



HAL
open science

Etude de l'interaction entre le récepteur FLT3 et le système opioïdergique endogène.dans les mécanismes de la douleur chronique

Maxime Thouaye

► To cite this version:

Maxime Thouaye. Etude de l'interaction entre le récepteur FLT3 et le système opioïdergique endogène.dans les mécanismes de la douleur chronique. Sciences agricoles. Université de Montpellier, 2022. Français. NNT : 2022UMONT014 . tel-03760557

HAL Id: tel-03760557

<https://theses.hal.science/tel-03760557v1>

Submitted on 25 Aug 2022

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Neurosciences

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche INSERM U1298, Institut des Neurosciences de Montpellier

ÉTUDE DE L'INTERACTION ENTRE LE RÉCEPTEUR FLT3 ET LE SYSTÈME OPIOÏDERGIQUE ENDOGENE DANS LES MÉCANISMES DE LA DOULEUR CHRONIQUE

Présentée par Maxime THOUAYE

Le 18 février 2022

Sous la direction de Cyril RIVAT et Jean VALMIER

Devant le jury composé de

Florence PERRIN, Professeure, Université de Montpellier

Sylvain HUGEL, Chargé de recherche, CNRS

Pascal FOSSAT, Professeur, Université de Bordeaux

Patrick DELMAS, Directeur de Recherche, CNRS

Cyril RIVAT, Maître de Conférence, Université de Montpellier

Jean VALMIER, Professeur, Université de Montpellier

Emmanuel VALJENT, Directeur de Recherche, INSERM

Présidente de Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury. Merci au Pr Pascal Fossat et au Dr Sylvain Hugel d'avoir accepté d'évaluer ce projet de thèse en tant que rapporteurs. Merci au Dr Patrick Delmas de bien vouloir examiner ce travail, et au Pr Florence Perrin d'avoir accepté de présider cette soutenance. Enfin, merci également au Dr Emmanuel Valjent pour tous ses conseils avisés lors des comités de thèse, et son aide précieuse tout au long de ma thèse.

Je tiens à remercier également tous les membres de mon équipe, passés et présents. Merci tout d'abord à Cyril de m'avoir accueilli dès le master 2 au sein du laboratoire, ce qui aura été le début d'une longue aventure. Merci pour toute ton aide au cours de ces quatre années, tes conseils, ton investissement, ta bonne humeur et ta patience, et toutes nos discussions scientifiques qui m'auront permis d'avancer, ou à discuter au bureau de tout ou de rien. Merci également à Jean pour son intérêt pour mon projet de thèse, tous ses conseils et son enthousiasme. Merci bien sûr à Adrien, qui m'a tout appris et m'a soutenu pendant toute la thèse. Je n'oublierai pas tous les bons moments passés au labo ou en dehors, toutes nos discussions autour d'une chouffe, la colocation pendant le premier confinement, les randos et l'escalade... J'ai hâte qu'on se croise à nouveau aux US (Et j'espère juste pour tes nouveaux collègues que tu n'augmentes plus autant le chauffage dans le bureau !). Merci également à Antoine, le premier à m'avoir encadré lors de mon arrivée en stage, et pour tous ses encouragements et son soutien depuis. Pareil je n'oublierai pas tous les bons moments passés ensemble, de te voir débarquer en escaladant le balcon, que de bonnes soirées passées à l'appartement ! Profite de ce voyage au bout du monde. Merci également à Stacy et Juliette, pour leur bonne humeur, leurs encouragements et toute leur aide. Merci à tous les autres membres de l'équipe également pour tous les bons moments passés ensemble, Sylvie, Ilana, Corinne et Claire, merci à tous d'avoir été là, et toujours dans la bonne humeur !! Merci aussi à Fabrice pour toute son aide et son soutien depuis qu'il est arrivé au laboratoire, et tout l'intérêt porté à mon projet.

Merci également à tous les autres collègues du laboratoire, et notamment ceux de l'open space. Merci à Roxanne pour toutes les soirées passées ensemble, de m'avoir initié au ski, à Aleksandra, Philippe, Paul, Laetitia, et tous ceux que j'ai pu croiser lors de ces quatre années passées à l'INM !

Je remercie aussi tous mes amis sur Montpellier, en commençant bien sûr par Alyssa, Maria et Maxime. Merci pour tous les fous rires, toutes les bonnes soirées passées ensemble depuis le master, les souvenirs mémorables, le week-end en Espagne, et j'en passe ! Merci à Alyssa pour les vacances en Corse, et toutes les discussions et pauses café depuis que tu as rejoint l'équipe ! Merci également à Julien, Laura, Gaël, Angelina, et j'en oublie pour tous les bons moments passés ensemble. Enfin, merci aux membres du projet Pépite, Alex, Ludo, Amandine et Christelle, que de bons moments et fous rires passés avec vous également, un jour *Oligolife* révolutionnera le monde ! Mention spéciale à Alex, toutes nos discussions sur tout et sur rien au Berthom vont me manquer après mon départ !

Pour finir, je tiens également à remercier mes amis en Normandie, et surtout ma famille ! Un grand merci notamment à mes parents, mes grands-parents, mon frère et ma sœur. Merci pour toute votre aide, vos encouragements et votre soutien sans faille depuis le début de mon parcours à Montpellier. Je ne serais pas arrivé là sans toute votre aide

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Regulation of delta-opioid receptor by FLT3 receptor is involved in the maintenance of chronic pain

THOUAYE M, TASSOU A, ALVES S, BERTIN J, GENIN A, MALLIE S, MECHALY I, VALMIER J, RIVAT C (en preparation)

Inhibiting interaction between mu-opioid and FLT3 receptors in sensory neurons improves morphine analgesia and abrogates associated tolerance and hyperalgesia

THOUAYE M*, JOUVENEL A*, TASSOU A*, LEYRIS JP*, RUEL J, ANTRI M, MALLIE S, SAR C, DIOULOUFET L, MAUREL D, SOUNIER R, GRANIER C, SONRIER C, DAUBEUF F, VENTEO S, FROSSARD N, CARROLL P, MECHALY I, ROGNAN D, SOKOLOFF P, DALLEL R, DELMAS P, VALMIER J, RIVAT C (en cours de soumission)

Activation of peripheral neuronal FLT3 promotes exaggerated sensorial and emotional-pain related behaviors facilitating the transition from acute to chronic pain

TASSOU A, THOUAYE M, GILABERT D, LEYRIS JP, JOUVENEL A, SONRIER C, DIOULOUFET L, MECHALY I, CHENTOUF M, NEIVEYANS M, PUGNIERE M, MARTINEAU P, ROBERT B, CAPDEVILA X, VALMIER J, RIVAT C. *Preprint disponible sur Biorxiv* : <https://doi.org/10.1101/2021.11.23.469557> (soumis)

COMMUNICATIONS

Juillet 2021 | INRC (Virtuel) | Abstract et Poster

Regulation of Delta Opioid Receptor by FLT3 receptor is involved in the maintenance of chronic pain

THOUAYE M, TASSOU A, ALVES S, BERTIN J, GENIN A, MALLIE S, MECHALY I, VALMIER J, RIVAT C

Mai 2021 | Neurofrance congress (Virtuel) | Abstract et Poster

Interaction between the endogenous opioid system and the FLT3 receptor during pain chronification

THOUAYE M, TASSOU A, ALVES S, MALLIE S, MECHALY I, VALMIER J, RIVAT C

Novembre 2019 | Journée des neurosciences, Montpellier | Présentation orale

Modulation of the endogenous opioid system in chronic pain

THOUAYE M, VALMIER J, RIVAT C

Mars 2019 | National Symposium of Pain (Paris) | Abstract pour présentation orale

The receptor tyrosine kinase Flt3 regulates morphine induced analgesia

TASSOU A, JOUVENEL A, THOUAYE M, LEYRIS JP, SONRIER C, GRANIER S, DIOULOUFET L, MALLIE S, DELMAS P, ANTRY M, VALMIER J, RIVAT C

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES	11
INDEX DES ABREVIATIONS.....	15
AVANT-PROPOS	17
INTRODUCTION	21
Chapitre I Neuroanatomie fonctionnelle du système somatosensoriel.....	23
I. Circuit général de la transmission du signal somesthésique.....	25
II. Les neurones somatosensoriels périphériques.....	27
1. Classification historique.....	27
2. Les terminaisons nerveuses.....	29
3. Avancées dans la classification des neurones sensoriels	31
III. Le système nerveux central	38
1. La moelle épinière.....	38
1.1. Architecture	38
1.2. Classification des neurones spinaux.....	42
1.3. Circuits neuronaux	46
2. Les voies ascendantes.....	49
3. Intégration supra-spinale.....	53
4. Les voies descendantes.....	58
Chapitre II Rôle fonctionnel des systèmes opioïdiques endogènes et exogènes	63
I. Système opioïdique endogène et son rôle physiologique dans la douleur.....	64
1. Les récepteurs aux opioïdes.....	65
1.1. Récepteur DOR.....	65
1.2. Récepteur MOR.....	69
1.3. Récepteur KOR.....	72
1.4. Récepteur NOR.....	75
2. Les ligands	78
II. Les opioïdes exogènes	82
1. Histoire des opiacés.....	82
2. Usage clinique des opiacés.....	85
3. La morphine	86
3.1. Pharmacologie.....	86
3.2. Effets secondaires.....	87
a. Addiction.....	88
b. Tolérance et hyperalgésie.....	88
4. La crise des opioïdes	91
Chapitre III Transition de la douleur aiguë à la douleur chronique	95
I. Définition et contexte clinique	96

II. Mécanismes de chronicisation douloureuse.....	97
1. Facteurs de risques.....	99
2. Sensibilisation périphérique.....	101
3. Sensibilisation centrale	104
4. Sensibilisation latente	109
III. Le récepteur FLT3 dans les mécanismes et traitements opiacés de douleur chronique	111
1. Les récepteurs tyrosine kinase de classe III.....	111
2. Implication de FLT3 dans la douleur chronique	118
2.1. Douleur neuropathique	118
2.2. Douleur post-opératoire	119
2.3. Douleur inflammatoire.....	121
3. Implication dans les effets secondaires de la morphine	121
OBJECTIFS DE LA THESE.....	125
MATERIEL ET METHODES.....	129
RESULTATS	149
DISCUSSION.....	203
BIBLIOGRAPHIE	219
ANNEXES	243
RÉSUMÉ	325

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Représentation générale du circuit somatosensoriel chez le rongeur.....	26
Figure 2. Représentation des différentes terminaisons nerveuses au niveau de la peau glabre.....	30
Figure 3. Classification moléculaire des neurones sensoriels, 2014.....	32
Table 1. Bilan des différents types fonctionnels neurones sensoriels et leurs caractéristiques.....	35
Figure 4. Classification moléculaire des neurones sensoriels, 2018.....	37
Figure 5. Représentation des projections spinales des différents neurones sensoriels.....	38
Figure 6. Organisation des neurones somatosensoriels au sein des laminae de la moelle épinière dorsale....	40
Figure 7. Morphologie des neurones spinaux de la lamina II.....	41
Figure 8. Représentation des 15 sous-types de neurones spinaux glutamatergiques et GABAergiques, et leurs marqueurs spécifiques.....	43
Table 2. Bilan des différents types fonctionnels d'interneurones spinaux par lamina et leurs caractéristiques moléculaires.....	45
Figure 9. Expression des marqueurs moléculaires au niveau des terminaisons centrales des neurones sensoriels.....	46
Figure 10. Réseau spinal des voies nociceptives et mécanoréceptives.....	48
Figure 11. Représentation de la voie ascendante lemniscale.....	50
Figure 12. Représentation des voies ascendantes transportant l'information nociceptive.....	52
Figure 13. Représentation des structures cérébrales faisant partie de la matrice douloureuse.....	54
Figure 14. Représentation des principales voies descendantes, sous contrôle des structures cérébrales de la matrice douloureuse.....	59
Figure 15. Représentation des 4 récepteurs aux opioïdes, et leurs différentes affinités avec les 4 ligands opioïdiques.....	65
Figure 16. Expression d' <i>Oprd1</i> dans les sous-populations d'afférences primaires définies par séquençage en single cell.....	67
Figure 17. Expression du DOR dans les sous-population d'afférences primaires.....	68
Figure 18. Expression d' <i>Oprm1</i> dans les sous-populations d'afférences primaires définies par séquençage en single cell.....	71
Figure 19. Expression d' <i>Oprk1</i> dans les sous-populations d'afférences primaires définies par séquençage en single cell.....	73
Figure 20. Expression du KOR cérébral, à l'aide de la lignée transgénique KOR Cre- TdTomato.....	75
Figure 21. Expression d' <i>Oprl1</i> dans les sous-populations d'afférences primaires définies par séquençage en single cell.....	77
Figure 22. Liste des différents peptides opioïdes endogènes, de leurs précurseurs, et affinités avec les récepteurs opioïdiques classiques.....	79
Figure 23. Expression des récepteurs aux opioïdes et de leurs ligands au sein du système sensoriel.....	81
Figure 24. Voies de signalisation impliquées dans l'effet analgésique de la morphine.....	87
Figure 25. Processus de désensibilisation du récepteur MOR impliqués dans la tolérance et l'OIH.....	91

Figure 26. Représentation des mécanismes d'allodynie et d'hyperalgésie suite à la sensibilisation à la douleur	98
Figure 27. Mécanismes de sensibilisation à la douleur postopératoire.....	102
Figure 28. Mécanismes de sensibilisation centrale.....	104
Figure 29. Rôle de la glie spinale dans les processus de suractivation des systèmes excitateurs et sous-régulation des systèmes inhibiteurs responsables de la chronicisation douloureuse.....	107
Figure 30. Représentation de la mise en place d'une sensibilisation latente.....	110
Figure 31. Représentation de la dimérisation et phosphorylation des RTKs suite à leur activation.....	112
Figure 32. Expression de flt3 dans les sous-populations d'afférences primaires définies par séquençage en single cell.....	115
Figure 33. Représentation des voies intracellulaires modulées par l'activation de FLT3.....	116
Figure 34. Représentation de la modulation du complexe EIF4F par les voies Erk et mTOR.....	117
Figure 35. Effet de la perte d'expression de FLT3 dans différents modèles de douleur neuropathique.....	118
Figure 36. Effet du blocage de l'EOS sur un modèle neuropathique de souris n'exprimant pas FLT3.....	119
Figure 37. Effet du blocage de l'EOS sur un modèle postopératoire de souris n'exprimant pas FLT3.....	120
Figure 38. Effet de la perte d'expression de FLT3 dans différents modèles de douleur inflammatoire.....	121
Figure 39. Protocole d'expérimentation in vivo de l'étude du système opioïdérique endogène dans la récupération à la douleur chronique.....	150
Figure 40. Le récepteur DOR central est impliqué dans la récupération de la douleur postopératoire.....	152
Figure 41. L'inhibition du récepteur DOR empêche une récupération à la douleur postopératoire, et réinstaura une douleur spontanée chez des animaux incisés.....	153
Figure 42. Le récepteur DOR central est impliqué dans la récupération à la douleur neuropathique.....	156
Figure 43. Le récepteur MOR central est impliqué dans la récupération à la douleur inflammatoire.....	157
Figure 44. L'hypersensibilité mécanique induite par le blocage du récepteur DOR passe par une activation de l'AC5.....	159
Figure 45. Protocole d'expérimentation in vivo de l'étude du système opioïdérique endogène dans la récupération à la douleur chronique chez des animaux n'exprimant pas FLT3.....	160
Figure 46. La récupération induite par l'inhibition génique de FLT3 est dépendante du DOR spinal chez les souris mâles dans la douleur postopératoire.....	161
Figure 47. La récupération induite par l'inhibition génique de FLT3 est dépendante du DOR spinal chez les souris femelles dans la douleur postopératoire.....	162
Figure 48. La récupération induite par l'inhibition pharmacologique de FLT3 est dépendante du DOR spinal dans la douleur postopératoire.....	163
Figure 49. Le blocage chronique du récepteur KOR retarde, mais n'empêche pas, la récupération à la douleur postopératoire.....	164
Figure 50. La récupération à l'hypersensibilité thermique, où le blocage de FLT3 n'a pas d'effet, est dépendante du récepteur MOR spinal dans la douleur postopératoire.....	165
Figure 51. La récupération induite par l'inhibition génique de FLT3 est dépendante du DOR spinal dans la douleur neuropathique.....	167

Figure 52. Protocole d'expérimentation de l'étude de la modulation du récepteur DOR par FLT3 dans la douleur chronique.....	168
Figure 53. L'expression en ARNm des récepteurs et ligands de l'EOS n'est pas modulée par la mise en place d'une douleur postopératoire et/ou le blocage génique de FLT3.....	169
Figure 54. L'instauration d'une douleur neuropathique induit une perte d'effet d'un agoniste DOR sur l'inhibition de l'activité neuronale in vitro du côté ipsilatéral spécifiquement, restauré par le blocage de FLT3.....	171
Figure 55. L'instauration d'une douleur neuropathique induit une perte d'effet d'un agoniste DOR sur l'inhibition de l'hypersensibilité mécanique in vivo, restauré par le blocage de FLT3.....	173
Figure 56. Représentation de l'expression en ARNm de <i>flt3</i> en hybridation in situ par réaction enzymatique dans différentes structures du système nerveux (DRG, ME, cervelet).....	174
Figure 57. Représentation de l'expression en ARNm de <i>flt3</i> en RNAscope dans différentes structures du système nerveux (DRG, moelle épinière et cervelet).....	176
Figure 58. Caractérisation de la lignée <i>flt3</i> -Cre : Ribotag dans les DRGs issus d'animaux naïfs.....	178
Figure 59. Caractérisation de la lignée <i>flt3</i> -Cre : Ribotag au niveau de la peau glabre et poilue de la patte issues d'animaux naïfs.....	179
Figure 60. Caractérisation de la lignée <i>flt3</i> -Cre : Ribotag dans les ME issus d'animaux naïfs.....	181
Figure 61. Caractérisation de la lignée <i>flt3</i> -Cre : Ribotag dans le cervelet issu d'animaux naïfs.....	182
Figure 62. Caractérisation de la lignée <i>flt3</i> -Cre : Ribotag dans les structures cérébrales issues d'animaux naïfs.....	183
Figure 63. Expression de FLT3 dans les DRGs de la souris <i>flt3</i> -Cre après injection d'un virus AAV-flex-Tdtomato PHP.S.....	184
Figure 64. Expression de FLT3 dans les DRGs et projections centrales de la souris FLT3-Cre après injection d'un virus AAV-flex-Tdtomato PHP.S.....	185
Figure 65. Représentation de l'expression en ARNm de <i>Oprd1</i> en RNAscope dans différentes structures du système nerveux (DRG et ME).....	187
Figure 66. FLT3 et <i>Oprd1</i> ne sont pas exprimés par les mêmes sous-populations neuronales du DRG, en condition naïve ou de douleur chronique.....	188
Figure 67. Co-expression de <i>Oprd1</i> et FLT3 dans la ME en condition naïve et douleur postopératoire....	189
Figure 68. Le récepteur DOR central est impliqué dans les processus de sensibilisation latente induite par la douleur postopératoire.....	191
Figure 69. Le récepteur MOR central est impliqué dans les processus de sensibilisation latente induite par la douleur inflammatoire.....	192
Figure 70. La mise en place d'une douleur chronique postopératoire induit une vulnérabilité aux effets motivationnels induits par la morphine sur le long terme.....	194
Figure 71. La douleur spontanée induite par une double-incision est prévenue chez les animaux n'exprimant pas FLT3.....	196
Figure 72. L'inhibition chronique de la microglie prévient la mise en place d'une hypersensibilité mécanique et de comportements anxiodépressifs induits par la douleur postopératoire.....	197

Figure 73. L'expression en ARNm de FLT3 au niveau de la corne dorsale n'est pas localisée dans les populations macrophagiques.....	198
Figure 74. Le blocage de FLT3 prévient l'augmentation de l'expression des marqueurs moléculaires impliqués dans l'OIH au niveau de la ME, lors d'un traitement chronique à la morphine.....	199
Figure 75. La voie Jak/STAT et le complexe EIF4F sont impliqués dans les processus de tolérance et OIH à la morphine induits par l'injection de FL.....	200

INDEX DES ABREVIATIONS

- AC**, Adénylate Cyclase
ACC, Cortex cingulaire antérieur
AMPA, Acide aminométhylphosphonique
AMPC, Adenosine MonoPhosphate cyclique
AORs, Atypical Opioid Receptors
CBD, Cannabidiol
CCK, Cholecystokinine
CDH3, Cadhérine 3
CFA, Complete Freud's adjuvant
cGRP, calcitonin Gene-Related peptide
CR, Calretinine
CSF1, Colony-stimulating factor 1
BDNF, Brain-Derived Neurotrophic Factor
DAMGO, D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol-enkephalin
DAPI2, DNAX-activating protein of 12 kD
DOR, δ -Opioid Receptor
DRGs, Ganglions Dorso-Rachidiens
Dyn, Dynorphine
EOS, Endogenous Opioid System
FLT3, Fms-like Tyrosine Kinase 3
GABA, γ -AminoButyric Acid
GIRK, G-protein activated Inwardly Rectifying K⁺ current
GlyT, Transporteur de la Glycine
GRKs, G protein-coupled receptor kinases
HA, Hémagglutinine
HTMRs, High-Threshold MechanoReceptors
IB4, Isoleuctin Beta 4
IL, Interleukine
i.p., Intrapéritonéal
i.t., Intrathécal
KOR, κ -Opioid Receptor
IPBN, Noyau parabrachial latéral
LTMRs, Low-Threshold MechanoReceptors
LTP, Potentialisation à long terme
MKP-1, Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-1
MRGPR, Mas-Related G-protein Couple Receptor Member
MOR, μ -Opioid Receptor
mTOR, mammalian Target Of Rapamycin
M6G, Morphine-6-glucoronide
Nacc, Noyau Accumbens
NF, Neurofilament
NGF, Nerve Growth Factor
NKB, Neurokinine B
NK1R, Neurokinin 1 Receptor
NMDA, Acide N-méthyl-D-Aspartique
nNOS, neuronal Nitric Oxyde Synthase
NOR, Nociceptin Opioid Receptor
NP, Non peptidergique
NPFF, Neuropeptide FF
NPY, Neuropeptide Y
NTS, Neurotensine
OIH, Opioid-Induced Hyperalgesia
PAG, Substance grise périaqueducule
PGDFR, Platelet-derived growth factor receptor
Pdyn, Prodynorphine
Penk, Préproenkephaline
PEP, Peptidergique
PGE2, Prostaglandine E2
PKA, Protéine Kinase A
POMC, Proopiomélanocortine
pN/OFQ, Prepronociceptine
PV, Parvalbumine
RA-LTMRs, rapidly adaptating LTMRs
RCPGs, Récepteurs Couplés aux Protéines G
ROR, RAR-related orphan receptor
TRK, Récepteur Tyrosine Kinase
RVM, Moelle rostroventromédiale
SA-LTMRs, slowly adaptating LTMRs
SCF, Stem cell factor
SNC, Système Nerveux Central
SNP, Système Nerveux Périphérique
SST, Somatostatine
TH, Tyrosine Hydroxylase
THC, Tetrahydrocannabidiol
TLR4, Toll Like Receptor 4
Trk, Tropomisine receptor Kinase
TRP, Transient Receptor Potential

TRPA, Transient Receptor Potential

Ankyrin

TRPM, Transient Receptor Potential

Melastatin

TRPV, Transient Receptor Potential

Vanilloid

VGAT, Transporteur Vésiculaire du GABA

VGLUT, Transporteur Vésiculaire du

Glutamate

VTA, Aire Tegmentale Ventrale

AVANT-PROPOS

D'après la nouvelle définition de l'Association Internationale de l'Etude de la Douleur établie en 2020, la douleur correspond à une « expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée ou ressemblant à celle associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ». Cette expérience est multidimensionnelle, comprenant ainsi une composante sensorielle, une composante émotionnelle, mais également une composante cognitive. De ce fait, elle est différente et propre à chacun, modulée à la fois en fonction de ses émotions, de son vécu et antécédents, mais aussi de divers facteurs biologiques, sociaux et environnementaux. La douleur aiguë, commune à la très grande majorité des espèces dans le règne animal, est un signal d'alarme transitoire, bénéfique, et même nécessaire à la survie de l'organisme. En effet, l'incapacité à ressentir la douleur, et donc de prendre connaissance et traiter d'éventuels dommages ou lésions dans l'organisme, peut avoir des conséquences néfastes.

Au niveau biologique, l'intégration et la modulation des différents messages nociceptifs fait intervenir différents systèmes et circuits neuronaux complexes, selon une organisation très précise. Ces systèmes et circuits font partie d'un système encore plus général, le système somatosensoriel, responsable de la détection de divers signaux sensoriels (tactiles, thermiques, chimiques, ...). De plus, cette organisation permet notamment de discriminer avec exactitude la localisation, l'intensité, ou encore la durée du signal nociceptif. Grâce à ces différents systèmes spécialisés, l'organisme est également capable de distinguer la nature du signal nociceptif (signal d'origine thermique ou chimique nocif, stimulus tactile de haute intensité, etc...). Enfin, parmi ces systèmes et circuits neuronaux, certains sont responsables de la genèse du message douloureux (on parle de systèmes excitateurs), tandis que d'autres sont capables d'adapter l'organisme à la douleur en modulant son extinction au cours du temps notamment après disparition du stimulus à l'origine du signal douloureux, rendant alors la douleur transitoire (on parle alors de systèmes inhibiteurs).

Cependant, divers processus physiologiques de sensibilisation et d'adaptation de l'organisme qui se mettent en place lors d'un influx nociceptif vont parfois provoquer l'apparition d'un signal nociceptif persistant au sein de l'organisme, même après disparition de la cause originelle. La douleur, au lieu d'être un processus physiologique bénéfique et transitoire pour l'organisme, va devenir pathologique, néfaste et contre-productive pour

l'organisme : on parle alors de douleur chronique. Aujourd'hui, cette pathologie touche plus de 2 milliards de personnes dans le monde, et est responsable d'une diminution importante de la qualité de vie des personnes atteintes. De plus, elle est associée au développement de différentes comorbidités telles que l'anxiodépression, des troubles de l'humeur ou du sommeil, ou encore d'une vulnérabilité à l'addiction. Ainsi, elle représente un fardeau sociétal important.

L'hypothèse principale pour expliquer cette douleur persistante au niveau biologique serait la suractivation au cours du temps des systèmes impliqués dans la genèse du signal douloureux, ajouté à une inhibition chronique des systèmes impliqués dans son extinction.

Une des stratégies thérapeutiques majoritaires dans le traitement de la douleur, en particulier chronique, est l'usage d'opiacés dont les effets analgésiques sont extrêmement importants. Ces opiacés vont justement moduler positivement l'activation de certains acteurs impliqués dans l'extinction du message nociceptif, qui font partie de ce qu'on appelle le système opioïdergique endogène.

Cependant, l'emploi de ces opiacés présentent deux problèmes majeurs. Premièrement, à ces effets analgésiques importants sont associés d'autres effets secondaires néfastes, parmi lesquels on peut citer le développement d'une accoutumance, d'une forte dépendance, ou encore d'une réversibilité de leurs effets analgésiques lors d'une prise chronique résultant ainsi en une hypersensibilité induite par ces mêmes opiacés. De plus, on remarque aujourd'hui que ces opiacés ne présentent pas la même efficacité dans tous les types de douleur chronique puisque leur action dépend principalement de la nature de la douleur. Cela suggère ainsi qu'il existe une différence dans les acteurs du système inhibiteur de la douleur, et notamment dans le système opioïdergique endogène, impliqués dans les différents types de douleur chronique en fonction de la nature du signal de départ. Pour pallier à ces problèmes, il est donc nécessaire de définir l'implication de ces différents acteurs et des mécanismes précis impliqués selon le type de douleur. De plus, il est également nécessaire d'identifier avec précision l'action des opiacés exogènes au sein de l'organisme, et les mécanismes responsables de leurs effets néfastes. A terme, cela permettrait une amélioration des stratégies thérapeutiques visant à traiter la douleur chronique, en limitant les effets secondaires délétères des traitements employés.

Ainsi, le but de mon projet de thèse était premièrement d'apporter une **meilleure caractérisation de l'implication des différents acteurs composant le système opioïdergique endogène** selon les différents types de douleur chronique. De plus, leur **modulation** par un acteur particulier identifié par le laboratoire comme étant impliqué dans la chronicisation douloureuse, **le récepteur FLT3** (« Fms-like Tyrosine Kinase 3) a également été étudiée.

Le manuscrit se compose donc d'une première partie décrivant le **système somatosensoriel** dans son ensemble, avec un intérêt particulier pour les circuits impliqués dans la transmission du message douloureux. S'en suit ensuite une partie caractérisant le **rôle du système opioïdergique endogène dans ce système somatosensoriel**, ainsi que les mécanismes d'action des opiacés exogènes employés dans le traitement de la douleur. Enfin, une dernière partie portera sur la **description de la douleur chronique, avec une focalisation sur l'implication du récepteur FLT3**. En particulier, en s'appuyant sur trois publications du laboratoire, dont deux auxquelles j'ai pu participer, cette dernière partie s'intéressera au rôle de **FLT3 dans deux types particuliers de douleur chronique**, mais également de son rôle majeur dans les effets secondaires délétères liés à l'usage des opiacés exogènes et notamment de la morphine. Ces différentes publications ont apporté la base scientifique menant à mon projet de thèse, dont les résultats seront ensuite présentés et discutés.

INTRODUCTION

Chapitre I

Neuroanatomie fonctionnelle du système somatosensoriel

I. Circuit général de la transmission du signal somesthésique

Le système nerveux somatosensoriel est responsable de la perception consciente ou inconsciente de différentes modalités sensorielles telles que le toucher, le chaud, le froid, la position des différentes parties du corps, ou encore la nociception. Ce système nerveux, capable de discriminer et générer des réponses différentes en fonction des variations de toucher ou de température perçues, est retrouvé chez de très nombreuses espèces, mêmes sommaires, au contraire d'autres sens comme la vision ou l'audition (Kaas, 2009). En plus d'indiquer une apparition précoce de ce système dans l'évolution des espèces, cela montre également l'importance de la somesthésie dans la majorité des espèces, nécessaire à leur survie et l'interaction avec leur environnement. De plus, la présence de ces réponses spécifiques suggère qu'il existe différents mécanismes spécialisés au sein du système somatosensoriel (Ma, 2012).

Aujourd'hui, la théorie principale permettant d'expliquer ces mécanismes est la présence de circuits intégrés codant l'information de façon spécifique pour chaque type de variation (tactile, thermique, ...). Ces circuits sont présents dans le système nerveux périphérique (SNP), et transmettent l'information jusqu'au système nerveux central (SNC), au niveau de la moelle épinière dorsale, du tronc cérébral et enfin du cerveau (figure 1). Ce sont les travaux indépendants de Magnus Blix en Suède, Alfred Goldscheider en Allemagne et Henry Donaldson aux États-Unis dans les années 1880 qui ont les premiers permis d'établir cette hypothèse (Norrzell et al. 1999). Leurs observations respectives ont démontré des localisations spécifiques sur la peau permettant de coder le chaud, le froid, le toucher léger, ou encore la nociception. Depuis, différents travaux ont permis une caractérisation plus précise des acteurs impliqués dans l'intégration de chaque modalité. Au niveau du système nerveux périphérique notamment, on connaît à présent l'existence de différents types de neurones sensoriels activés par des modalités différentes, et transmettant ensuite l'influx nerveux jusqu'au niveau de la moelle épinière (Li et al., 2011).

Cependant, bien qu'on soit capable par une stimulation spécifique d'engendrer une réponse spécialisée pour une modalité donnée, semblant confirmer cette théorie de circuits inhérents à une modalité sensorielle propre, ceux-ci ne sont pas isolés les uns des autres au sein du système somatosensoriel. Ainsi, ces réseaux sont interconnectés entre eux, permettant leur modulation respective (Wall, 1978). Cette modulation potentiellement bénéfique à l'organisme (une activation des récepteurs au froid pouvant moduler négativement la sensation de chaud engendrée par une brûlure par exemple), peut également être délétère dans certaines conditions pathologiques. Enfin, il apparaît aujourd'hui également que de nombreux neurones sensoriels

sont polymodaux, et sont donc capables de générer l'activation de différents circuits (Ma, 2010). Ainsi, le système somatosensoriel est caractérisé par des circuits spécifiques et spécialisés capables de coder des modalités bien précises. Cependant, ce système est bien moins linéaire que ce qui a été proposé au cours du XIX^{ème} siècle ; ces différents circuits ne sont en effet pas totalement isolés et ne répondent pas chacun à des signaux uniques. Leurs interconnexions, et la variété de signaux et de terminaisons nerveuses capables de les activer, en font un système complexe, et un sujet de recherche encore actif aujourd'hui. Ainsi, afin de mieux en comprendre le rôle, à la fois en condition physiologique et pathologique, il est nécessaire de caractériser et différencier de façon précise les différents acteurs du système somatosensoriel.

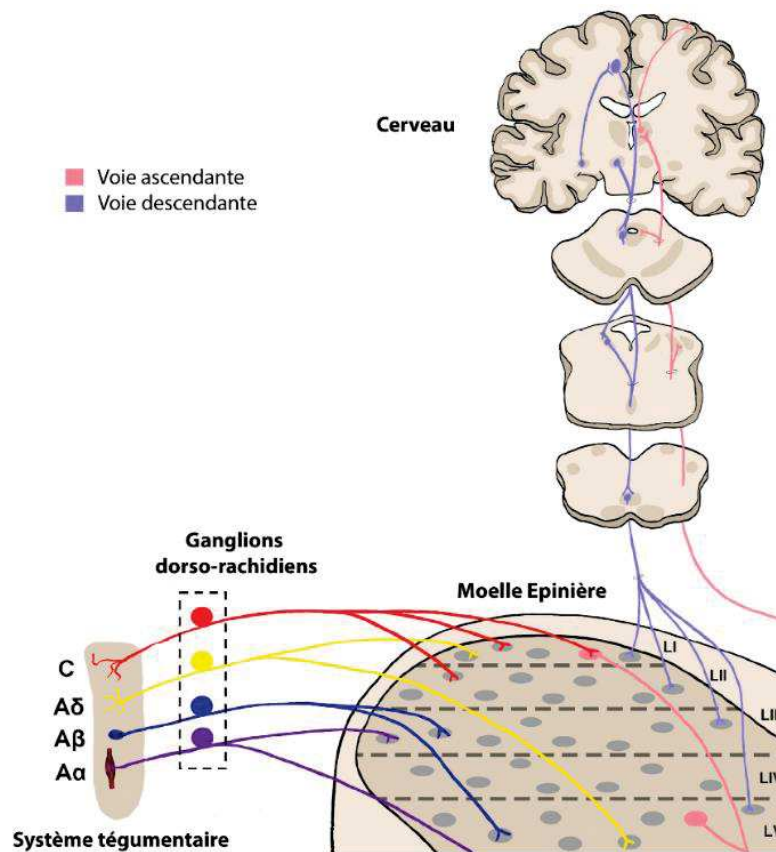


Figure 1. Représentation générale du circuit somatosensoriel

L'information sensorielle provenant de la périphérie va être transmise via différentes afférences primaires selon la modalité, dont les corps cellulaires se trouvent dans les ganglions dorso-rachidiens. Ces afférences vont projeter dans différents niveaux de la corne dorsale de la moelle épinière, où après décussation, l'information va ensuite être transmise par les voies ascendantes au niveau du cerveau, où elle sera intégrée. Enfin, des voies descendantes vont exercer un rétrocontrôle au niveau de la moelle épinière.

