middle panel), Adenylate Cyclase type 1 (AC1) can be activated by NMDA receptors or repressed by G-protein coupled receptors. Mu Opioid Receptor (MOR) activation by endogenous opioids (or Y1 receptor activation by NPY) decreases substance P (or neurotransmitter) release via an inhibition of AC1-cAMP-Protein Kinase A (PKA) signaling pathway. Thus, the nociceptive signal is attenuated. In post-synaptic neurons (lower panel), AC1 is also a key element of latent pain sensitization. Y1 receptor and MOR (ligand-dependent or -independent manner) activation dampen neuronal excitability via a decrease in cAMP. Elements downstream cAMP and the origin of NPY in the synaptic cleft remain to be determined. Both pre-synaptic and post-synaptic actions lead to a decrease in nociceptive signal transmission, then contribute to mask the hyperalgesic state and make it "latent" (latent pain sensitization).

10 References

Abe, T., Matsumura, S., Katano, T., Mabuchi, T., Takagi, K., Xu, L., Yamamoto, A., Hattori, K., Yagi, T., Watanabe, M., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Mishina, M., Nakai, Y., & Ito, S. (2005). Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain. *European Journal of Neuroscience*, *22*(6), 1445-1454.

Aley, K. O., & Levine, J. D. (1999). Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *Journal of Neuroscience*, 19(6), 2181-2186.

Aley, K. O., Messing, R. O., Mochly-Rosen, D., & Levine, J. D. (2000). Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the ε isozyme of protein kinase C. *Journal of Neuroscience*, 20(12), 4680-4685.

Angst, M. S., & Clark, J. D. (2006). Opioid-induced hyperalgesia : A qualitative systematic review. *Acute Pain*, 104(3), 570-587.

Appel, C. K., Gallego-Pedersen, S., Andersen, L., Blancheflor Kristensen, S., Ding, M., Falk, S., Sayilekshmy, M., Gabel-Jensen, C., & Heegaard, A. M. (2017). The Src family kinase inhibitor dasatinib delays pain-related behaviour and conserves bone in a rat model of cancer-induced bone pain. *Scientific Reports*, 7(1), 1-14.

Araldi, D., Ferrari, L. F., & Levine, J. D. (2015). Repeated mu-opioid exposure induces a novel form of the hyperalgesic priming model for transition to chronic pain. *Journal of Neuroscience*, *35*(36), 12502-12517.

Araldi, D., Ferrari, L. F., & Levine, J. D. (2016a). Adenosine-A1 receptor agonist induced hyperalgesic priming type II. *Pain*, *157*(3), 698-709.

Araldi, D., Ferrari, L. F., & Levine, J. D. (2016b). Gi-Protein Coupled 5-HT1B/D Receptor Agonist Sumatriptan Induces Type I Hyperalgesic Priming. *Pain*, *157*(8), 1773-1782.

Araldi, D., Ferrari, L. F., & Levine, J. D. (2017). Hyperalgesic priming (type II) induced by repeated opioid exposure : Maintenance mechanisms. *Pain*, *158*(7), 1204-1216.

Araldi, D., Ferrari, L. F., & Levine, J. D. (2018a). Mu-Opioid Receptor (MOR) Biased Agonists Induce Biphasic Dose-dependent Hyperalgesia and Analgesia, and Hyperalgesic Priming in the Rat. *Neuroscience*, *394*, 60-71.

Araldi, D., Ferrari, L. F., & Levine, J. D. (2018b). Role of GPCR (mu-opioid)-receptor tyrosine kinase (epidermal growth factor) crosstalk in opioid-induced hyperalgesic priming (type II). *Pain*, *159*(5), 864-875.

Araldi, D., Khomula, E. V., Ferrari, L. F., & Levine, J. D. (2018c). Fentanyl induces rapid onset hyperalgesic priming : Type I at peripheral and type II at central nociceptor terminals. *Journal of Neuroscience*, *38*(9), 2226-2245.

Asiedu, M. N., Tillu, D. V., Melemedjian, O. K., Shy, A., Sanoja, R., Bodell, B., Ghosh, S., Porreca, F., & Price, T. J. (2011). Spinal protein kinase M £ underlies the maintenance mechanism of persistent nociceptive sensitization. *Journal of Neuroscience*, *31*(18), 6646-6653.

Baron, E. P. (2015). Comprehensive review of medicinal marijuana, cannabinoids, and therapeutic implications in medicine and headache: What a long strange trip it's been ... *Headache*, *55*(6), 885-916.

Besse, D., Lombard, M. C., Zajac, J. M., Roques, B. P., & Besson, J. M. (1990). Pre- and postsynaptic distribution of μ , δ and κ opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Research*, *521*(1-2), 15-22.

Bessière, B., Laboureyras, E., Laulin, J. P., & Simonnet, G. (2010). Xenon prevents inflammation-induced delayed pain hypersensitivity in rats. *NeuroReport*, 21(18), 1167-1171.

Bessière, B., Richebé, P., Laboureyras, E., Laulin, J. P., Contarino, A., & Simonnet, G. (2007). Nitrous oxide (N2O) prevents latent pain sensitization and long-term anxiety-like behavior in pain and opioid-experienced rats. *Neuropharmacology*, *53*(6), 733-740.

Bogen, O., Alessandri-Haber, N., Chu, C., Gear, R. W., & Levine, J. D. (2012). Generation of a pain memory in the primary afferent nociceptor triggered by PKCɛ activation of CPEB. *Journal of Neuroscience*, *32*(6), 2018-2026.

Bonnica, J. (1953). The management of pain. Philadelphia: Lea & Febiger.

Brumovsky, P., Stanic, D., Shuster, S., Herzog, H., Villar, M., & Hökfelt, T. (2005). Neuropeptide Y2 receptor protein is present in peptidergic and nonpeptidergic primary sensory neurons of the mouse. *Journal of Comparative Neurology*, *489*(3), 328-348.

Busserolles, J., Lolignier, S., Kerckhove, N., Bertin, C., Authier, N., & Eschalier, A. (2020). Replacement of current opioid drugs focusing on MOR-related strategies. *Pharmacology and Therapeutics*, *210*, 107519.

Cabañero, D., Baker, A., Zhou, S., Hargett, G. L., Irie, T., Xia, Y., Beaudry, H., Gendron, L., Melyan, Z., Carlton, S. M., & Morón, J. A. (2013). Pain after discontinuation of morphine treatment is associated with synaptic increase of GluA4-containing AMPAR in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuropsychopharmacology*, *38*(8), 1472-1484.

Cabañero, D., Campillo, A., Célérier, E., Romero, A., & Puig, M. M. (2009). Pronociceptive effects of remifentanil in a mouse model of postsurgical pain : Effect of a second surgery. *Anesthesiology*, *111*(6), 1334-1345.

Campillo, A., Cabañero, D., Romero, A., García-Nogales, P., & Puig, M. M. (2011). Delayed postoperative latent pain sensitization revealed by the systemic administration of opioid antagonists in mice. *European Journal of Pharmacology*, *657*(1-3), 89-96.

Célèrier, E., Laulin, J. P., Corcuff, J. B., Le Moal, M., & Simonnet, G. (2001). Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: A sensitization process. *Journal of Neuroscience*, *21*(11), 4074-4080.

Célèrier, E., Laulin, J. P., Larcher, A., Le Moal, M., & Simonnet, G. (1999). Evidence for opiate-activated NMDA processes masking opiate analgesia in rats. *Brain Research*, 847(1), 18-25.

Célèrier, E., Rivat, C., Jun, Y., Laulin, J. P., Larcher, A., Reynier, P., & Simonnet, G. (2000). Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: Preventive effect of ketamine. *Anesthesiology*, *92*(2), 465-472.

Chen, S. R., Zhou, H. Y., Byun, H. S., & Pan, H. L. (2013). Nerve injury increases GluA2lacking AMPA receptor prevalence in spinal cords : Functional significance and signaling mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *347*(3), 765-772. Chen, W., Ennes, H. S., McRoberts, J. A., & Marvizón, J. C. (2018a). Mechanisms of μ -opioid receptor inhibition of NMDA receptor-induced substance P release in the rat spinal cord. *Neuropharmacology*, *128*, 255-268.

Chen, W., & Marvizón, J. C. (2020a). A Src family kinase maintains latent sensitization in rats, a model of inflammatory and neuropathic pain. *Brain Research*, *1746*, 146999.

Chen, W., & Marvizón, J. C. (2020b). Neurokinin 1 receptor activation in the rat spinal cord maintains latent sensitization, a model of inflammatory and neuropathic chronic pain. *Neuropharmacology*, *177*, 108253.

Chen, W., Taché, Y., & Marvizón, J. C. (2018b). Corticotropin-Releasing Factor in the Brain and Blocking Spinal Descending Signals Induce Hyperalgesia in the Latent Sensitization Model of Chronic Pain. *Neuroscience*, *381*, 149-158.

Chen, W., Zhang, G., & Marvizón, J. C. (2010). NMDA receptors in primary afferents require phosphorylation by Src family kinases to induce substance P release in the rat spinal cord. *Neuroscience*, *166*(3), 924-934.

Chou, R., Turner, J. A., Devine, E. B., Hansen, R. N., Sullivan, S. D., Blazina, I., Dana, T., Bougatsos, C., & Deyo, R. A. (2015). The Effectiveness and Risks of Long-Term Opioid Therapy for Chronic Pain : A Systematic Review for a National Institutes of Health Pathways to Prevention Workshop. *Annals of Internal Medicine*, *162*(4), 276-286.

Corder, G., Doolen, S., Donahue, R. R., Winter, M. K., Jutras, B. L., He, Y., Hu, X., Wieskopf, J. S., Mogil, J. S., Storm, D. R., Wang, Z. J., McCarson, K. E., & Taylor, B. K. (2013). Constitutive μ -opioid receptor activity leads to long-term endogenous analgesia and dependence. *Science*, *341*(6152), 1394-1399.

Custodio-Patsey, L., Donahue, R. R., Fu, W., Lambert, J., Smith, B. N., & Taylor, B. K. (2020). Sex differences in kappa opioid receptor inhibition of latent postoperative pain sensitization in dorsal horn. *Neuropharmacology*, *163*, 107726.

Dina, O. A., Green, P. G., & Levine, J. D. (2008). Role of interleukin-6 in chronic muscle hyperalgesic priming. *Neuroscience*, *152*(2), 521-525.

Dina, O. A., Khasar, S. G., Gear, R. W., & Levine, J. D. (2009). Activation of Gi induces mechanical hyperalgesia poststress or inflammation. *Neuroscience*, *160*(2), 501-507.

Emery, P. C., Wilson, K. G., & Kowal, J. (2014). Major depressive disorder and sleep disturbance in patients with chronic pain. *Pain Research and Management*, 19(1), 35-41.

Eriksen, J., Sjøgren, P., Bruera, E., Ekholm, O., & Rasmussen, N. K. (2006). Critical issues on opioids in chronic non-cancer pain: An epidemiological study. *Pain*, *125*(1-2), 172-179.

Feehan, A. K., & Zadina, J. E. (2019). Morphine immunomodulation prolongs inflammatory and postoperative pain while the novel analgesic ZH853 accelerates recovery and protects against latent sensitization. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1), 1-20.

Ferrari, L. F., Araldi, D., Bogen, O., Green, P. G., & Levine, J. D. (2019). Systemic Morphine Produces Dose-dependent Nociceptor-mediated Biphasic Changes in Nociceptive Threshold and Neuroplasticity. *Neuroscience*, *398*, 64-75.

Ferrari, L. F., Bogen, O., Chu, C., & Levine, J. D. (2013a). Peripheral administration of translation inhibitors reverses increased hyperalgesia in a model of chronic pain in the rat. *Journal of Pain*, *14*(7), 731-738.

Ferrari, L. F., Bogen, O., & Levine, J. D. (2010). Nociceptor Subpopulations Involved in Hyperalgesic Priming. *Neuroscience*, *165*(3), 896-901.

Ferrari, L. F., Bogen, O., & Levine, J. D. (2013b). Role of nociceptor α CaMKII in transition from acute to chronic pain (hyperalgesic priming) in male and female rats. *Journal of Neuroscience*, 33(27), 11002-11011.

Fu, W., Nelson, T. S., Santos, D. F., Doolen, S., Gutierrez, J. J. P., Ye, N., Zhou, J., & K Taylor, B. (2019). An NPY Y1 receptor antagonist unmasks latent sensitization and reveals the contribution of protein kinase A and Epac to chronic inflammatory pain. *Pain*, *160*(8), 1754-1765.

Fu, W., Wessel, C. R., & Taylor, B. K. (2020). Neuropeptide Y tonically inhibits an NMDAR \rightarrow AC1 \rightarrow TRPA1/TRPV1 mechanism of the affective dimension of chronic neuropathic pain. *Neuropeptides*, 80, 102024.

Fu, Y., & Neugebauer, V. (2008). Differential mechanisms of CRF1 and CRF2 receptor functions in the amygdala in pain-related synaptic facilitation and behavior. *Journal of Neuroscience*, 28(15), 3861-3876.

Gibson, S. J., Polak, J. M., Allen, J. M., Adrian, T. E., Kelly, J. S., & Bloom, S. R. (1984). The distribution and origin of a novel brain peptide, neuropeptide Y, in the spinal cord of several mammals. *Journal of Comparative Neurology*, 227(1), 78-91.

Guan, Y., Yuan, F., Carteret, A. F., & Raja, S. N. (2010). A partial L5 spinal nerve ligation induces a limited prolongation of mechanical allodynia in rats : An efficient model for studying mechanisms of neuropathic pain. *Neuroscience Letters*, 471(1), 43-47.

Guo, W., Zou, S., Guan, Y., Ikeda, T., Tal, M., Dubner, R., & Ren, K. (2002). Tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord during the development and maintenance of inflammatory hyperalgesia. *Journal of Neuroscience*, 22(14), 6208-6217.

Hildebrand, M. E., Xu, J., Dedek, A., Li, Y., Sengar, A. S., Beggs, S., Lombroso, P. J., & Salter, M. W. (2016). Potentiation of Synaptic GluN2B NMDAR Currents by Fyn Kinase Is Gated through BDNF-Mediated Disinhibition in Spinal Pain Processing. *Cell Reports*, *17*(10), 2753-2765.

Hucho, T. B., Dina, O. A., & Levine, J. D. (2005). Epac mediates a cAMP-to-PKC signaling in inflammatory pain: An isolectin B4(+) neuron-specific mechanism. *Journal of Neuroscience*, 25(26), 6119-6126.

Hylands-White, N., Duarte, R. V., & Raphael, J. H. (2017). An overview of treatment approaches for chronic pain management. *Rheumatology International*, *37*(1), 29-42.

Intondi, A. B., Dahlgren, M. N., Eilers, M. A., & Taylor, B. K. (2008). Intrathecal neuropeptide Y reduces behavioral and molecular markers of inflammatory or neuropathic pain. *Pain*, *137*(2), 352-365.

Intondi, A. B., Zadina, J. E., Zhang, X., & Taylor, B. K. (2010). Topography and time course of changes in spinal neuropeptide Y immunoreactivity after spared nerve injury. *Neuroscience*, *165*(3), 914-922.

Jackson, T., Thomas, S., Stabile, V., Shotwell, M., Han, X., & McQueen, K. (2016). A Systematic Review and Meta-Analysis of the Global Burden of Chronic Pain Without Clear

Etiology in Low- and Middle-Income Countries : Trends in Heterogeneous Data and a Proposal for New Assessment Methods. *Anesthesia and Analgesia*, 123(3), 739-748.

Ji, G., & Neugebauer, V. (2008). Pro- and anti-nociceptive effects of Corticotropin-Releasing Factor (CRF) in central amygdala neurons are mediated through different receptors. *Journal of Neurophysiology*, *99*(3), 1201-1212.

Joseph, E. K., Bogen, O., Alessandri-Haber, N., & Levine, J. D. (2007). PLC- β 3 signals upstream of PKC ϵ in acute and chronic inflammatory hyperalgesia. *Pain*, 132(1-2), 67-73.

Joseph, E. K., & Levine, J. D. (2010). Hyperalgesic priming is restricted to isolectin B4-positive nociceptors. *Neuroscience*, *169*(1), 431-435.

Joseph, E. K., Parada, C. A., & Levine, J. D. (2003). Hyperalgesic priming in the rat demonstrates marked sexual dimorphism. *Pain*, *105*(1-2), 143-150.

Joseph, E. K., Reichling, D. B., & Levine, J. D. (2010). Shared mechanisms for opioid tolerance and a transition to chronic pain. *Journal of Neuroscience*, *30*(13), 4660-4666.

Kandasamy, R., & Price, T. J. (2015). The pharmacology of nociceptor priming. *Handbook* of *Experimental Pharmacology*, 227, 15-37.

Khasar, S. G., Burkham, J., Dina, O. A., Brown, A. S., Bogen, O., Alessandri-Haber, N., Green, P. G., Reichling, D. B., & Levine, J. D. (2008). Stress induces a switch of intracellular signaling in sensory neurons in a model of generalized pain. *Journal of Neuroscience*, *28*(22), 5721-5730.

Khomula, E. V., Araldi, D., Bonet, I. J., & Levine, J. D. (2021). Opioid-Induced Hyperalgesic Priming in Single Nociceptors. *The Journal of Neuroscience*, *41*(1), 31-46.

Kim, D. H., Fields, H. L., & Barbaro, N. M. (1990). Morphine analgesia and acute physical dependence : Rapid onset of two opposing, dose-related processes. *Brain Research*, *516*(1), 37-40.

Kohno, T., Kumamoto, E., Higashi, H., Shimoji, K., & Yoshimura, M. (1999). Actions of opioids on excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord. *Journal of Physiology*, *518*(3), 803-813.

Kopp, J., Xu, Z. Q., Zhang, X., Pedrazzini, T., Herzog, H., Kresse, A., Wong, H., Walsh, J. H., & Hökfelt, T. (2002). Expression of the neuropeptide Y Y1 receptor in the CNS of rat and of wild-type and Y1 receptor knock-out mice. Focus on immunohistochemical localization. *Neuroscience*, *111*(3), 443-532.

Kopruszinski, C. M., Navratilova, E., Vagnerova, B., Swiokla, J., Patwardhan, A., Dodick, D., & Porreca, F. (2020). Cannabinoids induce latent sensitization in a preclinical model of medication overuse headache. *Cephalalgia*, 40(1), 68-78.

Laboureyras, E., Aubrun, F., Monsaingeon, M., Corcuff, J. B., Laulin, J. P., & Simonnet, G. (2014). Exogenous and endogenous opioid-induced pain hypersensitivity in different rat strains. *Pain Research and Management*, *19*(4), 191-197.

Laboureyras, E., Chateauraynaud, J., Richebé, P., & Simonnet, G. (2009). Long-term pain vulnerability after surgery in rats : Prevention by nefopam, an analgesic with antihyperalgesic properties. *Anesthesia and Analgesia*, *109*(2), 623-631.

Lai, C. Y., Lin, T. B., Hsieh, M. C., Chen, G. D., & Peng, H. Y. (2016). SIRPa1-SHP2 Interaction Regulates Complete Freund Adjuvant-Induced Inflammatory Pain via Src-Dependent GluN2B Phosphorylation in Rats. *Anesthesia and Analgesia*, *122*(3), 871-881.

Larcher, A., Laulin, J. P., Celerier, E., Le Moal, M., & Simonnet, G. (1998). Acute tolerance associated with a single opiate administration: Involvement of N-methyl-D-aspartate-dependent pain facilitatory systems. *Neuroscience*, *84*(2), 583-589.

Larivière, W. R., Chesler, E. J., & Mogil, J. S. (2001). Transgenic Studies of Pain and Analgesia: Mutation or Background Genotype? *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 297(2), 467-473.

Latremoliere, A., & Woolf, C. J. (2009). Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *Journal of Pain*, *10*(9), 895-926.

Laulin, J. P., Larcher, A., Célèrier, E., Le Moal, M., & Simonnet, G. (1998). Long-lasting increased pain sensitivity in rat following exposure to heroin for the first time. *European Journal of Neuroscience*, *10*(2), 782-785.

Laulin, J. P., Maurette, P., Corcuff, J. B., Rivat, C., Chauvin, M., & Simonnet, G. (2002). The role of ketamine in preventing fentanyl-induced hyperalgesia and subsequent acute morphine tolerance. *Anesthesia and Analgesia*, *94*(5), 1263-1269.

Le Roy, C., Laboureyras, E., Gavello-Baudy, S., Chateauraynaud, J., Laulin, J. P., & Simonnet, G. (2011). Endogenous opioids released during non-nociceptive environmental stress induce latent pain sensitization via a NMDA-dependent process. *Journal of Pain*, *12*(10), 1069-1079.

Lian, B., Vera-Portocarrero, L., King, T., Ossipov, M. H., & Porreca, F. (2010). Opioidinduced latent sensitization in a model of non-inflammatory viscerosomatic hypersensitivity. *Brain Research*, *1358*, 64-70.

Loeser, J. D., & Treede, R. D. (2008). The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, *137*(3), 473-477.

Mansour, A., Fox, C. A., Akil, H., & Watson, S. J. (1995). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends in Neurosciences*, 18(1), 22-29.

Marvizón, J. C., Martínez, V., Grady, E. F., Bunnett, N. W., & Mayer, E. A. (1997). Neurokinin 1 receptor internalization in spinal cord slices induced by dorsal root stimulation is mediated by NMDA receptors. *Journal of Neuroscience*, *17*(21), 8129-8136.

Marvizón, J. C., Walwyn, W., Minasyan, A., Chen, W., & Taylor, B. K. (2015). Latent sensitization : A model for stress-sensitive chronic pain. *Current Protocols in Neuroscience*, 71, 9.50.1-9.50.15.

Mattson, C. L., Tanz, L. J., Quinn, K., Mbabazi, K., Patel, P., & Davis, N. L. (2021). Trends and Geographic Patterns in Drug and Synthetic Opioid Overdose Deaths—United States, 2013-2019. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *70*(6), 202-206.

McNally, G. P. (1999). Pain facilitatory circuits in the mammalian central nervous system : Their behavioral significance and role in morphine analgesic tolerance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23(8), 1059-1078.

Melemedjian, O. K., Asiedu, M. N., Tillu, D. V., Peebles, K. A., Yan, J., Ertz, N., Dussor, G. O., & Price, T. J. (2010). IL-6- and NGF-induced rapid control of protein synthesis and nociceptive plasticity via convergent signaling to the eIF4F complex. *Journal of Neuroscience*, *30*(45), 15113-15123.

Melemedjian, O. K., Asiedu, M. N., Tillu, D. V., Sanoja, R., Yan, J., Lark, A., Khoutorsky, A., Johnson, J., Peebles, K. A., Lepow, T., Sonenberg, N., Dussor, G., & Price, T. J. (2011). Targeting adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in preclinical models reveals a potential mechanism for the treatment of neuropathic pain. *Molecular Pain*, *7*, 70.

Melemedjian, O. K., Tillu, D. V., Moy, J. K., Asiedu, M. N., Mandell, E. K., Ghosh, S., Dussor, G., & Price, T. J. (2014). Local translation and retrograde axonal transport of CREB regulates IL-6-induced nociceptive plasticity. *Molecular Pain*, *10*, 45.

Meye, F. J., van Zessen, R., Smidt, M. P., Adan, R. A. H., & Ramakers, G. M. (2012). Morphine withdrawal enhances constitutive μ -opioid receptor activity in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, *32*(46), 16120-16128.

Moy, J. K., Khoutorsky, A., Asiedu, M. N., Black, B. J., Kuhn, J. L., Barragán-Iglesias, P., Megat, S., Burton, M. D., Burgos-Vega, C. C., Melemedjian, O. K., Boitano, S., Vagner, J., Gkogkas, C. G., Pancrazio, J. J., Mogil, J. S., Dussor, G., Sonenberg, N., & Price, T. J. (2017). The MNK–eIF4E signaling axis contributes to injury-induced nociceptive plasticity and the development of chronic pain. *Journal of Neuroscience*, *37*(31), 7481-7499.

Moy, J. K., Kuhn, J. L., Szabo-Pardi, T. A., Pradhan, G., & Price, T. J. (2018). EIF4E phosphorylation regulates ongoing pain, independently of inflammation, and hyperalgesic priming in the mouse CFA model. *Neurobiology of Pain*, *4*, 45-50.

Parada, C. A., Reichling, D. B., & Levine, J. D. (2005). Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKCε second messenger pathways. *Pain*, *113*(1-2), 185-190.

Parada, C. A., Yeh, J. J., Joseph, E. K., & Levine, J. D. (2003a). Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. *European Journal of Neuroscience*, *17*(9), 1847-1852.

Parada, C. A., Yeh, J. J., Reichling, D. B., & Levine, J. D. (2003b). Transient attenuation of protein kinase C ϵ can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat. *Neuroscience*, *120*(1), 219-226.

Pereira, M. P., Donahue, R. R., Dahl, J. B., Werner, M., Taylor, B. K., & Werner, M. U. (2015a). Endogenous opioid-masked latent pain sensitization : Studies from mouse to human. *PLoS one*, *10*(8), e0134441.

Pereira, M. P., Werner, M. U., & Dahl, J. B. (2015b). Effect of a high-dose target-controlled naloxone infusion on pain and hyperalgesia in patients following groin hernia repair : Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, *16*, 511.

Pertovaara, A. (2006). Noradrenergic pain modulation. *Progress in Neurobiology*, 80(2), 53-83.

Reichling, D. B., & Levine, J. D. (2009). Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. *Trends in Neurosciences*, *32*(12), 611-618.

Richebé, P., Rivat, C., Laulin, J. P., Maurette, P., & Simonnet, G. (2005). Ketamine improves the management of exaggerated postoperative pain observed in perioperative fentanyl-treated rats. *Anesthesiology*, *102*(2), 421-428.

Rivat, C., Laboureyras, E., Laulin, J. P., Le Roy, C., Richebé, P., & Simonnet, G. (2007). Non-Nociceptive Environmental Stress Induces Hyperalgesia, Not Analgesia, in Pain and Opioid-Experienced Rats. *Neuropsychopharmacology*, *32*(10), 2217-2228.

Rivat, C., Laulin, J. P., Corcuff, J. B., Célèrier, E., Pain, L., & Simonnet, G. (2002). Fentanyl enhancement of carrageenan-induced long-lasting hyperalgesia in rats : Prevention by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist ketamine. *Anesthesiology*, *96*(2), 381-391.

Rivat, C., Richebé, P., Laboureyras, E., Laulin, J. P., Havouis, R., Noble, F., Moulinoux, J. P., & Simonnet, G. (2008). Polyamine deficient diet to relieve pain hypersensitivity. *Pain*, *137*(1), 125-137.

Roeckel, L. A., Utard, V., Reiss, D., Mouheiche, J., Maurin, H., Robé, A., Audouard, E., Wood, J. N., Goumon, Y., Simonin, F., & Gaveriaux-Ruff, C. (2017). Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. *Scientific Reports*, 7(1), 10406.

Romero, A., García-Carmona, J. A., Laorden, M. L., & Puig, M. M. (2017). Role of CRF1 receptor in post-incisional plasma extravasation and nociceptive responses in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *332*, 121-128.

Romero, A., Rojas, S., Cabañero, D., Gispert, J. D., Herance, J. R., Campillo, A., & Puig, M. M. (2011). A 18F-fluorodeoxyglucose MicroPET imaging study to assess changes in brain glucose metabolism in a rat model of surgery-induced latent pain sensitization. *Anesthesiology*, *115*(5), 1072-1083.

Romero, A., Romero-Alejo, E., Vasconcelos, N., & Puig, M. M. (2013). Glial cell activation in the spinal cord and dorsal root ganglia induced by surgery in mice. *European Journal of Pharmacology*, 702(1-3), 126-134.

Romero-Alejo, E., Puig, M. M., & Romero, A. (2016a). Antihyperalgesic effects of dexketoprofen and tramadol in a model of postoperative pain in mice – effects on glial cell activation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *68*(8), 1041-1050.

Romero-Alejo, E., Puig, M. M., & Romero, A. (2016b). Inhibition of astrocyte activation is involved in the prevention of postoperative latent pain sensitization by ketamine and gabapentin in mice. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 7(1), 22-24.

Rorick-Kehn, L. M., Witcher, J. W., Lowe, S. L., Gonzales, C. R., Weller, M. A., Bell, R. L., Hart, J. C., Need, A. B., McKinzie, J. H., Statnick, M. A., Suico, J. G., McKinzie, D. L., Tauscher-Wisniewski, S., Mitch, C. H., Stoltz, R. R., & Wong, C. J. (2015). Determining pharmacological selectivity of the kappa opioid receptor antagonist LY2456302 using pupillometry as a translational biomarker in rat and human. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *18*(2), pyu036.

Rorick-Kehn, L. M., Witkin, J. M., Statnick, M. A., Eberle, E. L., McKinzie, J. H., Kahl, S. D., Forster, B. M., Wong, C. J., Li, X., Crile, R. S., Shaw, D. B., Sahr, A. E., Adams, B. L., Quimby, S. J., Diaz, N., Jimenez, A., Pedregal, C., Mitch, C. H., Knopp, K. L., ... McKinzie, D. L. (2013). LY2456302 is a novel, potent, orally-bioavailable small molecule kappa-selective antagonist with activity in animal models predictive of efficacy in mood and addictive disorders. *Neuropharmacology*, *77*, 131-144.

Rothman, R. B. (1992). A review of the role of anti-opioid peptides in morphine tolerance and dependence. *Synapse*, *12*(2), 129-138.

Rouwette, T., Vanelderen, P., Roubos, E. W., Kozicz, T., & Vissers, K. (2012). The amygdala, a relay station for switching on and off pain. *European Journal of Pain*, *16*(6), 782-792.

Severino, A., Chen, W., Hakimian, J. K., Kieffer, B. L., Gaveriaux-Ruff, C., Walwyn, W., & Marvizón, J. C. (2018). Mu-opioid receptors in nociceptive afferents produce a sustained suppression of hyperalgesia in chronic pain. *Pain*, *159*(8), 1607-1620.

Simonnet, G., & Rivat, C. (2003). Opioid-induced hyperalgesia : Abnormal or normal pain? *NeuroReport*, *14*(1), 1-7.

Solway, B., Bose, S. C., Corder, G., Donahue, R. R., & Taylor, B. K. (2011). Tonic inhibition of chronic pain by neuropeptide Y. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(17), 7224-7229.

Springborg, A. D., Jensen, E. K., Kreilgaard, M., Petersen, M. A., Papathanasiou, T., Lund, T. M., Taylor, B. K., & Werner, M. U. (2020). High-dose naloxone : Effects by late administration on pain and hyperalgesia following a human heat injury model. A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial with an enriched enrollment design. *PLoS one*, *15*(11), e0242169.

Springborg, A. D., Jensen, E. K., Taylor, B. K., & Werner, M. U. (2016). Effects of targetcontrolled infusion of high-dose naloxone on pain and hyperalgesia in a human thermal injury model. *Medicine*, *95*(46), e5336.

Stone, L. S., MacMillan, L. B., Kitto, K. F., Limbird, L. E., & Wilcox, G. L. (1997). The $\alpha(2a)$ adrenergic receptor subtype mediates spinal analgesia evoked by $\alpha 2$ agonists and is necessary for spinal adrenergic-opioid synergy. *Journal of Neuroscience*, *17*(18), 7157-7165.

Taylor, B. K., Sinha, G. P., Donahue, R. R., Grachen, C. M., Morón, J. A., & Doolen, S. (2019). Opioid receptors inhibit the spinal AMPA receptor Ca 2+ permeability that mediates latent pain sensitization. *Experimental Neurology*, *314*, 58-66.

Tillu, D. V., Melemedjian, O. K., Asiedu, M. N., Qu, N., De Felice, M., Dussor, G., & Price, T. J. (2012). Resveratrol engages AMPK to attenuate ERK and mTOR signaling in sensory neurons and inhibits incision-induced acute and chronic pain. *Molecular Pain*, *8*(1), 5.

Treede, R.-D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M. I., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N. B., First, M. B., Giamberardino, M. A., Kaasa, S., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S., Smith, B. H., ... Wang, S.-J. (2015). A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain*, *156*(6), 1003-1007.

Wakisaka, S., Kajander, K. C., & Bennett, G. J. (1992). Effects of peripheral nerve injuries and tissue inflammation on the levels of neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat primary afferent neurons. *Brain Research*, *598*(1-2), 349-352.

Walwyn, W. M., Chen, W., Kim, H., Minasyan, A., Ennes, H. S., McRoberts, J. A., & Marvizón, J. C. (2016). Sustained suppression of hyperalgesia during latent sensitization by μ -, δ -, and κ -opioid receptors and α 2a adrenergic receptors: Role of constitutive activity. *Journal of Neuroscience*, *36*(1), 204-221.

Wang, D., Raehal, K. M., Bilsky, E. J., & Sadée, W. (2001). Inverse agonists and neutral antagonists at μ opioid receptor (MOR): Possible role of basal receptor signaling in narcotic dependence. *Journal of Neurochemistry*, 77(6), 1590-1600.

Wang, D., Raehal, K. M., Lin, E. T., Lowery, J. J., Kieffer, B. L., Bilsky, E. J., & Sadée, W. (2004). Basal Signaling Activity of μ Opioid Receptor in Mouse Brain : Role in Narcotic Dependence. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *308*(2), 512-520.

Wigerblad, G., Huie, J. R., Yin, H. Z., Leinders, M., Pritchard, R. A., Koehrn, F. J., Xiao, W. H., Bennett, G. J., Huganir, R. L., Ferguson, A. R., Weiss, J. H., Svensson, C. I., & Sorkin, L. S. (2017). Inflammation-induced GluA1 trafficking and membrane insertion of Ca2 + permeable AMPA receptors in dorsal horn neurons is dependent on spinal tumor necrosis factor, PI3 kinase and protein kinase A. *Experimental Neurology*, 293, 144-158.

Zhang, J., Mense, S., Treede, R. D., & Hoheisel, U. (2017). Prevention and reversal of latent sensitization of dorsal horn neurons by glial blockers in a model of low back pain in male rats. *Journal of Neurophysiology*, *118*(4), 2059-2069.

Depuis la soumission de la revue, des études plus récentes ont également montré l'implication de l'hétérodimère MOR-DOR dans le maintien de la SLD induite par une douleur post-opératoire (incision plantaire) ou neuropathique (administrations répétées de cisplatine). Après résolution de l'hypersensibilité, l'administration d'un peptide qui interfère spécifiquement avec l'hétérodimérisation des récepteurs MOR et DOR (Kabli et al., 2014) précipite la SLD, aussi bien chez les souris mâles que chez les souris femelles et dans les deux modèles de douleur (Inyang et al., 2021). Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la localisation cellulaire de ces hétérodimères et les mécanismes moléculaires par lesquels ils participent au maintien de la SLD.

Par ailleurs, Chen et collaborateurs ont poursuivi la caractérisation de la voie de signalisation intracellulaire en amont de la libération de substance P, laquelle entretient également l'hyperalgésie latente de la SLD (Chen & Marvizon, 2020). Si en conditions basales, l'activation des récepteurs NMDA provoque la libération de substance P via la voie AC - AMPc - PKA et Epac2 dans la ME, ce n'est pas le cas lors de la SLD contrairement à ce qui a été suggéré précédemment et qui est décrit dans la revue. En effet, la forskoline (qui active l'AC) diminue la libération de substance P (mesurée par l'internalisation de NK1R) dans la ME de rat ayant développé de SLD induite par le CFA. Ces données indiquent que l'augmentation de la libération de la substance P chez d'animaux en état de SLD ne serait pas liée à la voie de l'AC – AMPc – PKA (Chen et al., 2021). Bien que cela reste à démontrer, les auteurs suggèrent que cette libération de substance P induite par les récepteurs NMDA serait plutôt associée à une augmentation de la phosphorylation de ces derniers, possiblement par les Src kinases qui contribuent également à persistance de la SLD (Chen & Marvizón, 2020).

1 Généralités

D'autres systèmes récepteur-ligand présentant des propriétés anti-opioïdes, non mentionnés dans la revue ci-dessus, sont les récepteurs à peptides RF-amides. Cette famille de neuropeptides tient son nom du fait qu'ils partagent une séquence Arg-Phe amidée (RF-NH₂) à leur extrémité C-terminale (Espinoza et al., 2000; Walker et al., 2009). Le premier peptide de cette famille à avoir été identifié est le Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRF-NH₂) découvert chez la palourde *Macrocalista nimbosa* en 1977 pour ses propriétés cardioexcitatrices (Price & Greenberg, 1977). En utilisant un anticorps dirigé contre ce peptide, d'autres peptides au motif similaire (*FMRF amide-like peptides* ou peptides RF-amide) ont ensuite été identifiés dans différentes espèces y compris le rat et la souris (Boer et al., 1980; Dockray et al., 1981, 1983; Weber et al., 1981). Ainsi ces neuropeptides sont conservés au cours du règne animal, tant chez les invertébrés que chez les vertébrés. Chez *Caenorhabditis elegans*, il existe plus de 70 formes de peptides RF-amides codés par 31 gènes (Peymen et al., 2014; Walker et al., 2009) et qui sont impliqués dans les fonctions cardiorespiratoire et reproductrice, l'apprentissage, la nutrition et le système sensoriel (Elphick & Mirabeau, 2014; Krajniak, 2013; Nässel & Wegener, 2011; Peymen et al., 2014; Walker et al., 2009).

Ces peptides sont moins représentés chez les vertébrés, notamment chez les mammifères où seuls 5 gènes codent pour les 5 groupes de peptides RF-amides (Findeisen et al., 2011; Fukusumi et al., 2006; Parhar et al., 2012) :

- celui du RF-amide related peptide (RFRP): RFRP-1 (NPSF) et RFRP-3 (NPVF),
- celui du neuropeptide FF (NPFF) : NPFF et NPAF,
- celui du pyroglutamylated RF-amide peptide (QRFP) : QRFP-26 (26Rfa) et QRFP-43 (43Rfa),
- celui du prolactin-releasing peptide (PrRP) : PrRP-31 et PrRP-20,
- celui des kisspeptines : Kp-10, Kp-52 et Kp-54.

Les peptides RF-amides de chaque groupe se lient et activent principalement un récepteur, respectivement : NPFF1R (GPR147), NPFF2R (GPR74), QRFP-R (GPR103), PrRP-R (GPR10) et Kiss1R (GPR54). Ce sont des RCPG qui appartiennent à la famille 1 des rhodopsines. L'analyse phylogénétique de ces récepteurs humains révèle que Kiss1R fait

partie du groupe γ qui rassemble les récepteurs à la somatostatine, à la galanine et aux opioïdes. En accord avec ces observations, la kisspeptine dériverait d'un ancêtre commun avec la galanine et la spexine (Kim et al., 2014). Les quatre autres récepteurs RF-amides font quant à eux partie du groupe β avec de nombreux autres neuropeptides tels que le neuropeptide Y, la cholécystokinine et l'ocytocine (Elphick & Mirabeau, 2014; Fredriksson et al., 2003; Yun et al., 2014).

Peptide	Séquence peptidique
RFRP	RFRP-1 : MPHSFANLPL RF-NH 2
	RFRP-3 : VPNLPQ RF-NH 2
NPFF	NPFF : SQAFLFQPQ <mark>RF-NH</mark> 2
	NPAF : AGEGLNSQFWSLAAPQ RF-NH 2
QRFP	QRFP-43 : EDEGSEATGFLPAAGEKTSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH2
	QRFP-26 : TSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSF <mark>RF-NH</mark> 2
PrRP	PrRP-31 : SRTHRHSMEIRTPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH2
	PrRP-20 : TPDINPAWYASRGIRPVG <mark>RF-NH</mark> 2
Kiss-	Kp-54 : GTSLSPPPESSGSPQQPGLSAPHSRQIPAPQGAVLVQREKDLPNYNWNSFGLRF-NH2
peptine	Kp-10 : YNWNSFGL RF-NH 2

Tableau 2 : Séquence en acides aminés des peptides RF-amides chez l'Homme. L'extrémité Cterminale Arg – Phe amidée (RF-NH₂) conservée est indiquée en rouge. (Ayachi & Simonin, 2014).

D'abord identifiés par immunomarquage dans le cerveau bovin (Yang et al., 1985), le **NPAF** et le **NPFF** ont été mis en évidence dans le plasma et le liquide cérébrospinal humain (Burlet-Schiltz et al., 2002; Sundblom et al., 1995). Ils sont issus de la maturation du prépropeptide pro-NPFF_A (Perry et al., 1997) et activent principalement **NPFF2R** mais aussi NPFF1R dans une moindre mesure (Bonini et al., 2000; Liu et al., 2001; Mollereau et al., 2002; Yoshida et al., 2003). NPFF2R est couplé à la protéine $G_{i/o}$ et diminue la production d'AMPc (Elhabazi et al., 2013; Elshourbagy et al., 2000; Mollereau et al., 2002). Ce récepteur est peu sélectif puisque tous les autres peptides RF-amides sont capables de lier et d'activer NPFF2R (Elhabazi et al., 2013).

Le gène codant pour les peptides **RFRP-1** et **RFRP-3** a été identifié par deux équipes par recherche à partir de bases de données (Hinuma et al., 2000; Liu et al., 2001). Ils sont dérivés du prépropeptide pro-NPFF_B (Schulz et al., 2002) et considérés comme les ligands endogènes de **NPFF1R** mais ils se lient aussi à NPFF2R (Bonini et al., 2000; Liu et al., 2001; Mollereau et al., 2002; Yoshida et al., 2003). RFRP-1 est l'homologue mammifère du GnIH (*Gonadotropin-inhibitory Hormone*) aviaire (Satake et al., 2001). NPFF1R est couplé à la protéine G_{i/o} et diminue la production d'AMPc (Elhabazi et al., 2013; Hinuma et al., 2000;

Liu et al., 2001; Mollereau et al., 2002). Il lie également l'ensemble des peptides RF-amides (Elhabazi et al., 2013).

Le peptide **pyroglutamylated RF-amide** (QRFP) et son récepteur ont été découverts plus récemment chez les mammifères (Chartrel et al., 2003; Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003). QRFP existe sous deux formes issues du même précurseur, QRFP-26 et QRFP-43 (désigné par la suite respectivement 26RFa et 43RFa). Ce dernier est la forme allongée de 26RFa et débute par la séquence pyro-Glu à son extremité N-terminale, d'où son nom (Fukusumi et al., 2003). Le récepteur **QRFP-R** (désigné par la suite GPR103) existe sous une seule forme chez l'Homme mais deux sous-types ont été identifiés chez le rongeur QRFP-R1 (ou GPR103a) et QRFP-R2 (ou GPR103b) et qui partagent environ 80% d'homologie avec le récepteur humain (Kampe et al., 2006; Takayasu et al., 2006). Ce récepteur est couplé à la protéine G_q et provoque une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire (Fukusumi et al., 2006; Takayasu et al., 2006).

Le *prolactin-releasing peptide* tire son nom de son activité libératrice de la prolactine *in vitro* (Hinuma et al., 1998) bien que cette activité n'ait jamais pu être confirmée *in vivo*. PrRP-20 et PrRP-31 sont issus du même précurseur, où PrRP-31 peut-être lui-même clivé en PrRP-20 (Lin, 2008). Ce sont les ligands endogènes de **PrRP-R** (ou GPR10) (Hinuma et al., 1998). PrRP-R est homologue du récepteur au NPY (31%) mais il ne lie pas ce peptide (Marchese et al., 1995). Ce récepteur est couplé à la protéine G_q qui induit l'activation de la PLC et une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire (Hinuma et al., 1998; Langmead et al., 2000; Roland et al., 1999).

Les **kisspeptines** activent le récepteur Kiss1R ou GPR54. Chez l'Homme, le gène Kiss-1 code pour un précurseur long (Kp-54) ou plus court (Kp-10, Kp-13 et Kp-14 ; Kotani et al., 2001). La kisspeptine-54 (Kp-54) est également connue sous le nom de métastine en raison de son rôle suppresseur de métastase pour laquelle elle a été découverte (Lee et al., 1996). Chez le rongeur le précurseur le plus long est Kp-52 et l'arginine du motif Arg-Phe-NH₂ est remplacée par une tyrosine (Tyr-Phe-NH₂). Kiss1R est couplé à la protéine G_q qui active la PLC et la voie des kinases ERK1/2 (Kotani et al., 2001; Ohtaki et al., 2001). Kiss1R est apparenté aux récepteurs à la galanine mais n'est pas capable de lier ce peptide (Lee et al., 1999; Ohtaki et al., 2001)

Chez les vertébrés les peptides RF-amides ont un rôle dans la reproduction, l'homéostasie énergétique et la douleur (Quillet et al., 2016) ainsi que dans les fonctions cardiovasculaires

(Fang et al., 2009; Jhamandas & Goncharuk, 2013; Yamada et al., 2009), et la croissance tumorale (Kawan et al., 2019; Stathaki et al., 2019). Seule l'implication des récepteurs à peptides RF-amides dans la modulation de la nociception sera développée ici.

2 Implication dans la modulation de la nociception

2.1 Le système NPFF, NPAF et NPFF2R

Les plus hauts niveaux d'expression des peptides NPFF et NPAF sont retrouvés dans la corne dorsale de la ME chez le rongeur (Yang et al., 2008; Yang & Iadarola, 2006) et chez l'Homme (Majane et al., 1988; Nystedt et al., 2002). Le transcrit de NPFF est exprimé dans le noyau du tractus solitaire (NTS) et le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus. Son peptide est présent dans l'amygdale, le noyau parabrachial et accumbens (Yang et al., 2008; Yang & Iadarola, 2006). NPAF a été mis en évidence dans le liquide cérébrospinal humain (Burlet-Schiltz et al., 2002). La présence de transcrits ou de peptides de NPFF et NPAF dans les GRD reste controversée, tout comme celle de NPFF2R (Roumy & Zajac, 1998; Yang et al., 2008; Yang & Iadarola, 2006). Le récepteur NPFF2R a été identifié dans la VTA, le NTS, le Nac, les noyaux parabrachial et spinal trigéminal ainsi que la corne dorsale de la ME (Allard et al., 1989, 1992; Bonini et al., 2000; Dupouy et al., 1996; Gouardères et al., 2000, 2002, 2004c, 2004a; Wu et al., 2010). L'expression de NPFF2R et ses ligands endogènes dans des structures modulatrices de la douleur suggère son implication dans la nociception (Gutierrez-Mecinas et al., 2019).

NPFF module différemment la nociception selon le site d'injection. Administré par voie intrathécale, le NPFF est anti-nociceptif car il induit une analgésie et potentialise l'effet analgésique des opioïdes alors que son administration icv provoque une hyperalgésie et bloque l'analgésie morphinique (Roumy & Zajac, 1998). Il en est de même pour NPAF (Bonnard et al., 2001; Quelven et al., 2005).

L'effet anti-morphine du NPFF est prévenu par la co-administration de RF9 (un antagoniste des récepteurs NPFF1R et NPFF2R) (Elhabazi et al., 2012, 2013; Fang et al., 2008, 2011). De la même manière, l'administration de RF9 potentialise l'effet analgésique des opioïdes, prévient l'HIO ainsi que la tolérance analgésique (Elhabazi et al., 2012; Simonin et al., 2006), ce qui indique l'implication de NPFF1R et NPFF2R dans les propriétés pro-nociceptives et anti-opioïdes du NPFF. De plus, l'abolition de l'expression de NPFF réduit la tolérance à l'analgésie morphinique (Gelot et al., 1998; Lake et al., 1991). Par ailleurs, l'expression de MOR et NPFF2R semble étroitement liée. Un traitement aigu ou chronique à la morphine provoque l'augmentation de matériel immunoréactif pour NPFF dans le cerveau et la ME

(Devillers et al., 1995; Malin et al., 1990; Stinus et al., 1995). A l'inverse, l'administration de NPFF en icv diminue l'expression de MOR chez rat (Rothman et al., 1993) et l'injection sérum anti-NPFF l'augmente (Rothman et al., 1990). Le rôle anti-opioïde de NPFF ne se limite pas à la nociception, puisque l'injection icv de NPFF précipite le syndrome de sevrage (Malin et al., 1990) et l'infusion d'un sérum anti-NPFF le prévient (Gouardères et al., 2004b; Lake et al., 1991; Malin et al., 1990; Rothman et al., 1990, 1993). Il a notamment été proposé que les propriétés anti-opioïdes de NPFF soient liées à sa capacité à bloquer l'inhibition des canaux calciques induite par le DAMGO (Rebeyrolles et al., 1996) même si l'hypothèse d'une altération de la cascade signalisation intracellulaire induite par NPFF2R ou une hétérodimérisation MOR/NPFF2R n'est pas exclue (Moulédous et al., 2010).

Si le système NPFF/NPFF2R est pro-nociceptif chez des animaux traités au préalable avec des opiacés, en condition de douleur inflammatoire et neuropathique ce système montre des propriétés anti-nociceptives. L'administration de carragénine induit une surexpression de NPFF et NPFF2R dans la ME (Nystedt et al., 2004; Sun et al., 2013; Vilim et al., 1999; Yang & Iadarola, 2003) ainsi qu'une augmentation de NPFF2R dans les fibres afférentes (Yang & Iadarola, 2003). Des observations similaires ont été rapportées dans un modèle de douleur inflammatoire articulaire (Lombard et al., 1999) ou du côlon où l'expression de NPFF2R est augmentée au niveau supraspinal (Nystedt et al., 2004). L'administration intrathécale ou icv de NPFF a des propriétés anti-allodyniques dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA (Altier et al., 2000), tout comme son analogue le (1DMe)-NPYF dans un modèle de douleur inflammatoire induite par la carragénine (Xu et al., 1999). Enfin, l'agoniste de NPFF2R, le AC-26309 est également anti-hyperalgésique dans le test à la formaline ou suite à l'administration de carragénine (Lameh et al., 2010). En condition de douleur neuropathique, le transcrit de NPFF2R est légèrement augmenté dans le tronc cérébral mais celui de NPFF n'est pas surexprimé ni dans la ME ni dans le tronc cérébral (Nystedt et al., 2004; Vilim et al., 1999). Administré en icv, intrathécal ou directement dans la PAG, NPFF est anti-allodynique en condition neuropathique (Altier et al., 2000; Wei et al., 1998). De la même manière, l'injection intrathécale de son analogue (1DMe)-NPYF ou intrapéritonéale de AC-26309 sont également anti-allodyniques dans un modèle de ligation du nerf sciatique chez le rat (Lameh et al., 2010; Xu et al., 1999).

2.2 Le système 26RFa, 43RFa et GPR103

Les transcrits de 26RFa sont présents dans de nombreux noyaux de l'hypothalamus dont le PVN (Chartrel et al., 2011) ainsi que dans la ME chez l'Homme et la souris (Bruzzone et al.,

2006; Takayasu et al., 2006). 43RFa a également été mis en évidence dans les neurones de petit et moyen diamètre dans les GRD de rat (Yamamoto et al., 2008, 2011). GPR103a et GPR103b sont, contrairement à leur ligand endogène, largement distribués dans le SNC, dont le LC, le NTS, la VTA, les noyaux du raphé, accumbens et parabrachial, la PAG, l'habénula, l'amygdale et le PVN (Chartrel et al., 2011). La distribution entre les deux isoformes du récepteur ne se superpose pas (Takayasu et al., 2006). Ils sont également retrouvés dans les couches superficielles de la ME (Chartrel et al., 2011; Takayasu et al., 2006) mais pas dans les GRD (Yamamoto et al., 2008). Chez l'Homme, les transcrits de GPR103 ont été mis en évidence dans les ganglions trigéminaux et l'hypothalamus (Jiang et al., 2003). Ce système étant présent dans de nombreuses voies nociceptives, son implication dans la nociception a donc été évaluée.

L'administration icv et intrathécale de 26RFa n'induit pas de modification du seuil nociceptif basal chez le rat (Yamamoto et al., 2008, 2011, 2011) mais induit une hyperalgésie chez la souris par voie icv (Elhabazi et al., 2013). Outre la différence d'espèce entre ces études, le test nociceptif utilisé et la quantité de 26RFa administrée peuvent également expliquer ces divergences. De plus, cette hyperalgésie induite par le 26RFa est prévenue par le RF9, indiquant que NPFF1R et NPFF2R sous-tendent cet effet (Elhabazi et al., 2013). En revanche, l'injection intrathécale 26RFa est anti-allodynique dans des modèles de douleur inflammatoire et neuropathique (Yamamoto et al., 2011). De même, administré en intrathécal et en icv, le 26RFa inhibe les comportements nociceptifs dans les deux phases du test à la formaline (Yamamoto et al., 2008, 2011) et réprime l'expression de c-fos dans la corne dorsale de la ME, indiquant une potentielle implication dans la sensibilisation centrale (Yamamoto et al., 2008). Le TC26RFa (identifié chez la musaraigne chinoise) produit une analgésie chez la souris dans un modèle de douleur viscérale et induite par la formaline lorsqu'il est administré par voie intrapéritonéale (Zhu et al., 2014). Enfin, les administrations de 26RFa dans le LC et la PAG controlatérales à l'administration de formaline sont analgésiques et sont prévenues respectivement par un antagoniste des récepteurs α_2 et un antagoniste des récepteurs aux opioïdes. Ces résultats suggèrent que les récepteurs GPR103 et ses ligands ont des propriétés anti-nociceptives en cas de douleur inflammatoire et neuropathique, possiblement médiés par l'activation des systèmes adrénergique et opioïde (Yoshida et al., 2019).

2.3 Le système des peptides PrRP et PrRP-R

Chez l'Homme et le rat, le transcrit de PrRP est exprimé dans le bulbe rachidien, la médulla ventrolatérale (*ventrolateral medulla*, VLM) et le NTS et son peptide est exprimé dans la

VLM, l'amygdale basolatérale et la PAG (Dodd & Luckman, 2013; Fukusumi et al., 2006; Lin, 2008). Cependant, PrRP n'est pas exprimé dans la ME (Kalliomäki et al., 2004). Son récepteur PrRP-R est exprimé dans l'amygdale, le NTS, le LC, le PVN, le Nac, les noyaux parabrachial et du raphé dorsal (Fujii et al., 1999; Fukusumi et al., 2006; Gauriau & Bernard, 2002; Roland et al., 1999).