Adapté de Harding et al., 2020

II. Les neurones somatosensoriels périphériques

1. Classification historique

Les neurones de premier ordre sont des neurones sensoriels pseudo-unipolaires, responsables de la transmission de l'information somesthésique du système nerveux périphérique jusqu'au niveau de la moelle épinière. Les somas de ces neurones sensoriels sont regroupés au sein des ganglions dorso-rachidiens (ou DRGs). De ces ganglions, situés de part et d'autre de toute la moelle épinière, ils forment un axone distal vers la périphérie, et un axone proximal vers le système nerveux central. Historiquement, ces neurones ont d'abord été classifiés en trois catégories distinctes selon leurs différences anatomiques, et en particulier selon le diamètre de leur axone et leur degré de myélinisation. Cette première classification a été proposée dans les années 1920 par Erlanger et Gasser, deux scientifiques américains, et regroupe ainsi les neurones en fibres **A** (elles-mêmes classées en quatre sous-types : **A α** , **A β** , **A γ** , et **A δ**), en fibres **B**, et en fibres **C** (Erlanger & Gasser, 1927). Parmi ces différents types de fibres, les fibres **A α** , **A γ** , et **B** sont spécialisées dans la transmission de l'information proprioceptive, ou dans l'innervation des organes internes et du système nerveux autonome. Les fibres **A β** , **A δ** et **C** sont quant à elles responsables de la transmission de l'information à partir du système tégumentaire jusqu'au système nerveux central. Le système tégumentaire (correspondant chez les mammifères à la peau, les poils et les cheveux principalement) est l'interface principale entre le milieu extérieur et intérieur de l'organisme. Ces fibres **A β** , **A δ** et **C** étant particulièrement impactées dans les différentes pathologies touchant le système somatosensoriel (douleur chronique, prurit chronique, hypersensibilité à une ou plusieurs modalités sensorielles, ...), elles seront ainsi plus particulièrement étudiées dans ce chapitre.

Les fibres **A β** sont caractérisées par un large diamètre axonal (6 à 12 μ m), un fort degré de myélinisation et une vitesse de conduction de 15 à 100 m.s⁻¹, bien qu'il y ait une variabilité inter-espèces très importante (Geren, 1954). Classiquement, ces neurones sont associés à la transmission de l'information proprioceptive au niveau des fuseaux neuromusculaires d'une part (tout comme les fibres **A α**), mais surtout à la transmission de l'information mécanique et en particulier celle du toucher léger d'autre part, médiée par des mécanorécepteurs à bas seuil d'activation (low-threshold mechanoreceptors, ou LTMRs). Ces **A β -LTMRs** sont eux-mêmes répartis en plusieurs sous-catégories, en fonction des terminaisons nerveuses périphériques qu'ils forment, des différents types de stimuli mécaniques auxquels ils répondent (étirement ou déformation de la peau glabre ou poilue, vibrations, ...), et les différences dans leur réponse

électrophysiologique suite à ces stimuli. En particulier, on distingue plusieurs sous-types de fibres $A\beta$ -LTMRs à adaptation rapide ($A\beta$ rapidly adaptating ou **RA-LTMRs** –divisés en 3 sous-catégories-, qui ne vont générer de potentiels d'action qu'au début, et éventuellement à la fin, d'un stimulus), et de sous-types de fibres $A\beta$ -LTMRs à adaptation lente ($A\beta$ slowly adaptating ou **SA-LTMRs** –divisés en 2 sous-catégories-, qui vont continuer de générer des potentiels d'action pendant toute la durée d'un stimulus) (Ogawa et al., 1981). En fonction de leur adaptation, ils vont ainsi répondre à différents types de stimuli mécaniques : le contact léger des vêtements sur la peau par exemple va être détecté par les RA-LTMRs, leur adaptation rapide permettant de ne plus ressentir ce contact très rapidement après le début du stimulus. Les SA-LTMRs à l'inverse vont détecter un contact plus franc sur la peau pendant toute la durée de ce contact. Enfin, les **$A\beta$ field-LTMRs**, identifiés dès les années 1940 mais n'ayant été caractérisés de façon précise que ces 10 dernières années, peuvent avoir une adaptation lente ou intermédiaire en fonction de l'intensité du stimulus, et vont répondre à des signaux moins localisés, tels que des caresses sur la peau (bai et al., 2015). Il apparait également aujourd'hui qu'une part de nocicepteurs mécaniques, qui sont les neurones responsables de la transmission de l'information tactile douloureuse et généralement associés à des neurones de plus petit diamètre avec une vitesse de conduction plus faible, fait également partie des fibres $A\beta$: ce sont les **$A\beta$ -HTMRs** (high-threshold mechanoreceptors). Ces fibres représentent chez le rongeur environ 20% de la totalité des fibres $A\beta$.

Les fibres **$A\delta$** sont faiblement myélinisées, de petit diamètre (1 à 5 μ m), et ont une vitesse de conduction modérée (3 à 30 m.s⁻¹). A l'inverse des fibres $A\beta$, elles correspondent majoritairement aux nocicepteurs, et répondent ainsi à des stimuli de haute intensité, qu'ils soient d'origine mécanique (on parle alors de fibres **$A\delta$ -HTMRs**), chimique ou thermique. Il a cependant été observé qu'une faible partie de ces fibres répond également à des stimuli thermiques et mécaniques de faible intensité, correspondant ainsi pour ces dernières à des LTMRs (les **$A\delta$ -LTMRs**, ayant une adaptation rapide). Cela en fait ainsi une population aussi hétérogène que les fibres $A\beta$. Ces fibres sont également caractérisées par le type de terminaisons nerveuses qu'elles innervent (Meltzer et al., 2021).

Enfin, les fibres **C**, au contraire des fibres A, ne sont pas myélinisées et ont un diamètre axonal plus petit (0.2 à 1.5 μ m), résultant en une vitesse de conduction lente (0.5 à 3 m.s⁻¹). Elles représentent plus de la moitié de tous les neurones somatosensoriels, et sont majoritairement associées à des nocicepteurs mécaniques (les **C-HTMRs**) et thermiques, tout comme les fibres $A\delta$. Cependant, c'est également la catégorie la plus hétérogène, puisqu'une partie de ces fibres correspond à des thermorécepteurs, qui vont détecter les variations de température, ou bien à

des **C-LTMRs**. Ces dernières sont responsables de la sensation du toucher plaisant et sont caractérisées par une adaptation lente à modérée, de façon similaire aux $A\beta$ field-LTMRs, bien qu'ils innervent d'autres types de terminaisons nerveuses (Cain et al., 2001).

2. Les terminaisons nerveuses

En plus de pouvoir les différencier en fonction de leur anatomie et leurs propriétés électrophysiologiques, les différents types de fibres afférentes sont également caractérisées par les terminaisons nerveuses qu'elles forment, à la fois au niveau central (qui seront abordées dans la partie III), qu'au niveau du système tégumentaire. Dans ce dernier en particulier, il existe différents types de terminaisons nerveuses, dont certaines cellules spécialisées nommées corpuscules interagissant plus particulièrement avec les terminaisons nerveuses des différentes fibres LTMRs (Paré et al., 2002).

Au niveau de la peau glabre, on distingue 4 types de corpuscules différents, s'associant notamment à différentes fibres $A\beta$ -LTMRs (figure 2) :

- Les **corpuscules de Meissner**, qui sont la seule structure spécifique de la peau glabre. Ces corpuscules se situent proches de la surface de la peau, au creux des invaginations dans l'épiderme formées par le derme. Ils joueraient un rôle important dans la dextérité des mains, en détectant notamment des pressions mécaniques très légères, et de façon très précise.
- Les **disques de Merkel**, situés proches des kératinocytes. Une seule fibre forme plusieurs terminaisons axonales différentes, chacune innervant un disque de Merkel. De façon intéressante, il semblerait que les disques de Merkel et les fibres LTMRs forment un type de connexion entre eux très similaire à une synapse classique. S'il est admis que cette synapse serait excitatrice, le type de transmetteur libéré par les disques de Merkel reste débattu, plusieurs études suggérant soit une libération glutamatergique, soit sérotoninergique, ou encore adrénergique.
- Les **corpuscules de Pacini**. Les corpuscules de Pacini sont les structures les plus larges parmi les différents types de terminaisons nerveuses, et une seule fibre va innerver un seul corpuscule. De plus, ce type de terminaison est caractérisé par un champ récepteur bien plus large que toutes les autres terminaisons, répondant ainsi de façon moins précise aux stimuli tactiles.
- Les **corpuscules de Ruffini**, bien qu'ils restent largement hypothétiques, notamment chez la souris (Walcher et al., 2018). En effet, ce type de corpuscule n'a été pour

l'instant retrouvé que chez certains grands mammifères, et de façon assez inconsistante. Il reste ainsi à identifier précisément l'existence et les caractéristiques de ces terminaisons nerveuses.

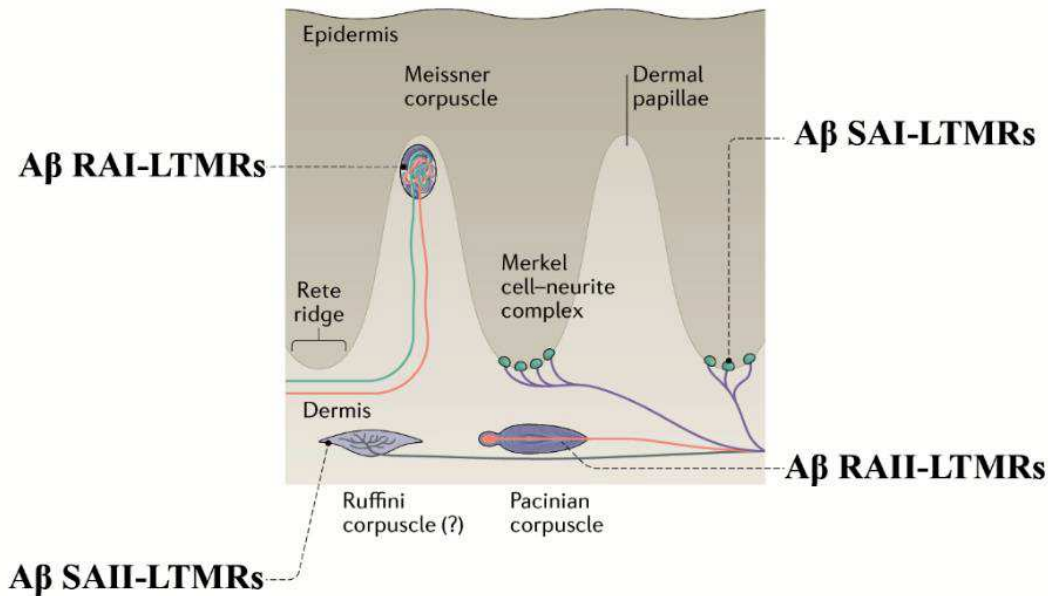


Figure 2. Représentation des différentes terminaisons nerveuses au niveau de la peau glabre
On distingue quatre types de terminaisons nerveuses au niveau de la peau glabre (corpuscule de Meissner, corpuscule de Pacini, corpuscule de Ruffini, et disques de Merkel), chacun innervé par un type différent de fibre A β LTMR.
Adapté de Handler et al., 2021

En plus de ces corpuscules, on trouve également deux autres types de terminaisons nerveuses également encapsulées au niveau de la peau poilue, caractéristiques des fibres A β / δ et C LTMRs :

- Les **terminaisons lancéolées**, qui vont venir s'entrelacer à la base des follicules pileux, ainsi qu'avec des cellules de Schwann et des fibres de collagènes. Chaque type de fibre va former des entrelacs particuliers, qui vont leur permettre de répondre aux différents mouvements des poils.
- Les **terminaisons circonférentielles**, également situées à la base des follicules pileux qui vont englober les terminaisons lancéolées, et spécifiques des fibres A β field-LTMRs. Leur interaction moins directe avec les follicules pileux pourrait expliquer le fait que ces fibres ne soient pas sensibles aux mouvements de poils de façon précise, mais plutôt à des sensations tactiles plus répandues, telles que des caresses.

Enfin, il existe également des **terminaisons libres**, nommées ainsi car non encapsulées, c'est-à-dire non reliées à des structures spécialisées ou enveloppées de collagènes et cellules de Schwann. Ces terminaisons sont spécifiques des fibres A δ et C, notamment HTMRs ou relayant les informations thermiques, nociceptives ou non (Zotterman, 1939). Bien qu'elles ne soient pas encapsulées, plusieurs études ont mis en évidence récemment qu'elles sont tout de même en interaction avec des cellules de Schwann, en particulier dans le cas des fibres non myélinisées. Cette interaction serait essentielle à la détection de stimuli nocifs et la génération d'un signal nociceptif, d'origine thermique ou mécanique. En revanche, cette interaction n'interviendrait pas dans la détection de signaux thermiques non-nociceptifs.

3. Avancées dans la classification des neurones sensoriels

Si la classification des neurones sensoriels en fonction de leur anatomie est toujours utilisée aujourd'hui, il apparaît cependant que le diamètre axonal, la vitesse de conduction, et le degré de myélinisation ne permettent pas à eux seuls de distinguer les différents types neuronaux présents au sein du système somatosensoriel, et leurs propriétés respectives. Ceci est d'ailleurs illustré par l'hétérogénéité des neurones qui composent chaque type de fibres. En plus de ces paramètres, d'autres critères sont ainsi utilisés pour distinguer ces différents types neuronaux. En particulier, on classifie aujourd'hui les neurones sensoriels majoritairement en fonction de leur rôle respectif dans la transmission de l'information des différentes modalités sensorielles. On distingue de cette façon quatre catégories de neurones sensoriels, exprimant chacun des acteurs moléculaires différents permettant ainsi de les distinguer entre eux, au moins partiellement (Lallemend & Ernfors, 2012) :

- Les **mécanorécepteurs**, répondant aux divers stimuli mécaniques non douloureux, tels que des étirements, déformations ou changements de pression au niveau de la peau, ou aux mouvements des poils. Comme décrit précédemment, d'un point de vue anatomique et électrophysiologique, ils correspondent majoritairement aux neurones de large diamètre, c'est-à-dire aux fibres A β , bien qu'un faible pourcentage de fibres A δ et de fibres C répondent eux aussi aux mêmes types de stimuli.
- Les **thermorécepteurs**, responsables de la détection des variations physiologiques de température. Contrairement aux mécanorécepteurs, ces fibres présentent bien moins d'hétérogénéité, à la fois dans leurs caractéristiques anatomiques et électrophysiologiques, que dans la diversité des acteurs moléculaires exprimés. Ces

fibres correspondent soit à des fibres C (codant pour le chaud ou pour le froid), soit à des fibres A δ (codant pour le froid uniquement).

- Les **propriocepteurs**, responsables de la perception des différentes parties du corps, et participent ainsi à la discrimination du *soi* et du *non-soi*. Ces neurones sont mécanosensitifs, et correspondent majoritairement aux fibres A α .
- Les **nocicepteurs**, activés spécifiquement en réponse à de stimuli de haute intensité, qu'ils soient d'origine mécanique, thermique, ou même chimique, et représentent plus de 50% des neurones sensoriels totaux. Ces neurones sont en général polymodaux, et donc capables de répondre à divers stimuli nocifs (voire physiologiques). Historiquement, ils ont été associés en particulier avec les fibres C et A δ , bien que l'on connaisse à présent l'existence de fibres A β -HTMRs. De par leur présence dans tous les types de fibres, mais également par la diversité des signaux auxquels ils répondent, en faisant une population extrêmement hétérogène, il est difficile d'identifier des marqueurs spécifiques par rapport aux modalités auxquels chaque type de nocicepteur répond.

NF1	NF2	NF3	NF4	NF5	NP1	NP2	NP3	PEP1	PEP2	TH
LDHB CACNA1H TRKB ^{high} NECAB2	LDHB CACNA1H TRKB ^{low} CALB1 RET	LDHB TRKC ^{high} FAM19A1 RET	LDHB TRKC ^{low} PV SPP1 CNTNAP2	LDHB TRKC ^{low} PV SPP1 CNTNAP2	PLXNC1 ^{high} P2X3 GFRA2 MRGPRD	PLXNC1 ^{high} P2X3 TRKA CGRP MRGPRA3	PLXNC1 ^{high} P2X3 SST	TRKA CGRP KIT TAC1 PLXNC1 ^{low}	TRKA CGRP KIT CNTNAP2 FAM19A1	PIEZO2 ^{high} VGLUT3 GFRA2
LTMRs		Proprioceptors			Nonpeptidergic			Peptidergic		C-LTMRs
NEFH		Myelinated	NEFH		Unmyelinated			Myel.	NEFH	Unmyel.
RET		RET	ASIC1	ASIC1	RET	TRPV1	RET	TRPV1	RET	RET
TRPA1		TRPA1	RUNX3	RUNX3	TRPA1	TRPA1	TRPA1	TRPA1	TRPA1	TRPA1
TRPC3		TRPC3			TRPC3	TRPC3	TRPC3	TRPC3	TRPC3	TRPC3
NAV1.8/9		NAV1.8/9			NAV1.8/9	NAV1.8/9	NAV1.8/9	NAV1.8/9	NAV1.8/9	NAV1.8/9

Figure 3. Classification moléculaire des neurones sensoriels, 2014

Représentation des 11 catégories de neurones sensoriels par analyse transcriptomique, avec leurs marqueurs moléculaires spécifiques : les populations NF1 à NF3 correspondent aux mécanorécepteurs des fibres myélinisées, NF4/5 aux propriocepteurs, TH aux mécanorécepteurs amyéliniques (fibres C-LTMRs) ; enfin, les autres populations correspondent aux nocicepteurs non peptidergiques et amyéliniques (NP1 à NP3), peptidergiques et amyéliniques (PEP1), ou peptidergiques et myélinisés (PEP2).

Usoskin et al., 2014

Différentes études réalisées ces dernières années ont permis de raffiner cette classification, par des méthodes non biaisées et indépendantes des classifications déjà existantes. Une analyse transcriptomique publiée en 2014 par les laboratoires de Patrick Ernfors et Sten Linnarsson notamment a permis d'identifier 11 sous-types de neurones sensoriels

différents, pouvant chacun être associé à l'une des quatre catégories de fibres sensorielles décrites plus haut (figure 3) (Usoskin et al., 2014).

A l'heure actuelle, la classification anatomique établie depuis de nombreuses années, et celle de Linnarsson et Ernfors, restent largement utilisées en complément l'une de l'autre afin de caractériser les 4 types fonctionnels de neurones sensoriels. Ainsi, un bilan de ces 4 types de neurones fonctionnels a été réalisé dans le tableau ci-dessous, associés aux stimuli pour lesquels ils répondent, le type de fibre et de terminaisons nerveuses correspondantes, et enfin les marqueurs moléculaires identifiés et sous-populations neuronales correspondantes d'après la classification moléculaire (table 1). Plusieurs points sont cependant à noter en complément de ce tableau.

Premièrement, on remarque que les différents types de fibres identifiées d'un point de vue anatomique et électrophysiologique n'ont pas tous pu être associés aux sous-populations neuronales identifiées par transcriptomique, voire à des marqueurs moléculaires spécifiques (notamment certains sous-types de fibres A β LTMRs à adaptation rapide ou lente). De plus, certains marqueurs moléculaires ne sont pas forcément spécifiques d'une seule sous-population. Par exemple, PIEZO2 n'est pas retrouvé uniquement dans les C-LTMRs même s'il y est fortement exprimé. Il serait un marqueur plus général retrouvé dans tous les sous-types de LTMRs, en faisant un marqueur intéressant des mécanorécepteurs de façon globale (Coste et al., 2010). En 2021, la découverte de ce canal ionique comme étant impliqué dans la mécanocception a d'ailleurs valu le prix Nobel de médecine à Ardem Patapoutian, conjointement avec David Julius.

Ensuite, au niveau des fibres codant pour le chaud ou pour le froid, on remarque en particulier l'implication des récepteurs appartenant à la superfamille des TRP (« transient receptor potential »). De par les nombreux types et sous-types qui composent cette famille de récepteurs, l'identification des différents récepteurs impliqués dans la perception du chaud, et du froid, ou dans les variations nocives de température est encore en cours aujourd'hui. De plus, la plupart de ces récepteurs ne sont pas sensibles uniquement aux signaux thermiques, mais répondent également à différentes stimulations d'origine chimique, ajoutant de la complexité dans leur caractérisation. Par exemple, TRPM8 (« Transient Receptor Potential Melastatin 8 ») est également le récepteur du menthol, tandis que TRPA1 (« Transient Receptor Potential Ankyrin 1 ») et TRPV1 (« Transient Receptor Potential Vanilloid 1 »), découverts par David Julius, prix Nobel de médecine, sont les récepteurs du wasabi et de la capsaïcine présente dans les piments, respectivement (Catarina et al., 1999). De manière intéressante, il a été démontré que c'est la partie C-terminale de ces récepteurs uniquement qui va permettre de déclencher un

signal codant pour le froid ou pour le chaud, donnant ainsi à chaque récepteur sa spécificité à l'une ou l'autre des modalités. Les parties extracellulaire et intermembranaire seraient quant à elles activées par leurs ligands chimiques comme le menthol ou la capsaïcine. Ainsi, des chimères des récepteurs TRPM8 et TRPV1 dont la partie C-terminale a été échangée vont être activés par des températures plus chaudes ou plus froides, respectivement (Brauchi et al., 2006).

De plus, la complexité des classifications peut être exemplifiée par des découvertes récentes, montrant par exemple qu'au moins deux types de fibres sont nécessaires dans la transmission des informations thermiques au chaud (Paricio-Montesinos et al., 2020) : une exprimant des récepteurs au chaud tels que TRPV1, TRPM2 ou TRPM3, l'autre exprimant TRPM8. Notamment, la première serait excitée par le chaud, tandis que la seconde serait inhibée. Ainsi, c'est l'intégration de l'information de ces deux types de fibres à la fois qui permettrait de percevoir de manière très précise la sensation de chaleur. De manière paradoxale, l'inhibition de TRPM8 empêche ainsi la perception du chaud. A l'inverse, l'inhibition de la 1^{ère} population provoque seulement une perte dans la précision de discrimination des variations de température, de façon cohérente à ce qui a été observé après délétion de TRPM2 ou TRPM3.

Enfin, il est important de noter que certaines de ces populations nociceptives de neurones sensoriels sont également capables de générer un autre type de réponse distinct de la nociception (bien que ces deux types de réponses soient généralement associés en condition pathologique), qui est la pruriception, correspondant à la sensation de démangeaisons. La nociception et la pruriception engagent l'activation des mêmes terminaisons nerveuses, et ainsi des mêmes circuits périphériques, montrant encore plus le caractère polymodal des fibres nociceptives. Les travaux du laboratoire de Philippe Séguéla en 2020 en particulier ont identifié les fibres C non peptidergiques exprimant MRGPRA3 (« Mas-Related G-Protein coupled Receptor member A3 », correspondant à la population NP2 dans la classification de 2014) comme étant celles capables de générer ces deux types de réponse (Sharif et al., 2020).

Classification fonctionnelle des neurones sensoriels	Stimuli détectés	Sous-populations neuronale(s)	Marqueurs moléculaires principaux	Type de fibres associées	Terminaisons nerveuses périphériques formées
Mécanorécepteurs	Toucher plaisant	TH	TH, PIEZO2, VGLUT3	C-LTMRs	Lancéolées
	Pressions / vibrations sur la peau, mouvement des poils	NF1	TrkB (<i>ntrk2</i>), NF200	A δ -LTMRs	
	Pressions / vibrations sur la peau	NF2	TrkB, NF200, Ret	A β RAI-LTMRs	Corpuscules de Meissner
	Pressions sur la peau	NF3 ?	TrkC (<i>ntrk3</i>), NF200	A β SAI-LTMRs	Disques de Merkel
	Étirements de la peau	?	NF200, ?	A β SAII-LTMRs	Corpuscules de Ruffini ?
	Pressions / vibrations sur la peau	?	NF200, Ret	A β RAI-LTMRs	Corpuscules de Pacini
	Pressions / vibrations sur la peau	?	NF200, Ret, NPY2	A β RA-LTMRs	Lancéolées
	Caresses sur la peau	NF3	NF200, TrkC, Ret	A β Field-LTMRs	Circonférentielles
Thermorécepteurs	Froid	PEP 1 ?	TRPM8, TRPA1	C	Libres
		PEP2	TRPM8, TRPA1, NF200	A δ	
	Chaud	NP1 à NP3 / PEP1	TRPV1, TRPM2, TRPM3	C	
Propriocepteurs	Contraction / Étirement des muscles, ...	NF4 / NF5	PV, TrkC, SPP1	A α	Fuseaux musculaires, Organes tendineux de Golgi
Nocicepteurs	Tactile	?	NF200, TrkA(<i>ntrk1</i>), Nav1.8/9	A β -HTMRs	Libres
	Tactile	NP1	TrkA, Nav1.8/9, Ib4, Ret, MRGPRD	C-HTMRs	
	Thermique	NP2	TrkA, Nav1.8/9, IB4, Ret, MRGPRA3	C	
		NP3	TrkA, Nav1.8/9, IB4, Ret, SST	C	
		PEP1	TrkA, Nav1.8/9, cGRP, substance P	C	
	Tactile et thermique (froid)	PEP2	NF200, TrkA, cGRP, Nav1.8/9	A δ	

Table 1. Bilan des différents types fonctionnels neurones sensoriels et leurs caractéristiques

NF=Neurofilament ; NP=non peptidergique ; PEP=Peptidergique ; Trk=Tropomisine receptor Kinase ; MRGPRD= Mas-Related G-protein Couple Receptor Member D ; IB4= Isoleuctin Beta 4 ; cGRP= calcitonin Gene-Related peptide ; SST=somatostatine ; PV=Parvalbumine ; NPY=neuropeptide Y

Puisqu'ils activent les mêmes circuits, ce serait une différence en terme d'activation de récepteurs en fonction des stimuli qui engagerait l'une ou l'autre modalité : ainsi, l'activation directe du récepteur MRGPRA3 (récepteur de la chloroquine) enclencherait la transmission d'un signal pruriceptif, tandis que l'activation des récepteurs P2X présents sur ces mêmes neurones enclencherait la transmission d'un signal nociceptif. De manière intéressante, la délétion des canaux TRP spécifiquement dans ces neurones bloque la pruriception, mais pas la nociception. Cela indiquerait ainsi des différences dans l'implication des TRP, associés généralement aux modalités thermique et chimique, en fonction des sous-types de neurones sensoriels dans lesquels ils sont exprimés.

Pour finir, d'autres études de transcriptomique ont été réalisées ces dernières années, chacune apportant de nouveaux marqueurs moléculaires, et de nouvelles classifications de sous-populations neuronales. Ainsi, les travaux du laboratoire de Xu Zhang publiés en 2016 ont identifié quant à eux 17 sous-types de neurones sensoriels, grâce à des techniques de « high-coverage single-cell » (Li et al., 2016). Les datas obtenues ont ensuite été comparées et corrélées non seulement à la taille des neurones analysés, aux marqueurs déjà identifiés dans les précédentes classifications par des techniques de co-marquage par immunofluorescence ou double hybridation *in situ*, mais également au phénotype de ces neurones, et en particulier à leurs réponses respectives suite à différents stimuli. Dans la majorité, ces résultats confirment les résultats obtenus précédemment, mais il est cependant difficile d'associer ces nouvelles sous-populations neuronales décrites à celles identifiées précédemment, notamment par la différence dans les marqueurs moléculaires spécifiques sélectionnés par chacune de ces études pour chacune des sous-populations.

Enfin, une étude encore plus approfondie, à nouveau réalisée par de Linnarsson et Ernfors en 2018, de l'ensemble du système nerveux a permis de classifier les cellules qui le composent en fonction non seulement de leur type (neurones, cellules immunitaires, ...), de leur localisation précise, mais aussi de leur origine développementale, et des marqueurs moléculaires qu'elles expriment (Zeisel et al., 2018). Les techniques de séquençage et d'analyse employées dans cette étude ont permis également d'identifier 17 sous-populations différentes de neurones sensoriels, qu'ils ont comparé à leur précédente classification (figure 4). Entre ces deux classifications, on passe de 5 à 3 populations neurofilament-positives, de 3 à 6 sous-populations non-peptidergiques (incluant la population TH, « Tyrosine Hydroxylase »), et de 2 sous-populations peptidergiques à 8 différentes, parmi lesquelles on peut noter l'apparition de 3 nouvelles sous-populations exprimant TRPM8. Ces dernières pourraient correspondre plus

spécifiquement aux fibres C codant pour le froid, qui étaient difficilement associables avec les sous-populations de la classification précédente.

Par leur complémentarité, ces différentes études offrent donc un panel important de marqueurs moléculaires permettant de discriminer, visualiser ou marquer les différentes sous-populations qui existent au sein des neurones sensoriels en condition physiologique. Associées aux caractéristiques anatomiques et électrophysiologiques déjà décrites plus haut, ces données permettent d'établir un profil complet de chaque type de neurones sensoriels. Cependant, harmoniser et interpréter toutes ces classifications employant divers critères et méthodes s'avère être un exercice très difficile. Ainsi, un travail très important reste à faire afin d'associer et confirmer toutes ces données entre elles. De plus, toutes ces caractérisations ayant été faites en condition physiologique, il est également important de prendre en compte que des remaniements sont possibles en condition pathologique.

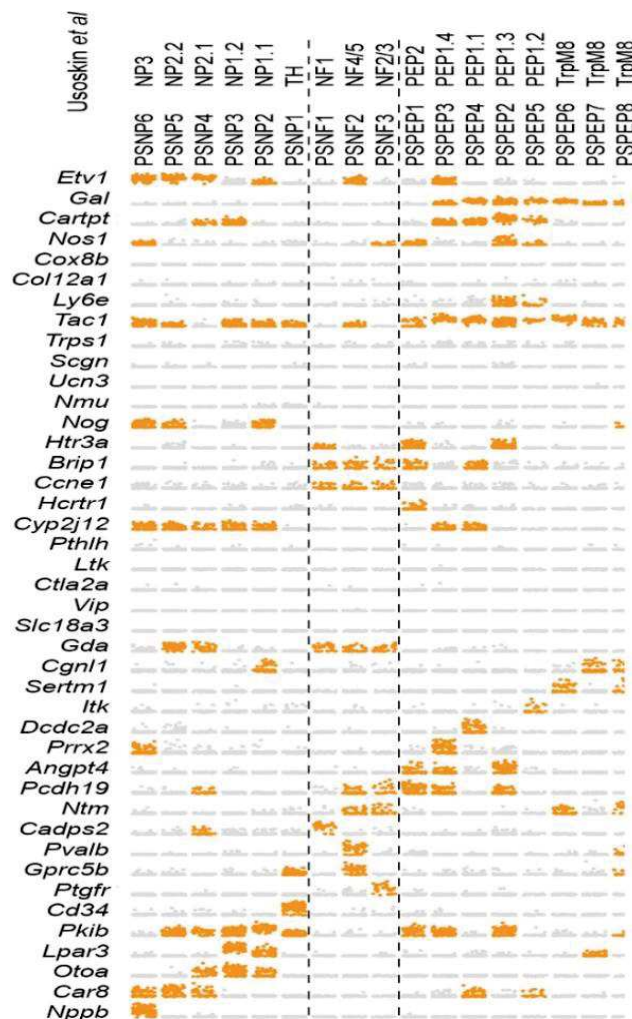


Figure 4. Classification moléculaire des neurones sensoriels, 2018

Expression de différents gènes dans les sous-populations de neurones sensoriels périphériques telles que définies par Usoskin et al. (Ligne du haut), et Zeisel et al. (Ligne du bas).

Zeisel et al., 2018

III. Le système nerveux central

1. La Moelle Épinière

1.1. Architecture

La moelle épinière est le premier relais lors de la transmission des informations sensorielles provenant des neurones de premier ordre. De plus, c'est un important centre d'intégration, qui module à la fois les informations sensorielles provenant de la périphérie et qui sont ensuite transmises aux différentes structures cérébrales *via* différentes voies ascendantes, mais également les informations motrices et sensorielles provenant des structures supraspinales *via* différentes voies descendantes. On distingue au sein de la moelle épinière la substance blanche, composée de fibres neuronales myélinisées, et la substance grise, comprenant les corps des différents types cellulaires (interneurones, motoneurones, cellules gliales) de la moelle épinière. Cette substance grise est elle-même divisée en différentes laminae (figure 5) : les **laminae I à VI**, qui constituent la **corne dorsale**, les **laminae VII à IX** qui composent la **corne ventrale**, et la **lamina X** au niveau du **canal central** de la moelle épinière, reliant les deux parties de la moelle (Rexed, 1952).

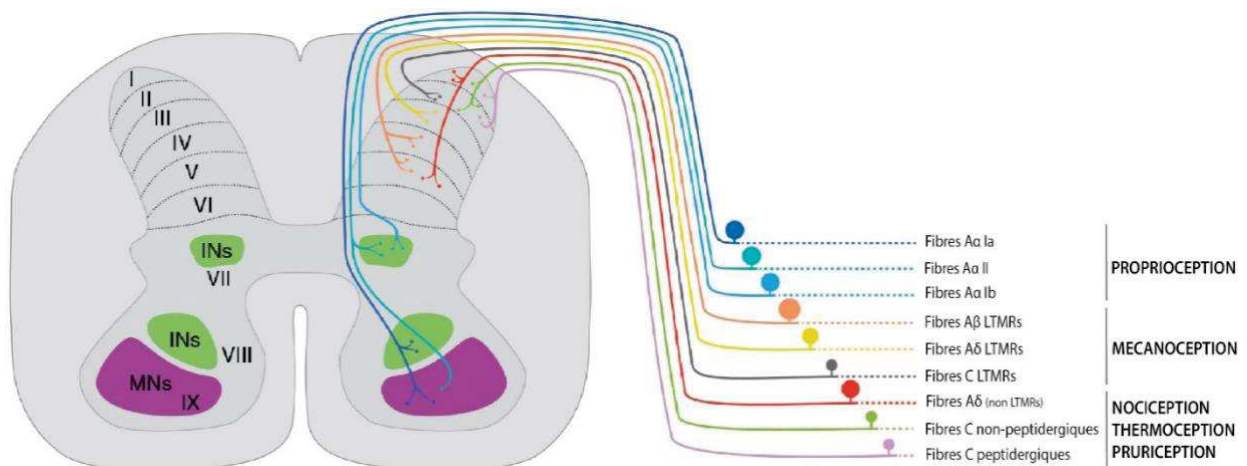


Figure 5. Représentation des projections spinales des différents neurones sensoriels

Les neurones sensoriels périphériques projettent dans différentes laminae de la corne dorsale de la ME (laminae I à V principalement), en fonction de la modalité transmise.

Adapté de Lallemand et al., 2012

Il est à noter qu'il peut exister des différences dans la morphologie et les caractéristiques de la substance grise, en fonction du niveau anatomique de la moelle épinière et de l'espèce étudiés. En effet, on divise la moelle épinière en différents niveaux (cervicaux, thoraciques, lombaires, sacrés et coccygiens), dont le nombre diffère selon l'espèce, et reçoivent les projections nerveuses de différentes parties du corps. La lamina VI illustre bien les variations anatomiques qu'il peut exister en fonction du niveau. C'est la couche la plus basale de la corne dorsale et elle n'est présente que dans certaines sections de la moelle épinière (cervicales, lombaires et sacrées).

Dans ce chapitre, l'architecture et les différents types neuronaux composant la corne dorsale lombaire de la souris seront donc plus particulièrement décrits. En effet, c'est principalement la corne dorsale qui reçoit les innervations des neurones de premier ordre, elle est donc plus particulièrement impliquée dans la modulation et la transmission des différents signaux somesthésiques (Brown, 1982). La corne ventrale quant à elle est plus impliquée dans le contrôle moteur et ne sera donc que très peu abordée dans le cadre de ma thèse.