En accord avec son expression dans des structures impliquées dans le traitement de l'information nociceptive, l'injection de PrRP-20 dans le NTS est analgésiante (Kalliomäki et al., 2004). A l'inverse, PrRP provoque une légère hyperalgésie lorsqu'il est administré dans la VLM caudale (Kalliomäki et al., 2004). Dans un modèle de douleur neuropathique induit par la ligation du nerf spinal chez le rat, l'administration de PrRP dans la PAG ou le NTS est anti-allodynique. Son administration dans la VLM caudale est en revanche dépourvue d'effet (Kalliomäki et al., 2004). Ainsi, PrRP module différemment le seuil nociceptif selon le site d'injection.

Des souris génétiquement délétées pour PrRP-R montrent des seuils nociceptifs basaux plus élevés, une potentialisation du l'analgésie induite par le stress et par la morphine, une absence de tolérance analgésique et ainsi qu'un syndrome de sevrage atténué, indiquant les propriétés anti-opioïdes de ce récepteur. L'hyperalgésie induite par l'administration icv de PrRP-20 et son effet anti-morphine sont tous deux abolis chez ces souris (Laurent et al., 2005) et par la co-administration de RF9 (antagoniste de NPFF1R et NPFF2R) avec PrRP (Elhabazi et al., 2013). Ainsi, NPFF1R, NPFF2R et PrRP-R sont tous les trois impliqués dans ces effets. De même, l'effet anti-morphine du NPFF est absent chez les souris KO pour PrRP-R et est contré par le RF9 (Elhabazi et al., 2013; Laurent et al., 2005). Il y aurait ainsi une interaction fonctionnelle entre les récepteurs aux NPFF et PrRP-R et qui contribue aux propriétés pro-nociceptives de NPFF et PrRP.

2.4 Le système des kisspeptines et Kiss1R

Des fibres immunoréactives pour les kisspeptines ont été mises en évidence dans le PVN, l'amygdale, la PAG, le LC et le NTS (Clarkson et al., 2009). Le transcrit et le peptide des kisspeptines sont également exprimés dans la corne dorsale de la ME ainsi que dans les GRD L4/L5 (Dun et al., 2003; Mi et al., 2009). Plus particulièrement dans les GRD, ce sont les neurones de large diamètre ainsi que les fibres non myélinisées de petit et moyen diamètre qui expriment kisspeptine (Mi et al., 2009). Le transcrit de kisspeptine humain est exprimé dans l'hypothalamus et les ganglions de la base (Muir et al., 2001). Kiss1R est quant à lui exprimé dans le LC, l'hypothalamus, l'amygdale, le noyau parabrachial, la VTA, la PAG, et l'habénula (Herbison et al., 2010; Lee et al., 1999), les laminas I et II de la ME et les GRD de rat, avec une distribution qui correspond à celle de ses ligands (Mi et al., 2009). Chez l'Homme, Kiss1R est présent dans l'amygdale, le LC, le bulbe rachidien et la ME (Kirby et al., 2010).

Malgré une expression de kisspeptine et son récepteur dans des structures qui modulent la douleur, peu d'études ont évalué l'implication de ce système dans la nociception. L'administration intraplantaire de kisspeptine induit une légère hyperalgésie thermique au chaud (test de la plaque chaude). De même, l'administration intraplantaire ou intrathécale de kisspeptine induit de l'hyperalgésie dans les deux phases du test à la formaline et s'accompagne de l'augmentation de la phosphorylation de TRPV1 au site d'injection ainsi que celle de ERK1/2 dans la corne dorsale de la ME. A l'inverse, l'administration de p234, un antagoniste de Kiss1R provoque une analgésie dans le test à la formaline (Spampinato et al., 2011). Lorsqu'elle est administrée en icv, la kisspeptine induit une hyperalgésie et abolit l'analgésie induite par la morphine. Ces deux effets semblent médiés par les récepteurs NPFF1R/NPFF2R, puisqu'ils sont prévenus par l'administration de RF9 (Elhabazi et al., 2013). Une étude plus récente rapporte que Kiss1R est également responsable l'hyperalgésie induite par l'administration icv de kisspeptine puisque cette dernière est prévenue le p234. En revanche, cette étude n'a pas évalué les conséquences de l'administration de p234 sur l'effet anti-morphine de la kisspeptine (Csabafi et al., 2018). Enfin, la kisseptine et Kiss1R sont surexprimés dans les GRD et la corne dorsale de la ME suite à l'administration de CFA (Mi et al., 2009) ainsi que dans les ganglions trigéminaux dans un modèle de douleur orofaciale (Aczél et al., 2018).

2.5 Le système des peptides RFRP et NPFF1R

2.5.1 Localisation du système RFRPs/NPFF1R dans les voies nociceptives

Les plus forts taux d'expression des peptides RFRP-1 et RFRP-3 et de leur transcrits ont été mis en évidence de manière récurrente dans les noyaux périventriculaire et ventromédial de l'hypothalamus (Fukusumi et al., 2001; Hinuma et al., 2000; Liu et al., 2001; Pertovaara et al., 2005; Yano et al., 2003), ce qui a été ensuite confirmé dans une lignée transgénique de rat exprimant la eGFP sous le contrôle du promoteur de RFPR (Soga et al., 2014). RFRP-1 et RFRP-3 ont été également observés par immunohistochimie dans d'autres structures impliquées dans la nociception, telles que le VPL du thalamus, le LC, Nac, le NTS, les noyaux parabrachial et du raphé dorso-médian ainsi que la PAG et l'amygdale (Ukena & Tsutsui, 2001; Yano et al., 2003). Des messagers ainsi que des fibres immunomarquées pour RFRP sont également trouvés dans les couches superficielles du noyau spinal trigéminal et dans la

ME chez la souris (Ukena & Tsutsui, 2001), plus précisément dans les laminas I et II. Des résultats similaires ont été rapportés au laboratoire par hybridation *in situ* fluorescente (données internes au laboratoire, fig. 12A et 12C). Il a notamment été proposé que les neurones exprimant RFRPs dans l'hypothalamus en soit l'origine (Pertovaara et al., 2005), l'hypothalamus étant l'une des structures majeures des contrôles descendants de la douleur qui projette dans le NTS et la ME (Millan, 2002). En revanche chez le rat, peu voire pas d'expression de RFRP n'a pu être mise en évidence dans la corne dorsale de la ME (Pertovaara et al., 2003). Enfin, peu de cellules exprimant les transcrits de RFRP-3 ont été observées dans les GRD (données internes au laboratoire).

La présence de transcrits de NPFF1R a également été montrée dans le Nac, le NTS, le LC, la VTA, la PAG, les noyaux périventriculaire de l'hypothalamus, parabrachial et du raphé, le septum latéral, l'habénula et l'amygdale chez le rat ou la souris (Bonini et al., 2000; Hinuma et al., 2000; Liu et al., 2001), en accord avec l'identification de sites de liaison de ce récepteur dans ces mêmes structures (Gouardères et al., 2002, 2004c, 2004a). Chez l'Homme, les ARNm de NPFF1R ont été mis en évidence dans l'hypothalamus, le thalamus, l'amygdale et la ME (Bonini et al., 2000). Selon la souche utilisée, le transcrit et des sites de liaison pour NPFF1R ont été mis en évidence dans la ME de rat et de la souris (Bonini et al., 2000; Gouardères et al., 2001). Les études d'hybridation *in situ* fluorescente menées au laboratoire ont permis de préciser la distribution de NPFF1R dans la ME chez la souris. Ce transcrit est exprimé dans les neurones des laminas I, II et IV et V, qui sont celles impliquées dans la nociception (fig. 12B et 12C). En revanche, peu de cellules positives pour le transcrit de NPFF1R ont été observées dans les GRD (données internes au laboratoire).



Figure 12 : Distribution des transcrits de NPFF1R et RFRP-3 dans la corne dorsale de la moelle épinière (ME) de souris par hybridation fluorescente multiplexée. Les triangles blancs indiquent la colocalisation des ARNm de RFRP-3 et NPFF1R (en rouge) et de celui du marqueur neuronal NeuN (turquoise). NPFF1R est exprimé dans les laminas I, II, IV et V tandis que l'expression de RFRP-3 est retreinte aux laminas I-II. Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI. Echelle : 12 µM. Données internes au laboratoire.
Ainsi, la distribution de NPFF1R coïncide avec celles de ses ligands : RFRPs/NPFF1R sont fortement exprimés dans le système limbique, suggérant un rôle de ce système dans l'aspect affectif et émotionnel de la douleur.

2.5.2 L'implication du système RFRPs/NPFF1R dans la nociception : premières évidences

Certaines études ont rapporté l'implication de ce système dans la nociception. L'administration icv de RFRP-1 n'induit pas de modification du seuil nociceptif basal (test de la plaque chaude) mais elle bloque l'analgésie morphinique dans le test de la plaque chaude et le test à la formaline chez le rat (Liu et al., 2001). Chez des rats neuropathiques, l'administration intrathécale de RFRP-1 réduit l'allodynie tactile et l'hyperalgésie thermique au chaud (mais pas l'hyperalgésie mécanique) de manière dose-dépendante tandis que l'administration de RFRP-1 dans le NTS produit de l'anti-hyperalgésie mécanique. Les propriétés anti-allodyniques (mais pas anti-hyperalgésiques) de RFRP-1 sont atténuées par l'administration de naloxone, indiquant que les récepteurs opioïdes sont en partie impliqués dans les effets spinaux de RFRP-1 (Pertovaara et al., 2005).

L'administration icv de RFRP-3 humain chez la souris n'induit pas de modification du seuil nociceptif basal mais atténue (Fang et al., 2011) ou potentialise (Quelven et al., 2005) l'analgésie morphinique. Au contraire, l'administration icv du RFRP-3 murin provoque une hyperalgésie thermique au chaud chez la souris (Elhabazi et al., 2013).

Cependant le récepteur ciblé par les peptides RFRPs n'a pas été déterminé dans ces expériences. RFRP-1 et RFRP-3 se lient préférentiellement à NPFF1R mais également à NPFF2R (Elhabazi et al., 2013), si bien que ces deux récepteurs sont potentiellement impliqués dans les différents effets décrits ci-dessus. En accord avec ce constat, l'administration de RF9, un antagoniste des récepteurs NPFF1R et NPFF2R (Simonin et al., 2006) prévient l'hyperalgésie induite par l'injection icv de RFRP-3 (Elhabazi et al., 2013). Le blocage pharmacologique des récepteurs au NPFF par le RF9 bloque également l'hyperalgésie induite par l'héroïne (Simonin et al., 2006), la morphine et le fentanyl (Elhabazi et al., 2012). L'administration de RF9 potentialise également l'analgésie induite par la morphine et le fentanyl (Elhabazi et al., 2012) et prévient le développement de la tolérance induite des administrations répétées d'héroïne et de morphine (Elhabazi et al., 2012; Simonin et al., 2006). Des observations similaires ont été faites avec un autre antagoniste de NPFF1R et NPFF2R, le RF313 (Elhabazi et al., 2017).

Ainsi les systèmes RFRP-3/NPFF1R et NPFF/NPFF2R ont des propriétés anti-opioïdes, mais le rôle respectif de chacun de ces récepteurs n'est pas connu. Ceci dresse l'importance de disposer d'antagonistes sélectifs de NPFF1R et de NPFF2R, en particulier pour l'étude de la nociception et l'analgésie induite par les opioïdes où ces deux récepteurs semblent impliqués (Ayachi & Simonin, 2014).

2.5.3 Développement d'un antagoniste sélectif de NPFF1R, le RF3286

Comme évoqué plus haut, le RF9 est un antagoniste non sélectif des récepteurs NPFF. De plus, il s'est avéré plus tard être également un agoniste du récepteur Kiss1R *in vitro* et *in vivo* (Kim et al., 2015; Min et al., 2015), ce qui limite l'utilisation de ce composé pour des études dans le domaine de la reproduction. D'autres antagonistes sélectifs de NPFF1R et NPFF2R ont été caractérisés depuis, dont le RF313 développé par le laboratoire, mais aucun d'entre eux ne présentaient une sélectivité suffisante pour l'un ou l'autre récepteur (Bihel et al., 2015; Elhabazi et al., 2017; Gaubert et al., 2009; Gealageas et al., 2012; Journigan et al., 2014; Kim et al., 2015; Lameh et al., 2010). L'absence d'antagoniste sélectif de NPFF1R vs. NPFF2R a donc conditionné l'équipe à développer un nouvel antagoniste très sélectif pour étudier l'implication de ce récepteur dans la modulation de la nociception.

La stratégie pour développer cet antagoniste a été la suivante. Le RF3286 est un dérivé de cpd37 et cpd38 (Gealageas et al., 2012) deux molécules constituées du dipeptide RF (Arg-Phe-NH₂, nécessaire à la liaison au récepteur), d'un groupement aryle et d'un espaceur à l'extrémité N-terminale. Bien que le cpd37 est 100 fois plus sélectif de NPFF1R par rapport à NPFF2R, ce composé est encore trop affin pour NPFF2R (Ki de 117 nM obtenu par des techniques de liaison au récepteur à partir de membrane de cellules exprimant NPFF2R). A l'inverse, le composé cpd38 est peu affin pour NPFF2R (Ki > 1 μ M) mais il est également peu sélectif de NPFF1R (20 fois seulement ; Gealageas et al., 2012). L'ajout d'un groupement phényl sur ces composés a pour conséquence d'augmenter l'affinité pour NPFF1R (de l'ordre du nanomolaire) tout en diminuant celle pour NPFF2R, soit une augmentation de la sélectivité de 50 à 100 fois. A partir du composé le plus sélectif (le RF3296) de nouveaux peptides ont été synthétisés, en remplaçant la phénylalanine par un acide aminé en position L ou D. Le remplacement par une glycine (RF3287) ou une L-leucine (RF3286) a permis d'obtenir deux composés présentant une affinité de respectivement 11,2 et 4,7 nM pour NPFF1R et supérieure à 1 µM pour NPFF2R. Ainsi, le RF3287 et RF3286 sont respectivement 150 et 471 fois plus sélectifs pour NPFF1R par rapport à NPFF2R, ce qui a ensuite été confirmé sur des préparation membranaires exprimant le récepteur NPFF1R murin (Quillet et al., 2021).



(Quillet et al., 2021).

2.5.4 Caractérisation du RF3286, antagoniste de NPFF1R, in vitro et in vivo

Le RF3286 étant plus sélectif pour NPFF1R que le RF3287, c'est ce composé qui a été sélectionné pour poursuivre sa caractérisation in vitro et in vivo. L'équipe s'est d'abord assurée que le RF3286 ne se lie pas aux autres récepteurs à peptides RF-amides et aux quatre récepteurs opioïdes, ce qui est le cas avec un Ki > 5-50 μ M pour chacun de ces récepteurs. Le RF3286 est dépourvu d'effet sur la production d'AMPc induite par la forskoline dans les cellules exprimant NPFF1R humain, contrairement au peptide RFRP-3 qui la diminue (NPFF1R étant couplé à la protéine $G_{\alpha i}$). Toujours dans ce même essai, le RF3286 induit un décalage vers la droite de la courbe dose-réponse provoquée par RFRP-3 (Kb = 16 nM, PA₂ de 7,7) ce qui fait de ce composé un antagoniste de NPFF1R. La droite de Schild a un coefficient directeur de 1, indiquant que cet antagoniste est compétitif. Des résultats similaires ont été obtenus dans d'autres essais fonctionnels, tels que la stimulation de la liaison de $[^{35}S]$ GTP γ S (Kb = 32 nM, PA₂ de 7,8) et les essais en DMR (*Dynamic Mass Redistribution*). Enfin, en accord avec les expériences de compétition, le RF3286 n'a pas d'activité agoniste ou antagoniste envers GPR103, Kiss1R et PrRP-R (couplés à Gq, mesure de l'augmentation calcique) et NPFF2R (couplé à Gai, mesure d'inhibition de la production AMPc). Ainsi, le RF3286 est un antagoniste compétitif et sélectif de NPFF1R in vitro (Quillet et al., 2021).

Afin d'évaluer si le RF3286 est également un antagoniste de NPFF1R *in vivo*, sa capacité à bloquer l'hyperalgésie induite par une administration icv de RFRP-3 (le ligand endogène de NPFF1R) a été évaluée chez la souris. Qu'il soit co-administré avec le RFRP-3 ou administré en systémique, le RF3286 prévient effectivement l'hyperalgésie induite par le RFRP-3 ce qui permet de déduire que i) c'est bien un antagoniste de NPFF1R *in vivo* et ii) ce composé est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique pour bloquer l'action centrale du RFRP-3. Ces résultats ne sont pas limités à la nociception et s'étendent dans une autre espèce non

murine puisque le RF3286 prévient également la libération de l'hormone lutéinisante (LH) induite par le RFRP-3 chez le Hamster Syrien mâle. De même, la sélectivité envers le récepteur NPFF1R est conservée *in vivo* : le RF3286 n'a pas d'influence sur l'effet antimorphine du NPFF (médié par NPFF2R), preuve qu'il n'a pas d'activité antagoniste envers ce récepteur (Quillet et al., 2021).

Ainsi, l'équipe a développé et caractérisé le premier antagoniste hautement sélectif de NPFF1R à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cet outil pharmacologique présente un intérêt majeur dans l'étude des fonctions modulées par chacun des systèmes RFRP-3/NPFF1R et NPFF/NPFF2R, incluant la régulation du métabolisme, la reproduction et la nociception (Quillet et al., 2016). Dans le cadre de ce projet, cet antagoniste a notamment permis de grandes avancées dans la compréhension NPFF1R dans les adaptations à long-terme liées aux administrations d'opiacés et aux douleurs inflammatoires.

2.5.5 RFRP-3/ NPFF1R : un système anti-opioïde

En accord avec les résultats obtenus avec l'administration de RF9 et RF313, le blocage pharmacologique du récepteur NPFF1R par le RF3286 prévient l'hyperalgésie induite par le fentanyl (Quillet et al., 2021) et par la morphine, ainsi que la tolérance à l'analgésie provoquée par des administrations répétées de morphine (données internes au laboratoire). Ces données ont été confirmées grâce à l'étude de souris génétiquement déficientes pour le récepteur NPFF1R (disponibles au laboratoire). En revanche, l'administration du RF3286 n'a pas de conséquences sur le syndrome de sevrage induit par la morphine, indiquant que l'implication de NPFF1R serait spécifique de la nociception (données internes au laboratoire). Dans l'ensemble, ces données démontrent l'activation du système RFRP-3/NPFF1R à la suite de l'administration d'opioïdes et mettent en exergue le rôle essentiel de ce système dans le développement de l'hyperalgésie et de la tolérance analgésique induite par l'administration répétée des agonistes opioïdergiques, ce qui illustre les propriétés pro-nociceptives et antiopioïdes de ce système. Ces mécanismes pourraient être d'origine spinale puisque les transcrits de NPFF1R sont exprimés dans les neurones de la corne dorsale de la ME. De plus, près de 60% des neurones NPFF1R+ coexpriment MOR (et environ 25% coexpriment DOR) suggérant que la modulation des effets induits par les opiacés interviendrait à ce niveau (données internes au laboratoire). Dans les cellules SH-Sy5y transfectées avec NPFF1R et exprimant MOR de manière endogène, il a d'ailleurs été montré que le prétraitement des cellules avec RFRP-3 diminue l'inhibition de la signalisation calcique induite par l'activation de MOR (Kersanté et al., 2006) et pourrait constituer l'un des mécanismes par lesquels NPFF1R module l'activation de MOR *in vivo*.

Enfin, l'administration de CFA provoque une augmentation du nombre de cellules exprimant NPFF1R (d'un facteur 2 environ) dans la corne dorsale de la ME de souris, suggérant son implication dans le développement de l'hyperalgésie induite par le CFA. Confirmant cette idée, le blocage répété du récepteur de NPFF1R par le RF3286 permet une résolution plus rapide de l'hyperalgésie induite par le CFA (données internes au laboratoire). Ainsi, l'implication de NPFF1R et de son ligand endogène en tant que système pro-nociceptif ne se limite pas aux adaptations à long-terme induites par les opiacés et s'étend également aux douleurs inflammatoires.

Objectifs des travaux de thèse

La SLD est un processus d'adaptation à long-terme mis en évidence récemment chez le rongeur à la suite d'une HIO (Célèrier et al., 2001), d'une douleur inflammatoire (Corder et al., 2013; Le Roy et al., 2011) ou neuropathique (Solway et al., 2011). Ce phénomène peut être mis en évidence après la résolution de la phase de l'hyperalgésie primaire, ce qui permet de séparer temporellement les mécanismes propres à cette phase d'hyperalgésie de ceux qui participent au maintien à long-terme de la douleur. Elle reproduit ainsi l'apparition d'épisodes douloureux (malgré la guérison de la blessure initiale) qui sont caractéristiques de certains types de douleurs chroniques humaines. La SLD pourrait donc constituer l'un des mécanismes à l'origine de la chronicisation de la douleur.

Comme décrit dans la revue, la SLD est la résultante d'un tonus élevé qui se met en place entre des systèmes pro- et anti-nociceptifs. Si la plupart des études se concentrent sur l'implication des systèmes anti-nociceptifs et leur contribution pour masquer l'hyperalgésie latente, peu de recherches sont menées sur les mécanismes associés aux systèmes pronociceptifs. L'équipe d'accueil s'intéresse à un système pro-nociceptif en particulier, le système de récepteurs à peptides RF-amides. Dans le cadre de ce projet nous nous sommes intéressés au rôle de ces récepteurs dans la SLD et plus particulièrement aux récepteurs GPR103 et NPFF1R, pour lesquels l'équipe disposait des outils pharmacologiques et génétiques.

Dans un premier temps, les investigations concernant l'implication du récepteur RF-amide GPR103 et son ligand endogène, le 26RFa, dans le développement et le maintien de la SLD ont été poursuivies. En effet, l'équipe avait déjà montré la capacité du RF1156 (un antagoniste sélectif des récepteurs GPR103 développé et caractérisé au laboratoire), à prévenir le développement et à réverser cet état de SLD provoqué par un traitement chronique aux opiacés (Ayachi, 2017), indiquant l'implication des récepteurs GPR103 dans la SLD qui se met en place suite à une HIO. Cependant, son implication dans la SLD induite par une douleur inflammatoire n'était pas connue.

Concernant l'étude de NPFF1R, l'équipe a développé récemment un antagoniste hautement sélectif de ce récepteur (Quillet et al., 2021), ce qui a permis de confirmer les propriétés antiopioïdes et pro-nociceptives du système RFRP-3/NPFF1R dans différents modèles d'HIO et de douleur inflammatoire. En revanche, la persistance de l'activation de ce récepteur après la résolution de la phase d'hyperalgésie pour participer au maintien de la SLD restait à confirmer. En effet, la co-administration du RF9 avec l'héroïne (Simonin et al., 2006), le fentanyl ou la morphine (données internes au laboratoire) prévient l'HIO et par conséquent la SLD qui en découle. De la même manière, l'administration du RF9 après la résolution de l'hyperalgésie induit par la morphine ou le fentanyl est capable de réverser la SLD, même lorsqu'elle est déjà établie. Ces premiers résultats indiquent que les récepteurs NPFF1R et NPFF2R sont impliqués dans le développement et le maintien de la SLD. A nouveau, l'absence d'antagoniste sélectif de NPFF1R et NPFF2R n'a pas permis dans ces études de déterminer l'implication et les rôles respectifs de chacun de ces récepteurs dans la SLD. Ainsi, les objectifs de cette thèse étaient de :

1) Etudier l'implication des systèmes à peptides RF-amides RFPR-3/NPFF1R et 26RFa/GPR103 dans le développement et le maintien de la SLD. Pour cela, nous avons étudié les conséquences du blocage pharmacologique du récepteur NPFF1R (à l'aide de deux antagonistes, le RF1359 et le RF3286, plus récemment caractérisé par l'équipe (Quillet et al., 2021)) dans plusieurs modèles de SLD. Ces résultats ont ensuite été validés par le blocage génétique de ce même récepteur (souris génétiquement délétées pour NPFF1R et disponibles au laboratoire), ce qui a permis d'établir NPFF1R et son ligand endogène comme étant un système pro-nociceptif et anti-opioïde contribuant à la SLD. En utilisant une stratégie similaire, l'implication des récepteurs GPR103 dans la SLD induite par des agents inflammatoires a été évaluée et confirmée.

2) Etudier les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables du maintien de la SLD. Nous avons étudié en particulier deux hypothèses, en lien avec l'activation persistante de NPFF1R lors de la SLD :

i) celle d'une inflammation latente qui persiste après résolution de l'hyperalgésie et qui contribuerait à entretenir la SLD. Cette hypothèse est issue de l'analyse du transcriptome (par *RNA-sequencing*) et qui a révélé l'augmentation de l'expression de certains gènes impliqués dans des processus inflammatoires dans la ME d'animaux en état de SLD. La surexpression de ces transcrits est abolie par le blocage pharmacologique de NPFF1R. Cette hypothèse a ensuite été confirmée par l'évaluation des effets d'anti-inflammatoires sur la mise en place et le maintien de la SLD. Pour caractériser plus encore ces processus inflammatoires, nous avons tenté d'identifier le type cellulaire surexprimant ces transcrits par des expériences d'hybridation *in situ* ainsi que de quantifier les modifications d'expression de ces mêmes transcrits dans les leucocytes d'animaux en état de SLD. Enfin,

l'implication spécifique des protéines S100A8 et S100A9 (dont les transcrits ont été identifiés par les expériences de *RNA-sequencing*) dans la SLD été évaluée à l'aide d'une molécule inhibitrice, le paquinimod (Björk et al., 2009).

ii) Celle d'une interaction fonctionnelle entre NPFF1R et MOR, tous deux impliqués dans la SLD et co-exprimés dans près de 60% des neurones de la ME (données internes au laboratoire). NPFF1R est capable de diminuer l'inhibition de signalisation calcique induite par l'activation de MOR dans des cellules SH-S_Y5_Y (Kersanté et al., 2006). NPFF1R pourrait ainsi également moduler l'activité constitutive de MOR, laquelle contribue au maintien de la SLD (Corder et al., 2013; Walwyn et al., 2016). Pour tester cette hypothèse, nous avons tenté de mettre en évidence l'activité de constitutive de MOR dans la ME d'animaux ayant développé de la SLD ainsi que dans les cellules SH-S_Y5_Y (qui expriment les deux récepteurs) grâce à des tests de liaison du [³⁵S]GTP_YS.

1 Evaluation de l'administration répétée de RF1156 sur la l'hyperalgésie et la SLD induites par l'administration de CFA

1.1 Composé administré

Le RF1156 (antagoniste sélectif des récepteurs GPR103) a été synthétisé par le Dr M. Schmitt du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (Faculté de Pharmacie, Illkirch). Il a été dissous dans du sérum physiologique NaCl 0,9% (Virbac) et administré par voie sous-cutanée à raison de 5 mg/kg. Les groupes témoins ont reçu une injection de sérum physiologique seul.

1.2 Evaluation de la sensibilité nociceptive mécanique

La sensibilité nociceptive des animaux (souris sauvages C57Bl/6N) a été suivie grâce au test de pression de la queue (*Tail Pressure Test*). L'animal est préalablement introduit dans une pochette grillagée pour l'immobiliser et une force ponctuelle et croissante est appliquée avec un analgésimètre (*Analgesy meter* le 7306, Bioseb) sur la queue de l'animal jusqu'à déclencher le réflexe de retrait. La pression (en g) nécessaire pour observer ce réflexe est relevée sur l'appareil. Un point limite au-delà duquel le test est arrêté en l'absence de réponse de l'animal (*cut-off*) est prédéfini pour éviter les lésions tissulaires. Il est fixé à environ trois fois le seuil nociceptif basal (soit une pression maximale de 450 g). Trois mesures sont réalisées par animal, le seuil nociceptif mécanique étant considéré comme la moyenne des trois valeurs. Les mesures de seuils nociceptifs débutent deux semaines avant les expériences pour habituer les animaux au test et s'affranchir de l'analgésie induite par le stress.

1.3 Procédure expérimentale

Ce modèle de douleur inflammatoire persistante consiste en une injection unique de CFA non dilué (Sigma-Aldrich) dans la base de la queue, telle que décrite dans l'article (voir §2.2.4, p. 145) au jour 0 (J0). Le décours de l'hyperalgésie induite par le CFA est suivi par des mesures régulières du seuil nociceptif mécanique.

L'un des groupes a été traité avec le RF1156 avant mise en place de la SLD induite par le CFA (groupe CFA + RF1156 préventif) lorsque l'hyperalgésie est maximale (J1 après injection de CFA). De J1 à J5, le RF1156 (5 mg/kg, s.c., une fois par jour) a été administré

après mesure des seuils nociceptifs afin d'évaluer son effet sur l'hyperalgésie induite par le CFA et le développement de la SLD qui en découle.

Un second groupe a été traité avec le RF1156 après mise en place de la SLD induite par le CFA (groupe CFA + RF1156 curatif) lorsque les animaux sont revenus à leur seuil nociceptif basal (soit à J39 d'après l'expérience). De J42 à J45, les animaux reçoivent une administration de RF1156 (5 mg/kg, s.c., une fois par jour) suivi 20 min plus tard d'une injection de naltrexone (5 mg/kg, s.c.). Les seuils nociceptifs ont été mesurés toutes les heures pendant 5 heures après l'administration de naltrexone, pour suivre l'effet de chaque injection de l'antagoniste de RF1156 sur la SLD.

Enfin, pour apprécier la durée de la SLD dans ce modèle et évaluer l'efficacité à long-terme de l'antagoniste, un suivi cinétique après injection de naltrexone (5 mg/kg, s.c.) a été réalisé à J57et J71 pendant 5 heures pour tous les groupes sans administration préalable de RF1156.

2 Evaluation de la SLD induite par la carragénine chez les souris KO pour GPR103a

2.1 Les souris KO pour GPR103a

Ces souris ont été générées à l'Institut Clinique de la Souris de l'Université de Strasbourg. Les souris génétiquement déficientes pour GPR103a (KO GPR103a) ont été obtenues par recombinaison homologue. Un vecteur contenant l'exon 4 du gène GPR103a flanqué de séquences LoxP ainsi qu'une cassette de résistance à la néomycine flanquée de séquences FRT a été introduit dans des cellules souches embryonnaires par électroporation. Les cellules ayant intégré le vecteur, résistantes à la néomycine, ont ensuite été sélectionnées. Les clones ayant subi la recombinaison homologue ont été sélectionnés par PCR et Southern Blot. Un clone positif a ensuite été implanté dans un blastocyste de souris Balb/cN puis dans une souris pseudo-gestante. Les souris chimériques ainsi obtenues ont ensuite été croisées avec des souris C57Bl/6N qui expriment constitutivement la Flip Recombinase. Cette dernière va exciser le fragment entre les séquences FRT, afin d'obtenir des animaux dépourvus de la cassette de résistance à la néomycine et floxés pour GPR103a. Enfin, ces souris ont été croisées avec des souris C57Bl/6N expriment constitutivement la Cre recombinase (CMV - Cre mice) afin d'exciser le fragment entre les séquences LoxP et obtenir des animaux délétés pour l'exon 4 de GPR103a.

Le protocole de génotypage est celui indiqué dans l'article (voir §2.1.1, p. 143). Les PCR ont été réalisées avec des amorces spécifiques des souris sauvages (Lf: AGTGTATGGCATT-ATCAACAGTCAGCG ; Lr : CTCCACATCTGTCACCGACTTCAAAC) et KO pour

GPR103a (Lf : GCTACCAGTTGCCTTTTTAATGCCTCT ; Lr : GGCCAGCAAAGTGAC-AGGGAGAA). La taille des fragments obtenus était de 334 et 269 paires de bases pour les fragments KO GPR103a et sauvages.

2.2 Procédure expérimenale

Le modèle de douleur inflammatoire consiste en une injection unique de λ -carragénine (Sigma-Aldrich) à 2% dans du sérum physiologique NaCl 0,9% (Virbac) dans la base de la queue, telle que décrite dans l'article (§2.2.4, p. 145). Le décours de l'hyperalgésie induite par la carragénine est suivi par des mesures de seuil nociceptif au test d'immersion de la queue (tel que décrit au §2.2.1, p. 143) 6h après l'administration puis à J1, J2, J3 et J4. A J28, la SLD qui en découle a été mise en évidence par un suivi cinétique des seuils nociceptifs par le test d'immersion de la queue (toutes heures les pendant 6 heures) à la suite d'une administration de naltrexone (5 mg/kg, s.c.)

3 Evaluation de l'administration répétée de paquinimod sur l'hyperalgésie et la SLD induites par la carragénine

3.1 Composé administré

Le paquinimod (molécule inhibitrice des protéines S100A8 et S100A9 des neutrophiles) provient de chez Sigma-Aldrich. Il a été dissous dans une solution composée de sérum physiologique NaCl 0,9% (Virbac) et de 10% de KolliphorEL (Sigma-Aldrich) et administré par voie intrapéritonéale à raison de 10 mg/kg. Les groupes témoins ont reçu une injection du mélange sérum physiologique - 10% de KolliphorEL.

3.2 Procédure expérimentale

Le modèle de douleur inflammatoire consiste en une injection unique de λ -carragénine (Sigma-Aldrich) à 2% dans du sérum physiologique NaCl 0,9% (Virbac) dans la base de la queue de souris sauvages C57Bl/6N, telle que décrite dans l'article (voir §2.2.4, p. 145). Le décours de l'hyperalgésie induite par la carragénine est suivie par des mesures de seuil nociceptif au test d'immersion de la queue (voir §2.2.1, p. 143) 6h après l'administration puis à J1, J2 et J3.

L'un des groupes a été traité avec le paquinimod avant mise en place de la SLD induite par la carragénine (groupe carragénine + paquinimod préventif) lors de la phase d'hyperalgésie. A J0, le paquinimod a été administré (10 mg/kg, i.p.) 30 min avant l'administration de carragénine puis quotidiennement de J1 à J3 (une fois par jour après mesure des seuils nociceptifs) pour évaluer son effet sur l'hyperalgésie induite par la carragénine et le développement de la SLD qui en découle.

Un second groupe a été traité avec le paquinimod après mise en place de la SLD induite par la carragénine (groupe carragénine + paquinimod curatif) lorsque les animaux sont revenus à leur seuil nociceptif basal (soit à J3 d'après l'expérience). De J7 à J10, les animaux reçoivent une administration de paquinimod (10 mg/kg, i.p., une fois par jour) suivi 30 min plus tard d'une injection de naltrexone (5 mg/kg, s.c.). Les seuils nociceptifs ont été mesurés à 1, 3 et 6h après l'administration de naltrexone, pour suivre l'effet de chaque injection de paquinimod sur la SLD.

4 Quantification de l'expression des gènes dans la ME par RT-qPCR

L'expression des différents gènes dans la ME a été quantifiée lorsque les animaux ont récupéré leur seuil nociceptif basal après administration de CFA puis été traités pendant 6 jours consécutifs avec le RF3286 (1 mg/kg, s.c., 3 fois par jour) jusqu'à complète disparition de l'hyperalgésie induite par la naltrexone (disparition de la SLD), comme décrit dans l'article (voir §2.2.6, p. 147). Les animaux ont été sacrifiés le lendemain du dernier jour de traitement au RF3286. Pour une partie des animaux (n = 4) l'expression des gènes a été quantifiée par *RNA-sequencing* (résultats présentés dans l'article, voir p. 184) et par RT-qPCR pour l'autre (n = 4-6), selon le protocole décrit ci-dessous.

4.1 Dissection de la ME

Les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale et la dissection de la ME lombaire est réalisée par extrusion hydraulique, telle que décrite dans l'article (voir §2.2.5, p. 147). La ME est prélevée au niveau du rétrécissement lombaire L4-L6. Une fois extraits, les tissus sont placés dans 500 μ L de solution permettant de préserver les ARN, le *RNA Later* (RNA stabilization reagent, Qiagen) et stockés à -20°C.

4.2 Purification d'ARN à partir des ME

Les ARN sont extraits grâce au *RNeasy Lipid Tissue Minikit* (Qiagen). Les tissus sont homogénéisés dans un potter avec 1 mL de tampon de lyse (*Qiazol Lysis Reagent*, Qiagen). L'extraction d'ARN à partir de ces homogénats est ensuite réalisée sur colonne selon les instructions du fournisseur. L'ARN ainsi purifié est élué dans 30 μ L d'eau dépourvue d'ARNase. Les concentrations en ARN sont ensuite déterminées grâce au Nanodrop (Thermo Scientific) et leur pureté est évaluée grâce aux rapports d'absorbance A_{260/280} et A_{260/230} : un ARN est de bonne qualité s'il présente un rapport A_{260/280} d'environ 2 et un rapport A_{260/230} supérieur à 2. Enfin, les échantillons sont conservés à -80°C

4.3 Protocole de RT-qPCR

La RT-qPCR se déroule en deux temps :

- La transcription inverse, à savoir la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de 100 ng d'ARN purifié, est réalisée selon le protocole du *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (Thermo Scientific). Un premier traitement à l'ADNase I (2 min à 37°C) permet d'éliminer l'ADN génomique contaminant puis la transcription inverse et l'élongation sont effectuées en trois étapes (10 min à 25°C, 15 min à 50°C et 5 min à 85°C). La solution d'ADNc est stockée au 1/5° à -20°C.
- La PCR quantitative (qPCR) est réalisée en triplicat dans une plaque 96 puits à l'aide du *KAPA SYBR FAST qPCR Master 2,5 mM* (Kappa Biosystem) en présence de 10 μM d'amorces spécifiques des gènes d'intérêt (tableau 3, voir p. 124) et de l'ADNc, dans un volume total de 10 μL par puit. L'incubation est réalisée dans l'appareil qPCR StepOnePlus (Applied Biosystem) en 2 étapes : 3 min à 95°C suivie de 40 cycles (20 s à 95°C puis 30 s à 65°C). Une courbe de fusion (20 s à 95° C, 1 min à 65° C puis augmentation de 0,3 °C jusqu'à 95°C toutes les 15 s) est réalisée pour s'assurer de la spécificité de la réaction et de l'amplification d'un seul fragment. Toutes les amorces proviennent de chez Sigma-Aldrich. Elles ont été préalablement validées au laboratoire par analyse de la courbe de fusion et d'efficacité. Les résultats sont analysés par la méthode des ΔΔCT (Livak and Schmittgen, 2001), selon la formule : ΔΔCT = (CT_{gène cible} CT_{gène de référence)condition} (CT_{gène cible} CT_{gène de référence)saline}, avec CT le nombre de cycle moyen pour dépasser le seuil de détection fixé à 0,2 et comme gène de référence celui de la β-actine. La variation de l'expression du gène ciblé correspond à 2^{-ΔΔCT}.

5 Visualisation de l'expression de transcrits par hybridation *in situ* dans la ME

Dans une expérience séparée, une nouvelle cohorte de souris a été administrée de carragénine afin d'induire une SLD. Au retour au seuil basal nociceptif à J4, un groupe de souris a été traité avec le RF3286 (1 mg/kg, s.c., 3 fois par jour) pendant 5 jours consécutifs (J4-J8). À J9, tous les groupes ont reçu de naltrexone (5 mg/kg, s.c.) et un suivi cinétique des seuils nociceptifs au test d'immersion de la queue a été réalisé pendant 6 heures pour s'assurer de la mise en place de la SLD et son blocage par le traitement au RF3286. Le lendemain,

l'ensemble des souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale pour prélever la ME comme décrit ans l'article (§2.2.5, p. 147).

Les moelles épinières incluses dans du CryomatrixTM ont été cryosectionnées à 14 µM d'épaisseur (Leica, CM3050S) à -20°C puis montées sur des lames Superfrost Plus (Fisher Scientific). Les lames ont été placées 20 min à température ambiante (*Room Temperature*, RT) pour optimiser l'adhésion des coupes de ME sur les lames puis conservées à -80°C.

Les hybridations fluorescentes in situ ont été réalisées avec le RNAscope Multiplex fluorescent v2 kit (Advanced Cell Diagnostics). Brièvement, les tissus ont été fixés dans un bain de paraformaldéhyde 4% dilué dans du Phosphate Buffer Saline (PBS) 1x pendant 1h à 4°C. Les lames ont été lavées dans du PBS (1x) à RT pendant 2 min sous agitation, puis immergées dans des bains d'éthanol croissants successifs (50 %-70 %-100 %-100 % pendant 5 min chacun, RT) pour déshydrater les tissus. Une barrière hydrophobe a été tracée autour de chaque section avec le stylo hydrophobe ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen (Advanced Cell Diagnostics). Le peroxyde d'hydrogène a ensuite été incubé sur chaque coupe pendant 10 min à RT, suivi de la protéase IV pendant 30 min à RT. Le mélange de sondes (50 µL par coupe) a été hybridé pendant 2h à 40°C dans un four HybEZ oven (Advanced Cell Diagnostics). Les lames ont été plongées 3 fois dans un bain de PBS entre ces différentes étapes pour éliminer l'excès de réactif. Les sondes utilisées sont les suivantes : marqueur neuronal NeuN ou Rbfox3 (Mm-Rbfox3 313311 et Mm-Rbfox3-C3 313311-C3), marqueur microglial CX3CR1 (Mm-Cx3cr1-C3 314221-C3), s100a9 (Mm-S100a9 481401), Cd177 (Mm-Cd177-C2 866701-C2), Mmp8 (Mm-Mmp8-C3 499861-C3) et Mpo (Mm-Mpo-C2 558471-C2).

Le signal a ensuite été révélé par ajout de la HRP (*Horseradish Peroxydase*) et amplifié à l'aide du système TSA® plus fluorophores (*Tyramide Signal Amplification*, Akoya Biosciences) selon les instructions du fabricant. Les fluorophores proviennent d'Akoya Biosciences : TSA plus fluorescéine (longueur d'onde d'excitation : 494 nm, longueur d'onde d'émission : 512 nm), TSA plus cyanine 3 (longueur d'onde d'excitation : 554 nm, longueur d'onde d'émission : 568 nm), TSA plus cyanine 5 (longueur d'onde d'excitation : 650 nm, longueur d'onde d'émission : 669 nm) dilué dans du tampon TSA (Advanced Cell Diagnostic) au 1/1500^e. Les noyaux ont été marqués au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindol, longueur d'onde d'excitation : 350 nm, longueur d'onde d'émission : 470 nm) et recouverts d'une lamelle en utilisant le milieu de montage *Prolong Gold antifade Reagent* (Invitrogen). Les lames marquées ont été conservées à 4°C dans l'obscurité.

Les images ont été acquises dans les deux semaines suivant l'hybridation *in situ* avec un scanner de lames (NanoZoomer S60, Hamamatsu, 40x) et le logiciel NDPview. Les images agrandies ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal laser (Leica TSC SPE, objectif x20 ou x63, 12 bits en 1024 x 1024 pixels) et analysées avec le logiciel ImageJ. 3 animaux par groupe et 3-5 coupes par animal ont été réalisées et analysées.

6 Quantification de l'expression des gènes dans les leucocytes par RTqPCR

L'expression des différents gènes a été quantifiée par RT-qPCR dans les leucocytes des animaux ayant été administrés avec de la carragénine puis traités avec de la N-acétylcystéine (NAC) et dont les résultats des expériences comportementales sont présentés dans l'article (voir p.184). Brièvement, après résolution de l'hyperalgésie induite par la carragénine (J3 d'après l'expérience), les animaux ont été administrés avec de la NAC à J7 et J8 (100 mg/kg, i.p., une fois par jour) pour effacer la SLD. A J14, un suivi cinétique des seuils nociceptifs au test d'immersion de la queue (tel que décrit au §2.2.1, p. 143) après une administration unique de naltrexone (5 mg/kg, s.c.) a été réalisé pour s'assurer que la SLD est toujours bloquée chez les animaux traités avec la NAC. Les animaux ont été euthanasiés à J15.

6.1 Isolement de globules blancs à partir du sang de souris

Les souris sont anesthésiées par une administration intrapéritonéale d'un mélange de 100 mg/kg de kétamine (Imalgène 100 mg/mL, Merial) et 12 mg/kg de xylazine (Rompun 2%, Bayer). 500 μ L de sang est prélevé par ponction intracardiaque et placé dans un tube *coaté* à l'EDTA (microtube 1,3 ml, EDTA K3, Sarstedt) pour éviter la coagulation sanguine. 7 mL de tampon de lyse de globules rouges (*FCM lysis solution*, Santa Cruz Biotechnology) sont ajoutés au prélèvement sanguin et incubé 5 min à RT sous agitation. Le lysat est centrifugé pendant 5 min à 2000 rpm à RT et le surnageant est éliminé. Le culot est suspendu dans 14 mL de PBS 1x à 4°C puis centrifugé 5 min à 2000 rpm à RT. Après élimination du surnageant, le culot de globules blancs est conservé à -80°C.

6.2 Purification d'ARN et évaluation de l'intégrité des ARN

Les ARN sont isolés avec le *RNeasy micro kit* (Qiagen). Les culots de globules blancs sont homogénéisés dans du tampon de lyse (*RLT buffer*, Qiagen) à l'aide d'un disperseur-homogénéiseur (Ultra-Turrax). La purification d'ARN à partir de ces homogénats est ensuite réalisée sur colonne selon les instructions du fournisseur. L'ARN ainsi purifié est élué dans

14 μL dépourvue d'ARNase. Les concentrations en ARN sont ensuite déterminées grâce au Nanodrop (Thermo Scientific) comme plus haut (voir §4.2, p. 120).

Pour s'assurer de l'intégrité de l'ARN, ces derniers sont chargés sur une puce, séparés par électrophorèse capillaire d'après les instructions fournies dans le kit (RNA 6000 Nano Kit, Agilent technologies) puis détectés par fluorescence à l'aide de l'appareil Bioanalyzer 2100 (Agilent technologies). Selon les caractéristiques du profil électrophorétique des ARN ribosomaux 18s et 28s, le logiciel attribue un score appelé RIN (*RNA Integrity Number*) pour évaluer la dégradation de l'ARN. Un ARN est considéré comme intègre (non dégradé) si son RIN > 7.

La quantification d'expression des gènes par RT-qPCR est ensuite réalisée telle que décrite plus haut (§4.3, p. 121)

	Gène	Séquence 5' -> 3'	Tm (°C)
Chue de néférence	β-actine	F : GACGGCCAGGTCATCACTAT	63,9
Gene de reference		R : CCACCGATCCACACAGAGTA	63,7
Système RF-amide	NPFF1R	F : CCACAACCCTCGTGGACAAC	67,8
		R : CCTGTACCAAGCCGCTCAT	65,2
	RFRP-3	F : TCACAGCAAAGAAGGTGACG	64,1
		R : CAGGGGCTGGACTCATCTTA	64,1
Marqueurs de	IL-1β	F : CTCTGCTTGTGAGGTGCTGA	64,5
		R : TCCCAAGCAATACCCAAAGA	64,2
l'inflammation	TNF-α	F : AGCCGATGGGTTGTACCTTG	66,0
		R : TAGCAAATCGGCTGACGGTG	68,3
	s100a8	F : AAATCACCATGCCCTCTACAAG	60,0
		R : CCCACTTTTATCACCATCGCAA	60,9
	s100a9	F : ATACTCTAGGAAGGAAGGACACC	60,0
Cibles identifiées par les expériences de RNA-seq		R : TCCATGATGTCATTTATGAGGGC	60,2
	Мро	F : AGTTGTGCTGAGCTGTATGGA	61,1
		R : CGGCTGCTTGAAGTAAAACAGG	62,0
	Mmp8	F : CCAAGGAGTGTCCAAGCCAT	66,3
		R : CCTGCAGGAAAACTGCATCG	68,0
	Cd177	F : GGTGATCTGGCTCAGGACAG	65
		R : CACCTGTGGGTGTAGGTAGC	62,1
	Camp	F : GCTGTGGCGGTCACTATCAC	62,9
		R : TGTCTAGGGACTGCTGGTTGA	62,3

Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour les expériences de RT-qPCR dans les échantillons d'ARN issus des ME ou des leucocytes. Tm : température de fusion (melting temperature) indiquées par le fournisseur (Sigma-Aldrich), F : amorce sens (Forward primer), R : amorce anti-sens (Reverse primer). Ces amorces ont été au préalable vérifiées et validées au laboratoire par analyse de l'efficacité et de la courbe de fusion.

7 Test de liaison du [³⁵S]GTPγS sur préparations membranaires de ME

7.1 Dissection des ME et préparation de membranes

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et la dissection de la ME lombaire (L4-L6) est réalisée par extrusion hydraulique telle que décrite dans l'article (voir §2.2.5, p. 147) et directement congelées à -80°C. 3-4 ME ont été broyées dans 4 mL de TMEN (Tris HCl 100 mM ; MgCl₂ 3 mM ; EGTA 0,2 mM ; NaCl 100 mM pH 7,4) à l'aide d'un disperseurhomogénéiseur (Ultra-Turrax). L'homogénat est centrifugé à 40 000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot est ensuite resuspendu dans 1,5 mL sucrose de 0,32 M avec un potter. La concentration membranaire a été déterminée à l'aide d'un dosage Bradford et les aliquots de membranes (1 mg de protéine/mL) ont été conservés à -80°C dans du sucrose 0,32 M jusqu'à utilisation.

7.2 Test de liaison du [³⁵S]GTPγS

Comme décrit précédemment (Pradhan et al., 2010), l'essai a été réalisé en plaque 96 puits *deepwell* en polystyrène dans du tampon TMEN (Tris HCl 100 mM ; MgCl₂ 3 mM ; EGTA 0,2 mM ; NaCl 100 mM pH 7,4) dans un volume total de 250 μ L. 5 μ g de membranes ont été incubées avec 0,1 nM [³⁵S]GTP γ S, 30 μ M de GDP ainsi qu'une gamme de différentes concentrations d'agoniste (DAMGO, 0,1 nM à 10 μ M) à 25°C pendant 1h sous agitation. L'incubation a été arrêtée par filtration rapide sous vide à travers des filtres *unifilter* GF/B Whatmann en plaque 96 puits (Perkin Elmer) pré-humidifiés dans de l'eau milliQ, suivie de trois lavages dans du tampon TMEN pH 7,4 à 4°C. 40 μ L de liquide de scintillation (Microscint, Packard) par puits ont été ajoutés et les filtres ont été placés 1h à l'obscurité avant de quantifier la radioactivité à l'aide d'un compteur à scintillation (TopCount, Perkin Elmer). La liaison de [³⁵S]GTP γ S basale a été déterminée en l'absence d'agoniste.

8 Test de liaison du [³⁵S]GTPγS sur membranes de cellules SH-S_Y5_YhNPFF1R

8.1 Culture des cellules SH-S_Y5_Y-hNPFF1R

Cette lignée cellulaire, issue de neuroblastome humain, nous a été fournie gracieusement par l'équipe de C. Mollereau. Ces cellules expriment de manière endogène MOR (100 fmol/mg de protéines) et ont été transfectées de manière stable avec le récepteur NPFF1R humain (clone SH₁-C7), comme cela a été décrit précédemment (Kersanté et al., 2006). Les cellules ont été cultivées dans du milieu *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM, 4.5 g/l glucose, GlutaMAXI, Invitrogen) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal, de 100U/mL final de pénicilline et de $100\mu g/mL$ final de streptomycine. $500 \mu g/ml$ de G418 ont été ajoutés à chaque passage afin de maintenir la sélection des cellules recombinantes. Les cellules sont ensuite incubées à 37° C avec 5% CO₂. Les expériences ont été réalisées sur des cellules indifférenciées.

8.2 Préparation de membranes à partir des cellules SH-S_Y5_Y-hNPFF1R

Les cellules récoltées et lavées à partir de 15-20 boîtes de 10 cm (confluence de 80-90 %) dans du versène (5 mM EDTA dilué dans du PBS 1x). Les cellules sont ensuite centrifugées à 4000-5000 rpm pendant 10 min à 4°C et les culots de cellules congelés à -80°C pendant au moins une nuit. Les culots ont été décongelés 5 min à RT et le lysat cellulaire a ensuite été homogénéisé dans 20 mL de tampon 50 mM Tris-HCl – 1 mM EDTA, pH 7,4 à 4°C avec un Dounce puis centrifugé à 1000 rpm pendant 15 min à 4°C pour éliminer la fraction nucléaire. Le culot a été remis en suspension dans 20 ml de tampon 50 mM Tris-HCl – 1 mM EDTA, pH 7,4 à 4°C, homogénéisé avec un Dounce, et centrifugé à nouveau à 1000 rpm pendant 15 min à 4°C. Les deux surnageants ont été ensuite rassemblés puis centrifugés à 100 000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot a ensuite été resuspendu dans 3 mL de tampon 50 mM Tris-HCl – 1 mM EDTA, pH 7,4 à l'aide d'un potter. La concentration membranaire a été déterminée à l'aide d'un dosage de Bradford et les aliquots de membranes (1 mg de protéine/mL) ont été conservés à -80°C dans du tampon 50 mM Tris-HCl – 1 mM EDTA, pH 7,4 jusqu'à utilisation.

8.3 Test de liaison du [³⁵S]GTPγS

L'essai a été réalisé en plaque 96 puits *deepwell* en polypropylène dans du tampon HEPES (20 mM, pH 7.4) contenant 3 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1% BSA (Sigma-Aldrich) à 4°C dans un volume total de 500 μ L. 5 à 10 μ g de membranes ont été incubées avec 5 mg de saponine, 0,07 nM [³⁵S]GTP γ S, 10 μ M de GDP ainsi qu'une gamme de différentes concentrations d'agoniste (DAMGO, 0,1 nM à 50 μ M) à 30°C pendant 1h sous agitation. La réaction a été arrêtée par filtration rapide sous vide à travers des filtres *unifilter* GF/B Whatmann en plaque 96 puits (Perkin Elmer), pré-humidifiés dans le tampon 20 mM HEPES pH 7,4, 3 mM MgCl₂, 100 mM NaCl et 0,1 % de BSA à 4°C, suivis de trois lavages dans ce même tampon à 4°C. 40 μ L de liquide de scintillation (Microscint, Packard) par puits ont été ajoutés et les filtres ont été placés 1h à l'obscurité avant de quantifier la radioactivité à l'aide d'un compteur à scintillation (TopCount, Perkin Elmer). La liaison de [³⁵S]GTP γ S basale a été déterminée en l'absence d'agoniste.

Résultats

Partie I : Implication des récepteurs à peptides RF-amides dans SLD

1 Implication du système 26RFa/GPR103 dans la SLD induite par une inflammation

L'équipe d'accueil ayant déjà démontré l'implication du système 26RFa/GPR103 dans la SLD induite par un traitement prolongé aux opiacés, il s'agissait ici de confirmer et d'étendre ces observations à des modèles de douleur inflammatoire. Pour ce faire, les conséquences de l'administration répétée de RF1156 pendant et à la suite de la résolution de l'hyperalgésie induite par le CFA ont été évaluées. Puis, nous avons étudié la mise en place de la SLD induite par un autre agent inflammatoire, la carragénine, chez des souris génétiquement déficientes pour GPR103a.

1.1 Résultats



le CFA et la sensibilisation latente à la douleur (SLD) qui en découle. A. *A J0, le CFA a été injecté dans la queue des souris et le décours de l'hyperalgésie a été suivi par des mesures quotidiennes des seuils nociceptifs entre J1-J5 puis une fois par semaine jusque retour au seuil nociceptif basal à J39. L'un des groupes a reçu une administration de RF1156 (5 mg/kg, s.c.) une fois par jour après mesure des seuils nociceptifs lorsque l'hyperalgésie était maximale (J1-J5). A J42, J43, J44, J45 un suivi cinétique des seuils nociceptifs est réalisé suite à une administration de naltrexone (NTX, 5 mg/kg, s.c.) et un autre groupe a été préalablement administré de RF1156 20 min avant l'injection de naltrexone. Toutes les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, n = 7-10 par groupe. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 CFA vs. saline ; ###p < 0,001 CFA + RF1156 préventif vs. saline ; \$p < 0,001 CFA + RF1156 curatif vs. saline ; °p < 0,05, °°p < 0,001 CFA + RF1156 curatif vs. CFA ; ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées, test de Tukey en post-hoc B. Comparaison des aires sous la courbe (Area Under the Curve, AUC) correspondant à l'hyperalgésie induite par le CFA (J0-J39) ou induite par la natrexone (J42, J43, J44, J45, J57 et J71). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ***p < 0,*

Tandis que l'administration de solution saline dans la queue ne provoque pas de modification des seuils nociceptifs, l'administration de CFA dans la queue à J0 provoque dès le lendemain une diminution du seuil nociceptif, qui traduit le développement d'une hyperalgésie mécanique induite par l'agent inflammatoire (fig. 14A, J1, CFA : $72,5 \pm 9,8$ g

vs. saline : 118,3 \pm 10,1 g vs, p < 0,001). Cette hyperalgésie est maximale de J1 à J9 (J1 à J9, CFA vs. saline, p < 0,001) puis elle se résorbe progressivement, comme l'en atteste le retour au seuil nociceptif basal à J39 (fig. 14A, J39, CFA : 112,1 \pm 12,7 g vs. saline : 124 \pm 3,2 g, ns). L'administration de RF1156 de J1 à J5 (5 mg/kg, s.c., une fois par jour) ne modifie pas le seuil nociceptif mécanique des animaux préalablement administrés avec une solution saline (fig. 14B, AUC J0-J39, saline + RF1156 : -111,9 \pm 199,6 u.a vs. saline : - 54,8 \pm 208,4 u.a, ns). Le RF1156 est donc dépourvu de propriétés analgésiques propres. Le même traitement au RF1156 n'influence pas l'hyperalgésie induite par le CFA (fig. 14B, AUC J0-J39, CFA + RF1156 préventif : -1148,7 \pm 201,1 u.a vs. CFA : - 1257 \pm 280,9 u.a, ns). Ainsi, le 26RFa et ses récepteurs GPR103 ne semblent pas avoir de rôle dans le maintien de l'hyperalgésie inflammatoire.

Après retour des animaux au seuil nociceptif basal, l'un des groupes a été traité au RF1156 pendant 4 jours consécutifs (J42-J45) et les conséquences de chaque jour de traitement sur la SLD ont été révélées par l'administration de naltrexone (5 mg/kg, s.c.). De J42 à J45, l'administration de naltrexone ne modifie pas les seuils nociceptifs des groupes saline et saline + RF1156 (données non montrées), mais provoque une phase d'hyperalgésie mécanique transitoire dans le groupe CFA seul dès 1h (fig. 14A, t = 1h, J42, J43, J44, J45, CFA vs. saline, p < 0,001) et d'une durée de 4h environ. Ainsi, l'hyperalgésie induite par l'administration de CFA mène au développement d'une SLD. Concernant le groupe d'animaux ayant été administrés avec le RF1156 pendant la phase d'hyperalgésie de J1 à J5, l'administration de naltrexone induit une hyperalgésie transitoire similaire à celle du groupe CFA seul (données non montrées). Ainsi, le blocage répété des récepteurs GPR103 par le RF1156 pendant la phase d'hyperalgésie induite par la SLD qui en découle.

Enfin, les animaux traités avec le RF1156 de J42 à J45, montrent une hyperalgésie latente révélée par l'administration de naltrexone similaire à celle du groupe CFA seul à J42 (fig. 14B, AUC J42, CFA + RF1156 curatif : -86,2 ± 51,8 u.a vs. CFA : - 70,4 ± 32,7 u.a , ns). A partir de J43, l'hyperalgésie induite par la naltrexone est progressivement diminuée dans le groupe CFA + RF1156 curatif en comparaison au groupe CFA à J43 (fig. 14B, AUC J43, CFA + RF1156 curatif : -33,7 ± 32,2 u.a vs. CFA : - 67,1 ± 39 u.a, ns) et à J44 (Fig. 14B, AUC J44, CFA + RF1156 curatif : -21,1 ± 25 u.a vs. CFA : - 66,7 ± 28 u.a , p < 0,01) jusqu'à disparition complète à J45 (Fig. 14B, AUC J45, CFA + RF1156 curatif : -5,1 ± 34 u.a vs. CFA : - 66,3 ± 42,7 u.a, p < 0,01 ; CFA + RF1156 curatif : -5,1 ± 34 u.a vs. saline : - 21 ± 28,2 u.a, ns). Ainsi, le blocage pharmacologique répété des récepteurs GPR103 (mais pas le blocage

aigu) permet de réverser complètement l'état de SLD induite par le CFA. Par conséquent, si le 26RFa et ses récepteurs GPR103 ne jouent pas de rôle dans l'établissement de la SLD, ils semblent essentiels à son maintien.

A J57 et à J71, tous les groupes ont reçu une administration de naltrexone (5 mg/kg, s.c.) (sans administration préalable de RF1156) afin d'évaluer les conséquences à long-terme du traitement avec l'antagoniste des récepteurs GPR103. A J57, le groupe CFA seul manifeste une phase d'hyperalgésie transitoire induite par la naltrexone (fig. 14B, AUC J57, CFA : - 89,4 \pm 37,6 u.a vs. saline : - 10,9 \pm 39,3 u.a, p < 0,01) ce qui n'est pas le cas du groupe CFA + RF1156 curatif (fig. 14B, AUC J57, CFA + RF1156 curatif : -6,1 \pm 53,7 u.a vs. CFA : 89,4 \pm 37,6 u.a, p < 0,01 ; CFA + RF1156 curatif : -6,1 \pm 53,7 u.a vs. aline : - 10,9 \pm 39,3 u.a, ns). Le blocage de la SLD par le traitement au RF1156 (de J42 à J45) est donc durable. A J71, la naltrexone induit une hyperalgésie transitoire dans le groupe CFA + RF1156 curatif : -52,6 \pm 36,2 u.a vs. CFA : 76,4 \pm 41,4 u.a, ns) indiquant que la SLD est à nouveau présente dans ce groupe. Ainsi, le blocage de la SLD par le traitement au RF1156 est durable mais pas définitif ce qui suggère que blocage pharmacologique des récepteurs GPR103 ne permet pas de neutraliser complètement les mécanismes sous-jacents de ce phénomène.

En résumé, cette expérience nous a permis de montrer que les récepteurs GPR103 ne semblent pas nécessaires pour le maintien de l'hyperalgésie induite par le CFA ni pour le développement de la SLD qui s'ensuit. En revanche, les récepteurs GPR103 sont activés une fois la SLD établie, mais leur implication serait limitée à l'expression de ce phénomène plutôt qu'à sa persistance dans le temps.

Pour compléter et confirmer ces premières observations obtenues à l'aide du blocage pharmacologique des récepteurs GPR103, nous avons étudié les conséquences du blocage génétique de ce récepteur dans le développement et le maintien de la SLD à l'aide de souris génétiquement invalidées. Pour rappel chez la souris, le récepteur GPR103 existe sous deux isoformes (GPR103a et GPR103b), homologues à 80% avec le récepteur humain (Takayasu et al., 2006). Les souris génétiquement invalidées pour chacun de ces deux récepteurs sont disponibles au laboratoire et des expériences préliminaires de l'équipe ont montré que l'hyperalgésie induite par le fentanyl est atténuée chez les souris KO pour GPR103a mais qu'elle est comparable à celle des souris sauvages chez les souris KO pour GPR103b. Ces données suggèrent que ce soit par l'intermédiaire de GPR103a que le 26RFa induit ses effets pro-nociceptifs et anti-opioïdes. C'est pourquoi dans cette expérience, qui s'inscrit dans la continuité de la caractérisation du système 26RFa/GPR103 comme système pro-nociceptif et anti-opioïde (Ayachi, 2017), nous avons choisi d'étudier les souris KO pour GPR103a. Pour des questions de temps, nous avons utilisé un modèle de SLD induite par la carragénine (et non le CFA) pour laquelle l'hyperalgésie induite par l'inflammation est plus courte (3 à 4 jours contre 35-40 jours pour le CFA).



Figure 15: Conséquences du blocage génétique de GPR103a sur le développement d'hyperalgésie induite par la carragénine et la SLD qui en découle. A. A J0, la carragénine a été injectée dans la queue des souris et le décours de l'hyperalgésie a été suivi par des mesures de seuils nociceptifs à 6h puis de J1 à J4. A J28, tous les groupes ont reçu une injection de naltrexone (NTX, 5 mg/kg, s.c.) et un suivi cinétique des seuils nociceptifs pendant 6 heures a été réalisé. Toutes les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, n = 10 par groupe. **p < 0,01, ***p <0,001 WT carragénine vs. WT saline ; #p < 0,001; ##p < 0,001; ###p < 0,001 WT carragénine ; ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées, test de Tukey en post-hoc. B. Comparaison des aires sous la courbe (Area Under the Curve, AUC) correspondant à l'hyperalgésie induite par la carragénine (J0-J4) ou induite par la naltrexone (J28). ***p < 0,001; ANOVA à un facteur, test de Tukey en post-hoc.

A J0, l'administration de carragénine dans la queue provoque chez les souris WT une hyperalgésie thermique au chaud visible et maximale à 6h (fig. 15A, t = 360', WT carragénine : $6,43 \pm 0,73$ s vs. WT saline : $9,08 \pm 0,45$ s vs, p < 0,001) et qui se résorbe en 4

jours (fig. 15A, D4, WT carragénine : $9,5 \pm 0,63$ s vs. WT saline : $9,12 \pm 0,21$, ns). Les souris KO pour GPR103a ne montrent pas de modification du seuil nociceptif suite à l'injection de carragénine (fig. 15B, AUC D0-D4, KO GPR103a carragénine : $0,78 \pm 19,33$ u.a vs. WT carragénine : $-61,19 \pm 19,46$ u.a., p < 0,001; KO GPR103a carragénine : $-0,78 \pm 19,33$ u.a. vs. KO GPR103a saline : $-0,89 \pm 12,61$ u.a, ns), indiquant que ces souris n'ont pas développé d'hyperalgésie inflammatoire. Ainsi, la délétion génétique du récepteur GPR103a prévient la mise en place de l'hyperalgésie induit par la carragénine.

L'administration de naltrexone (5 mg/kg, s.c.) à J28 provoque dans le groupe WT carragénine une phase d'hyperalgésie transitoire maximale à 1h (t = 60', WT carragénine : $6,83 \pm 0,62$ s vs. WT saline : $9,78 \pm 0,74$ s, p < 0,001) de plus de 6h (t = 360', WT carragénine : $8,97 \pm 0,67$ s vs. WT saline : $9,79 \pm 0,51$ s, p < 0,01), mais pas dans le groupe WT saline, ce qui atteste de la présence d'une SLD à la suite de la résolution de l'hyperalgésie induite par la carragénine. En revanche, les souris KO pour GPR103a ne montrent pas d'hyperalgésie induite par la naltrexone (fig. 15B, AUC J28, KO GPR103a carragénine : $0,98 \pm 4,56$ u.a vs. KO GPR103a saline : $-1,28 \pm 4,94$ u.a, ns ; KO GPR103a carragénine : $0,98 \pm 4,56$ u.a vs. WT carragénine : $-19,82 \pm 4,15$ u.a, p < 0,001) ce qui indique que la SLD ne s'est pas développée dans ce groupe.

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que l'administration de deux agents inflammatoires (carragénine et CFA) provoquent une hyperalgésie (de respectivement 4 et 40 jours) suivi du développement d'une SLD durable. Dans le modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA, le blocage pharmacologique des récepteurs GPR103 est dépourvu d'effet sur l'hyperalgésie primaire mais réverse transitoirement la SLD qui en découle. Ainsi, il semblerait que les récepteurs GPR103 soit impliqués dans le maintien de la SLD mais pas dans celle de l'hyperalgésie primaire. En revanche, la délétion génétique de GPR103a abolit à la fois l'hyperalgésie induite par la carragénine et la SLD qui s'ensuit ce qui suggère que GPR103a est essentiel à la fois au développement de l'hyperalgésie primaire induite par une inflammation et de la SLD qui en découle.

1.2 Discussion

1.2.1 L'implication de GPR103 dans l'hyperalgésie inflammatoire

Dans le modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA, l'administration de RF1156 lorsque l'hyperalgésie est maximale ne permet pas une résolution plus rapide de cette dernière, suggérant que le système 26RFa/GPR103 n'est pas responsable du maintien de l'hyperalgésie inflammatoire. Ce résultat semble contradictoire avec l'absence d'hyperalgésie induite par la carragénine chez les souris KO pour GPR103a ainsi qu'avec les résultats précédemment obtenus dans l'équipe, où le traitement au RF1156 prévient le développement de l'hyperalgésie induite par la carragénine ou le fentanyl (Ayachi, 2017). Cependant dans ces expériences, le blocage des récepteurs GPR103 (génétique ou pharmacologique par son antagoniste le RF1156) précède l'administration de carragénine et de fentanyl tandis que dans notre expérience les administrations de RF1156 ont débuté le lendemain de l'administration de CFA. Même si on ne peut pas exclure que la dose ou la durée du traitement au RF1156 n'ait pas permis un blocage suffisant des récepteurs GPR103 (les propriétés pharmacocinétiques du RF1156 n'étant pas connues), ces données suggèrent que ce récepteur et son ligand endogène sont activés lors de la mise en place hyperalgésie plutôt que lors de sa maintenance. Déterminer la pharmacocinétique (la demi-vie et la capacité de passage de la barrière hémato-encéphalique) du RF1156 pour adapter le traitement (dose, fréquence d'administration) ou coadministrer le RF1156 avec le CFA permettrait de confirmer cette hypothèse.

Ces données vont également à l'encontre de la littérature, où l'administration centrale de 26RFa est décrite comme étant anti-allodynique dans des modèles de douleur neuropathique et inflammatoire et diminue les comportements nociceptifs dans le test à la formaline (Yamamoto et al., 2008, 2011). Par ailleurs, l'administration intrapéritonéale de TC26RFa (identifié chez la musaraigne chinoise) est analgésiante chez la souris dans modèle de douleur viscérale induite par la formaline (Zhu et al., 2014). Cependant dans ses études, de fortes doses de ligand ont été utilisées et l'implication des récepteurs GPR103 dans ces effets n'a pas été démontrée (à l'aide d'un antagoniste sélectif par exemple) si bien qu'il est difficile de conclure quant à la spécificité d'action du composé. En accord avec cette idée, une étude a rapporté que l'effet analgésique du 26RFa dans la première (mais pas la deuxième) phase du test à la formaline est contré par un antagoniste des récepteurs au NPFF et du récepteur au neuropeptide Y (NPY), Y1 (Yamamoto et al., 2009). De même, l'homologue du récepteur GPR103 humain existe sous deux formes chez le rongeur (Kampe et al., 2006; Takayasu et al., 2006) mais le rôle respectif de GPR103a et GPR103b est peu étudié. 26RFa et 43RFa montrent une affinité similaire pour ces deux récepteurs dans des cellules transfectées pour GPR103a et GPR103b murin (Kampe et al., 2006; Takayasu et al., 2006). De plus, RF1156 antagonise chacun des deux récepteurs de manière similaire in vitro (Foltz et al., 2012), ce qui ne permet pas dans nos expériences de discerner l'implication respective de chacun des soustypes. Les souris KO pour GPR103a ne développent pas ou peu d'hyperalgésie induite par la carragénine ou par le fentanyl (Ayachi, 2017) alors que les souris KO pour GPR103b

développent une hyperalgésie induite par le fentanyl similaire à celle des souris sauvages. Dans l'ensemble, ces données semblent ainsi indiquer que le 26RFa induit ses effets pronociceptifs et anti-opioïdes par l'activation de GPR103a, plutôt que GPR103b. Les effets du 26RFa sur la prise alimentaire seraient également médiés par GPR103a (Ayachi, 2017; Granata et al., 2014; Moriya et al., 2006; Takayasu et al., 2006). Une étude plus approfondie de la souche de souris KO pour GPR103b est donc nécessaire pour confirmer ces observations et établir l'implication GPR103b dans la modulation de la nociception ou du métabolisme, et le cas échéant, son rôle dans ces différentes fonctions.

1.2.2 L'implication de GPR103 dans la SLD

Nos expériences confirment qu'à la suite de l'hyperalgésie induite par la carragénine et par le CFA, un état de SLD se développe. Celui-ci se manifeste par une phase d'hyperalgésie transitoire révélée par une administration de naltrexone après retour au seuil nociceptif basal (résolution de l'hyperalgésie) chez les animaux ayant reçu l'agent inflammatoire, tel que précédemment décrit (Corder et al., 2013; Le Roy et al., 2011; Walwyn et al., 2016). Ceci révèle l'activation anormale (qui n'existe pas chez les animaux naïfs) du système opioïde endogène qui persiste malgré la résolution de l'hyperalgésie pour compenser et masquer l'activité des systèmes pro-nociceptifs et résulte ainsi en une SLD.

Pour évaluer l'implication des récepteurs GPR103 dans la SLD, nous avons administré un antagoniste sélectif de ces récepteurs après que les animaux aient récupéré leur seuil nociceptif basal. Alors que la première dose de RF1156 est dépourvue d'effet sur la SLD, son administration répétée atténue progressivement l'hyperalgésie induite par la naltrexone jusqu'à complète disparition au 4^e jour de traitement. Les récepteurs GPR103 et son ligand endogène 26RFa sont donc impliqués dans le maintien de la SLD en tant que système pronociceptif anti-opioïde. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans le modèle de SLD induite par l'administration de fentanyl (Ayachi, 2017), indiquant des mécanismes communs aux différents modèles de douleur. L'évaluation des conséquences à long-terme du traitement au RF1156 a montré que le blocage de la SLD est temporaire et se maintient 12 jours après la dernière administration de RF1156. Le blocage pharmacologique des récepteurs GPR103 semble abolir transitoirement l'expression de la SLD mais ne semble pas effacer complètement les adaptations à long-terme qui en sont responsables. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'adapter le traitement au RF1156 (plusieurs administrations par jour, administrations de plus de 4 jours) afin de bloquer la SLD de manière définitive.

Pour confirmer ces observations, nous avons étudié le développement de la SLD chez des souris génétiquement délétées pour GPR103a (de manière constitutive). Les souris KO pour ce récepteur ne développent pas de SLD suite à l'administration de carragénine. Cependant il est difficile de conclure quant à l'implication de GPR103a dans la SLD dans cette expérience puisque ces souris ne développent pas d'hyperalgésie inflammatoire, confirmant que cette phase d'hyperalgésie primaire est nécessaire pour l'établissement d'une SLD. Ainsi, pour dissocier les mécanismes sous-jacents à l'hyperalgésie et ceux de la SLD, l'étude d'une lignée de souris KO conditionnelle pour GPR103 serait plus appropriée.

A noter que ces deux expériences ont chacune été réalisées dans deux modalités nociceptives : thermique (test d'immersion de la queue) et mécanique (test de pression de la queue). Seul le test ayant permis d'obtenir les résultats les moins variables sont représentés, mais les résultats obtenus dans les deux modalités étaient comparables. La SLD se manifeste donc de la même façon dans différentes modalités nociceptives dans notre modèle.

Dans l'ensemble, ces résultats traduisent l'activation précoce des récepteurs GPR103 lors d'une hyperalgésie induite par les opiacés ou une inflammation ainsi qu'après sa résolution pour participer à l'expression de la SLD et confirment le rôle important des récepteurs GPR103 et de son ligand endogène en tant que système pro-nociceptif anti-opioïde, tel que précédemment décrit (Ayachi, 2017).

2 Implication du système RFRP-3/NPFF1R dans la SLD

De la même manière que pour le système 26RFa/GPR103, nous avons étudié l'implication du récepteur NPFF1R et de son ligand endogène le RFRP-3 dans la mise en place et le maintien de la SLD. Pour ce faire, nous disposions d'un antagoniste hautement sélectif de NPFF1R récemment caractérisé au sein de l'équipe, le RF3286 (Quillet et al., 2021) et qui avait déjà permis d'établir les propriétés anti-opioïdes de ce récepteur dans la tolérance analgésique et l'HIO. L'administration de cet antagoniste permet de prévenir et d'abolir la SLD dans différents modèles de douleur chronique, indiquant que l'activation précoce de ce récepteur lors de l'hyperalgésie perdure même après sa résolution pour contribuer à la l'hyperalgésie latente révélée par l'administration de naltrexone. Contrairement au traitement au RF1156 (l'antagoniste des récepteurs GPR103), le blocage de la SLD par le traitement au RF3286 est définitif, indiquant que NPFF1R est impliqué dans les mécanismes clés de la persistance de la SLD. C'est pourquoi dans le cadre de cette thèse, nous avons poursuivi les investigations concernant les mécanismes moléculaires et cellulaires de la SLD en lien avec le récepteur NPFF1R. Cette étude fait l'objet de l'article scientifique ci-dessous, intitulé «*RFRP-3/NPFF1R* is a pronociceptive system that contributes to inflammatory processes responsible for the establishment and maintenance of latent pain sensitization » et qui sera soumis pour publication prochainement.

RFRP-3/NPFF1R is a pronociceptive system that contributes to inflammatory processes responsible for the establishment and maintenance of latent pain sensitization

Manon Gerum^a, Raphaëlle Quillet^a, Séverine Schneider^b, Valérie Utard^a, Glenn-Marie Le Coz^a, Océane Boyer^a, Khadija Elhabazi^a, Laurent Starck^a, Jérôme Zens^a, Nathalie Petit-Démoulière^a, Michaël Dumas^a, Michaël Weber^a, Frédéric Bihel^b and Frédéric Simonin^a*

Affiliation :

^aBiotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR 7242 CNRS, Université de Strasbourg, Institut du Médicament de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France
^bLaboratoire Innovation Thérapeutique, UMR 7200 CNRS, Université de Strasbourg, Illkirch, France

* Corresponding author:

Frédéric Simonin, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR7242 CNRS / Université de Strasbourg, 300 boulevard Sébastien Brant, CS 10413, 67412 Illkirch-Graffenstaden, Cedex, France. +33-368854875; simonin@unistra.fr

Abstract

Latent pain sensitization is a preclinical model that recapitulates both episodic and stress sensitivity of human chronic pain. This maladaptive state is caused by the high level of endogenous activation of pro- and anti-nociceptive systems that overlasts the initial phase of hyperalgesia induced by painful events or opioid treatments. This phenomenon can be evidenced by pharmacological blockade of anti-nociceptive systems or stress that lead to a transitory phase of hyperalgesia that is absent in animals with no prior pain history. Although several anti-nociceptive systems have already been involved in latent pain sensitization, much less is known about pro-nociceptive systems contribution to this endogenous neuroadaptation to hyperalgesia. In the present study, we show that both pharmacological and genetic blockade of neuropeptide FF1 receptor (NPFF1R) prevent and/or reverse already established latent pain sensitization in different models of opioid- and inflammatory-induced latent pain sensitization. We further show by RNA-sequencing that this phenomenon is associated with long-lasting overexpression of several genes in the spinal cord of sensitized animals, most of which are involved in inflammatory processes, and that pharmacological blockade of NPFF1R can normalize the expression of some of them. Moreover, we show that two anti-inflammatory compounds (ibuprofen and N-acetylcysteine) efficiently prevent and reverse latent pain sensitization. Altogether, our data show that latent pain sensitization is underlain by a latent inflammation and that NPFF1R is part of a pro-nociceptive system that critically contributes to the establishment and long-term maintenance of this maladaptive state that participates to pain chronicization.

Keywords: latent pain sensitization – NPFF1R - hyperalgesia – spinal cord – opioid – antiopioid

Abbreviations:

AUC : Area Under the Curve ; AMPA : α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid ; cDNA : complementary DNA ; CFA : Complete Freund's Adjuvant ; CRF : Corticotrophin Releasing Factor ; DEG : Differential Expressed Genes ; DNA : Deoxyribonucleic Acid ; EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid ; OIH : Opioid-Induced Hyperalgesia ; i.p. : intraperitoneally ; KO : Knock-Out ; NAC : N-acetylcysteine ; NMDA : N-Methyl-D-aspartate ; NPFF : Neuropeptide FF ; NPFF1R : Neuropeptide FF 1 Receptor ; NPFF2R : Neuropeptide FF 2 Receptor ; NK1 : Neurokinin 1 ; NPY : Neuropeptide Y ; NTX : Naltrexone ; PCR : Polymerase Chain Reaction ; RFRP-3 : RFRP : RF-amide Related Peptide-3 ; RF9 : N-adamantane-1-carbonyl-Arg-Phe-NH₂ trifluoroacetate ; rpm : rotation per minute ; RTqPCR : Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction ; s.c. : subcutaneous ; TNF- α : Tumor Necrosis Factor α ; WT : Wild Type

Table of contents

1	Introdu	lection		
2	Materia	al and Methods145		
	2.1 Ma	aterial		
	2.1.1	Animals145		
	2.1.2	Compounds		
	2.2 Ex	perimental procedures		
	2.2.1	Tail immersion test		
	2.2.2	Morphine-induced latent pain sensitization		
	2.2.3	Fentanyl-induced latent pain sensitization147		
	2.2.4	Inflammatory-induced latent pain sensitization148		
	2.2.4	.1 Preventive pharmacological blockade of NPFF1R with RF3286 in the		
	mode	el of carrageenan-induced latent pain sensitization		
	2.2.4	.2 Genetical blockade of NPFF1R in the model of carrageenan-induced latent		
	pain	sensitization149		
	2.2.4	.3 Curative pharmacological blockade of NPFF1R with RF3286 in the model		
	of ca	rrageenan-induced latent pain sensitization		
	2.2.4	.4 Curative pharmacological blockade of NPFF1R with RF3286 in the model		
	of Cl	FA-induced latent pain sensitization149		
	2.2.4	.5 Curative pharmacological blockade of NPFF1R with RF3286 in the model		
of CFA-induced latent pain sensitization in female mice				
	2.2.4	.6 Preventive and curative treatments with anti-inflammatory compounds in		
	the n	nodel of carrageenan-induced latent pain sensitization		
	2.2.5	Spinal cord dissection		
	2.2.6	RNA isolation for gene expression analysis in the spinal cord151		
	2.2.7	RNA-sequencing151		
	2.2.8	Data and statistical analysis		
3	Results			

	3.1	NPFF1R and NPFF2R are involved in development and maintenance of opiates-			
	induced latent pain sensitization				
	3.2	Effect of selective NPFF1R blockade by RF1359 on fentanyl-induced latent pain			
	sensitization156				
	3.3	NPFF1R is involved in inflammatory-induced latent pain sensitization			
	development and maintenance				
	3.4	Spinal differential expressed genes analysis by RNA-sequencing 161			
	3.5	Latent pain sensitization is maintained by a latent inflammation 162			
4	Dis	cussion164			
5	Cor	clusion			
References					
Supplementary figures and legends					

1 Introduction

Chronic pain is a debilitating condition that impacts approximately 34% of adult worldwide (Jackson et al., 2016) and for which there are few effective treatments devoid of side effects. In humans, chronic pain is often stress-sensitive, episodic and occurs without any apparent cause or long after injury has resolved. Those characteristics are found in latent pain sensitization, a long-lasting vulnerability to pain evidenced in several animal pain models, which has been proposed to be involved in pain chronicization (Marvizon et al., 2015).

Latent pain sensitization is induced by a variety of injuries such as opioid-induced hyperalgesia (Célèrier et al., 2001), inflammatory pain induced by carrageenan (Le Roy et al., 2011) or by CFA (Corder et al., 2013; Walwyn et al., 2016), plantar incision (Campillo et al., 2011) and neuropathic pain (Solway et al., 2011). This process results from the abnormal and persistent high level of activation of antinociceptive and pronociceptive systems that outlasts hyperalgesia resolution. Hyperalgesia is then constantly repressed by activation of antinociceptive systems that counteracts high activation of pronociceptive systems to maintain normal pain sensitivity, according to the opponent process theory (Simonnet & Rivat, 2003). Yet, many anti-nociceptive receptors were identified as critical players in this phenomenon including the μ - (Corder et al., 2013), κ -, Δ - opioid and α_{2A} receptors (Walwyn et al., 2016), Y1 and Y2 Neuropeptide Y (NPY) receptors (Solway et al., 2011), Corticotrophin Releasing Factor (CRF) (Chen et al., 2018) and CB1 cannabinoid receptors (Kopruszinski et al., 2020). Consequently, whenever antinociceptive systems activity is pharmacologically or genetically impaired, a new transitory episode of pain ensues. This apparent state of remission can also be disrupted by an acute stress (Le Roy et al., 2011; Rivat et al., 2007). Accordingly, latent pain sensitization was also evidenced in human (Pereira et al., 2015). Several pro-nociceptive anti-opioid receptors have also been shown to be involved in latent pain sensitization including NMDA (Célèrier et al., 2001), Neurokinin 1 (NK1) (Chen & Marvizon, 2020) and AMPA receptors (Taylor et al., 2019) but little is known about the precise molecular mechanisms by which they contribute to this phenomenon.

RF-amide peptides and their receptors are also known to modulate nociception (Ayachi & Simonin, 2014). More particularly, several lines of evidence suggest that RF-amide related peptide-3 (RFRP-3) and neuropeptide FF (NPFF) that binds to Neuropeptide 1 receptor (NPFF1R) and Neuropeptide 2 receptor (NPFF2R) respectively are anti-opioid pronociceptive systems that could be involved in latent pain sensitization. Indeed, coadministration of heroin with RF9 (a non-selective NPFF1R and NPFF2R antagonist), prevents latent pain sensitization suggesting those two receptors are involved in its
development (Simonin et al., 2006), but the respective role of each receptor is unknown. We have recently developed and characterized RF3286, a highly selective NPFF1R antagonist (Quillet et al., 2021). Pharmacological blockade of this receptor in mice with RF3286 demonstrated its anti-opioid properties by reducing opioid-induced hyperalgesia (OIH) and analgesic tolerance (Quillet et al., 2021). In the present study, we sought to confirm and study specifically the involvement of RFRP-3/NPFF1R system in latent pain sensitization by using our new selective antagonist RF3286 (Quillet et al., 2021) as well as NPFF1R KO mice. We further explored underlying molecular and cellular mechanisms of latent pain sensitization establishment and maintenance and identify latent inflammation as a potential critical mechanism that underlies latent pain sensitization.

2 Material and Methods

2.1 Material

2.1.1 Animals

Experiments were conducted on adult male or female mice C57Bl6/N (6-8 weeks old, 20-25g) from Janvier Labs. Animals were housed at 5 per cage and kept under a light-dark cycle 12:12 at $22^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ with free access to food and water. Experiments were conducted during light phase of the cycle (light beginning at 7 pm). Animals were handled for a week to get used to the experiment room and the user before nociceptive threshold measurement. All procedures were carried out accordingly to the European guidelines for the care of laboratory animals (European Communities Council Directive 2010/63/EU) and approved by the local ethical committee (C.R.E.M.E.A.S.). All efforts were made to minimize animal discomfort and to reduce the number of animals used.

NPFF1R knock-out (KO) mice were engineered at the Institute Clinic of Mouse at the University of Strasbourg using homologous recombination. A targeting vector containing NPFF1R exon 4 flanked by LoxP sequences and a Neomycin resistance cassette flanked by FRT sequences was introduced in embryonic stem cells by electroporation. Cells were selected for their resistance to Neomycin. Clones where homologous recombination took place were selected using PCR and Southern blot experiments. A positive clone was implanted in a Balb/cN mouse blastocyst and then in a pseudo-pregnant mouse. Chimeric mice were crossed with C57BI/6N mice constitutively expressing Flip Recombinase, an enzyme that delete the fragment between FRT sequences to generate animals deleted for Neomycin resistance cassette and with a floxed exon 4 NPFF1R. Finally, these mice were crossed with C57BI/6N mice constitutively expressing Cre recombinase (CMV-Cre mice), that delete the

fragment between LoxP sequences allowing the generation of NPFF1R exon 4 genetically depleted mice.

Genotyping protocols: ear fragments from WT and KO mice were incubated with protease K in a reaction medium containing 200 μ L of lysis buffer (1 M Tris-HCl pH 8.5 ; 0.5 M EDTA ; SDS 10% ; 5 M NaCl) and 4 μ L proteinase K (20 mg/mL Fermentas), overnight at 55°C in rotation in an oven. Then, PCR reactions were performed using specific primers for exon 4 (Lf : TGCTGCTGCTCATCGACTAC ; Lr : AGAAGGCCAGCCAGTGTG) in a reaction mixture containing : reaction buffer, 4 x10 mM NTP, 50 mM MgCl₂, Go Taq polymerase Promega, 10 mM of each primer, genomic DNA. PCR reactions were realized in 28 cycles: 1 x 94°C for 3 min; 28 x (94°C for 30 sec; 68°C for 30 sec; 72 °C for 1 min) ; 1 x 4°C, ∞. Amplified DNA fragments were analyzed on an agarose gel (1.5%) after staining with Ethidium Bromide (0.5 μ g/mL) and UV visualization.

2.1.2 Compounds

Fentanyl citrate, naltrexone hydrochloride, N-acetylcysteine, ibuprofen, paquinimod, CFA and λ -carrageenan were purchased from Sigma-Aldrich. Morphine hydrochloride was obtained from Francopia. RF3286 and N-adamantane-1-carbonyl-Arg-Phe-NH₂ trifluoroacetate (RF9) RF9 were synthetized as previously described (Quillet et al., 2021; Simonin et al., 2006).

All compounds were dissolved in physiological saline (NaCl 0,9%, Virbac) to get a 60 μ g/kg fentanyl solution, 10 mg/kg morphine solution, 5 mg/kg naltrexone, RF9 and RF1359 solutions, Ibuprofen and N-acetylcysteine were dissolved in saline with 10% kolliphor-EL to get a 100 mg/kg solution. RF3286 was dissolved to get a 1 mg/kg solution that was then placed in an ultrasound bath for 20 min and vortex every 5 min to help complete RF3286 powder dissolution.

Except for N-acetylcysteine and ibuprofen that were injected intraperitoneally (i.p.) all solutions were administered subcutaneously (s.c.). In both cases, compounds were injected at 10 mL/kg (volume/body weight).

2.2 Experimental procedures

2.2.1 Tail immersion test

Thermal nociceptive thresholds were assessed using the tail immersion test as previously reported (Simonin et al., 1998). Mice were placed in a grid container and 2/3 of their tail were immerged in a water bath maintained at 47 ± 0.5 °C. Tail withdrawal latencies (in seconds)

were measured with a timer. At 47°C, nociceptive basal values are comprised between 8-10 sec, which allows to visualize both nociceptive thresholds increase or decrease (analgesia and hyperalgesia, respectively). In absence of nociceptive reflex, mice tails were withdrawn from the hot water after 27 s (cut-off value) to avoid any tissue damage. 3 measures were realized for each animal, the nociceptive basal value is the mean of these 3 values. Nociceptive threshold measurement started a week before compounds administrations to habituate animals to the nociceptive test and get rid of stress-induced analgesia.

2.2.2 Morphine-induced latent pain sensitization

Mice were administered with morphine (10 mg/kg, s.c.) once a day from day 0 (D0) to day 8 (D8). Control mice received saline injections instead of morphine and morphine + RF9 group received RF9 (5 mg/kg, s.c.) 20 min before each morphine administration. From D0 to D8 the nociceptive threshold of the animals was measured daily *before* morphine administration as previously described (Elhabazi et al., 2014). Nociceptive thresholds were then assessed at D9, D13, D15, D19, D21 and D27 until complete return to the basal nociceptive basal threshold (D27). At D28, D34 and D41, all groups received a single administration of naltrexone (NTX, 5 mg/kg, s.c.) and a time course of nociceptive thresholds was performed for 6 hrs

In a second experiment, mice were administered with morphine (10 mg/kg, s.c.) once a day from D0 to D8 8. Once morphine-induced hyperalgesia has resolved at D23, RF9 (5 mg/kg, s.c.) was administrated at D30, D31 and D32 and followed 20 min later by an injection of NTX (5 mg/kg, s.c.) and the nociceptive threshold of the animals was measured 30 min from 30 to 150 min to evaluate the consequence of RF9 administration on latent pain sensitization.

2.2.3 Fentanyl-induced latent pain sensitization

To mimic its use in clinic, mice were administered on D0 with 4 successive injections of fentanyl (4 x 60 μ g/kg, s.c.) spaced with 15 min. Fentanyl-induced analgesia was assessed by measuring of the thermal nociceptive threshold of the animals in the tail immersion test at 60, 120, 180 and 240 min after the last injection. Fentanyl-induced hyperalgesia was assessed by daily measurement of the thermal nociceptive threshold of mice from day 1 to day 4. Control mice were administered with vehicle (saline).

In a first experiment, preventive treatment with RF9 consisted in a single injection of RF9 (5 mg/kg, s.c.) 20 minutes before fentanyl. At D11 and D18, all groups received a single administration of NTX (5 mg/kg, s.c.) to reveal latent pain sensitization. NTX-induced

hyperalgesia was assessed by a time course of nociceptive thresholds at 30, 60 min and then every 60 min until 360 min following NTX administration.

In the same cohort of mice, curative administrations of RF9 were tested on latent pain sensitization. RF9 treatment began once fentanyl-induced hyperalgesia has resolved (D4). Mice received RF9 (5 mg/kg, s.c.) for 4 days (D7-D10). At D11, D18 and D25 all groups received a single administration of NTX (5 mg/kg, s.c.) and a time course of nociceptive thresholds over a 6 hrs period was performed.

In a second experiment, a preventive administration of RF1359 (0,2; 1 and 5 mg/kg. s.c.) was performed 20 minutes before fentanyl. Once fentanyl-induced hyperalgesia has resolved a D4, all groups received a single administration of NTX (5 mg/kg, s.c.) and a time course of thermal nociceptive thresholds was performed for 6 hrs at D8 and D15.

2.2.4 Inflammatory-induced latent pain sensitization

In all the following experiments, mice were restrained in a plastic container (Bioseb) and 20 μ L of undiluted Complete Freud's Adjuvant (CFA) or λ -carrageenan (2% dissolved in saline) were administered subcutaneously at the basal part of mice tail using a Hamilton syringe. Control group received a saline injection. Carrageenan-induced hyperalgesia was assessed by measuring the nociceptive threshold of the animals at 6, 24, 48, 72 and 96 hrs following inflammatory agent administration. CFA-induced hyperalgesia was assessed by measuring the nociceptive threshold of mice twice a week until complete return to basal nociceptive threshold (5-6 weeks).

2.2.4.1 Preventive pharmacological blockade of NPFF1R with RF3286 in the model of carrageenan-induced latent pain sensitization

Mice were treated with RF3286 (1 mg/kg, s.c.) 3 times a day during the course of carrageenan-induced hyperalgesia. At D0, mice received the first administration of RF3286 30 min before carrageenan administration, the second one at 1 pm and the third one at 6 pm. Nociceptive threshold measurement at 6h was performed between the last two administrations of RF3286. From D1-D4, nociceptive thresholds were measured daily before RF3286 administrations (at 9 am, 1 pm and 6 pm). At D9, all groups received a single administration of NTX (5 mg/kg, s.c.) and a time course of nociceptive thresholds over a 6 hrs period was performed to assess the effect of preventive RF3286 treatment on latent pain sensitization.

2.2.4.2 Genetical blockade of NPFF1R in the model of carrageenan-induced latent pain sensitization

WT and NPFF1R KO mice were administered with carrageenan in the tail at D0. Following return to basal nociceptive threshold, all groups received a single administration of NTX (5 mg/kg, s.c.) at D4 and the nociceptive threshold of the animals was measured over a period of 6 hrs to reveal NTX-induced hyperalgesia.

2.2.4.3 Curative pharmacological blockade of NPFF1R with RF3286 in the model of carrageenan-induced latent pain sensitization

Mice were treated with RF3286 (1 mg/kg, s.c.) once carrageenan-induced hyperalgesia has resolved. RF3286 (1 mg/kg, s.c.) was administrated three times a day for 5 days. To evaluate the acute effect of RF3286 administration on latent pain sensitization, the first RF3286 dose was followed 20 min later by an injection of NTX (5 mg/kg, s.c.). NTX-induced hyperalgesia was assessed by measuring the thermal nociceptive threshold of the animals at 30 min, 60 min and 120 min after NTX administration. The second and third injections of RF3286 were performed at around 1 and 6 pm, respectively. To assess long term consequences of RF3286 treatment on latent pain sensitization, mice were administered with NTX (5 mg/kg, s.c.) and the nociceptive threshold of the animals was measured over a period of 6 hrs at D20. Distinct mice from the same cohort were submitted to a forced swim stress to compare acute stress and naltrexone latent pain sensitization reinstatement. To this purpose, mice were placed in a 40 cm high plastic container for 6 min in a water bath at 18 cm depth (so that they cannot touch the bottom of the container with their tail) maintained at 32°C (Amitani et al., 2005). At the end of the swimming session, mice were placed in their home cages until nociceptive thresholds measurement. The water was changed and the container cleaned between each mice submitted to forced swim. To avoid any interferences between stress-induced hyperalgesia and opioid system, those mice were administered with carrageenan at D0 and RF3286 for 5 days (D5-D9) but didn't receive any NTX injection. Nociceptive thresholds measurement began at the end of the 6 minutes stress period.

2.2.4.4 Curative pharmacological blockade of NPFF1R with RF3286 in the model of CFA-induced latent pain sensitization

After the resolution of the hyperalgesia induced by CFA administration, mice were administered with RF3286 (1 mg/kg, s.c.) three times per day for 6 days and the first dose of RF3286 was followed 20 min later by an injection of NTX (5 mg/kg, s.c.) according to the same schedule than the one described above in the model of carrageenan-induced latent pain

sensitization. NTX-induced hyperalgesia was visualized by measuring the thermal nociceptive threshold of the animals at 30 min, 60 min and 120 min after NTX administration. In order to assess the duration of the latent pain sensitization phenomenon and long-term effect of RF3286 treatment in the CFA experiment, from D71 mice were administered every two weeks with NTX (5 mg/kg, s.c.) and the nociceptive threshold of the animals was measured over a period of 6 hrs until NTX-induced hyperalgesia disappearance, to assess latent pain sensitization duration.

2.2.4.5 Curative pharmacological blockade of NPFF1R with RF3286 in the model of CFA-induced latent pain sensitization in female mice

Carrageenan was injected in the tail of female mice at D0 and once carrageenan-induced hyperalgesia has resolved (D4), RF3286 (1 mg/kg, s.c.) was administrated three times a day for 4 days (D6-D9) according to the same schedule used for male mice. Another group of mice was treated with RF1359 (another antagonist of NPFF1R) two times a day (5 mg/kg, s.c.) for 3 days (D6-D10). The first dose was administered 20 min before the injection of NTX (5 mg/kg, s.c.,) and the thermal nociceptive threshold of the animals was measured at 60 min and 120 min after NTX administration to assess NTX-induced hyperalgesia. The second dose of RF1359 (5 mg/kg, s.c.) was performed at 6 pm.

2.2.4.6 Preventive and curative treatments with anti-inflammatory compounds in the model of carrageenan-induced latent pain sensitization

Carrageenan was injected in the tail of mice at D0. A group of mice received preventive administrations of ibuprofen (100 mg/kg, i.p.). The first administration was performed 30 min before carrageenan injection and then daily from D1 to D3 (after measuring the thermal nociceptive threshold of the animals). Curative ibuprofen (100 mg/kg, i.p.) treatment began once carrageenan-induced hyperalgesia has resolved (D4). At D8 and D9, mice were treated with ibuprofen 30 min before the injection NTX (5 mg/kg, s.c.) and NTX-induced hyperalgesia was assessed by measuring the thermal nociceptive threshold of the animals at 60 min, 180 min and 360 min. To assess long-term consequences of both ibuprofen treatments on latent pain sensitization, all groups were administered with a single administration of NTX (5 mg/kg, s.c.) at D11, D18 and D25 and the nociceptive threshold of the animals was measured for 6 hrs.

In a separate experiment, carrageenan was injected in the tail of mice at D0 and then were allowed to return to their nociceptive basal threshold (at D3). Mice were then treated with N-acetylcysteine (100 mg/kg, i.p.) at D7 and D8. NTX (5 mg/kg, s.c.) was injected and 30 min

later and NTX-induced hyperalgesia was assessed by measuring the thermal nociceptive threshold of the animals at 60 min, 180 min and 360 min following administration of NTX (5 mg/kg, s.c.). Long-term effects of N-acetylcysteine treatment on latent pain sensitization was assessed at D11 and D14 by measuring the nociceptive threshold of the animals for 6 hrs following a single administration of NTX (5 mg/kg, s.c.).

2.2.5 Spinal cord dissection

Mice were euthanized by cervical dislocation. A dorso-median incision was performed and a portion of spine was isolated. Spinal cords were quickly harvested by hydraulic extrusion with sterile PBS 1x and sectioned at the lumbar narrowing (L4-L6). For RT-qPCR and RNA-sequencing experiments, spinal cords were placed in 500 μ L of RNA later (RNA stabilization reagent, Qiagen) to prevent RNA degradation and frozen at -20°C.

2.2.6 RNA isolation for gene expression analysis in the spinal cord

In a separate experiment, latent pain sensitization was induced by CFA administration in a cohort of mice and at the return to normal basal nociceptive thresholds (at D34) one group of mice was treated with RF3286 (1 mg/kg, s.c., 3 times a day) for 6 days (D42-D47). The day after mice from saline, CFA and CFA + RF3286 treated groups were euthanized by cervical dislocation to harvest spinal cords as described in §2.2.5. RNAs were extracted with the RNeasy Lipid Tissue Minikit (Qiagen). Spinal cords were homogenized in a 1 mL potter with lysis buffer (Qiazol Lysis Reagent, Qiagen). RNAs were isolated from these homogenates on columns according to the manufacturer's instructions. RNA was eluted in 30 μ L of RNAse free water. RNA concentrations, A_{260/280} and A_{260/230} ratios were assessed using the Nanodrop (Thermo Scientific). RNA samples were stocked at -80°C.

2.2.7 RNA-sequencing

Integrity of RNA samples was evaluated by using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) and samples that displayed a RIN > 7 were submitted to RNA-sequencing at the GenomEAST plateform (I.G.B.M.C., Illkirch, France). Following a first step of ribosomal RNAs depletion (ribodepletion), libraries were prepared from spinal RNAs according to the RNA-seq Ribozero/standard quantity protocol using the Truseq Stranded Total RNA Sample Prep kit (Illumina) without poly-A selection. Integrity of final double-stranded cDNA samples was verified with the Agilent 2100 Bioanalyzer. Single read (1×50 bp) sequencing of the libraries was carried out at the Illumina HiSeq4000. Reads were mapped to the mouse genome (mm10) using TopHat v2.0.13 with a RefSeq transcriptome index. Unique reads were counted in RefSeq genes with HTSeq v0.7.2 (parameters –t exon –s reverse), and differentially

expressed genes were determined using DESeq2 v1.16.1 (fold change > 2, p value < 0,05). The FPKM values were generated using DESeq2. Genes with differential expression in latent pain sensitized animals (CFA group compared to both saline and CFA + RF3286 groups) were then included in pathway analysis to infer their functional roles and relationships. Gene ontology enrichment analysis of differentially expressed genes was performed using Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) 6.8. (https://david.ncifcrf.gov). 4 animal per group were analyzed.

2.2.8 Data and statistical analysis

Data were expressed and statistical analysis were performed using Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Nociceptive thresholds were expressed as mean \pm SEM (n = 5-10 per group) and analyzed using two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc test. To better visualize hyperalgesic and analgesic time courses, Area Under the Curve (AUC) were calculated with the trapezoidal rule (Célèrier et al., 2000) using the following formula : AUC values were $\Sigma[(Xn-Xm)+(Xn-1-Xm)]x \frac{\text{tn-tn-1}}{2}$ with Xn nociceptive threshold at n, Xm basal nociceptive threshold , and tn-tn-1 interval time between nociceptive test at n and n-1 (in minutes or in days), AUC in arbitrary units (a.u.). AUC and relative fold change in qPCR ($2^{-\Delta\Delta CT}$) were analyzed using one way ANOVA followed by Tukey post hoc test. Results were considered statistically different if *p < 0,05, **p < 0,01 et ***p < 0,001.

3 Results

3.1 NPFF1R and NPFF2R are involved in development and maintenance of opiatesinduced latent pain sensitization

To study the involvement of both NPFF receptors (NPFF1R and NPFF2R) in fentanyl- and morphine-induced hyperalgesia, and latent pain sensitization, we evaluated the consequences of their pharmacological blockade in mice with RF9, a compound that display high affinity for and good antagonist activity at both receptor subtypes (Simonin et al., 2006).

Mice were administered with morphine (10 mg/kg, s.c.,) once a day for 9 consecutive days and the nociceptive threshold of the animals was measured every day before morphine administration. This resulted in a progressive decrease of the nociceptive threshold of morphine-treated mice that started to be significantly different from saline-treated animals at D5 (fig. 1A, morphine: $4,93 \pm 0,77$ sec vs. saline: $6,86 \pm 2,15$ sec, p < 0,05). Hyperalgesia was maximal at D9 (the day after the last morphine administration, fig. 1A, morphine: $3,92 \pm$ 0,83 sec vs. saline: 7,18 \pm 2,54 sec, p < 0,001) and then progressively resolves until D27 (fig. 1A, morphine: $7,09 \pm 1,45$ sec vs. saline: $7,2 \pm 2,3$ sec, ns). Mice that were administered with RF9 before each administration of morphine did not show any decrease of their nociceptive threshold (fig. 1B, D0-D27, morphine + RF9 : -22.5 ± 32.3 a.u. vs. saline: -2.7 ± 35.6 a.u., ns), indicating that repetitive blockade of NPFF1R and NPFF2R by their antagonist RF9 prevented the development of morphine-induced hyperalgesia in those animals. At D28, all groups received an injection of the opioid receptor antagonist naltrexone (NTX, 5 mg/kg, s.c.) and the nociceptive threshold of animals was measured over a 6h period. NTX had no effect in saline-treated mice but induced a transitory phase of hyperalgesia for 4 hrs (fig. 1A, t = 120) min, morphine: $5,26 \pm 1,25$ sec vs. saline: $7,63 \pm 1,54$ sec, p < 0,01; t = 240 min, morphine: $5,31 \pm 1,86$ sec vs. saline: $7,12 \pm 1,29$ sec, p < 0,05) in morphine-treated animals with a maximal intensity at 30 min. These results indicated that a chronic opioid treatment leads to the development of a phenomenon of latent pain sensitization as previously described (Célèrier et al., 2001). In the same group, NTX also induced a significant hyperalgesia at day 34 but reduced in duration (fig. 1A, t = 30 min, morphine: $5,11 \pm 1,92$ sec vs. saline: $6,88 \pm$ 1,43 sec, p < 0,05) while at D41 there was no statistical difference between saline- and morphine-treated animals (fig. 1A, t = 30 min, morphine: $5,75 \pm 1,68$ sec vs. saline: $7,03 \pm$ 1,56 sec, ns). This result indicates that latent pain sensitization induced by chronic morphine, although long-lasting, attenuates progressively and is therefore not irreversible. Mice that were co-administered with RF9 and morphine displayed no NTX-induced hyperalgesia at D28 (fig. 1A, t = 30 - 150 min, morphine + RF9 vs. saline, ns), D34 (fig. 1A, t = 30 - 150 min, morphine + RF9 vs. saline, ns) and D41 (fig. 1A, t = 30 - 150 min, morphine + RF9 vs. saline, ns). This result suggests that NPFF1R and NPFF2R are involved in the establishment of morphine-induced latent pain sensitization.