De façon plus précise, chaque type de neurones sensoriels va innover des laminae bien spécifiques de la corne dorsale (figure 5 et 6) (Lallemend et al., 2012) :

- La quasi-totalité des fibres **thermo-, pruri- et nociceptives** (qu'elles soient de type A β , A δ , ou C) projettent au niveau des couches superficielles de la corne dorsale, correspondant aux laminae **I** et aux 2 subdivisions les plus externes parmi les 3 composant la lamina **II** (**IIo** pour « outer lamina **II** », et **IIid** pour « dorsal part of inner lamina **II** »).
- A l'inverse, les laminae **IIiv** (« ventral part of inner lamina **II** ») à **V**, correspondant aux couches profondes de la moelle épinière dorsale, reçoivent les informations des différentes fibres **mécanoréceptrices**. En particulier, les A β -LTMRs vont projeter dans toutes ces différentes couches, tandis que les fibres A δ - et C-LTMRs projettent dans la lamina **IIiv**. Seule exception, une partie des fibres A δ nociceptives projette également dans la lamina **V**.
- Enfin, la lamina **VI** ne reçoit pas de projections des fibres A β , A δ , ou C, et semble être plus impliquée dans la transmission de l'information **proprioceptive**, tout comme certaines laminae de la corne ventrale.

Il ressort donc la présence d'une organisation fonctionnelle bien précise de la corne dorsale, où l'intégration des informations mécaniques, proprioceptives, et thermiques ou nociceptives n'impliquent les mêmes populations spinales.

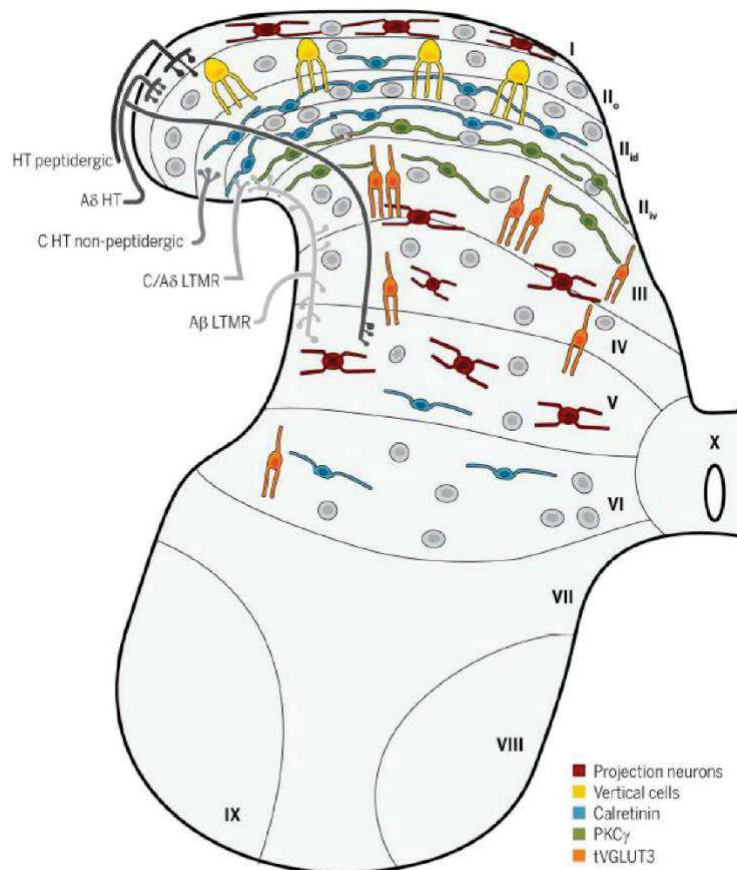


Figure 6. Organisation des neurones somatosensoriels au sein des laminae de la moelle épinière dorsale

Représentation des projections centrales des différents sous-types de neurones sensoriels au sein des laminae de la corne dorsale, et des différents sous-types d'interneurones spinaux exprimés dans chaque lamina.

Peirs et al., 2017

En plus de recevoir les projections de différents types de fibres de façon spécifique, chaque lamina est également caractérisée au niveau anatomique par la morphologie distincte des neurones qui les composent (Maxwell et al., 2007).

Ainsi, au niveau de la **lamina I**, on peut distinguer 3 types de neurones différents selon leur morphologie : des neurones **fusiformes**, **pyramidaux**, ou **multipolaires**.

Au niveau de la lamina II, on distingue cette fois 4 types morphologiques différents (figure 7):

- Les **cellules verticales** exclusivement situées dans la lamina **IIo**

- Les **cellules radiales** situées à la jonction des laminae **IIo** et **IIid**
- Les **cellules centrales**, situées dans la lamina **III**, et qui possèdent une arborisation s'étendant au niveau des autres laminae
- Les **cellules îlots**, présentes dans l'entièreté de la **lamina II**

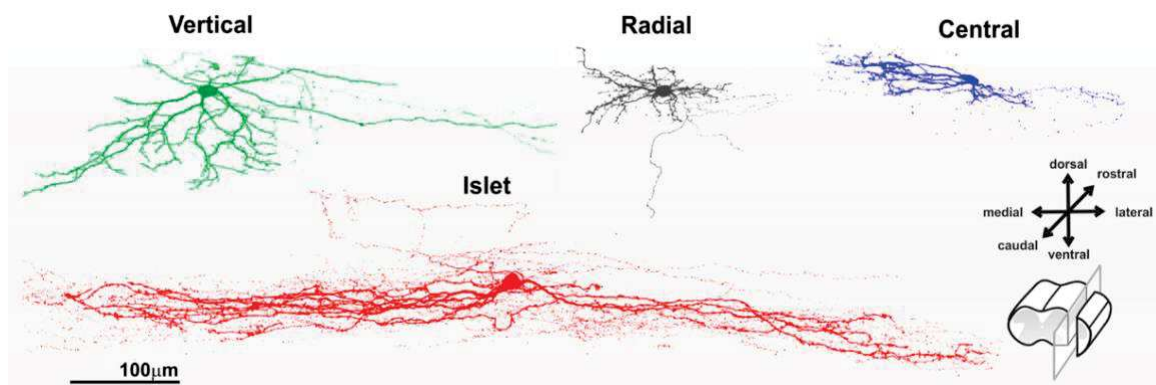


Figure 7. Morphologie des neurones spinaux de la lamina II

On distingue quatre types de neurones spinaux en sein de la lamina II en fonction de leur morphologie, les cellules verticales (vert), les cellules radiales (noir), les cellules centrales (bleu) et les cellules îlots (rouge).

Peirs et al., 2020

Enfin, les interneurones composant chacune des laminae III à V sont difficilement dissociables et possèdent une arborisation importante s'étendant dans les trois laminae, voire même au niveau ventral.

En revanche, si ces différentes morphologies correspondent généralement à des propriétés électrophysiologiques distinctes, il n'est cependant pas possible d'identifier un rôle fonctionnel des neurones spinaux par leur morphologie, à l'exception des cellules îlots. En effet, on distingue au niveau fonctionnel trois types majeurs de neurones au sein de la moelle épinière : les **neurones de projections** (qui seront abordés plus en détail dans la partie 2), les **interneurones excitateurs**, et les **interneurones inhibiteurs**. Ces deux dernières populations sont dissociées des neurones de projection par le fait que leur axone est entièrement situé au sein de la moelle épinière. Ce sont ces interneurones qui vont réguler de façon positive ou négative respectivement, les différents influx somesthésiques et notamment nociceptifs arrivant au niveau spinal. Parmi ces trois types, les cellules îlots correspondent exclusivement à des interneurones inhibiteurs.

1.2. Classification des neurones spinaux

Toutes les projections centrales des neurones sensoriels forment une synapse dans la moelle avec les différentes populations de neurones spinaux, et notamment avec les différents interneurons. De manière similaire aux neurones de premier ordre, on peut classer ces interneurons en fonction de différents critères et notamment en fonction du type de neurotransmetteurs qu'ils libèrent. Ceci permet ainsi de distinguer la population d'interneurones excitateurs de celle d'interneurones inhibiteurs (Peirs et al., 2020).

En s'appuyant sur ce paramètre pour les différencier, une étude transcriptomique des populations spinales réalisée également par le groupe de Linnarsson et Ernfors en 2018, a ensuite raffiné cette classification en 15 sous-types différents de neurones spinaux excitateurs, et 15 sous-types de neurones spinaux inhibiteurs, par les différents marqueurs moléculaires exprimés dans chacune de ces sous-populations (Håring et al., 2018). De plus, en dehors de ces neurotransmetteurs, certains facteurs de transcription ont également pu être associés à une majorité de neurones excitateurs, ou inhibiteurs, permettant leur labellisation globale au sein de la corne dorsale (Lai et al., 2016).

Ainsi, les **populations excitatrices** libèrent toutes du glutamate, et expriment le transporteur vésiculaire du glutamate **VGLUT2** (Todd et al., 2003). Dans la classification d'Ernfors, les 15 sous-populations glutamatergiques identifiées sont nommées de Glut1 à Glut15, avec différents marqueurs spécifiques (figure 8).

De plus, on peut citer deux facteurs de transcription généralement utilisés pour marquer les neurones excitateurs :

- *Tlx3*, nécessaire dans l'expression des différents neuropeptides excitateurs cités plus hauts, et notamment ceux impliqués dans la transmission du message nociceptif. On le retrouve ainsi plus dans les couches superficielles.
- *Lmx1b*, impliqué dans le développement des différents interneurons excitateurs de la corne dorsale, et exprimé au niveau de toutes les laminae.

Les **populations inhibitrices** sont quant à elles plus hétérogènes au niveau de leur neurotransmetteur principal, mais libéreraient dans leur majorité du GABA (γ -aminobutyric acid), exprimant ainsi le transporteur vésiculaire du GABA, **VGAT**. Le laboratoire d'Ernfors a classifié les 15 sous-populations GABAergiques identifiées de GABA1 à GABA15, également avec différents marqueurs spécifiques (figure 8). Cependant, il est important de noter que cette

analyse s'étant focalisée uniquement sur les interneurons exprimant VGLUT2 ou VGAT. Hors, si les interneurons inhibiteurs des laminae I à III libèrent bien majoritairement du GABA, on sait également que les interneurons inhibiteurs des laminae III à V libèrent majoritairement de la glycine et expriment le transporteur de la glycine **glyT2**, certains d'entre eux ne libérant pas de GABA (Inquimbert et al., 2007). Enfin, différentes études ont également montré une population inhibitrice **cholinergique** au sein des laminae III-IV jouant un rôle dans la modulation de signaux sensoriels. Il est donc possible que certaines populations inhibitrices non GABAergiques n'apparaissent pas dans cette analyse.

Enfin, il existe également un facteur de transcription semblant impliqué dans l'expression de tous les interneurons GABAergiques et glycinergiques, et pouvant ainsi être utilisé pour identifier de façon globale la grande majorité des interneurons inhibiteurs : le facteur de transcription *Pax2*.

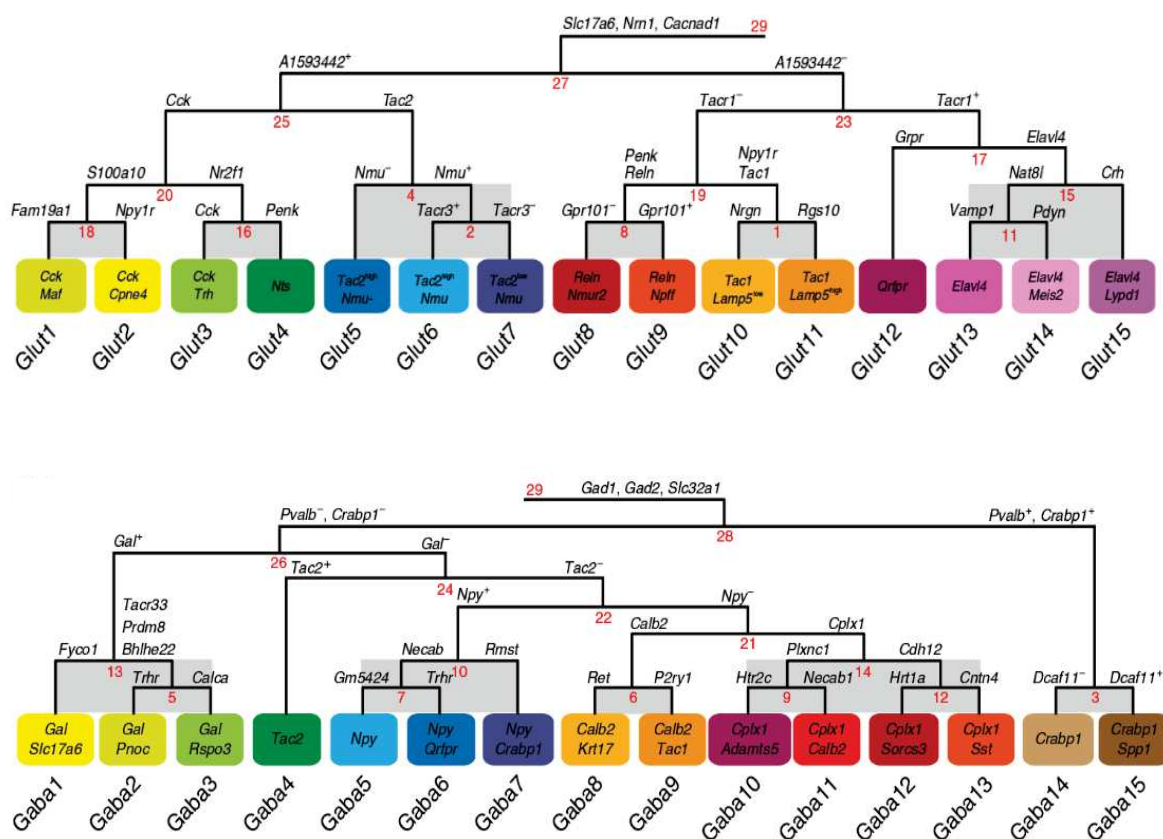


Figure 8. Représentation des 15 sous-types de neurones spinaux glutamatergiques et GABAergiques, et leurs marqueurs spécifiques

En fonction des marqueurs qu'ils expriment, les neurones spinaux excitateurs (panel du haut) et inhibiteurs (panel du bas) peuvent chacun être distingués en 15 sous-types différents, nommés Glut1 à Glut15, et Gaba1 à Gaba15 respectivement. Les marqueurs spécifiques à chaque sous-type sont indiqués dans la case colorée correspondant au sous-type.

Häring et al., 2018

D'autres études ont quant à elles choisi de réaliser une caractérisation ciblée par lamina, en prenant compte à la fois de la morphologie, du neurotransmetteur libéré et des marqueurs moléculaires exprimés, apportant ainsi des informations complémentaires sur l'organisation générale de la corne dorsale, et des caractéristiques des interneurons excitateurs et inhibiteurs composant chaque lamina.

En revanche, tout comme pour les neurones sensoriels, il peut s'avérer difficile de relier les différentes caractérisations provenant de toutes ces études, notamment car des différences peuvent exister en fonction des paramètres de classification choisis, de l'âge ciblé, et de la précision des méthodes employées (Russ et al., 2021). Un dernier facteur limitant dans la réunification des résultats obtenus suite aux nombreuses études de caractérisation, est la variation d'expression inter-espèces. En effet, ces différentes études morphologiques, électrophysiologiques, ou moléculaires, se sont focalisées chacune sur différentes espèces, notamment la souris, le rat, le chat, ou encore des primates humains ou non-humains. En comparant ces études entre elles, on peut noter des divergences importantes, soit en terme de marqueurs moléculaires exprimés, ou dans la répartition des différents sous-types neuronaux.

Même s'il faut tenir compte de tous ces biais, ces études ont tout de même permis une caractérisation bien précise au niveau des marqueurs moléculaires et de la caractérisation fonctionnelle des différents types d'interneurones, et en fonction des laminae. En particulier, on distingue différentes sous-populations spécifiques des laminae I, II, ou III à V (Peirs & Seal, 2016). Un tableau récapitulatif de ces différentes sous-populations d'interneurones excitateurs et inhibiteurs présents dans chaque lamina, et de leurs marqueurs d'intérêt, est disponible ci-dessous (table 2). De façon générale, ces marqueurs sont chacun spécifiques d'une sous-population neuronale distincte au sein de chaque lamina, bien que certaines sous-populations expriment plusieurs de ces marqueurs à la fois. C'est le cas par exemple dans la lamina II, où certains neurones n'expriment que la PKC γ ou que la CCK, tandis que d'autres expriment les deux. En revanche, on remarque qu'il existe très peu de marqueurs spécifiques d'une seule lamina, et encore moins spécifiques seulement des populations inhibitrices ou excitatrices de chacune d'entre elle. Cela ajoute une difficulté dans l'étude et la caractérisation précise des différents interneurons spinaux, où différents co-marquages sont souvent nécessaires pour discriminer avec précision le type d'interneurone étudié.

Lamina	Type d'interneurones	Neurotransmetteur(s) libéré(s)	Différentes sous-populations neuronales
I	Excitateurs	Glutamate	PKC γ (8% des neurones totaux de la lamina I), Dyn, cGRP, CR, PV, substance P, Penk
	Inhibiteurs	GABA	Dyn (50% des neurones Dyn totaux de la lamina I), NPY, nNOS
II	Excitateurs	Glutamate	NTS (9% des interneurones excitateurs de la lamina II), substance P (24%), NKB (14%), cGRP (15%), CCK (7%), NPFF (6%), SST, Dyn, Penk
	Inhibiteurs	GABA (majoritaire), et/ou glycine (minoritaire)	Dyn, NPY, nNOS, CR, PV
III à V	Excitateurs	Glutamate	VGLUT3, CCK, SST, PKC γ , ROR α/β
	Inhibiteurs	Glycine (majoritaire) et/ou GABA (minoritaire) et/ou acétylcholine	Ret, ROR β , CDH3, PV, nNOS

Table 2. Bilan des différents types fonctionnels d'interneurones spinaux par lamina et leurs caractéristiques moléculaires

Dyn=dynorphine, CR=calretinine, Penk=Préenkephaline, nNOS=neuronal Nitric Oxyde Synthase, NTS=neurotensine, NKB=neurokinine B, CCK=cholecystokinine, NPFF=neuropeptide FF, CDH3=cadhérine 3, ROR=RAR-related orphan receptor

Enfin, on peut également identifier chaque lamina de façon globale par l'utilisation des marqueurs moléculaires abordés dans la partie II, associés à chaque sous-type de neurones sensoriels de premier ordre, et dont on sait qu'ils sont exprimés au niveau de leurs terminaisons centrales (figure 9). Cela apporte également des informations plus précises sur les projections des différents sous-types de fibres A δ , et C : par exemple, celles exprimant TRPM8 et associées ainsi plus à la sensation de froid semblent être spécifiques de la lamina I. A l'inverse, celles impliquées dans la transmission de l'information pruriceptive (MRGPRA3+) sont plus spécifiques de la lamina IIo, alors que les populations TRPV1+ codant pour le chaud projettent dans l'une et l'autre de ces laminae.

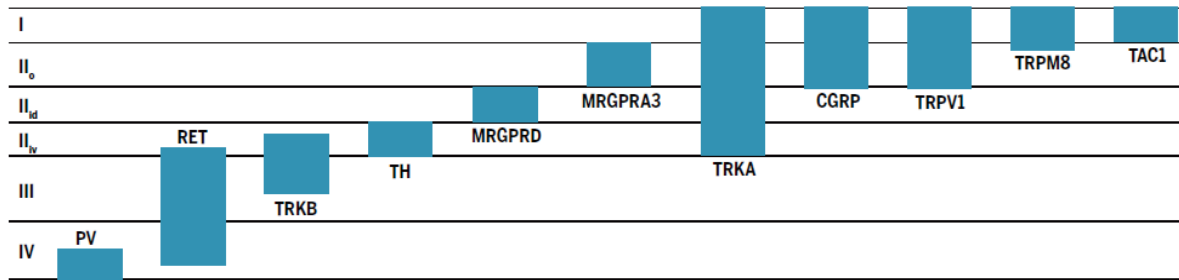


Figure 9. Expression des marqueurs moléculaires au niveau des terminaisons centrales des neurones sensoriels

Localisation des terminaisons centrales des différents sous-types de neurones sensoriels périphériques, classés en fonction des marqueurs moléculaires qu'ils expriment.

Peirs et al., 2017

1.3. Circuits neuronaux

Pouvoir caractériser de façon précise les différentes populations spinales, à la fois en fonction de leur localisation dans les différentes laminae et de leur rôle fonctionnel, représente donc encore à l'heure actuel un défi conséquent malgré des avancées importantes ces dernières années. Cette caractérisation est cependant nécessaire, afin notamment de pouvoir étudier de façon précise les connexions formées entre ces différents types d'interneurones, mais aussi avec les afférences primaires et les neurones de projection. En effet, comme mentionné précédemment, la moelle épinière représente un centre d'intégration très important des différentes modalités sensorielles, et les réseaux neuronaux formés par ces différentes connexions vont jouer un rôle important dans la modulation des différentes informations somatosensorielles (Peirs et al., 2017 ; Cordero-Erausquin et al., 2016).

En particulier, ces réseaux sont très étudiés dans le cadre de l'intégration et la modulation de l'information nociceptive, à la fois en condition physiologique, mais aussi dans un cadre pathologique, provoqué en partie par une dérégulation de ces réseaux (cf. chapitre III). En effet, les interneurones spinaux vont jouer un rôle important dans la modulation au cours du temps du signal nociceptif. Plus particulièrement, des interneurones inhibiteurs modulés par les afférences mécanoréceptives projetant dans les couches profondes, peuvent exercer un contrôle négatif sur le message nociceptif transmis au niveau des couches superficielles (figure 10). Cette modulation négative, décrite dès le milieu du XX^{ème} siècle, constitue la **théorie du**

« **gate-control** » (Melzack & Wall, 1965 ; Torsney & McDermott, 2006), et fait intervenir les différentes populations spinales peuplant chaque lamina.

Les fibres A δ et C nociceptives projetant dans les laminae I et II établissent des connexions synaptiques avec les neurones de projections situés dans la lamina I, soit directement, ou soit indirectement par le biais de différents interneurons excitateurs (cellules centrales et verticales glutamatergiques). L'activation de ces fibres conduit donc à l'excitation de ces interneurons et neurones de projection, et à une libération de glutamate. Un premier contrôle négatif de l'influx nociceptif est déjà présent à ce niveau, puisque les fibres nociceptives établissent également des synapses avec des interneurons inhibiteurs (cellules îlots GABAergiques et glycinergiques), qui vont exercer un rétrocontrôle négatif sur ces fibres, empêchant ainsi la transmission d'un signal nociceptif persistant, en condition physiologique (Koch et al., 2018).

Le deuxième contrôle de l'influx nociceptif, correspondant au « gate-control », est donc effectué par les fibres A β mécanoréceptrices projetant dans les laminae III à V. Elles établissent des connexions directes avec les cellules verticales glutamatergiques de la lamina II (tout comme les fibres nociceptives), elles-mêmes reliées aux neurones de projection, ou indirectes via un circuit composé de différents interneurons excitateurs glutamatergiques, dont certains appartiennent aux populations CR ou PKC γ . Enfin, les fibres A β sont également reliées à des interneurons inhibiteurs Dyn⁺ de la lamina IIo qui exercent un contrôle négatif sur les neurones de projection et sur les cellules verticales. Elles possèdent également des connexions avec les interneurons inhibiteurs PV dans la lamina III qui vont venir à la fois moduler l'activation des neurones PKC γ , et exercer un rétrocontrôle négatif sur les fibres A β elles-mêmes (Stachowski & Dougherty, 2021).

Ainsi, le circuit formé par ces différents interneurons excitateurs et inhibiteurs permet de prévenir (ou stopper) la transmission d'un signal nociceptif, en cas d'activation des fibres mécanoréceptives. En condition pathologique, et en particulier en cas de douleur chronique, il y aurait une perte de contrôle de ces interneurons inhibiteurs, provoquant une hypersensibilité mécanique en cas de stimulation tactile normalement non douloureuse (cf. chapitre III).

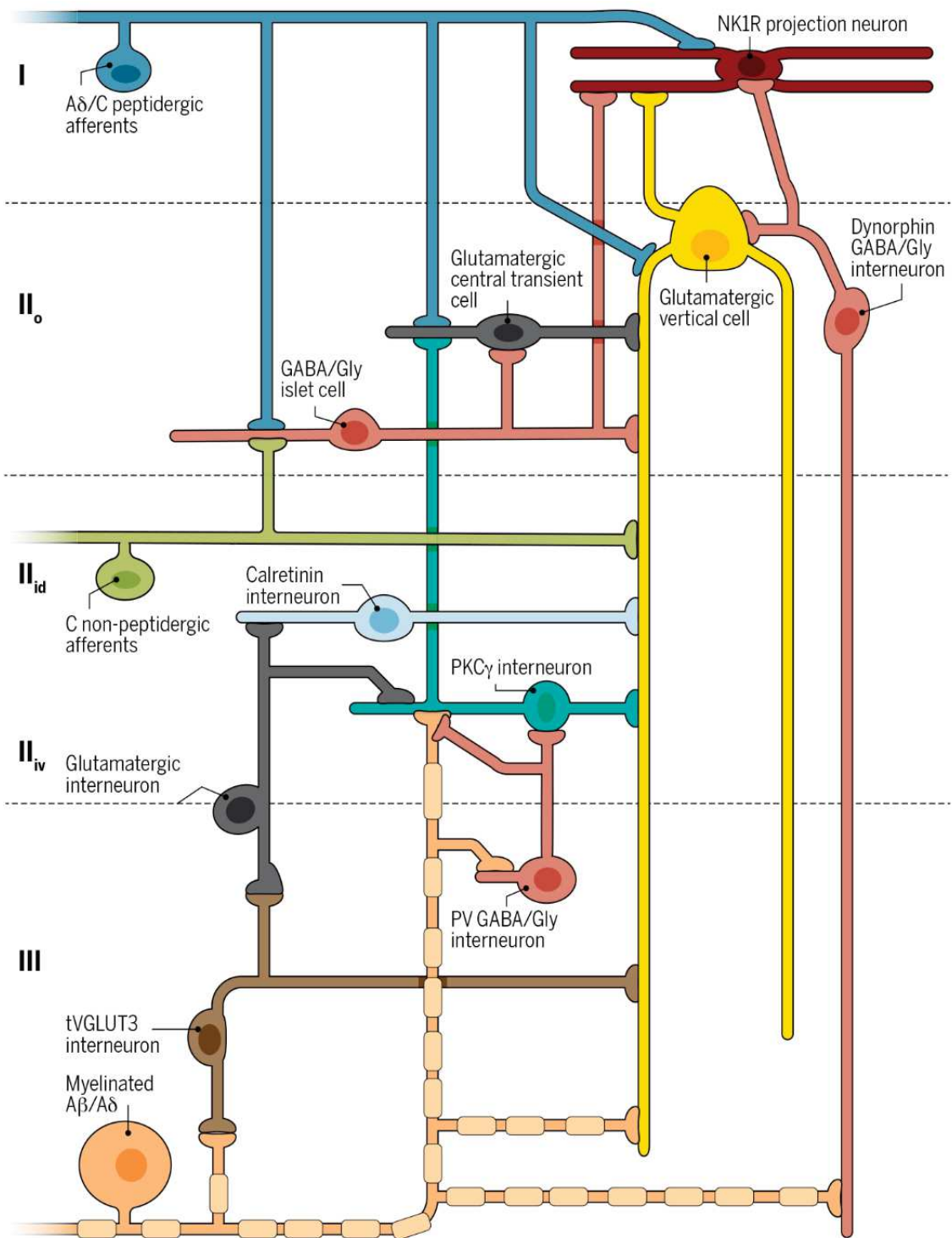


Figure 10. Réseau spinal des voies nociceptives et mécanoréceptives.

Les neurones sensoriels nociceptifs et mécanoréceptifs projettent au niveau de la lamina I et II à III respectivement. L'information nociceptive et mécanoreceptive est ensuite transmise au niveau des mêmes neurones de projection NK1R, directement ou indirectement via un réseau d'interneurones spinaux excitateurs et inhibiteurs, qui viennent moduler ces signaux.

Peirs et al., 2017

2. Les voies ascendantes

Comme il a été défini dans l'avant-propos, la douleur est une expérience résultant de l'intégration de trois composantes différentes : une **composante sensori-discriminative**, une **composante émotionnelle** et une **composante cognitive**. Ces différentes composantes sont dues aux nombreuses projections issues de la moelle, qui vont chacune transmettre les informations nociceptives à différentes structures cérébrales spécifiques, chacune étant responsable de l'intégration des différents aspects composant la douleur de manière spécialisée (Almeida et al., 2004).

Les différents neurones de projection (appelés également neurones de second ordre) situés dans la moelle épinière sont responsables de la transmission des informations sensorielles vers différentes structures cérébrales. La majorité de ces neurones est présent dans la lamina I (composant 5 à 10% des neurones spinaux de cette lamina), et sont généralement identifiés grâce au marqueur moléculaire NK1R (« neurokinin 1 Receptor ») (Al-Khater et al., 2008). Cependant, des neurones de projections sont également présents dans les laminae III à V en plus faibles proportions (1-2% des neurones des couches profondes), mais dont seulement un tiers exprime NK1R. L'identification de marqueurs moléculaires de ces populations est donc encore en cours aujourd'hui. Récemment, le facteur de transcription *Zic2* a par exemple été identifié comme étant exprimé par plusieurs neurones spinaux des couches profondes, dont certains neurones de projections. Ces neurones de projection *Zic2+* seraient plus particulièrement impliqués dans la transmission du toucher léger, et formant un réseau plus spécifique avec les A β -LTMRs (Paixão et al., 2019). En effet, il existe différents types de neurones de projections, chacun impliqué plus spécifiquement dans certaines modalités, bien que la plupart soient polymodaux. Ainsi, en fonction des neurones de projection, de leur implication dans la transmission des différentes modalités, et des structures vers lesquelles ils projettent, on distingue différentes voies, ou tractus, impliquées dans la transmissions des informations sensorielles. Ces différentes voies composent la voie antérolatérale de la moelle épinière.

La voie lemniscale (figure 11) transmet **l'information tactile** (notamment le toucher léger et les vibrations sur la peau), ou certains signaux proprioceptifs (Choi et al., 2020). Les neurones de projection composant cette voie ne sont situés que dans les couches profondes de la moelle épinière, et une décussation se fait au niveau du lemnisque médian du bulbe rachidien (donnant son nom à cette voie). Ces neurones traversent différentes structures, en particulier les

formations réticulées bulbaires et pontiques, avant de d'atteindre le noyau ventro-latéro-postéral du thalamus. Ici, ces neurones forment une synapse avec des neurones projetant vers les cortex somesthésiques 1 et 2 (on les nomme ainsi neurones de troisième ordre), où les différentes informations sensorielles vont être intégrées. En particulier, ce sont les informations dites « sensori-discriminatives » qui sont intégrées via cette voie-là, c'est-à-dire la localisation, la temporalité, et l'intensité précise de ces signaux sensoriels. Les neurones de projection exprimant *Zic2* feraient ainsi partie de la voie lemniscale.

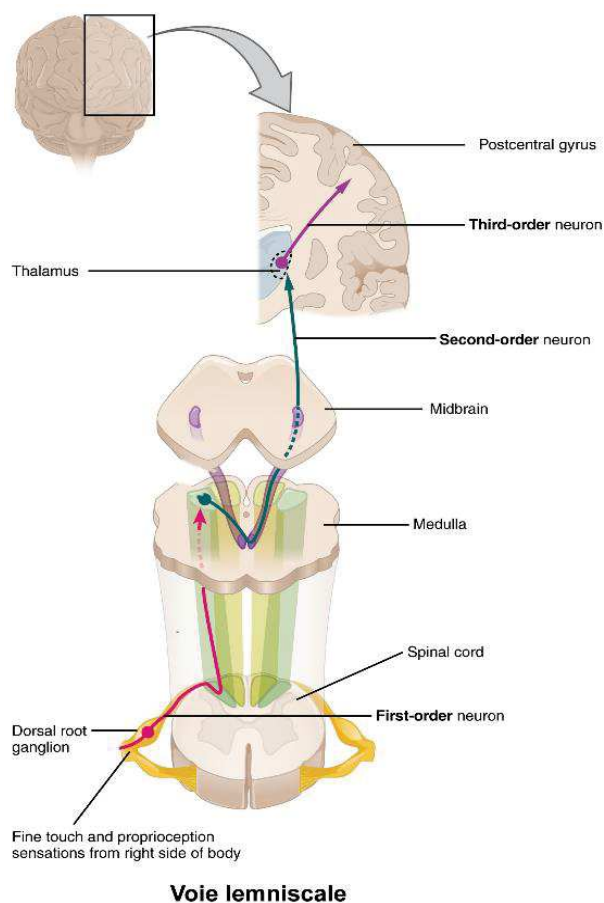


Figure 11. Représentation de la voie ascendante lemniscale
Adapté du site de l'Université publique de l'Oregon

Les neurones de projection responsables de la transmission de l'information nociceptive et thermique décussent au niveau de la commissure centrale de la moelle épinière vers la corne ventrale opposée, avant de projeter dans différentes structures supra-spinales. Comme décrit plus haut, les différentes voies engagées dans la transmission de la nociception correspondent aux différentes composantes de la douleur (figure 12) (Irvine & Clark, 2017).

Le **tractus spino-thalamique**, impliquant majoritairement des neurones de projections de la lamina I, IV ou V, est responsable de la transmission des informations **thermoceptives** et **nociceptives** provenant des fibres afférentes C qui projettent dans la lamina I, et A δ qui projettent dans les laminae I et V. Certaines **informations tactiles** relayées par ces mêmes fibres sont également transmises *via* ce tractus (notamment le toucher franc, et les pressions exercées sur la peau). On distingue deux voies parallèles et difficilement dissociables parmi ce tractus, **la voie spinothalamique latérale** plus impliquée dans la transmission des informations nociceptives et thermiques, et **la voie spinothalamique antérieure** pour l'information tactile.

Certains neurones de projection des laminae I et V forment quant à eux des terminaisons synaptiques aux niveau des formations réticulées du tronc cérébral, et sont plus spécifiques de l'information nociceptive. En fonction des terminaisons effectuées dans le tronc cérébral, différentes voies sont ensuite engagées :

- A partir de la formation réticulée, des neurones de troisième ordre projettent vers les noyaux composant le thalamus ventro-postéro-médian (de façon semblable à la voie spinothalamique). Enfin, à partir du thalamus, des neurones de quatrième ordre transmettent finalement **l'information nociceptive** de façon diffuse dans le cortex et le système limbique. Ce réseau constitue **la voie spinoréticulaire**, qui serait plutôt impliquée dans la perception consciente de la douleur, dans la mise en place d'un état d'alerte, ou encore dans l'éveil suite à des stimuli nociceptifs lors du sommeil.
- Certains neurones forment quant à eux des terminaisons synaptiques au niveau de la substance grise périaqueducale (PAG), ou au niveau de la moelle rostroventromédiale (RVM), entre autres. De là, des neurones projettent vers le thalamus, puis les cortex somesthésiques, de façon similaire au tractus spinothalamique. Ils constituent **la voie spinomésencéphalique**, et participent à **l'aspect sensori-discriminatif** de la douleur. De ces deux structures, d'autres neurones projettent également à nouveau dans la moelle épinière, constituant différentes voies descendantes qui vont moduler les signaux sensoriels.
- D'autres neurones de projection forment des terminaisons synaptiques avec le noyau parabrachial latéral du pont (ou IPBN), formant **la voie spinoparabrachiale** (non représentée sur la figure 12). De là, des neurones de troisième ordre transmettent

l'information vers l'amygdale notamment, ou encore le cortex cingulaire. Cette voie est plus spécifique de **la composante émotionnelle** de la douleur.

Il faut aussi noter qu'il existe d'autres voies ascendantes, plus impliquées dans la transmission des informations proprioceptives, et qui font intervenir majoritairement des neurones de projection situés dans la corne ventrale.