In a separate experiment, mice were administered with morphine (10 mg/kg, s.c.) from D1 to D8 to cause morphine-induced hyperalgesia as described above (fig. 2A and fig. 2B, AUC D0-D23, morphine: $-53,7 \pm 9,4$ a.u. vs. saline: $-8,61 \pm 17,1$ a.u., p < 0,001). Mice were then allowed to recover and returned to their basal nociceptive threshold at D23 (fig. 2A, morphine: $4,72 \pm 0,93$ sec vs. saline: $5,96 \pm 1,65$ sec, ns). At D30, D31 and D32 a group of mice received RF9 (5 mg/kg, s.c.) and then all groups were administered with NTX (5 mg/kg, s.c.) followed by measurement of nociceptive thresholds for 150 min to reveal latent pain sensitization. At D30, D31 and D32, morphine treated mice showed NTX-induced hyperalgesia that peaked at 60 min (fig. 2A, D30, morphine: $4,86 \pm 0,97$ sec vs. saline: $8,35 \pm 1,93$ sec, p < 0,001; D31, morphine: $5,24 \pm 0,82$ sec vs. saline: $8,82 \pm 0,97$ sec, p < 0,001; D32, morphine: $4,71 \pm 1,15$

sec vs. saline: $8,58 \pm 1,58$ sec, p < 0,001) and lasted more than 150 min, indicating that morphine-induced latent pain sensitization established in this group. At D30, NTX induced similar hyperalgesia in both morphine + RF9 and morphine groups (fig. 2A and fig. 2B, AUC D30, morphine + RF9: $-8,16 \pm 4$ a.u. vs. morphine: $-7,09 \pm 5,17$ a.u., ns) indicating that acute pharmacological blockade of NPFF1R and NPFF2R had no significant effect on morphine-induced latent pain sensitization. At D31, NTX induced hyperalgesia that was less intense at 60, 120 and 150 min in the morphine/RF9 group compared to morphine group, although not significantly (fig. 2A and fig. 2B, AUC D31, morphine + RF9: $-6,58 \pm 3,38$ a.u. vs. morphine: $-7,05 \pm 4,9$ a.u., ns) and was completely absent in morphine + RF9 group at D32 (fig. 2A and fig. 2B, AUC D32, morphine + RF9: $-2,37 \pm 3,89$ a.u. vs. saline: $-1,60 \pm 3,41$ a.u., ns; morphine + RF9: $-2,37 \pm 3,89$ a.u. vs. morphine: $-9,49 \pm 4,05$ a.u., p < 0,05) indicating that 3 days of RF9 treatment progressively but completely reverses latent pain sensitization induced by chronic morphine administration. This result suggests that activation of NPFF1R and NPFF2R is essential for the maintenance of this phenomenon.

We next wanted to extend our observations to another model of latent pain sensitization induced by acute fentanyl. Fentanyl administration (4x60 µg/kg, s.c.) induced analgesia that was maximal 60 min following the injection and lasted for 3 hrs (fig. 3A and 3B, AUC D0, fentanyl: $-1862,4 \pm 323,03$ a.u. vs. saline: $-53,25 \pm 257,5$ a.u., p < 0,001). Nociceptive thresholds from control group administered with saline were unchanged. Co-administration of RF9 with fentanyl slightly potentiated this analgesia with a longer tail withdrawal latency at 120 min compared with the fentanyl group (fig. 3A, fentanyl + RF9: $21,54 \pm 2,06$ sec vs. fentanyl: $16,36 \pm 1,88$ sec, p < 0,001). At D1, mice administered with fentanyl alone showed a decrease of their nociceptive threshold (hyperalgesia) that progressively resolved at D4 (fig. 3B, AUC D1-D4, fentanyl: -19440 ± 8366 a.u. vs. saline: -3600 ± 4970 a.u., p < 0,001). From D1 to D4, fentanyl + RF9 treated mice had nociceptive thresholds comparable to those of the saline group (fig. 3B, AUC D1-D4, fentanyl + RF9: -17552 ± 4775 a.u. vs. saline: $-36000 \pm$ 4970 a.u., ns), indicating that co-administration of RF9 with fentanyl prevented fentanylinduced hyperalgesia. At D11, all groups were administered with NTX (5 mg/kg, s.c.) and nociceptive threshold of the animals was measured during 6 hrs to assess latent pain sensitization establishment. As expected, NTX administration had no effect on nociceptive threshold of saline group but induced a transitory phase of hyperalgesia that peaked at 30 min following NTX administration (fig. 3A, fentanyl: $2,11 \pm 0,55$ sec vs. saline: $6,6 \pm 1,15$ sec, p < 0,001) and lasted for approximately 5 hrs in the fentanyl-treated mice (fig. 3A and 3B, AUC D11, fentanyl: $-1023,45 \pm 294,15$ a.u. vs. saline: $4,88 \pm 297,36$ a.u., p < 0,001), indicating that acute fentanyl administration led to the development of latent pain sensitization. Mice from fentanyl + RF9 group did not show NTX-induced hyperalgesia (fig. 3B, AUC D11, fentanyl + RF9: $-101,78 \pm 231,84$ a.u. vs. saline: $4,88 \pm 297,36$ a.u., ns ; fentanyl + RF9: $-101,78 \pm 231,84$ a.u. vs. saline: $4,88 \pm 297,36$ a.u., ns ; fentanyl + RF9: $-101,78 \pm 231,84$ a.u. vs. fentanyl: $-1023,45 \pm 294,15$ a.u., p < 0,001) showing that fentanyl-induced latent pain sensitization was prevented by pharmacological blockade of NPFF1R and NPFF2R. Similar results were obtained at D18 (fig. 3B, AUC D18, fentanyl + RF9: $140,57 \pm 402,15$ a.u. vs. fentanyl: $-1222,2 \pm 272,86$ a.u., p < 0,001) suggesting that reversion of fentanyl-induced latent pain sensitization by RF9 was long-lasting.

In the same experiment, we wanted to evaluate NPFF1R and NPFF2R involvement in latent pain sensitization maintenance. Mice were administered with fentanyl, analgesia was measured (fig. 3A, t = 60 - 240 min) and mice were allowed to recover from fentanyl-induced hyperalgesia (fig. 4B, AUC D1-D4, fentanyl: -19440 ± 8366 a.u. vs. saline: -3600 ± 4970 a.u., p < 0.001). Following return to nociceptive basal threshold, a group of mice was treated with RF9 (5 mg/kg, s.c.). Based on the results from the latent pain sensitization reversal by RF9 within 3 days of treatment in the morphine model, we choose to administer RF9 (5 mg/kg, s.c.) for 4 successive days. At D11, nociceptive threshold of the animals was evaluated after NTX administration (5 mg/kg, s.c.) during a period of 6h. As previously observed, latent pain sensitization developed in fentanyl-treated mice, as revealed by the decrease of tail withdrawal latencies of the animals following NTX administration but did not in the saline-treated group (fig. 4B, AUC D11, fentanyl: $-1023,45 \pm 294,15$ a.u. vs. saline: $4,87 \pm 297,36$ a.u., p < 0,001). Fentanyl + RF9 group did not show NTX-induced hyperalgesia at D11 (fig. 4B, AUC D11, fentanyl + RF9: $-161,33 \pm 587,69$ a.u. vs. saline: $-4,87 \pm 297,36$ a.u., ns ; fentanyl + RF9: - $161,33 \pm 587,69$ a.u. vs. fentanyl: $-1023,45 \pm 294,15$ a.u., p < 0,001). Thus, pharmacological blockade of NPFF1R and NPFF2R by RF9 completely reversed latent pain sensitization even after its establishment. Similar results were obtained following NTX administration at D18 (fig. 4B, AUC D18, fentanyl + RF9: $71,33 \pm 323,18$ a.u. vs. saline: $-212,81 \pm 354,3$ a.u., ns ; fentanyl + RF9: 71,33 \pm 323,18 a.u. vs. fentanyl: -1222,2 \pm 272,86 a.u., p < 0,001) and D25 (fig. 4B, AUC D25, fentanyl + RF9: $-159,5 \pm 217,46$ a.u. vs. saline: $-193,5 \pm 231,9$ a.u., ns ; fentanyl + RF9: $159,5 \pm 217,46$ a.u. vs. fentanyl: $-1320,45 \pm 479,83$ a.u., p < 0,001). These results indicate that blockade of NPFF1R and NPFF2R on a short period of time (4 consecutive days) can completely reverse latent pain sensitization for at least 14 days.

3.2 Effect of selective NPFF1R blockade by RF1359 on fentanyl-induced latent pain sensitization

We then wanted to evaluate the specific involvement of NPFF1R in latent pain sensitization development and maintenance. To this purpose we used RF1359, a heterocyclic compound that we recently developed and displays selective antagonist activity at this receptor versus NPFF2R (Schmitt et al., 2018).

Mice were administered with fentanyl (4x60 μ g/kg, s.c.) that induced an analgesia that was maximal at 60 min following its administration and lasted for approximately 2 hrs (fig. 5A). Mice co-administered with RF1359 at 0,2 mg/kg (s.c.) had a similar analgesia compared to fentanyl group (fig. 5A, t = 60', fentanyl + RF1359 0,2 mg/kg : 14.9 ± 1.75 sec vs. fentanyl: $15,39 \pm 2,10$ sec, ns), while 1 or 5 mg/kg of RF1359 (s.c.) slightly potentiated fentanyl analgesia (fig. 5A, $t = 60^{\circ}$, fentanyl + RF1359 1 mg/kg: 19,21 ± 3,44 sec vs. fentanyl: 15,39 $\pm 2,10 \text{ sec}, p < 0,001$; fentanyl + RF1359 5 mg/kg : 18,06 $\pm 4,27 \text{ sec vs. fentanyl}$: 15,39 \pm 2,10 sec, p < 0,05). As expected, at D1 mice administered with fentanyl alone showed a decrease of their nociceptive threshold (hyperalgesia) that progressively resolved at D4. In mice treated with RF1359, fentanyl-induced hyperalgesia was dose-dependently attenuated as compared to fentanyl group (fig. 5B, AUC D1-D4, fentanyl + RF1359 0,2 mg/kg : $14,91 \pm$ 1,75 a.u. vs. fentanyl : $15,39 \pm 2,1$ a.u., ns ; fentanyl + RF1359 1 mg/kg : $19,21 \pm 3,44$ a.u. vs. fentanyl : $15,39 \pm 2,1$ a.u., p < 0,001) and was completely blocked by 5 mg/kg of RF1359 (fig. 5B, AUC D1-D4, fentanyl + RF1359 5 mg/kg : $18,06 \pm 4,27$ a.u. vs. fentanyl : $15,39 \pm 2,1$ a.u., p < 0.001). These results indicates that NPFFR1 displays anti-opioid properties as shown recently (Quillet et al., 2021).

At D8 and D15, all groups were administered with NTX (5 mg/kg, s.c.) and nociceptive threshold of the animals was measured during a 6 hrs period to visualize latent pain sensitization. NTX administration induced a transitory phase of hyperalgesia that peaked at 30 min following NTX administration and lasted approximately 6 hrs in fentanyl-treated mice. In mice that received 0,2 or 1 mg/kg RF1359, NTX-induced hyperalgesia was weaker compared to fentanyl group at D8 (fig. 5B, AUC D8, fentanyl + RF1359 0,2 mg/kg: -9,93 ± 16,13 a.u. vs. fentanyl: -19,56 ± 6,81 a.u., ns ; fentanyl + RF1359 1 mg/kg: -4,56 ± 10,04 a.u. vs. fentanyl: -19,56 ± 6,81 a.u., ns ; fentanyl + RF1359 1 mg/kg: -4,56 ± 10,04 a.u. vs. fentanyl: -17,92 ± 10,02 a.u., ns ; fentanyl + RF1359 1 mg/kg: -3,19 ± 7,9 a.u. vs. fentanyl: -17,92 ± 10,02 a.u., ns) while it was absent in animals co-administrated with fentanyl and 5 mg/kg RF1359 (fig. 5B, AUC D8, fentanyl + RF1359 5 mg/kg : 0,14 ± 11,93 a.u. vs. fentanyl: -19,56 ± 6,81 a.u., p < 0,05) and D15 (fig. 5B, AUC D15, fentanyl + RF1359 5 mg/kg : 0,14 ± 11,93 a.u. vs. fentanyl: -19,56 ± 6,81 a.u., p < 0,05) and D15 (fig. 5B, AUC D15, fentanyl + RF1359 5 mg/kg : 0,14 ± 11,93 a.u. vs. fentanyl: -19,56 ± 6,81 a.u., p < 0,05) and D15 (fig. 5B, AUC D15, fentanyl + RF1359 5 mg/kg : 0,14 ± 11,93 a.u. vs. fentanyl: -19,56 ± 6,81 a.u., p < 0,05) and D15 (fig. 5B, AUC D15, fentanyl + RF1359 5 mg/kg : 0,14 ± 11,93 a.u. vs. fentanyl: -19,56 ± 6,81 a.u., p < 0,05) and D15 (fig. 5B, AUC D15, fentanyl + RF1359 5 mg/kg : 0,14 ± 11,93 a.u. vs. fentanyl: -19,56 ± 6,81 a.u., p < 0,05) and D15 (fig. 5B, AUC D15, fentanyl + RF1359 5 mg/kg : 0,14 ± 11,93 a.u. vs. fentanyl: -19,56 ± 6,81 a.u., p < 0,05) and D15 (fig. 5B, AUC D15, fentanyl + 11,93 a.u. vs. fentanyl: -19,56 ± 6,81 a.u., p < 0,05) and D15 (fig. 5B, AUC D15, fentanyl + 11,93 a.u. vs. fentanyl: -19,56 ± 6,81 a.u., p < 0,05) and D15 (fig. 5B, AUC D15, fentanyl + 11,93 a.u. vs. fentanyl = -19,56 ± 6,81 a.u., p < 0,05) and D15 (fig. 5B, AUC D15, fentanyl + 11,93 a.

RF1359 5 mg/kg : 0.5 ± 9.17 a.u. vs. fentanyl : -17.92 ± 10.02 a.u., p < 0.05). These results indicate that NPFF1R is involved not only in the development of fentanyl-induced hyperalgesia but also in the establishment of fentanyl-induced latent pain sensitization.

3.3 NPFF1R is involved in inflammatory-induced latent pain sensitization development and maintenance

We then studied the involvement of NPFF1R on carrageenan-induced latent pain sensitization using our recently characterized selective antagonist of this receptor, RF3286 (Quillet et al., 2021) that is structurally different from RF1359. Carrageenan was injected in the tail of mice at D0 and nociceptive thresholds were measured at 6h and from D1 to D4.

While saline administration had no effect on the nociceptive threshold of the animals, carrageenan induced a hyperalgesia at 6h (fig. 6A, carrageenan: $7,39 \pm 0,59$ sec vs. saline: $9,59 \pm 0,29$ sec, p < 0,001), that progressively resolved within 4 days (fig. 6A, carrageenan: $9,67 \pm 0,50$ sec vs. saline: $9,54 \pm 0,29$ sec, ns). Carrageenan group treated with RF3286 (1 mg/kg, s.c., 3 times a day from D0 to D4) display a similar inflammatory-induced hyperalgesia than carrageenan-treated mice (fig. 6B, AUC D0-D4, carrageenan + RF3286: $-81,16 \pm 13,51$ a.u. vs. carrageenan: $-69,46 \pm 14,44$ a.u., ns) except at D1 where it was slightly increased (fig. 6A, carrageenan + RF3286: 7,51 \pm 0,36 sec vs. carrageenan: 8,07 \pm 0,76 sec, p < 0,05). At D9, NTX (5 mg/kg, s.c.) was administered and the nociceptive threshold of the animals was measured over a 6h period to visualize latent pain sensitization in all groups. NTX did not change nociceptive thresholds of saline group but induced a transitory phase of hyperalgesia in carrageenan group (fig. 6B, AUC D9, carrageenan: $-11,10 \pm 3,56$ a.u. vs. saline: $-0,18 \pm$ 3,91 a.u., p < 0.001), indicating that inflammatory-induced hyperalgesia led to the establishment of latent pain sensitization. In mice treated with RF3286 from D0 to D4, NTXinduced hyperalgesia was observed (fig. 6B, AUCD9, carrageenan + RF3286: $-4,56 \pm 3,73$ a.u. vs. saline: -0.18 ± 3.91 a.u., p < 0.01), but was greatly diminished compared to carrageenan group (fig. 6A and 6B, AUCD9, carrageenan + RF3286: $-4,56 \pm 3,73$ a.u. vs. carrageenan: $-11,10 \pm 3,56$ a.u., p < 0,05). These data show that repeated pharmacological blockade of NPFF1R by RF3286 had no effect on carrageenan-induced hyperalgesia but prevented and attenuated latent pain sensitization development, suggesting that activation of NPFF1R is not necessary to primary hyperalgesia induced by carrageenan but is essential to the establishment of resulting latent pain sensitization process.

We then sought to confirm NPFF1R involvement in latent pain sensitization using genetical blockade of this receptor. To this purpose, we examined carrageenan-induced latent

pain sensitization development in NPFF1R knock-out (KO) mice. Wild Type (WT) and KO mice display similar nociceptive thresholds before carrageenan administration (fig. 7A, WT saline: 9,24 \pm 0,68 sec vs. WT carrageenan: 9,32 \pm 0,45 sec vs. KO NPFF1R saline: 9,34 \pm 0,28 sec vs. KO NPPF1R carrageenan: 9,4 \pm 0,28 sec, ns), indicating that NPFF1R receptor deletion has no effect on basal nociceptive threshold of mice. While saline administration did not change nociceptive thresholds in WT and KO NPFF1R mice, WT mice that received carrageenan developed a hyperalgesia within 6h (fig. 7A, WT carrageenan: 7,07 \pm 0,67 sec vs. WT saline: 9,26 \pm 0,73 sec, p < 0,001) that resolved at D3 (fig. 7A, WT carrageenan: 9,12 \pm 0,69 sec vs. WT saline: 9,33 \pm 0,74 sec, ns). Carrageenan-induced hyperalgesia was greatly reduced in NPFF1R KO compared to WT mice (Fig 7A and 7B, AUC D0-D3, KO NPFF1R carrageenan: -26,71 \pm 23,24 a.u. vs. KO NPFF1R saline: -6,81 \pm 10,39 a.u., ns ; KO NPFF1R carrageenan: -26,71 \pm 23,24 a.u. vs. WT carrageenan: -57,19 \pm 19,5 a.u., p < 0,01) and was only significant at D1 (fig. 7A, KO NPFF1R carrageenan : 8,47 \pm 0,93 sec vs. KO NPFF1R saline : 9,32 \pm 0,5 sec) indicating that NPFF1R is critically involved in hyperalgesia induced by carrageenan.

At D4, all groups received an administration of NTX (5 mg/kg, s.c.) to visualize latent pain sensitization. In WT and NPFF1R KO saline groups NTX had no effect while hyperalgesia was observed in WT carrageenan group (fig. 7B, AUC D4, WT carrageenan: $-8,67 \pm 3,08$ a.u. vs. WT saline: $-0,01 \pm 3,15$ a.u., p < 0,001). As expected from our results of pharmacological blockade (fig. 6), NTX-induced hyperalgesia was absent in NPFF1R KO mice that received carrageenan (fig. 7B, AUC D4, KO NPFF1R carrageenan: $1,06 \pm 4,71$ a.u. vs. KO NPFF1R saline: $0,12 \pm 2,72$ a.u., ns ; KO NPFF1R carrageenan: $1,06 \pm 4,71$ a.u. vs. WT carrageenan: $8,67 \pm 3,08$ a.u., p < 0,001). This result confirms that NPFF1R is mandatory for the establishment of latent pain sensitization following administration of an inflammatory agent.

To investigate NPFF1R involvement in the maintenance of latent pain sensitization, we examined the consequences of pharmacological blockade of this receptor in mice after the establishment of this phenomenon. Mice were administered with carrageenan and RF3286 (1 mg/kg, s.c., 3 times a day) was administered during several days once they had recovered from inflammatory-induced hyperalgesia. We assessed the consequences of RF3286 treatment on latent pain sensitization by administering everyday NTX (5 mg/kg, s.c.) and measuring the nociceptive threshold of the animals over a 2h period (fig. 8A).

As expected, in animals that were treated with carrageenan alone we observed the development of latent pain sensitization after hyperalgesia resolved from D5 to D9 (fig.8A

and fig. 8B, AUC D5, carrageenan: $-6,6 \pm 1,67$ a.u. vs. saline: $-1,05 \pm 1,74$ a.u., p < 0,001; AUC D6, carrageenan: -6.91 ± 1.69 a.u. vs. saline: -0.84 ± 2.17 a.u., p < 0.001; AUC D7, carrageenan: $-6,51 \pm 1,57$ a.u. vs. saline: $0,43 \pm 1,5$ a.u., p < 0,001; AUC D8, carrageenan: - $5,57 \pm 1,35$ a.u. vs. saline : $0,13 \pm 1,51$ a.u., p < 0,001; AUC D9, carrageenan: $-7 \pm 1,44$ a.u. vs. saline: -0.22 ± 1.57 , a.u., p < 0.001). At D5, NTX-induced hyperalgesia was similar between carrageenan and carrageenan + RF3286 groups (fig. 8A and fig. 8B, AUC D5, carrageenan + RF3286: $-7 \pm 2,27$ a.u. vs. carrageenan: $-6,6 \pm 1,67$ a.u., ns). From D6 to D8, NTX-induced hyperalgesia progressively decreases compared to carrageenan group (fig. 8A and fig. 8B, AUC D6, carrageenan + RF3286: $-5,98 \pm 2,29$ a.u. vs. carrageenan: $-6,91 \pm 1,69$ a.u., ns; AUC D7, carrageenan + RF3286: $-2,59 \pm 1,87$ a.u. vs. carrageenan: $-6,51 \pm 1,57$ a.u., p < 0.001; AUC D8, carrageenan + RF3286: -0.45 ± 1.45 a.u. vs. carrageenan: -5.57 ± 1.35 a.u., p < 0,001) while at D9, NTX-induced hyperalgesia was completely abolished by RF3286 (fig. 8A and fig. 8B, AUC D9, carrageenan + RF3286: -0.34 ± 2.35 a.u. vs. carrageenan: -6.99 \pm 1,44 a.u., p < 0,001; carrageenan + RF3286: -0,34 \pm 2,35 a.u. vs. saline: -0,22 \pm 1,57 a.u., ns). Similar results were obtained in female mice with RF3286 (fig. S1) and with the other NPFF1R antagonist RF1359 (fig. 8E and 8F) after only 3 days of treatment. Altogether these data show that repeated pharmacological blockade of NPFF1R by two structurally different highly selective NPFF1R antagonists (RF3286 and RF1359) completely reversed latent pain sensitization induced by carrageenan. In this model, long-term consequences of RF3286 treatment on latent pain sensitization was further assessed in male mice at D20 following NTX administration or by forced swim stress, as latent pain sensitization can also be revealed by an acute stress (Le Roy et al., 2011; Rivat et al., 2007). NTX-induced hyperalgesia was observed in carrageenan group but not in carrageenan group treated with RF3286 from D5 to D9 (fig. 8C and 8D, AUC D20, carrageenan + NTX: $-13,78 \pm 3,8$ a.u. vs. saline + NTX: $0,48 \pm 3$ a.u., p < 0.001). Importantly, forced swim stress also precipitated hyperalgesia (fig. 8C and 8D, AUC D20, carrageenan + stress: $-13,31 \pm 4,47$ a.u. vs. saline + stress: $-0,36 \pm 3,91$ a.u., p < 0,001) in a comparable manner to NTX (fig. 8C and 8D, AUC D20, carrageenan + NTX: - $13,78 \pm 3,8$ a.u., vs. carrageenan + stress: $-13,31 \pm 4,47$ a.u., ns). These data clearly indicate that latent pain sensitization reversal by blockade of NPFF1R is long-lasting, suggesting that activation of this receptor is not only involved in the expression of latent pain sensitization but also in the mechanisms that are responsible for the long-term maintenance of this phenomenon.

We next wanted to extend our observations to another model of inflammatory pain. Mice were administered with CFA in the tail and nociceptive thresholds were measured at different time intervals (fig. 9). While saline had no effect on nociceptive threshold of control mice, CFA administration induced a hyperalgesia that fully developed within 5 days (fig. 9A, CFA: $5,6 \pm 0,89$ sec vs. saline: $9,66 \pm 0,4$ sec, p < 0,001) and lasted for 35 days (fig. 9A, CFA: $9,55 \pm 0,58$ sec vs. saline: $10,91 \pm 0,78$ sec, ns). Following resolution of hyperalgesia (D35), a group of mice was administered with RF3286 (1 mg/kg, s.c., 3 times a day) and its effect on latent pain sensitization was assessed using NTX (5 mg/kg, s.c.).

In CFA group, NTX induced a transitory phase of hyperalgesia from D51 to D56 (fig. 9A and 9B, AUC D51, CFA: -5,47 ± 1,20 a.u. vs. saline: -0,62 ± 1,47 a.u., p < 0,001; AUC D52, CFA: $-6,12 \pm 0,78$ a.u. vs. saline: $-0,88 \pm 1,39$ a.u., p < 0,001; AUC D53, CFA: $-6,65 \pm 0,88$ a.u. vs. saline: $-1,17 \pm 1,55$ a.u., p < 0,001; AUC D54, CFA: $-4,63 \pm 1,13$ a.u. vs. saline: -0,75 \pm 1,21 a.u., p < 0,001; AUC D55, CFA: -4,4 \pm 0,55 a.u. vs. saline: -0,79 \pm 1,08 a.u., p < 0,001; AUC D56, CFA: $-4,67 \pm 1,51$ a.u. vs. saline: $0,05 \pm 1,17$ a.u., p < 0,001) while it had no effect in saline group, indicating that CFA-induced hyperalgesia led to the establishment of latent pain sensitization. At D51, animals that received CFA or CFA + RF3286 displayed similar NTX-induced hyperalgesia (fig. 9A and 9B, AUC D51, CFA + RF3286: $-5,61 \pm 1,25$ a.u. vs. CFA: $-5,47 \pm 1,20$ a.u., ns). From D52 to D55, NTX-induced hyperalgesia was progressively attenuated by RF3286 treatment compared to CFA group (fig. 9A and 9B, AUC D52, CFA + RF3286: -4,28 ± 1,02 a.u. vs. CFA: -6,12 ± 0,78 a.u., p < 0,01; AUC D53, CFA + RF3286: - $3,84 \pm 1,02$ a.u. vs. CFA: -6,65 ± 0,88 a.u., p < 0,001; AUC D54, CFA + RF3286: -1,75 ± 0,73 a.u. vs. CFA: -4,63 ± 1,13 a.u., p < 0,001; AUC D55, CFA + RF3286: -1,42 ± 0,95 a.u. vs. CFA: -4.4 ± 0.55 a.u., p < 0.001). At D56, NTX-induced hyperalgesia was completely abolished by repeated RF3286 administrations (fig. 9B, AUC D56, CFA + RF3286: $0.06 \pm$ 0,79 a.u. vs. CFA: -4,67 \pm 1,51 a.u., p < 0,001; CFA + RF3286: 0,06 \pm 0,79 a.u. vs. saline: - 0.05 ± 1.17 a.u., ns). These results show that repeated pharmacological blockade of NPFF1R by RF3286 over several days is necessary to completely reverse pain sensitization state induced by CFA.

From D71, NTX challenge was performed every two weeks to assess the persistence of latent pain sensitization induced by CFA and long-term consequences of the RF3286 treatment on this phenomenon. In CFA-treated group, NTX-induced hyperalgesia was similar at D71, D85, D99, and D113 with a peak at 30 min (fig. 9C, tail withdrawal latency of approximately 7 sec) and a duration of 6h. From D128, NTX-induced hyperalgesia was progressively attenuated in intensity and duration until complete disappearance at D225 (fig. 9A, t = 30 min, CFA: 9,42 ± 0,78 sec vs. saline: 9,9 ± 0,48 sec, ns). Animals that were treated with RF3286 from D51 to D56 and in which latent pain sensitization was abolished (fig. 9A)

displayed no significant NTX-induced hyperalgesia until the end of the experiment (fig. 9C). Overall, these results show that latent pain sensitization induced by CFA is a very long-lasting (between 211 and 225 days after a single CFA administration) but not irreversible phenomenon. Moreover, a six days treatment with RF3286 completely and definitively reverses this phenomenon highlighting the critical role of NPFF1R in the maintenance of latent pain sensitization and underlying mechanisms.

3.4 Spinal differential expressed genes analysis by RNA-sequencing

We next sought to identify the mechanism that underlie the maintenance of latent pain sensitization at the level of the spinal cord. To this purpose, we used RNA-sequencing to explore gene expression changes associated with latent pain sensitization. In a separate experiment, mice were administered with CFA and once inflammatory-induced hyperalgesia was resolved, a group of animals was treated with RF3286 for 6 consecutive days as described in figure 9A. The day after, lumbar spinal cords (L4-L6) were harvested and RNAs were purified to perform RNA-sequencing analysis. Latent pain sensitization establishment and its reversal by RF3286 was verified by administration of NTX and nociceptive threshold measurement at the end of RF3286 treatment in a small group of mice belonging to the same cohort but were not used for RNA-sequencing analysis (data not shown).

Differential expressed genes (DEGs) were selected using the following criteria: fold change > 2 and p-value < 0.05. As shown in figure 10, RNA-sequencing of spinal RNAs revealed approximately 55 genes significantly overexpressed in mice that had developed latent pain sensitization after CFA administration (CFA group vs. saline group and fig. S2). Intriguingly, none of these genes were known to be involved in pain processing except Ccl12 (Chemokine (C-C motif) ligand 12). Similarly, only 2 (Gabra6 (Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-6)) and Kcnj4 (Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, *member 4*) among the 55 genes were known to be specifically involved in neuronal function and most of the others were associated or involved in immune response, such as C1s2 (Complement component 1, subcomponent 2) or Ill8rap (Interleukin-18 receptor accessory protein). To confirm these observations, we submitted this list of 55 genes to gene ontology analysis using DAVID tool. As expected, gene ontology pathways associated with these genes were significatively enriched in inflammatory processes related functions, such as leukocyte migration, defense response to bacterium or neutrophil aggregation (fig. 11). These results suggest the existence of a phenomenon of latent inflammation within the spinal cord that would underlie the maintenance of latent pain sensitization.

Among those 55 genes, we identified 13 transcripts whose upregulation was reversed by RF3286 (fig. 10, black arrow) including *Cdh26* (Cadherin-like protein 26), *Itg2bl* (Integrin β -2-like protein), *Elane* (Elastase neutrophil expressed), *Cd177* (CD177 antigen), *Mpo* (Myeloperoxidase), *Abca13* (ATP-binding cassette sub-family A member 13), *Mmp8* (Neutrophil collagenase or matrix metalloproteinase-8) *Retnlg* (Resistin-like γ), *Chil3* (Chitinase-like 3), *Camp* (Cathelicidin antimicrobial peptide), *Mir6982* (micro RNA 6982 whose target is currently unknown), *s100a8* (S100A8 protein) and *s100a9* (S100A9 protein). Those results further suggest that upregulation of these genes is linked to NPFF1R activation and could therefore be critical for the maintenance of latent pain sensitization. Of note, no genes were found significantly downregulated (fold change $\leq 0,5$ and p-value $\leq 0,05$) in this model.

3.5 Latent pain sensitization is maintained by a latent inflammation

Based on RNA-sequencing experiment results, we next wanted to evaluate the involvement of inflammatory processes in latent pain sensitization development and maintenance. To this aim, we investigated the consequences of preventive and curative treatments with two different compounds known for their anti-inflammatory properties, ibuprofen and Nacetylcysteine, in the carrageenan inflammatory pain model in mice.

In a first experiment, carrageenan was injected in the tail of mice at D0 and nociceptive thresholds were measured 6 hrs later and from D1 to D4. As described above, carrageenan induced a short hyperalgesia that last over 4 days (fig. 12A and B, AUC D0-D3, carrageenan: $98,04 \pm 24,49$ a.u. vs. saline: $2,18 \pm 21,91$ a.u., p < 0,001). As expected, ibuprofen treatment (100 mg/kg, i.p., once a day) from D0 to D3 completely prevented carrageenan-induced hyperalgesia (fig. 12A and B, AUC D0-D3, carrageenan + ibuprofen preventive: $1,64 \pm 15,86$ a.u. vs. carrageenan: $98,04 \pm 24,49$ a.u., p < 0,001; AUC D0-D3, carrageenan + ibuprofen preventive: $1,64 \pm 15,86$ a.u. vs. saline: $2,18 \pm 21,91$ a.u., ns), confirming its antiinflammatory properties at this dose in our model. Once hyperalgesia was resolved, another group of mice was treated with ibuprofen (100 mg/kg, i.p. once a day) at D8 and D9 and latent pain sensitization was evidenced by NTX administration and measurement of the nociceptive threshold of the animals during a period of 6 hrs. As described above, carrageenan-injected animals developed latent pain sensitization as evaluated at D8 and D9 (fig. 12A and B, AUC D8, carrageenan: $-8,79 \pm 1,97$ a.u. vs. saline: $0,67 \pm 1,05$ a.u., p < 0,001; AUC D9, carrageenan: $-10,14 \pm 0,93$ a.u. vs. saline: $0,13 \pm 1,50$ a.u., p < 0,001). Preventive ibuprofentreated mice showed no NTX-induced hyperalgesia at D8 and D9 (fig. 12A and B, AUC D8, carrageenan + ibuprofen preventive: $-0,55 \pm 1,51$ a.u. vs. saline: $0,67 \pm 1,05$ a.u., ns; AUC D9, carrageenan + ibuprofen preventive: $-1,25 \pm 1,64$ a.u. vs. saline: $0,13 \pm 1,50$ a.u., ns) confirming that a period of primary hyperalgesia is necessary to observe the development of latent pain sensitization. Most interestingly, one curative administration of ibuprofen at D8 was sufficient to abolish NTX-induced hyperalgesia (fig. 12A and B, AUC D8, carrageenan + ibuprofen curative: $-0,93 \pm 1,86$ a.u. vs. saline: $0,67 \pm 1,05$ a.u., ns) and a similar result was observed at D9 (fig. 12A and B, AUC D9, carrageenan + ibuprofen curative: $-1,25 \pm 1,64$ a.u. vs. saline: $0,13 \pm 1,50$ a.u., ns). These data confirm that establishment and maintenance of latent pain sensitization are closely associated with inflammatory processes.

Long-term consequences of ibuprofen (preventive or curative) treatments on latent pain sensitization were assessed at D11, D18 and D25 following NTX administration (without prior ibuprofen administration). Nociceptive thresholds measurement revealed that NTXinduced hyperalgesia was only present in carrageenan group (fig. 12A and B, AUC D11, carrageenan: $-11,46 \pm 1,69$ a.u. vs. saline: $0,11 \pm 2,2$ a.u., p < 0,001; AUC D18, carrageenan: $-9,14 \pm 1,06$ a.u. vs. saline: $0,42 \pm 2,33$ a.u., p < 0,001; AUC D25, carrageenan: $-8,54 \pm 1,62$ a.u. vs. saline : $-0, \pm 2, 11$ a.u., p < 0,001) but not in carrageenan + ibuprofen preventive group (fig. 12A and B, AUC D11, carrageenan + ibuprofen preventive: $-1,59 \pm 2,31$ a.u. vs. saline: $0,11 \pm 2,2$ a.u., ns; AUC D18, carrageenan + ibuprofen preventive: $-0,6 \pm 1,48$ a.u. vs. saline: 0.42 ± 2.33 a.u., ns; AUC D25, carrageenan + ibuprofen preventive: -0.39 ± 0.82 a.u. vs. saline: -0.61 ± 2.11 a.u., ns) and in carrageenan + ibuprofen curative group (fig. 12A and B, AUC D11, carrageenan + ibuprofen curative: -0.38 ± 1.92 a.u. vs. saline: 0.11 ± 2.2 a.u., ns; AUC D18, carrageenan + ibuprofen curative: $-2,05 \pm 2,34$ a.u. vs. saline: $0,42 \pm 2,33$ a.u., ns; AUC D25, carrageenan + ibuprofen curative: $-1,48 \pm 2,52$ a.u. vs. saline: $-0,61 \pm 2,11$ a.u., ns). These results show that reversal of latent pain sensitization by ibuprofen is long-lasting and further suggest that a single administration of this compound is sufficient to normalize over a long time period latent inflammatory processes that underlie the maintenance of latent pain sensitization.

In a second experiment, mice were administered with carrageenan at D0 and N-acetylcysteine (100 mg/kg, i.p., once a day) at D7 and D8 once they had recovered from carrageenan-induced hyperalgesia. Consequences of each N-acetylcysteine administration on latent pain sensitization was assessed by measuring the decrease of nociceptive threshold induced by administration of NTX (5 mg/kg, s.c.). As shown previously, carrageenan induced the development of latent pain sensitization as shown by NTX-induced decrease of nociceptive thresholds in this group at D7 and D8 (fig. 13A and B, AUC D7, carrageenan: -

 $11,07 \pm 1,60$ a.u. vs. saline: $0,30 \pm 1,63$ a.u., p < 0,001; AUC D8, carrageenan: $-10,78 \pm 1,67$ a.u. vs. saline: -0.13 ± 1.30 a.u., p < 0.001). Similarly to what we observed with ibuprofen, Nacetylcysteine (NAC) treated mice showed no NTX-induced hyperalgesia at D7 and D8 (fig. 13A and B, AUC D7, carrageenan + NAC: $-1,15 \pm 2,10$ a.u. vs. saline: $0,30 \pm 1,63$ a.u., ns; AUC D8, carrageenan + NAC: $0,41 \pm 0,99$ a.u. vs. saline: $-0,13 \pm 1,30$ a.u., ns), demonstrating efficient reversal of latent pain sensitization. As N-acetylcysteine has been previously shown to display anti-inflammatory properties (Samuni et al., 2013), these data again indicate that latent pain sensitization might be underlie by latent inflammatory processes. At D11 and D14, NTX (5 mg/kg, s.c.) precipitated hyperalgesia in animals treated with carrageenan alone (fig. 13A and B, AUC D11, carrageenan: $-10,01 \pm 1,14$ a.u. vs. saline: $-0,06 \pm 1,64$ a.u., p < 0,001; AUC D14, carrageenan: $-10,87 \pm 1,22$ a.u. vs. saline: $-0,26 \pm 0,47$ a.u., p < 0,001) but not in animals treated with carrageenan and N-acetylcysteine in the curative mode (fig. 13A and B, AUC D11, carrageenan + NAC: -0.28 ± 1.45 a.u. vs. saline: -0.06 ± 1.64 a.u., ns; AUC D14, carrageenan + NAC: -0.61 ± 1.17 a.u. vs. saline: -0.26 ± 0.47 a.u., ns) suggesting that latent pain sensitization reversal by N-acetylcysteine treatment is long-lasting and might have completely reinitialize latent inflammation underlying latent pain sensitization.

4 Discussion

In this study, we show that both pharmacological and genetic blockade of NPFF1R prevent and reverse latent pain sensitization in different pain models. Together with our previous study (Quillet et al., 2021), these data strongly suggest that this receptor and its endogenous ligand RFRP-3 constitute a new anti-opioid pronociceptive system critically involved in the development and maintenance of latent pain sensitization. We also demonstrated that latent pain sensitization is associated with changes in gene expression in the spinal cord. More specifically, around 50 genes linked to the immune response were found to be overexpressed in spinal cord of sensitized animals and the overexpression of several of them was abolished by NPFF1R antagonist treatment. Finally, using anti-inflammatory compounds, we also evidenced that inflammatory processes are responsible for latent pain sensitization maintenance. Altogether our results strongly suggest that NPFF1R activation is necessary for the establishment and maintenance of latent pain sensitization and might indirectly contribute to latent inflammation that sensitizes nociceptors and leads to latent pain sensitization.

In the present study, we studied latent pain sensitization in several models of pain, including OIH caused by chronic morphine treatment (Roeckel et al., 2017) or by an acute administration of fentanyl (Laulin et al., 2002; Rivat et al., 2002) as well as inflammation

induced by carrageenan (Le Roy et al., 2011) or CFA (Corder et al., 2013; Walwyn et al., 2016). Latent pain sensitization was mostly revealed by naltrexone administration followed by measurement of the nociceptive threshold of the animals (Corder et al., 2013; Walwyn et al., 2016). Another key characteristic of latent pain sensitization is that it can also be precipitated by an acute stress (Le Roy et al., 2011; Rivat et al., 2007). To validate our model, we adapted the protocol of forced swim stress for mice based on the protocol used for rats (Le Roy et al., 2011). A 6 min session of forced swim stress in mice was sufficient to precipitate hyperalgesia that was comparable to that observed following naltrexone administration. However, in our experiments we did not observe any stress-induced analgesia in naive mice, as previously reported in rats (Le Roy et al., 2011; Rivat et al., 2007). This difference could be explained by the difference of rodent species or the temperature used for these experiments. Indeed, when we used a water temperature of 24°C we observed no hyperalgesia induced by stress in carrageenan-treated animals (data not shown). We therefore used a water temperature of 32°C, since at this temperature stress-induced analgesia in naive mice has been shown to be opioid dependent (Amitani et al., 2005), which is also the case for latent pain sensitization (Célèrier et al., 2001).

To further characterize this model, we wanted to assess how long latent pain sensitization can be visualized. We showed that naltrexone-induced hyperalgesia disappears between days 34 and 41 after nine days of morphine exposure and between days 211 and 225 after a single administration of CFA in the tail. In agreement with our data, Corder and collaborators were able to visualize latent pain sensitization following an administration of naltrexone until 105 days after CFA administration in the paw of mice (Corder et al., 2013). Moreover, several studies have shown that this phenomenon is long-lasting in different pain models and species including postoperative pain in mice, in which persistence of latent pain sensitization was observed during 150 days after surgery (Campillo et al., 2011), and carageenan- and fentanylinduced hyperalgesia in rats, in which stress-induced hyperalgesia was still present four months after treatments with carrageenan or fentanyl (Rivat et al., 2007). Here we show in our models of morphine and CFA-induced hyperalgesia that naltrexone-induced hyperalgesia progressively disappears, thus demonstrating that latent pain sensitization is not only longlasting but is also reversible.

In this study we first studied the involvement of NPFF receptors in latent pain sensitization by using RF9, a compound that displays antagonist properties at both NPFF1 and NPFF2 receptors. This compound clearly abolishes fentanyl- and morphine-induced hyperalgesia. suggesting that NPFF1R and/or NPFF2R are involved in OIH as previously reported (Elhabazi et al., 2012, 2013, 2017; Quillet et al., 2021). In agreement with the absence of OIH in RF9treated mice, latent pain sensitization did not develop in this group. These results confirm our previous observations showing that co-administration of RF9 with heroin blocks the establishment of latent pain sensitization (Simonin et al., 2006) and clearly highlight the need of a period of hyperalgesia to allow latent pain sensitization to establish. Moreover, RF9 repetitive administrations once morphine and fentanyl-induced hyperalgesia has resolved progressively reverses latent pain sensitization and in case of prolonged exposure to morphine, this reversion was shown to be definitive. Therefore, activation of NPFF1R and/or NPFF2R are not only involved in development but also in maintenance of latent pain sensitization. These data suggest that NPFF1R and/or NPFF2R are activated during opioid-induced hyperalgesia to allow latent pain sensitization to establish and stay activated to contribute the maintenance of this phenomenon, as proposed in the hypothesis of the homeostatic balance between pro- and anti-nociceptive systems proposed by Simonnet's team (Célèrier et al., 2001; Simonnet & Rivat, 2003).

We further wanted to explore the specific involvement of NPFF1R in latent pain sensitization using two highly selective antagonists of this receptor, RF1359 (Schmitt et al., 2018) and RF3286 (Quillet et al., 2021). We showed here that RF1359 dose-dependently prevents fentanyl induced hyperalgesia, in accordance with anti-opioid properties of NPFF1R previously shown using RF3286 (Quillet et al., 2021). Similarly to what we observed with RF9, we further show here that NPFF1R blockade during fentanyl administration also dose-dependently blocks the establishment of latent sensitization indicating that activation of this receptor is mandatory to allow OIH and following latent pain sensitization to develop. Our data does not exclude the involvement of NPFF2R in this phenomenon but tools that specifically target this receptor are needed to answer this question. Although we already engineered NPFF2R KO mice (Waqas et al. 2017), selective antagonists of this receptor are still missing.

We then evaluated the consequences of NPFF1R pharmacological blockade on inflammatory-induced latent pain sensitization. RF3286 treatment during carrageenan-induced hyperalgesia had no effect on it but attenuated delayed latent pain sensitization, indicating that, similarly to what we observed in OIH models, NPFF1R is involved in the establishment of latent pain sensitization induced by inflammatory pain. When administered once carrageenan-induced hyperalgesia has resolved, RF3286 and RF1359 progressively attenuated latent pain sensitization over several days of treatment. Thus, repeated (and not acute) pharmacological blockade of NPFF1R seems necessary to completely reverse latent

pain sensitization. Similar results were obtained using CFA. Importantly in this latter inflammatory pain model, latent pain sensitization reversal by RF3286 was definitive. Consequently, NPFF1R is not only involved in the expression but also in the mechanisms of latent pain sensitization maintenance, induced either by opiates or inflammatory compounds. We also confirm our observations using NPFF1R deletion in mice. Latent pain sensitization did not develop in genetically deficient mice despite a reduced phase of hyperalgesia induced by carrageenan. Of note, these mice displayed similar nociceptive thresholds than WT mice, indicating that NPFF1R is not involved in basal nociception. Altogether our data provide strong evidence that NPFF1R activates following opiates or carrageenan administration, according to the theory of the homeostatic balance between pro- and anti-nociceptive systems (Célèrier et al., 2001; Corder et al., 2013), and this activation is necessary for the development of hyperalgesia induced by these compounds as well as for the establishment and maintenance of latent pain sensitization. We further confirmed our observations in female mice indicating that in our model, latent pain sensitization expresses the same way in both sexes at the behavioral level. However, some previous studies have shown that if latent pain sensitization manifests similarly between males and females, underlying mechanisms could be different (Custodio-Patsey et al., 2020; Severino et al., 2018). In the future, further studies should allow addressing this issue in our model.

Carrageenan-induced hyperalgesia was not reversed by RF3286 (NPFF1R antagonist), which is inconsistent with NPFF1R KO mice that display a weaker hyperalgesia compared to WT mice. This difference could be explained by the weak central nervous system penetrance of RF3286 (Quillet et al., 2021) that was administered systemically in our experiments. Indeed, complete reversal of latent pain sensitization by RF3286 occurs after 5 to 6 days of treatment in our models of inflammatory-induced latent pain sensitization but carrageenan-induced hyperalgesia lasts only 3 to 4 days. Thus, the phenomenon observed is shorter that the period of time necessary for the RF3286 treatment to be effective when administered subcutaneously, which could explain the absence of RF3286 effect on carrageenan-induced hyperalgesia. Further experiment using intrathecal or intracerebroventricular administration of RF3286 or systemic administration of RF1359, which display a better brain penetrance (data not shown) in latent pain sensitization model, should allow to answer this question and confirm NPFF1R involvement in carrageenan-induced hyperalgesia that was observed in NPFF1R KO mice.

RNA-sequencing experiments demonstrated that latent pain sensitization is associated with genes overexpression in the spinal cord. RF3286 treatment abolished both this upregulation for some of this genes and latent pain sensitization. This suggest that upregulation of these genes is due to NPFF1R activation and is relevant for latent pain sensitization maintenance. Gene ontology pathway analysis revealed that those upregulated genes are significantly enriched in genes involved in immune response which led us to hypothesize that latent pain sensitization might be underlain by a latent inflammation. According to this hypothesis, we have shown that two anti-inflammatory drugs (ibuprofen and N-acetylcysteine) very efficiently reverse latent pain sensitization. Moreover, we observed that the effect of only two doses of ibuprofen is very long-lasting confirming that inflammatory processes persist despite inflammatory hyperalgesia has resolved and could underlie latent pain sensitization maintenance. Ibuprofen is a non-steroidal anti-inflammatory drug and a non-selective inhibitor of cyclooxygenase enzymes (Cox-1 and Cox-2) that mediates prostaglandins synthesis. As prostaglandins are known to sensitize nociceptors during acute inflammation (Julius & Basbaum, 2001) it is tempting to speculate that they might participate in latent pain sensitization by sensitizing nociceptors too. We obtained similar results with Nacetylcysteine, another compound with anti-inflammatory properties. Indeed, Nacetylcysteine reduces oxidative stress and reactive oxygen species (Samuni et al., 2013) that can also sensitize nociceptors (Julius & Basbaum, 2001) and contribute to behavioral hypersensitivity in latent pain sensitization. Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine can also be explained via inhibition of matrix metalloproteinases, as it was previously demonstrated in neuropathic pain (Li et al., 2016). Involvement of this class of proteins is in agreement with the upregulation of matrix metalloproteinases 8 and 13 (Mmp13 and Mmp8) transcripts that we observed in our RNA-sequencing experiments. However, N-acetylcysteine is mainly described to normalize the glutamatergic tone in reward circuit in connection with dependance and addiction disorders (Hodebourg et al., 2019; Ooi et al., 2018). Hyperglutamatergia is also known to contribute chronic pain (Vilar et al., 2013). Besides, glutamate and its NMDA receptor were largely demonstrated to be involved in latent pain sensitization as a pronociceptive system (Bessière et al., 2007, 2010; Célèrier et al., 2001; Corder et al., 2013; Fu et al., 2019, 2020; Laulin et al., 2002, 2002; Le Roy et al., 2011; Richebé et al., 2005; Rivat et al., 2002, 2007, 2008; Romero et al., 2011). Therefore, we cannot exclude that hyperglutamatergia normalization might also explain latent pain sensitization reversal by NAC.

To the best of our knowledge, this is the first time that inflammation is demonstrated to be responsible for latent pain sensitization establishment and maintenance. Nevertheless, it was previously suggested that inflammatory processes might be relevant in latent pain sensitization development by Zadina and collaborators since ZH853, a morphine derived compound deprived of pro-inflammatory properties (contrary to morphine) does not lead to the development of latent pain sensitization while morphine does (Feehan & Zadina, 2019). As NPFF1R antagonists reverse efficiently and durably latent pain sensitization it is tempting to speculate that sustained activation of this receptor during establishment and maintenance of latent pain sensitization might be a key event in the control of latent inflammation underlying this phenomenon. Future experiments will be needed to establish the link between those latent inflammatory processes and NPFF1R activation in latent pain sensitization.

5 Conclusion

Here, we identified NPFF1 receptor and its endogenous ligand RFRP-3 as a new anti-opioid pronociceptive system involved in latent pain sensitization. NPFF1R activation is both responsible for the development and maintenance of this phenomenon in different models of pain and for the overexpression of some genes involved in inflammatory processes associated with latent pain sensitization. Accordingly, experiments with two different anti-inflammatory compounds also provide evidence of the presence of a latent inflammation that outlasts the initial phase of hyperalgesia to cause and sustain latent pain sensitization. Finally, our findings suggest that NPFF1R as well as other molecular and cellular components of this latent inflammation could represent interesting targets to consider in the development therapeutic strategies to prevent pain chronification.

References

Amitani, M., Umetani, Y., Hosoi, R., Kobayashi, K., Abe, K., & Inoue, O. (2005). Changes in in vivo [3H]-Ro15-4513 binding induced by forced swimming in mice. *Synapse*, 58(1), 23-29.

Ayachi, S., & Simonin, F. (2014). Involvement of Mammalian RF-Amide Peptides and Their Receptors in the Modulation of Nociception in Rodents. *Frontiers in Endocrinology*, *5*(158).

Bessière, B., Laboureyras, E., Laulin, J.-P., & Simonnet, G. (2010). Xenon prevents inflammation-induced delayed pain hypersensitivity in rats. *NeuroReport*, 21(18), 1167-1171.

Bessière, B., Richebé, P., Laboureyras, E., Laulin, J.-P., Contarino, A., & Simonnet, G. (2007). Nitrous oxide (N2O) prevents latent pain sensitization and long-term anxiety-like behavior in pain and opioid-experienced rats. *Neuropharmacology*, *53*(6), 733-740.

Campillo, A., Cabañero, D., Romero, A., García-Nogales, P., & Puig, M. M. (2011). Delayed postoperative latent pain sensitization revealed by the systemic administration of opioid antagonists in mice. *European Journal of Pharmacology*, 657(1-3), 89-96.

Célèrier, E., Laulin, J.P., Corcuff, J.B., Le Moal, M., & Simonnet, G. (2001). Progressive Enhancement of Delayed Hyperalgesia Induced by Repeated Heroin Administration : A Sensitization Process. *The Journal of Neuroscience*, *21*(11), 4074-4080.

Célèrier, E., Rivat, C., Jun, Y., Laulin, J. P., Larcher, A., Reynier, P., & Simonnet, G. (2000). Long-lasting Hyperalgesia Induced by Fentanyl in Rats. *Anesthesiology*, *92*(2), 465-472.

Corder, G., Doolen, S., Donahue, R. R., Winter, M. K., Jutras, B. L., He, Y., Hu, X., Wieskopf, J. S., Mogil, J. S., Storm, D. R., Wang, Z. J., McCarson, K. E., & Taylor, B. K. (2013). Constitutive μ -Opioid Receptor Activity Leads to Long-Term Endogenous Analgesia and Dependence. *Science*, *341*(6152), 1394-1399.

Custodio-Patsey, L., Donahue, R. R., Fu, W., Lambert, J., Smith, B. N., & Taylor, B. K. (2020). Sex differences in kappa opioid receptor inhibition of latent postoperative pain sensitization in dorsal horn. *Neuropharmacology*, *163*, 107726.

Elhabazi, K., Ayachi, S., Ilien, B., & Simonin, F. (2014). Assessment of Morphine-induced Hyperalgesia and Analgesic Tolerance in Mice Using Thermal and Mechanical Nociceptive Modalities. *Journal of Visualized Experiments*, *89*, e51264.

Elhabazi, K., Humbert, J. P., Bertin, I., Quillet, R., Utard, V., Schneider, S., Schmitt, M., Bourguignon, J. J., Laboureyras, E., Ben Boujema, M., Simonnet, G., Ancel, C., Simonneaux, V., Beltramo, M., Bucher, B., Sorg, T., Meziane, H., Schneider, E., Petit-Demoulière, B., ... Simonin, F. (2017). RF313, an orally bioavailable neuropeptide FF receptor antagonist, opposes effects of RF-amide-related peptide-3 and opioid-induced hyperalgesia in rodents. *Neuropharmacology*, *118*, 188-198.

Elhabazi, K., Humbert, J. P., Bertin, I., Schmitt, M., Bihel, F., Bourguignon, J. J., Bucher, B., Becker, J. A. J., Sorg, T., Meziane, H., Petit-Demoulière, B., Ilien, B., & Simonin, F. (2013). Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPFF receptors. *Neuropharmacology*, *75*, 164-171.

Elhabazi, K., Trigo, J., Mollereau, C., Moulédous, L., Zajac, J. M., Bihel, F., Schmitt, M., Bourguignon, J., Meziane, H., Petit-demoulière, B., Bockel, F., Maldonado, R., & Simonin, F. (2012). Involvement of neuropeptide FF receptors in neuroadaptive responses to acute and chronic opiate treatments: NPFF receptors in neuroadaptive responses to opiates. *British Journal of Pharmacology*, *165*(2), 424-435.

Feehan, A. K., & Zadina, J. E. (2019). Morphine immunomodulation prolongs inflammatory and postoperative pain while the novel analgesic ZH853 accelerates recovery and protects against latent sensitization. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1), 100.

Fu, W., Nelson, T. S., Santos, D. F., Doolen, S., Gutierrez, J. J. P., Ye, N., Zhou, J., & K. Taylor, B. (2019). An NPY Y1 receptor antagonist unmasks latent sensitization and reveals the contribution of protein kinase A and Epac to chronic inflammatory pain. *Pain*, *160*(8), 1754-1765.

Fu, W., Wessel, C. W., & Taylor, B. K. (2020). Neuropeptide Y tonically inhibits an NMDAR \rightarrow AC1 \rightarrow TRPA1/TRPV1 mechanism of the affective dimension of chronic neuropathic pain. *Neuropeptides*, 80, 102024.

Hodebourg, R., Murray, J. E., Fouyssac, M., Puaud, M., Everitt, B. J., & Belin, D. (2019). Heroin seeking becomes dependent on dorsal striatal dopaminergic mechanisms and can be decreased by N-acetylcysteine. *European Journal of Neuroscience*, *50*(3), 2036-2044.

Jackson, T., Thomas, S., Stabile, V., Shotwell, M., Han, X., & McQueen, K. (2016). A Systematic Review and Meta-Analysis of the Global Burden of Chronic Pain Without Clear Etiology in Low- and Middle-Income Countries : Trends in Heterogeneous Data and a Proposal for New Assessment Methods. *Anesthesia & Analgesia*, *123*(3), 739-748.

Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203-210.

Laulin, J.P., Maurette, P., Corcuff, J.B., Rivat, C., Chauvin, M., & Simonnet, G. (2002). The Role of Ketamine in Preventing Fentanyl-Induced Hyperalgesia and Subsequent Acute Morphine Tolerance: *Anesthesia & Analgesia*, *94*(5), 1263-1269.

Le Roy, C., Laboureyras, E., Gavello-Baudy, S., Chateauraynaud, J., Laulin, J. P., & Simonnet, G. (2011). Endogenous Opioids Released During Non-Nociceptive Environmental Stress Induce Latent Pain Sensitization Via a NMDA-Dependent Process. *The Journal of Pain*, *12*(10), 1069-1079.

Li, J., Xu, L., Deng, X., Jiang, C., Pan, C., Chen, L., Han, Y., Dai, W., Hu, L., Zhang, G., Cheng, Z., & Liu, W. (2016). N-acetyl-cysteine attenuates neuropathic pain by suppressing matrix metalloproteinases. *Pain*, *157*(8), 1711-1723.

Marvizon, J. C., Walwyn, W., Minasyan, A., Chen, W., & Taylor, B. K. (2015). Latent Sensitization : A Model for Stress-Sensitive Chronic Pain. *Current Protocols in Neuroscience*, *71*, 9.50.1-9.50.14.

Ooi, S. L., Green, R., & Pak, S. C. (2018). N-Acetylcysteine for the Treatment of Psychiatric Disorders : A Review of Current Evidence. *BioMed Research International*, 2018, 2469486.

Quillet, R., Schneider, S., Utard, V., Drieu la Rochelle, A., Elhabazi, K., Henningsen, J. B., Gizzi, P., Schmitt, M., Kugler, V., Simonneaux, V., Ilien, B., Simonin, F., & Bihel, F. (2021). Identification of an N-acylated- DArg-Leu-NH2 Dipeptide as a Highly Selective Neuropeptide FF1 Receptor Antagonist That Potently Prevents Opioid-Induced Hyperalgesia. *Journal of Medicinal Chemistry*, *64*(11), 7555-7564.

Richebé, P., Rivat, C., Laulin, J.-P., Maurette, P., & Simonnet, G. (2005). Ketamine Improves the Management of Exaggerated Postoperative Pain Observed in Perioperative Fentanyl-treated Rats. *Anesthesiology*, *102*(2), 421-428.

Rivat, C., Laboureyras, E., Laulin, J. P., Le Roy, C., Richebé, P., & Simonnet, G. (2007). Non-Nociceptive Environmental Stress Induces Hyperalgesia, Not Analgesia, in Pain and Opioid-Experienced Rats. *Neuropsychopharmacology*, *32*(10), 2217-2228.

Rivat, C., Laulin, J.-P., Corcuff, J.-B., Célèrier, E., Pain, L., & Simonnet, G. (2002). Fentanyl Enhancement of Carrageenan-induced Long-lasting Hyperalgesia in Rats. *Anesthesiology*, *96*(2), 381-391.

Rivat, C., Richebé, P., Laboureyras, E., Laulin, J.P., Havouis, R., Noble, F., Moulinoux, J.-P., & Simonnet, G. (2008). Polyamine deficient diet to relieve pain hypersensitivity. *Pain*, *137*(1), 125-137.

Roeckel, L.A., Utard, V., Reiss, D., Mouheiche, J., Maurin, H., Robé, A., Audouard, E., Wood, J. N., Goumon, Y., Simonin, F., & Gaveriaux-Ruff, C. (2017). Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. *Scientific Reports*, 7(1), 10406.

Romero, A., Rojas, S., Cabañero, D., Gispert, J. D., Herance, J. R., Campillo, A., & Puig, M. M. (2011). A 18F-fluorodeoxyglucose MicroPET Imaging Study to Assess Changes in Brain Glucose Metabolism in a Rat Model of Surgery-induced Latent Pain Sensitization. *Anesthesiology*, *115*(5), 1072-1083.

Samuni, Y., Goldstein, S., Dean, O. M., & Berk, M. (2013). The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochimica et Biophysica Act*, *1830*(8), 4117-4129.

Schmitt, M., Bricard, J., Simonin, F., Bourguignon, J. J., Bihel, F., & Elhabazi, K. (2018). *Compounds and compositions for the treatment of pain* (Patent N^o WO-2019149965-A1).

Severino, A., Chen, W., Hakimian, J. K., Kieffer, B. L., Gaveriaux-Ruff, C., Walwyn, W., & Marvizón, J. C. G. (2018). Mu-opioid receptors in nociceptive afferents produce a sustained suppression of hyperalgesia in chronic pain. *Pain*, *159*(8), 1607-1620.

Simonin, F., Schmitt, M., Laulin, J. P., Laboureyras, E., Jhamandas, J. H., MacTavish, D., Matifas, A., Mollereau, C., Laurent, P., Parmentier, M., Kieffer, B. L., Bourguignon, J. J., & Simonnet, G. (2006). RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(2), 466-471.

Simonin, F., Valverde, O., Smadja, C., Slowe, S., Kitchen, I., Dierich, A., Le Meur, M., Roques, B., Maldonado, R., & Kieffer, B. (1998). Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions

of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *The EMBO Journal*, 17(4), 886-897.

Simonnet, G., & Rivat, C. (2003). Opioid-induced hyperalgesia : Abnormal or normal pain? *NeuroReport*, *14*(1), 1-7.

Vilar, B., Busserolles, J., Ling, B., Laffray, S., Ulmann, L., Malhaire, F., Chapuy, E., Aissouni, Y., Etienne, M., Bourinet, E., Acher, F., Pin, J.-P., Eschalier, A., & Goudet, C. (2013). Alleviating Pain Hypersensitivity through Activation of Type 4 Metabotropic Glutamate Receptor. *Journal of Neuroscience*, *33*(48), 18951-18965.

Walwyn, W. M., Chen, W., Kim, H., Minasyan, A., Ennes, H. S., McRoberts, J. A., & Marvizon, J. C. G. (2016). Sustained Suppression of Hyperalgesia during Latent Sensitization by μ -, δ -, and κ -opioid receptors and 2A Adrenergic Receptors : Role of Constitutive Activity. *Journal of Neuroscience*, *36*(1), 204-221.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS and Université de Strasbourg. It has been published within the LABEX Medalis/Institut du Médicament de Strasbourg and received financial support from the French government managed by "Agence National de la Recherche" under "Programme d'investissement d'avenir" (ANR-10-LABX-0034 and ANR-17-EURE-0022, EURIDOL graduate school of pain). RNA-Sequencing was performed by the GenomEast platform, a member of the 'France Génomique' consortium (ANR-10-INBS-0009).

The present manuscript has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere.

Figures and legends



Figure 1. Co-administration of RF9 with morphine prevents morphine-induced hyperalgesia and ensuing latent pain sensitization. (A) From D0 to D8, mice were administered with morphine (10 mg/kg, s.c.) alone or in combination with RF9 (5 mg/kg, s.c., 20 min before morphine injection) and nociceptive thresholds were measured daily before the injections and until return to nociceptive basal threshold at D27. At D28, D34 and D41 all groups received an injection of naltrexone (NTX, 5 mg/kg, s.c.) and the nociceptive threshold of the animals was measured during 4-6 hrs after each administration. Data are expressed as mean \pm SEM, n =9-10 per group. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 morphine vs. saline group ; #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 morphine vs. morphine + RF9 group by two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc test. (B) Calculated AUC (Area Under the Curve) for each group corresponding to morphine (D0-D27) or naltrexone-induced hyperalgesia (D28, D34, D41). Data are expressed as mean \pm SEM, n =9-10 per group. ***p < 0,001 by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test.



Figure 2. RF9 treatment reverses latent pain sensitization induced by chronic morphine. (A) From D0 to D8, mice were administered with morphine (10 mg/kg, s.c.) and nociceptive thresholds were measured daily before the injections. Following return to the basal nociceptive threshold (at D23), all groups received a single administration of naltrexone (NTX, 5 mg/kg, s.c.) alone or in combination with RF9 (5 mg/kg, s.c., 20-30 min before naltrexone injection) and the nociceptive threshold of the animals was measured during 150 min at D30, D31 and D32. Data are expressed as mean \pm SEM, n = 5 per group. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 morphine vs. saline group ; °p < 0,05, °°p < 0,01, °°°p < 0,001 morphine + RF9 group vs. saline group ; ##p < 0,01, ###p < 0,001 morphine vs. morphine + RF9 group by two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc test. (B) Calculated AUC (Area Under the Curve) for each group corresponding to morphine (D0-D23) or naltrexone-induced hyperalgesia (D30, D31, D32). Data are expressed as mean \pm SEM, n = 5 per group *p < 0,05, ***p < 0,001 by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test.



Figure 3. Co-administration of RF9 with fentanyl prevents fentanyl-induced hyperalgesia and ensuing latent pain sensitization. (A) At D0, fentanyl (4 x 60 μ g/kg, 15 min between each injection) was admistered alone or in combination with RF9 (5 mg/kg, s.c., 20 min before fentanyl injection) and tail withdrawal latencies were measured every hour over a 4 hrs period to assess fentanyl-induced analgesia. Fentanyl induced-hyperalgesia was evidenced by daily nociceptive threshold measurement until D4. At D11 and D18, the nociceptive threshold of the animals was measured during 6 hrs following administration of naltrexone (NTX,5 mg/kg, s.c.). Data are expressed as mean ± SEM, n = 7-10 per group. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 fentanyl vs. saline group ; #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 fentanyl + RF9 group ; ^{ooo}p < 0,001 fentanyl + RF9 vs. saline group by two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc test. (B) Calculated AUC (Area Under the Curve) for each group corresponding to fentanyl-induced analgesia (D0), hyperalgesia (D1-D4) or naltrexone-induced hyperalgesia (D11 and D18). Data are expressed as mean ± SEM, 7-10 per group. ***p < 0,001 by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test.



Figure 4. RF9 treatment reverses latent pain sensitization induced by fentanyl. (A) At D0, fentanyl (4 x 60 µg/kg, 15 min between each injection) was admistered and tail withdrawal latencies were measured every hour over a 4 hrs period (not shown) to assess fentanyl-induced analgesia. Fentanyl-induced hyperalgesia was evidenced by daily nociceptive threshold measurement until D4. From D7 to D10 a group of mice was treated with RF9 (5 mg/kg, s.c.,). At D11, D18 and D25, the nociceptive threshold of the animals was measured during a 6 hrs period following naltrexone (NTX) administration (5 mg/kg, s.c.). Data are expressed as mean ± SEM, n = 8-10 per group. * p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 fentanyl vs. saline group ; #p < 0,05, ###p < 0,001 fentanyl vs. fentanyl + RF9 group ; ^{ooo}p < 0,001 fentanyl + RF9 vs. saline group by two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc test. (B) Calculated AUC (Area Under the Curve) for each group corresponding to fentanyl-induced hyperalgesia (D1-D4) or naltrexone-induced hyperalgesia (D11, D18 and D25). Data are expressed as mean ± SEM, n = 8-10 per group. ***p < 0,001 by one-way ANOVA followed by Tukey post test.



Figure 5. Co-administration of RF1359 with fentanyl dose dependently prevents fentanyl-induced hyperalgesia and latent pain sensitization. Different doses of RF1359 (0,2; 1 and 5 mg/kg, s.c.) was administered 20 minutes before fentanyl (4 x 60 µg/kg, 15 min between each injection). Fentanyl-induced analgesia and fentanyl induced hyperalgesia were assessed by measuring tail withdrawal latencies of the animals every hour over a 3 hrs period on D0 and once a day from D1 to D4 following fentanyl administration. At D8 and D15, nociceptive threshold was measured following an administration of naltrexone (NTX,5 mg/kg, s.c.) during 6 hrs. Data are expressed as mean \pm SEM, n = 7-9 per group. °p < 0,05, °°p < 0.01, $^{\circ\circ\circ}p < 0.001$ fentanyl vs. fentanyl + RF1359 1 mg/kg group; #p < 0.05, ###p < 0.001fentanyl vs. fentanyl + RF1359 5 mg/kg group; p < 0.05, p < 0.001 fentanyl + RF1359 1 mg/kg vs. fentanyl + RF1359 0,2 mg/kg group; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 fentanyl + RF1359 5 mg/kg vs. fentanyl + RF1359 0,2 mg/kg group by two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc test. (B) Calculated AUC (Area Under the Curve) for each group corresponding to fentanyl-induced analgesia (D0), hyperalgesia (D1-D4) or naltrexone-induced hyperalgesia (D8 and D15). Data are expressed as mean \pm SEM, n = 7-9 per group *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test.



Figure 6. RF3286 treatment partially prevents carrageenan-induced latent pain sensitization. (A) At D0, carrageenan was injected in the tail of the animals. A group of mice received RF3286 30 minutes before carrageenan, and two other administrations before and after the 6 hrs nociceptive threshold measurement. From D1 to D4, RF3286 (3 x 1 mg/kg, s.c.) was administered after the assessment of the nociceptive threshold of the animals. At D9, all groups received a single administration of naltrexone (NTX,5 mg/kg, s.c.) and nociceptive threshold of the animals was measured over a 6 hrs period. Data are expressed as mean \pm SEM, n = 11-12 per group. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 carrageenan + RF3286 vs. carrageenan group; °p < 0,05, °°p < 0,01, °°°p < 0,001 carrageenan + RF3286 vs. saline group by two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc test. (B) Calculated AUC (Area Under the Curve) for each group corresponding to carrageenan-induced hyperalgesia (D0-D4) or naltrexone-induced hyperalgesia (D9). Data are expressed as mean \pm SEM, n = 11-12 per group *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test.


Figure 7. Carrageenan-induced hyperalgesia is attenuated and resulting latent pain sensitization is absent in NPFF1R KO mice. (A) Carrageenan was injected the tail of mice at D0 and carrageenan-induced hyperalgesia was assessed by measuring tail withdrawal latencies of the animals at 6h and D1 to D3. At D4, when hyperalgesia has resolved, naltrexone (NTX) was administered (5 mg/kg, s.c.) and nociceptive threshold of mice was measured over a 6 hrs period. Data are expressed as mean \pm SEM, n = 10-11 per group. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 WT carrageenan vs. WT saline group ; #p < 0,05, NPFF1R KO carrageenan vs. NPFF1R KO saline group ; ^{oo}p < 0,01, ^{ooo}p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R KO carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R KO carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R KO carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R KO carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R KO carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R KO carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R KO carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R KO carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R KO carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R KO carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R KO carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R KO carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R hot carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R hot carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R hot carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R hot carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R hot carrageenan group ; \$\$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R hot carrageenan group ; \$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R hot carrageenan group ; \$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R hot carrageenan group ; \$\$p < 0,001 WT carrageenan vs. NPFF1R hot carrageenan group ; \$\$p < 0,001 WT carrageenan ys. NPFF1R hot carrageenan group ; \$\$p < 0,





Figure 8. RF3286 and RF1359 repeated administrations progressively reverse carrageenan-induced latent pain sensitization in mice. Carrageenan was injected in the tail of mice at D0 and thermal hyperalgesia was assessed by measuring tail withdrawal latencies at 6h and daily until return to nociceptive basal threshold at D4. (A) Between D5 and D9, all groups were administered with naltrexone (NTX, 5 mg/kg, s.c.) and nociceptive thresholds were assessed at 30', 1h and 2h. The group of mice treated with RF3286 (3 x 1 mg/kg, s.c.) received the first administration 20 minutes before NTX and the second and third administrations of RF3286 after the time course and 5h later, respectively. (C) At D20 in the same experiment, NTX was administered or an acute stress (forced swim) was applied without prior administration of RF3286 and the nociceptive threshold of the animals was measured over a 6 hrs period. (E) A similar protocol was used for female mice using RF1359 that was administered twice a day (5 mg/kg, s.c.). Data are expressed as mean \pm SEM, n = 9-10 per group. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 carrageenan vs. saline group; ##p < 0,01, ###p < 0,001 carrageenan + RF3286 or carrageenan + RF1359 vs. carrageenan group; °p < 0,05, °°p < 0,01, °°° p < 0,001 carrageenan + RF3286 or carrageenan + RF1359 vs. saline group by twoway repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc test. (B), (D) and (F) Calculated

AUC (Area Under the Curve) for each group corresponding to carrageenan-induced hyperalgesia (D0-D3 or D0-D4) or naltrexone- or stress-induced hyperalgesia (D6-D10 and D20) in male (B, D) and female (F) mice. Data are expressed as mean \pm SEM, n = 9-10 per group. **p < 0,01, ***p < 0,001 by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test.



Figure 9. Acute and long-lasting effects of NPFF1R pharmacological blockade by RF3286 on CFA-induced latent pain sensitization. (A) CFA was administrated in the tail of mice at D0 and CFA-induced hyperalgesia was assessed by daily measurement of tail withdrawal latencies between D1 and D5 and then two times per week until return to basal nociceptive threshold at D35. At D51, D52, D53, D54, D55 and D56 all groups were administered with naltrexone (NTX, 5 mg/kg, s.c.) and nociceptive thresholds were assessed at 30', 1h and 2h. The group of mice that was administered with RF3286 (3 x 1 mg/kg, s.c. from D51 to D56) received the first administration 20 minutes before the NTX and the second and third administration after the time course of NTX-induced hyperalgesia and 5h later, respectively. (B) Calculated AUC (Area Under the Curve) for each group corresponding to

CFA-induced hyperalgesia (D0-D35) or naltrexone-induced hyperalgesia (D51-D56). Data are expressed as mean \pm SEM, n = 10 per group. **p < 0,01, ***p < 0,001 by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. (C) NTX was administered without prior administration of RF3286 every two weeks from D71 and nociceptive threshold of the animals was measured over a 6 hrs period until complete disapearance of latent pain sensitization. Data are expressed as mean \pm SEM, n = 10 per group. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 CFA vs. saline group; #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 CFA + RF3286 vs. CFA group; °p < 0,05, °°p < 0,01, °°°p < 0,001 CFA + RF3286 vs. saline group by two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc test.



Figure 10. Latent pain sensitization is associated with changes in gene expression in the spinal cord. Mice were administered with CFA in the tail. Once CFA-induced hyperalgesia has resolved, a group of mice was treated with RF3286 (3 x 1 mg/kg, s.c.) for 6 days as described in figure 9. The day after, mice were euthanized and their spinal cord was harvested to analyze gene expression in animals that developed latent pain sensitization (CFA group) or in which latent pain sensitization was abolished by RF3286 treatment (CFA + RF3286 treatment) versus control (saline group). Black arrows indicate gene whose overexpression in latent pain sensitized animals is normalized by RF3286 treatment. Data are expressed as mean \pm SEM, n =4 per group. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 CFA vs. saline group; #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 CFA + RF3286 vs. CFA group by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. FPKM: Fragments Per Kilo base per Million (mapped reads).



Figure 11. Gene ontology pathway analysis of the 55 most upregulated expressed genes associated with latent pain sensitization in the spinal cord. The top 15 significant biological processes, molecular functions and cellular components of upregulated expressed genes are shown in red, blue and green, respectively. The P-value (0,05) is indicated by the dotted line.



Ibuprofen treatment prevents and reverses carrageenan-induced Figure 12. hyperalgesia and latent pain sensitization. (A) At D0, carrageenan was injected in the tail of mice and nociceptive thresholds were measured 6 hrs later and then daily until D3. A group of mice received ibuprofen (100 mg/kg, i.p.) 30 minutes after carrageenan and from D1 to D3 before measurement of nociceptive thresholds. On D8 and D9, all groups were administered with naltrexone (NTX, 5 mg/kg, s.c.) and nociceptive thresholds were evaluated over a 6h period. One group of mice received ibuprofen (100 mg/kg, i.p.) 20 minutes before the NTX on D8 and D9. At D11, D18 and D25, NTX was administered without prior administration of ibuprofen and nociceptive thresholds were followed for 6 hrs. Data are expressed as mean \pm SEM, n = 10 per group. ***p < 0,001 carrageenan vs. saline group; ###p < 0,001 carrageenan + ibuprofen preventive vs. carrageenan group; \$ p < 0,001 carrageenan + ibuprofen curative vs. carrageenan group; $^{\circ\circ}p < 0.01$, $^{\circ\circ\circ}p < 0.001$ carrageenan + ibuprofen curative vs. saline group by two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc test. (B) Calculated AUC (Area Under the Curve) for each group corresponding to carrageenaninduced hyperalgesia (D0-D3) or naltrexone-induced hyperalgesia (D8, D9, D11, D18 and D25). Data are expressed as mean \pm SEM, n = 10 per group. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0,001 by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test.



Figure 13. N-acetylcysteine treatment reverses carrageenan-induced latent pain sensitization. (A) At D0, carrageenan was injected in the tail of mice and nociceptive thresholds were measured 6 hrs later and then daily until D3. On D7 and D8, all groups were administered with naltrexone (NTX, 5 mg/kg, s.c.) and nociceptive thresholds were measured over a 6 hrs period. One group of mice received N-acetylcysteine (NAC,100 mg/kg, i.p.) 20 minutes before the NTX on D8 and D9. At D11 and D14, NTX was administered without prior administration of NAC and nociceptive thresholds were measured over a 6 hrs period. Data are expressed as mean \pm SEM, n = 10 per group. ***p < 0,001 carrageenan vs. saline group; ##p < 0,01, ###p < 0,001 carrageenan + NAC vs. carrageenan group; °p < 0,05, °°p < 0,01, °°°p < 0,001 carrageenan + NAC vs. saline group by two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc test. (B) Calculated AUC (Area Under the Curve) for each group corresponding to carrageenan-induced hyperalgesia (D0-D3) or naltrexone-induced hyperalgesia (D7, D8, D9 and D10). Data are expressed as mean \pm SEM, n = 10 per group. ***p < 0,001 by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test.



Supplementary figures and legends

Figure S1. RF3286 repeated administrations progressively reverse carrageenan-induced latent pain sensitization in female mice. (A) Carrageenan was injected in the tail of mice at D0 and thermal hyperalgesia was assessed by measuring tail withdrawal latencies at 6h and once daily until return to nociceptive basal threshold at D4. Between D6 and D10, all groups were administered with naltrexone (NTX, 5 mg/kg, s.c.) and nociceptive threshold of the animals was measured at 30', 1h and 2h. The group of mice that was treated with RF3286 (3 x 1 mg/kg, s.c. from D6 to D10) received the first administration 20 minutes before NTX and the second and third administrations after the time course and 5h later, respectively. Data are expressed as mean \pm SEM, n = 9-10 per group. **p < 0,01, ***p < 0,001 carrageenan vs. saline group ; ###p < 0,001 carrageenan + RF3286 vs. carrageenan group ; °p < 0,05, °°p < 0,01, °°° p < 0,001 carrageenan + RF3286 vs. saline group by two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc test. (B) Calculated AUC (Area Under the Curve) for each group corresponding to carrageenan-induced hyperalgesia (D0-D3) or naltrexone-induced hyperalgesia (D6-D10). Data are expressed as mean \pm SEM, n = 9-10 per group. **p < 0,01, ***p < 0,01 per group. **p < 0,01, ***p < 0,001 carrageenan + RF3286 vs. saline group by two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc test. (B) Calculated AUC (Area Under the Curve) for each group corresponding to carrageenan-induced hyperalgesia (D0-D3) or naltrexone-induced hyperalgesia (D6-D10). Data are expressed as mean \pm SEM, n = 9-10 per group. **p < 0,01, ***p < 0,01 ***p <

Gene	Products
9830166K06RiK	RIKEN cDNA 9830166K06 gene (LncRNA)
Gabra6	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-6
4921501E09Rik	Uncharacterized protein
Col17a1	Collagen TypeXVII Alpha 1 chain
Crb3	Crumbs family member 3
C1s2	Complement component 1, subcomponent 2
Mmp13	Matrix metallproteinase 13 or collagenase 3
Il18rap	Interleukin-18 receptor accessory protein
Itih4	Inter alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4
Slfn1	Schlafen 1
Cdh26	Cadherin-like protein 26
5031410I06Rik	RIKEN cDNA 5031410I06 gene
Pabpc11	Poly(A) binding protein, cytoplasmic 1-like
Itgb21	Integrin beta-2-like protein
Cnga2	Cyclic nucleotide-gated subunit alpha 2
Art5	ADP-ribosyltransferase 5
Mtl5	Tesmin
Plac8	Placenta-specific 8
Arl11	ADP-ribosylation factor-like protein 11
Elane	Elastase, neutrophil expressed
Adcy10	Adenylate cyclase type 10
Gm9833	Myelin basic protein expression factor 2
Cd177	CD177 antigen
Xlr3b	X-linked lymphocyte-regulated protein 3B
Мро	Myeloperoxidase
Abca13	ATP-binding cassette subfamily A member 13
Pdia2	Protein disulfide-isomerase associated 2
Inmt	Indolethylamine N-methyltransferase
Cyp4f18	Cytochrome P450 family 4, subfamily polypeptide 18
Pilra	Paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha
Acsm3	Acyl-coenzyme A synthetase medium-chain family member 3
Kcnj4	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4
Pdzd3	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF4
Ccdc105	Coiled-coil domain-containing 105
Нр	Haptoglobin
Klkb1	Kallikrein B, plasma 1
Cytip	Cytohesin-interacting protein
Clec12a	C-type lectin domain family 12 member A
Sell	L-selectin
Mmp8	Matrix metalloproteinase 13 or neutrophil collagenase
Chrnb1	Acetylcholine receptor subunit beta

Rps15a-ps4	Ribosomal protein S15A
Plbd1	Phospholipase B domain containing 1
Gm5458	Predicted gene 5458
Retnlg	Resistin-like gamma
Chil3	Chitinase-like 3
Ccl12	Chemokine (C-C motif) ligand 12
Mirlet7g	MicroRNA let7g
Camp	Cathelicidin antimicrobial peptide
Mir6982	MicroRNA 6982
Mir3060	MicroRNA 3060
Snord57	Small nucleolar RNA, C/D box 57
Mir3535	MicroRNA 3535
S100a8	Protein S100A8
S100a9	Protein S100A9

Figure S2. List of top 55 upregulated genes associated with latent pain sensitization in the spinal cord and their corresponding product.

<u>Partie II : Etude des processus inflammatoires qui sous-</u> <u>tendent la SLD</u>

Dans l'article précédemment décrit, nous avons montré que l'établissement et le maintien de la SLD semblent étroitement liés à des processus inflammatoires. En effet, les cellules du système immunitaire général sont déjà connues pour sensibiliser les nocicepteurs lors d'une inflammation aiguë selon un processus appelé sensibilisation périphérique (§4.1.1, p. 33, Basbaum et al., 2009). Ces cellules s'infiltrent au sein du SNC et contribuent également aux douleurs chroniques (Cairns et al., 2015) ce qui laisse penser que des mécanismes similaires pourraient sous-tendre les processus inflammatoires responsables de la SLD. Par ailleurs, les gènes s100a8 et s100a9 sont ceux les plus surexprimés dans les ME d'animaux en état de SLD et sont exprimés majoritairement par les neutrophiles du système immunitaire (Wang et al., 2018b). Cependant en conditions physiologiques, peu de cellules du système immunitaire sont présentes au sein du SNC et les processus inflammatoires sont liés aux cellules microgliales résidentes. En effet, l'activation des cellules microgliales contribue à la mise en place de la SLD (Romero et al., 2013; Zhang et al., 2017) indiquant que la microglie pourrait également contribuer à ces processus inflammatoires. Ainsi, pour déterminer si cette inflammation latente est sous-tendue par les cellules du système immunitaire général ou les cellules microgliales, nous avons réalisé plusieurs expériences pour :

i) Confirmer la surexpression et la présence certains transcrits identifiés par les expériences de *RNA-sequencing* en condition de SLD dans la ME par RT-qPCR et déterminer le type cellulaire qui les exprime à l'aide de co-marquages par hybridation *in situ*.

 ii) Evaluer les variations d'expression de ces mêmes transcrits dans les leucocytes de souris ayant développé de la SLD par RT-qPCR afin de voir si les modifications observées au sein de la ME s'étendent également à la périphérie.

Enfin pour caractériser plus encore ces processus inflammatoires, nous avons étudié l'implication spécifique des protéines S100A8 et S100A9 à l'aide d'un outil pharmacologique.

1 Quantification de l'expression des transcrits Camp, Cd177, Mmp8, Mpo, s100a8 et s100a9 dans la ME lors de la SLD par RT-qPCR

Pour confirmer les modifications d'expression de gènes associées à la SLD mises en évidence par les expériences de *RNA-sequencing*, nous avons quantifié les variations

d'expression de certains de ces transcrits (Camp, Cd177, Mmp8, Mpo, s100a8 et s100a9) dans les ME d'animaux ayant développé de la SLD ou non par RT-qPCR. Deux cohortes d'animaux différentes ont été considérées :

- Une partie de la cohorte de souris (mâles) ayant reçu du CFA à J0 puis traitées après résolution de l'hyperalgésie (à J34) avec le RF3286 (de J41 à J47). L'autre partie de cette cohorte sont les animaux à partir desquels les quantifications d'expression de gènes par *RNA-sequencing* ont été réalisées.

- Une cohorte de souris (femelles) administrées avec de la carragénine à J0 et traitées après retour au seuil nociceptif basal (J4) avec des antagonistes de NPFF1R (RF1359 ou RF3286, J6 à J9) afin de bloquer la SLD. Les résultats des études comportementales correspondant à cette expérience sont présentés dans l'article (voir pp. 176 et 185).

Dans les deux cohortes, les animaux ont été euthanasiés le lendemain du dernier jour de traitement avec le RF3286 pour prélever les ME et quantifier les modifications d'expression des gènes par RT-qPCR.

1.1 Résultats



Figure 16: Quantification de l'expression des gènes impliqués dans des processus inflammatoires dans la ME d'animaux ayant développé de la SLD par RT-qPCR. Le taux d'expression de certains transcrits identifiés par les expériences de RNA-sequencing (Camp, Cd177, Mmp8, Mpo, s100a8, s100a9) a été quantifié dans les ME par RT-qPCR chez des souris ayant développé de la SLD induite par le CFA (A) ou la carragénine (B) et traitées avec les antagonistes de NPFF1R, le RF1359 ou le RF3286. (A) Les animaux ont reçu une administration de CFA dans la queue (J0). Après retour au seuil nociceptif basal (J34), l'un des groupes a été traité avec le RF3286 (3 x 1 mg/kg, s.c.) de J41 à J47, ce qui a pour conséquence d'abolir durablement la SLD. (B) Les souris femelles ont reçu une administration de carragénine dans la queue (J0). Après retour au seuil nociceptif basal (J4), l'un des groupes a été traité avec le RF1359 (2 x 5 mg/kg, s.c.) de J6 à J8 ou avec le RF3286 (3 x 1 mg/kg, s.c.) de J6 à J9 pour effacer durablement la SLD. Dans les deux expériences, les souris ont été euthanasiées le lendemain du dernier jour de traitement et les ME prélevées pour évaluer l'expression de certains transcrits. Les résultats sont présentés en taux d'expression. Un taux d'expression de 1 est indiqué par la ligne pointillée. Toutes les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, n = 4-9 par groupe.

Dans la première cohorte d'animaux (soumis aux mêmes traitements que ceux avec lesquels les expériences de *RNA-sequencing* ont été réalisées), l'expression de Camp (codant le *cathelicidin Antimicrobial Peptide*), Cd177 (codant pour l'antigène Cd177), Mmp8 (codant pour la *Matrix Metalloproteinase 8*), Mpo (codant pour la myéloperoxydase) s100a8 (codant pour la protéine S100A8) et s100a9 (codant pour la protéine S100A9) a été quantifiée par RT-

qPCR dans la ME. Il n'y a pas de variation significative de l'expression des gènes Camp (fig. 16A, Camp, saline : 2,49 ± 3,94 vs. CFA : 0,41 ± 0,5 vs. CFA + RF3286 : 1,04 ± 1,14, F(2, 11) = 0,7678), Cd177 (fig. 16A, Cd177, saline : 1,25 ± 1 vs. CFA : 1,41 ± 0,94 vs. CFA + RF3286 : 1,88 ± 1,1, F(2, 11) = 0,4835) et Mmp8 (fig. 16A, Mmp8, saline : 2,18 ± 3,35 vs. CFA : 1,91 ± 2,63 vs. CFA + RF3286 : 1,81 ±1,32, F(2, 11) = 0,02470) en condition de SLD (groupe CFA) ou de SLD effacée par le traitement au RF3286 (groupe CFA + RF3286). De même, l'expression des gènes Mpo (fig. 16A, Mpo, saline : 2,36 ± 3,94 vs. CFA : 0,49 ± 0,16 vs. CFA + RF3286 : 0,95 ± 0,68, F(2, 11) = 0,6706), s100a8 (fig. 16A, s100a8, saline : 2,61 ± 4,14 vs. CFA : 0,83 ± 1,96 vs. CFA + RF3286 : 1,23 ± 1,25, F(2, 11) = 0,5204) et s100a9 (fig. 16A, s100a9, saline : 1,97 ± 2,56 vs. CFA : 0,73 ± 0,89 vs. CFA + RF3286 : 1,05 ± 0,86, F(2, 11) = 0,6181) n'est pas significativement modifiée en fonction des différents traitements. Cette expérience semble donc indiquer que l'état de SLD induit par l'administration de CFA ne conduit pas à de modifications d'expression de ces transcrits dans la ME. Cependant, il existe une forte variabilité dans cette expérience, plus particulièrement au sein du groupe contrôle saline qui pourrait être lié au nombre d'échantillons restreint (n = 4-6 par groupe).

Pour tenter de réduire la variabilité, les quantifications de ces mêmes transcrits par RTqPCR ont été réitérées sur un nombre plus grand d'animaux (n = 7-9 par groupe) Dans cette seconde cohorte et pour des questions de temps, la SLD a été induite par une administration de carragénine (dont le décours de l'hyperalgésie est plus court) puis abolie par un traitement au RF1359 ou RF3286. Les transcrits de Camp (fig. 16B, Camp, saline : $1,25 \pm 0,84$ vs. CFA $: 1,28 \pm 0,93$ vs. CFA + RF3286 $: 1,32 \pm 1,06$ vs. CFA + RF1359 $: 1,73 \pm 1,82$, F(3, 26) = 0,2504), Cd177 (fig. 16B, Cd177, saline : $1,14 \pm 0,62$ vs. CFA : $0,49 \pm 0,38$ vs. CFA + RF3286 : 0.55 ± 0.5 vs. CFA + RF1359 : 0.96 ± 0.71 , F(3, 26) = 2.361) et Mmp8 (fig. 16B, Mmp8, saline : 1,20 ± 0,82 vs. CFA : 0,6 ± 0,24 vs. CFA + RF3286 : 0,65 ± 0,64 vs. CFA + RF1359 $: 0.41 \pm 0.44$, F (3, 22) = 2.162) ne montrent pas de modification significative de leur expression dans les différentes conditions. De même, Mpo (fig. 16B, Mpo, saline : $1,17 \pm 0,62$ vs. CFA : 1,01 ± 0,41 vs. CFA + RF3286 : 1,17 ± 0,63 vs. CFA + RF1359 : 1,59 ± 1,1, F(3, 26) = 0,8146), s100a8 (fig. 16B, s100a8, saline : 1,51 ± 1,59 vs. CFA : 1,33 ± 1,09 vs. CFA + $RF3286: 1,21 \pm 1,39$ vs. $CFA + RF1359: 1,75 \pm 2,3$, F(3, 26) = 0,1403) et s100a9 (fig. 16B, s100a9, saline : 1,36 ± 1,02 vs. CFA : 1,28 ± 0,88 vs. CFA + RF3286 : 1,26 ± 1,75 vs. CFA + RF1359 : $1,5 \pm 1,35$, F(3, 26) = 0,04995) ne voient pas de changement significative de leur expression dans les différents groupes. A noter que l'expression du transcrit Mmp8 n'était pas détectable dans deux échantillons dans chacun des groupes saline et carragénine + RF1359.

1.2 Discussion

Dans la première cohorte d'animaux, aucune modification d'expression des transcrits Camp, Cd177, Mmp8, Mpo, s100a8 et s100a9 n'a été observée chez les souris en état de SLD induite par l'administration de CFA par rapport au groupe contrôle saline. Ce résultat est en contradiction avec la surexpression de ces mêmes transcrits qui a été visualisée par des expériences de RNA-sequencing sur d'autres souris en état de SLD de la même cohorte. Cette divergence peut s'expliquer par la forte variabilité au sein de cette expérience. En raison de contraintes techniques liées à la réalisation des expériences comportementales, seul un faible nombre d'échantillons par groupe (n = 4 à 6 par groupe) a pu être quantifié dans cette expérience. C'est pourquoi dans une seconde cohorte, nous avons quantifié l'expression de ces mêmes transcrits sur un nombre plus élevé d'animaux. Puisque le traitement au RF3286 bloque la SLD dans les deux modèles et pour des raisons de temps, nous avons choisi d'induire la SLD par une administration de carragénine (et non pas de CFA) dont l'hyperalgésie est plus courte (3-4 jours contre 35-40 jours pour le CFA) dans cette seconde expérience. Après retour au seuil nociceptif basal, les animaux ont donc été traités au RF3286 ou au RF1359 (antagonistes de NPFF1R) pour abolir durablement la SLD. Malgré un nombre d'échantillon par groupe plus élevé et une variabilité légèrement atténuée en comparaison à l'expérience précédente, nous n'avons pas visualisé de changement d'expression des transcrits Camp, Cd177, Mmp8, Mpo, s100a8 et s100a9 chez les animaux ayant développé de la SLD. Il semblerait donc que la surexpression de ces gènes observés par RNA-sequencing soient relativement faible et plus difficile à mettre en évidence par RT-qPCR. Même si aucune différence d'expression de ces transcrits n'a pu être mise en évidence dans les deux cohortes avec cette technique, l'expression de ces transcrits est tout de même détectable dans l'ensemble des groupes (à l'exception du gène Mmp8 dans certains échantillons) indiquant leur présence au sein de la ME.

2 Visualisation des transcrits s100a9, Cd177, Mmp8 et Mpo dans la ME lors de la SLD par hybridation *in situ*.

Nous avons ensuite voulu confirmer la présence des transcrits s100a9, Mmp8, Cd177 et Mpo dans la ME en condition de SLD par la technique d'hybridation *in situ* fluorescente multiplexée, récemment mise en place au sein du laboratoire. Pour ce faire, une nouvelle cohorte d'animaux a été administrée avec de la carragénine dans la queue puis traitée avec une solution saline ou le RF3286 (1 mg/kg, s.c., 3 fois par jour pendant 5 jours) après retour au seuil nociceptif basal afin d'effacer la SLD. Le lendemain du dernier jour de traitement, les

animaux ont été euthanasiés pour prélever les ME et procéder aux marquages. Afin de préciser le type cellulaire dans lesquels les messagers sont exprimés, des co-marquages ont été réalisés pour chacun des transcrits avec des marqueurs des types cellulaires présent au sein du SNC : neuronal (NeuN) et microglial (CX3CR1). Ce protocole ne permettant pas de visualiser plus de trois transcrits différents sur une même coupe, nous avons choisi pour des questions de temps, de ne pas inclure de marqueur astrocytaire (GFAP) dans ces expériences. En effet, peu d'éléments de la littérature laissaient supposer l'expression de ces transcrits s100a9, Mmp8, Cd177 et Mpo dans les astrocytes.

2.1 Résultats



Figure 17 : Hybridation in situ fluorescente multiplexée du transcrit de s100a9 et différents marqueurs cellulaires dans la ME d'animaux en état de SLD. A. Expression des transcrits de NeuN (blanc), CX3CR1 (vert) et s100a9 (rouge) dans les ME d'animaux contrôles (saline), ayant développé de la SLD (carragénine) ou pour lesquels la SLD est bloquée par le traitement au RF3286 (carragénine + RF3286). Les images ont été acquises au scanner de lames (Nanozoomer). Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI. La flèche blanche indique une cellule s100a9+. Les images sont représentatives de 3 à 5 coupes par animal issues de 3 animaux différents par groupe. Barre d'échelle : 250 μ M. B. Quantification du nombre cellules s100a9+ dans les ME d'animaux des groupes saline, carragénine et carragénine + RF3286. Le nombre de cellules exprimant s100a9 tend à être diminué dans les groupes carragénine et carragénine + RF3286. Données exprimées en moyenne \pm SEM, n = 3-5 coupes par animal, n = 3 animaux par groupe. ANOVA à un facteur, test de Tukey en post-hoc. C. La microscopie confocale révèle que les transcrits de s100a9 (rouge, indiqués par les flèches blanches) ne colocalisent pas avec le marqueur neuronal NeuN (blanc) ou le marqueur microglial CX3CR1 (vert) sur une coupe de ME d'un animal du groupe saline. Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI. Barre d'échelle : 100 μ M.

L'hybridation *in situ* fluorescente multiplexée a révélé la présence de cellules exprimant s100a9 (codant pour la protéine du même nom) dans la ME des animaux des groupes saline, carragénine et carragénine + RF3286. Cependant, de nombreuses coupes ne comportaient aucune cellule exprimant s100a9 et ce, dans les trois groupes expérimentaux (fig. 17A) indiquant que ces cellules sont présentes mais en faible nombre. Le décompte du nombre de cellules positives par coupe ne montre pas de différences significatives entre les groupes, mais tend à être diminué dans les groupes carragénine et carragénine : 0,1 ± 0,32 cellule par coupe, p = 0,0824 ; saline : 0,73 ± 1 cellule par coupe vs. carragénine + RF3286 : 0,91 ± 0,3 cellule par coupe, p = 0,0687). Notons cependant que la variabilité au sein du groupe saline est plus importante que dans les groupes carragénine et carragénine + RF3286. Enfin, nous avons également observé que les transcrits de s100a9 ne colocalisent jamais avec le transcrit du marqueur neuronal NeuN, ni celui du marqueur microglial CX3CR1 dans les trois groupes expérimentaux (fig. 17C). Ainsi, les quelques cellules présentes et exprimant s100a9 ne sont ni des cellules neuronales, ni des cellules microgliales.

Dans cette série d'expériences, nous avions également voulu visualiser l'expression des transcrits Mmp8 (codant pour la *Matrix metalloproteinase 8*), Mpo (codant pour la myéloperoxydase) et Cd177 (codant pour l'antigène Cd177) que nos expériences de *RNA-sequencing* avaient également révélés comme des messagers surexprimés dans la ME en condition de SLD. Des expériences préliminaires avec les sondes ciblant les transcrits Mmp8 et Mpo n'ont pas permis d'observer un marquage suffisant (ne permettaient pas de définir de cellule distincte et généraient un bruit de fond important, données non montrées) quelle que soit la dilution de fluorophore utilisée. La sonde ciblant Cd177 n'a pas permis de mettre en évidence des cellules positives malgré un bruit de fond relativement faible, indiquant l'absence de cellules positives pour le transcrit de Cd177 dans nos conditions (données non montrées).

2.2 Discussion

Ces expériences d'hybridation *in situ* à l'aide de sondes fluorescentes nous ont permis de révéler la présence d'un faible nombre de cellules exprimant le transcrit de s100a9 dans la ME de souris contrôles et ayant développé de la SLD. Le nombre de ces cellules s100a9 positives n'est pas significativement différent entre les 3 groupes et tend même à être diminué chez les animaux ayant été administrés avec de la carragénine en comparaison au groupe contrôle saline. Ce résultat peut s'expliquer par une forte variabilité au sein du groupe saline lié à l'un

des animaux analysés (sur les 3) qui comptabilise à lui-seul presque la totalité des cellules s100a9 positives au sein de ce groupe. Afin de s'assurer que ces résultats reflètent une réalité, il aurait été pertinent d'analyser plus d'animaux par groupe (n = 3 dans cette expérience) ou d'augmenter le nombre de coupes par animal (n = 3-5 dans cette expérience). Cela n'a pas été réalisé dans cette expérience en raison d'un problème lié au vieillissement des coupes. Néanmoins, le fait que le nombre de cellules exprimant s100a9 n'est pas augmenté chez les souris en état de SLD (groupe carragénine) suggère que la surexpression de ce même gène observé par *RNA-sequencing* chez ces animaux n'est pas liée à une augmentation du nombre de cellules l'exprimant mais plutôt à une augmentation du nombre de transcrits de ce gène par cellule. La quantification du nombre de transcrits par cellule ou de l'intensité de la fluorescence aurait été le plus à même de répondre à cette question. Malheureusement, un nombre trop insuffisant de cellules a été mis en évidence dans cette expérience pour permettre ces quantifications (une seule cellule positive pour s100a9 a été observée dans chacun des groupes carragénine + RF3286 sur l'ensemble des coupes marquées).

Partant du constat que s100a9 est surexprimé dans les neurones et la microglie dans certaines conditions associées à de la neuro-inflammation telles que la maladie d'Alzheimer (Kummer et al., 2012; Ryu et al., 2012; Shepherd et al., 2006; Wang et al., 2014) ou de Parkinson (Horvath et al., 2018), nous avons fait le choix dans cette expérience de réaliser des co-marquages de s100a9 avec un marqueur neuronal et un marqueur microglial. Nos expériences ont révélé que les transcrits de s100a9 ne sont pas coexprimés avec ceux des marqueurs neuronal (NeuN) et microglial (CX3CR1), indiquant que ces cellules s100a9 positives ne sont respectivement ni des neurones ni des cellules microgliales. Par ailleurs, les protéines S100A8 et S100A9 sont également décrites comme étant exprimées par les neutrophiles du système immunitaire général. En effet, elles constituent à elles seules près de 45% du cytosol des neutrophiles où elles sont stockées afin d'être sécrétées en cas d'inflammation. Enfin, ces protéines sont également exprimées dans une moindre mesure dans les monocytes (Edgeworth et al., 1991; Hogg et al., 1989). Ceci suggère que les cellules s100a9 positives observées dans la ME seraient plutôt des cellules du système immunitaire général infiltrées dans le SNC. Pour confirmer ces hypothèses, il serait judicieux de réaliser ces mêmes expériences d'hybridation in situ avec un marqueur spécifique des neutrophiles et monocytes, afin de s'assurer de l'identité des cellules dans lesquelles est exprimé s100a9.

3 Quantification de l'expression des transcrits Camp, Mmp8, s100a9, IL-1β et TNF-α dans les leucocytes lors de la SLD par RT-qPCR

Afin d'étudier si les adaptations à long-terme se mettant en place durant la SLD dans la ME s'étendent en périphérie ou restent localisées dans le SNC, les modifications d'expression des gènes des marqueurs inflammatoires et de certaines des cibles identifiées par les expériences de *RNA-sequencing* ont été analysés par RT-qPCR dans les leucocytes d'animaux en état de SLD (fig. 18).

Les souris ont été administrées avec la carragénine puis traitées après retour au seuil nociceptif basal (J3) avec de la N-acétylcystéine (NAC, 100 mg/kg, i.p., une fois par jour), tel que décrit dans l'article (§2.2.4, p. 145). Les souris ont été euthanasiées à J15 pour prélever le sang et isoler les globules blancs, après s'être assurés à J14 que chez les animaux administrés de NAC à J7 et J8, la SLD est toujours bloquée par ce traitement (voir p. 184). Cette expérience a été réalisée par Océane BOYER dans le cadre de son stage de Master 2, encadré par le Dr. Frédéric SIMONIN et moi-même.



3.1 Résultats

Figure 18: Quantification de l'expression des gènes impliqués dans des processus inflammatoires dans les leucocytes d'animaux en état de SLD par RT-qPCR. Le taux d'expression des transcrits de marqueurs de l'inflammation (TNF- α et IL-1 β) et de ceux identifiés par les expériences de RNA-sequencing (s100a9, Mmp8, Camp) a été quantifié dans les globules blancs par RT-qPCR chez des souris ayant été traitées avec la N-acétylcystéine (NAC). Pour rappel, les animaux ont reçu une administration de carragénine dans la queue (J0). Après retour au seuil nociceptif basal (J3), l'un des groupes a été traité pendant 2 jours consécutifs (J7-J8) avec la NAC (100 mg/kg, i.p.) ce qui a pour conséquence d'abolir durablement la SLD. A J15, les souris ont été euthanasiées et le sang prélevé pour en isoler les leucocytes et évaluer l'expression de l est indiqué par la ligne pointillée. Toutes les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, n = 6-9 par groupe. *p < 0,05; ANOVA à un facteur, test de Tukey en post-hoc.

Avant de quantifier l'expression des gènes par RT-qPCR, l'intégrité de chaque échantillon d'ARN a été évaluée par électrophorèse capillaire sur puce (Bioanalyzer). Ainsi, 4 échantillons d'ARN (sur 10) au sein du groupe saline ainsi qu'un échantillon d'ARN (sur 10) dans chacun des groupes carragénine et carragénine + NAC curatif ont été écartés de l'analyse car ils étaient trop dégradés (avec un RIN <7).

Le transcrit codant pour le TNF- α ne présente pas de variation significative de son expression dans les différents groupes (fig. 18, TNF- α , saline : 1,29 ± 1,01 vs. carragénine : 0.78 ± 0.49 vs. carragénine + NAC curatif : 0.86 ± 0.77 , F (2, 21) = 0.9223). L'expression du transcrit de IL-1 β est significativement sous-exprimé dans chez les animaux ayant développé de la SLD et traité à la NAC en comparaison aux animaux naïfs (fig. 18, IL-1β, saline : 1,81 \pm 1,49 vs. carragénine + NAC curatif : 0,46 \pm 0,5, p < 0,05). De même, l'expression des gènes Mmp8 et Camp est significativement diminuée dans le groupe carragénine + NAC par rapport aux groupe saline (fig. 18, Mmp8, saline : $2,58 \pm 2,73$ vs. carragénine + NAC curatif : $0,31 \pm$ 0,39, p < 0,05; Camp, saline 1,47 \pm 1,24 vs. carragénine + NAC curatif : 0,35 \pm 0,33, p < 0,05). Enfin, l'expression du transcrit de s100a9 n'est pas significativement modifiée en fonction des différents traitements (fig. 18, s100a9, saline : $2,2 \pm 2,7$ vs. carragénine : $1,03 \pm$ 1,44 vs. carragénine + NAC curatif : $0,39 \pm 0,37$, F (2, 21) = 2,583) mais on note tout de même une tendance à la sous-expression dans le groupe carragénine + NAC curatif par rapport au groupe contrôle saline (fig. 18, s100a9, saline : $2,2 \pm 2,7$ vs. carragénine + NAC curatif : 0,39 \pm 0,37, p = 0,0827). Le groupe saline présente une forte variabilité des taux d'expression pour l'ensemble des gènes quantifiés.