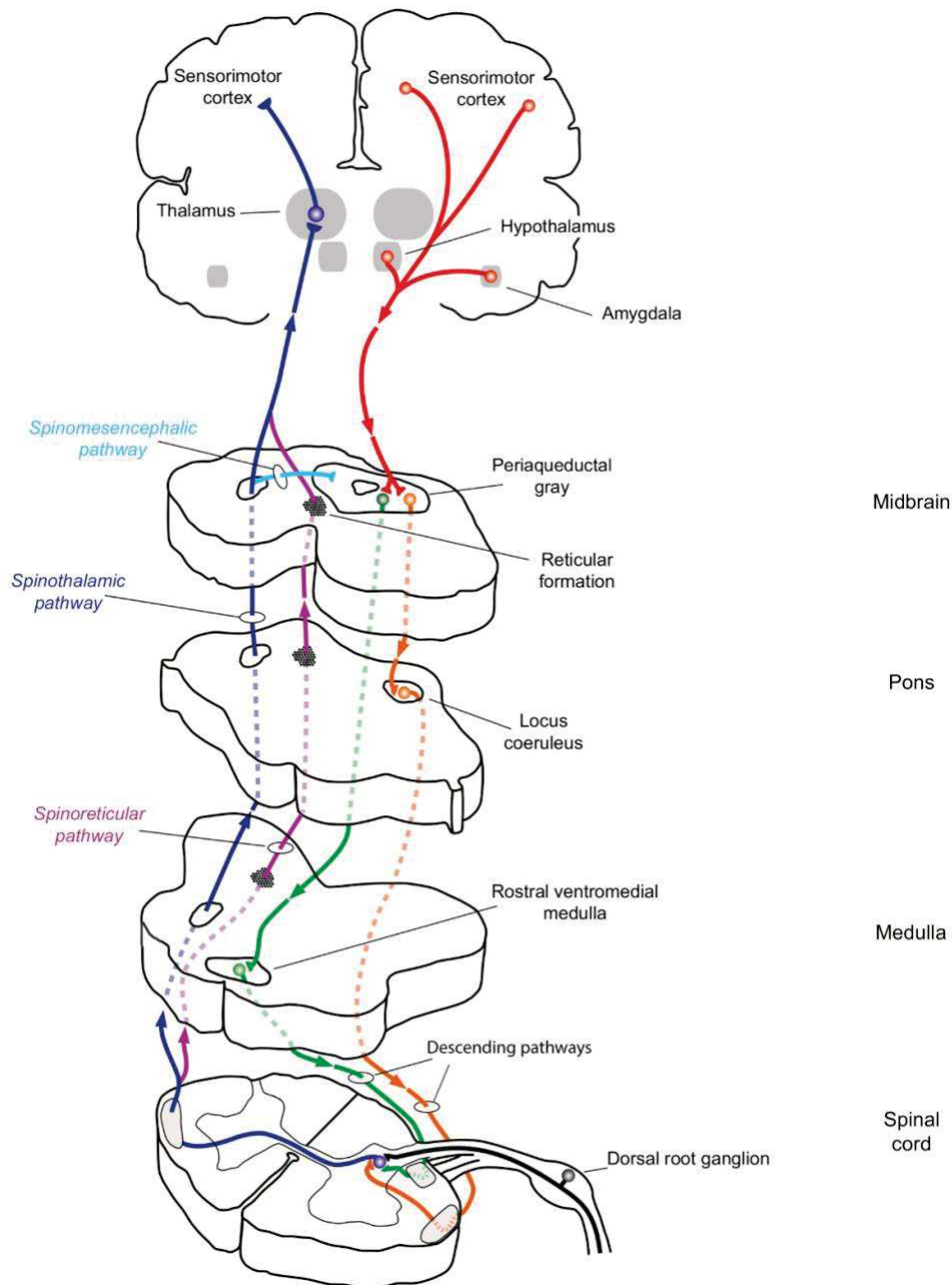


Figure 12. Représentation des voies ascendantes transportant l'information nociceptive

Représentation des voies spinothalamique (bleu), spinoréticulaire (violet), spinomésencéphalique (cyan), ainsi que des voies descendantes (vert et orange) transmettant et modulant l'information nociceptive.

Adapté de Irvine & Clark, 2017

3. Intégration supra-spinale

De nombreuses structures cérébrales, notamment celles innervées par les différentes voies ascendantes décrites dans le paragraphe précédent, sont impliquées dans l'intégration et la modulation des différents signaux somesthésiques provenant de l'entièreté de l'organisme, et en particulier de l'influx nociceptif. Ces structures peuvent donc être impliquées plus particulièrement dans la composante sensori-discriminative de cet influx, ou dans les composantes émotionnelles et cognitives. Mais on peut noter que c'est aussi vrai dans une moindre mesure pour les autres modalités sensorielles, dont la perception sensorielle peut également être modulée positivement ou négativement par le contexte, l'état d'esprit et les émotions ressenties au moment du stimulus.

Etant donné la complexité des réseaux impliqués dans l'intégration de ces différentes composantes pour chaque modalité sensorielle, cette partie se focalisera sur une description non exhaustive des structures principales impliquées dans l'intégration du signal nociceptif, et qui constituent la « matrice douloureuse » (figure 13). La plupart de ces structures jouent également un rôle similaire dans l'intégration et la modulation des informations thermiques ou tactiles non-nociceptives, bien qu'impliquant généralement des sous-populations neuronales différentes au sein de ces structures, et spécifiques à chaque modalité.

Ainsi, le thalamus, l'amygdale, les cortex somesthésiques S1 et S2, la PAG, ou encore les cortex insulaire et cingulaire antérieur (ACC) et le IPBN, peuvent tous être cités comme des structures importantes dans l'intégration du signal nociceptif (Mercer Lindsay et al., 2021).

Le **thalamus** est un relais important dans toutes les modalités sensorielles, somesthésiques ou non. C'est d'ailleurs illustré dans le cadre de la somesthésie par le nombre de neurones de second ordre des différents tractus qui forment des terminaisons synaptiques au sein du thalamus. Celui-ci relayant ensuite ces informations à la fois au niveau du système limbique et dans les différents cortex, il est donc impliqué dans les trois composantes de la douleur (Yen et Lu, 2013). En plus d'être un relais principal vers les autres structures de la matrice douloureuse, c'est également un des premiers centres d'intégration du message nociceptif, et notamment de sa composante sensori-discriminative. C'est ainsi au niveau du thalamus que sont intégrées les informations sur la temporalité, l'intensité, et la localisation précise au niveau tégumentaire du signal nociceptif.

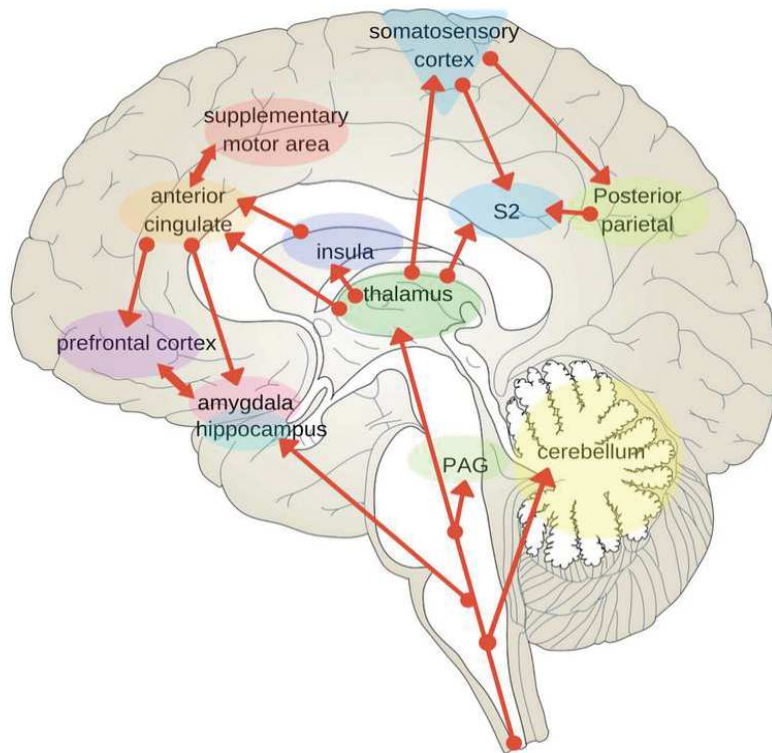


Figure 13. Représentation des structures cérébrales faisant partie de la matrice douloureuse
Bright Brain Center, London

D'un point de vue anatomique et fonctionnel, on remarque que les différents noyaux composant chaque partie du thalamus sont chacun impliqués dans l'intégration ou le relais des différentes modalités de façon très précise. Notamment, le noyau ventral postérieur médial, le noyau ventral postérieur latéral, et le noyau postérieur du thalamus latéral, sont plus impliqués dans la composante sensori-discriminative de la douleur, à la fois dans son intégration et dans le relais de l'information vers d'autres structures tels que les cortex somesthésiques (Tang et al., 2009). A l'inverse, les noyaux intralaminaires et noyaux médians du thalamus dorsal sont quant à eux impliqués dans les composantes émotionnelles et cognitives, notamment de par les projections partant de ces noyaux vers l'amygdale ou l'ACC (Meda et al., 2019) Toutes les projections partant du thalamus sont des neurones glutamatergiques, modulés par d'autres neurones GABAergiques provenant de la « zona incerta » appartenant au pré-thalamus. Cette structure recevant elle-même des afférences sensorielles provenant de la moelle épinière, il est suggéré que ces neurones inhibiteurs ont un rôle similaire de « gate control » de l'information sensorielle, comme au niveau de la moelle.

Les **cortex somesthésiques 1 et 2**, recevant des projections issues principalement du thalamus, sont également un centre important de la composante sensori-discriminative (Liang et al., 2011). De par leur organisation somatotopique correspondant à chaque partie du corps, c'est en particulier dans ces structures que la localisation précise de l'origine du signal nociceptif est intégrée (en plus du thalamus capable de discriminer la localisation lorsque l'origine du signal est au niveau tégumentaire). En particulier, les neurones des couches 2 et 3 du cortex S1 seraient plus particulièrement impliqués dans l'analyse des textures, de la dynamique et dans une moindre mesure de l'intensité des stimuli (notamment cutanés), et différents neurones seraient responsables de l'intégration des informations nociceptives, par rapport aux autres informations non-nociceptives (Tan & Kuner, 2021). Le cortex S2 serait quant à lui plus spécialisé dans l'intégration de l'intensité du stimulus. En revanche, ces cortex ne jouent aucun rôle dans les autres composantes de la douleur, et leur ablation partielle ou totale n'engendre qu'un défaut dans la capacité à identifier l'origine spatiale du message douloureux, sans bloquer l'intégration du message en lui-même (Uhelski et al., 2012).

Tout comme le thalamus, le **cortex insulaire** est quant à lui impliqué dans les différentes composantes, avec une délimitation bien précise des parties impliquées dans la composante sensori-discriminative et celles impliquées dans les composantes émotionnelles et cognitives (Martucci & Mackey, 2018). De façon intéressante, il possède des connexions (afférentes et efférentes) avec la plupart des autres structures cérébrales de la matrice douloureuse, et est considéré comme le lieu de convergence de toutes les informations nociceptives intégrées par ces autres structures. C'est donc une structure primordiale dans la génération du message douloureux global. C'est d'ailleurs illustré par le fait que cette structure est la seule dont la stimulation directe est capable d'engendrer une douleur, et qui est quasi-systématiquement activée dans les différentes études d'imagerie fonctionnelle réalisées dans différents contextes douloureux.

L'**amygdale** est plus généralement associée à la composante émotionnelle et cognitive de la douleur, bien qu'elle joue également un rôle dans la composante sensori-discriminative (Pignatelli et Beyeler, 2019). Parmi les différents complexes de noyaux formant l'ensemble de l'amygdale, l'amygdale centrale et basolatérale sont notamment impliqués dans l'intégration des messages nociceptifs.

L'amygdale centrale est la partie recevant les projections issues du thalamus ou du IPBN, et est considérée comme étant « l'amygdale nociceptive ». Elle serait plus particulièrement

impliquée dans l'intégration de l'aspect sensoriel, et dans la régulation des réponses physiologiques autonomes suite à un signal nociceptif, et les comportements en réponse à des stimulations douloureuses (tels que le retrait de la partie du corps d'où provient le signal nociceptif) (Janak et al., 2015). A nouveau, il semblerait que différentes sous-populations de cette structure soient impliquées dans différentes composantes. Par exemple, une population GABAergique de l'amygdale centrale serait impliquée spécifiquement dans l'extinction de signaux nociceptifs lors d'une anesthésie (Hua et al., 2020). L'amygdale basolatérale est la partie particulièrement impliquée dans l'aspect aversif (notamment peur et anxiété) de la douleur, et de l'apprentissage résultant de cette aversion pour éviter par la suite de réitérer une expérience douloureuse (Corder et al., 2018). Elle est donc plus spécifique des composantes émotionnelle et cognitive. Elle possède également des connexions importantes avec les autres structures de la matrice douloureuse. C'est par la convergence des différentes informations intégrées dans ces structures (informations sur le contexte, le signal nociceptif en lui-même, et toutes les réponses émotionnelles induites), vers l'amygdale basolatérale que cet apprentissage peut se faire. Cette structure est également étroitement connectée à l'hippocampe et le cortex préfrontal dans les processus de mémorisation à long terme, issus de cet apprentissage généré.

L'ACC, recevant des afférences du thalamus, aurait un rôle similaire à l'amygdale basolatérale, en étant impliquée dans les effets émotionnels aversifs de la douleur, ainsi que dans des processus de potentialisation à long terme (LTP) participant à la mise en place d'un apprentissage après avoir été dans un contexte douloureux. Cependant, il existe une dichotomie importante en fonction des études d'imagerie fonctionnelle chez l'Homme : certaines observent son activation lors d'un contexte douloureux et qui jouerait un rôle dans la mise en place d'une aversion et d'une anxiété (voire de dépression dans un contexte pathologique), de manière similaire à différentes expériences d'électrophysiologie ou d'optogénétique réalisées chez le rongeur. En particulier, une hyperactivité des neurones situés au niveau des aires 24a et 24b de l'ACC, associée à une surexpression de la phosphatase MKP-1 (Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-1), seraient responsables de la mise en place d'une anxiodépression induite par la douleur (Fillinger et al., 2017 ; Barthas et al., 2017). A l'inverse, d'autres études observent son activation seulement après la mise en place de traitements contre la douleur, suggérant plutôt un rôle dans l'inhibition du signal nociceptif. Tout comme les autres structures, cela suggère fortement l'implication de différentes sous-populations et projections au sein de l'ACC (Mussio et al., 2020). Enfin, cette structure serait également impliquée dans les

phénomènes d'empathie, étant activée chez des patients lorsqu'ils observent une autre personne souffrir.

Pour finir, déjà évoqué plusieurs fois dans ce chapitre, le **IPBN** est également un acteur important dans l'intégration du signal nociceptif. Situé à la base du tronc cérébral, il constitue une interface importante entre les différentes projections des voies ascendantes, des voies descendantes, et des autres structures supraspinales de la matrice douloureuse. Parmi les différentes sous-populations neuronales composant le IPBN, il a été montré qu'une sous-population exprimant cGRP serait plus impliquée dans la composante aversive de la douleur, et notamment dans la génération d'un signal de danger et dans les comportements de peur et de fuite induits par la douleur (Campos et al., 2018). Une autre sous-population exprimant la substance P est quant à elle plus impliquée dans la génération d'un réflexe suite à un stimulus nocif. Enfin, une étude très récente a montré que la division dorsale de la IPBN, qui reçoit différentes afférences des neurones de projection, projette ensuite dans au niveau de l'hypothalamus et de la PAG et est plus particulièrement impliquée dans la génération du comportement de fuite (Chiang et al., 2021). De plus, l'activation de ces neurones suffit à provoquer une analgésie importante, en inhibant supposément l'activation de voies descendantes excitatrices issues de la PAG. La division externe de la IPBN est quant à elle impliquée dans la mise en place d'une mémoire aversive à la douleur, notamment *via* ses efférences vers l'amygdale. Une sous-population exprimant la dynorphine est nécessaire dans la transmission du signal nociceptif de la partie dorsale vers la partie externe de la IPBN, l'inhibition de cette sous-population étant suffisante pour bloquer la mise en place d'une aversion à la douleur. Enfin, de façon intéressante, la IPBN est capable de moduler négativement le signal nociceptif *via* l'intégration d'autres signaux biologiques nécessaires à la survie de l'organisme et entrant en compétition avec les messages douloureux. En particulier, des signaux de faim sont capables d'inhiber au cours du temps la composante émotionnelle de la nociception et les réponses comportementales induites par la douleur *via* des afférences provenant de l'hypothalamus est libérant NPY au sein du IPBN, tandis que les efférences du IPBN vers l'hypothalamus vont inhiber la sensation de faim pour prioriser la génération d'un message douloureux dans les premiers instants suivant la génération du message nociceptif (Alhadeff et al., 2018).

En plus de ces structures principales, on note également l'activation d'autres structures cérébrales telles que le **cervelet**, les **ganglions de la base**, ou le **cortex moteur**, qui pourraient

être impliqués non seulement dans les réponses motrices suite à l'intégration du signal nociceptif, mais également participer à l'intégration de la composante cognitive, dans certaines situations. C'est notamment le cas du cervelet, dont on sait qu'il reçoit des afférences de certains neurones de projection impliqués dans la transmission du signal nociceptif, et serait un des centres d'intégration de ce signal (Moulton et al., 2010). De plus, différentes études d'imagerie fonctionnelle chez l'Homme suggèrent également un rôle de cette structure dans l'aspect cognitif de la nociception, notamment dans des situations d'anticipation d'un événement douloureux, ou également dans les phénomènes de placebo ou nocebo, étroitement liés au circuit de la douleur (Zunhammer et al., 2021). Cependant, les mécanismes précis dans le cervelet participant dans la composante cognitive dans ces contextes restent encore à être élucidés.

On sait également que la **substance noire**, le **noyau Accumbens** (Nacc) et l'**aire tegmentale ventrale** (VTA), et de façon plus générale le système de récompense, régulés par des neurones dopaminergiques, jouent un rôle important dans les effets motivationnels dans un contexte de douleur (motivation à éviter les situations associées à une douleur, ou rechercher des moyens d'atténuer une douleur) (Markovic et al., 2021 ; Borsook et al., 2016).

Enfin, le **cortex préfrontal** et l'**hippocampe** déjà cités plus hauts sont également important, notamment dans la mémorisation à long terme des contextes associés à une douleur, pour plus tard éviter ces contextes.

4. Les voies descendantes

Suite à l'intégration au niveau supra-spinal des signaux somatosensoriels, les structures cérébrales de la matrice douloureuse sont capables de moduler de façon rétroactive l'activation des différents circuits neuronaux transmettant ces informations (en plus de générer différentes réponses motrices adaptées au contexte). Cette modulation se fait principalement au niveau de la moelle épinière, *via* différentes voies descendantes (Bannister & Dickenson, 2017). De telles voies ont été décrites pour la première fois par Basbaum and Fields (Basbaum & Fields, 1984). Ces voies seraient contrôlées par des cellules au niveau de la RVM. Ils ont en effet montré qu'au niveau du RVM il existait 3 types de populations « ON », « OFF », et « neutre ». Les 2 premières seraient à l'origine d'un contrôle descendant de la transmission nociceptive au niveau spinal. Les cellules ON seraient activées tandis que les cellules OFF inhibées suite à la présentation d'un stimulus nociceptif. L'activation des cellules OFF par la morphine permettrait

d'inhiber la transmission nociceptive. Une même structure modulerait ainsi la transmission au niveau spinale. Comme il a été décrit plus haut, ces voies descendantes sont issues du tronc cérébral, et en particulier de la PAG, qui reçoit d'importantes connexions d'autres structures cérébrales telles que l'amygdale, l'ACC ou le cortex préfrontal, ou de la voie ascendante spinomésencéphalique (Caston et al., 2020). La PAG est également située en amont de la RVM dans ces voies descendantes, et peut moduler son activité, bien qu'elle possède également des projections distinctes de la RVM. Enfin, on note aussi la présence de voies descendantes issues du IPBN (figures 12 et 14).

Ainsi, les neurones de ces voies descendantes pénètrent dans la moelle épinière majoritairement *via* le funiculus dorsolatéral (correspondant à la substance blanche entourant les laminae dorsales superficielles), et forment des connexions avec les différents interneurons inhibiteurs et excitateurs des laminae de la corne dorsale de la moelle épinière. Certains neurones des voies descendantes forment quant à eux des connexions synaptiques directement avec les terminaisons centrales des afférences primaires.

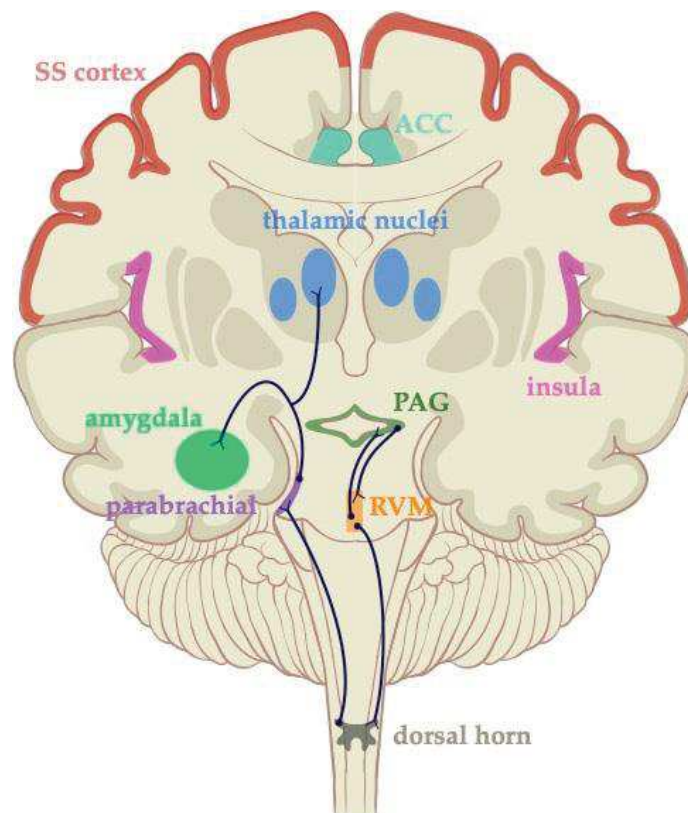


Figure 14. Représentation des principales voies descendantes, sous contrôle des structures cérébrales de la matrice douloureuse
Caston et al., 2020

Au niveau moléculaire et fonctionnel, on a longtemps distingué des neurones glutamatergiques, supposés faciliter la transmission des signaux somesthésiques, et notamment nociceptifs, de neurones GABAergiques supposés moduler négativement la transmission de ces signaux. Cependant, il apparaît maintenant que cette modulation est plus complexe, notamment du fait que certaines neurones GABAergiques innervent, et donc modulent négativement, certains interneurons inhibiteurs de la moelle épinière également, la levée de l'inhibition induite par ces interneurons résultant en une excitation (Lau & Vaughan, 2014). De plus, d'autres populations de neurones des voies descendantes vont libérer d'autres neurotransmetteurs, et notamment la sérotonine et la noradrénaline.

Le rôle excitateur ou inhibiteur de ces différentes sous-populations semble être déterminé non seulement par le neurotransmetteur libéré, mais également par le type de neurones qu'ils innervent, et les récepteurs exprimés en post-synaptique par ces neurones.

Ainsi, dans le cadre de la nociception, on sait notamment que les neurones sérotoninergiques, qui proviennent du noyau du raphé, peuvent être pro- ou anti- nociceptifs (Bardin, 2011). En effet, certains de ces neurones vont former des connexions synaptiques avec les terminaisons de fibres C exprimant TRPV1. Ces fibres expriment également le récepteur à la sérotonine 5-HT_{3A}, et leur activation va induire une sensibilisation, résultant en une hypersensibilité thermique au chaud. Paradoxalement, l'inhibition au niveau spinal de 5-HT_{3A} induirait également des effets pronociceptifs. A l'inverse, il semblerait que l'activation du récepteur 5-HT₇ au niveau spinal aurait un effet antinociceptif. La variation entre les effets pro- ou anti-nociceptifs pourrait donc être en partie expliquée par l'expression de différents types de récepteurs à la sérotonine au sein des neurones spinaux, et des voies de signalisation dépendantes de chacun de ces récepteurs.

De la même manière, deux sous-populations GABAergiques différentes ont été identifiées. La première, co-exprimant la proenkephaline (Penk), aurait un effet inhibiteur au niveau de la transmission de signaux thermoréceptifs au chaud, ou mécanoréceptifs. En revanche, l'activation d'une autre population GABAergique n'exprimant pas la Penk, serait celle responsable de l'inhibition de certains interneurons spinaux GABAergiques exprimant la Penk, résultant en une hypersensibilité mécanique (François et al., 2017).

En revanche, les neurones libérant la noradrénaline semblent avoir un effet inhibiteur uniquement. En effet, la libération de noradrénaline va activer en post-synaptique le récepteur α_2 , qui est couplé à la protéine G_i et présent dans les neurones de projections ou certaines afférences primaires, diminuant ainsi l'excitation neuronale de ces neurones. De même, cette

libération va activer le récepteur α_1 , couplé à la protéine Gq et présent au niveau des interneurons inhibiteurs GABAergiques, participant ainsi à leur activation.

Pour conclure, ce premier chapitre illustre la complexité du système somatosensoriel ainsi que la diversité importante des acteurs qui le composent, que ce soit d'un point de vue moléculaire, électrophysiologique, anatomique, ou fonctionnel. Grâce à l'évolution ces dernières années des techniques d'imagerie, de transcriptomique, et d'électrophysiologie, des avancées importantes ont cependant été réalisées dans sa caractérisation. Notamment, nous avons à présent une meilleure idée des **sous-populations neuronales** impliquées dans chacune des modalités sensorielles, ainsi que de leurs **caractéristiques anatomiques et électrophysiologiques**, des **réseaux formés**, et surtout des **marqueurs cellulaires et moléculaires** spécifiques à chacune des sous-populations de neurones sensoriels primaires et spinaux.

L'identification des marqueurs est particulièrement intéressante. En effet, ils peuvent nous renseigner sur divers aspects des cellules les exprimant, tels que les **mécanismes de neurogénèse** de chaque type neuronal du système somatosensoriel, leurs **effets excitateurs ou inhibiteurs** au sein de ce système, ou encore les modalités pour lesquelles ils répondent. De plus, nombre de **ces marqueurs sont dérégulés dans un contexte pathologique**. Étudier ces dérégulations en fonction de la pathologie étudiée pourrait nous permettre de mieux en comprendre les mécanismes, et développer des stratégies thérapeutiques plus efficaces ciblant ces marqueurs.

Enfin, un autre système particulièrement impliqué dans la modulation de la douleur est le **système opioïdergique endogène**. Les différents récepteurs et ligands formant ce système sont exprimés dans l'entièreté du système somatosensoriel, où ils sont connus pour être impliqués dans la modulation des différents signaux sensoriels et notamment dans leur inhibition, et sont une **cible thérapeutique importante**. De façon plus générale, ils jouent également un rôle important dans la **régulation des émotions, du stress**, ou encore du **plaisir et de l'addiction**.

Dans le second chapitre, nous nous intéresserons donc plus particulièrement à la description de ce système opioïdergique endogène au sein du système somatosensoriel, des différents acteurs qui le composent, et des mécanismes d'action des traitements thérapeutiques opioïdergiques existants.

Chapitre II

Rôle fonctionnel des systèmes opioïdiques endogènes et exogènes

I. Le système opioïdérique endogène et son rôle physiologique dans la douleur

Le système opioïdérique endogène, ou EOS (« endogenous opioid system ») est exprimé dans l'entière du système nerveux, mais également dans plusieurs cellules du système immunitaire, ou encore au niveau de différentes glandes de l'organisme. Ainsi, il est impliqué dans de multiples fonctions, allant de la neurogénèse, au contrôle du rythme cardiaque et de la respiration, en passant par la sécrétion et modulation de différentes hormones, le contrôle des émotions, ou encore dans les mécanismes d'apprentissage et de plasticité cérébrale (Kibaly et al., 2019).

Il est majoritairement composé de 4 récepteurs opioïdériques : les récepteurs MOR (pour μ -opioid receptor), DOR (δ -opioid receptor), KOR (κ -opioid receptor), et NOR (nociceptin opioid receptor). Ces quatre récepteurs ont une composition en acides aminés identiques à 60%, et sont tous des récepteurs à couplés aux protéines G (RCPGs), et notamment aux protéines G inhibitrices, ainsi qu'à la β -arrestine (Al-Hasani & Bruchas, 2011). Leur activation respective provoque donc une inhibition neuronale, induite plus particulièrement par une inhibition de l'adénylate cyclase (AC) et la voie AMPc (Adenosine MonoPhosphate cyclique), des canaux calciques voltage-dépendants, et une activation des canaux rectificateurs du potassium (GIRK, G-protein activated Inwardly Rectifying K⁺ current). Cependant, malgré ces similitudes, on note également des différences dans la localisation de leur expression et des voies de signalisation engagées par chacun. Notamment au niveau de la modulation de l'AC, celle-ci possède neuf isoformes différents, avec des variations d'expression, de régulation, et dans leur rôle fonctionnel respectif (Sadana & Dessauer, 2009). En particulier, l'isoforme 5 serait impliqué dans les mécanismes de nociception (Kim et al., 2007), et pourrait être régulée par le récepteur DOR ou MOR en fonction de la structure (Kim et al., 2006). A l'inverse, l'isoforme 1 modulé par le MOR pourrait être plus impliqué dans la persistance douloureuse (Corder et al., 2013).

Aussi, il existe différents peptides ligands aux récepteurs opioïdériques, qui vont chacun avoir une affinité différente avec ces récepteurs (figure 15). Les 4 principaux ligands opioïdes sont l'enképhaline, la dynorphine, l'endorphine et la nociceptine.

De plus, d'autres récepteurs sont aujourd'hui connus pour être activés par les ligands opioïdes (qu'on appelle les « AORs, pour atypical opioid receptors »), bien qu'ils ne soient pas reconnus comme des récepteurs opioïdériques en tant que tels (Palmer et al., 2021). Dans ce chapitre, nous nous focaliserons uniquement sur les 4 récepteurs et les 4 ligands classiques de

l'EOS, et leur rôle dans le système somesthésique et la pain matrix. Leur expression respective dans les différentes sous-populations neuronales et les structures cérébrales impliquées dans la somesthésie, et plus particulièrement impliquées dans l'intégration du signal nociceptif, est résumée dans la figure 23 (p.68).

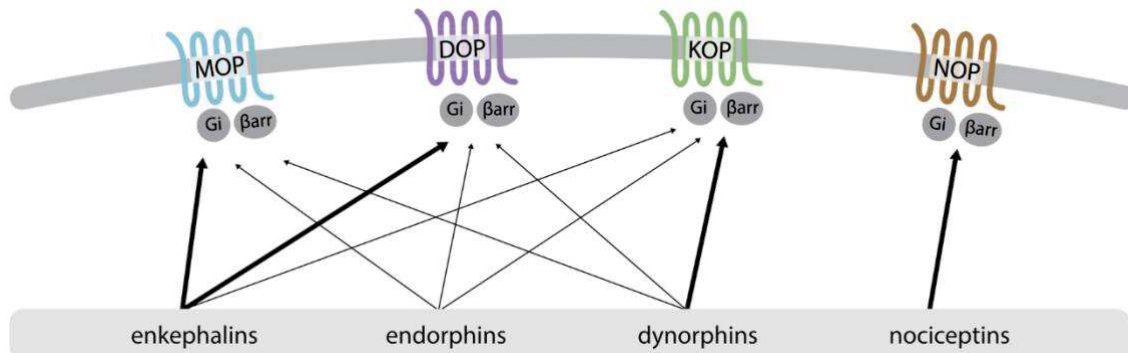


Figure 15. Représentation des 4 récepteurs aux opioïdes, et leurs différentes affinités avec les 4 ligands opioïdiques

Palmer et al., 2021

1. Les récepteurs aux opioïdes

1.1. Récepteur DOR

Le récepteur DOR, codé par le gène *Oprdl*, est l'un des deux récepteurs opioïdiques (avec MOR) particulièrement étudié ces dernières années, notamment pour son potentiel thérapeutique important. En effet, de nombreuses études montrent des effets bénéfiques lors de l'activation de DOR dans divers contextes pathologiques, et en particulier des effets analgésiques, anxiolytiques, et antidépresseurs, pouvant en faire une cible intéressante dans un contexte de douleur chronique ou d'anxiodépression. Cependant, tout comme les autres récepteurs opioïdiques, sa vaste expression au sein de l'organisme et la multitude de fonctions auxquels il est lié, est à l'origine de nombreux effets secondaires lors de l'administration médicamenteuse d'opioïdes ciblant l'activation (spécifique ou non) du DOR. En particulier, l'effet le plus néfaste et retrouvé de façon conséquente dans les agonistes DOR est l'induction de crise d'épilepsie (Chu Sin Chung et al., 2015). De plus, on s'aperçoit aujourd'hui qu'en plus d'effets secondaires délétères, les différentes stratégies thérapeutiques ciblant les opioïdes ont une efficacité limitée en fonction du contexte pathologique, et de l'affinité des traitements avec les différents récepteurs aux opioïdes. Cela s'explique en particulier par une méconnaissance des mécanismes d'action précis de DOR au niveau

cellulaire, et de son expression exacte, notamment au sein du système somatosensoriel. Ainsi, une recherche importante est en cours aujourd'hui pour mieux caractériser ce récepteur, au niveau anatomique et fonctionnel. Si des avancées importantes ont été réalisées ces dernières années dans cette caractérisation, il faut cependant noter qu'une forte contradiction existe entre les différentes études, notamment sur l'expression du DOR dans les différentes sous-populations neuronales, et par conséquent son rôle dans la transmission et la modulation des différentes modalités sensorielles est encore largement débattu.

Dans les afférences primaires en particulier, des résultats contradictoires ont été obtenus, notamment en fonction de la technique expérimentale employée, ou de l'espèce étudiée. Ainsi, dans les premières études faites chez le rongeur, l'emploi d'anticorps en immunohistochimie ou de sondes ciblant l'ARNm *Oprd1* ont montré que DOR serait exprimé dans une majorité de neurones primaires, incluant des neurones à large et moyen diamètre myélinisés, et des neurones à petit diamètre non myélinisés (Dado et al., 1993). Associés à ces résultats, il a donc été suggéré que le récepteur DOR participerait à la modulation des différentes modalités sensorielles (mécanique, thermique, nociceptive), et que son activation aurait ainsi des effets bénéfiques sur l'hypersensibilité à la fois mécanique et thermique.

En revanche, une étude comparative de l'expression du DOR chez les primates humains et non-humains comparé au rongeur, a obtenu des résultats divergents. En effet, si des résultats similaires ont été observés quant à l'expression généralisée du DOR dans les différents types neuronaux des primates, ils n'ont observé en revanche une expression du DOR que dans les neurones à large diamètre chez le rongeur (Mennicken et al., 2003).

Ces dernières années, l'emploi de techniques et outils plus spécifiques, telles que des lignées transgéniques comme la DOR-eGFP et le séquençage d'ARN en single cell, démontrent également une expression de DOR uniquement dans les neurones à large diamètre. Ainsi, d'après les données de transcriptomique réalisée par Ernfors en 2014, DOR ne serait présent que dans la population NF3 majoritairement, et NF2 en plus faible quantité (figure 16).