3.2 Discussion

Afin d'étendre nos observations de modifications d'expression de gènes dans la ME au système immunitaire général, l'expression des gènes de marqueurs inflammatoires (TNF- α et IL-1 β) et de certaines cibles issues des expériences de *RNA-sequencing* (s100a9, Mmp8, Camp) a été quantifiée par RT-qPCR dans les leucocytes d'animaux en état de SLD.

Dans cette expérience et pour l'ensemble des gènes, aucune augmentation significative d'expression n'a pu être mise en évidence chez les animaux ayant développé de la SLD (groupe carragénine) par rapport aux animaux naïfs (groupe saline). Contrairement à ce qui avait été observé par les expériences de *RNA-sequencing* dans la ME, il semblerait même que ces gènes soient légèrement sous-exprimés par rapport au groupe contrôle. Ceci est d'autant plus vrai pour les animaux pour lesquels la SLD a été bloquée par un composé aux propriétés anti-inflammatoires tel que la NAC (groupe carragénine + NAC) où cette diminution atteint

la significativité pour les gènes de IL-1 β , Mmp8, Camp. Mais en raison d'une forte variabilité au sein du groupe saline, dont le taux d'expression moyen est anormalement élevé et dépasse largement un taux de 1 pour certains gènes, il est difficile de tirer des conclusions de cette expérience.

Pourtant, les amorces utilisées pour les expériences de RT-qPCR ont été préalablement vérifiées et validées au sein du laboratoire par analyse de la courbe de fusion et d'efficacité, et sont bien spécifiques des gènes étudiés. Par ailleurs, les échantillons d'ARN présentant une pureté ou une intégrité insuffisante n'ont pas été pris en compte pour l'analyse. Cependant, cela a eu pour conséquence de diminuer le nombre d'échantillons par groupe, plus particulièrement au sein du groupe contrôle (saline) où seuls 6 échantillons ont été retenus. Dans cette expérience, le nombre d'échantillons par groupe était limité à 10 (initialement, avant exclusion des ARN trop dégradés) en raison de considérations éthiques et techniques liées aux expériences comportementales. De plus, cela indique également que le protocole utilisé pour isoler les leucocytes à partir du sang périphérique et en purifier l'ARN n'est pas parfaitement reproductible et induirait plus ou moins de dégradation selon les échantillons, ce qui peut également induire de la variabilité dans notre expérience. Ainsi, si ces expériences sont réitérées, ces protocoles nécessiteront encore quelques étapes d'optimisation afin de réduire la dégradation des ARNs et d'augmenter le nombre d'échantillons utilisables par groupe pour diminuer au mieux la variabilité.

Nous avons analysé nos résultats en utilisant la méthode usuelle dite comparative (Livak & Schmittgen, 2001) où l'expression d'un gène correspond à $2^{-\Delta\Delta CT}$ (voir matériel et méthodes, §4.3, p. 121) et est normalisé en fonction d'un gène de référence (constitutivement exprimé et dont l'expression ne varie pas selon les conditions, l'actine dans notre cas). Pour des questions de temps, seul un gène de référence a été utilisé dans les quantifications et les analyses des taux d'expression. Cependant certaines études recommandent l'utilisation de deux gènes de référence différents (Bustin et al., 2009) afin d'apporter plus de robustesse aux résultats. Ce point pourrait également permettre de limiter la variabilité des résultats dans de futures expériences.

Enfin, ces quantifications d'expression des gènes ont été réalisées sur une population cellulaire hétérogène et pourrait également expliquer la forte variabilité de cette expérience. En effet, le protocole utilisé permet d'isoler l'ensemble des leucocytes du sang, qui comprennent les neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes, les éosinophiles et basophiles. Cependant certains des gènes quantifiés dans cette expérience comme Mmp8 (qui code pour la neutrophile collagénase) et s100a9 (codant pour la protéine S100A9) sont décrits comme

étant majoritairement exprimés par les neutrophiles (Tester et al., 2007; Wang et al., 2018b). Il serait donc plus difficile de visualiser des différences d'expression de gène exprimés par les neutrophiles parmi ces différents types cellulaires. Une possibilité serait donc d'isoler uniquement les neutrophiles à partir du sang, à l'aide des kits dédiés à cet effet et qui sont disponibles dans le commerce, afin d'étudier la variation d'expression de gènes spécifiquement exprimés dans cette population cellulaire.

4 Conséquences du blocage pharmacologique de S100A8/S100A9 dans le développement et le maintien de la SLD induites par la carragénine

Parmi les gènes identifiés par les expériences de *RNA-sequencing* dont l'expression est augmentée dans la ME d'animaux avant développé de la SLD, les gènes s100a8 et s100a9 (codant pour les protéines du même nom), sont ceux pour lesquelles la surexpression est la plus importante. Nous avons donc étudié l'implication spécifique des protéines S100A8 et S100A9 dans le maintien et le développement de la SLD dans notre modèle. Pour ce faire, nous avons évalué les conséquences de l'administration de paquinimod (ou ABR-215757) une molécule inhibitrice de S100A8 et S100A9 (Björk et al., 2009) sur le développement et la maintenance de la SLD. Cette expérience a également été réalisée par Océane BOYER sous ma supervision.

4.1 Résultats



Figure 19 : Conséquences de l'administration répétée de paquinimod sur l'hyperalgésie induite par la carragénine et la SLD qui en découle. A. A J0, la carragénine a été injecté dans la queue des souris et le décours de l'hyperalgésie a été suivi par des mesures de seuils nociceptifs à 6h puis de J1 à J3. Un groupe de souris a recu une injection de paquinimod (10 mg/kg, i.p.) 30 minutes avant l'agent inflammatoire puis quotidiennement de J1 à J3 après évaluation du seuil nociceptif (traitement préventif). A J7, J8, J9 et J10 tous les groupes ont reçu une injection de NTX (5 mg/kg, s.c.) et un suivi cinétique des seuils nociceptifs pendant 6 heures a été réalisé. Un autre groupe de souris a reçu une administration de paquinimod (10 mg/kg, i.p.) 20 minutes avant chaque administration de naltrexone (traitement curatif). Toutes les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, n = 10 par groupe. ***p < 0,001 carragénine vs. saline ; $^{\circ\circ\circ}p < 0,001$ carragénine + paquinimod préventif vs. saline ; ###p < 0.001 carragénine + paquinimod curatif vs. saline ; &&p< 0,01 carragénine + paquinimod curatif vs. carragénine ; p < 0,05 carragénine + paquinimod préventif vs. carragénine, ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées, test de Tukey en post-hoc. B. Comparaison des aires sous la courbe (Area Under the Curve, AUC) correspondant à l'hyperalgésie induite par la carragénine (J0-J3) ou induite par la naltrexone (J7, J8, J9 et J10). ***p < 0,001; ANOVA à un facteur, test de Tukey en post-hoc.

L'administration de carragénine dans la queue induit une hyperalgésie thermique au chaud visible après 6h (fig. 19A, t = 360', WT carragénine : $6,1 \pm 0,37$ s vs. WT saline : $9,68 \pm 0,17$, p < 0,001) et qui se résorbe en 3 jours dans les groupes carragénine (fig. 19A, J3, WT carragénine : $9,50 \pm 0,26$ vs. WT saline : $9,58 \pm 0,25$, ns) et carragénine + paquinimod curatif

(fig. 19A, J3, WT carragénine + paquinimod curatif : 9,63 \pm 0,28 vs. WT saline : 9,58 \pm 0,25, ns), telle que décrite dans les expériences précédentes. L'administration de paquinimod (10 mg/kg, s.c.) de J0 à J3 n'induit pas de modification des seuils nociceptifs des animaux du groupe saline indiquant que le paquinimod est dépourvu de propriétés hyperalgésiques ou analgésiques propres (données non montrées). Les animaux administrés de carragénine et recevant le même traitement au paquinimod montrent une hyperalgésie induite par la carragénine similaire à celle du groupe carragénine (fig. 19B, AUC J0-J3, carragénine + paquinimod préventif : -79,1 \pm 9,7 u.a vs. carragénine : -85,1 \pm 10,9 u.a, ns), ce qui suggère que les protéines S100A8 et S1009 ne contribuent pas au maintien de l'hyperalgésie induite par la carragénine.

Après retour au seuil nociceptif basal (J3), un autre groupe d'animaux a été traité avec le paquinimod (10 mg/kg, i.p.) une fois par jour pendant 4 jours consécutifs. Les conséquences de chaque administration de paquinimod sur la SLD sont révélées par l'administration de naltrexone. De J7 à J10, les souris du groupe carragénine manifestent une hyperalgésie transitoire induire par la naltrexone maximale à 1h (fig. 19A, J7-J10, t = 60', carragénine vs. saline, p < 0.001) de plus de 6h (fig. 19A, J7-J10, t = 360', carragénine vs. saline, p < 0.01) ce qui n'est pas le cas des animaux du groupe saline, confirmant le développement d'une SLD induite par la carragénine. Le groupe d'animaux préalablement traités au paquinimod avant chaque administration de naltrexone (groupe carragénine + paquinimod curatif) montre également une phase d'hyperalgésie transitoire similaire à celle du groupe carragénine que ce soit à J7 (fig. 19B, AUC J7, carragénine + paquinimod curatif : $-9,86 \pm 1,75$ u.a vs. carragénine : -11,07 \pm 1,61 u.a, ns), J8 (fig. 19B, AUC J8, carragénine + paquinimod curatif : -11,83 \pm 0,81 u.a vs. carragénine : -10,68 ± 1,55 u.a, ns), J9 (fig. 19B, AUC J9, carragénine + paquinimod curatif : $-10,44 \pm 1,27$ u.a vs. carragénine : $-11,1 \pm 1,37$ u.a, ns) ou J10 (fig. 19B, AUC J10, carragénine + paquinimod curatif : $-10,66 \pm 1,21$ u.a vs. carragénine : $-10,84 \pm 1,86$ u.a, ns). Enfin, les souris ayant reçu le traitement au paquinimod lors de l'hyperalgésie induite par la carragénine (groupe carragénine + paquinimod préventif), montrent également une hyperalgésie induite par la carragénine similaire à celle du groupe carragénine à J7 (fig. 19B, AUC J7, carragénine + paquinimod préventif : $-10,74 \pm 1,22$ u.a vs. carragénine : $-11,07 \pm$ 1,61 u.a, ns). En l'absence d'effet du traitement au paquinimod, les mesures en suivi cinétique suite à l'administration de naltrexone n'ont pas été poursuivies dans ce groupe à J8, J9 et J10. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que le traitement au paquinimod n'a pas d'effet sur la SLD, qu'il soit administré avant sa mise en place (pendant la phase d'hyperalgésie induite par la carragénine) ou lorsqu'elle est déjà établie (après résolution de l'hyperalgésie). Ceci suggère que les protéines S100A8 et S100A9 ne sont pas impliquées dans le développement ou le maintien de la SLD.

4.2 Discussion

S100A8 (également appelée MRP8 ou calgranuline A) et S100A9 (MRP14 ou calgranuline B) sont des protéines de liaison au Ca²⁺ et au Zn²⁺, majoritairement exprimées par les neutrophiles. Elles exercent différentes fonctions, dont la polymérisation de la tubuline et le réarrangement du cytosquelette permettant la migration cellulaire et le recrutement des neutrophiles et autres leucocytes, nécessaires à la réaction inflammatoire. Elles sont également impliquées dans la libération de cytokines et le métabolisme de l'acide arachidonique. Ainsi une fois sécrétées, elles agissent comme des cytokines et ont des actions autocrine et paracrine via l'activation de leurs récepteurs, les *Toll Like Receptors 4* (TLR4) (Vogl et al., 2007) et les *Receptors for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) (Hofmann et al., 1999). Le paquinimod est une molécule inhibitrice de S100A8 et S100A9 qui prévient leur liaison aux récepteurs TLR4 et RAGE (Björk et al., 2009). Cette interaction empêche ainsi l'accumulation de cellules myéloïdes et serait à l'origine de ses propriétés immunomodulatrices (Deronic et al., 2014; Helmersson et al., 2013).

Dans notre modèle, l'administration répétée de paquinimod est dépourvue d'effet sur l'hyperalgésie induite par la carragénine ou la SLD qui en découle. Ainsi, nos expériences semblent indiquer que les protéines S100A8 et S100A9 ne sont pas impliquées dans les processus inflammatoires responsables de l'hyperalgésie induite par la carragénine ou développement et du maintien de la SLD.

Il convient tout de même de mentionner que le paquinimod est un composé très peu caractérisé chez le rongeur. En accord ses propriétés immunomodulatrices, il a prouvé son efficacité contre des pathologies telles que le lupus érythémateux disséminé (Bengtsson et al., 2012), le diabète de type 1 (Tahvili et al., 2018), la sclérose en plaque (Helmersson et al., 2013) et de nombreux autres modèles de maladies inflammatoires et auto-immunes (Fransén Pettersson et al., 2018; Masouris et al., 2017; Schelbergen et al., 2015; Stenström et al., 2016; Wache et al., 2015; Yan et al., 2013) mais il n'a jamais été évalué dans un modèle de douleur chronique. Par ailleurs, la pharmacocinétique de ce composé n'est pas connue. Ainsi, nous ne pouvons pas affirmer que dans les conditions dans lesquelles nous l'avons utilisé, il permet un blocage efficace des protéines S100A8 et S100A9. En effet, la plupart des études précédemment citées ont utilisé ce composé par voie orale, tandis que nous l'avons administré par voie intrapéritonéale. Néanmoins, certaines études ont montré qu'il peut également être

efficace par cette voie d'administration (Gong et al., 2018; Wache et al., 2015; Yan et al., 2013). A noter toutefois que nous avons utilisé une solution saline contenant 10% de KolliphorEL comme véhicule en raison de la faible solubilité de notre lot de paquinimod dans la solution saline seule, ce qui diffère de ces études (solution saline ou de PBS par voie intrapéritonéale).

Ainsi des analyses ultérieures nécessiteront de tester plusieurs doses de ce composé, plusieurs fréquences/voies d'administration, afin de confirmer ou d'infirmer l'implication de ces protéines dans la mise en place des adaptations conduisant au développement de la SLD. Des souris génétiquement déficientes pour S100A9 existent et sont viables (Manitz et al., 2003). Il serait alors pertinent d'étudier l'établissement et le maintien de la SLD dans cette lignée afin de confirmer nos résultats préliminaires.

<u>Partie III : Etude de l'activité constitutive de MOR in vivo et</u> <u>in vitro</u>

L'une des hypothèses avancées pour expliquer l'activation persistante de MOR après la résolution de l'hyperalgésie et qui contribue à la SLD est celle de son activité constitutive (Corder et al., 2013; Walwyn et al., 2016). Nous avons également démontré au cours de ce projet l'implication de NPFF1R dans le maintien de la SLD. Par ailleurs, des données internes au laboratoire montrent qu'environ 60% des neurones exprimant le transcrit de NPFF1R dans la ME co-expriment également celui de MOR. Enfin dans un modèle cellulaire (cellules SH-S_Y5_Y transfectées avec NPFF1R), il a déjà été montré que l'activation de NPFF1R réduit l'inhibition de la signalisation calcique provoquée par l'activation de MOR (Kersanté et al., 2006), indiquant une interaction fonctionnelle entre ces deux récepteurs. Ainsi, NPFF1R pourrait également moduler l'activité constitutive de MOR.

Dans ce contexte, l'objectif de ces expériences étaient doubles : i) mettre en évidence l'activité constitutive du récepteur MOR et ii) étudier les conséquences d'une pré-stimulation du récepteur NPFF1R sur cette activité constitutive.

1 Mesure de l'activité constitutive de MOR dans la ME lors de la SLD

Pour cette expérience, nous avons réalisé des préparations membranaires à partir de ME des souris mâles ayant développé de la SLD induite par la carragénine et traitées ou non avec l'antagoniste sélectif du récepteur NPFF1R, le RF3286 (voir §2.2.4, p. 145). Pour rappel, après administration de carragénine (J0) les souris des groupes « NTX » ont reçu une injection de naltrexone pour chaque jour de traitement au RF3286 (de J5 à J9) puis à J20, pour évaluer la durabilité du traitement au RF3286. Les animaux des groupes « stress » n'ont pas reçu d'injections de naltrexone lors du traitement au RF3286 et ont subi un stress aigu induit par la nage forcée à la place de l'injection de naltrexone à J20. Les ME ont été prélevées à J42 (des expériences menées au laboratoire ont montré que la SLD induite par la carragénine a une durée de 60 jours). 3 à 4 ME d'animaux du même groupe ont été regroupées pour la préparation des membranes.

1.1 Résultats



développé de la SLD. Stimulation de la liaison du [³⁵S]GTP γ S en présence de (A) naltrexone (NTX), de (B) DAMGO ou de (C) DAMGO et de naltrexone. Chaque point ou histogramme représente la moyenne d'un triplicat. Les données sont représentées en pourcentage du basal (le signal obtenu en l'absence d'agoniste). ***p < 0,001 ; ANOVA à un facteur, test de Tukey en post-hoc.

Pour évaluer l'activité constitutive de MOR, les membranes de ME d'animaux en état de SLD ont été incubées en présence de doses croissantes de naltrexone. En effet, si ce composé est habituellement décrit comme un antagoniste des récepteurs opioïdes, il s'également révélé avoir des propriétés d'agoniste inverse spécifique de MOR à la suite d'une stimulation prolongée par les agonistes (Wang et al., 2001a). Par conséquent, si MOR est constitutivement actif (c'est-à-dire capable d'induire de la signalisation en l'absence ligand) un agoniste inverse devrait induire une diminution du signal basal (en l'absence d'agoniste) et ce d'autant plus que la concentration d'agoniste inverse est élevée (courbe dose-réponse).

Quelle que soit la dose de naltrexone (NTX) appliquée, celle-ci est dépourvue d'effet sur la liaison du [35 S]GTP γ S qui reste au même niveau que le signal basal (fig. 20A) dans les membranes de ME des groupes « saline + NTX » et « carragénine + NTX ». Pourtant, le DAMGO est capable d'induire une courbe dose-réponse (fig. 20B) indiquant que MOR est bien fonctionnel dans cet essai. De même, la naltrexone est capable d'abolir l'augmentation de la liaison du [35 S]GTP γ S induite par 1 μ M de DAMGO (fig. 20C), indiquant que dans ces conditions la naltrexone est capable se lier à MOR pour empêcher celle du DAMGO. Puisque la naltrexone ne diminue pas de manière dose-dépendante la liaison basale du [35 S]GTP γ S, cela suggère que MOR n'est pas constitutivement actif dans les ME d'animaux naïfs ou ayant développé de la SLD. En accord avec ce constat, des résultats similaires ont été obtenus avec les membranes de ME des « groupes saline + stress » et « carragénine + stress » ainsi qu'en utilisant la β -funaltrexamine (β -FNA) qui est un autre agoniste inverse spécifique de MOR et celui utilisé par Corder et collaborateurs pour mettre en évidence l'activité constitutive de MOR dans leur essai de liaison du [³⁵S]GTP γ S (données non montrées, Corder et al., 2013).

1.2 Discussion

Nos résultats semblent indiquer qu'il n'y a pas d'augmentation de l'activité constitutive de MOR chez les animaux ayant développé de la SLD en comparaison aux animaux naïfs, contrairement à ce qui a été démontré précédemment (Corder et al., 2013; Walwyn et al., 2016).

Cependant il faut noter que Corder et collaborateurs ont réalisé leurs essais de liaison du $[^{35}S]GTP\gamma S$ sur des coupes de ME (Corder et al., 2013). Ils ont ainsi montré l'augmentation de l'activité constitutive de MOR dans la corne dorsale de la ME, là où MOR est majoritairement exprimé (Aicher et al., 2000; Spike et al., 2002). De plus dans leur expérience, la diminution de la signalisation basale de MOR par la β -FNA est relativement faible (30% environ pour une concentration de 10 μ M de β -FNA). Il est donc possible qu'en préparant des membranes à partir de ME entière (corne dorsale et corne ventrale) le rapport signal sur bruit soit diminué, si bien que l'on arrive plus à mettre en évidence l'augmentation de l'activité constitutive de MOR dans la corne dorsale de la ME des animaux en état de SLD.

Par ailleurs, les ME des animaux ont été prélevées 42 jours après l'administration de carragénine. Des expériences préliminaires du laboratoire montrent que l'hyperalgésie induite par la naltrexone est toujours présente à J42 mais qu'elle commence à s'atténuer à partir de J30. Ainsi, nous pourrions supposer qu'avec la disparition de la SLD, l'augmentation de l'activité constitutive de MOR soit plus faible et ainsi plus difficile à visualiser. Il serait intéressant à l'avenir de reproduire cette expérience en ne prélevant que la corne dorsale de la ME à une phase plus précoce de la SLD induite par la carragénine afin de faciliter la mise en évidence de l'activité constitutive de MOR chez les animaux ayant développé une SLD. Il est à noter cependant que ces résultats sont préliminaires et restent à confirmer puisque l'ensemble des échantillons au sein d'un même groupe n'a pas pu être analysé et que les expériences ont été réalisées en monoplicat ou en duplicat seulement, en raison du confinement lié à la crise sanitaire.

2 Mise en évidence de l'activité constitutive de MOR dans la lignée cellulaire SH-S_Y5_Y-hNPFF1R

Comme nous n'avons pas été en mesure de visualiser l'activité constitutive de MOR sur des membranes préparées à partir de ME d'animaux en état de SLD, nous sommes passés à un modèle cellulaire *in vitro* pour tester notre hypothèse de la modulation de l'activité constitutive de MOR par l'activation de NPFF1R. Notamment, la lignée de cellules SH-S_Y5_Y exprime le récepteur MOR de manière endogène et a été transfectée de manière stable avec le récepteur NPFF1R humain (hNPFF1R, clone SH₁-C7, Kersanté et al., 2006).

2.1 Résultats

En l'absence de protocole publié pour réaliser l'essai de liaison du [³⁵S]GTPγS sur ce clone de cellules transfectées avec hNPFF1R, nous nous sommes basés sur celui utilisé par l'équipe qui nous a donné ce clone pour mesurer la liaison du [³⁵S]GTPγS dans des cellules SH-S_Y5_Y mais transfectées avec hNPFF2R (Kersanté et al., 2010). Avant de visualiser l'activité constitutive de MOR, nous avons d'abord évalué les courbes dose-réponse obtenues par stimulation du récepteur MOR en présence de concentrations croissantes de DAMGO, afin de s'assurer que le récepteur est fonctionnel dans les conditions appliquées.

De nombreuses conditions de culture de ces cellules (changement de milieu de culture, de lot de sérum, confluence) et du test de stimulation de la liaison du [³⁵S]GTPγS (variation de la quantité de membranes par puits, de la concentration en [³⁵S]GTPγS, en GDP, en BSA, retrait de la saponine, remplacement du DAMGO par un agoniste entier, le fentanyl), ont été testées pour diminuer la variabilité et optimiser les résultats. Cependant, aucune d'entre elles n'ont permis d'observer de manière robuste une courbe dose-réponse de la liaison de [³⁵S]GTPγS de type sigmoïdale (représentation semi-logarithmique).



hNPPFR1 par des doses croissantes de DAMGO. Trois expériences séparées ont été réalisées à l'identique avec le même lot de préparation de membranes et le même protocole pour l'essai [³⁵S]GTP_YS. Chaque point représente la moyenne d'un triplicat. Les données sont représentées en pourcentage du signal basal (le signal obtenu en l'absence d'agoniste). A noter que l'échelle des ordonnées pour l'essai #1 est différente des deux autres.

La figure 21 illustre quelques exemples de courbes obtenues en présence de concentrations croissantes de DAMGO selon le protocole utilisé pour la lignée SH-S_Y5_Y-hNPFF2R (Kersanté et al., 2010). Pourtant réalisées dans les mêmes conditions, l'allure des courbes de chacun des essais est différente, ce qui illustre la forte variabilité inter-expérimentale. Dans aucun cas une courbe dose-réponse de type sigmoïdale n'a été obtenue, à l'exception de l'essai #3. Cependant dans cette expérience l'intensité maximale (120% de stimulation de liaison de [³⁵S]GTPγS est trop faible pour imputer cet effet à une réelle stimulation du récepteur MOR. Enfin, seules des concentrations très élevées de DAMGO (> 10 μ M) permettent d'obtenir une augmentation de la stimulation de liaison au [³⁵S]GTPγS.

Par ailleurs, ces cellules étant transfectées avec hNPFF1R, nous avons également évalué la stimulation de la liaison de [35 S]GTP γ S par différentes doses de son ligand endogène le RFRP-3 humain (hRFRP-3, données non montrées). Comme pour le récepteur MOR, aucune relation dose-effet n'a pu être mis en évidence et l'augmentation de la stimulation de la liaison de [35 S]GTP γ S n'avait lieu que pour des doses élevées de hRFRP-3 (> 10 μ M).

2.2 Discussion

Dans cette expérience, aucune des conditions testées pour la culture des cellules SH-S_Y5_YhNPFF1R ou pour la réalisation du test de liaison au [35 S]GTP γ S n'a permis de visualiser la stimulation de la liaison de [35 S]GTP γ S par l'activation de MOR et NPFF1R suite à la liaison de leur agonistes, respectivement le DAMGO et hRFRP-3.

Néanmoins à de fortes doses, MOR et NPFF1R semblent activables, indiquant que ces récepteurs sont tout de même fonctionnels et que les difficultés de visualisation de la

stimulation de la liaison du [³⁵S]GTPγS par leurs agonistes respectifs ne sont pas liées spécifiquement à l'un ou l'autre des récepteurs. Par ailleurs, certaines difficultés ont été rencontrées pour la culture des cellules (croissance irrégulière, mortalité importante à la décongélation). Même si les cellules ont été cultivées selon les conditions indiquées dans la littérature (Kersanté et al., 2006), il semblerait donc qu'elles n'étaient pas dans des conditions de croissance optimales pour pouvoir visualiser de manière robuste et efficace l'activation des protéines G à l'aide de l'essai de la stimulation de la liaison du [³⁵S]GTPγS. Nous n'avons donc pas poursuivi les expérimentations concernant l'activité constitutive de MOR et sa modulation par l'activation de NPFF1R. Dans le futur, une alternative pourrait être envisagée en essayant de reproduire strictement les expériences décrites par Corder et collaborateurs (Corder et al., 2013) de liaison de [³⁵S]GTPγS sur coupes de ME ou en visualisant l'activation de la voie des MAPK sur coupe de ME d'animaux en état de SLD qui a également été observée dans cette étude.
Discussion générale

Les récepteurs à peptides RF-amides, et plus particulièrement GPR103 et NPFF1R qui nous intéressent ici, sont impliqués dans la modulation de la nociception (Ayachi & Simonin, 2014). Au laboratoire, des antagonistes hautement sélectifs de chacun de ces récepteurs ont été développés et caractérisés *in vitro* et *in vivo*, respectivement le RF1156 (Ayachi, 2017) et le RF3286 (Quillet et al., 2021). Ces outils pharmacologiques ont permis de confirmer les propriétés anti-opioïdes et pro-nociceptives des systèmes 26RFa/GPR103 et RFRP-3/NPFF1R dans différents modèles d'HIO et de douleur inflammatoire (Ayachi, 2017; Elhabazi et al., 2017; Hammoud et al., 2018; Quillet et al., 2021). En particulier pour GPR103, l'activation de ces récepteurs persiste après la résolution de l'HIO pour participer au maintien de la SLD (Ayachi, 2017). En revanche pour NPFF1R, sa contribution dans la SLD n'était pas connue. Dans ce contexte, les objectifs principaux de ces travaux de thèse ont été :

- i) confirmer l'implication de 26RFa/GPR103 dans la SLD qui découle d'une douleur inflammatoire ainsi que d'étudier l'implication du système RFRP-3/NPFF1R dans le développement et le maintien de la SLD.
- ii) d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables du développement et maintien de cette SLD.

En accord avec le premier objectif, nous avons évalué les conséquences du blocage génétique (souris génétiquement invalidées) et pharmacologique des récepteurs GPR103 (à l'aide de l'antagoniste sélectif le RF1156) dans différents modèles de SLD induite par un agent inflammatoire. L'administration de RF1156 lors de l'hyperalgésie induite par le CFA n'a pas effet sur cette hyperalgésie alors que les souris génétiquement invalidées pour GPR103a ne développent pas d'hyperalgésie induite par la carragénine, suggérant que les récepteurs GPR103 seraient activés lors du développement l'hyperalgésie inflammatoire, plutôt que dans sa maintenance. L'administration de RF1156 après (mais pas avant) la résolution de l'hyperalgésie induite par le CFA réverse progressivement la SLD. Conformément à ses propriétés anti-opioïdes, ce résultat confirme que les récepteurs GPR103 contribuent à la SLD provoquée par une hyperalgésie inflammatoire, comme cela a été observé à la suite d'une HIO (Ayachi, 2017). Cependant, le blocage de la SLD se maintient temporairement après le traitement au RF1156 pour une durée de 12 jours minimum ce qui

indique que le blocage pharmacologique des récepteurs GPR103 empêche transitoirement l'expression de la SLD mais ne neutralise pas les mécanismes qui sous-tendent la persistance de la SLD.

Lorsque le RF9 (antagoniste non sélectif des récepteurs au NPFF) et le RF1359 (antagoniste sélectif de NPFF1R) sont administrés avec le traitement opiacé ou suite à la résolution de l'HIO, la SLD est abolie dans les deux cas, démontrant ainsi l'activation de NPFF1R lors de l'établissement et le maintien de la SLD induite par une HIO. Dans un modèle de SLD induite par le CFA, l'administration répétée de RF3286, (le nouvel antagoniste sélectif de NPFF1R récemment caractérisé par l'équipe, (Quillet et al., 2021)) une fois l'hyperalgésie résolue, réverse progressivement la SLD. Les suivis cinétiques ont été poursuivis jusqu'à disparition de l'hyperalgésie induite par la naltrexone (sans administration préalable de RF3286) et a permis de mettre en évidence que la SLD dure entre 211 et 225 jours après l'administration du CFA et que son blocage par le RF3286 est définitif. Ainsi, le blocage pharmacologique de NPFF1R efface complètement les adaptations à long-terme responsables de la SLD.

Ces observations ont été étendues au modèle de SLD induite par la carragénine : le blocage répété de NPFF1R par le RF3286 réverse aussi durablement l'hyperalgésie induite par la naltrexone ou un stress aigu provoqué par la nage forcée. En effet, afin de valider la pertinence de notre modèle de SLD, un protocole de stress aigu permettant de visualiser une hyperalgésie latente comparable à celle induite par l'administration de naltrexone tel que décrit dans la littérature (Le Roy et al., 2011; Rivat et al., 2007) a été mis au point et validé. Des résultats similaires ont été obtenus chez les souris femelles avec ce même antagoniste, suggérant que la SLD se manifeste de la même manière chez les mâles et les femelles. Enfin, l'injection de RF3286 lors de la phase d'hyperalgésie induite par la carragénine prévient partiellement la SLD, suggérant que le système RFRP-3/NPFF1R participe également au développement de cette adaptation à long-terme.

Ces résultats ont été confirmés en administrant un autre antagoniste du récepteur NPFF1R développé par le laboratoire, le RF1359, et à l'aide de souris génétiquement délétées pour NPFF1R (disponibles au laboratoire) qui ne développent pas de SLD malgré une hyperalgésie induite par la carragénine partielle. Dans l'ensemble, ces données montrent que l'activation du récepteur NPFF1R par son ligand endogène RFRP-3 contribue à l'établissement et au maintien de la SLD induite par une inflammation et un traitement prolongé aux opiacés, confirmant les propriétés pro-nociceptives et anti-opioïdes de ce système (Elhabazi et al., 2017; Hammoud et al., 2018; Quillet et al., 2021).

Bien que les récepteurs GPR103 et NPFF1R soient de la même famille et soient tous deux impliqués dans la SLD en tant que système pro-nociceptif anti-opioïde, il semblerait qu'il y ait des différences subtiles de cinétique d'action entre ces systèmes. En effet, l'activation des récepteurs GPR103 ne semble pas intervenir dans le maintien de l'hyperalgésie induite par le CFA contrairement à NPFF1R, dont le blocage pharmacologique par un traitement de 10 jours au RF3286 permet une résolution plus rapide d'hyperalgésie dans ce même modèle (données internes au laboratoire). De même, l'administration de RF1156 lors de l'hyperalgésie induite par le CFA n'a pas d'effet sur la SLD qui en découle, tandis que l'administration de RF3286 pendant l'hyperalgésie induite par les opiacés ou par une inflammation prévient la mise en place de la SLD. Ainsi, les récepteurs GPR103 ne seraient pas activés lors de mise en place de la SLD mais interviendrait une fois qu'elle est établie ; NPFF1R serait activé dans ces deux processus. Ces deux récepteurs à peptides RF-amides interviendraient donc à différents moments de l'établissement et du maintien de la SLD ce qui suggère qu'ils aient des rôles distincts. En accord avec cette idée, le traitement au RF3286 (antagoniste de NPFF1R) réverse définitivement la SLD, tandis le traitement au RF1156 (antagoniste des récepteurs GPR103) ne la bloque que transitoirement. Même si on ne peut pas exclure qu'adapter le traitement RF1156 pourrait permettre un blocage pharmacologique des récepteurs GPR103 plus efficace et éventuellement un blocage définitif de la SLD, ceci indique que NPFF1R est impliqué dans les mécanismes sous-jacents à la SLD, tandis que les récepteurs GPR103 sont plutôt impliqués dans son expression. Cela pose la question de l'implication des autres récepteurs à peptides RF-amides ainsi que de leurs fonctions respectives dans ce phénomène, en particulier NPFF2R dont la contribution à la SLD reste à confirmer (Simonin et al., 2006).

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés aux mécanismes responsables du maintien de la SLD en lien avec l'activation du NPFF1R (puisque la réversion de la SLD par le RF3286 est définitive). Partant d'une hypothèse de modifications épigénétiques, les variations d'expression de gènes spinaux associées au maintien de la SLD ont été évaluées dans notre modèle. Dans une expérience séparée, les ME d'animaux ayant développé de la SLD induite par le CFA ou pour lesquels cette SLD a été bloquée par le traitement au RF3286 ont été prélevées. L'analyse en *RNA-sequencing* a révélé l'augmentation de l'expression d'une cinquantaine de messagers chez les animaux en état de SLD. Certains de ces transcrits voient leur surexpression abolie par l'antagoniste de NPFF1R (qui réverse l'état de SLD) indiquant que ces gènes sont associés au maintien de cet état. Ces gènes présentent la particularité, pour la plupart, d'être impliqués dans des processus inflammatoires ce qui suggère que la SLD

serait sous-tendue par une inflammation latente. En accord avec cette hypothèse, l'administration de deux composés aux propriétés anti-inflammatoires (N-acétylcystéine et ibuprofène) pendant ou après la phase d'hyperalgésie induite par la carragénine, prévient ou réverse respectivement la SLD. Ainsi, l'établissement et le maintien de la SLD semblent étroitement liés à des processus inflammatoires.

Nous avons ensuite voulu poursuivre la caractérisation de ces processus inflammatoires. En effet, la mise en place d'une réaction inflammatoire se traduit par un ensemble de cascade de réactions moléculaires et cellulaires, dont le but est le recrutement de cellules immunitaires au site de l'infection. Brièvement, la réponse inflammatoire est initiée par la détection de motifs moléculaires caractéristiques des pathogènes appelés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern) ou de signaux de dommages cellulaires appelés DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) qui sont reconnus par des récepteurs, les PRR (Pattern Recognition Receptors) (Akira et al., 2006). Les PRR sont exprimés à la surface membranaire des cellules dendritiques, macrophages, monocytes, mastocytes, neutrophiles et les cellules endothéliales. Une fois activées, ces cellules produisent des facteurs solubles (molécules du complément, chimiokines, cytokines, radicaux libres, prostaglandines...). Les cytokines activent les cellules endothéliales pour augmenter la perméabilité vasculaire et favoriser l'influx de cellules immunitaires à partir du sang. Ce phénomène est responsable de la rougeur et de l'œdème, symptômes de la réaction inflammatoire. Une fois au site d'infection, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages exercent leur fonction de phagocytose pour éliminer le pathogène. Les prostaglandines quant à elles sensibilisent les nocicepteurs et sont responsables d'un autre symptôme, la douleur (Fullerton & Gilroy, 2016; Netea et al., 2017).

Cependant, en conditions physiologiques, peu de ces cellules du système immunitaire sont présentes dans le SNC. Par ailleurs, le SNC est lui-même doté de cellules myéloïdes résidentes et immunocompétentes, appelées cellules microgliales (ou microglie), et qui constituent la première ligne de défense contre les pathogènes en cas d'inflammation (Wolf et al., 2017). Pour déterminer si cette inflammation latente est sous-tendue par les cellules microgliales ou le système immunitaire général, nous avons tenté de mettre en évidence le type cellulaire à l'origine de la surexpression des transcrits observés par les expériences de *RNA-sequencing*. Pour cela, des co-marquages de certains de ces transcrits en présence de différents marqueurs cellulaires ont été réalisés par hybridation *in situ* fluorescente multiplexée dans la ME de souris en condition de SLD.

Ces expériences ont révélé la présence d'un faible nombre de cellules exprimant le transcrit de s100a9 dans la ME de souris contrôles et en état de SLD. Le nombre de ces cellules n'est pas significativement augmenté dans les animaux ayant développé une SLD, suggérant que la surexpression de ce gène observée par *RNA-sequencing* n'est pas liée à une augmentation du nombre de cellules positives pour s100a9+ chez ces animaux mais plutôt à une augmentation de l'expression du nombre de transcrits de ce gène dans les cellules qui l'expriment. Par ailleurs, nous avons pu montrer que le transcrit de s100a9 ne colocalise pas avec les marqueurs NeuN et Cx3CR1, indiquant que ces cellules s100a9+ ne sont respectivement ni des neurones ni des cellules microgliales. Ainsi, lors de la SLD, l'expression de s100a9 n'est pas induite dans les cellules microgliales de la ME comme cela a été observé dans le cerveau dans certaines conditions neuro-inflammatoires telles que la maladie d'Alzheimer (Kummer et al., 2012; Ryu et al., 2012; Shepherd et al., 2006; Wang et al., 2014) ou de Parkinson (Horvath et al., 2018). Cependant, les protéines S100A8 et S100A9 sont décrites comme étant exprimées par les polynucléaires neutrophiles et les monocytes où elles constituent respectivement 45% et 1% du cytosol (Edgeworth et al., 1991; Hogg et al., 1989). Dans les tissus sains, elles ne sont pas exprimées par les macrophages et les lymphocytes (Lagasse & Clerc, 1998; Zwadlo et al., 1988). Lorsqu'elles sont sécrétées sous forme d'hétérodimère nommé calprotectine (Steinbakk et al., 1990), elles modulent la production de cytokines (Sunahori et al., 2006), augmentent la perméabilité vasculaire (Viemann et al., 2005, 2007) et favorisent l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium (Newton & Hogg, 1998). Les cellules s100a9+ observées dans la ME seraient donc des cellules du système immunitaire général, plus probablement des neutrophiles. En accord avec ces observations, le nombre de neutrophiles exprimant les transcrits et les protéines S100A8 et S100A9 augmente dans la ME pendant 3 jours après l'administration de carragénine dans la patte (Mitchell et al., 2008). Ces neutrophiles restent localisés dans le système vasculaire et ne s'infiltrent pas dans la ME. Des observations similaires ont été rapportés dans le cortex préfrontal dans un modèle de douleur faciale également induit par l'administration de carragénine (Poh et al., 2012). Il serait alors possible qu'une partie de ces neutrophiles restent localisés dans les vaisseaux sanguins malgré la résolution de l'hyperalgésie induite par la carragénine pour entretenir la SLD. En raison de problèmes techniques, l'analyse par RT-qPCR de l'expression de s100a9 et d'autres cibles issues des expériences de RNA-sequencing dans les leucocytes (dont font partie les neutrophiles) issus d'animaux en état de SLD n'a pas permis de déterminer si ces cellules sont à l'origine des modifications d'expression génique observées dans la ME. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour étayer et soutenir cette hypothèse, au vu du très faible nombre de cellules s100a9+ visualisées par nos expériences d'hybridation *in situ* dans les coupes de ME d'animaux en condition de SLD.

Par ailleurs, les effets de S100A8 et S100A9 sur la nociception sont encore débattus dans la littérature. De par leur propriétés pro-inflammatoires, S100A8 et S100A9 (qui sont des DAMPs) pourraient initier et/ou amplifier la réaction inflammatoire qui mène par conséquent à l'activation des nocicepteurs selon les processus évoqués plus haut. Ces protéines contribuent à la sensation douloureuse dans un modèle d'arthrite (Blom et al., 2020) et serait liée à une infiltration de monocytes dans les GRD qui, en sécrétant S100A8, activent directement des neurones nociceptifs via leur récepteur TLR4 (Miller et al., 2015). A l'inverse, l'administration intrapéritonéale de S100A9 (Giorgi et al., 1998) ou la libération de S100A9 par les neutrophiles (Pagano et al., 2002, 2006) inhibe les réponses nociceptives dans plusieurs modèles de péritonite. L'administration de S100A9 ou de son extrémité C-terminale murine (mS10019p) est également anti-nociceptive dans des modèles de douleur induit par la carragénine (Dale et al., 2006) et neuropathique (Paccola et al., 2008). De même, chez des souris traitées à la carragéninine, l'injection de mS10019p dans le cortex préfrontal ou par voie icv diminue les comportements nociceptifs (Poh et al., 2012). L'extrémité C-terminale de S100A9 est capable de moduler le signal nociceptif par l'inhibition de l'activation des canaux calciques voltage dépendant de type N dans les GRD (Dale et al., 2009), indiquant qu'il est doté de propriétés anti-nociceptives intrinsèques, indépendamment de leur rôle dans la modulation de la réaction inflammatoire. Dans ce cas, si S100A8 et S100A9 sont dotées de propriétés anti-nociceptives dans notre modèle, cela pourrait également expliquer que leur inhibition par le paquinimod, n'a pas d'effet sur le développement ou la mise en place de SLD chez la souris. Cependant, il est difficile de conclure quant à ce résultat et au rôle des protéines S100A8 et S100A9 puisque dans nos expériences, nous n'avons pas confirmé la surexpression des transcrits s100a8 et s100a9 au niveau protéique. De plus, comme évoqué plus haut (voir résultats, §4.2, p. 206) il se peut que le traitement au paquinimod appliqué dans cette expérience n'ait pas été optimal pour inhiber ces protéines.

Lors de nos expériences d'hybridation *in situ*, seul le transcrit de s100a9 a pu être visualisé. En raison de l'aspécifité de plusieurs sondes, nous n'avons pas été en mesure de confirmer par cette méthode la surexpression dans les ME des animaux en état de SLD et de réaliser des co-marquages pour les transcrits qui codent pour la myéloperoxydase (Mpo), la métalloprotéinase matricielle 8 (Mmp8) et l'antigène Cd177 (Cd177). Néanmoins dans la littérature, les neutrophiles sont décrits comme la principale source de myéloperoxydase (Schultz & Kaminker, 1962), où elle est contenue dans les granules. Lors de la phagocytose, ces granules fusionnent avec le phagosome, et la myéloperoxydase libérée permet la catalyse d'espèces réactives de l'oxygène pour détruire le pathogène (Aratani, 2018). Elle est également exprimée dans les lysosomes des monocytes dans une moindre mesure (Bos et al., 1978). L'antigène Cd177 est une glycoprotéine exprimée à la membrane d'une sous-population de neutrophiles (Stroncek et al., 1990) et facilite l'interaction entre les neutrophiles et les cellules endothéliales pour faciliter leur migration (Sachs et al., 2007). La métalloprotéinase matricielle 8 (également surexprimé dans la ME d'animaux en état de SLD) contenues dans les granules de ces cellules, sont des protéases sécrétées par les neutrophiles dans le milieu pour dégrader les protéines de la matrice extracellulaire, attirer d'autres leucocytes et lutter contre le pathogène (Alfakry et al., 2016).

Dans l'ensemble, même si nous n'avons pas pu déterminer dans nos expériences quel type cellulaire exprime les transcrits identifiés par nos expériences de *RNA-sequencing*, nos données semblent pointer un rôle des neutrophiles dans les processus inflammatoires qui maintiennent la SLD. Ceci suggère que certains des mécanismes à l'origine de la réaction inflammatoire induite par l'administration de CFA ou carragénine qui participent à l'hyperalgésie primaire, ne se résorbent pas complètement et perdurent dans le temps pour contribuer à la SLD. Cette hypothèse est également en accord avec le constat que de nombreuses conditions pathologiques sont liées aux cellules immunitaires et/ou à des processus inflammatoires (Couzin-Frankel, 2010). Cette « inflammation chronique systémique » serait issue d'une inflammation aigüe qui serait mal ou pas résolue et qui augmenterait la susceptibilité de développer d'autres pathologies (Furman et al., 2019). Il serait ainsi intéressant de déterminer si une telle inflammation latente contribue à la SLD dans d'autres modèles de douleur dont l'inducteur n'est pas un agent inflammatoire (par exemple, une douleur neuropathique ou une HIO).

Parmi les transcrits dont l'expression augmente dans la ME après mise en place de la SLD, certains voient leur surexpression abolie par l'antagoniste de NPFF1R (qui réverse également l'état de SLD) indiquant que ces gènes sont associés au maintien de cet état. Comme évoqué plus haut, ces gènes sont pour la majorité, associés à des processus inflammatoires. Cependant, le lien entre l'activation de NPFF1R et ces processus inflammatoires lors de la SLD reste à établir.

De nombreux neuropeptides ont montré des propriétés immunomodulatrices (Souza-Moreira et al., 2011). En plus de favoriser la vasodilatation en agissant directement sur les cellulaires endothéliales, ces derniers peuvent activer les cellules immunitaires (neutrophiles, monocytes, macrophages et mastocytes) qui expriment également certains récepteurs aux neuropeptides, notamment ceux du CGRP et de la substance P (Fattori et al., 2021). Cependant, peu d'études rapportent une telle interaction (appelée communication neuroimmune) pour le système de récepteurs à peptides RF-amides et le système immunitaire général.

Le transcrit de Kiss1R a été détecté par RT-qPCR à de faibles niveaux dans les leucocytes du sang périphérique (Ohtaki et al., 2001) ainsi que les lymphocytes chez l'Homme (Muir et al., 2001). Cependant, ces principales fonctions immunomodulatrices sont la tolérance immunitaire (inhibition spécifique de la réponse immunitaire) lors de la grossesse (Gorbunova & Shirshev, 2020) en accord avec son implication dans la reproduction (Clarke et al., 2015; Pinilla et al., 2012). De rares études mentionnent également son implication dans certaines maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaque (Xing et al., 2018) et l'arthrite rhumatoïde (Wang et al., 2021).

Concernant le NPFF (ligand endogène de NPFF2R), de plus en plus d'études argumentent en faveur de propriétés anti-inflammatoires, *in vitro* et *in vivo*. En effet, le NPFF en module la prolifération des lymphocytes T (Lecron et al., 1992) et la présence de sites de liaison au NPFF sur ces cellules ont été identifiés plus tard (Minault et al., 1995). NPFF2R est exprimé par les macrophages issus du péritoine ainsi que ceux de la lignée RAW 264.7, et le NPFF réduit la production de NO par ces macrophages. Ce processus est inhibé par l'administration de RF9, un antagoniste des récepteurs du NPFF (Sun et al., 2013). Le NPFF favorise aussi l'activation et la prolifération des macrophages de type 2 du tissu adipeux chez l'Homme et la souris (Quillet & Simonin, 2018; Waqas et al., 2017). Enfin, le NPFF inhibe l'expression de transcrits liés à l'immunité dans la lignée de macrophage RAW 264.7 (Sun et al., 2021b) et régule le transcriptome de macrophages issus de la moelle osseuse, où NPFF2R est également exprimé (Sun et al., 2021a).

Dans le cadre de ce projet, nous pourrions supposer des propriétés immunomodulatrices similaires pour NPFF1R. Cependant, il n'existe à ce jour aucune donnée de la littérature indiquant l'expression de ce récepteur dans les cellules du système immunitaire. Dans nos expériences, les transcrits de NPFF1R et de son ligand RFRP-3 ne sont pas détectables dans les leucocytes isolés à partir du sang de souris naïves ou ayant développé de la SLD par RTqPCR (données non montrées). De plus, dans la lignée de macrophages RAW 264.7, l'ARNm de NPFF1R n'est pas détectable par RT-qPCR (Sun et al., 2021b). Pourtant au sein de la ME, NPFF1R et RFRP-3 sont exprimés dans les neurones (données internes au laboratoire) et contribuent à la mise en place et du maintien de la SLD. Ainsi, si RFRP-3 et NPFF1R modulent les cellules immunitaires qui initient les processus inflammatoires qui sous-tendent la SLD ou si à l'inverse, les cellules immunitaires modulent l'activité des neurones qui expriment NPFF1R dans la ME, il semblerait que cela soit par un mode d'action indirect. L'inflammation latente sous-jacente à la SLD ferait ainsi intervenir au moins un autre facteur, voir même un troisième acteur cellulaire différent. Des études plus approfondies sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse et déterminer les différents facteurs moléculaires et ces cellulaires qui contribuent aux processus inflammatoires à l'origine de la SLD.

Conclusion

Ce travail de thèse aura permis de montrer que la SLD est un phénomène durable mais réversible lentement et progressivement au cours du temps. L'activation des récepteurs à peptide RF-amide GPR103 ne semblent pas essentiels au développement de cette SLD, puisque le blocage pharmacologique de ces récepteurs par son antagoniste ne prévient pas ce phénomène. En revanche un traitement de plusieurs jours avec cet antagoniste bloque transitoirement une SLD déjà établie, indiquant que l'activation des récepteurs GPR103 est responsable de l'expression mais pas de la maintenance de ce phénomène. Par ailleurs, l'administration répétée de l'antagoniste du récepteur NPFF1R prévient très efficacement cet état, indiquant une activation précoce de ce récepteur lors de la phase d'hyperalgésie primaire. De plus, l'activation de ce récepteur semble également essentielle au maintien de l'état de SLD puisqu'un traitement de quelques jours à l'aide de cet antagoniste bloque définitivement la persistance de ce phénomène. Ces résultats ont été confirmés par le blocage génétique de NPFF1R à l'aide de souris KO. Nous avons ainsi identifié un nouveau système pro-nociceptif et anti-opioïde responsable de l'établissement et du maintien de la SLD. Cette dernière semble également étroitement associée à des processus inflammatoires latents dont l'origine reste à confirmer. Nos premiers résultats indiquent que ces adaptations pourraient être associées à des cellules du système immunitaire périphérique. Dans l'ensemble, ce projet aura permis de mieux comprendre les adaptations menant à la mise en place de la sensibilisation latente associée aux douleurs persistantes et d'identifier ainsi de nouvelles cibles thérapeutiques pour développer des traitements plus efficaces contre les processus à l'origine de la chronicisation de la douleur.

Bibliographie

A

Aczél, T., Kun, J., Szőke, É., Rauch, T., Junttila, S., Gyenesei, A., Bölcskei, K., & Helyes, Z. (2018). Transcriptional Alterations in the Trigeminal Ganglia, Nucleus and Peripheral Blood Mononuclear Cells in a Rat Orofacial Pain Model. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*, 219.

Aicher, S. A., Punnoose, A., & Goldberg, A. (2000). Mu-Opioid receptors often colocalize with the substance P receptor (NK1) in the trigeminal dorsal horn. *The Journal of Neuroscience*, 20(11), 4345-4354.

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, *124*(4), 783-801.

Alexander, S. P. H., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., Davies, J. A., CGTP Collaborators, Abbracchio, M. P., Alexander, W., Alhosaini, K., Bäck, M., ... Yao, C. (2019). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20 : G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology*, *176*(S1).

Aley, K. O., Messing, R. O., Mochly-Rosen, D., & Levine, J. D. (2000). Chronic Hypersensitivity For Inflammatory Nociceptor Sensitization Mediated by the ε Isozyme of Protein Kinase C. *The Journal of Neuroscience*, 20(12), 4680-4685.

Alfakry, H., Malle, E., Koyani, C. N., Pussinen, P. J., & Sorsa, T. (2016). Neutrophil proteolytic activation cascades : A possible mechanistic link between chronic periodontitis and coronary heart disease. *Innate Immunity*, 22(1), 85-99.

Allard, M., Geoffre, S., Legendre, P., Vincent, J. D., & Simonnet, G. (1989). Characterization of rat spinal cord receptors to FLFQPQRFamide, a mammalian morphine modulating peptide : A binding study. *Brain Research*, *500*(1-2), 169-176.

Allard, M., Zajac, J. M., & Simonnet, G. (1992). Autoradiographic distribution of receptors to FLFQPQRFamide, a morphine-modulating peptide, in rat central nervous system. *Neuroscience*, *49*(1), 101-116.

al-Rodhan, N., Yaksh, T., & Kelly, P. (1992). Comparison of the neurochemistry of the endogenous opioid systems in two brainstem pain-processing centers. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 59(1-4), 15-19.

Altier, N., Dray, A., Ménard, D., & Henry, J. L. (2000). Neuropeptide FF attenuates allodynia in models of chronic inflammation and neuropathy following intrathecal or intracerebroventricular administration. *European Journal of Pharmacology*, 407(3), 245-255.

American Psychiatric Association (Éd.). (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5* (5th ed). American Psychiatric Association.

Angst, M. S., & Clark, J. D. (2006). Opioid-induced hyperalgesia : A qualitative systematic review. *Acute Pain*, *104*(3), 570-587.

Apkarian, A. V., Bushnell, M. C., Treede, R. D., & Zubieta, J. K. (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *European Journal of Pain*, 9(4), 463-484.