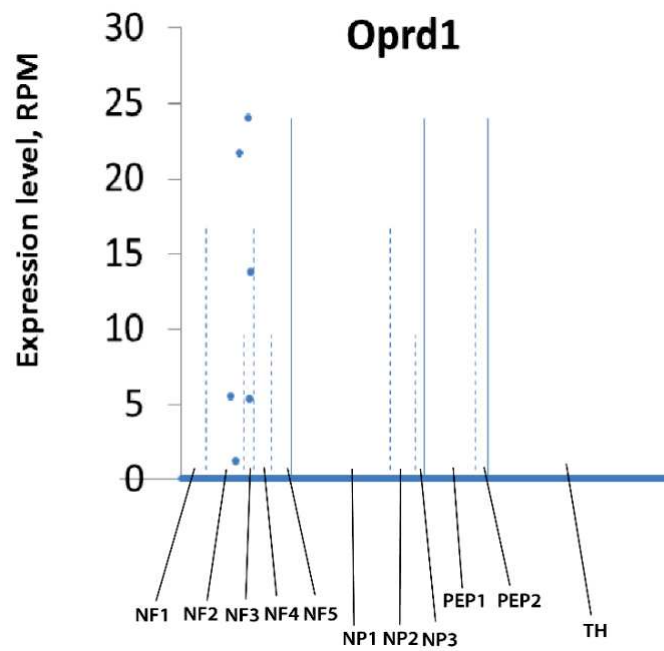


Figure 16. Expression d'*Oprd1* dans les sous-populations d'afférences primaires définies par séquençage en single cell

Représentation du niveau d'expression d'*Oprd1* (en read Per Million) dans les différentes sous-populations du DRG. Chaque point représente un neurone différent, un niveau d'expression en RPM plus élevé signifiant une expression plus importante au sein de ce neurone.

Adapté des datas en libre-service obtenues lors de l'étude Usoskin et al, 2014

D'après cette étude, DOR serait donc spécifiquement exprimé dans des mécanorécepteurs $A\beta$, et notamment les deux sous-populations exprimant Ret. Ces résultats concordent globalement avec une étude réalisée par le laboratoire de Grégory Scherrer en 2014 employant la lignée DOR-eGFP ((Bardoni et al., 2014). En étudiant la co-expression de la GFP avec des marqueurs des différentes sous-populations, ils ont observé une expression du DOR uniquement dans les neurones myélinisés : les 2/3 de ces neurones expriment TrkC (co-marqué dans la majorité avec Ret), correspondant bien aux populations NF2 et NF3 décrites par Ernfors. Cependant, 1/3 des neurones myélinisés expriment quant à eux TrkA et cGRP, correspondant à des neurones $A\delta$ -HTMRs. Associés à d'autres résultats obtenus par électrophysiologie ou en étudiant les terminaisons nerveuses périphériques exprimant DOR, cette étude conclue ainsi que les afférences primaires exprimant DOR correspondrait bien majoritairement à des $A\beta$ -LTMRs, ou dans une minorité des cas à des fibres A HTMRs (figure 17). Ainsi, DOR serait plus spécifiquement impliqué dans la transmission de l'information mécanoréceptive, ou mécanonociceptive. En revanche, elle n'interviendrait pas dans la transmission de la modalité thermique, que ce soit à des seuils physiologiques ou nocifs (Scherrer et al., 2009).

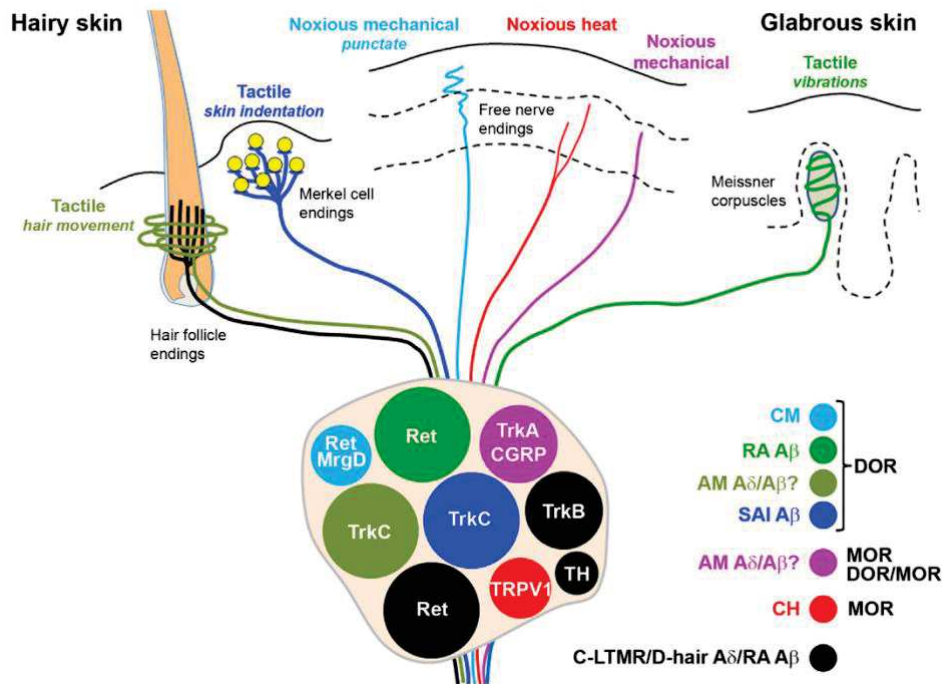


Figure 17. Expression du DOR dans les sous-population d'afférences primaires

DOR est majoritairement exprimé dans les sous-populations A et C mécanoréceptrices, représentées en bleu et vert avec leurs marqueurs et types de terminaisons nerveuses associés.

Bardoni et al., 2014

Les différentes techniques employées dans ces études ont toutes été critiquées, notamment la spécificité dans le cas d'utilisation d'anticorps dirigés contre le DOR en immunohistochimie, ou le fait que l'ajout d'une séquence GFP dans la lignée DOR-eGFP pourrait altérer l'adressage et le maintien à la membrane du récepteur, et donc ne représenterait pas la véritable expression du DOR physiologique (François & Scherrer, 2017). Cependant, si les différents anticorps dirigés contre DOR ont pour la plupart été invalidés au fur et à mesure des années (notamment de par la présence d'un signal dans des souris n'exprimant pas le récepteur DOR), de nombreuses autres études ont quant à elles trouvé des résultats similaires à l'étude du laboratoire de Scherrer, par emploi de radio ligand, ou de double hybridation *in situ*. Cela tend à confirmer l'hypothèse d'une expression et une implication du DOR majoritairement dans les fibres mécano(noci)ceptives.

Toutefois, le manque d'études récentes sur l'expression du DOR chez les primates ne permet pas de confirmer ou invalider les datas obtenus précédemment, dans l'étude datant de

2003 réalisée par le laboratoire de Dajan O'Donnell. Il est donc possible qu'il existe une variabilité inter-espèces dans l'expression du récepteur au niveau des afférences primaires.

Au niveau central en revanche, les différentes études sur l'expression du DOR chez le rongeur s'accordent plus. Ainsi, si DOR est exprimé au niveau de toute la corne dorsale, il semble majoritaire dans les interneurons excitateurs de la lamina II exprimant la somatostatine. Ces interneurons contribuent à la transmission des signaux mécanoréceptifs, et en particulier mécanonociceptifs. De plus, une expression du DOR est également observée dans les neurones de projection de la lamina I. Toutes ces datas suggèrent donc qu'au niveau spinal, DOR est également impliqué dans la modulation de la mécano(noci)ception, et non de la thermoréception. Chez les primates humains et non-humains, des observations similaires ont été réalisées, avec une présence du récepteur plus particulièrement dans les laminae I et II.

Enfin, au niveau supraspinal, DOR semble avoir une expression assez étendue, à la fois chez le rongeur et les primates. Il serait ainsi impliqué dans les trois composantes, sensori-discriminative, émotionnelle, et cognitive, de la douleur. En particulier, on observe une forte expression de DOR au niveau de l'amygdale basolatérale, et de certaines laminae de l'ACC (Wang et al., 2018). Si un travail conséquent reste à faire pour déterminer le rôle exact du DOR dans chacune des structures de la matrice douloureuse, et chacune des composantes de la douleur, il a déjà été montré que l'activation supraspinale du DOR a des effets antinociceptif, des effets anxiolytiques et antidépresseurs, comme déjà mentionné plus haut (Bodnar, 2018). L'amygdale basolatérale étant connue pour son implication dans le développement du stress, c'est par l'inhibition des neurones glutamatergiques de cette structure que les effets anxiolytiques pourraient agir. A l'inverse, DOR est également exprimé dans le système de récompense, et son activation engendrerait également des effets pro-addictifs, et notamment dans les effets motivationnels induits par la consommation de substances addictives (Klenowski et al., 2015 ; Jiang et al., 2021). Cette action du DOR est bien évidemment à prendre en compte dans le développement de molécules thérapeutiques ciblant ce récepteur.

1.2. Récepteur MOR

L'expression du récepteur MOR au sein du système somatosensoriel est plus généralement admise que celle du DOR. Les différentes études de caractérisation (impliquant l'utilisation d'anticorps en immunohistochimie, le ciblage de l'ARNm *Oprm1* codant pour

MOR, le séquençage en single-cell, ou encore l'usage de lignées transgéniques telles que la lignée MOR-mCherry) semblent assez concordantes.

Ainsi, MOR est exprimé dans les afférences primaires majoritairement au niveau des neurones de petit diamètre, non myélinisés, exprimant cGRP et la substance P, et sensibles à la capsaïcine (Corder et al., 2017). Ces neurones correspondraient donc à des fibres C peptidergiques thermo- et nociceptives. D'après les datas de transcriptomique d'Ernfors, on trouve également une expression de MOR au niveau des fibres C non-peptidergiques, renforçant l'implication de ce récepteur dans la modulation du signal thermoréceptif (figure 18). En revanche, très peu d'expression est retrouvée au niveau des fibres myélinisées (notamment A β) ou des fibres C-LTMRs. Ainsi, MOR serait plus responsable de la modulation de signaux thermoréceptifs, et/ou nociceptifs (Scherrer et al., 2019). De façon intéressante, il semblerait donc que DOR et MOR aient une expression, associée à un rôle fonctionnel, complémentaire au sein des neurones de premier ordre. Cela s'opposerait en revanche à des études existantes qui suggèrent une hétérodimérisation de ces deux récepteurs dans les processus d'inhibition de la transmission des signaux somesthésiques au niveau périphérique. Ces études s'appuyant sur les premières caractérisations faites sur le récepteur DOR le situant dans ces mêmes populations de thermo- et nocicepteurs, ainsi que sur des études *in vitro*, elles sont aujourd'hui remises en cause. De plus, aucune étude *in vivo* n'a pu démontrer jusqu'alors cette hétérodimérisation (Massotte, 2015).

De même, l'expression fonctionnelle de MOR au niveau du SNC semble majoritairement différente et complémentaire de celle du DOR (Wang et al., 2018). Au niveau de la moelle épinière, s'il semble y avoir une co-expression importante au niveau de la corne ventrale entre ces deux récepteurs (dont la fonction, probablement sur le système moteur, reste à être élucidée), très peu de co-expression a été trouvée au niveau de la corne dorsale entre ces deux récepteurs. Cette co-expression se limite majoritairement aux neurones de projection de la lamina I. Hormis les neurones de projection, MOR est exprimé au niveau des interneurons excitateurs de la lamina IIo. Ces interneurons excitateurs sont majoritairement des populations exprimant la Penk, et formant des connexions avec des fibres afférentes C ou A δ . Cette expression suggère à nouveau un rôle du MOR dans la régulation spécifique de la thermo(noci)ception, mais pas de la mécanoception. Enfin, l'application d'agonistes spécifiques du MOR (tels que le DAMGO, pour « D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol-enkephalin ») ou du DOR (tels que la deltorphine II), provoque l'internalisation et la dégradation uniquement du récepteur pour lequel ils présentent une forte affinité, sans impacter la fonctionnalité de

l'autre récepteur. Cela montre à nouveau un rôle fonctionnel distinct entre les récepteurs MOR et DOR, même dans les neurones minoritaires dans lesquels ils sont tous deux exprimés (Al-Hasani & Bruchas, 2011).

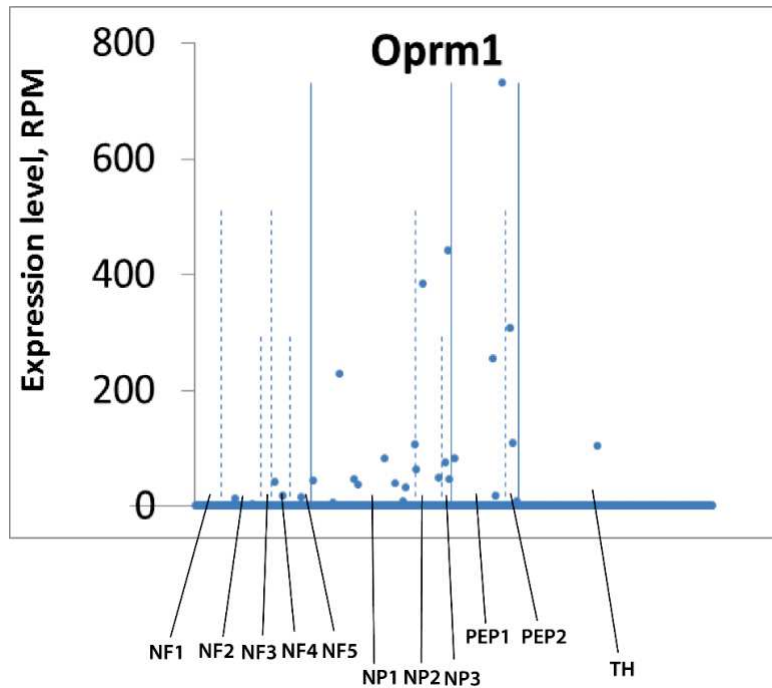


Figure 18. Expression d'Oprm1 dans les sous-populations d'afférences primaires définies par séquençage en single cell

Représentation du niveau d'expression d'Oprm1 (en read Per Million) dans les différentes sous-populations du DRG. Chaque point représente un neurone différent, un niveau d'expression en RPM plus élevé signifiant une expression plus importante au sein de ce neurone.

Adapté des datas en libre-service obtenues lors de l'étude Usoskin et al, 2014

Enfin, au niveau supraspinal, on observe également une expression complémentaire du MOR comparé au DOR. Dans les structures où celui-ci est fortement exprimé, c'est-à-dire l'amygdale et l'ACC, MOR est exprimé dans différentes sous-parties (Mercer Lindsay et al., 2021). Ainsi, on le retrouve fortement exprimé dans les neurones inhibiteurs de l'amygdale centrale, suggérant un rôle dans l'aspect sensori-discriminatif de la nociception, et dans des laminae de l'ACC différentes de celles où DOR est exprimé. Dans cette structure, il semblerait que MOR soit impliqué dans les effets bénéfiques ressentis lors de l'administration d'analgésiques dans un contexte de douleur. En plus de cela, on note une expression de MOR majoritaire comparé aux autres récepteurs dans certaines structures impliquées dans le contrôle ascendant, le thalamus et le IPBN, et dans les structures impliquées dans le contrôle descendant de la douleur, la PAG et la RVM. De plus, la population de neurones descendants GABAergiques cités plus haut qui n'expriment pas Penk exprime en revanche le récepteur MOR (François et al., 2017).

Enfin, tout comme DOR, MOR est exprimé dans les différentes structures du système de récompense, notamment la VTA et le Nacc, et est fortement impliqué dans la régulation du système dopaminergique au sein de ces structures. Ainsi, dans les effets secondaires de l'administration d'analgésiques ciblant l'activation du MOR, le développement d'un renforcement positif menant à une addiction à ces analgésiques est un problème majeur. Ces analgésiques étant notamment considérés comme les « gold standard » dans le traitement de la douleur, leur prescription importante est d'ailleurs aujourd'hui à l'origine d'une crise majeure, en particulier à cause de ces effets secondaires (cf. partie II).

Tout cela montre ainsi une implication au moins aussi importante du MOR dans l'intégration des composantes sensori-discriminative, émotionnelle, et cognitive de la douleur. Cependant, son rôle précis dans chaque structure pour cette intégration reste tout de même à élucider.

1.3. Récepteur KOR

L'expression du récepteur KOR, codée par le gène *Oprk1*, est longtemps restée inconnue. Le développement d'une lignée transgénique KOR Cre couplée à l'utilisation de virus Cre-dépendant tdTomato permettant le marquage des cellules exprimant ce récepteur, a permis sa caractérisation très récemment, notamment au niveau des afférences primaires et de la corne dorsale de la moelle épinière (Snyder et al., 2018). Ainsi, KOR est exprimé par plusieurs sous-populations neuronales, notamment des populations NF200+, TH+ et/ou cGRP+. De plus, au niveau des terminaisons nerveuses périphériques, seules des terminaisons lancéolées ou circonférentielles semblent exprimer le récepteur KOR. Tous ces résultats suggèrent une expression de KOR dans les fibres A mécanoréceptrices (C, A δ et A β), et notamment celles innervant la peau poilue, ainsi que des populations peptidergiques non myélinisées correspondant à des fibres C nociceptives. Cette étude a montré des résultats similaires chez l'Homme par RT-qPCR, où tous les neurones exprimant KOR sont également peptidergiques, exprimant notamment TRPV1. Ainsi, KOR serait imprimé à la fois dans les modalités mécanique et nociceptive, de manière similaire à DOR. En revanche, KOR ne semble être exprimé ni dans les populations TRPM8, et donc ne serait pas impliqué dans la modalité thermique au froid, et ni dans les nocicepteurs exprimant Mrgpr3a. Différentes études ayant démontré un rôle de ce récepteur dans le contrôle de la transmission de l'information pruriceptive au niveau périphérique spécifiquement, il reste à déterminer de quelle façon KOR

contrôle cette sous-population neuronale, s'il n'est pas exprimé directement au sein de ces neurones. De plus, de façon intéressante, KOR semble plus exprimé dans les fibres mécanocaptives innervant la peau poilue, à l'inverse de DOR qui a une expression plus généralisée, bien que majoritaire au niveau de la peau glabre. A nouveau, il semble donc que KOR ait une expression au moins partiellement complémentaire par rapport aux récepteurs MOR et DOR. Aussi, tout comme entre MOR et DOR, plusieurs études suggèrent une hétérodimérisation entre les récepteurs KOR et DOR au niveau des mécanorécepteurs, responsable de l'inhibition de l'information tactile. Leur co-expression partielle démontre la faisabilité de cette hypothèse (au contraire de l'hétérodimérisation entre DOR et MOR), cependant il reste à démontrer l'existence de cette dimérisation *in vivo*. Enfin, si on regarde les datas du laboratoire d'Ernfors, on note des différences assez importantes dans les résultats obtenus par rapport à l'emploi de lignée transgénique, au contraire des deux autres récepteurs : en effet, ces datas suggèrent une expression du KOR spécifique au niveau des sous-populations NF1 et NF2 (figure 19). Aucune expression n'est en revanche détectée au niveau des fibres peptidergiques, myélinisées ou non. Ces différences pourraient s'expliquer par une expression faible en ARNm en condition physiologique au niveau des afférences primaires, et donc de difficultés à mesurer son expression par des techniques de séquençage en single-cell. Une étude approfondie est cependant nécessaire afin de confirmer ou non cette hypothèse.

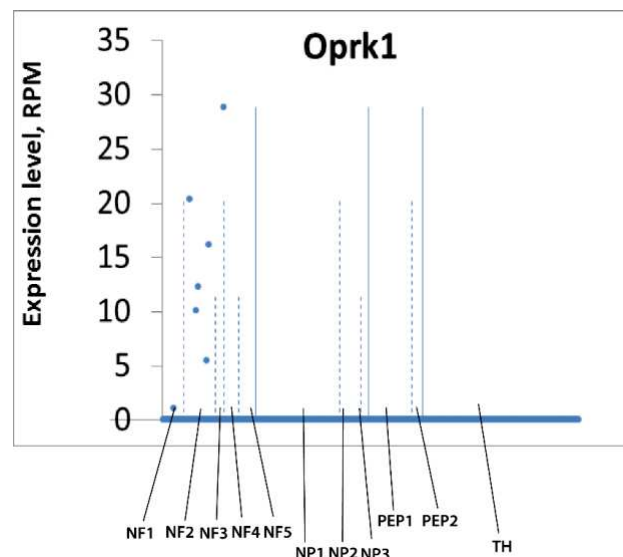


Figure 19. Expression d'*Oprk1* dans les sous-populations d'afférences primaires définies par séquençage en single cell

Représentation du niveau d'expression d'*Oprk1* (en read Per Million) dans les différentes sous-populations du DRG. Chaque point représente un neurone différent, un niveau d'expression en RPM plus élevé signifiant une expression plus importante au sein de ce neurone.

Adapté des datas en libre-service obtenues lors de l'étude Usoskin et al, 2014

Au niveau central, l'expression et le rôle précis du récepteur KOR est en revanche encore très peu connue. Au niveau fonctionnel dans la moelle épinière, il a été montré par injection de différents agonistes passant ou non la barrière hémato-encéphalique, que le KOR spinal aurait une action différente du KOR périphérique dans la modulation de l'information somesthésique. En particulier, l'activation de KOR au niveau périphérique a un effet analgésique bénéfique sur la mécanociception, mais pas la thermoception, induites dans différents modèles de douleur aiguë ou chronique chez l'animal, tout comme le KOR spinal. En revanche, seule l'activation du KOR spinal inhibe l'hypersensibilité thermique observée après injection de l'agoniste du récepteur TRPV1, la capsaïcine, malgré l'expression de KOR dans les afférences primaires TRPV1+. L'usage de la lignée KOR-Cre récemment développée pourrait à l'avenir donner plus de renseignements sur les sous-populations neuronales exprimant KOR au niveau spinal, et éventuellement expliquer les différences d'action du KOR central comparé au KOR périphérique dans la modulation de l'information sensorielle. On note tout de même que KOR, comme les deux autres récepteurs, a donc un rôle important dans la modulation de l'information nociceptive. Ce rôle serait en revanche moins spécifique de certaines modalités pour KOR, qui modulerait à la fois la mécano- et thermonociception. Enfin, au niveau spinal également l'activation de KOR a démontré des effets bénéfiques dans la modulation de l'information pruriceptive, et présente un fort intérêt dans le traitement du prurit chronique.

Au niveau supraspinal, de façon intéressante, l'activation du KOR semble avoir des effets majoritairement opposés à ceux de MOR ou DOR (Lalanne et al., 2014). En particulier, l'activation de KOR au niveau de l'amygdale centrale aurait des effets pronociceptifs. Outre cette population qui modulerait l'aspect sensori-discriminatif de la douleur, KOR est surtout connu dans ces effets sur les composantes émotionnelles de la douleur. Il est notamment exprimé dans le système de la récompense, où comme MOR et KOR, il va participer aux effets motivationnels induits par la consommation de substances addictives, participant aux effets délétères de certains analgésiques présentant des effets renforçants. Cependant, au contraire de DOR notamment, il aurait également un rôle central dans le développement de stress, d'anhédonie, voire de dépression, liés ou non à la douleur (Corder et al., 2018). Son blocage au niveau supraspinal aurait donc des effets bénéfiques à la fois au niveau nociceptif, du stress, et de l'addiction. En revanche, ici également son expression précise dans les différentes sous-populations neuronales reste à élucider. Au niveau des structures cérébrales l'exprimant, la génération très récemment d'une lignée transgénique dont le récepteur KOR exprime la TdTomato, couplé à la technique de transparasation de tissu CLARITY, a cependant permis une

première avancée dans cette caractérisation (figure 20) (Chen et al., 2020). On peut ainsi noter que son expression semble localisée dans la majorité des structures impliquées dans la matrice douloureuse.

Table 1: KOR distribution in brain regions of KtdT/KtdT mice

Telencephalon		Hypothalamus	
Amygdala		Arcuate nucleus	2
Central nucleus	1	Dorsomedial nucleus	3
Cortical nucleus	1	Lateral hypothalamic area	1
Basolateral nucleus	2	Mammillary nucleus	1
Medial nucleus	1	Paraventricular nucleus	2
Bed nucleus, stria terminalis	1	Periventricular area	3
Cerebral cortex		Preoptic area	1
Layer 1	1	Suprachiasmatic nucleus	2
Layer 2/3	2	Retrochiasmatic nucleus	2
Layer 4	0	Subthalamus	
Layer 5	2	SI	2
Layer 6	2	Subthalamic nucleus	2
CLA	4	Zona incerta	1
CP	1	Thalamus	
Endopiriform nucleus	4	Periventricular nucleus	2
Globus pallidus	1	Reuniens nucleus	1
Hippocampal formation			
Cornu ammonis	1	Mesencephalon	
Dentate gyrus	1	Edinger–Westphal nucleus	2
Septum		PAG	3
LS	1	SN	
Medial septum	1	SNc	1
SI	3	SNr	4
Ventral striatum		Superior colliculus	3
ACB core	2	Retrorubral field (A8)	3
ACB shell	3	VTA	2
Olfactory tubercle	2		
		Pons/medulla	
Diencephalon		Nucleus raphe magnus	3
Epithalamus		Parabrachial nucleus	2
LHb	1	Raphe nuclei	2
Medial habenula	1	Rostral ventral medulla	2

Number 4 indicates the highest density and 1 the lowest. Data are derived from three mice.

Figure 20. Expression du KOR cérébral, à l'aide de la lignée transgénique KOR Cre- TdTomato
Chen et al, 2020

1.4. Récepteur NOR

Le récepteur NOR, de son gène *Oprl1*, est le dernier récepteur aux opioïdes découvert, environ 30 ans après les 3 autres. Par conséquent, il reste le récepteur le moins caractérisé, à la fois au niveau de son expression et de son rôle fonctionnel. De plus, s'il partage une structure et une séquence en acides aminés très proches de celles des trois autres récepteurs classiques, et engage des voies de signalisation similaires, il présente des différences d'affinité importante

avec les ligands classiques des opioïdes (Palmer et al., 2021). Notamment, l'injection de naloxone, le principal antagoniste des récepteurs aux opioïdes MOR, KOR et DOR, ne semble pas bloquer l'activité de NOR. De même, il semblerait que les principaux peptides opioïdiques endogènes (enképhaline, dynorphine, et endorphine), qui sont tous capables de se lier aux 3 récepteurs MOR, KOR et DOR avec différentes affinités, ne se lient pas à ce récepteur. Un débat important a ainsi eu lieu afin de considérer ou non NOR comme un récepteur aux opioïdes. Cependant, son activation ou inhibition pharmacologique a démontré une implication à la fois au niveau émotionnel, cognitif et sensoriel du contrôle de la nociception, de même que son activation est capable de moduler les effets pro- ou antinociceptif de ligands opioïdiques exogènes (Toll et al., 2016). Il est donc aujourd'hui admis qu'il fasse bien partie des récepteurs opioïdiques, et suscite un intérêt croissant ces dernières années, notamment dans le développement de stratégies thérapeutiques alternatives à celles visant classiquement l'activation des autres récepteurs opioïdiques (Raffa et al., 2017). Il reste cependant à réaliser un travail de caractérisation encore plus important que les 3 autres récepteurs, au niveau fondamental.

Tout comme les autres, c'est la génération très récemment d'une lignée transgénique (ici, la lignée NOR-eGFP) permettant l'expression fluorescente du récepteur, et les datas de transcriptomique générées ces dernières années, qui a permis une première réelle avancée dans l'étude de son expression dans le système somatosensoriel. Avant cela, les résultats obtenus dans sa caractérisation suite à sa découverte par l'usage d'anticorps en immunohistochimie avaient longtemps suscité des doutes sur sa réelle expression, comme ça a été le cas pour les autres récepteurs, et ne semblent aujourd'hui pas être validés dû au manque de spécificité. Ainsi, en se basant sur les datas de séquençage en single-cell (figure 21), on note qu'il semble majoritairement exprimé dans les fibres A α ou A β (populations NF1 à NF5), et dans les fibres C-LTMRs (population TH). Les fibres C nociceptives peptidergiques (PEP1) semblent également exprimer ce récepteur. L'emploi de la lignée transgénique a montré de son côté également une forte expression dans les fibres myélinisées (60% des neurones exprimant NOR exprimant NF200), mais également dans les populations exprimant cGRP ou IB4 (Ozawa et al., 2015). Cette caractérisation présente cependant plusieurs limites : en effet, seuls ces trois marqueurs ont été utilisés, et l'analyse a été réalisée de façon distincte entre chacun de ces 3 marqueurs et le signal de la GFP. Ainsi, la population exprimant cGRP est possiblement en partie redondante avec celle exprimant NF200, ce qui n'est pas pris en compte dans l'analyse. De même, l'emploi d'autres marqueurs (tels que TRPV1, TH, substance P, parvalbumine, ou

encore Trk A/B/C) aurait permis une caractérisation bien plus raffinée des sous-populations exprimant NOR.

Malgré cela, on peut conclure par ces deux études que NOR semble majoritairement dans les populations mécanoréceptrices, myélinisées ou non, et certaines populations nociceptrices, notamment peptidrgiques. Son rôle fonctionnel pourrait ainsi être similaire des récepteurs KOR et DOR. L'emploi d'agonistes de NOR en périphérie a d'ailleurs montré une inhibition de la nociception, et notamment de la mécanonociception. En se basant sur le séquençage des 4 récepteurs, il est intéressant de noter qu'il semble avoir l'expression la plus complémentaire à celle de MOR, celui-ci étant quasi-exclusivement dans les populations NP1 à 3, seules populations où NOR n'est pratiquement pas exprimé. L'étude utilisant la NOR-eGFP a quant à elle montré que 30% des neurones NOR exprimeraient le MOR. Cependant, l'usage d'anticorps en immunohistochimie pour étudier la localisation de MOR apporte un doute important quant à la validité des résultats obtenus. De plus, toujours en comparant ces data de séquençage, il semblerait que le niveau d'expression en ARNm de NOR soit largement supérieur à celui des 3 autres récepteurs en condition physiologique. Il serait intéressant d'étudier leurs changements d'expression en condition pathologique, et notamment de voir s'il y a une perte de cette expression de NOR.

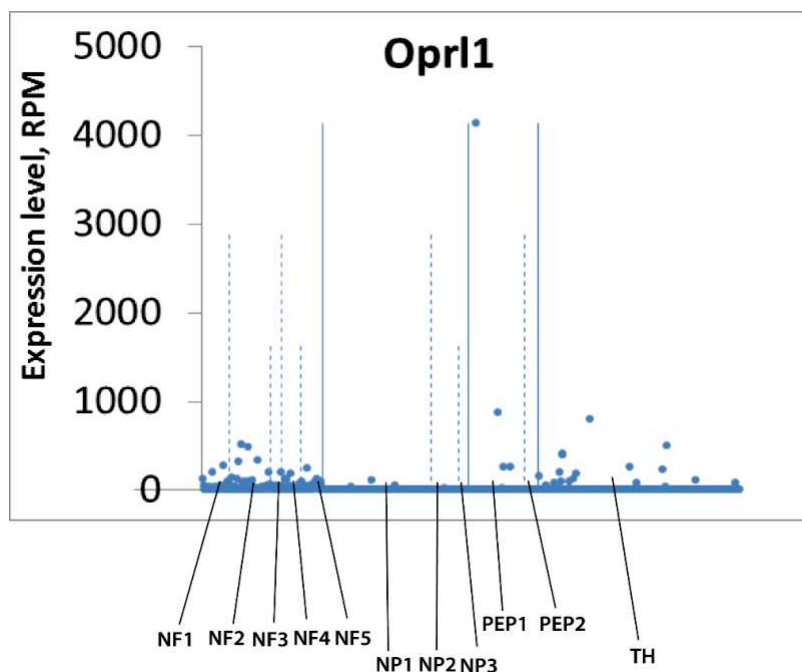


Figure 21. Expression d'Opr11 dans les sous-populations d'afférences primaires définies par séquençage en single cell

Représentation du niveau d'expression d'Opr11 (en read Per Million) dans les différentes sous-populations du DRG. Chaque point représente un neurone différent, un niveau d'expression en RPM plus élevé signifiant une expression plus importante au sein de ce neurone.

Adapté des datas en libre-service obtenues lors de l'étude Usoskin et al, 2014

Au niveau spinal, il a simplement été montré l'expression de ce récepteur dans les laminae I à III de la corne dorsale, sans caractérisation précise des sous-populations neuronales.

Au niveau supraspinal, il semble localisé dans les mêmes structures que les autres récepteurs. En particulier, en opposition avec les afférences primaires, une forte expression dans les structures et sous-populations où MOR est majoritaire a été montrée. Il a d'ailleurs été suggéré qu'une modulation de MOR est possible via l'activation de NOR. En effet, l'ajout d'agoniste NOR au niveau supra-spinal semble potentialiser les effets antinociceptifs de MOR, et inhiber certains de ces effets secondaires (développement d'une tolérance, ou d'hyperlocomotion notamment). De même, les effets motivationnels induits par certaines substances semblent inhibés par l'activation de NOR, d'où le développement d'un intérêt thérapeutique pour ce récepteur. Cependant, ces études utilisent majoritairement des stratégies pharmacologiques non spécifiques, et sont controversées. En effet, d'autres études suggèrent quant à elles (également via différentes stratégies pharmacologiques) que l'activation de NOR dans le SNC serait au contraire pronociceptive, ou bloquerait les effets analgésiques induits par le MOR, ou encore que ce récepteur n'aurait aucune action sur la modulation du système de récompense. L'emploi de techniques plus spécifiques, notamment d'opto- ou chémo-génétique, pourrait à l'avenir permettre une meilleure caractérisation du rôle fonctionnel de NOR.

2. Les ligands

Les 4 principaux peptides opioïdiques endogènes sont, tout comme leurs récepteurs, exprimés dans le système somatosensoriel, notamment au niveau central, et sont autant étudiés que les récepteurs pour leur rôle dans le contrôle de la modulation des informations somesthésiques, notamment nociceptives. Si 4 peptides sont principalement étudiés (Met-enképhaline, β -endorphine, dynorphine A, et nociceptine/orphanine FQ), étant les principaux agonistes de chacun des 4 récepteurs aux opioïdes, il est à noter qu'il existe de nombreux autres peptides, avec des variations dans leur séquence en acides aminés, et différentes affinités pour les récepteurs aux opioïdes (certains étant même spécifiques des AORs) (Palmer et al., 2021). Tous ces peptides sont issus de 4 précurseurs principaux (figure 22), la préproenképhaline (Penk), la prodynorphine (Pdyn), la proopiomélanocortine (POMC), et la prepronociceptine (pN/OFQ). De par la difficulté à labelliser ou mesurer quantitativement l'expression de ces

ligands, en fonction des études et des stratégies utilisées, les précurseurs comme les 4 peptides principaux peuvent être ciblés. Ainsi, un biais peut exister dans le cas de l'étude du précurseur puisque différents peptides peuvent en résulter, même si on admet généralement que l'expression du précurseur est représentative de l'expression du ligand principal issu.

precursor	ligand	sequence	MOP	DOR	KOP	NOP
proenkephalin	[Met]enkephalin	YGGFM	●	●	●	■
	adrenorphin	YGGFMRRV-NH ₂	●	●	●	■
	BAM18	YGGFMRRVGRPEWWMMDYQ	●	●	●	■
	BAM22	YGGFMRRVGRPEWWMMDYQKRYG	●	●	●	■
	BAM8-22	-----VGRPEWWMMDYQKRYG	■	■	■	■
	peptide E	YGGFMRRVGRPEWWMMDYQKRYGGFL	●	●	●	■
prodynorphin	dynorphin A 1-17	YGGFLRRIRPKLKWDNQ	●	●	●	■
	dynorphin A 1-13	YGGFLRRIRPKLK	●	●	●	■
	dynorphin A 2-13	-GGFLRRIRPKLK	■	■	■	■
	dynorphin A 2-17	-GGFLRRIRPKLKWDNQ	■	■	■	■
	dynorphin B	YGGFLRRQFKVVT	●	●	●	■
	leumorphin	YGGFLRRQFKVVTRSQEDPNAYSGELFDA	●	●	●	■
	big dynorphin	YGGFLRRIRPKLKWDNQKRYGGFLRRQFKVVT	●	●	●	■
	α-neoendorphin	YGGFLRKYPK	●	●	●	■
	β-neoendorphin	YGGFLRKYP	●	●	●	■
[Leu]enkephalin	YGGFL	●	●	■	■	
proopio-mélanocortin	α-endorphin	YGGFMTSEKSQTPLVT				
	β-endorphin	YGGFMTSEKSQTPLVTLFKNAIKNAYKKGE	●	●	●	■
	γ-endorphin	YGGFMTSEKSQTPLVTL				
pronociceptin	nociceptin	FGGFTGARKSARKLANQ	■	■	■	●
	nociceptin 1-13	FGGFTGARKSARK-NH ₂	■	■	■	●

Figure 22. Liste des différents peptides opioïdes endogènes, de leurs précurseurs, et affinités avec les récepteurs opioïdiques classiques

Les peptides présentant une affinité avec un des récepteurs aux opioïdes sont indiqués en vert, en rouge s'ils n'en présentent pas. Les peptides grisés représentent ceux n'ayant une affinité qu'avec les AORs.