Araldi, D., Ferrari, L. F., & Levine, J. D. (2018). Mu-opioid Receptor (MOR) Biased Agonists Induce Biphasic Dose-dependent Hyperalgesia and Analgesia, and Hyperalgesic Priming in the Rat. *Neuroscience*, *394*, 60-71.

Aratani, Y. (2018). Myeloperoxidase : Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 640, 47-52.

Attal, N. (2019). Pharmacological treatments of neuropathic pain: The latest recommendations. *Revue Neurologique*, 175(1), 46-50.

Ayachi, S. (2017). Implication des récepteurs à peptides RF-amide dans la modulation de la douleur et de l'hyperalgésie induite par les opiacés. Université de Strasbourg.

Ayachi, S., & Simonin, F. (2014). Involvement of Mammalian RF-Amide Peptides and Their Receptors in the Modulation of Nociception in Rodents. *Frontiers in Endocrinology*, *5*(158).

B

Bals-Kubik, R., Ableitner, A., & Shippenberg, T. S. (1993). Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *264*(1), 489-495.

Bardoni, R., Tawfik, V. L., Wang, D., François, A., Solorzano, C., Shuster, S. A., Choudhury,
P., Betelli, C., Cassidy, C., Smith, K., de Nooij, J. C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer,
B. L., Woodbury, C. J., Basbaum, A. I., MacDermott, A. B., & Scherrer, G. (2014). Delta
Opioid Receptors Presynaptically Regulate Cutaneous Mechanosensory Neuron Input to the
Spinal Cord Dorsal Horn. *Neuron*, *81*(6), 1312-1327.

Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 139(2), 267-284.

Beecher, H. (1956). Relationship of significance of wound to pain experienced. *Journal of the American Medical Association*, *161*(17), 1609-1613.

Bengtsson, A. A., Sturfelt, G., Lood, C., Rönnblom, L., van Vollenhoven, R. F., Axelsson, B., Sparre, B., Tuvesson, H., Wallén Ohman, M., & Leanderson, T. (2012). Pharmacokinetics, tolerability, and preliminary efficacy of paquinimod (ABR-215757), a new quinoline-3-carboxamide derivative : Studies in lupus-prone mice and a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, repeat-dose, dose-ranging study in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatology*, *64*(5), 1579-1588.

Benrath, J., Brechtel, C., Stark, J., & Sandkühler, J. (2005). Low dose of S(+)-ketamine prevents long-term potentiation in pain pathways under strong opioid analgesia in the rat spinal cord in vivo. *British Journal of Anaesthesia*, 95(4), 518-523.

Besse, D., Lombard, M., Zajac, J. M., Roques, B., & Besson, J. M. (1990). Pre- and postsynaptic distribution of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Research*, *521*(1-2), 15-22.

Bihel, F., Humbert, J.-P., Schneider, S., Bertin, I., Wagner, P., Schmitt, M., Laboureyras, E., Petit-Demoulière, B., Schneider, E., Mollereau, C., Simonnet, G., Simonin, F., & Bourguignon, J. J. (2015). Development of a peptidomimetic antagonist of neuropeptide FF receptors for the prevention of opioid-induced hyperalgesia. *ACS Chemical Neuroscience*, 6(3), 438-445.

Bilsky, E. J., Bernstein, R. N., Wang, Z., Sadée, W., & Porreca, F. (1996). Effects of naloxone and D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH2 and the protein kinase inhibitors H7 and H8 on acute morphine dependence and antinociceptive tolerance in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277(1), 484-490.

Björk, P., Björk, A., Vogl, T., Stenström, M., Liberg, D., Olsson, A., Roth, J., Ivars, F., & Leanderson, T. (2009). Identification of Human S100A9 as a Novel Target for Treatment of Autoimmune Disease via Binding to Quinoline-3-Carboxamides. *PLoS Biology*, 7(4), e97.

Blom, A. B., van den Bosch, M. H., Blaney Davidson, E. N., Roth, J., Vogl, T., van de Loo, F. A., Koenders, M., van der Kraan, P. M., Geven, E. J., & van Lent, P. L. (2020). The alarmins S100A8 and S100A9 mediate acute pain in experimental synovitis. *Arthritis Research & Therapy*, 22(1), 199.

Bockaert, J., & Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors : An evolutionary success. *The EMBO Journal*, *18*(7), 1723-1729.

Bodnar, R. J. (2020). Endogenous Opiates and Behavior : 2018. Peptides, 132, 170348.

Boer, H. H., Schot, L. P. C., Veenstra, J. A., & Reichelt, D. (1980). Immunocytochemical identification of neural elements in the central nervous systems of a snail, some insects, a fish, and a mammal with an antiserum to the molluscan cardio-excitatory tetrapeptide FMRF-amide. *Cell And Tissue Research*, *213*(1), 21-27.

Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R., Lin, F. T., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (2000). Muopioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature*, 408(6813), 720-723.

Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R., Peppel, K., Caron, M. G., & Lin, F. T. (1999). Enhanced Morphine Analgesia in Mice Lacking beta-Arrestin 2. *Science*, *286*(5449), 2495-2498.

Bokoch, G. M., & Gilman, A. G. (1984). Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by pertussis toxin. *Cell*, *39*(2), 301-308.

Bonini, J. A., Jones, K. A., Adham, N., Forray, C., Artymyshyn, R., Durkin, M. M., Smith, K. E., Tamm, J. A., Boteju, L. W., Lakhlani, P. P., Raddatz, R., Yao, W. J., Ogozalek, K. L., Boyle, N., Kouranova, E. V., Quan, Y., Vaysse, P. J., Wetzel, J. M., Branchek, T. A., ...

Borowsky, B. (2000). Identification and Characterization of Two G Protein-coupled Receptors for Neuropeptide FF. *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), 39324-39331.

Bonnard, E., Burlet-Schiltz, O., Francés, B., Mazarguil, H., Monsarrat, B., Zajac, J. M., & Roussin, A. (2001). Identification of neuropeptide FF-related peptides in rodent spinal cord. *Peptides*, *22*(7), 1085-1092.

Borsook, D., Hargreaves, R., Bountra, C., & Porreca, F. (2014). Lost but making progress— Where will new analgesic drugs come from? *Science Translational Medicine*, 6(249), 249sr3.

Bos, A., Wever, R., & Roos, D. (1978). Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, *525*(1), 37-44.

Brownstein, M. J. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(12), 5391-5393.

Bruzzone, F., Lectez, B., Tollemer, H., Leprince, J., Dujardin, C., Rachidi, W., Chatenet, D., Baroncini, M., Beauvillain, J. C., Vallarino, M., Vaudry, H., & Chartrel, N. (2006). Anatomical distribution and biochemical characterization of the novel RFamide peptide 26RFa in the human hypothalamus and spinal cord. *Journal of Neurochemistry*, *99*(2), 616-627.

Burlet-Schiltz, O., Mazarguil, H., Sol, J. C., Chaynes, P., Monsarrat, B., Zajac, J. M., & Roussin, A. (2002). Identification of neuropeptide FF-related peptides in human cerebrospinal fluid by mass spectrometry. *FEBS Letters*, *532*(3), 313-318.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines : Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 611-622.

C

Cahill, C. M., Holdridge, S. V., & Morinville, A. (2007). Trafficking of δ -opioid receptors and other G-protein-coupled receptors : Implications for pain and analgesia. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(1), 23-31.

Cahill, C. M., Morinville, A., Hoffert, C., O'Donnell, D., & Beaudet, A. (2003). Up-regulation and trafficking of d opioid receptor in a model of chronic inflammation : Implications for pain control. *Pain*, *101*(1-2), 199-208.

Cairns, B. E., Arendt-Nielsen, L., & Sacerdote, P. (2015). Perspectives in Pain Research 2014 : Neuroinflammation and glial cell activation: The cause of transition from acute to chronic pain? *Scandinavian Journal of Pain*, 6(1), 3-6.

Campillo, A., Cabañero, D., Romero, A., García-Nogales, P., & Puig, M. M. (2011). Delayed postoperative latent pain sensitization revealed by the systemic administration of opioid antagonists in mice. *European Journal of Pharmacology*, 657(1-3), 89-96.

Carullo, V., Fitz-James, I., & Delphin, E. (2015). Opioid-Induced Hyperalgesia : A Diagnostic Dilemma. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy*, *29*(4), 378-384.

Cassel, D., & Selinger, Z. (1977). Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: Inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(8), 3307-3311.

CDC WONDER. (2020). Wide-Ranging Online Data for Epidemiologic Research (WONDER).

Célèrier, E., Laulin, J. P., Corcuff, J. B., Le Moal, M., & Simonnet, G. (2001). Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: A sensitization process. *Journal of Neuroscience*, *21*(11), 4074-4080.

Célèrier, E., Rivat, C., Jun, Y., Laulin, J. P., Larcher, A., Reynier, P., & Simonnet, G. (2000). Long-lasting Hyperalgesia Induced by Fentanyl in Rats. *Anesthesiology*, *92*(2), 465-472.

Chartrel, N., Alonzeau, J., Alexandre, D., Jeandel, L., Alvear-Perez, R., Leprince, J., Boutin, J., Vaudry, H., Anouar, Y., & Llorens-Cortes, C. (2011). The RFamide neuropeptide 26RFa and its role in the control of neuroendocrine functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *32*(4), 387-397.

Chartrel, N., Dujardin, C., Anouar, Y., Leprince, J., Decker, A., Clerens, S., Do-Rego, J. C., Vandesande, F., Llorens-Cortes, C., Costentin, J., Beauvillain, J. C., & Vaudry, H. (2003). Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), 15247-15252.

Chen, L., & Huang, L. Y. (1991). Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a mu opioid. *Neuron*, 7(2), 319-326.

Chen, S. R., & Pan, H. L. (2008). Removing TRPV1-expressing primary afferent neurons potentiates the spinal analgesic effect of δ -opioid agonists on mechano-nociception. *Neuropharmacology*, 55(2), 215-222.

Chen, W., & Marvizon, J. C. (2020). Neurokinin 1 receptor activation in the rat spinal cord maintains latent sensitization, a model of inflammatory and neuropathic chronic pain. *Neuropharmacology*, *177*, 108253.

Chen, W., & Marvizón, J. C. (2020). A Src family kinase maintains latent sensitization in rats, a model of inflammatory and neuropathic pain. *Brain Research*, *1746*, 146999.

Chen, W., McRoberts, J. A., Ennes, H. S., & Marvizón, J. C. (2021). CAMP signaling through protein kinase A and Epac2 induces substance P release in the rat spinal cord. *Neuropharmacology*, *189*, 108533.

Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., & Yu, L. (1993). Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities. *The Biochemical Journal*, 295(Part 3), 625-628.

Chiu, C. T., Ma, T., & Ho, I. K. (2006). Methamphetamine-induced behavioral sensitization in mice : Alterations in μ -opioid receptor. *Journal of Biomedical Science*, 13(6), 797-811.

Chou, R., Turner, J. A., Devine, E. B., Hansen, R. N., Sullivan, S. D., Blazina, I., Dana, T., Bougatsos, C., & Deyo, R. A. (2015). The Effectiveness and Risks of Long-Term Opioid

Therapy for Chronic Pain : A Systematic Review for a National Institutes of Health Pathways to Prevention Workshop. *Annals of Internal Medicine*, *162*(4), 276-286.

Christie, M. J., & Chesher, G. B. (1982). Physical dependence on physiologically released endogenous opiates. *Life Sciences*, *30*(14), 1173-1177.

Clarke, H., Dhillo, W. S., & Jayasena, C. N. (2015). Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders. *Endocrinology and Metabolism (Seoul, Korea)*, *30*(2), 124-141.

Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Colledge, W. H., Caraty, A., & Herbison, A. E. (2009). Distribution of Kisspeptin Neurones in the Adult Female Mouse Brain. *Journal of Neuroendocrinology*, *21*(8), 673-682.

Convertino, M., Samoshkin, A., Gauthier, J., Gold, M. S., Maixner, W., Dokholyan, N. V., & Diatchenko, L. (2015). µ-Opioid receptor 6-transmembrane isoform : A potential therapeutic target for new effective opioids. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *62*, 61-67.

Cook, S. P., & McCleskey, E. W. (2002). Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain*, *95*(1), 41-47.

Corder, G., Castro, D. C., Bruchas, M. R., & Scherrer, G. (2018). Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. *Annual Review of Neuroscience*, *41*(1), 453-473.

Corder, G., Doolen, S., Donahue, R. R., Winter, M. K., Jutras, B. L., He, Y., Hu, X., Wieskopf, J. S., Mogil, J. S., Storm, D. R., Wang, Z. J., McCarson, K. E., & Taylor, B. K. (2013). Constitutive μ-Opioid Receptor Activity Leads to Long-Term Endogenous Analgesia and Dependence. *Science*, *341*(6152), 1394-1399.

Costa, T., & Herz, A. (1989). Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(19), 7321-7325.

Coull, J. A. M., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M. W., & De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, *438*(7070), 1017-1021.

Couzin-Frankel, J. (2010). Inflammation Bares a Dark Side. Science, 330(6011), 1621-1621.

Csabafi, K., Bagosi, Z., Dobó, É., Szakács, J., Telegdy, G., & Szabó, G. (2018). Kisspeptin modulates pain sensitivity of CFLP mice. *Peptides*, *105*, 21-27.

D

Dale, C. S., Altier, C., Cenac, N., Giorgi, R., Juliano, M. A., Juliano, L., Zamponi, G. W., & Vergnolle, N. (2009). Analgesic properties of S100A9 C-terminal domain : A mechanism dependent on calcium channel inhibition. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 23(4), 427-438.

Dale, C. S., Pagano, R. de L., Paccola, C. C., Pinotti-Guirao, T., Juliano, M. A., Juliano, L., & Giorgi, R. (2006). Effect of the C-terminus of murine S100A9 protein on experimental nociception. *Peptides*, *27*(11), 2794-2802.

Darcq, E., & Kieffer, B. L. (2018). Opioid receptors : Drivers to addiction? *Nature Reviews Neuroscience*, 19(8), 499-514.

Deronic, A., Helmersson, S., Leanderson, T., & Ivars, F. (2014). The quinoline-3-carboxamide paquinimod (ABR-215757) reduces leukocyte recruitment during sterile inflammation : Leukocyte- and context-specific effects. *International Immunopharmacology*, *18*(2), 290-297.

Devillers, J. P., Boisserie, F., Laulin, J. P., Larcher, A., & Simonnet, G. (1995). Simultaneous activation of spinal antiopioid system (neuropeptide FF) and pain facilitatory circuitry by stimulation of opioid receptors in rats. *Brain Research*, 700(1-2), 173-181.

DeWire, S. M., Yamashita, D. S., Rominger, D. H., Liu, G., Cowan, C. L., Graczyk, T. M., Chen, X. T., Pitis, P. M., Gotchev, D., Yuan, C., Koblish, M., Lark, M. W., & Violin, J. D. (2013). A G Protein-Biased Ligand at the μ-Opioid Receptor Is Potently Analgesic with Reduced Gastrointestinal and Respiratory Dysfunction Compared with Morphine. *The journal* of pharmacology and experimental therapeutics, 344(3), 708-717.

D'Mello, R., & Dickenson, A. H. (2008). Spinal cord mechanisms of pain. *British Journal of Anaesthesia*, 101(1), 8-16.

Dockray, G. J., Reeve, J. R., Shively, J., Gayton, R. J., & Barnard, C. S. (1983). A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamide. *Nature*, *305*(5932), 328-330.

Dockray, G. J., Vaillant, C., & Williams, R. G. (1981). New vertebrate brain-gut peptide related to a molluscan neuropeptide and an opioid peptide. *Nature*, *293*(5834), 656-657.

Dodd, G. T., & Luckman, S. M. (2013). Physiological Roles of GPR10 and PrRP Signaling. *Frontiers in Endocrinology*, *4*, 20.

Drdla, R., Gassner, M., Gingl, E., & Sandkuhler, J. (2009). Induction of Synaptic Long-Term Potentiation After Opioid Withdrawal. *Science*, *325*(5937), 207-210.

Drdla-Schutting, R., Benrath, J., Wunderbaldinger, G., & Sandkuhler, J. (2012). Erasure of a Spinal Memory Trace of Pain by a Brief, High-Dose Opioid Administration. *Science*, *335*(6065), 235-238.

Dun, S. L., Brailoiu, G. C., Parsons, A., Yang, J., Zeng, Q., Chen, X., Chang, J. K., & Dun, N. J. (2003). Metastin-like immunoreactivity in the rat medulla oblongata and spinal cord. *Neuroscience Letters*, *335*(3), 197-201.

Dupouy, V., Puget, A., Eschalier, A., & Zajac, J. M. (1996). Species differences in the localization of neuropeptide FF receptors in rodent and lagomorph brain and spinal cord. *Peptides*, *17*(3), 399-405.

Eckert, W. A., & Light, A. R. (2002). Hyperpolarization of substantia gelatinosa neurons evoked by μ -, κ -, δ 1-, and δ 2-selective opioids. *The Journal of Pain*, *3*(2), 115-125.

Edgeworth, J., Gorman, M., Bennett, R., Freemont, P., & Hogg, N. (1991). Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(12), 7706-7713.

Elhabazi, K., Humbert, J. P., Bertin, I., Quillet, R., Utard, V., Schneider, S., Schmitt, M., Bourguignon, J. J., Laboureyras, E., Ben Boujema, M., Simonnet, G., Ancel, C., Simonneaux, V., Beltramo, M., Bucher, B., Sorg, T., Meziane, H., Schneider, E., Petit-Demoulière, B., ... Simonin, F. (2017). RF313, an orally bioavailable neuropeptide FF receptor antagonist, opposes effects of RF-amide-related peptide-3 and opioid-induced hyperalgesia in rodents. *Neuropharmacology*, *118*, 188-198.

Elhabazi, K., Humbert, J. P., Bertin, I., Schmitt, M., Bihel, F., Bourguignon, J. J., Bucher, B., Becker, J. A. J., Sorg, T., Meziane, H., Petit-Demoulière, B., Ilien, B., & Simonin, F. (2013). Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPFF receptors. *Neuropharmacology*, *75*, 164-171.

Elhabazi, K., Trigo, J., Mollereau, C., Moulédous, L., Zajac, J. M., Bihel, F., Schmitt, M., Bourguignon, J., Meziane, H., Petit-demoulière, B., Bockel, F., Maldonado, R., & Simonin, F. (2012). Involvement of neuropeptide FF receptors in neuroadaptive responses to acute and chronic opiate treatments: NPFF receptors in neuroadaptive responses to opiates. *British Journal of Pharmacology*, *165*(2), 424-435.

Elphick, M. R., & Mirabeau, O. (2014). The Evolution and Variety of RFamide-Type Neuropeptides : Insights from Deuterostomian Invertebrates. *Frontiers in Endocrinology*, *5*(93).

Elshourbagy, N. A., Ames, R. S., Fitzgerald, L. R., Foley, J. J., Chambers, J. K., Szekeres, P. G., Evans, N. A., Schmidt, D. B., Buckley, P. T., Dytko, G. M., Murdock, P. R., Milligan, G., Groarke, D. A., Tan, K. B., Shabon, U., Nuthulaganti, P., Wang, D. Y., Wilson, S., Bergsma, D. J., & Sarau, H. M. (2000). Receptor for the Pain Modulatory Neuropeptides FF and AF Is an Orphan G Protein-coupled Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(34), 25965-25971.

Emery, P. C., Wilson, K. G., & Kowal, J. (2014). Major Depressive Disorder and Sleep Disturbance in Patients with Chronic Pain. *Pain Research and Management*, 19(1), 35-41.

Erbs, E., Faget, L., Scherrer, G., Matifas, A., Filliol, D., Vonesch, J. L., Koch, M., Kessler, P., Hentsch, D., Birling, M. C., Koutsourakis, M., Vasseur, L., Veinante, P., Kieffer, B. L., & Massotte, D. (2015). A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Structure and Function*, *220*(2), 677-702.

Espinoza, E., Carrigan, M., Thomas, S. G., Shaw, G., & Edison, A. S. (2000). A Statistical View of FMRFamide Neuropeptide Diversity. *Molecular Neurobiology*, *21*(1-2), 35-56.

Evans, C., Keith, D., Morrison, H., Magendzo, K., & Edwards, R. (1992). Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*, *258*(5090), 1952-1955.

F

Fang, Q., Jiang, T., Li, N., Han, Z., & Wang, R. (2011). Central Administration of Neuropeptide FF and Related Peptides Attenuate Systemic Morphine Analgesia in Mice. *Protein & Peptide Letters*, 18(4), 403-409.

Fang, Q., Liu, Q., Li, N., Jiang, T., Li, Y., Yan, X., & Wang, R. (2009). Cardiovascular effects of intravenous administered 26RFa, a novel RFamide peptide ligand for GPR103, in anaesthetised rats. *European Journal of Pharmacology*, *621*(1-3), 61-66.

Fang, Q., Wang, Y. Q., He, F., Guo, J., Guo, J., Chen, Q., & Wang, R. (2008). Inhibition of neuropeptide FF (NPFF)-induced hypothermia and anti-morphine analgesia by RF9, a new selective NPFF receptors antagonist. *Regulatory Peptides*, *147*(1-3), 45-51.

Fattori, V., Ferraz, C. R., Rasquel-Oliveira, F. S., & Verri, W. A. (2021). Neuroimmune communication in infection and pain : Friends or foes? *Immunology Letters*, *229*, 32-43.

Ferrini, F., Trang, T., Mattioli, T.-A. M., Laffray, S., Del'Guidice, T., Lorenzo, L. E., Castonguay, A., Doyon, N., Zhang, W., Godin, A. G., Mohr, D., Beggs, S., Vandal, K., Beaulieu, J. M., Cahill, C. M., Salter, M. W., & De Koninck, Y. (2013). Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl- homeostasis. *Nature Neuroscience*, *16*(2), 183-192.

Fichna, J., Janecka, A., Costentin, J., & Do Rego, J. C. (2007). The Endomorphin System and Its Evolving Neurophysiological Role. *Pharmacological Reviews*, *59*(1), 88-123.

Fields, H. (2004). State-dependent opioid control of pain. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(7), 565-575.

Findeisen, M., Rathmann, D., & Beck-Sickinger, A. G. (2011). RFamide Peptides : Structure, Function, Mechanisms and Pharmaceutical Potential. *Pharmaceuticals*, *4*(9), 1248-1280.

Fletcher, D., & Martinez, V. (2014). Opioid-induced hyperalgesia in patients after surgery : A systematic review and a meta-analysis. *British Journal of Anaesthesia*, *112*(6), 991-1004.

Foltz, L., Suter, T., Gackenheimer, S., Ruble, C., Pedregal, C., Statnick, M., & Emmerson, P. (2012). *In Vitro Pharmacological Characterization of Human and Mouse QRFP/GPR103 Receptors*.

François, A., Low, S. A., Sypek, E. I., Christensen, A. J., Sotoudeh, C., Beier, K. T., Ramakrishnan, C., Ritola, K. D., Sharif-Naeini, R., Deisseroth, K., Delp, S. L., Malenka, R. C., Luo, L., Hantman, A. W., & Scherrer, G. (2017). A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins. *Neuron*, *93*(4), 822-839.e6.

François, A., & Scherrer, G. (2017). Delta Opioid Receptor Expression and Function in Primary Afferent Somatosensory Neurons. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 247, 87-114.

Frankiewicz, T., Potier, B., Bashir, Z., Collingrigde, C., & Parsons, C. G. (1996). Effects of memantine and MK-801 on NMDA-induced currents in cultured neurones and on synaptic transmission and LTP in area CAl of rat hippocampal slices. *British Journal of Pharmacology*, *117*(4), 689-697.

Fransén Pettersson, N., Deronic, A., Nilsson, J., Hannibal, T. D., Hansen, L., Schmidt-Christensen, A., Ivars, F., & Holmberg, D. (2018). The immunomodulatory quinoline-3-carboxamide paquinimod reverses established fibrosis in a novel mouse model for liver fibrosis. *PLOS ONE*, *13*(9), e0203228.

Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G., & Schiöth, H. B. (2003). The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Molecular Pharmacology*, *63*(6), 1256-1272.

Fujii, R., Fukusumi, S., Hosoya, M., Kawamata, Y., Habata, Y., Hinuma, S., Sekiguchi, M., Kitada, C., Kurokawa, T., Nishimura, O., Onda, H., Sumino, Y., & Fujino, M. (1999). Tissue distribution of prolactin-releasing peptide (PrRP) and its receptor. *Regulatory Peptides*, *83*(1), 1-10.

Fujita, W., Gomes, I., & Devi, L. A. (2015). Heteromers of μ - δ opioid receptors : New pharmacology and novel therapeutic possibilities. *British Journal of Pharmacology*, 172(2), 375-387.

Fukusumi, S., Fujii, R., & Hinuma, S. (2006). Recent advances in mammalian RFamide peptides : The discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides*, *27*(5), 1073-1086.

Fukusumi, S., Habata, Y., Yoshida, H., Iijima, N., Kawamata, Y., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Kitada, C., Shintani, Y., Suenaga, M., Onda, H., Nishimura, O., Tanaka, M., Ibata, Y., & Fujino, M. (2001). Characteristics and distribution of endogenous RFamide-related peptide-1. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1540*(3), 221-232.

Fukusumi, S., Yoshida, H., Fujii, R., Maruyama, M., Komatsu, H., Habata, Y., Shintani, Y., Hinuma, S., & Fujino, M. (2003). A New Peptidic Ligand and Its Receptor Regulating Adrenal Function in Rats. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46387-46395.

Fullerton, J. N., & Gilroy, D. W. (2016). Resolution of inflammation : A new therapeutic frontier. *Nature Reviews Drug Discovery*, *15*(8), 551-567.

Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L.,
Gilroy, D. W., Fasano, A., Miller, G. W., Miller, A. H., Mantovani, A., Weyand, C. M.,
Barzilai, N., Goronzy, J. J., Rando, T. A., Effros, R. B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., & Slavich,
G. M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine*, 25(12), 1822-1832.

G

Gallantine, E. L., & Meert, T. F. (2005). A Comparison of the Antinociceptive and Adverse Effects of the mu-Opioid Agonist Morphine and the delta-Opioid Agonist SNC80. *Basic & Clinical Pharmaocology & Toxicology*, *97*(1), 39-51.

Gaubert, G., Bertozzi, F., Kelly, N. M., Pawlas, J., Scully, A. L., Nash, N. R., Gardell, L. R., Lameh, J., & Olsson, R. (2009). Discovery of Selective Nonpeptidergic Neuropeptide FF2 Receptor Agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, *52*(21), 6511-6514.

Gauriau, C., & Bernard, J. F. (2002). Pain Pathways and Parabrachial Circuits in the Rat. *Experimental Physiology*, 87(2), 251-258.

Gavériaux-Ruff, C., Karchewski, L. A., Hever, X., Matifas, A., & Kieffer, B. L. (2008). Inflammatory pain is enhanced in delta opioid receptor-knockout mice. *European Journal of Neuroscience*, *27*(10), 2558-2567.

Gavériaux-Ruff, C., & Kieffer, B. L. (2011). Delta opioid receptor analgesia: Recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behavioural Pharmacology*, 22(5-6), 405-414.

Gealageas, R., Schneider, S., Humbert, J. P., Bertin, I., Schmitt, M., Laboureyras, E., Dugave, C., Mollereau, C., Simonnet, G., Bourguignon, J. J., Simonin, F., & Bihel, F. (2012). Development of sub-nanomolar dipeptidic ligands of neuropeptide FF receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *22*(24), 7471-7474.

Gelot, A., Francés, B., Gicquel, S., & Zajac, J. M. (1998). Antisense oligonucleotides to human SQA-neuropeptide FF decrease morphine tolerance and dependence in mice. *European Journal of Pharmacology*, *358*(3), 203-206.

Gendron, L., Mittal, N., Beaudry, H., & Walwyn, W. (2015). Recent advances on the δ opioid receptor : From trafficking to function. *British Journal of Pharmacology*, *172*(2), 403-419.

George, S. R., Fan, T., Xie, Z., Roderick, T., Tam, V., Varghese, G., & O'Dowd, B. F. (2000). Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(34), 26128-26135.

Giorgi, R., Pagano, R. L., Dias, M. A. A., Aguiar-Passeti, T., Sorg, C., & Mariano, M. (1998). Antinociceptive effect of the calcium-binding protein MRP-14 and the role played by neutrophils on the control of inflammatory pain. *Journal of Leukocyte Biology*, *64*(2), 214-220.

Gomes, I., Fujita, W., Gupta, A., Saldanha, S. A., Negri, A., Pinello, C. E., Eberhart, C., Roberts, E., Filizola, M., Hodder, P., & Devi, L. A. (2013). Identification of a μ - δ opioid receptor heteromer-biased agonist with antinociceptive activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(29), 12072-12077.

Gomes, I., Gupta, A., Filipovska, J., Szeto, H. H., Pintar, J. E., & Devi, L. A. (2004). A role for heterodimerization of and opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(14), 5135-5139.

Gomes, I., IJzerman, A. P., Ye, K., Maillet, E. L., & Devi, L. A. (2011). G Protein-Coupled Receptor Heteromerization : A Role in Allosteric Modulation of Ligand Binding. *Molecular Pharmacology*, 79(6), 1044-1052.

Gomes, I., Jordan, B., Gupta, A., Trapaidze, N., Nagy, V., & Devi, L. (2000). Heterodimerization of μ and δ Opioid Receptors : A Role in Opiate Synergy. *The Journal of Neuroscience*, 20(22), RC110.

Gong, H., Su, W. J., Cao, Z. Y., Lian, Y. J., Peng, W., Liu, Y. Z., Zhang, Y., Liu, L. L., Wu, R., Wang, B., Zhang, T., Wang, Y. X., & Jiang, C. L. (2018). Hippocampal Mrp8/14 signaling plays a critical role in the manifestation of depressive-like behaviors in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 252.

Goodman, O. B., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H., & Benovic, J. L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptorP-Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the p2-adrenergic receptor. *Nature*, *383*(6599), 447-450.

Gorbunova, O. L., & Shirshev, S. V. (2020). Role of Kisspeptin in Regulation of Reproductive and Immune Reactions. *Biochemistry (Moscow)*, *85*(8), 839-853.

Gouardères, C., Faura, C. C., & Zajac, J. M. (2004a). Rodent strain differences in the NPFF1 and NPFF2 receptor distribution and density in the central nervous system. *Brain Research*, *1014*(1-2), 61-70.

Gouardères, C., Kieffer, B. L., & Zajac, J. M. (2004b). Opposite alterations of NPFF1 and NPFF2 neuropeptide FF receptor density in the triple MOR/DOR/KOR-opioid receptor knockout mouse brains. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 27(2), 119-128.

Gouardères, C., Puget, A., & Zajac, J. M. (2004c). Detailed distribution of neuropeptide FF receptors (NPFF 1 and NPFF 2) in the rat, mouse, octodon, rabbit, guinea pig, and marmoset monkey brains : A comparative autoradiographic study: Localization of Neuropeptide FF Receptors. *Synapse*, *51*(4), 249-269.

Gouardères, C., Quelven, I., Mollereau, C., Mazarguil, H., Rice, S. Q. J., & Zajac, J. M. (2002). Quantitative autoradiographic distribution of NPFF1 neuropeptide FF receptor in the rat brain and comparison with NPFF2 receptor by using [125I]YVP and [125I]EYF as selective radioligands. *Neuroscience*, *115*(2), 349-361.

Gouardères, C., Roumy, M., Advokat, C., Jhamandas, K., & Zajac, J. M. (2000). Dual localization of neuropeptide FF receptors in the rat dorsal horn. *Synapse*, *35*(1), 45-52.

Granata, R., Settanni, F., Trovato, L., Gallo, D., Gesmundo, I., Nano, R., Gallo, M. P., Bergandi, L., Volante, M., Alloatti, G., Piemonti, L., Leprince, J., Papotti, M., Vaudry, H., Ong, H., & Ghigo, E. (2014). RFamide Peptides 43RFa and 26RFa Both Promote Survival of Pancreatic -Cells and Human Pancreatic Islets but Exert Opposite Effects on Insulin Secretion. *Diabetes*, *63*(7), 2380-2393.

Gris, P., Gauthier, J., Cheng, P., Gibson, D. G., Gris, D., Laur, O., Pierson, J., Wentworth, S., Nackley, A. G., Maixner, W., & Diatchenko, L. (2010). A Novel Alternatively Spliced Isoform of the Mu-Opioid Receptor : Functional Antagonism. *Molecular Pain*, *6*, 33.

Gupta, A., Mulder, J., Gomes, I., Rozenfeld, R., Bushlin, I., Ong, E., Lim, M., Maillet, E., Junek, M., Cahill, C. M., Harkany, T., & Devi, L. A. (2010). Increased Abundance of Opioid Receptor Heteromers After Chronic Morphine Administration. *Science Signaling*, *3*(131), ra54.

Gutierrez-Mecinas, M., Bell, A., Polgár, E., Watanabe, M., & Todd, A. J. (2019). Expression of Neuropeptide FF Defines a Population of Excitatory Interneurons in the Superficial Dorsal

Horn of the Mouse Spinal Cord that Respond to Noxious and Pruritic Stimuli. *Neuroscience*, *416*, 281-293.

Gysling, K., & Wang, R. Y. (1983). Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat. *Brain Research*, 277(1), 119-127.

Η

Hammoud, H., Elhabazi, K., Quillet, R., Bertin, I., Utard, V., Laboureyras, E., Bourguignon, J. J., Bihel, F., Simonnet, G., Simonin, F., & Schmitt, M. (2018). Aminoguanidine Hydrazone Derivatives as Nonpeptide NPFF1 Receptor Antagonists Reverse Opioid Induced Hyperalgesia. *ACS Chemical Neuroscience*, *9*(11), 2599-2609.

Harasawa, I., Fields, H. L., & Meng, I. D. (2000). Delta opioid receptor mediated actions in the rostral ventromedial medulla on tail flick latency and nociceptive modulatory neurons. *Pain*, 85(1-2), 255-262.

Haugan, F., Rygh, L. J., & Tjølsen, A. (2008). Ketamine blocks enhancement of spinal long-term potentiation in chronic opioid treated rats. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, *52*(5), 681-687.

Heinke, B., Gingl, E., & Sandkühler, J. (2011). Multiple targets of μ -opioid receptor-mediated presynaptic inhibition at primary afferent Aδ- and C-fibers. *Journal of Neuroscience*, *31*(4), 1313-1322.

Helmersson, S., Sundstedt, A., Deronic, A., Leanderson, T., & Ivars, F. (2013). Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by the Quinoline-3-Carboxamide Paquinimod. *The American Journal of Pathology*, *182*(5), 1671-1680.

Herbison, A. E., d'Anglemont de Tassigny, X., Doran, J., & Colledge, W. H. (2010). Distribution and Postnatal Development of Gpr54 Gene Expression in Mouse Brain and Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrinology*, *151*(1), 312-321.

Hill, R., Disney, A., Conibear, A., Sutcliffe, K., Dewey, W., Husbands, S., Chris, B., Kelly, E., & Henderson, G. (2018). The novel μ-opioid receptor agonist PZM21 depresses respiration and induces tolerance to antinociception. *British Journal of Pharmacology*, *175*(13), 2653-2661.

Himmelsbach, C. (1941). The morphine abstinence syndrome, its nature and treatment. *Annals of Internal Medicine*, *15*, 829-839.

Hinuma, S., Habata, Y., Fujii, R., Kawamata, Y., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kitada, C., Masuo, Y., Asano, T., Matsumoto, H., Sekiguchi, M., Kurokawa, T., Nishimura, O., Onda, H., & Fujino, M. (1998). A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature*, *393*(272-276), 301-304.

Hinuma, S., Shintani, Y., Fukusumi, S., Iijima, N., Matsumoto, Y., Hosoya, M., Fujii, R., Watanabe, T., Kikuchi, K., Terao, Y., Yano, T., Yamamoto, T., Kawamata, Y., Habata, Y., Asada, M., Kitada, C., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., ... Fujino, M. (2000). New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nature Cell Biology*, *2*(10), 703-708.

Hofmann, M. A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P., Neurath, M. F., Slattery, T., Beach, D., McClary, J., Nagashima, M., Morser, J., Stern, D., & Schmidt, A. M. (1999). RAGE Mediates a Novel Proinflammatory Axis : A Central Cell Surface Receptor for S100/Calgranulin Polypeptides. *Cell*, *97*(7), 889-901.

Hogg, N., Allen, C., & Edgeworth, J. (1989). Monoclonal antibody 5.5 reacts with p8,14, a myeloid molecule associated with some vascular endothelium. *European Journal of Immunology*, 19(6), 1053-1061.

Horvath, I., Iashchishyn, I. A., Moskalenko, R. A., Wang, C., Wärmländer, S. K., Wallin, C., Gräslund, A., Kovacs, G. G., & Morozova-Roche, L. A. (2018). Co-aggregation of proinflammatory S100A9 with α -synuclein in Parkinson's disease : Ex vivo and in vitro studies. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 172.

Hylands-White, N., Duarte, R. V., & Raphael, J. H. (2017). An overview of treatment approaches for chronic pain management. *Rheumatology International*, *37*(1), 29-42.

I

Ikeda, H., Heinke, B., Ruscheweyh, R., & Sandkühler, J. (2003). Synaptic Plasticity in Spinal Lamina I Projection Neurons That Mediate Hyperalgesia. *Science*, *299*(5610), 1237-1240.

Ikeda, H., Stark, J., Fischer, H., Wagner, M., Drdla, R., Jäger, T., & Sandkühler, J. (2006). Synaptic Amplifier of Inflammatory Pain in the Spinal Dorsal Horn. *Science*, *312*(5780), 1659-1662.

Inyang, K. E., George, S. R., & Laumet, G. (2021). The μ - δ opioid heteromer masks latent pain sensitization in neuropathic and inflammatory pain in male and female mice. *Brain Research*, 1756, 147298.

J

Jackson, T., Thomas, S., Stabile, V., Shotwell, M., Han, X., & McQueen, K. (2016). A Systematic Review and Meta-Analysis of the Global Burden of Chronic Pain Without Clear Etiology in Low- and Middle-Income Countries : Trends in Heterogeneous Data and a Proposal for New Assessment Methods. *Anesthesia & Analgesia*, *123*(3), 739-748.

Jhamandas, J. H., & Goncharuk, V. (2013). Role of neuropeptide FF in central cardiovascular and neuroendocrine regulation. *Frontiers in Endocrinology*, *4*.

Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. A., & Woolf, C. J. (2003). Central sensitization and LTP : Do pain and memory share similar mechanisms? Trends in Neurosciences, 26(12), 696-705.

Jiang, Y., Luo, L., Gustafson, E. L., Yadav, D., Laverty, M., Murgolo, N., Vassileva, G., Zeng, M., Laz, T. M., Behan, J., Qiu, P., Wang, L., Wang, S., Bayne, M., Greene, J., Monsma, F., & Zhang, F. L. (2003). Identification and Characterization of a Novel RF-amide Peptide Ligand for Orphan G-protein-coupled Receptor SP9155. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(30), 27652-27657.

Johnson, S., & North, R. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *The Journal of Neuroscience*, *12*(2), 483-488.

Journigan, V. B., Mésangeau, C., Vyas, N., Eans, S. O., Cutler, S. J., McLaughlin, J. P., Mollereau, C., & McCurdy, C. R. (2014). Nonpeptide Small Molecule Agonist and Antagonist Original Leads for Neuropeptide FF1 and FF2 Receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, *57*(21), 8903-8927.

Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203-210.

K

Kabli, N., Nguyen, T., Balboni, G., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2014). Antidepressantlike and anxiolytic-like effects following activation of the μ - δ opioid receptor heteromer in the nucleus accumbens. *Molecular Psychiatry*, 19(9), 986-994.

Kalliomäki, M.-L., Pertovaara, A., Brandt, A., Wei, H., Pietilä, P., Kalmari, J., Xu, M., Kalso, E., & Panula, P. (2004). Prolactin-releasing peptide affects pain, allodynia and autonomic reflexes through medullary mechanisms. *Neuropharmacology*, *46*(3), 412-424.

Kampe, J., Wiedmer, P., Pfluger, P. T., Castaneda, T. R., Burget, L., Mondala, H., Kerr, J., Liaw, C., Oldfield, B. J., Tschöp, M. H., & Bagnol, D. (2006). Effect of central administration of QRFP(26) peptide on energy balance and characterization of a second QRFP receptor in rat. *Brain Research*, *1119*(1), 133-149.

Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2013). Structure-Function of the G Protein– Coupled Receptor Superfamily. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53(1), 531-556.

Kawan, M. A., Kyrou, I., Ramanjaneyna, M., Williams, K., Jeyaneethi, J., Randeva, H. S., & Karteris, E. (2019). Involvement of the glutamine RF-amide peptide and its cognate receptor GPR103 in prostate cancer. *Oncology Reports*, *41*(2), 1140-1150.

Kenakin, T. (2001). Inverse, protean, and ligand-selective agonism: Matters of receptor conformation. *FASEB Journal*, *15*(3), 598-611.

Kenakin, T. (2004). Principles : Receptor theory in pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, *25*(4), 186-192.

Kenakin, T., & Christopoulos, A. (2013). Signalling bias in new drug discovery : Detection, quantification and therapeutic impact. *Nature Reviews Drug Discovery*, *12*(3), 205-216.

Kersanté, F., Mollereau, C., Zajac, J. M., & Roumy, M. (2006). Anti-opioid activities of NPFF1 receptors in a SH-SY5Y model. *Peptides*, 27(5), 980-989.

Kersanté, F., Moulédous, L., Zajac, J. M., & Mollereau, C. (2010). Modulation by Neuropeptide FF of the interaction of Mu-opioid (MOP) receptor with G-proteins. *Neurochemistry International*, *56*(6-7), 768-773.

Kieffer, B. L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C., & Hirth, C. G. (1992). The delta-opioid receptor : Isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89(24), 12048-12052.

Kim, D. K., Yun, S., Son, G. H., Hwang, J. I., Park, C. R., Kim, J. I., Kim, K., Vaudry, H., & Seong, J. Y. (2014). Coevolution of the Spexin/Galanin/Kisspeptin Family : Spexin Activates Galanin Receptor Type II and III. *Endocrinology*, *155*(5), 1864-1873.

Kim, J. S., Brownjohn, P. W., Dyer, B. S., Beltramo, M., Walker, C. S., Hay, D. L., Painter, G. F., Tyndall, J. D. A., & Anderson, G. M. (2015). Anxiogenic and Stressor Effects of the Hypothalamic Neuropeptide RFRP-3 Are Overcome by the NPFFR Antagonist GJ14. *Endocrinology*, *156*(11), 4152-4162.

Kirby, H. R., Maguire, J. J., Colledge, W. H., & Davenport, A. P. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVII. Kisspeptin Receptor Nomenclature, Distribution, and Function. *Pharmacological Reviews*, 62(4), 565-578.

Kirchheiner, J., Schmidt, H., Tzvetkov, M., Keulen, J. T., Lötsch, J., Roots, I., & Brockmöller, J. (2007). Pharmacokinetics of codeine and its metabolite morphine in ultra-rapid metabolizers due to CYP2D6 duplication. *The Pharmacogenomics Journal*, 7(4), 257-265.

Kivell, B., & Prisinzano, T. E. (2010). Kappa opioids and the modulation of pain. *Psychopharmacology*, 210(2), 109-119.

Kliewer, A., Schmiedel, F., Sianati, S., Bailey, A., Bateman, J. T., Levitt, E. S., Williams, J. T., Christie, M. J., & Schulz, S. (2019). Phosphorylation-deficient G-protein-biased μ -opioid receptors improve analgesia and diminish tolerance but worsen opioid side effects. *Nature Communications*, *10*(1), 367.

Klous, M. G., Van den Brink, W., Van Ree, J. M., & Beijnen, J. H. (2005). Development of pharmaceutical heroin preparations for medical co-prescription to opioid dependent patients. *Drug and Alcohol Dependence*, *80*(3), 13.

Kohno, T., Kumamoto, E., Higashi, H., Shimoji, K., & Yoshimura, M. (1999). Actions of opioids on excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord. *The Journal of Physiology*, *518*(3), 803-813.

Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J. M., Le Poul, E., Brézillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S. N., Vassart, G., & Parmentier, M. (2001). The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(37), 34631-34636.

Krajniak, K. G. (2013). Invertebrate FMRFamide Related Peptides. *Protein & Peptide Letters*, 20(6), 647-670.

Kummer, M. P., Vogl, T., Axt, D., Griep, A., Vieira-Saecker, A., Frank, J., Gelpi, E., Roth, J., & Heneka, M. T. (2012). Mrp14 deficiency ameliorates amyloid β burden by increasing microglial phagocytosis and modulation of amyloid precursor protein processing. *Journal of Neuroscience*, *32*(49), 17824-17829.

L

LaBuda, C. J., Sora, I., Uhl, G. R., & Fuchs, P. N. (2000). Stress-induced analgesia in muopioid receptor knockout mice reveals normal function of the delta-opioid receptor system. *Brain Research*, 869(1-2), 1-5.

Lagasse, E., & Clerc, R. G. (1998). Cloning and expression of two human genes encoding calcium-binding proteins that are regulated duringmyeloid differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 8(6), 2402-2410.

Lake, J. R., Hammond, M. V., Shaddox, R. C., Hunsicker, L. M., Yang, H. Y. T., & Malin, D. H. (1991). IgG from neuropeptide FF antiserum reverses morphine tolerance in the rat. *Neuroscience Letters*, *132*(1), 29-32.

Lam, H., Maga, M., Pradhan, A., Evans, C. J., Maidment, N. T., Hales, T. G., & Walwyn, W. (2011). Analgesic tone conferred by constitutively active mu opioid receptors in mice lacking β -arrestin 2. *Molecular Pain*, 7(24).

Lameh, J., Bertozzi, F., Kelly, N., Jacobi, P. M., Nguyen, D., Bajpai, A., Gaubert, G., Olsson, R., & Gardell, L. R. (2010). Neuropeptide FF Receptors Have Opposing Modulatory Effects on Nociception. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *334*(1), 244-254.

Langmead, C. J., Szekeres, P. G., Chambers, J. K., Ratcliffe, S. J., Jones, D. N. C., Hirst, W. D., Price, G. W., & Herdon, H. J. (2000). Characterization of the binding of [¹²⁵ I]-human prolactin releasing peptide (PrRP) to GPR10, a novel G protein coupled receptor: Characterization of [¹²⁵ I]-PrRP-20 binding to GPR10. *British Journal of Pharmacology*, *131*(4), 683-688.

Lapalu, S., Moisand, C., Butour, J. L., Mollereau, C., & Meunier, J. C. (1998). Different domains of the ORL1 and κ -opioid receptors are involved in recognition of nociceptin and dynorphin A. *FEBS Letters*, 427(2), 296-300.

Lapalu, S., Moisand, C., Mazarguil, H., Cambois, G., Mollereau, C., & Meunier, J. C. (1997). Comparison of the structure-activity relationships of nociceptin and dynorphin A using chimeric peptides. *FEBS Letters*, *417*(3), 333-336.

Latremoliere, A., & Woolf, C. J. (2009). Central Sensitization : A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *The Journal of Pain*, *10*(9), 895-926.

Laurent, P., Becker, J. A. J., Valverde, O., Ledent, C., de Kerchove d'Exaerde, A., Schiffmann, S. N., Maldonado, R., Vassart, G., & Parmentier, M. (2005). The prolactinreleasing peptide antagonizes the opioid system through its receptor GPR10. *Nature Neuroscience*, 8(12), 1735-1741.

Le Roy, C., Laboureyras, E., Gavello-Baudy, S., Chateauraynaud, J., Laulin, J. P., & Simonnet, G. (2011). Endogenous Opioids Released During Non-Nociceptive Environmental Stress Induce Latent Pain Sensitization Via a NMDA-Dependent Process. *The Journal of Pain*, *12*(10), 1069-1079.

Lecron, J. C., Minault, M., Allard, M., Laforest, P. G. de, Gombert, J., & Simonnet, G. (1992). Modulation of human lymphocyte proliferation by FLFQPQRFamide, a FMRFamide-like peptide with anti-opiate properties. *Journal of Neuroimmunology*, *38*(1-2), 1-8.

Lee, D. K., Nguyen, T., O'Neill, G. P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A. D., Coulombe, N., Tan, C. P., Tang-Nguyen, A. T., George, S. R., & O'Dowd, B. F. (1999). Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Letters*, 446(1), 103-107.

Lee, J. H., Miele, M. E., Hicks, D. J., Phillips, K. K., Trent, J. M., Weissman, B. E., & Welch, D. R. (1996). KiSS-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor Gene. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 88(23), 1731-1737.

Li, X., Angst, M. S., & Clark, J. D. (2001). A murine model of opioid-induced hyperalgesia. *Molecular Brain Research*, *86*(1-2), 56-62.

Lin, S. H. (2008). Prolactin-Releasing Peptide. *Results and Problem in Cell Differentiation*, 46, 57-88.

Liu, J. G., & Prather, P. L. (2001). Chronic exposure to mu-opioid agonists produces constitutive activation of mu-opioid receptors in direct proportion to the efficacy of the agonist used for pretreatment. *Molecular Pharmacology*, *60*(1), 53-62.

Liu, J. G., & Prather, P. L. (2002). Chronic Agonist Treatment Converts Antagonists into Inverse Agonists at δ -Opioid Receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(3), 1070-1079.

Liu, Q., Guan, X. M., Martin, W. J., McDonald, T. P., Clements, M. K., Jiang, Q., Zeng, Z., Jacobson, M., Williams, D. L., Yu, H., Bomford, D., Figueroa, D., Mallee, J., Wang, R., Evans, J., Gould, R., & Austin, C. P. (2001). Identification and Characterization of Novel Mammalian Neuropeptide FF-like Peptides That Attenuate Morphine-induced Antinociception. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(40), 36961-36969.

Liu, S. S., Pickens, S., Burma, N. E., Ibarra-Lecue, I., Yang, H., Xue, L., Cook, C., Hakimian, J. K., Severino, A. L., Lueptow, L., Komarek, K., Taylor, A. M. W., Olmstead, M. C., Carroll, F. I., Bass, C. E., Andrews, A. M., Walwyn, W., Trang, T., Evans, C. J., ... Cahill, C. M. (2019). Kappa Opioid Receptors Drive a Tonic Aversive Component of Chronic Pain. *The Journal of Neuroscience*, *39*(21), 4162-4178.

Liu, X. G., & Sandkühler, J. (1997). Characterization of long-term potentiation of C-fiberevoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat : Essential role of NK1 and NK2 receptors. *Journal of Neurophysiology*, 78(4), 1973-1982.

Liu, X., & Sandkühler, J. (1995). Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N-methyl-d-aspartic acid receptor blockage. *Neuroscience Letters*, *191*(1-2), 43-46.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta CT$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Loeser, J. D., & Treede, R. D. (2008). The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, *137*(3), 473-477.

Lombard, M. C., Weil-Fugazza, J., Ries, C., & Allard, M. (1999). Unilateral joint inflammation induces bilateral and time-dependent changes in neuropeptide FF binding in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord : Implication of supraspinal descending systems. *Brain Research*, *816*(2), 598-608.

Luján, R., Marron Fernandez de Velasco, E., Aguado, C., & Wickman, K. (2014). New insights into the therapeutic potential of Girk channels. *Trends in Neurosciences*, *37*(1), 20-29.

Μ

Majane, E. A., Casanova, M. F., & Yang, H. Y. T. (1988). Biochemical characterization of FMRF-NH2-like peptides in spinal cords of various mammalian species using specific radioimmunoassays. *Peptides*, 9(5), 1137-1144.

Malin, D. H., Lake, J. R., Fowler, D. E., Hammond, M. V., Brown, S. L., Leyva, J. E., Prasco, P. E., & Dougherty, T. M. (1990). FMRF-NH2-like mammalian peptide precipitates opiate-withdrawal syndrome in the rat. *Peptides*, *11*(2), 277-280.

Manglik, A., Lin, H., Aryal, D. K., McCorvy, J. D., Dengler, D., Corder, G., Levit, A., Kling, R. C., Bernat, V., Hübner, H., Huang, X.-P., Sassano, M. F., Giguère, P. M., Löber, S., Da Duan, Scherrer, G., Kobilka, B. K., Gmeiner, P., Roth, B. L., & Shoichet, B. K. (2016). Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature*, *537*(7619), 185-190.

Manitz, M.-P., Horst, B., Seeliger, S., Strey, A., Skryabin, B. V., Gunzer, M., Frings, W., Schönlau, F., Roth, J., Sorg, C., & Nacken, W. (2003). Loss of S100A9 (MRP14) Results in Reduced Interleukin-8-Induced CD11b Surface Expression, a Polarized Microfilament System, and Diminished Responsiveness to Chemoattractants In Vitro. *Molecular and Cellular Biology*, 23(3), 1034-1043.

Mansour, A., Fox, C. A., Akil, H., & Watson, S. J. (1995). Opioid-receptor mRNA expression rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends in Neurosciences*, *18*(1), 22-29.

Mao, J., Sung, B., Ji, R. R., & Lim, G. (2002). Chronic Morphine Induces Downregulation of Spinal Glutamate Transporters : Implications in Morphine Tolerance and Abnormal Pain Sensitivity. *The Journal of Neuroscience*, *22*(18), 8312-8323.

Marchese, A., Heiber, M., Nguyen, T., Heng, H. H. Q., Saldivia, V. R., Cheng, R., Murphy, P. M., Tsui, L. C., Shi, X., Gregor, P., George, S. R., O'Dowd, B. F., & Docherty, J. M. (1995). Cloning and Chromosomal Mapping of Three Novel Genes, GPR9, GPR10, and GPR14, Encoding Receptors Related to Interleukin 8, Neuropeptide Y, and Somatostatin Receptors. *Genomics*, *29*(2), 335-344.

Marker, C. L., Luján, R., Loh, H. H., & Wickman, K. (2005). Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids. *Journal of Neuroscience*, *25*(14), 3551-3559.