Adapté de Palmer et al, 2021

Au niveau périphérique, l'expression de certains précurseurs a pu être mesurée (notamment POMC et Penk), et des variations ont été détectées en condition pathologique, ou après délétion de certains gènes tel que celui codant pour le récepteur Nav1.7 (Minett et al., 2015). Cependant, leur rôle fonctionnel, leur localisation précise, et leur implication dans le développement de pathologies associées (notamment en douleur chronique), restent largement inconnus.

Au niveau spinal en revanche, comme illustré dans le chapitre précédent, diverses sous-populations neuronales expriment la dynorphine ou la Penk, et sont utilisés comme marqueurs moléculaires de ces sous-populations. Notamment, il a été démontré que les interneurons inhibiteurs Penk des laminae II et III inhibent l'information mécano(noci)ceptive via la formation de synapse spécifiquement avec les afférences primaires exprimant le récepteur DOR. Ce mécanisme passe par la libération d'enképhaline venant activer ces récepteurs DOR

présynaptiques. En revanche, ces interneurons ne semblent pas impliqués dans la modulation de l'information thermique. De plus, ils sont sous le contrôle des neurones descendants GABAergiques non Penk, exprimant le récepteur MOR. L'effet pronociceptif des neurones décrit dans le chapitre I passerait ainsi par une inhibition de ces interneurons inhibiteurs.

La dynorphine spinale, quant à elle, aurait notamment des effets anti-pruriceptifs. Elle serait produite et libérée par une population d'interneurones inhibiteurs Dyn⁺ et nNOS⁺, et activerait le KOR spinal (Kardon et al., 2014). Dans le cadre de la nociception en revanche, le rôle anti- ou pronociceptif de la dynorphine spinale est débattue (cf. chapitre III).

En revanche, si l'endorphine et la nociceptine sont exprimées et jouent ainsi un rôle au niveau spinal, cela n'a pas été démontré pour le moment.

Enfin, au niveau supra-spinal, on retrouve une expression des 4 ligands dans toutes les structures où sont exprimés et impliqués les récepteurs aux opioïdes (Le Merrer et al., 2009 ; Corder et al., 2018). L'activation des différents récepteurs serait d'ailleurs médiée majoritairement par la libération et fixation de leurs ligands respectifs. Ainsi, on peut associer un rôle pro- ou anti- addictif, nociceptif, ou anxiodépresseur à chacun de ces ligands de façon similaire à leurs récepteurs. Ainsi, l'endorphine, l'enképhaline et la nociceptine sont généralement considérés anti-nociceptives, tandis que la dynorphine serait pro-nociceptive. De même, hormis la nociceptine, tous seraient impliqués dans les effets pro-addictifs. Si l'enképhaline semble jouer un rôle dans les effets anxiolytiques du DOR, la dynorphine quant à elle joue un rôle majoritaire dans le développement d'anxiodépresseur, ou plus globalement dans les effets émotionnels négatifs de la nociception.

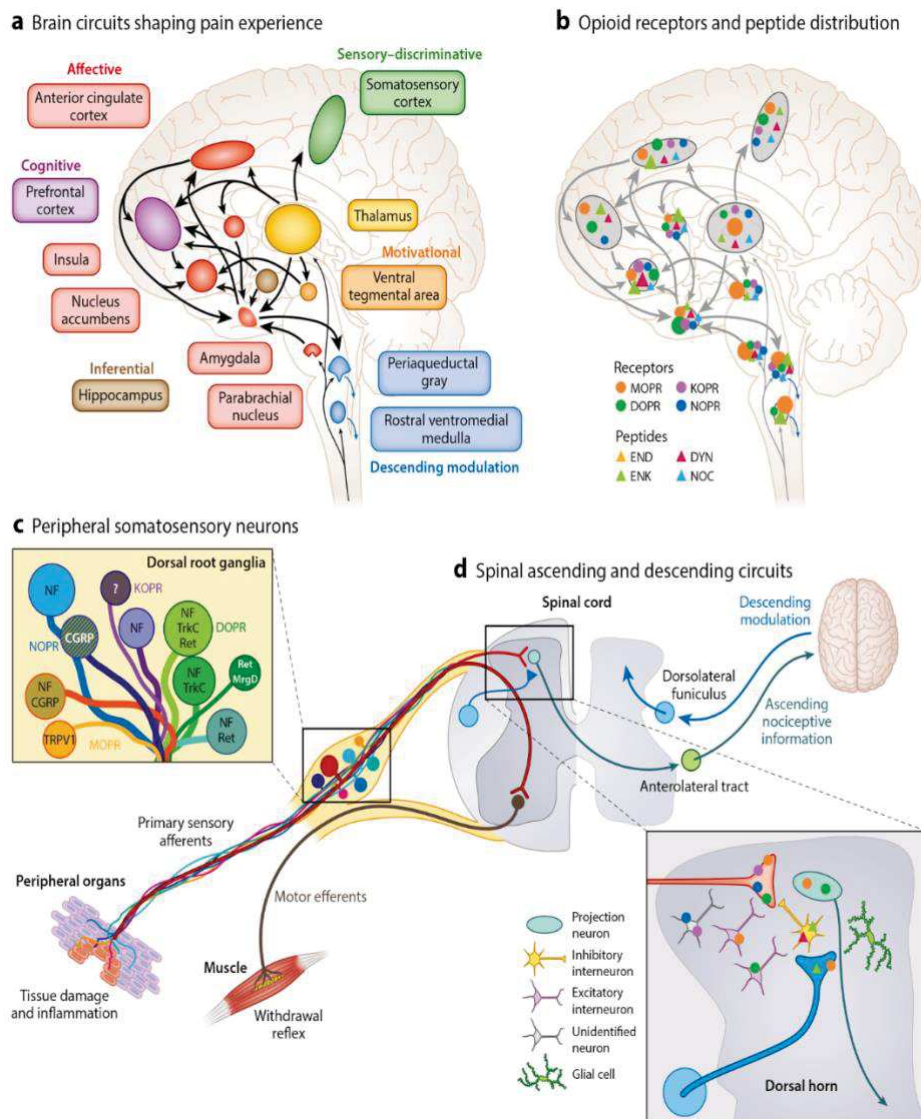


Figure 23. Expression des 4 récepteurs aux opioïdes et de leurs ligands au sein du système somatosensoriel
 a) Représentation des structures composant la matrice douloureuse, et de leur implication dans les différentes composantes de la douleur ; b) expression des récepteurs et ligands de l'EOS dans les différentes structures de la matrice douloureuse ; c) expression des récepteurs opioïdiques au sein du DRG ; d) expression des récepteurs opioïdiques dans les différents sous-types de neurones spinaux.
 Corder et al., 2018

II. Les opioïdes exogènes

1. Histoire des opiacés

Les opiacés désignent les différents ligands exogènes des récepteurs aux opioïdes, issus ou synthétisés à partir de l'opium, substance sécrétée par la graine de pavot somnifère *Papaver somniferum*. De nombreuses molécules connues et très utilisées aujourd'hui, dont la morphine ou la codéine, sont issues de l'opium. Cette substance et les différents opiacés en résultant sont notamment utilisés pour leurs effets analgésiques importants, en faisant une source thérapeutique conséquente dans de nombreuses civilisations depuis l'Âge de pierre jusqu'à aujourd'hui. Par ailleurs, ils sont également connus pour leur induction d'un état de somnolence couplé à une euphorie, à l'origine d'un état onirique et de bien-être. Dû à cela, l'opium a donc aussi été largement consommé dans un cadre récréatif depuis de nombreux siècles. Cependant, on note également d'autres effets qui sont au contraire fortement délétères, notamment le développement d'une accoutumance et d'une importante dépendance pour toutes les substances dérivées de l'opium.

Au cours de l'Histoire, cette dualité entre les effets bénéfiques et les effets néfastes des opiacés a été à l'origine de plusieurs crises sanitaires et sociales, et de conflits géopolitiques majeurs à l'ampleur parfois mondiale. En effet, les opiacés ont longtemps été, et restent encore à présent, les analgésiques les plus largement utilisés par faute d'alternatives aussi efficaces. Aujourd'hui cependant, la prescription et l'usage abusif des opiacés, et ce malgré la connaissance de leurs effets addictifs néfastes, ont mené à une nouvelle crise des opioïdes s'étendant au niveau mondial, qui sera décrite plus amplement à la fin de ce chapitre. Retracer les conséquences de la consommation d'opium au cours de l'Histoire, depuis sa première utilisation il y a 6000 ans jusqu'à nos jours, nous permet de mieux comprendre les différents événements ayant contribué au développement de cette crise. De plus, cela nous permet d'illustrer les enjeux majeurs et encore non résolus qui existent depuis des siècles pour tenter de palier à ces effets dichotomiques des opiacés, et en faire une source thérapeutique plus efficace et sûre.

L'opium est l'une des substances les plus anciennement utilisées, soit pour ses vertus thérapeutiques ou soit dans un cadre récréatif, et est l'une des plus présentes dans de nombreuses civilisations. On a notamment découvert des traces de culture de pavot datant de la période néolithique, et plus particulièrement par la civilisation sumérienne, dès 3500 ans avant J-C. Les sumériens l'appelaient *Hul Gil*, signifiant la « plante de la joie », démontrant que déjà à cette époque elle devait probablement être utilisée à des fins euphorisantes. L'usage de

l'opium s'est ensuite transmis dans différentes civilisations au cours des époques, des babyloniens jusqu'aux grecs et romains, en passant par les peuples assyriens, arabes et égyptiens. Ceux-ci sont notamment les premiers à décrire un usage thérapeutique de l'opium en tant que somnifère, mais aussi en tant que traitement contre la douleur par ses effets analgésiques. Une des principales molécules psychoactives de l'opium découverte des siècles plus tard, la thébaïne, tire d'ailleurs son nom de Thèbes, l'ancienne capitale égyptienne où un commerce important d'opium avait lieu. Plus tard, au cours du II^{ème} millénaire après J-C, l'opium a été introduit en Asie par des peuples arabes et perses, et sous l'influence de l'Empereur moghol Jahângîr, il est ensuite devenu prédominant dans les civilisations indienne et chinoise. La fumerie d'opium en particulier s'est développée en Asie, avant de s'imposer ensuite dans de nombreux pays occidentaux au cours du XIX^{ème} siècle.

La grande importance médicinale et récréative de l'opium dans ces différentes civilisations est également démontrée par les nombreux textes mythologiques, littéraires et scientifiques l'évoquant. On trouve ainsi plusieurs mentions de l'opium dans différents textes datant de la Grèce Antique, comme l'*Odyssée* d'Homère en 800 avant J-C qui le nommait *Népenthès* (signifiant la « non-tristesse ») et l'évoquait pour ses effets euphoriques, ou encore dans la pharmacopée d'Hippocrate, qui était surnommé le « père de la médecine ». Les divinités de la nuit *Nyx*, de la mort *Thanatos*, et du sommeil *Hypnos* dans la mythologie grecque étaient d'ailleurs couramment représentées et associées au pavot.

Autres exemples, on peut citer les traités du médecin et philosophe perse Avicenne au XXI^{ème} siècle après J-C qui vantait l'opium pour ses effets narcotiques importants, en passant par des références dans diverses formules médicinales développées par les médecins impériaux romains, tels que Claude Galien sous le règne de Marc Aurèle, ou encore Andromaque sous le règne de Néron. Même dans la littérature plus contemporaine, l'opium reste un sujet de prédilection pour de nombreux auteurs qui en faisaient le plaidoyer, et montre ainsi l'importance grandissante de l'opium dans les pays européens occidentaux. On peut notamment mentionner Charles Baudelaire ou Victor Hugo, qui décrivent tous deux les effets oniriques de l'opium comme une échappatoire à la réalité, et à cette mélancolie ou *spleen* baudelairien dont ils souffraient.

Cependant, tous ces textes nous informent également des autres effets fortement délétères de l'usage d'opiacés. Edgar Allan Poe par exemple, dans son recueil de nouvelles *Histoires Extraordinaires*, a pu écrire « J'étais devenu un esclave de l'opium, il me tenait dans ses liens, et tous mes travaux et mes plans avaient pris la couleur de mes rêves ». Cette citation est très

révélatrice et représentative de l'opposition existante entre les différents bénéfices et inconvénients liés à l'opium.

Plusieurs événements historiques démontrent également à quels points les effets délétères des opiacés ont pu être à l'origine de différentes crises, parfois similaires à celle existante aujourd'hui. Notamment, très utilisé en Chine de façon récréative mais également comme traitement de la dysenterie (un autre effet des opiacés étant la constipation), le développement d'une importante dépendance à l'opium a eu comme effet de provoquer ensuite un abus de consommation dans la population, abus devenu rapidement incontrôlable. Suite à cela, l'Empereur de Chine Daoguang a tenté d'interdire au cours du XIX^{ème} siècle l'usage de l'opium, et a notamment détruit des quantités importantes provenant du commerce avec le Royaume-Uni. Cette interdiction et destruction des stocks britanniques a été l'élément déclencheur des deux grandes guerres de l'opium, entre les pays occidentaux (Royaume-Uni, France et Etats-Unis) qui en avaient développé un commerce extrêmement lucratif et la Chine, résultant en la défaite de celle-ci et en la levée de l'interdiction. Ces guerres démontrent ainsi à quel point les opiacés ont occupé une place de plus en plus prédominante dans différentes cultures au cours du temps, jusqu'à être au centre d'enjeux commerciaux et géopolitiques mondiaux.

Parallèlement aux guerres de l'opium et au développement de fumoirs à opium en Europe, c'est également au cours du XIX^{ème} siècle que les premières molécules psychoactives contenues dans l'opium ont pu être isolées, et ont permis par la suite le développement de différents opiacés de synthèse. La morphine a ainsi été la première molécule issue de l'opium à être décrite en 1817 par Friedrich Sertürner. Celui-ci lui a donné son nom en s'inspirant du dieu des songes et des rêves *Morphée* dans la mythologie grecque ; La morphine fut ainsi le premier analgésique développé, et largement utilisé au cours de la guerre civile aux États-Unis. L'invention contemporaine de la seringue hypodermique en 1853 par Charles Pravaz a particulièrement contribué à cette utilisation massive lors de la guerre, en facilitant la distribution et l'auto-administration de morphine par les soldats directement sur le champ de bataille. A nouveau, les effets bénéfiques importants de la morphine ont été contrastés par le développement d'une forte dépendance des soldats pour cette substance, résultant en un sevrage difficile lors de l'arrêt. Ces effets néfastes très importants ont même été surnommés par la suite « the Soldier's disease », aux conséquences sociales et économiques importantes en Amérique dans l'après-guerre. Par la suite, de nombreuses autres molécules de l'opium ont été isolées et développées en tant qu'analgésiques, comme la codéine ou la thébaïne, toutes présentant les mêmes effets secondaires néfastes. Différents opiacés ont ensuite été synthétisés à partir de la morphine, avec comme objectif de potentialiser ses effets analgésiques, sans provoquer de phénomène de

dépendance. C'est dans ce but que l'héroïne a été synthétisée par Alder Wright puis Felix Hoffmann, et avait été commercialisée à l'origine comme analgésique, utilisée notamment en tant que sirop contre la toux. Le nom héroïne a d'ailleurs été donné pour illustrer les actions « héroïques » de cette substance, décrite comme plus puissante que la morphine mais n'entraînant pas de dépendance. Ironiquement, cette substance s'est révélée bien plus addictive que la morphine, et a fini par être interdite et à devenir source d'un commerce illicite important, et encore incontrôlable à l'heure actuelle.

Depuis, aucun autre traitement à base d'opiacé développé ne s'est affranchi de ces effets d'accoutumance et de dépendance. Mais les enjeux financiers et commerciaux majeurs que représentent les opiacés (comme illustré par les guerres de l'opium par exemple) associés à leur efficacité analgésique inégalée et à leur popularité mondiale, a incité au maintien de leur prescription et utilisation excessive au cours des XX^{ème} et XXI^{ème} siècles, et ce malgré les nombreux exemples des risques de consommation d'opiacées. Les derniers synthétisés (parmi lesquels on peut citer l'oxycodone, dérivé puissant de la thébaïne, ou encore le fentanyl), sont ainsi majoritairement responsables, pour toutes ces raisons, de la crise des opioïdes sévissant aujourd'hui. Enfin, il est important de noter qu'en plus de cette dépendance, la plupart des opiacés présentent également de nombreux autres effets secondaires limitant leur utilisation thérapeutique sur le long terme, et qui seront abordés dans ce chapitre.

Ainsi, il devient primordial de trouver de nouvelles approches thérapeutiques, notamment dans le cadre de la douleur, en s'affranchissant des effets délétères provoqués par les opiacés. C'est en particulier à cette fin qu'une meilleure caractérisation du système opioïdique endogène, et de son altération en condition pathologique est nécessaire. Associé à cela, une meilleure compréhension des mécanismes d'action des opiacés exogènes est également requise pour espérer palier à leurs effets néfastes, en préservant leurs effets analgésiques qui présentent toujours un intérêt thérapeutique non négligeable.

2. Usage clinique des opiacés

L'usage clinique des différents opiacés dérivés de la morphine peut varier fortement en fonction des pays. Cependant, on constate que dans la majorité des pays européens ou anglophones, ils sont très largement utilisés pour traiter les douleurs modérées à sévères, et ce dès la 1^{ère} intention, ou 2nde dans les cas où le paracétamol prescrit en 1^{ère} intention s'est révélé inefficace. Cela s'explique notamment par une efficacité significativement plus importante des traitements opioïdes comparé aux traitements non-opioïdiques pour traiter tous types de

douleur, et notamment chronique (Rosenblum et al., 2008). Ainsi à titre d'exemple, on dénombre pratiquement 200 millions de prescriptions d'opiacés en 2019 aux États-Unis. En comparaison, on estime une prévalence allant de 20 à 50 millions d'américains déclarés en situation de douleur modérée à sévère, entre 2000 et 2015 (Andrew et al., 2014). Parmi les différents opiacés prescrits, on peut citer notamment le tramadol, l'hydrocodone, l'oxycodone, le fentanyl et la morphine. Tous ces opiacés agissent majoritairement sur le récepteur MOR, avec une affinité moins importante pour les autres récepteurs opioïdiques, et présentent les mêmes effets secondaires que ceux associés classiquement à l'usage de morphine (avec une sévérité plus ou moins importante en fonction de l'opiacé). Néanmoins, il existe tout de même une disparité importante dans l'efficacité de ces opioïdes, en fonction du type de douleur. Notamment, leurs effets analgésiques sont particulièrement reconnus contre les douleurs avec une composante inflammatoire prépondérante (comme par exemple les douleurs induites par une brûlure, douleurs liées à une tumeur ou un cancer, ou encore l'arthrite inflammatoire). A l'inverse, pour traiter efficacement les autres types de douleur ou la composante inflammatoire n'est pas majoritaire (telles que les douleurs issues de lésions nerveuses), on note la nécessité d'employer des doses d'opioïdes pouvant être 4 à 5 fois supérieures à celles prescrites dans les différentes douleurs inflammatoires, augmentant également le risque d'effets secondaires (Nadeau et al., 2021). Cela montre ainsi la nécessité de reconsidérer la prescription massive et systématique d'opioïdes en clinique en fonction du type de douleur.

3. La morphine

3.1. Pharmacologie

La morphine est l'un des opioïdes utilisé le plus classiquement en clinique. Au niveau structural, elle présente une analogie importante avec l'enképhaline, et de ce fait, exerce son action principalement via l'activation du récepteur MOR, ainsi que du récepteur DOR (bien qu'à l'inverse de l'enképhaline, elle possède une affinité relativement moins importante pour DOR) (Paul et al., 2021). Cette activation des récepteurs aux opioïdes s'effectue dans l'entièreté de l'organisme sans grande spécificité. En effet, après le métabolisme de la morphine au niveau du foie suite à son administration, le métabolite principal synthétisé et majoritairement responsable des effets de la morphine, la morphine-6-glucoronide (M6G), est diffusé dans tout l'organisme et est également capable de traverser efficacement la barrière hémato-encéphalique (De Gregori et al., 2012). Après sa fixation sur les récepteurs opioïdiques, les voies de signalisation classiques de ceux-ci seront engagées (figure 24). Ainsi, les sous-unités α et β/γ

vont se dissocier du récepteur, et la sous-unité α va venir inhiber la voie AMPc et PKA via le blocage de l'AC (Pasternak & Pan, 2013). Le blocage de cette voie va résulter en l'inactivation de différents canaux transmembranaires impliqués dans l'excitation neuronale, ainsi qu'en l'inhibition du facteur de transcription CREB impliqué dans la synthèse de différents neuropeptides et neurotransmetteurs, notamment excitateurs. En parallèle, les sous-unités β/γ vont quant-à-elles bloquer l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants et activer au contraire des canaux potassiques, notamment les canaux GIRK, résultant en une hyperpolarisation membranaire. Ces effets cumulés sont ainsi à l'origine de l'effet analgésique de la morphine en inhibant les neurones responsables de la transmission et intégration de l'information nociceptive.

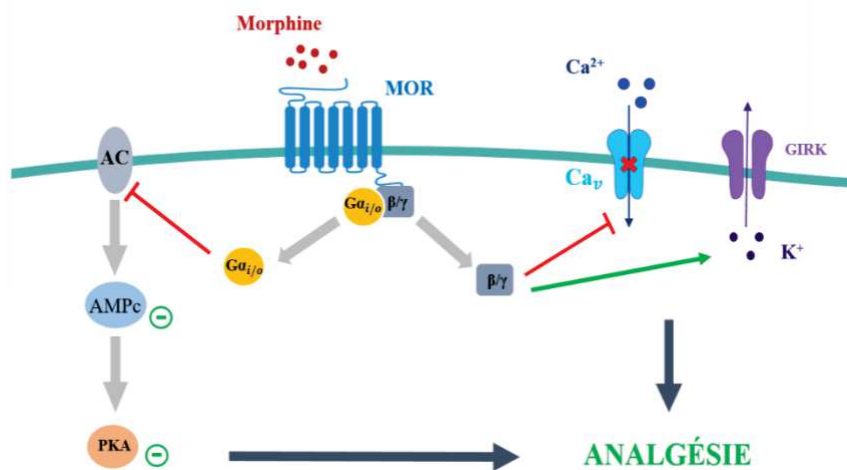


Figure 24. Voies de signalisation impliquées dans l'effet analgésique de la morphine
La fixation de la morphine au récepteur MOR entraîne sa dissociation avec les sous-unités α et β/γ , venant inhiber la voie AMPc pour la sous-unité α , et moduler l'ouverture de canaux ioniques pour la sous-unité β/γ .

3.2. Effets secondaires

Parmi les nombreux effets secondaires liés à l'usage de morphine ou d'autres opiacées, on peut citer de la constipation, des dépressions respiratoires, des nausées et vomissements, de la somnolence, ou encore des dérèglements du système immunitaires ou hormonaux. Il est à noter que MOR en est majoritairement responsable, en étant activé soit directement dans les structures cérébrales modulant ces effets, soit au niveau des terminaisons nerveuses innervant les organes impliqués (Roeckel et al., 2017). Si l'association avec différents traitements peuvent

palier à la plupart de ces effets, d'autres en revanche limitent fortement l'utilisation clinique d'opioïdes sur le long terme dans le traitement des douleurs.

a. Addiction

L'effet délétère principal de la morphine, déjà largement mentionné dans ce chapitre, est un effet renforçant positif pouvant mener au développement de dépendance et d'addiction à la morphine, notamment lors d'un usage répété. Différents mécanismes au niveau supraspinal ont été démontré pour expliquer cet effet renforçant (Lutz & Kieffer, 2013). En particulier, la désinhibition des neurones dopaminergiques de la VTA permettrait l'activation de l'entièreté du système de la récompense. L'activation de MOR serait plus particulièrement impliquée dans cette désinhibition : il est en effet exprimé au niveau des afférences GABAergiques (provenant notamment du pallidum ventral et du noyau rostromedian du tegmentum) qui inhibent de façon tonique les neurones dopaminergiques de la VTA. L'inhibition de ces afférences via l'activation de MOR provoquerait donc l'activation des neurones dopaminergiques de la VTA. De plus, MOR agirait également directement au sein de la VTA via l'inhibition d'interneurones GABAergiques, mais également de certaines sous-populations dopaminergiques, qui exerceraient également un contrôle négatif sur des afférences dopaminergiques de la VTA.

Le rôle des autres récepteurs dans ces effets est plus controversé. Différentes études ont montré un rôle pro-addictif de DOR et KOR qui pourrait participer au développement des effets addictifs des opiacés par le biais d'autres mécanismes (Darcq & Kieffer, 2018). Notamment, le DOR préfrontal serait nécessaire dans les effets motivationnels de la morphine, et son expression au niveau de l'hippocampe interviendrait dans les processus cognitifs d'apprentissage nécessaire au développement d'un renforcement. D'autres études montrent à l'inverse leur implication dans le développement d'une addiction à d'autres substances, mais suggèrent qu'ils n'interviendraient pas dans celle liée aux opioïdes.

b. Tolérance et hyperalgésie

La tolérance à la morphine désigne le développement d'une accoutumance pharmacologique résultant en une diminution de l'effet analgésique de la morphine pour une même dose, entraînant ainsi la nécessité d'augmenter les doses au cours du temps pour maintenir cet effet analgésique.

L'hyperalgésie induite par la morphine ou par d'autres opiacés (qu'on nomme également OIH, « Opioid-Induced Hyperalgesia ») désigne quant à elle le développement paradoxal d'une hypersensibilité à la douleur, induite par l'usage chronique d'opioïdes. De

façon similaire au développement d'une tolérance, cet effet secondaire entraîne ainsi la nécessité de stopper le traitement, ou d'augmenter progressivement les doses de morphine pour palier à cette OIH, l'augmentation des doses entraînant à son tour une augmentation des différents effets secondaires de la morphine.

Le développement d'une tolérance est particulièrement commun chez tous les patients sous traitement opioïdique. On note en revanche une certaine variabilité interindividuelle dans le développement d'OIH, suggérant la présence de facteurs de risques jouant un rôle dans son développement (Kum et al., 2020). Il semblerait que ces facteurs de risques, ainsi que certains mécanismes participant à l'établissement d'une OIH, soient similaires à ceux intervenant dans les processus de sensibilisation et de plasticité dite « maladaptative » des circuits nociceptifs responsables de la chronicisation douloureuse (qui seront abordés dans le chapitre III) (Roedel et al., 2016). Cependant, d'un point de vue cellulaire et moléculaire, les mécanismes précis et les structures participant à chacun de ces effets secondaires restent encore controversés.

Le phénomène de tolérance serait expliqué notamment par une désensibilisation du récepteur MOR résultant en une perte de réponse à la morphine. Cette désensibilisation, dite homologue, est induite par la phosphorylation du récepteur suite à son activation via différentes kinases (notamment les GRKs, « G protein-coupled receptor kinases »), provoquant ensuite le recrutement de la β -arrestine 2 et sa fixation au niveau des sites phosphorylés du récepteur (Rivat & Ballantyne, 2016). Cela va provoquer à la fois un blocage des voies de signalisation engagées par les sous-unités des protéines G, une activation de différentes voies de signalisation telles que la voie MAPK/ERK et p38, et une internalisation suivie d'une déphosphorylation et d'un recyclage du récepteur à la membrane (figure 25). En fonction des opiacés et de leur capacité respective à phosphoryler le récepteur, cette désensibilisation peut intervenir plus ou moins rapidement (quelques minutes à quelques heures) et de façon plus ou moins prononcée, expliquant les différences dans la durée des effets analgésiques et dans le développement d'une tolérance selon l'opiacé utilisé (Al-Hasani & Bruchas, 2011).

D'autres processus de désensibilisation hétérologue lors d'un usage chronique de morphine participent également au développement d'une tolérance, où d'autres voies de signalisation (notamment impliquant PKC γ ou ERK) sont capables d'internaliser le récepteur MOR.

Les mécanismes impliqués dans la tolérance vont participer également au développement d'une OIH de façon indirecte par l'internalisation du MOR, mais également par

l'activation des voies MAPK/ERK et p38 qui sont connues pour être pronociceptives (Rivat & Ballantyne, 2016 ; Kondo & Shibuta, 2020). Ajouté à cela, les processus de plasticité et sensibilisation impliqués dans l'OIH seraient également dépendants du MOR. En particulier, il a été suggéré que ce serait le MOR exprimé au niveau des fibres afférentes nociceptives qui serait impliqué. Ainsi, bloquer le MOR périphérique permettrait d'empêcher le développement d'OIH, en maintenant ses effets analgésiques qui seraient dû au MOR central (Corder et al., 2017).

D'autres études suggèrent que ces effets d'OIH ne passeraient non pas par une altération du niveau d'expression du MOR membranaire, mais par un changement d'expression dans les voies de signalisation engagées par le récepteur. En particulier, le traitement chronique à la morphine induirait un couplage du MOR avec la protéine Gs au lieu de la protéine Gi, résultant ainsi en la production d'AMPc et la transcription de plusieurs facteurs pronociceptifs (Chakrabarti et al., 2005). Il a été suggéré que l'adrénomédulline, peptide qui présente une homologie importante avec cGRP et qui est surexprimé au niveau spinal en condition de morphine chronique, jouerait un rôle important dans ces effets (Wang et al., 2016).

Il est également important de noter que plusieurs études ont suggéré un rôle du récepteur DOR dans les processus de tolérance et OIH. En effet, bloquer ce récepteur serait suffisant pour prévenir le développement des effets secondaires de certains opiacés (Wang et al., 2015). Ainsi, certaines stratégies visant à activer MOR en bloquant DOR pour garder un effet analgésique tout en bloquant les effets de tolérance et OIH sont en cours d'études depuis plusieurs années (Dietis et al., 2009). Cependant, une controverse importante existe sur le rôle précis du DOR dans ces effets, d'autres études montrant à l'inverse des effets bénéfiques d'une activation spécifique du DOR. Cela est dû en particulier au manque de caractérisation du DOR au niveau de son expression cellulaire et des voies de signalisation spécifiques. En effet, si l'activation aiguë ou prolongée de DOR va avoir les mêmes effets que pour MOR (figures 24 & 25), il existerait des différences dans les kinases impliquées, dans l'expression intracellulaire et membranaire de DOR en condition physiologique et pathologique, ou encore dans le recyclage après phosphorylation, plusieurs études suggérant une dégradation dans les lysosomes plutôt qu'un recyclage à la membrane (Gendron et al., 2015). Enfin, la différence existant dans la régulation des isoformes de l'AC par chacun de ces récepteurs pourrait également expliquer ce rôle spécifique du DOR comparé au MOR. En effet, l'AC5 inhibée plus particulièrement par DOR, serait impliquée dans les effets secondaires de la morphine (Kim et al., 2007), et un défaut de son inhibition dû à la dégradation de DOR pourrait être à l'origine du développement d'OIH et tolérance (Pineyro et Nagi, 2021), bien que cela reste à prouver.

Enfin, plusieurs études suggèrent un rôle de la microglie spinale dans les effets d'OIH, qui serait activé par la morphine et serait à l'origine de la libération de nombreux médiateurs pronociceptifs. MOR a été démontré comme étant exprimé dans la microglie, cependant le rôle de ce MOR microglial dans ces effets reste assez controversé en fonction des études (Reiss et al., 2020 ; Corder et al., 2017).

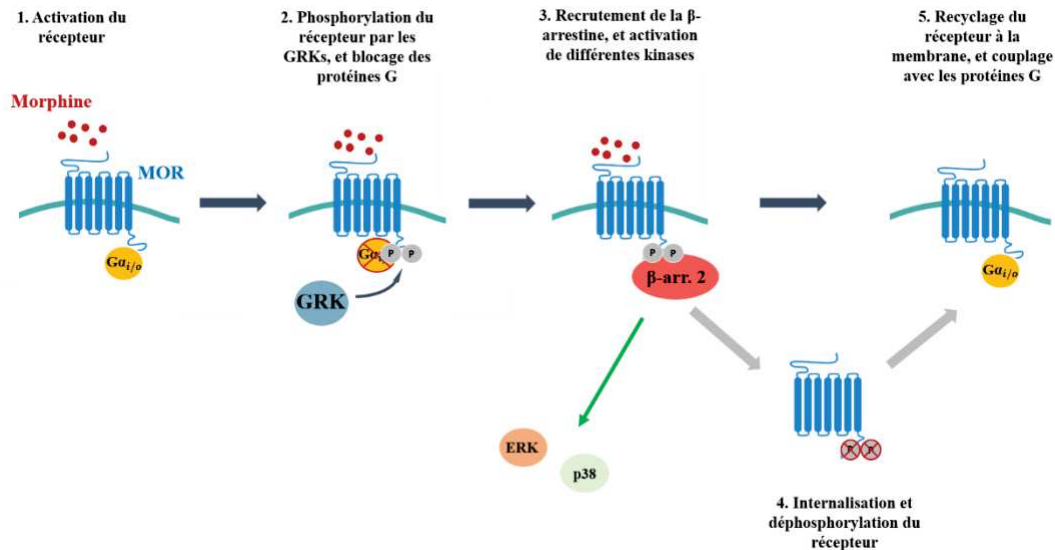


Figure 25. Processus de désensibilisation du récepteur MOR impliqués dans la tolérance et l'OIH

4. La crise des opioïdes

Comme il a été décrit précédemment, l'utilisation massive d'opioïdes dans le traitement des douleurs modérées à sévères, sans regard de leur efficacité réelle en fonction du type de douleur ni des effets secondaires pourtant à présent bien connus, a conduit aujourd'hui à une crise des opioïdes dans plusieurs pays.

En particulier, la promotion par des groupes pharmaceutiques aux Etats-Unis (où la crise est majoritaire) dans les années 1990 de leurs opioïdes de synthèse, et leur affirmation que ces opioïdes ne provoquent pas de phénomène de dépendance et d'addiction, a résulté en une augmentation exponentielle d'ordonnances d'opiacés pour traiter la douleur (Nadeau et al., 2021). Cette augmentation s'est aussi observée plus tard dans d'autres pays, notamment anglophones (Canada, Royaume-Uni, Australie), ou encore en Suède où la prescription d'opioïdes a augmenté de 150% entre 2000 et 2015 (Bäckryd et al., 2021). Ainsi, cette crise commence à se témoigner ces dernières années à un niveau mondial.

En conséquence, on a observé aux États-Unis une augmentation drastique de consultation pour des problèmes d'addiction aux opiacées, mais aussi du nombre de décès liés à des overdoses ou à des dépressions respiratoires induites par les opioïdes. Une grande partie de ces overdoses est notamment due à une consommation illégale et non contrôlée d'opiacés, faisant suite au développement d'une addiction ayant pour origine une prescription d'opioïdes dans un cadre médical. En particulier, la consommation d'héroïne dans les années 2000, puis de fentanyl (qui est moins cher, plus facilement procurable, 50 fois plus puissant, mais avec un seuil d'overdose 100 fois plus bas que l'héroïne) à partir des années 2010, a fortement augmenté et est responsable de la majorité des overdoses (estimées à environ 70 000 par an, et en constante augmentation) (Lyden & Binswanger, 2019). Les conséquences de cette crise sont à la fois sanitaires, sociales et économiques. Notamment, le nombre de décès liés aux opioïdes est à l'origine d'une baisse de l'espérance de vie aux États-Unis depuis 2014, la première depuis 1918. Enfin, la mise en place de traitements et centres de soin, et les conséquences liées à l'addiction aux opioïdes (perte d'emploi ou de productivité, instabilité psychologique, dépenses importantes dans l'achat illégal d'opiacés, ...) ont un coût estimé à 90 milliards de dollars par an.

Ainsi dans ce chapitre, nous avons pu voir la place importante qu'occupent les acteurs du **système opioïdique endogène** dans tout le système somatosensoriel, et notamment dans **la modulation** des différentes étapes et aspects de l'intégration du **signal nociceptif**. Leur importance est d'ailleurs illustrée par une efficacité significativement plus importante des traitements thérapeutiques ciblant ces acteurs, comparé aux autres traitements existants actuellement dans le cadre du traitement de la douleur, en faisant des cibles thérapeutiques majeures.

Ce chapitre a également pu illustrer la grande variété de fonctions physiologiques dans lesquelles interviennent les acteurs du système opioïdique, en dehors de cette modulation du signal nociceptif. Néanmoins, il illustre également notre méconnaissance et les **controverses existant encore actuellement, sur l'expression, l'implication, et les mécanismes d'action et de modulation précis de chacun de ces acteurs**, dans ces différentes fonctions, en condition physiologique ou pathologique.

Pour ces différentes raisons, **l'avantage thérapeutique** que représente ce système opioïdique, en particulier dans un contexte de douleur chronique, est fortement contrasté par des **effets secondaires néfastes et importants**, qui sont même aujourd'hui à l'origine d'une **crise sanitaire et économique majeure**.

Une meilleure caractérisation de ce système, en particulier dans un contexte de douleur chronique, et **des mécanismes intervenant à la fois dans sa dérégulation en condition pathologique**, et dans ceux intervenant dans **le développement des effets délétères des opioïdes exogènes**, est donc nécessaire.

Dans le dernier chapitre, nous nous intéresserons donc à décrire les **mécanismes cellulaires et moléculaires intervenant dans les différents types de douleur chronique**, et comment ce système opioïdique endogène se retrouve dérégulé. En particulier, nous nous intéresserons à **un nouvel acteur de la chronicisation douloureuse identifié par le laboratoire ces dernières années**. Son implication dans la douleur chronique, mais également dans les effets délétères de la morphine, seront décrits au travers de trois publications de l'équipe.

Chapitre III

Transition de la douleur aiguë à la douleur chronique

I. Définition et contexte clinique

D'après la dernière classification internationale des maladies entrant en vigueur en 2022 (ICD-11), la douleur chronique est définie comme toute douleur persistant plus de 3 mois. Dans cette classification, qui est la première reconnaissant officiellement la douleur chronique comme une maladie en soi, on distingue les **douleurs chroniques primaires** (sans origine ou cause précise justifiant l'origine de la douleur), et les **douleurs chroniques secondaires** (avec une cause pouvant être déterminée). En fonction de la cause et des symptômes, ces types de douleurs chroniques peuvent être sous-divisés en plusieurs autres catégories (Scholz et al., 2019). Notamment, parmi les douleurs secondaires, on peut distinguer :

- Les **douleurs chroniques neuropathiques**, ayant pour origine une lésion ou maladie du système nerveux somatosensoriel
- Les **douleurs chroniques post-opératoires**, faisant suite à une opération chirurgicale et persistant après rétablissement complet de l'opération
- Les **douleurs chroniques cancéreuses**, provoquées par le cancer en lui-même, ou par les traitements anti-cancéreux
- Les **douleurs chroniques viscérales**, correspondant à des douleurs au niveau des organes internes
- Les **douleurs chroniques musculosquelettiques**, au niveau des muscles, os, tendons ou articulations
- Les **douleurs chroniques orofaciales et migraineuses**, considérées comme chroniques si elles persistent plus de 2h par jour de façon journalière pendant au moins 3 mois

Dans sa globalité, les douleurs chroniques touchent environ 20% de la population mondiale, représentant ainsi 1,5 milliard de personnes. En plus des symptômes douloureux, pouvant à eux seuls impacter fortement la qualité de vie (à la fois au niveau professionnel et personnel), la douleur chronique est associée au développement de différentes comorbidités, et notamment d'anxiodépression, d'une vulnérabilité à l'addiction, ou encore différents troubles de l'humeur et du sommeil (Dahlhamer et al., 2018). Le coût annuel global que représente la douleur chronique, comprenant à la fois les coûts médicaux liés à cette pathologie mais également les conséquences sociales et économiques telles qu'une baisse de productivité ou un absentéisme prolongé dans la vie professionnelle par exemple, est estimé à plusieurs milliers

de milliards de dollars (Leadley et al., 2012). Aux États-Unis seuls par exemple, le coût annuel est estimé à près de 700 milliards de dollars par an.

Outre l'emploi d'opioïdes exogènes, dont les avantages et inconvénients ont déjà été décrits, différents traitements sont utilisés dans le cadre de douleurs chroniques. Notamment, on peut citer l'emploi de différents antidépresseurs tricycliques, d'antiépileptiques (gabapentine ou prégabaline), ou encore de cannabinoïdes, plus particulièrement à base de cannabidiol (CBD), ou dans certains pays en fonction de la législation, à base de tétrahydrocannabidiol (THC) (Martinez et al., 2010). Cependant eux aussi présentent de nombreux désavantages limitant leur utilisation à long terme : en plus des effets communs de tolérance, la plupart de ces traitements ne sont pas spécifiques à la douleur chronique, présentent de nombreux autres effets secondaires communs ou distincts à ceux des opiacés, et/ou ne présentent pas d'efficacité chez une partie des patients. Le fait qu'une partie des personnes atteintes de douleurs chroniques soient résistante à la plupart des traitements existant actuellement pose notamment un problème majeur.

Enfin, en fonction du type de douleur chronique, comme déjà montré pour la morphine dans le chapitre précédent, ces différents traitements vont présenter plus ou moins d'efficacité. Cela est notamment dû au fait que certaines douleurs peuvent présenter des mécanismes propres et distincts de ceux impliqués dans d'autres formes de douleur.

Dans ce chapitre, nous présenterons plus particulièrement les mécanismes identifiés dans la chronicisation de certains types de douleurs qui nous intéressent plus particulièrement au sein du laboratoire (neuropathique, postopératoire et inflammatoire), bien que certains puissent être communs à d'autres types de douleurs.

II. Mécanismes de chronicisation douloureuse

La transition de la douleur aiguë à la douleur chronique résulte du cumul de différents facteurs. Premièrement, il est montré que l'histoire du patient joue un rôle important, et différents facteurs de risques ont été identifiés comme pouvant influencer cette chronicisation douloureuse. Celle-ci est également le résultat d'une **sensibilisation** à la fois **périphérique** et **centrale** du système somatosensoriel, conduisant notamment à une hyperexcitabilité neuronale. Cette dernière est associée à une diminution du seuil nociceptif, provoquant d'un côté une **allodynie** (où un signal normalement non nociceptif va le devenir), et d'un autre côté une

hyperalgésie (où la perception d'un signal nociceptif va être exacerbée) (Figure 26). La sensibilisation du système somatosensoriel est provoquée par la dérégulation des systèmes pro- et antinociceptifs ; les premiers étant anormalement activés sur le long terme, tandis que les seconds sont anormalement inhibés. Tous ces processus sont dus notamment à une plasticité du système nerveux se mettant en place dès la transmission d'un signal nociceptif aigu, comme cela a été évoquée pour l'OIH, qui est à l'origine de modifications sous-jacentes sur le long terme. L'activation du système immunitaire, et notamment de différents acteurs pro-inflammatoires, va également avoir un rôle important dans la mise en place de cette hyperexcitabilité et activation de systèmes pronociceptifs.

A noter que si la douleur chronique est communément considérée comme une pathologie néfaste pour l'organisme, et ainsi cette plasticité du système nerveux est généralement désignée comme « maladaptative », deux études suggèrent au contraire que cette sensibilisation au long terme aurait un rôle adaptatif pour la survie, en exacerbant les comportements d'attention et de défense de l'animal (notamment envers les prédateurs) pour compenser son état de vulnérabilité induit par une blessure (Lister et al., 2020 ; Crook et al., 2014). Des études plus approfondies sont en revanche nécessaires pour confirmer ou non cette hypothèse et les premiers résultats obtenus pour la soutenir, encore très préliminaires.

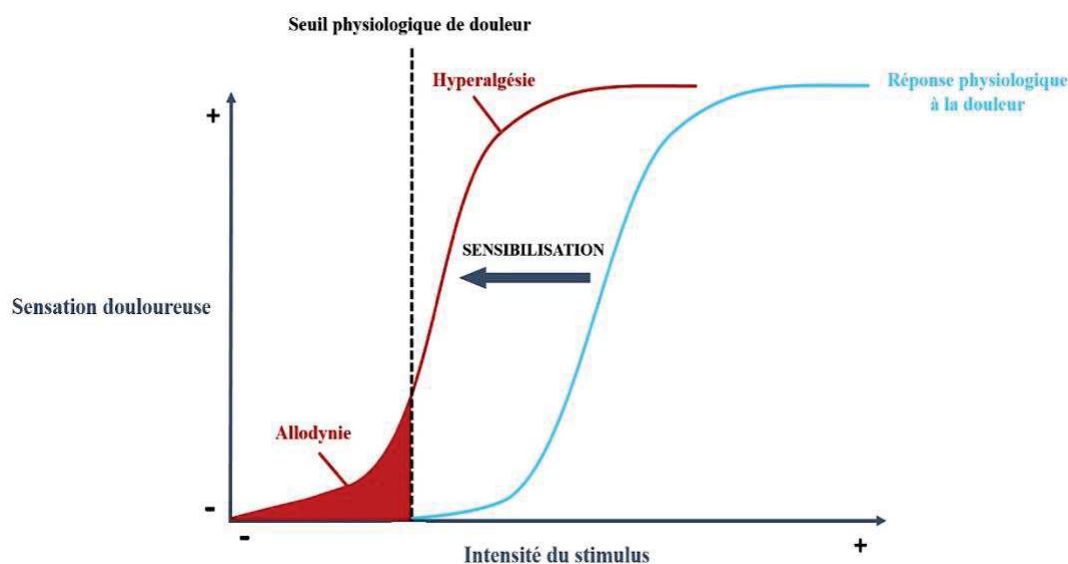


Figure 26. Représentation des mécanismes d'allodynie et d'hyperalgésie suite à la sensibilisation à la douleur

1. Facteurs de risques

Il est aujourd'hui connu que nombreux facteurs de risques et prédispositions influencent la transition de la douleur aiguë vers la douleur chronique (Mills et al., 2019). Associé à cela, des recherches importantes sont effectuées pour tenter d'identifier différents biomarqueurs permettant d'anticiper un risque de chronicisation douloureuse chez les patients.

Ainsi, on peut classer ces facteurs de risques en différentes catégories :

- **Facteurs démographiques** : le sexe et l'âge sont deux facteurs importants dans le développement de douleurs chroniques. Notamment, un âge plus avancé est associé à un risque accru de développer des douleurs chroniques, dû à la multiplication d'événements au cours de l'histoire du patient pouvant être considérés comme des facteurs de risques de chronicisation. La catégorie socio-professionnelle, les revenus et l'inactivité professionnelle sont également des facteurs devant être pris en compte, puisque les personnes ayant une bonne situation financière et professionnelle sont statistiquement moins aptes à développer de douleurs chroniques. Aussi, statistiquement, il est reconnu que les femmes ont plus de risques d'être en situation de douleur chronique, et que ces douleurs apparaissent en général à différents endroits de l'organisme, comparé aux hommes qui déclarent des douleurs plus localisées. Enfin, il semblerait qu'il existe également des différences dans le ressenti de la douleur, les femmes déclarant des douleurs de plus haute intensité et impactant plus fortement la qualité de vie. Aujourd'hui, des recherches importantes sont effectuées pour identifier l'importance de l'âge et du genre dans la chronicisation douloureuse.
- **Style de vie** : La consommation régulière d'alcool et de tabac, l'inactivité physique, la malnutrition et le manque d'exposition au soleil (et donc le manque de vitamines D) sont tous corrélés à un risque plus important de développer des douleurs chroniques.
- **Facteurs cliniques et psychologiques** : Le plus grand risque clinique associé au développement de douleur chronique est un antécédent d'événements douloureux aigus, responsables d'une sensibilisation de l'organisme (qui sera décrite en détail dans les parties suivantes). Outre ces événements douloureux, un antécédent des comorbidités associées aux douleurs chroniques est également suffisant pour sensibiliser l'organisme,

et notamment la présence de troubles psychiatriques tels que l'anxiodépression, ou encore des troubles du sommeil ou de l'humeur. De même, des événements traumatisants, notamment pendant l'enfance, peuvent sensibiliser l'organisme sur le long terme. En plus de ces troubles psychiatriques, l'état psychologique de l'individu, et notamment sa perception et attitude face à un événement douloureux, peuvent également influencer l'intensité et la durée de la douleur. D'autres pathologies comme des troubles cardiaques ou pulmonaires, ou des traumas de la moelle épinière, sont également corrélés au développement de douleurs chroniques. Souvent lié au style de vie, l'obésité est également un facteur de risque important.

- **Facteurs génétiques** : la présence de clusters familiaux de douleurs chroniques, et d'une possible hérédité, suggère une part importante de la génétique dans les facteurs de risques à la douleur chronique. A l'heure actuelle, plus de 150 gènes différents ont été associés à la chronicisation douloureuse, généralement associés au système opioïdérique endogène, à des facteurs de stress, ou encore à des acteurs pro-inflammatoires du système immunitaire.

Tous ces facteurs de risque sont communs aux différents types de douleur. Cependant, il est à noter que dans le cas de la douleur postopératoire, d'autres facteurs pré-, péri- et post-opératoires peuvent également influencer la chronicisation douloureuse (Joshi & Ogunnaike, 2005). Ainsi nous pouvons distinguer en

- **Préopératoire**, l'attention accordée au patient et l'attitude du corps médical peuvent influencer positivement ou négativement la douleur, de façon similaire à un effet placebo ou nocebo.
- **Péri-opératoire**, le type d'opération, sa durée, le tissu opéré, et surtout les dégâts causés au niveau du tissu ou de son environnement, sont différents facteurs jouant également sur le risque de développer une douleur chronique.
- **Postopératoires**, les anesthésiques et traitements utilisés peuvent avoir une grande influence sur la durée de la douleur postopératoire. En particulier, il a été montré que l'usage de hautes doses d'opiacés tels que le fentanyl, ou la consommation d'opiacés en amont de l'opération, étaient liés au développement d'une douleur postopératoire persistante chez de nombreux patients (pour revue voir Richebé et al., 2018), passant notamment par la mise en place d'une OIH. Ainsi il a été montré chez le rongeur dans un modèle de douleur incisionnel de la patte arrière de l'animal que l'administration

d'une forte dose de fentanyl pendant la chirurgie entraînait une exagération tant en amplitude qu'en intensité de l'hypersensibilité provoquée par l'incision (Richebé et al., 2005). Des résultats similaires ont été observés après l'administration de remifentanyl (Cabañero et al., 2009). Limiter l'usage d'opioïdes exogènes à des doses plus restreintes et seulement en postopératoire, en employant des stratégies anesthésiques sans opiacés, a d'ailleurs montré une meilleure efficacité dans le traitement de la douleur postopératoire aiguë. Pour finir, l'attention accordée au patient et l'attitude et l'accessibilité du corps médical suite à l'opération semblent tout aussi important qu'en préopératoire pour prévenir les douleurs postopératoires persistantes.

2. Sensibilisation périphérique

La sensibilisation périphérique est due à un changement d'expression et d'activité de différents gènes, correspondant notamment à différents canaux ioniques exprimés au niveau des afférences primaires, des récepteurs et neuropeptides spécifiques de chaque type de fibres et présentés au cours du chapitre I, ou encore différentes cytokines pro-inflammatoires et facteurs neurotrophiques libérés par le système immunitaire (Kiguchi et al., 2018 ; Sun et al., 2018). Si certains de ces acteurs semblent impliqués dans la sensibilisation périphérique quel que soit le type de stimulus nociceptifs, on note toutefois que des gènes peuvent être spécifiquement impliqués ou leur profil d'activation (durée et temporalité de l'activation suite à la génération du signal nociceptif) varier en fonction du stimulus nociceptif.

Dans les mécanismes de sensibilisation postopératoire, on peut plus particulièrement citer une suractivation du canal ionique sodique voltage-dépendant **Nav1.7** (Sun et al., 2018), une suractivation des canaux de la famille TRP, notamment **TRPV1** ou **TRPA1** (Sugiyama et al., 2019), ou encore la surexpression de nombreux gènes codant pour différents facteurs neurotrophiques, en particulier pour **l'artémine**, le **NGF** (« Nerve Growth Factor », qui se lie au récepteur **TrkA**), ou le **BDNF** (« Brain-Derived Neurotrophic Factor », qui se lie au récepteur **TrkB**) (Spofford & Brennan, 2013). Ces différents facteurs neurotrophiques sont libérés en particulier par les cellules satellites, de même que certaines cytokines pro-inflammatoires telles que les **interleukines 1 β** (IL-1 β) et **6** (IL-6). Ces cellules gliales sont activées notamment via la libération de **substance P** par les nocicepteurs suite à un stimulus nociceptif (Sahbaie et al., 2009). Tout cela montre ainsi l'importance des interactions neuro-immunes dans les processus de sensibilisation. Enfin, l'activation des différents récepteurs

comme TrkA ou TrkB va induire l'activation de différentes voies intracellulaires à l'origine de la libération de différentes kinases pronociceptives (**p38**, **Erk**, ou encore **mTOR**, « mammalian Target Of Rapamycin ») et enfin d'une augmentation de l'expression de VGLUT2 et de la libération de glutamate (figure 27).

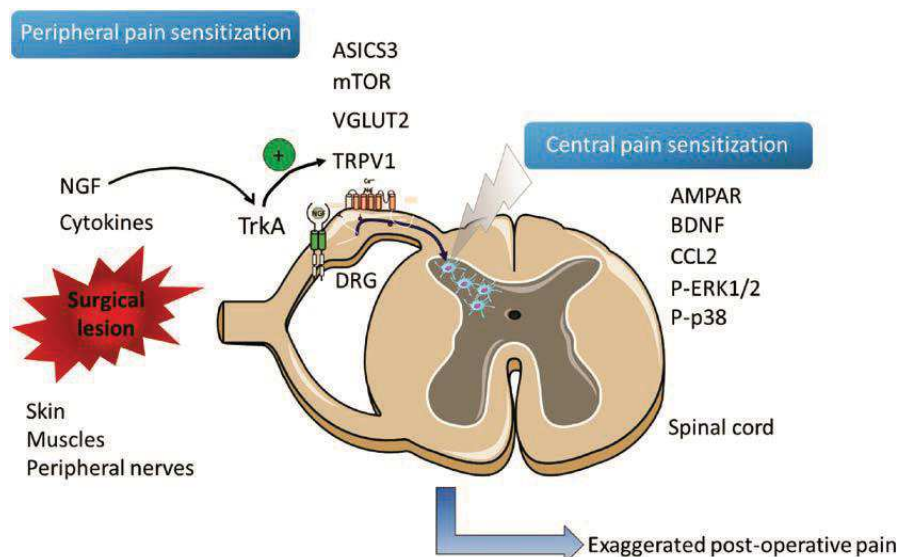


Figure 27. Mécanismes de sensibilisation à la douleur postopératoire

Une incision chirurgicale provoque la libération de facteurs neurotrophiques au niveau de la peau, des muscles et des nerfs périphériques, entraînant une activation gliale et de différents acteurs participant à la sensibilisation périphérique, suivie d'une sensibilisation centrale au niveau des cellules neuronales et gliales de la ME, à l'origine d'une exagération de la douleur postopératoire.

Richebé et al., 2018

Nombreux de ces acteurs sont également présents dans les mécanismes de sensibilisation périphérique dans différents modèles de douleurs neuropathiques. C'est le cas par exemple pour le NGF et BDNF, bien que leur surexpression, observée dans les heures suivant l'incision, semble plus tardive puisqu'observées plusieurs jours, voire semaines, après lésion (Spofford & Brennan, 2013). Dans ces douleurs, une suractivation de PIEZO2 au niveau des mécanorécepteurs serait également à l'origine de l'hyperalgésie observée après lésion nerveuse (Prato et al., 2017). Aussi, en plus de Nav1.7, de nombreux canaux ioniques voltage-dépendants sodiques (comme **Nav1.8** et **Nav1.9**), calciques (**Cav2.2** et **Cav3.2**) ou encore de **canaux potassiques** participerait à l'allodynie mécanique (Bouali-Benazzouz, 2021). Cependant, il existe de nombreux modèles de douleur neuropathique différents (ciblant une lésion totale ou partielle de nerf périphérique, un trauma de la moelle épinière, ou provoquées par d'autres pathologies ou traitements pharmacologiques), et des divergences peuvent exister dans les acteurs identifiés, selon le modèle employé. On note également l'implication de

certaines neuropeptides tels que **cGRP** comme étant impliqués dans les douleurs neuropathiques, au contraire des douleurs postopératoires (Ishida et al., 2014).

Enfin, dans les modèles de douleur chronique inflammatoire, les interactions neuro-immunes citées plus haut sont particulièrement impliquées, avec une libération prolongée d'acteurs pro-inflammatoires et de facteurs neurotrophiques. Des neuropeptides tels que cGRP et la substance P sont également importants dans les douleurs inflammatoires. Par ailleurs, il a été montré que le récepteur prurigineux **P2X4** exprimé au niveau des neurones sensoriels périphériques contrôle la libération de BDNF spécifiquement dans les douleurs chroniques inflammatoires, mais ne serait pas impliqué au niveau périphérique dans les douleurs neuropathiques (Lalisse et al., 2018). De plus, P2X4 régulerait également la libération de la prostaglandine E2 (**PGE2**), également importante dans les processus d'hypersensibilité neuronale induite par l'inflammation (Ulmann et al., 2010).

Pour finir, comme il a été décrit plus haut, en plus d'une sur-activation des acteurs pronociceptifs et donc du système excitateur de la douleur, cette sensibilisation au long terme s'accompagne également d'une inhibition des acteurs antinociceptifs, et notamment des acteurs de l'EOS. Cependant, de par les difficultés à mesurer et observer l'expression des différents récepteurs aux opioïdes, il existe une importante contradiction entre les différentes études sur la modulation de ces récepteurs en condition pathologique, en fonction des méthodes employées. Malgré ces divergences, on note cependant qu'une majorité d'études n'a observé aucune modification de l'expression du DOR au niveau des neurones de premier ordre dans les modèles de douleurs chroniques inflammatoires, au contraire des douleurs neuropathiques où il est sous-exprimé (Gavériaux-Ruff & Kieffer, 2011 ; Ceredig et al., 2018). En revanche, si l'efficacité de nombreux opiacés exogènes ciblant les acteurs de l'EOS périphérique a été étudiée et corrélée à leur expression respective dans différents modèles de douleur chronique, l'expression endogène des récepteurs MOR, KOR ou NOR en condition pathologique reste très peu connue. Il semblerait cependant qu'il existe une interaction importante entre TRPV1 et MOR spécifiquement dans les modèles de douleur chronique inflammatoire, où l'activation de TRPV1 permettrait une inhibition de la β -arrestine 2 et un maintien du MOR (sans activité constitutive) au niveau membranaire dans les neurones de premier ordre, à l'origine de l'efficacité plus prononcée de la morphine dans ce type de douleur (Endres-Becker et al., 2007 ; Basso et al., 2019). Enfin, à l'heure actuelle il n'a pas été montré de rôle, ou même de modulation (voire d'expression), des différents ligands opioïdiques au niveau périphérique. Cependant, il a été démontré que dans une lignée transgénique n'exprimant pas le récepteur Nav1.7 et étant incapable de ressentir la douleur aiguë ou chronique (de manière similaire aux

personnes souffrant d'insensibilité congénitale à la douleur), il y a une surexpression de Penk participant à cette insensibilité au niveau des neurones de premier ordre (Menett et al., 2015). Cela pourrait suggérer qu'en condition de douleur chronique, il existe des mécanismes de modulation négative de la Penk par le Nav1.7 suractivé, bien que cela n'ait pas été démontré à l'heure actuelle.

3. Sensibilisation centrale

Les mécanismes de sensibilisation centrale ont majoritairement été étudiés au niveau de la moelle épinière, où on observe ainsi la mise en place d'une LTP augmentant la réponse à la douleur. Dans tous les types de douleur chronique, cette sensibilisation est le résultat à la fois des **mécanismes de sensibilisation périphérique** qui vont également avoir des conséquences au niveau spinal, d'une **perte de l'inhibition** régulée par les différents systèmes inhibiteurs spinaux, d'une **hyperexcitabilité des systèmes excitateurs** spinaux, et enfin d'une **activation gliale** importante en partie responsable de cette régulation des systèmes excitateurs et inhibiteurs (Latremoliere & Woolf, 2009, Richebé et al., 2018) (Figures 27, 28 et 29). Ces quatre phénomènes sont étroitement liés entre eux, les mécanismes périphériques agissant par exemple à la fois sur l'activation gliale, la levée d'inhibition de certaines sous-populations, et l'excitation d'autres populations neuronales. Il est également à noter que les voies descendantes

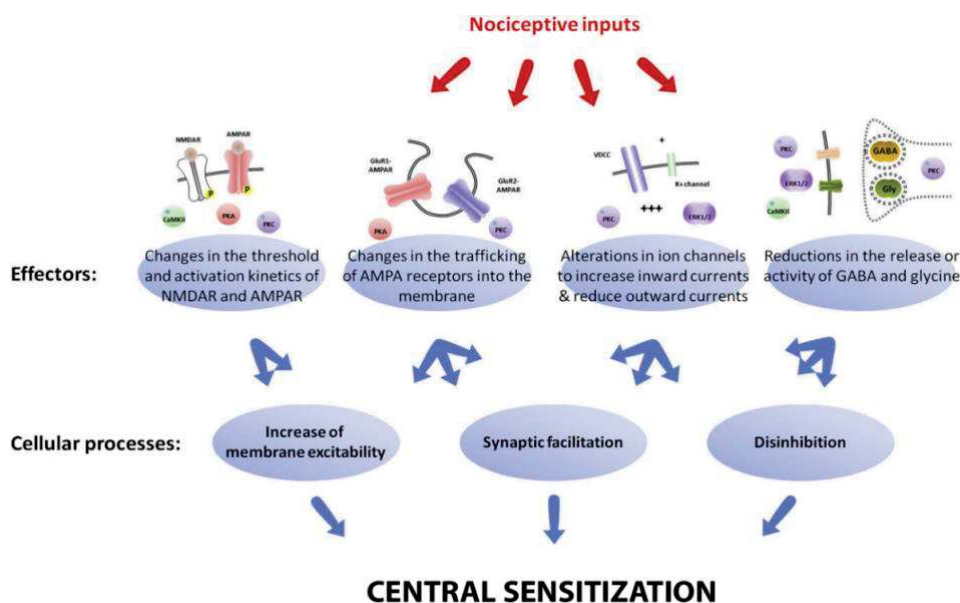


Figure 28. Mécanismes de sensibilisation centrale

La sensibilisation centrale est le résultat des mécanismes de sensibilisation périphérique qui vont avoir des conséquences au niveau spinal, mais aussi d'une perte de l'inhibition régulée par les différents systèmes inhibiteurs spinaux, d'une hyperexcitabilité des systèmes excitateurs spinaux, et d'une plasticité synaptique.

Adapté de Latremoliere & Woolf, 2009

En particulier, on observe une perte d'activité des voies descendantes inhibitrices en condition de douleur chronique, résultant en une perte d'inhibition du signal nociceptif au niveau spinal (Ossipov et al., 2014). Enfin, il est à noter que les différentes interactions neuro-immunes et modifications de l'excitabilité neuronale responsable d'une plasticité neuronale sont également observés dans les circuits supra-spinaux de la douleur, participant à la fois à la mise en place d'une douleur persistante, mais aussi à la mise en place des comorbidités associés à la douleur chronique.

Ainsi, la libération augmentée au niveau synaptique de glutamate par les afférences primaires, de même que la libération des différents neuropeptides, molécules pro-inflammatoires et facteurs neurotrophiques, provoque une sur-activation des neurones post-synaptiques. En particulier, le BDNF libéré en périphérie est transporté de façon antérograde jusqu'à la corne dorsale, et est capable d'agir sur son récepteur TrkB au niveau spinal, conduisant à la phosphorylation du récepteur ionotropique au glutamate NMDA (« Acide N-méthyl-D-Aspartique ») ou encore la voie Erk (Lalisse et al., 2018 ; Wang et al., 2009). Très récemment, il a également été montré que le BDNF provoquerait une excitation de certaines populations neuronales spinales silencieuses en condition physiologique, et une inhibition d'autres populations (restant à identifier précisément), qui participent à la sensibilisation centrale de l'organisme (Alles et al., 2021). Il est à noter que le rôle précis du BDNF est cependant encore sujet à débat : en particulier, des différences existeraient entre les douleurs inflammatoires où P2X4 neuronal en périphérie est responsable de la libération de BDNF agissant sur les neurones spinaux, tandis que dans les douleurs neuropathiques, il serait libéré directement par la microglie (activée en particulier par les récepteurs P2X4 exprimés au niveau de la glie) au niveau spinal. De plus, il existerait à la fois des différences dans ces mécanismes entre les espèces étudiées, mais également entre mâles et femelles (Moy et al., 2019). Notamment, ce mécanisme serait plus spécifique aux mâles, où la microglie aurait un rôle bien plus conséquent dans les mécanismes de chronicisation douloureuse que chez la femelle (Sorge et al., 2015). A l'inverse, les interactions neuro-immunes responsables de la chronicisation douloureuse chez la femelle seraient en particulier dépendantes du récepteur TLR-4 neuronal (« Toll Like Receptor 4 ») (Szabo-Pardi et al., 2021). Bien que ce dimorphisme sexuel reste encore mal caractérisé, voire débattu, avec des différences en fonction des types de douleurs chroniques, il pourrait éventuellement être à l'origine des différences observées dans le ressenti de la douleur en fonction du genre chez les patients.

La perte d'inhibition au niveau de la corne dorsale est quant à elle observée notamment sur les interneurons GABAergiques et glycinergiques. Différentes hypothèses ont été proposées, notamment une perte d'expression et/ou une mort neuronale des interneurons GABAergiques, en particulier en cas de douleur neuropathique ou postopératoire (Lorenzo et al., 2014), bien que d'autres études n'aient observé à l'inverse aucune perte d'expression de ces neurones dans les mêmes modèles (Polgár & Todd, 2008). Une autre hypothèse suggère quant à elle une perte d'expression du co-transporteur de chlore et potassium KCC2, co-exprimé avec le récepteur GABA_A. KCC2 serait nécessaire à l'inhibition synaptique par les interneurons GABAergiques et glycinergiques en maintenant un gradient électrochimique de Cl⁻ vers le milieu extracellulaire. Ainsi, la perte d'expression de KCC2 provoque une perte de Cl⁻ dans le milieu extracellulaire, et donc une perte d'efficacité lors de l'activation des récepteurs GABA et glycinergiques puisqu'il n'y aura plus d'entrée de ces ions, résultant en un défaut d'hyperpolarisation (Wei et al., 2013). De façon intéressante, le BDNF ainsi que le récepteur NMDA joueraient également un rôle important dans la régulation de KCC2 (Trang et al., 2012 ; Zhou et al., 2012). Ce défaut d'inhibition des interneurons inhibiteurs glycinergiques et GABAergiques serait en particulier observé au niveau des interneurons PV présents à l'intersection des laminae IIiv et III, et nécessaires dans le « gate-control » (figure 10). Ainsi, en condition chronique, une disruption de ce gate-control provoquerait une sur-activation des neurones de projection glutamatergiques par les circuits nociceptifs (responsables d'une sensibilisation au niveau supraspinal), mais également une allodynie mécanique lors de l'activation des fibres afférentes Aβ-LTMRs projetant dans les couches profondes (Yasaka et al., 2014 ; Hughes & Todd, 2020). Enfin, on observe également un défaut d'inhibition des voies descendantes sérotoninergiques modulant le signal nociceptif, notamment en cas de douleur neuropathique, participant à cette sensibilisation centrale (Liu et al., 2010).

L'activation gliale, provoquée par différents facteurs libérés en périphérie notamment, correspond plus particulièrement à la fois à une astroglie, et à une microglie. En plus du BDNF, la libération de CSF1 (« colony-stimulating factor 1 ») en périphérie participe de façon importante à une activation microgliale, notamment en cas de lésion nerveuse, au niveau spinal où il se fixe à son récepteur CSF1R (Guan et al., 2016). La prolifération et l'activation des astrocytes et de la microglie participe largement aux phénomènes d'excitation neuronale, en libérant des facteurs pro-inflammatoires similaires à ce que l'on peut observer en périphérie, en activant différentes voies pronociceptives (Erk, p38, PKCγ), en modulant l'activité des canaux ioniques des synapses excitatrices et inhibitrices, ou encore en participant à la synthèse de différents neurotransmetteurs excitateurs ou acides aminés tels que la sérine responsable de

l'activation du récepteur NMDA (Dodds et al., 2016) (figure 29). A nouveau, il existe des différences dans l'implication respective des astrocytes et de la microglie en fonction du type de douleur chronique, de même que dans leurs mécanismes d'action, comme cela a été illustré plus haut avec le BDNF.

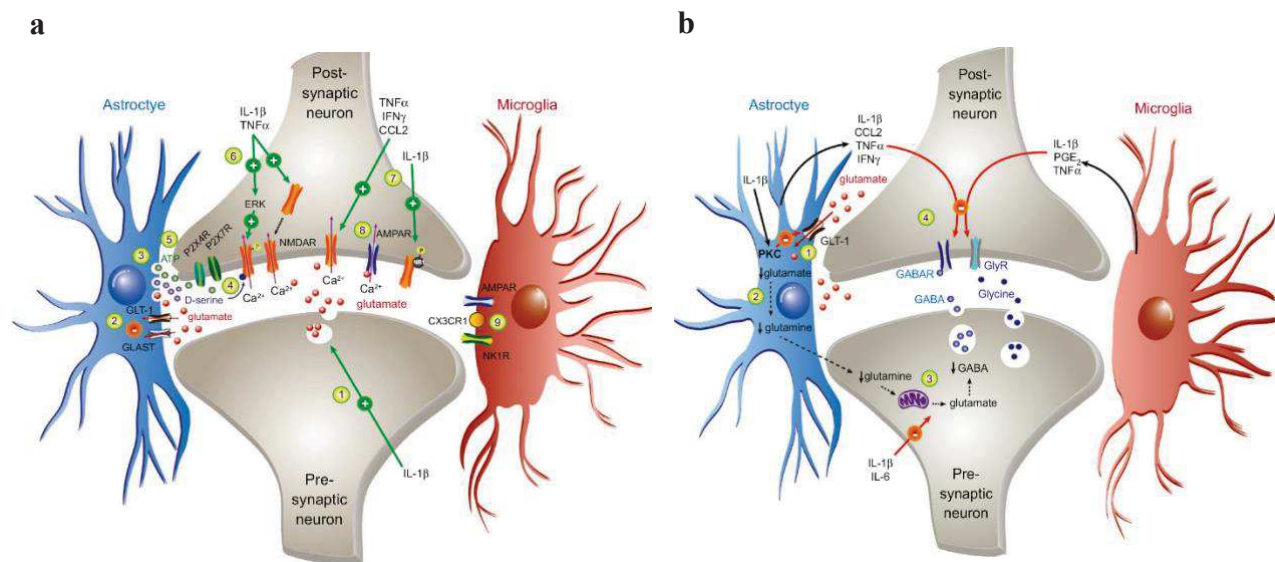


Figure 29. Rôle de la glie spinale dans les processus de sur-activation des systèmes excitateurs (a) et sous-régulation des systèmes inhibiteurs (b) responsables de la chronicisation douloureuse

La libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α ,...), de neurotransmetteurs excitateurs (D-sérine, glutamate), ou encore de molécules d'ATP par la microglie et les astrocytes participent à (a) une suractivation des systèmes excitateurs au niveau des synapses excitatrices via l'ouverture de canaux calciques et l'activation des récepteurs glutamatergiques et purinergiques, et (b) une inhibition des systèmes inhibiteurs au niveau des synapses inhibitrices via l'inhibition de récepteurs GABAergiques et glycinergiques.