Martyn, J. A. J., Mao, J., & Bittner, E. A. (2019). Opioid Tolerance in Critical Illness. *New England Journal of Medicine*, 380(4), 365-378.

Marvizon, J. C., Walwyn, W., Minasyan, A., Chen, W., & Taylor, B. K. (2015). Latent Sensitization : A Model for Stress-Sensitive Chronic Pain. *Current Protocols in Neuroscience*, *71*, 9.50.1-9.50.14.

Masouris, I., Klein, M., Dyckhoff, S., Angele, B., Pfister, H. W., & Koedel, U. (2017). Inhibition of DAMP signaling as an effective adjunctive treatment strategy in pneumococcal meningitis. *Journal of Neuroinflammation*, *14*(1), 214.

Matsui, A., Jarvie, B. C., Robinson, B. G., Hentges, S. T., & Williams, J. T. (2014). Separate GABA Afferents to Dopamine Neurons Mediate Acute Action of Opioids, Development of Tolerance, and Expression of Withdrawal. *Neuron*, *82*(6), 1346-1356.

Matthes, H. W. D., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dollé, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B. P., & Kieffer, B. L. (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature*, *383*(6603), 819-823.

Mattson, C. L., Tanz, L. J., Quinn, K., Mbabazi, K., Patel, P., & Davis, N. L. (2021). Trends and Geographic Patterns in Drug and Synthetic Opioid Overdose Deaths—United States, 2013-2019. *MMWR*. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, *70*(6), 202-206.

Meade, J. A., Alkhlaif, Y., Contreras, K. M., Obeng, S., Toma, W., Sim-Selley, L. J., Selley, D. E., & Damaj, M. I. (2020). Kappa opioid receptors mediate an initial aversive component of paclitaxel-induced neuropathy. *Psychopharmacology*, *237*(9), 2777-2793.

Melzack, R., & Casey, K. L. (1968). Sensory, motivational and central control determinants of pain. In *Sensation and Perception* (p. 423-439).

Meunier, J.-C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J. L., Guillemot, J. C., Ferrara, P., Monsarrat, B., Mazarguil, H., Vassart, G., Parmentier, M., & Costentin, J. (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*, *377*(6549), 532-535.

Meye, F. J., van Zessen, R., Smidt, M. P., Adan, R. A., & Ramakers, G. M. (2012). Morphine withdrawal enhances constitutive μ -opioid receptor activity in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, *32*(46), 16120-16128.

Meyer, R., Ringkamp, M., Campbell, J., & Raja, S. (2008). Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In S. McMahon & M. Koltzenburg (Éds.), *Wall and Melzack's textbook of pain* (p. 3-34). Philadelphia : Elsevier.

Mi, W. L., Mao-Ying, Q. L., Liu, Q., Wang, X. W., Li, X., Wang, Y. Q., & Wu, G. C. (2009). The distribution of kisspeptin and its receptor GPR54 in rat dorsal root ganglion and up-regulation of its expression after CFA injection. *Brain Research Bulletin*, 78(4-5), 254-260.

Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. Progress in Neurobiology, 66(6), 355-474.

Miller, R. E., Belmadani, A., Ishihara, S., Tran, P. B., Ren, D., Miller, R. J., & Malfait, A. M. (2015). Damage-Associated Molecular Patterns Generated in Osteoarthritis Directly Excite Murine Nociceptive Neurons Through Toll-like Receptor 4. *Arthritis & Rheumatology*, 67(11), 2933-2943.

Milligan, G., & Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: A short history: Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology*, 147 Suppl 1(Suppl 1), S46-S55.

Min, L., Leon, S., Li, H., Pinilla, L., Carroll, R. S., Tena-Sempere, M., & Kaiser, U. B. (2015). RF9 Acts as a KISS1R Agonist In Vivo and In Vitro. *Endocrinology*, *156*(12), 4639-4648.

Minault, M., Lecron, J. C., Labrouche, S., Simonnet, G., & Gombert, J. (1995). Characterization of binding sites for neuropeptide FF on T lymphocytes of the Jurkat cell line. *Peptides*, *16*(1), 105-111.

Minneman, K. P., & Iversen, L. L. (1976). Enkephalin and opiate narcotics increase cyclic GMP accumulation in slices of rat neostriatum. *Nature*, *262*(5566), 313-314.

Mitchell, K., Yang, H. Y. T., Tessier, P. A., Muhly, T. W., Swaim, W. D., Szalayova, I., Keller, J. M., Mezey, E., & Iadarola, M. J. (2008). Localization of S100A8 and S100A9 expressing neutrophils to spinal cord during peripheral tissue inflammation. *Pain*, *134*(1), 216-231.

Mogil, J. S., Grisel, J. E., Zhangs, G., Belknap, J. K., & Grandy, D. K. (1996). Functional antagonism of mu-, delta- and kappa-opioid antinociception by orphanin FQ. *Neuroscience Letters*, *214*(2-3), 131-134.

Mollereau, C., Mazarguil, H., Marcus, D., Quelven, I., Kotani, M., Lannoy, V., Dumont, Y., Quirion, R., Detheux, M., Parmentier, M., & Zajac, J. M. (2002). Pharmacological characterization of human NPFF1 and NPFF2 receptors expressed in CHO cells by using NPY Y1 receptor antagonists. *European Journal of Pharmacology*, *451*(3), 245-256.

Mollereau, C., & Mouledous, L. (2000). Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides*, *21*(7), 907-917.

Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J.-L., Moisand, C., Chalon, P., Caput, D., Vassart, G., & Meunier, J. C. (1994). ORL1, a novel member of the opioid receptor family : Cloning, functional expression and localization. *FEBS Letters*, *341*(1), 33-38.

Morisset, V., & Nagy, F. (2000). Plateau potential-dependent windup of the response to primary afferent stimuli in rat dorsal horn neurons : Plateau potential-dependent windup in rat DHNs. *European Journal of Neuroscience*, *12*(9), 3087-3095.

Moriya, R., Sano, H., Umeda, T., Ito, M., Takahashi, Y., Matsuda, M., Ishihara, A., Kanatani, A., & Iwaasa, H. (2006). RFamide Peptide QRFP43 Causes Obesity with Hyperphagia and Reduced Thermogenesis in Mice. *Endocrinology*, *147*(6), 2916-2922.

Morley, J., & Levine, A. (1980). Stress-induced eating is mediated through endogenous opiates. *Science*, 209(4462), 1259-1261.

Moulédous, L., Mollereau, C., & Zajac, J. M. (2010). Opioid-modulating properties of the neuropeptide FF system. *BioFactors*, *36*(6), 423-429.

Muir, A. I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N. A., Michalovich, D., Moore, D. J., Calamari, A., Szekeres, P. G., Sarau, H. M., Chambers, J. K., Murdock, P., Steplewski, K., Shabon, U., Miller, J. E., Middleton, S. E., Darker, J. G., Larminie, C. G. C., Wilson, S., Bergsma, D. J.,

Emson, P., ... Harrison, D. C. (2001). AXOR12, a Novel Human G Protein-coupled Receptor, Activated by the Peptide KiSS-1. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(31), 28969-28975.

Ν

Nagi, K., & Pineyro, G. (2014). Kir3 channel signaling complexes : Focus on opioid receptor signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 186.

Nässel, D. R., & Wegener, C. (2011). A comparative review of short and long neuropeptide F signaling in invertebrates : Any similarities to vertebrate neuropeptide Y signaling? *Peptides*, *32*(6), 1335-1355.

Navani, D. M., Sirohi, S., Madia, P. A., & Yoburn, B. C. (2011). The role of opioid antagonist efficacy and constitutive opioid receptor activity in the opioid withdrawal syndrome in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *99*(4), 671-675.

Netea, M. G., Balkwill, F., Chonchol, M., Cominelli, F., Donath, M. Y., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Golenbock, D., Gresnigt, M. S., Heneka, M. T., Hoffman, H. M., Hotchkiss, R., Joosten, L. A. B., Kastner, D. L., Korte, M., Latz, E., Libby, P., Mandrup-Poulsen, T., Mantovani, A., Mills, K. H. G., ... Dinarello, C. A. (2017). A guiding map for inflammation. *Nature Immunology*, *18*(8), 826-831.

Newton, R., & Hogg, N. (1998). The Human S100 Protein MRP-14 Is a Novel Activator of the β 2 Integrin Mac-1 on Neutrophils. *The Journal of Immunology*, *160*(3), 1427-1435.

Noble, F., Coric, P., Turcaud, S., Fournié-Zaluski, M. C., & Roques, B. P. (1994). Assessment of physical dependence after continuous perfusion into the rat jugular vein of the mixed inhibitor of enkephalin-degrading enzymes, RB 101. *European Journal of Pharmacology*, *253*(3), 283-287.

Nystedt, J. M., Brandt, A. M., Mandelin, J., Vilim, F. S., Ziff, E. B., & Panula, P. (2002). Analysis of human neuropeptide FF gene expression: Analysis of human NPFF gene expression. *Journal of Neurochemistry*, *82*(6), 1330-1342.

Nystedt, J. M., Lemberg, K., Lintunen, M., Mustonen, K., Holma, R., Kontinen, V. K., Kalso, E., & Panula, P. (2004). Pain- and morphine-associated transcriptional regulation of neuropeptide FF and the G-protein-coupled NPFF2 receptor gene. *Neurobiology of Disease*, *16*(1), 254-262.

0

Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., ... Fujino, M. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, *411*(6837), 613-617.

Oladosu, F. A., Conrad, M. S., O'Buckley, S. C., Rashid, N. U., Slade, G. D., & Nackley, A. G. (2015). Mu Opioid Splice Variant MOR-1K Contributes to the Development of Opioid-Induced Hyperalgesia. *PLoS ONE*, *10*(8), e0135711.

P

Paccola, C. C., Gutierrez, V. P., Longo, I., Juliano, L., Juliano, M. A., & Giorgi, R. (2008). Antinociceptive effect of the C-terminus of murine S100A9 protein on experimental neuropathic pain. *Peptides*, 29(10), 1806-1814.

Pagano, R. L., Dias, M. A. A., Dale, C. S., & Giorgi, R. (2002). Neutrophils and the calciumbinding protein MRP-14 mediate carrageenan-induced antinociception in mice. *Mediators of Inflammation*, 11(4), 203-210.

Pagano, R. L., Mariano, M., & Giorgi, R. (2006). Neutrophilic Cell-Free Exudate Induces Antinociception Mediate by the Protein S100A9. *Mediators of Inflammation*, 2006(4), 36765.

Pan, Z., Tershner, S., & Field, H. (1997). Cellular mechanism for anti-analgesic action of agonists of the kappa-opioid receptor. *Nature*, 389(6649), 382-385.

Parhar, I., Ogawa, S., & Kitahashi, T. (2012). RFamide peptides as mediators in environmental control of GnRH neurons. *Progress in Neurobiology*, *98*(2), 176-196.

Paterson, K. J., Zambreanu, L., Bennett, D. L. H., & McMahon, S. B. (2013). Characterisation and mechanisms of bradykinin-evoked pain in man using iontophoresis. *Pain*, 154(6), 782-792.

Perry, S. J., Yi-Kung Huang, E., Cronk, D., Bagust, J., Sharma, R., Walker, R. J., Wilson, S., & Burke, J. F. (1997). A human gene encoding morphine modulating peptides related to NPFF and FMRFamide. *FEBS Letters*, *409*(3), 426-430.

Pert, C. B., & Snyder, S. H. (1973). Opiate Receptor: Demonstration in Nervous Tissue. *Science*, *179*(4077), 1011-1014.

Pertovaara, A., Östergård, M., Änkö, M. L., Lehti-Koivunen, S., Brandt, A., Hong, W., Korpi, E. R., & Panula, P. (2005). RFamide-related peptides signal through the neuropeptide FF receptor and regulate pain-related responses in the rat. *Neuroscience*, *134*(3), 1023-1032.

Peymen, K., Watteyne, J., Frooninckx, L., Schoofs, L., & Beets, I. (2014). The FMRFamide-Like Peptide Family in Nematodes. *Frontiers in Endocrinology*, *5*, 90.

Pfeiffer, A., Brantl, V., Herz, A., & Emrich, H. (1986). Psychotomimesis mediated by kappa opiate receptors. *Science*, *233*(4765), 774-776.

Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R. P., & Tena-Sempere, M. (2012). Kisspeptins and Reproduction : Physiological Roles and Regulatory Mechanisms. *Physiological Reviews*, *92*(3), 1235-1316.

Poh, K. W., Yeo, J. F., Stohler, C. S., & Ong, W. Y. (2012). Comprehensive Gene Expression Profiling in the Prefrontal Cortex Links Immune Activation and Neutrophil Infiltration to Antinociception. *Journal of Neuroscience*, *32*(1), 35-45.

Polter, A. M., Barcomb, K., Chen, R. W., Dingess, P. M., Graziane, N. M., Brown, T. E., & Kauer, J. A. (2017). δ. *ELife*, *6*, e23785.

Porreca, F., Heyman, J. S., Mosberg, H. I., Omnaas, J. R., & Vaught, J. L. (1987). Role of Mu and Delta Receptors in the Supraspinal and Spinal Analgesic Effects of [D-Pen2, D-

Pen5]Enkephahn in the Mouse. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 241(2), 393-400.

Pradhan, A. A. A., Walwyn, W., Nozaki, C., Filliol, D., Erbs, E., Matifas, A., Evans, C., & Kieffer, B. L. (2010). Ligand-directed trafficking of the δ-opioid receptor in vivo : Two paths toward analgesic tolerance. *Journal of Neuroscience*, *30*(49), 16459-16468.

Pradhan, A., Smith, M., McGuire, B., Evans, C., & Walwyn, W. (2013). Chronic inflammatory injury results in increased coupling of delta opioid receptors to voltage-gated Ca2+ channels. *Molecular Pain*, *9*, 8.

Price, D. D., Hu, J. W., Dubner, R., & Gracely, R. H. (1977). Peripheral suppression of first pain and central summation of second pain evoked by noxious heat pulses. *Pain*, *3*(1), 57-68.

Price, D., & Greenberg, M. (1977). Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science*, *197*(4304), 670-671.

Q

Quelven, I., Roussin, A., & Zajac, J. M. (2005). Comparison of pharmacological activities of Neuropeptide FF1 and Neuropeptide FF2 receptor agonists. *European Journal of Pharmacology*, 508(1-3), 107-114.

Quillet, R., Ayachi, S., Bihel, F., Elhabazi, K., Ilien, B., & Simonin, F. (2016). RF-amide neuropeptides and their receptors in Mammals: Pharmacological properties, drug development and main physiological functions. *Pharmacology & Therapeutics*, *160*, 84-132.

Quillet, R., Schneider, S., Utard, V., Drieu la Rochelle, A., Elhabazi, K., Henningsen, J. B., Gizzi, P., Schmitt, M., Kugler, V., Simonneaux, V., Ilien, B., Simonin, F., & Bihel, F. (2021). Identification of an N-acylated- D Arg-Leu-NH 2 Dipeptide as a Highly Selective Neuropeptide FF1 Receptor Antagonist That Potently Prevents Opioid-Induced Hyperalgesia. *Journal of Medicinal Chemistry*, *64*(11), 7555-7564.

Quillet, R., & Simonin, F. (2018). Le neuropeptide FF, aiguilleur des macrophages du tissu adipeux [The neuropeptide FF: a signal for M1 to M2 type switching in macrophages from the adipose tissue]. *Medecine sciences* : M/S, 34(1), 27-29.

R

Raehal, K. M., Lowery, J. J., Bhamidipati, C. M., Paolino, R. M., Blair, J. R., Wang, D., Sadée, W., & Bilsky, E. J. (2005a). In Vivo Characterization of 6β-Naltrexol, an Opioid Ligand with Less Inverse Agonist Activity Compared with Naltrexone and Naloxone in Opioid-Dependent Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *313*(3), 1150-1162.

Raehal, K. M., Walker, J. K. L., & Bohn, L. M. (2005b). Morphine Side Effects in β -Arrestin 2 Knockout Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(3), 1195-1201.

Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X. J., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R.,
Ushida, T., & Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain : Concepts, challenges, and compromises. *Pain*, *161*(9), 1976-1982.

Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, *26*(22), 3100-3112.

Randic, M., Jiang, M., & Cerne, R. (1993). Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, *13*(12), 5228-5241.

Rebeyrolles, S., Zajac, J. M., & Roumy, M. (1996). Neuropeptide FF reverses the effect of mu-opioid on Ca2+ channels in rat spinal ganglion neurones. *Neuroreport*, 7(18), 2979-2981.

Reinscheid, R. K., Nothacker, H. P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R. A., Bunzow, J. R., Grandy, D. K., Langen, H., Monsma, F. J., & Civelli, O. (1995). Orphanin FQ: A neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*, *270*(5237), 792-794.

Ren, K., & Dubner, R. (2010). Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nature Medicine*, *16*(11), 1267-1276.

Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *The Journal* of Comparative Neurology, 96(3), 415-495.

Reynolds, D. V. (1969). Surgery in the Rat during Electrical Analgesia Induced by Focal Brain Stimulation. *Science*, *164*(3878), 444-445.

Rivat, C., Laboureyras, E., Laulin, J. P., Le Roy, C., Richebé, P., & Simonnet, G. (2007). Non-Nociceptive Environmental Stress Induces Hyperalgesia, Not Analgesia, in Pain and Opioid-Experienced Rats. *Neuropsychopharmacology*, *32*(10), 2217-2228.

Rivat, C., Vera-Portocarrero, L. P., Ibrahim, M. M., Mata, H. P., Stagg, N. J., De Felice, M., Porreca, F., & Malan, T. P. (2009). Spinal NK-1 receptor-expressing neurons and descending pathways support fentanyl-induced pain hypersensitivity in a rat model of postoperative pain. *European Journal of Neuroscience*, *29*(4), 727-737.

Rizzi, A., Marzola, G., Bigoni, R., Guerrini, R., Salvadori, S., Mogil, J. S., Regoli, D., & Calò, G. (2001). Endogenous nociceptin signaling and stress-induced analgesia: *Neuroreport*, *12*(14), 3009-3013.

Roeckel, L. A., Le Coz, G. M., Gavériaux-Ruff, C., & Simonin, F. (2016). Opioid-induced hyperalgesia : Cellular and molecular mechanisms. *Neuroscience*, *338*, 160-182.

Roland, B. L., Sutton, S. W., Wilson, S. J., Luo, L., Pyati, J., Huvar, R., Erlander, M. G., & Lovenberg, T. W. (1999). Anatomical Distribution of Prolactin-Releasing Peptide and Its Receptor Suggests Additional Functions in the Central Nervous System and Periphery. *Endocrinology*, *140*(12), 5736-5745.

Romero, A., Romero-Alejo, E., Vasconcelos, N., & Puig, M. M. (2013). Glial cell activation in the spinal cord and dorsal root ganglia induced by surgery in mice. *European Journal of Pharmacology*, 702(1-3), 126-134.

Rossbach, M. J. (1880). Ueber die Gewoehnung an Gifte. *Pflugers Archieve Gesamte Physiologie des Menschen*, 21, 213-225.

Rossi, G., Pasternak, G., & Bodnar, R. (1994). Mu and delta opioid synergy between the periaqueductal gray and the rostro-ventral medulla. *Brain Research*, 665(1), 85-93.

Rothman, R. B., Brady, L. S., Xu, H., & Long, J. B. (1993). Chronic intracerebroventricular infusion of the antiopioid peptide, Phe-Leu-Phe-Gln-Pro-Gln-Arg-Phe-NH2 (NPFF), downregulates mu opioid binding sites in rat brain. *Peptides*, *14*(6), 1271-1277.

Rothman, R. B., Long, J. B., & Yang, A. E. (1990). Upregulation of the Opioid Receptor Complex by the Chronic Administration of Morphine : A Biochemical Marker Related to the Development of Tolerance and Dependence. *Peptides*, *12*(1), 151-160.

Roumy, M., & Zajac, J. M. (1998). Neuropeptide FF, pain and analgesia. *European Journal* of *Pharmacology*, 345(1), 1-11.

Rozenfeld, R., & Devi, L. A. (2007). Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling : Beta-arrestin2-mediated ERK activation by μ - δ opioid receptor heterodimers. *The FASEB Journal*, 21(10), 2455-2465.

Rusin, K., Giovannucci, D., Stuenkel, E., & Moises, H. (1997). Kappa-opioid receptor activation modulates Ca2+ currents and secretion in isolated neuroendocrine nerve terminals. *The Journal of Neuroscience*, *17*(17), 6565-6574.

Ryu, M. J., Liu, Y., Zhong, X., Du, J., Peterson, N., Kong, G., Li, H., Wang, J., Salamat, S., Chang, Q., & Zhang, J. (2012). Oncogenic Kras Expression in Postmitotic Neurons Leads to S100A8-S100A9 Protein Overexpression and Gliosis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(27), 22948-22958.

S

Sachs, U. J. H., Andrei-Selmer, C. L., Maniar, A., Weiss, T., Paddock, C., Orlova, V. V., Choi, E. Y., Newman, P. J., Preissner, K. T., Chavakis, T., & Santoso, S. (2007). The Neutrophil-specific Antigen CD177 Is a Counter-receptor for Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31). *Journal of Biological Chemistry*, 282(32), 23603-23612.

Sadée, W., Wang, D., & Bilsky, E. J. (2005). Basal opioid receptor activity, neutral antagonists, and therapeutic opportunities. *Life Sciences*, *76*(13), 1427-1437.

Sandkühler, J., & Liu, X. (1998). Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury: LTP in spinal cord induced by noxious stimulation. *European Journal of Neuroscience*, *10*(7), 2476-2480.

Satake, H., Hisada, M., Kawada, T., Minakata, H., Ukena, K., & Tsutsui, K. (2001). Characterization of a cDNA encoding a novel avian hypothalamic neuropeptide exerting an inhibitory effect on gonadotropin release. *The Biochemical Journal*, *354*(Pt2), 379-385.

Schelbergen, R. F., Geven, E. J., van den Bosch, M. H. J., Eriksson, H., Leanderson, T., Vogl, T., Roth, J., van de Loo, F. A. J., Koenders, M. I., van der Kraan, P. M., van den Berg, W. B., Blom, A. B., & van Lent, P. L. E. M. (2015). Prophylactic treatment with S100A9 inhibitor

paquinimod reduces pathology in experimental collagenase-induced osteoarthritis. Annals of the Rheumatic Diseases, 74(12), 2254-2258.

Scherrer, G., Befort, K., Contet, C., Becker, J., Matifas, A., & Kieffer, B. L. (2004). The delta agonists DPDPE and deltorphin II recruit predominantly mu receptors to produce thermal analgesia : A parallel study of mu, delta and combinatorial opioid receptor knockout mice. *European Journal of Neuroscience*, *19*(8), 2239-2248.

Scherrer, G., Imamachi, N., Cao, Y. Q., Contet, C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B. L., & Basbaum, A. I. (2009). Dissociation of the Opioid Receptor Mechanisms that Control Mechanical and Heat Pain. *Cell*, *137*(6), 1148-1159.

Schultz, J., & Kaminker, K. (1962). Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *96*, 465-467.

Schulz, H. L., Stoehr, H., White, K., van Driel, M. A., Hoyng, C. B., Cremers, F., & Weber, H. F. (2002). Genomic structure and assessment of the retinally expressed RFamide-related peptide gene in dominant cystoid macular dystrophy. *Molecular Vision*, *8*, 67-71.

Shepherd, C. E., Goyette, J., Utter, V., Rahimi, F., Yang, Z., Geczy, C. L., & Halliday, G. M. (2006). Inflammatory S100A9 and S100A12 proteins in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *27*(11), 1554-1563.

Shoblock, J. R., & Maidment, N. T. (2006). Constitutively Active Mu Opioid Receptors Mediate the Enhanced Conditioned Aversive Effect of Naloxone in Morphine-Dependent Mice. *Neuropsychopharmacology*, *31*(1), 171-177.

Shoblock, J. R., & Maidment, N. T. (2007). Enkephalin release promotes homeostatic increases in constitutively active mu opioid receptors during morphine withdrawal. *Neuroscience*, *149*(3), 642-649.

Simon, E. J., Hiller, J. M., & Edelman, I. (1973). Stereospecific Binding of the Potent Narcotic Analgesic [3H]Etorphine to Rat-Brain Homogenate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(7), 1947-1949.

Simonin, F., Gavériaux-Ruff, C., Befort, K., Matthes, H., Lannes, B., Micheletti, G., Mattéi, M. G., Charron, G., Bloch, B., & Kieffer, B. (1995). appa-Opioid receptor in humans : CDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(15), 7006-7010.

Simonin, F., Schmitt, M., Laulin, J. P., Laboureyras, E., Jhamandas, J. H., MacTavish, D., Matifas, A., Mollereau, C., Laurent, P., Parmentier, M., Kieffer, B. L., Bourguignon, J. J., & Simonnet, G. (2006). RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(2), 466-471.

Simonin, F., Valverde, O., Smadja, C., Slowe, S., Kitchen, I., Dierich, A., Le Meur, M., Roques, B., Maldonado, R., & Kieffer, B. (1998). Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *The EMBO Journal*, *17*(4), 886-897.

Simonnet, G., & Rivat, C. (2003). Opioid-induced hyperalgesia : Abnormal or normal pain? *NeuroReport*, *14*(1), 1-7.

Sirohi, S., Dighe, S. V., Madia, P. A., & Yoburn, B. C. (2009). The Relative Potency of Inverse Opioid Agonists and a Neutral Opioid Antagonist in Precipitated Withdrawal and Antagonism of Analgesia and Toxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 330(2), 513-519.

Sirohi, S., & Walker, B. M. (2015). Maturational alterations in constitutive activity of medial prefrontal cortex kappa-opioid receptors in Wistar rats. *Journal of Neurochemistry*, *135*(4), 659-665.

Sivilotti, L. G., Thompson, S. W. N., Woolf, C. J., & Kingdom, U. (1993). Potential Windup in Rat Spinal Neurons In Vitro. *Journal of Neurophysiology*, *69*(5), 1621-1631.

Snyder, L. M., Chiang, M. C., Loeza-Alcocer, E., Omori, Y., Hachisuka, J., Sheahan, T. D.,
Gale, J. R., Adelman, P. C., Sypek, E. I., Fulton, S. A., Friedman, R. L., Wright, M. C., Duque,
M. G., Lee, Y. S., Hu, Z., Huang, H., Cai, X., Meerschaert, K. A., Nagarajan, V., ... Ross, S.
E. (2018). Kappa Opioid Receptor Distribution and Function in Primary Afferents. *Neuron*, 99(6), 1274-1288.e6.

Soga, T., Kitahashi, T., Clarke, I. J., & Parhar, I. S. (2014). Gonadotropin-Inhibitory Hormone Promoter-Driven Enhanced Green Fluorescent Protein Expression Decreases During Aging in Female Rats. *Endocrinology*, *155*(5), 1944-1955.

Souza-Moreira, L., Campos-Salinas, J., Caro, M., & Gonzalez-Rey, E. (2011). Neuropeptides as Pleiotropic Modulators of the Immune Response. *Neuroendocrinology*, *94*(2), 89-100.

Spampinato, S., Trabucco, A., Biasiotta, A., Biagioni, F., Cruccu, G., Copani, A., Colledge, W. H., Sortino, M. A., Nicoletti, F., & Chiechio, S. (2011). Hyperalgesic Activity of Kisspeptin in Mice. *Molecular Pain*, *7*, 90.

Spanagel, R., Herz, A., & Shippenberg, T. S. (1992). Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(6), 2046-2050.

Spike, R. C., Puskár, Z., Sakamoto, H., Stewart, W., Watt, C., & Todd, A. J. (2002). MOR-1immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord : Evidence for nonsynaptic innervation by substance P-containing primary afferents and for selective activation by noxious thermal stimuli: Spinal cord MOR1 cells. *European Journal of Neuroscience*, *15*(8), 1306-1316.

Stathaki, M., Stamatiou, M. E., Magioris, G., Simantiris, S., Syrigos, N., Dourakis, S., Koutsilieris, M., & Armakolas, A. (2019). The role of kisspeptin system in cancer biology. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *142*, 130-140.

Staud, R., Cannon, R. C., Mauderli, A. P., Robinson, M. E., Price, D. D., & Vierck, C. J. (2003). Temporal summation of pain from mechanical stimulation of muscle tissue in normal controls and subjects with fibromyalgia syndrome. *Pain*, *102*(1), 87-95.

Steinbakk, M., Naess-Andresen, C. F., Fagerhol, M. K., Lingaas, E., Dale, I., & Brandtzaeg, P. (1990). Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *The Lancet*, *336*(8718), 763-765.

Stenström, M., Nyhlén, H. C., Törngren, M., Liberg, D., Sparre, B., Tuvesson, H., Eriksson, H., & Leanderson, T. (2016). Paquinimod reduces skin fibrosis in tight skin 1 mice, an experimental model of systemic sclerosis. *Journal of Dermatological Science*, 83(1), 52-59.

Stinus, L., Allard, M., Gold, L., & Simonnet, G. (1995). Changes in CNS neuropeptide FFlike material, pain sensitivity, and opiate dependence following chronic morphine treatment. *Peptides*, *16*(7), 1235-1241.

Stone, L. S., & Molliver, D. C. (2009). In search of analgesia : Emerging roles of GPCRs in pain. *Molecular Intervention*, *9*(5), 234-251.

Stroncek, D., Skubitz, K., & McCullough, J. (1990). Biochemical characterization of the neutrophil-specific antigen NB1. *Blood*, *75*(3), 744-755.

Sun, Y., Kuang, Y., & Zuo, Z. (2021a). Transcriptomic Changes in Mouse Bone Marrow-Derived Macrophages Exposed to Neuropeptide FF. *Genes*, *12*(5), 705.

Sun, Y., Kuang, Y., Zuo, Z., Zhang, J., Ma, X., Xing, X., Liu, L., Miao, Y., Ren, T., Li, H., & Mei, Q. (2021b). Cellular processes involved in RAW 264.7 macrophages exposed to NPFF : A transcriptional study. *Peptides*, *136*, 170469.

Sun, Y. L., Zhang, X. Y., Sun, T., He, N., Li, J. Y., Zhuang, Y., Zeng, Q., Yu, J., Fang, Q., & Wang, R. (2013). The anti-inflammatory potential of neuropeptide FF in vitro and in vivo. *Peptides*, *47*, 124-132.

Sunahori, K., Yamamura, M., Yamana, J., Takasugi, K., Kawashima, M., Yamamoto, H., Chazin, W. J., Nakatani, Y., Yui, S., & Makino, H. (2006). The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 8(3), R69.

Sundblom, D. M., Panula, P., & Fyhrquist, F. (1995). Neuropeptide FF-like immunoreactivity in human plasma. *Peptides*, *16*(2), 347-350.

Т

Tahvili, S., Törngren, M., Holmberg, D., Leanderson, T., & Ivars, F. (2018). Paquinimod prevents development of diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *PLoS ONE*, *13*(5), e0196598.

Takayasu, S., Sakurai, T., Iwasaki, S., Teranishi, H., Yamanaka, A., Williams, S. C., Iguchi, H., Kawasawa, Y. I., Ikeda, Y., Sakakibara, I., Ohno, K., Ioka, R. X., Murakami, S., Dohmae, N., Xie, J., Suda, T., Motoike, T., Ohuchi, T., Yanagisawa, M., & Sakai, J. (2006). A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(19), 7438-7443.

Taylor, B. K., & Corder, G. (2014). Endogenous Analgesia, Dependence, and Latent Pain Sensitization. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 20, 283-325.

Terenius, L. (1973). Characteristics of the "Receptor" for Narcotic Analgesics in Synaptic Plasma Membrane Fraction from Rat Brain. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, *33*(5), 377-384.

Tester, A. M., Cox, J. H., Connor, A. R., Starr, A. E., Dean, R. A., Puente, X. S., López-Otín, C., & Overall, C. M. (2007). LPS Responsiveness and Neutrophil Chemotaxis In Vivo Require PMN MMP-8 Activity. *PLoS ONE*, *2*(3), e312.

Thompson, A. A., Liu, W., Chun, E., Katritch, V., Wu, H., Vardy, E., Huang, X. P., Trapella, C., Guerrini, R., Calo, G., Roth, B. L., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2012). Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature*, *485*(7398), 395-399.

Thompson, S. W. N., King, A. E., & Woolf, C. J. (1990). Activity-Dependent Changes in Rat Ventral Horn Neurons in vitro; Summation of Prolonged Afferent Evoked Postsynaptic Depolarizations Produce a D-2-Amino-5-Phosphonovaleric Acid Sensitive Windup. *European Journal of Neuroscience*, 2(7), 638-649.

Tian, J. H., Xu, W., Fang, Y., Mogil, J. S., Grisel, J. E., Grandy, D. K., & Han, J. S. (1997). Bidirectional modulatory effect of orphanin FQ on morphine-induced analgesia : Antagonism in brain and potentiation in spinal cord of the rat. *British Journal of Pharmacology*, *120*(4), 676-680.

Tiwari, V., He, S.-Q., Huang, Q., Liang, L., Yang, F., Chen, Z., Tiwari, V., Fujita, W., Devi, L. A., Dong, X., Guan, Y., & Raja, S. N. (2020). Activation of μ-δ opioid receptor heteromers inhibits neuropathic pain behavior in rodents. *Pain*, *161*(4), 842-855.

Toll, L., Bruchas, M. R., Calo', G., Cox, B. M., & Zaveri, N. T. (2016). Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Structure, Signaling, Ligands, Functions, and Interactions with Opioid Systems. *Pharmacological Reviews*, *68*(2), 419-457.

Torrecilla, M., Marker, C. L., Cintora, S. C., Stoffel, M., Williams, J. T., & Wickman, K. (2002). G-Protein-Gated Potassium Channels Containing Kir3.2 and Kir3.3 Subunits Mediate the Acute Inhibitory Effects of Opioids on Locus Ceruleus Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *22*(11), 4328-4334.

Treede, R. D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M. I., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N. B., First, M. B., Giamberardino, M. A., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S., ... Wang, S. J. (2019). Chronic pain as a symptom or a disease : The IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain*, *160*(1), 19-27.

U

Ukena, K., & Tsutsui, K. (2001). Distribution of novel RFamide-related peptide-like immunoreactivity in the mouse central nervous system. *Neuroscience Letters*, 300(3), 153-156.

Usoskin, D., Furlan, A., Islam, S., Abdo, H., Lönnerberg, P., Lou, D., Hjerling-Leffler, J., Haeggström, J., Kharchenko, O., Kharchenko, P. V., Linnarsson, S., & Ernfors, P. (2015). Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, *18*(1), 145-153.

V

Vanderah, T. W. (2010). Delta and Kappa Opioid Receptors as Suitable Drug Targets for Pain. *The Clinical Journal of Pain, 26 Suppl 10*, S10-S15.

Vanderah, T. W., Largent-Milnes, T., Lai, J., Porreca, F., Houghten, R. A., Menzaghi, F., Wisniewski, K., Stalewski, J., Sueiras-Diaz, J., Galyean, R., Schteingart, C., Junien, J. L., Trojnar, J., & Rivière, P. J. M. (2008). Novel d-amino acid tetrapeptides produce potent antinociception by selectively acting at peripheral κ-opioid receptors. *European Journal of Pharmacology*, 583(1), 62-72.

Vardanyan, A., Wang, R., Vanderah, T. W., Ossipov, M. H., Lai, J., Porreca, F., & King, T. (2009). TRPV1 Receptor in Expression of Opioid-Induced Hyperalgesia. *The Journal of Pain*, *10*(3), 243-252.

Venkatakrishnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Heydenreich, F. M., Flock, T., Miljus, T., Balaji, S., Bouvier, M., Veprintsev, D. B., Tate, C. G., Schertler, G. F. X., & Babu, M. M. (2016). Diverse activation pathways in class A GPCRs converge near the G-protein-coupling region. *Nature*, *536*(7617), 484-487.

Vetter, I., Wyse, B. D., Monteith, G. R., Roberts-Thomson, S. J., & Cabot, P. J. (2006). The μ Opioid Agonist Morphine Modulates Potentiation of Capsaicin-Evoked TRPV1 Responses through a Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase a Pathway. *Molecular Pain*, *2*, 22.

Viemann, D., Barczyk, K., Vogl, T., Fischer, U., Sunderkötter, C., Schulze-Osthoff, K., & Roth, J. (2007). MRP8/MRP14 impairs endothelial integrity and induces a caspase-dependent and -independent cell death program. *Blood*, *109*(6), 2453-2460.

Viemann, D., Strey, A., Janning, A., Jurk, K., Klimmek, K., Vogl, T., Hirono, K., Ichida, F., Foell, D., Kehrel, B., Gerke, V., Sorg, C., & Roth, J. (2005). Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. *Blood*, *105*(7), 2955-2962.

Vilim, F. S., Aarnisalo, A. A., Nieminen, M. L., Lintunen, M., Karlstedt, K., Kontinen, V. K., Kalso, E., States, B., Panula, P., & Ziff, E. (1999). Gene for Pain Modulatory Neuropeptide NPFF: Induction in Spinal Cord by Noxious Stimuli. *Molecular Pharmacology*, *55*(5), 804-811.

Vogl, T., Tenbrock, K., Ludwig, S., Leukert, N., Ehrhardt, C., van Zoelen, M. A. D., Nacken, W., Foell, D., van der Poll, T., Sorg, C., & Roth, J. (2007). Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nature Medicine*, *13*(9), 1042-1049.

Wache, C., Klein, M., Ostergaard, C., Angele, B., Häcker, H., Pfister, H.-W., Pruenster, M., Sperandio, M., Leanderson, T., Roth, J., Vogl, T., & Koedel, U. (2015). Myeloid-Related Protein 14 Promotes Inflammation and Injury in Meningitis. *Journal of Infectious Diseases*, *212*(2), 247-257.

Walker, E. A., & Sterious, S. N. (2005). Opioid antagonists differ according to negative intrinsic efficacy in a mouse model of acute dependence : Antagonists and negative intrinsic efficacy. *British Journal of Pharmacology*, 145(7), 975-983.

Walker, R. J., Papaioannou, S., & Holden-Dye, L. (2009). A review of FMRFamide- and RFamide-like peptides in metazoa. *Invertebrate Neuroscience : IN*, 9(3-4), 111-153.

Wall, P. D., & Melzack, R. (1965). Pain mechanisms : A new theory. *Science*, 150(3699), 971-979.

Walwyn, W., Evans, C. J., & Hales, T. G. (2007). Beta-Arrestin2 and c-Src Regulate the Constitutive Activity and Recycling of Opioid Receptors in Dorsal Root Ganglion Neurons. *Journal of Neuroscience*, 27(19), 5092-5104.

Walwyn, W. M., Chen, W., Kim, H., Minasyan, A., Ennes, H. S., McRoberts, J. A., & Marvizon, J. C. G. (2016). Sustained Suppression of Hyperalgesia during Latent Sensitization by μ -, δ -, and κ -opioid receptors and 2A Adrenergic Receptors : Role of Constitutive Activity. *Journal of Neuroscience*, *36*(1), 204-221.

Wang, C., Klechikov, A. G., Gharibyan, A. L., Wärmländer, S. K., Jüri, J., Zhao, L., Jia, X., Narayana, V. K., Shankar, S. K., Olofsson, A., Brännström, T., Mu, Y., Gräslund, A., & Morozova-Roche, L. A. (2014). The role of pro-inflammatory S100A9 in Alzheimer's disease amyloid-neuroinflammatory cascade. *Acta Neuropathologica*, *127*(4), 507-522.

Wang, D., Raehal, K. M., Bilsky, E. J., & Sadée, W. (2001a). Inverse agonists and neutral antagonists at μ opioid receptor (MOR): Possible role of basal receptor signaling in narcotic dependence: Basal signaling activity of μ opioid receptor. *Journal of Neurochemistry*, 77(6), 1590-1600.

Wang, D., Raehal, K. M., Lin, E. T., Lowery, J. J., Kieffer, B. L., Bilsky, E. J., & Sadée, W. (2004). Basal Signaling Activity of μ Opioid Receptor in Mouse Brain : Role in Narcotic Dependence. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(2), 512-520.

Wang, D., Sun, X., & Sadee, W. (2007). Different Effects of Opioid Antagonists on μ -, δ -, and κ -Opioid Receptors with and without Agonist Pretreatment. *Journal of Pharmacology* and *Experimental Therapeutics*, 321(2), 544-552.

Wang, D., Tawfik, V. L., Corder, G., Low, S. A., François, A., Basbaum, A. I., & Scherrer, G. (2018a). Functional Divergence of Delta and Mu Opioid Receptor Organization in CNS Pain Circuits. *Neuron*, *98*(1), 90-108.e5.

Wang, D., Wu, Z., Zhao, C., Yang, X., Wei, H., Liu, M., Zhao, J., Qian, M., Li, Z., & Xiao, J. (2021). KP-10/Gpr54 attenuates rheumatic arthritis through inactivating NF- κ B and MAPK signaling in macrophages. *Pharmacological Research*, 105496.

Wang, S., Song, R., Wang, Z., Jing, Z., Wang, S., & Ma, J. (2018b). S100A8/A9 in Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 9, 1298.

Wang, Y., Sun, J., Tao, Y., Chi, Z., & Liu, J. (2010). The role of κ -opioid receptor activation in mediating antinociception and addiction. *Acta Pharmacologica Sinica*, *31*(9), 1065-1070.

Wang, Z., Bilsky, E. J., & Sadée, W. (1994). Constitutive mu opioid receptor activation as a regulatory mechanism underlying narcotic tolerance and dependence. *Life Sciences*, *54*(20), 339-350.

Wang, Z., Gardell, L. R., Ossipov, M. H., Vanderah, T. W., Brennan, M. B., Hochgeschwender, U., Hruby, V. J., Malan, T. P., Lai, J., & Porreca, F. (2001b). Pronociceptive Actions of Dynorphin Maintain Chronic Neuropathic Pain. *The Journal of Neuroscience*, *21*(5), 1779-1786.

Waqas, S. F. H., Hoang, A. C., Lin, Y. T., Ampem, G., Azegrouz, H., Balogh, L., Thuróczy, J., Chen, J. C., Gerling, I. C., Nam, S., Lim, J. S., Martinez-Ibañez, J., Real, J. T., Paschke, S., Quillet, R., Ayachi, S., Simonin, F., Schneider, E. M., Brinkman, J. A., ... Röszer, T. (2017). Neuropeptide FF increases M2 activation and self-renewal of adipose tissue macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(7), 2842-2854.

Weber, E., Evans, C., Samuelsson, S., & Barchas, J. (1981). Novel peptide neuronal system in rat brain and pituitary. *Science*, *214*(4526), 1248-1251.

Wei, H., Panula, P., & Pertovaara, A. (1998). A differential modulation of allodynia, hyperalgesia and nociception by neuropeptide FF in the periaqueductal gray of neuropathic rats : Interactions with morphine and naloxone. *Neuroscience*, *86*(1), 311-319.

Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annual Review of Biochemistry*, 87(1), 897-919.

Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M., & Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology*, 79(1), 619-643.

Wu, C. H., Tao, P. L., & Huang, E. Y. K. (2010). Distribution of neuropeptide FF (NPFF) receptors in correlation with morphine-induced reward in the rat brain. *Peptides*, *31*(7), 1374-1382.

X

Xing, R., Liu, F., Yang, Y., Cui, X., Wang, T., Xie, L., Zhao, Y., Fang, L., Yi, T., Zheng, B., Liu, M., & Chen, H. (2018). GPR54 deficiency reduces the Treg population and aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Science China Life Sciences*, *61*(6), 675-687.

Xu, M. (2004). Neuropathic Pain Activates the Endogenous Opioid System in Mouse Spinal Cord and Induces Opioid Receptor Tolerance. *Journal of Neuroscience*, *24*(19), 4576-4584.

Xu, M., Bruchas, M. R., Ippolito, D. L., Gendron, L., & Chavkin, C. (2007). Sciatic Nerve Ligation-Induced Proliferation of Spinal Cord Astrocytes Is Mediated by Opioid Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Journal of Neuroscience*, *27*(10), 2570-2581.

Xu, M., Kontinen, V. K., Panula, P., & Kalso, E. (1999). Effects of (1DMe)NPYF, a synthetic neuropeptide FF analogue, in different pain models. *Peptides*, *20*(9), 1071-1077.

Xu, X., Hao, J., & Wiesenfeld-Hallin, Z. (1996). Nociceptin or antinociceptin : Potent spinal antinociceptive effect of orphanin FQ/nociceptin in the rat. *NeuroReport*, 7(13), 2092-2094.

Y

Yamada, T., Mochiduki, A., Sugimoto, Y., Suzuki, Y., Itoi, K., & Inoue, K. (2009). Prolactin-Releasing Peptide Regulates the Cardiovascular System Via Corticotrophin-Releasing Hormone : Prolactin-releasing peptide regulates the cardiovascular system. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(6), 586-593.

Yamamoto, T., Miyazaki, R., & Yamada, T. (2009). Intracerebroventricular administration of 26RFa produces an analgesic effect in the rat formalin test. *Peptides*, *30*(9), 1683-1688.

Yamamoto, T., Miyazaki, R., Yamada, T., & Shinozaki, T. (2011). Anti-allodynic effects of intrathecally and intracerebroventricularly administered 26RFa, an intrinsic agonist for GRP103, in the rat partial sciatic nerve ligation model. *Peptides*, *32*(6), 1262-1269.

Yamamoto, T., Wada, T., & Miyazaki, R. (2008). Analgesic effects of intrathecally administered 26RFa, an intrinsic agonist for GPR103, on formalin test and carrageenan test in rats. *Neuroscience*, *157*(1), 214-222.

Yan, L., Bjork, P., Butuc, R., Gawdzik, J., Earley, J., Kim, G., & Hofmann Bowman, M. A. (2013). Beneficial effects of quinoline-3-carboxamide (ABR-215757) on atherosclerotic plaque morphology in S100A12 transgenic ApoE null mice. *Atherosclerosis*, 228(1), 69-79.

Yang, H. W., Hu, X. D., Zhang, H. M., Xin, W. J., Li, M.-T., Zhang, T., Zhou, L. J., & Liu, X. G. (2004). Roles of CaMKII, PKA, and PKC in the Induction and Maintenance of LTP of C-Fiber-Evoked Field Potentials in Rat Spinal Dorsal Horn. *Journal of Neurophysiology*, *91*(3), 1122-1133.

Yang, H. Y., Fratta, W., Majane, E. A., & Costa, E. (1985). Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Roceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(22), 7757-7761.

Yang, H. Y. T., & Iadarola, M. J. (2003). Activation of spinal neuropeptide FF and the neuropeptide FF receptor 2 during inflammatory hyperalgesia in rats. *Neuroscience*, *118*(1), 179-187.

Yang, H. Y. T., & Iadarola, M. J. (2006). Modulatory roles of the NPFF system in pain mechanisms at the spinal level. *Peptides*, 27(5), 943-952.

Yang, H. Y. T., Tao, T., & Iadarola, M. J. (2008). Modulatory role of neuropeptide FF system in nociception and opiate analgesia. *Neuropeptides*, *42*(1), 1-18.

Yano, T., Iijima, N., Kakihara, K., Hinuma, S., Tanaka, M., & Ibata, Y. (2003). Localization and neuronal response of RFamide related peptides in the rat central nervous system. *Brain Research*, *982*(2), 156-167.

Yasuda, K., Raynor, K., Kong, H., Breder, C. D., Takeda, J., Reisine, T., & Bell, G. I. (1993). Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(14), 6736-6740.

Yoshida, H., Habata, Y., Hosoya, M., Kawamata, Y., Kitada, C., & Hinuma, S. (2003). Molecular properties of endogenous RFamide-related peptide-3 and its interaction with receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1593*(2-3), 151-157.

Yoshida, K., Nonaka, T., Nakamura, S., Araki, M., & Yamamoto, T. (2019). Microinjection of 26RFa, an endogenous ligand for the glutamine RF-amide peptide receptor (QRFP receptor), into the rostral ventromedial medulla (RVM), locus coelureus (LC), and periaqueductal grey (PAG) produces an analgesic effect in rats. *Peptides*, *115*, 1-7.

Yun, S., Kim, D. K., Furlong, M., Hwang, J. I., Vaudry, H., & Seong, J. Y. (2014). Does Kisspeptin Belong to the Proposed RF-Amide Peptide Family? *Frontiers in Endocrinology*, *5*, 134.

Ζ

Zadina, J. E., Hackler, L., Ge, L. J., & Kastin, A. J. (1997). A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature*, *386*(6624), 499-502.

Zhang, L., Berta, T., Xu, Z. Z., Liu, T., Park, J. Y., & Ji, R. R. (2011). TNF-alpha contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: Distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. *Pain*, *152*(2), 419-427.

Zhang, M., Wang, Y., Geng, J., Zhou, S., & Xiao, B. (2019). Mechanically Activated Piezo Channels Mediate Touch and Suppress Acute Mechanical Pain Response in Mice. *Cell Reports*, *26*(6), 1419-1431.e4.

Zhang, R., Xu, B., Zhang, M. N., Zhang, T., Wang, Z.-L., Zhao, G., Zhao, G. H., Li, N., Fang, Q., & Wang, R. (2017). Peripheral and central sites of action for anti-allodynic activity induced by the bifunctional opioid/NPFF receptors agonist BN-9 in inflammatory pain model. *European Journal of Pharmacology*, *813*, 122-129.

Zhang, Y., Zhao, S., Rodriguez, E., Takatoh, J., Han, B. X., Zhou, X., & Wang, F. (2015). Identifying local and descending inputs for primary sensory neurons. *Journal of Clinical Investigation*, *125*(10), 3782-3794.

Zhao, Y. L., Chen, S. R., Chen, H., & Pan, H. L. (2012). Chronic Opioid Potentiates Presynaptic but Impairs Postsynaptic N-Methyl-d-aspartic Acid Receptor Activity in Spinal Cords. *Journal of Biological Chemistry*, 287(30), 25073-25085.

Zhou, H. Y., Chen, S. R., Chen, H., & Pan, H. L. (2010). Opioid-Induced Long-Term Potentiation in the Spinal Cord Is a Presynaptic Event. *Journal of Neuroscience*, *30*(12), 4460-4466.

Zhu, Y., Duan, Z., Mo, G., Shen, C., Lv, L., Chen, W., & Lai, R. (2014). A novel 26RFa peptide containing both analgesic and anti-inflammatory functions from Chinese tree shrew. *Biochimie*, *102*, 112-116.

Zwadlo, G., Bruggen, J., Gerhards, G., Schlegel, R., & Sorg, C. (1988). Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. *Clinical and Experimental Immunology*, 72(3), 510-515.





Manon GERUM

Etude des mécanismes moléculaires et cellulaires de la sensibilisation latente à la douleur

Résumé : La sensibilisation latente à la douleur est un état de susceptibilité durable aux stimuli nociceptifs observée dans des modèles précliniques de douleur et qui contribuerait à la chronicisation de la douleur humaine. Cet état résulterait d'un tonus endogène élevé entre systèmes opioïdes et anti-opioïdes qui persiste après résolution de l'hyperalgésie et qui se manifeste par une nouvelle phase d'hyperalgésie transitoire à la suite d'un stress aigu ou de l'administration d'un antagoniste du système opioïde endogène. Les récepteurs à peptides RF-amides, particulièrement GPR103 et NPFF1R, présentent des propriétés anti-opioïdes et sont activés lors de la phase d'hyperalgésie. Ainsi, le but de ce travail était de déterminer l'implication de ces récepteurs dans la sensibilisation latente à la douleur et les mécanismes moléculaires par lesquels ils y contribuent.

Le blocage pharmacologique et génétique de chacun de ces récepteurs prévient et abolit durablement la sensibilisation latente dans différents modèles de douleur. L'analyse du transcriptome a révélé que cet état est lié à la surexpression de transcrits dans la moelle épinière et qui sont rétablies par l'antagoniste de NPFF1R. Ces gènes sont liés à des processus inflammatoires ce qui nous a mené à considérer l'importance de ces processus dans le maintien de ce phénomène. Cette hypothèse a été confirmée par l'administration d'anti-inflammatoires qui effacent la sensibilisation latente à la douleur.

Dans l'ensemble, ce projet aura démontré l'implication des récepteurs NPFF1R et GPR103 dans les adaptations à long-terme qui conduisent à la sensibilisation latente à la douleur et que ce phénomène est entretenu par une inflammation latente.

<u>Mots-clés :</u> sensibilisation latente à la douleur - hyperalgésie - opioïdes - RF-amide - moelle épinière - inflammation

Study of latent pain sensitization molecular and cellular mechanisms

<u>Abstract:</u> Latent pain sensitization is a long-lasting state of nociceptive stimuli susceptibility evidenced in preclinical models of pain that might contribute to pain chronicization in human. This state would result from a high endogenous tonus between opioid and anti-opioid systems that persists after hyperalgesia has resolved and occur by a new transitory phase of hyperalgesia following an acute stress or an opioid system antagonist administration. RF-amide peptides receptors, such as GPR103 and NPFF1R, display anti-opioid properties and are activated during the hyperalgesic state. Thus, the objective of this work was to determine the involvement of those receptors in latent pain sensitization and the molecular mechanisms by which they contribute to it.

Pharmacological and genetical blockade of both receptors prevents and abolishes latent pain sensitization in different pain models. Transcriptome analysis revealed that this state is associated with the upregulation of several transcripts in the spinal cord that are reversed by NPFF1R antagonist treatment. Those genes are involved in inflammatory processes which lead us to consider the importance of this process in the maintenance of this phenomenon. This hypothesis was confirmed by anti-inflammatory compounds administration that erases latent pain sensitization.

Altogether, this project has demonstrated NPFF1R et GPR103 receptors involvement in the long-lasting adaptations leading to latent pain sensitization and that this phenomenon is sustained by a latent inflammation.

Keywords: latent pain sensitization - hyperalgesia - opioids - RF-amide - spinal cord - inflammation