Dodds et al., 2016

Enfin, tous ces mécanismes sont responsables de l'induction d'une hyperexcitabilité neuronale au sein de la moelle épinière, à l'origine d'une LTP et de la sensibilisation centrale. Tout comme pour les processus classiques de LTP observés au niveau cérébral, le récepteur NMDA semble particulièrement important dans la mise en place de cette LTP, à la fois dans des modèles de douleur inflammatoire (LaGraize et al., 2010), et dans différents modèles de douleur neuropathique (Willis, 2002). De façon intéressante, la LTP présente dans les modèles de douleur postopératoire serait quant à elle indépendante du récepteur NMDA, et liée au récepteur AMPA (« acide aminométhylphosphonique ») (Wang et al., 2013). En revanche, la potentialisation de l'hypersensibilité observée par l'emploi de fentanyl lors de l'anesthésie semble bien être dépendante du récepteur NMDA puisque bloquée par l'administration de kétamine (Richebé et al., 2005 ; Rivat et al., 2002). On note également l'importance du

récepteur NK1R dans ces processus de LTP, et plus particulièrement de la mise en place d'une plasticité des neurones de projection. Chacun de ces deux récepteurs sont suractivés en condition chronique, notamment dû à l'activation de différentes voies de transduction du signal tels que PKA et PKC.

Pour finir, tout comme en périphérie, l'expression et la modulation des opioïdes endogènes en condition de douleur chronique au niveau spinal sont encore très peu connues. De même, si les quatre récepteurs sont exprimés au niveau des différentes cellules immunitaires, leur rôle précis reste encore débattu en condition pathologique (Machelska & Celik, 2020). Une augmentation de l'expression du DOR dans la corne dorsale en condition neuropathique a été observée récemment, cependant l'emploi d'agonistes exogènes radioactifs pour étudier cette localisation dans cette étude apporte potentiellement un biais important dans l'activité du récepteur (Cahill et al., 2020). De même, l'emploi de différentes stratégies pharmacologiques ne permet pas de conclure de façon précise sur l'activité de chacun des récepteurs. En effet, certaines études observent une perte d'efficacité analgésique de certains agonistes en condition chronique (suggérant une perte de fonction ou d'expression des récepteurs), tandis que d'autres études observent, au contraire, une augmentation de l'efficacité analgésique. C'est le cas notamment des récepteurs MOR et DOR, plusieurs études montrant un manque d'effet des agonistes en condition physiologique dû possiblement à une faible expression des récepteurs spinaux dans cette condition, en fonction du modèle de douleur étudié (Woolf, 2009 ; Gavériaux-Ruff & Kieffer, 2011).

Au niveau des ligands en revanche, et en particulier de la dynorphine spinale, une meilleure caractérisation a été réalisée. En particulier, plusieurs études démontrent une élévation de l'expression de Pdyn, puis de dynorphine, au niveau spinal dans des modèles de douleur chronique (neuropathique, postopératoire et inflammatoire), pendant une durée correspondant à la phase d'hypersensibilité. Ces études suggèrent donc une participation de la dynorphine dans les mécanismes de maintenance de cette hypersensibilité (Podvin et al., 2017). En revanche, en cas de douleur aiguë ou dans les premières phases de la douleur chronique, la dynorphine aurait un effet antinociceptif qui dépendrait en partie de la quantité de dynorphine libérée (Ossipov et al., 1996).

Au niveau des voies descendantes, le rôle du récepteur MOR a en revanche été mieux caractérisé. Son activation permettrait notamment une levée d'inhibition des sous-populations inhibitrices la RVM spécifiquement, en inhibant les efférences GABAergiques issues de la PAG et modulant l'activité de la RVM, ou certaines sous-populations neuronales de la RVM

directement (Lau et al., 2020). Cependant, la régulation de son activité en condition chronique est là encore mal connue. Il a cependant été suggéré que l'exercice physique (connu pour soulager les symptômes de douleur chronique), permettrait une activation du récepteur au niveau de la RVM responsable de l'activation des voies descendantes inhibitrices (Stagg et al., 2011 ; Kim et al., 2015).

Enfin, la mise en place de ces processus de sensibilisation, et notamment au niveau supraspinal, joue un rôle majeur dans le développement des comorbidités associées à une chronicisation douloureuse. Une étude très récente a montré par exemple que dans un modèle de douleur chronique inflammatoire, on observe une diminution de l'activité des neurones dopaminergique de la VTA, responsable de la mise en place d'une anhédonie induite par la douleur chronique (Markovic et al., 2021). Une recherche importante est en cours aujourd'hui pour étudier la modulation du EOS au niveau cérébral en condition chronique, qui semble avoir une implication importante dans la mise en place de ces comorbidités. On note par exemple une diminution de l'expression du MOR au niveau du cortex insulaire et du Nacc en condition de douleur neuropathique, qui participerait à la mise en place d'une anhédonie. A l'inverse, une augmentation de l'expression du KOR et de son ligand dynorphine est observée dans plusieurs structures supraspinales, et notamment dans l'amygdale où il va participer à la mise en place de l'effet aversif de la douleur mais également d'une anxiodépression, ou encore dans la VTA et les noyaux du raphé, où il va inhiber les systèmes dopaminergiques et sérotoninergiques respectivement, également à l'origine de la mise en place d'une anxiodépression associée à une anhédonie (Ji et al., 2021).

4. Sensibilisation latente

Comme il a été évoqué au début de ce chapitre, l'histoire de l'individu, et notamment ses antécédents douloureux ou psychiatriques, ont une influence importante sur la mise en place d'une chronicisation douloureuse. De même, de nombreuses douleurs chroniques sont épisodiques, et sont caractérisées par la succession de phases d'hypersensibilité et de phases de rémission. De nouveaux événements douloureux pendant la phase de rémission, ou des situations de stress ou troubles psychologiques peuvent provoquer, voire exagérer, une nouvelle phase d'hypersensibilité, et ainsi provoquer l'apparition de douleur persistante (Rivat et al., 2007). De plus, l'emploi d'antagonistes pendant la phase de rémission des acteurs composant le système inhibiteur de la douleur, et notamment des antagonistes ciblant l'EOS, est suffisant pour provoquer à nouveau une hypersensibilité (Campillo et al., 2011 ; Bessière et al., 2007).

Pour expliquer l'apparition d'une vulnérabilité à la douleur suite à la répétition de stimulus douloureux voire non douloureux tels que le stress, il a été proposé qu'après récupération de la douleur (qu'elle soit aiguë ou chronique), l'organisme ne revient pas à un état d'homéostasie. En effet, les processus de sensibilisation seraient activés à très long terme mais cette activation serait masquée par l'activation des systèmes inhibiteurs, et notamment opioïdiques, venant s'opposer à cette sensibilisation. Ainsi, l'organisme n'est plus dans un état homéostatique, mais dans un état dit « allostatique » où les systèmes inhibiteurs et activateurs de la nociception restent suractivés : on parle alors de « sensibilisation latente » (Rivat et al., 2002 ; Rivat et al., 2007) (figure 30). Au cours de la vie, la répétition de ces différents traumatismes et événements va augmenter cette suractivation des systèmes opposants (Solomon & Corbit, : on parle alors d'une augmentation de la « charge allostatique », à l'origine d'altérations anatomiques et fonctionnelles amenant à des dérégulations pathologiques et un épuisement de l'organisme, devenant alors plus vulnérables à d'éventuels nouveaux traumatismes. Ainsi, suite à une accumulation trop importante de la charge allostatique, nouveau trauma provoquerait une rupture du nouvel équilibre allostatique provoquant une inhibition persistante du système inhibiteur, et une activation persistante du système excitateur. Les mécanismes de sensibilisation latente ont donc une grande importance dans la transition de la douleur aiguë vers la douleur chronique. De façon intéressante, cette théorie de l'allostase est également connue dans les mécanismes de stress chronique et de vulnérabilité à l'addiction, où les systèmes opposants modulant positivement ou négativement le stress ou le système de récompense subissent les mêmes altérations (Koob et Le Moal, 2008 ; McEwen, 1998). Dans le cas de la douleur chronique, cet état allostatique pourrait ainsi participer au développement de comorbidités.

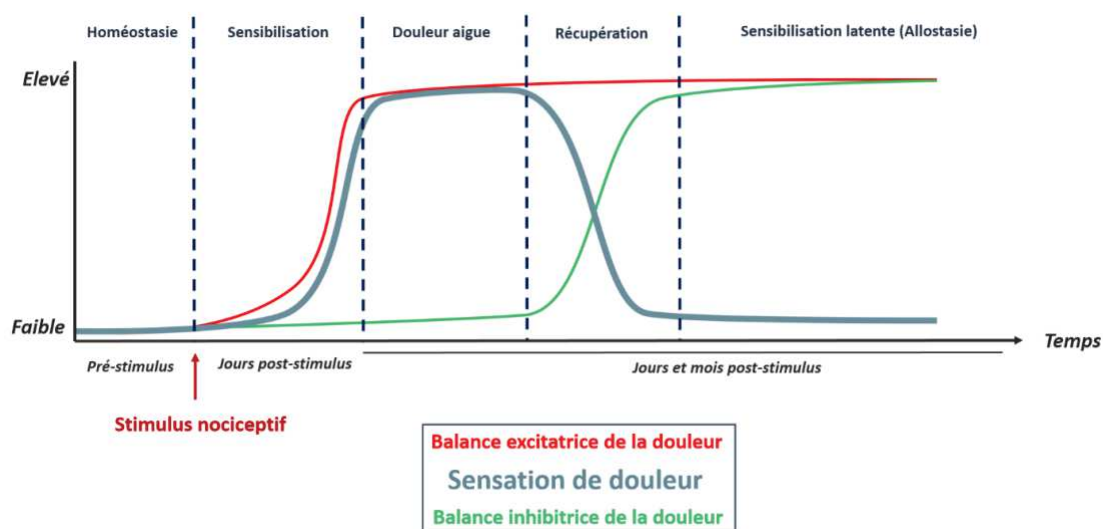


Figure 30. Représentation de la mise en place d'une sensibilisation latente suite à un stimulus nociceptif

Ainsi, dans la recherche on note aujourd'hui l'apparition de différents modèles permettant d'étudier la sensibilisation latente, en provoquant un premier événement douloureux aigu (on parle de « priming »), suivi après rémission totale d'un nouveau stimulus nociceptif (identique ou non au précédent) ou d'un stress. L'injection de différentes molécules pro-inflammatoires ou adjuvants tels que PGE2, les carraghénanes, le CFA (« Complete Freud's adjuvant »), et la réalisation de différentes lésions nerveuses ou incisions chirurgicales sont généralement employés pour provoquer cette sensibilisation latente (Marvizon et al., 2015). De plus, l'usage d'opiacés exogènes suffit également à induire ou exagérer une sensibilisation latente, démontrant le lien étroit entre les processus d'OIH et de sensibilisation douloureuse.

III. Le récepteur FLT3 dans les mécanismes et traitements opiacés de douleur chronique

1. Les récepteurs tyrosine kinase de classe III

Parmi les différents acteurs moléculaires exprimés dans les différentes sous-populations neuronales du système somatosensoriel périphérique et spinal, et impliqués de manière importante dans les processus de chronicisation douloureuse, on note une part importante des récepteurs tyrosine kinase (ou RTKs) et de leurs ligands. Les RTKs sont connus à l'origine pour leur implication dans de nombreux processus cellulaires physiologiques, tels que la différenciation, prolifération, migration et survie cellulaires. Ainsi, des altérations génétiques de différents RTKs ont été identifiées et corrélées à différentes pathologies, notamment dans l'oncogenèse ou le développement de maladies auto-immunes (Esteban-Villarrubia et al., 2020).

Au niveau structural, ces protéines membranaires monomériques sont composées d'une extrémité N-terminale extracellulaire où se fixe le ligand, d'un seul domaine transmembranaire, et d'une partie intracellulaire composée de domaines tyrosine kinase et d'une extrémité C-terminale. De plus, ils sont caractérisés par leur capacité à former des dimères suite à la fixation de leur ligand, entraînant leur activation et leur trans-autophosphorylation par le biais des domaines tyrosine kinase de chacun des monomères, et activant enfin de différentes voies de signalisation cellulaire (Trenker & Jura, 2020) (Figure 31).

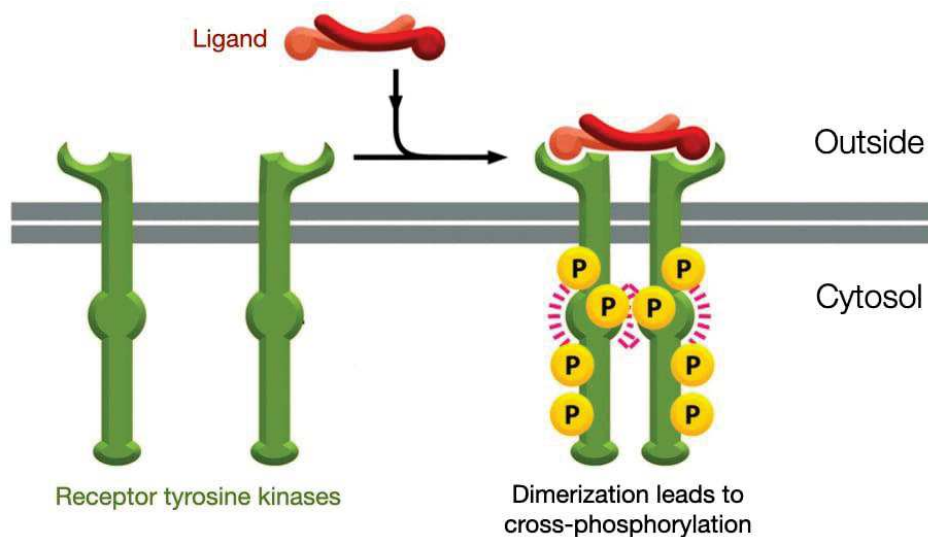


Figure 31. Représentation de la dimérisation et phosphorylation des RTKs suite à leur activation

Yale Team-based Learning website

En fonction du ligand se fixant sur le site extracellulaire et de sa conformation, on note cependant des différences dans la conformation des dimères générés, les tyrosines kinases intracellulaires phosphorylées, et ainsi des différentes cascades de signalisation enclenchées. Ces différents types d'activation des récepteurs sont encore mal connus, de même que le type d'interaction existant entre les domaines extra- et intracellulaires, mais constituent cependant une recherche importante afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques se basant sur des agonistes biaisés promouvant l'activation de certaines voies de signalisation spécifiquement (Li et al., 2019). Enfin, en plus de cette activation par leur ligand, d'autres mécanismes de transactivation entre différents RTKs ou entre RTKs et RCPGs ont également été observés, où l'activation de l'un de ces deux types de récepteurs peut amener à une libération extracellulaire du ligand spécifique à l'autre type via différentes voies de signalisation. Enfin, ces récepteurs sont également capables de former des homo- ou hétéro-oligomères avec d'autres protéines transmembranaires, provoquant ou renforçant ainsi l'activation de voies de signalisation intracellulaires spécifiques, et qui pourraient avoir un rôle dans certaines pathologies (Trenker & Jura, 2020).

En fonction de la composition de leur domaine extracellulaire, des ligands avec qui ils présentent une affinité, et les fonctions dans lesquelles ils jouent un rôle, les RTKs sont divisés en vingt sous-classes. On peut notamment citer parmi elles TrkA, TrkB et TrkC et leurs ligands respectifs NGF, BDNF et neurotrophine 3 faisant partie de la classe VII, ou encore le récepteur

Ret composant la classe XIV (Ségaly et al., 2015). Une autre classe dont l'implication importante de chacun des récepteurs a été démontrée dans des modèles de douleur neuropathique ou inflammatoire, ou dans les processus d'OIH également, est la classe III de RTKs.

La famille de RTKs de classe III est composée des récepteurs PDGFR- α et β (« Platelet-derived growth factor receptor »), CSF1-R, c-kit, et FLT3. Différents rôles dans les processus de chronicisation douloureuse ou d'OIH ont été démontrés en fonction du RTK et de son ligand :

- **CSF1-R**, comme il a été décrit plus haut, est exprimé notamment au niveau de la microglie spinale, et est activé par la libération de son ligand principal CSF1, après la synthèse et libération de celui-ci au niveau des afférences primaires suite à une lésion nerveuse périphérique, et transport jusqu'à la corne dorsale. En revanche, les voies de signalisation induites par l'activation de CSF1-R dans la microglie sont encore mal connues. Il a été démontré que l'activation du polypeptide pronociceptif DAP12 (« DNAX-activating protein of 12 kD ») dans les modèles de douleur neuropathique, qui participe à la surexpression de nombreux gènes microgliaux en condition pathologique et dont la délétion atténue la douleur neuropathique, est dépendante de CSF1-R (Yu et al., 2021). En revanche, les voies de signalisation induites par CSF1-R permettant une prolifération microgliale ne sont pas dépendantes de DAP12, et restent encore à être élucidées. En plus de son ligand CSF1, CSF1-R peut également être activé par IL-34, également suractivé en condition neuropathique. Enfin, il a été montré plus récemment que CSF1-R participe également aux douleurs inflammatoires, son blocage inhibant le développement dans des modèles de douleurs induites par injection de molécules pro-inflammatoires (Saleh et al., 2018).
- **C-kit** est exprimé au niveau des fibres C et des laminae I et II de la moelle épinière. Activé par son ligand SCF (« Stem cell factor »), il a été démontré que son inhibition prévient le développement de douleur chronique inflammatoire ou de douleur neuropathique (Sun et al., 2009). Les voies de signalisation induites par l'activation de c-kit participant à la chronicisation douloureuse ne sont pas encore connues, bien qu'une activation de la tyrosine kinase pro-nociceptive Src semble être dépendante de c-kit. Enfin, il a été observé qu'une inhibition de c-kit diminue la thermosensibilité au chaud

et au froid chez plusieurs patients, de façon cohérente avec son expression identifiée au niveau des fibres C (Ceko et al., 2014).

- **PDGFR**, et notamment le récepteur β , est impliqué dans les douleurs inflammatoires. Son activation, notamment par son ligand PDGF au niveau de la microglie spinale, provoque une hypersensibilité à la douleur, tandis que son inhibition est suffisante pour bloquer la mise en place de douleur inflammatoire (Omer et al., 2019). De plus, un rôle de PDGFR β a été démontré dans les mécanismes de tolérance à la morphine, où l'activation du récepteur MOR par la morphine sur le long terme induirait une transactivation de PDGFR β au niveau de la moelle épinière, résultant en une prolifération microgliale (Li et al., 2020). Inhiber ce récepteur prévient ainsi la mise en place d'une tolérance à la morphine, mais également à une potentialisation de l'effet analgésique de la morphine dans un modèle de douleur neuropathique, où l'inhibition de PDGFR β n'a aucun effet (Donica et al., 2014).

Jusqu'à récemment, le récepteur FLT3 était le seul RTK de classe III sans rôle connu dans les processus de douleur chronique. A l'origine, FLT3 était connu pour son rôle important au niveau développemental dans l'hématopoïèse, et ainsi son expression a été principalement identifiée dans les différents organes hématopoïétiques (Verstraete & Savvides, 2014). On sait aujourd'hui cependant que FLT3 présente une expression assez large dans le système somatosensoriel (Usoskin et al., 2014), et dans différentes structures supraspinales. Dans les neurones sensoriels de premier ordre en particulier, il semble notamment exprimé de façon majoritaire (mais pas exclusive) au niveau des populations NF1 à NF5, suggérant ainsi une expression dans les mécano- et propriocepteurs (figure 32). Malgré cela, son rôle physiologique après la fin du développement n'est pas connu, que ce soit dans le système immunitaire ou nerveux. En revanche, il présente une cible thérapeutique importante en oncologie, de même que son ligand FL, et plus particulièrement dans le cadre des leucémies aiguës myéloblastiques. En effet, la mutation du gène codant pour FLT3, associée à une surexpression du niveau en ARNm et protéique de FLT3 et de FL, est la mutation la plus couramment présente chez les personnes atteintes de ce type de leucémies (24% des patients), et est corrélé à un plus faible pronostic vital chez ces patients (Zhao et al., 2021).

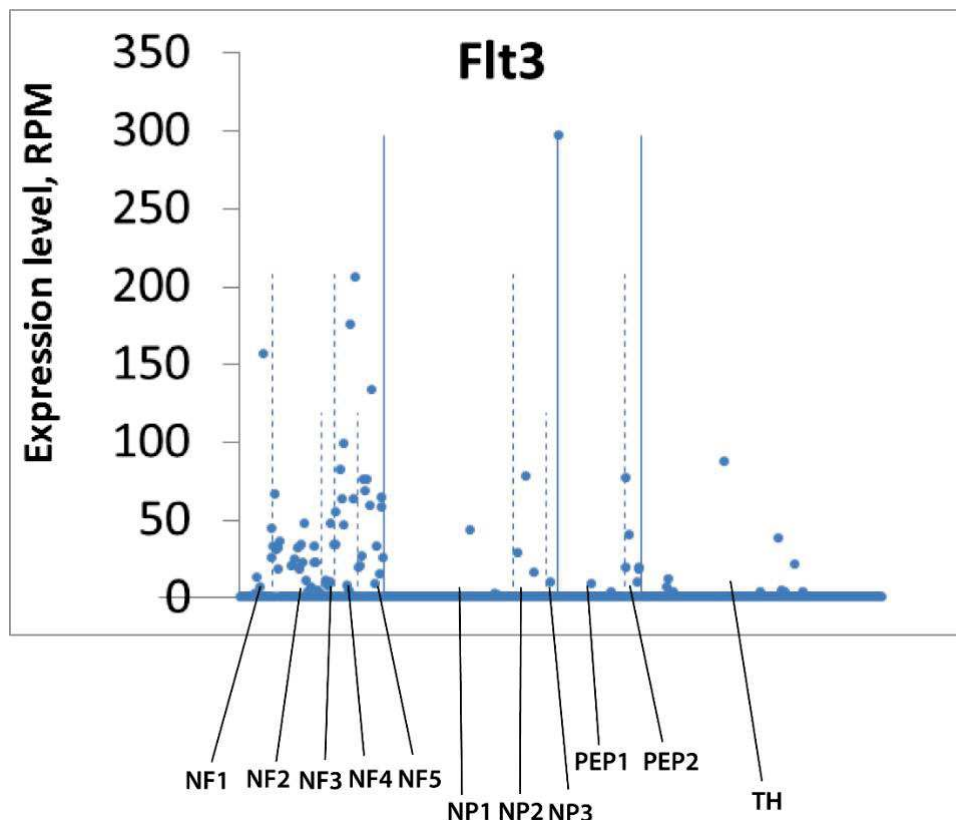


Figure 32. Expression de *flt3* dans les sous-populations d'afférences primaires définies par séquençage en single cell

Représentation du niveau d'expression de *FLT3* (en read Per Million) dans les différentes sous-populations du DRG. Chaque point représente un neurone différent, un niveau d'expression en RPM plus élevé signifiant une expression plus importante au sein de ce neurone.

Adapté des datas en libre-service obtenues lors de l'étude Usoskin et al, 2014

L'importance de FLT3 dans certains types de leucémie a conduit en une caractérisation importante des voies de signalisation classiquement engagées par ce récepteur (figure 33).

On note 3 voies de signalisation cellulaire pouvant être activées par FLT3 lors de la fixation de son ligand, et de sa dimérisation :

- La voie **Akt/PI3K/mTOR**, qui va réduire l'apoptose, et augmenter la prolifération cellulaire dans les pathologies cancéreuses. Au niveau de la douleur chronique, cette voie est également largement étudiée, et connue pour être pro-nociceptive. En effet, dans différents modèles de douleur neuropathique, inflammatoire, ou postopératoire, les acteurs de cette voie sont suractivés et participent de manière importante à la sensibilisation centrale au niveau spinal (Chen et al., 2017). Dans les processus d'OIH, il a également été démontré l'implication de mTOR au niveau spinal (Xu et al., 2014).

- La voie **MAPK/Erk**, incluant la kinase p38, qui est également une cible importante à la fois en oncologie et dans le traitement de la douleur chronique, neuropathique, inflammatoire, ou postopératoire (Melemedjian & Khoutorsky, 2015). De plus, comme cela a été décrit dans le chapitre précédent, ses acteurs sont également impliqués dans les processus de tolérance et d'OIH induites par la morphine.
- La voie **Jak/STAT**, qui de façon similaire aux deux voies précédentes, et suractivée dans différentes pathologies cancéreuses ou de douleurs chroniques, et dont l'inhibition permet d'atténuer, voire inhiber, la chronicisation douloureuse (Salaffi et al., 2018). En revanche, aucune implication de cette voie dans la tolérance ou l'OIH n'a été démontré pour le moment.

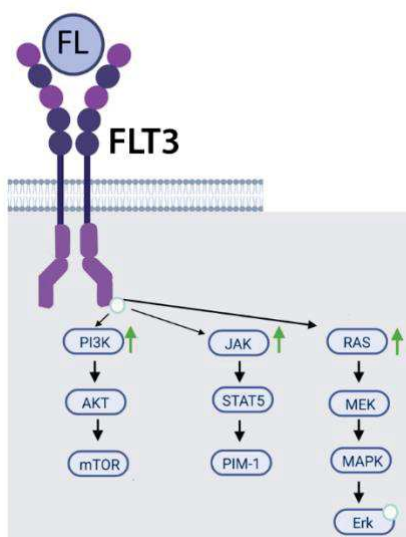


Figure 33. Représentation des voies intracellulaires modulées par l'activation de FLT3

Adapté de Kennedy & Smith, 2020

Ces trois voies participent aux processus de chronicisation douloureuse en particulier via la modulation de la transcription de différents gènes. En particulier, ces trois voies convergent vers un facteur d'initiation de la traduction, le complexe EIF4F (figure 34). L'activation de ce complexe (pouvant être initiée par de nombreux récepteurs connus pour leur implication dans la douleur chronique), nécessite notamment une levée d'inhibition de sa sous-unité eif4e, et la phosphorylation de cette même sous-unité.

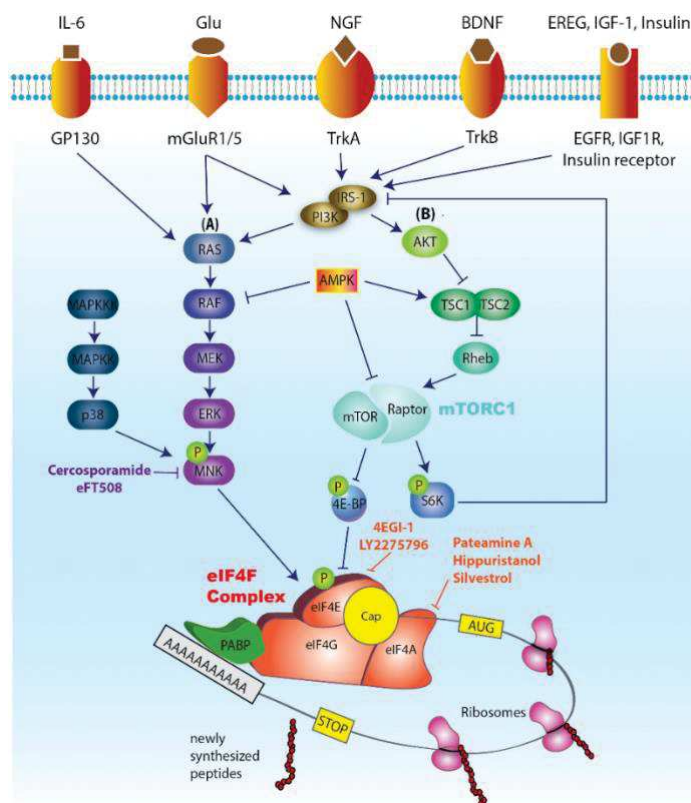


Figure 34. Représentation de la modulation du complexe EIF4F par les voies Erk et mTOR

L'inhibition de la sous-unité 4EBP-1 suite à l'activation de la voie mTOR, couplée à l'activation de la sous-unité eif4e suite à l'activation de la voie Erk, permet l'activation du complexe EIF4F.

Uttam et al., 2018

Ces deux mécanismes sont en particulier régulés par la voie mTOR (dont l'activation inhibe la protéine 4EBP-1 responsable de l'inhibition de eif4e) et la voie Erk respectivement (Uttam et al., 2018). De même que pour les trois voies de signalisation, un rôle important de ce complexe a pu être démontré dans le processus de LTP spinale, impliqué dans la chronicisation douloureuse. Si un rôle similaire a déjà été suggéré pour les processus d'OIH étant donné l'implication de Erk et mTOR, cela n'a en revanche pas encore été démontré.

Ainsi, étant donné la forte implication des différents ligands et récepteurs de la classe III des RTKs ainsi que des voies de signalisation induites par FLT3 dans les processus de chronicisation douloureuse et d'OIH, le laboratoire a étudié ces dernières années l'implication de FLT3 dans différents modèles de douleur chronique neuropathique, postopératoire, ou inflammatoire. De plus, un éventuel rôle de ce récepteur dans les processus de tolérance et OIH induites par la morphine a également été étudié. Le résultat de ces recherches, ayant abouti à un article publié et deux publications en cours de soumission, est résumé dans la dernière partie de cette introduction.

2. Implication de FLT3 dans la douleur chronique

2.1. Douleur neuropathique

L'implication de FLT3 dans les douleurs neuropathiques a tout d'abord été étudié. En employant divers modèles de constriction de nerfs périphériques (CCI, « chronic constriction injury » ; SNI, « spared nerve injury » ; SNL, « spinal nerve ligation »), ou de neuropathie induite par des traitements anti-cancéreux (modèle oxaliplatine), il a été montré qu'une souris délétée du gène FLT3 ne développait pas d'hypersensibilité mécanique (figure 35) (Rivat et al., 2018). De même, l'inhibition pharmacologique de FLT3 par un modulateur allostérique négatif spécifique développé en collaboration avec Didier Rognan, le BDT001, suffit à bloquer la chronicisation douloureuse dans ces modèles.

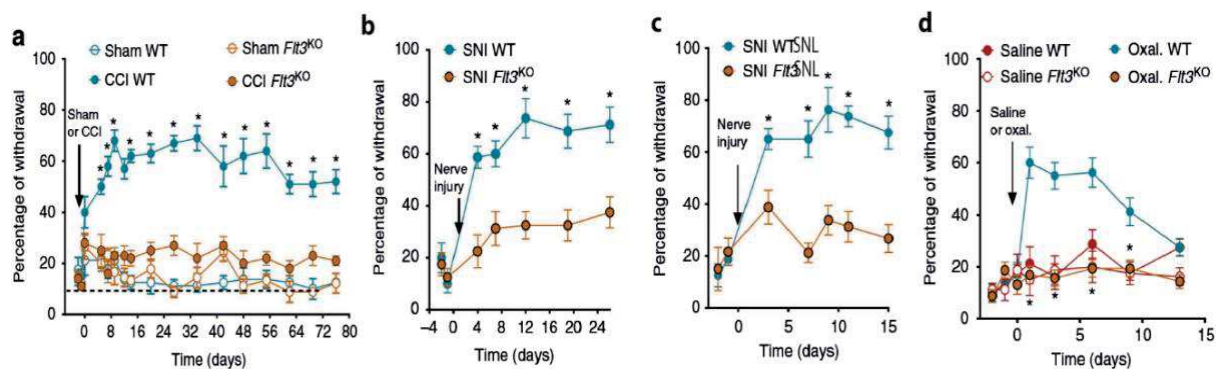


Figure 35. Effet de la perte d'expression de FLT3 dans différents modèles de douleur neuropathique
Adapté de Rivat et al., 2018

De façon intéressante, l'activation de FLT3 par injection de son ligand FL suffit à l'inverse à provoquer une hypersensibilité mécanique, et thermique au chaud et au froid pendant plusieurs jours, et la surexpression ARNm de différents marqueurs pronociceptifs classiques tels que TRPV1 ou TRPA1 dans les DRGs, ou Iba1 (marqueur de la microglie) et GFAP (marqueur des astrocytes) dans la moelle épinière. Une présence de cellules immunitaires exprimant FL a d'ailleurs été observée au niveau du nerf, uniquement en condition neuropathique. Enfin, après mise en place de la douleur neuropathique, les souris n'exprimant pas FLT3, et donc n'ayant pas développé de douleur chronique, ne présentent pas d'augmentation de ces mêmes marqueurs dans les DRGs et la moelle épinière, que ce soit au niveau de l'ARN ou de la protéine.

Ainsi, tous ces résultats montrent une implication de FLT3 dans les mécanismes de chronicisation à la douleur neuropathique, où son activation induite par libération de son ligand FL au niveau du nerf lésé est suffisante pour augmenter l'expression de différents marqueurs pronociceptifs.

Cependant, un résultat préliminaire obtenu par le laboratoire (non publié) où une injection de la naloxone, antagoniste non spécifique de l'EOS, a été effectuée sur des souris n'exprimant pas FLT3 18 jours après la mise en place du modèle de douleur neuropathique (période à laquelle ces souris ne présentent pas d'hypersensibilité apparente), a ré-induit une hypersensibilité mécanique (figure 36). Ce résultat suggère ainsi la présence d'une sensibilisation latente, et donc que l'inhibition de FLT3 ne bloque pas l'activation du système exciteur de la douleur, mais provoque une activation plus rapide du système inhibiteur venant contrebalancer le système exciteur.

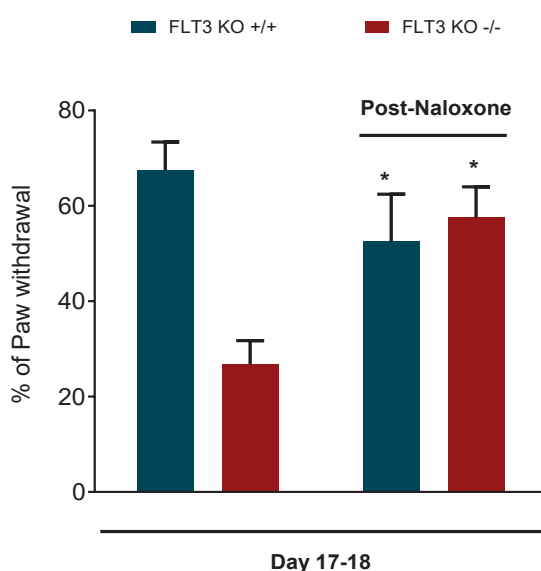


Figure 36. Effet du blocage de l'EOS sur un modèle neuropathique de souris n'exprimant pas FLT3

2.2. Douleur postopératoire

Pour étudier l'implication de FLT3 dans la chronicisation des douleurs postopératoires, le laboratoire a utilisé un modèle dit de « double-hit », ou double incision, consistant à réaliser une première incision sur la peau et le fascia de la voute plantaire de la patte arrière gauche de l'animal (Annexe I). Après rémission au bout de 7 jours, la même opération a été réalisée sur la patte arrière opposée. Une caractérisation du modèle nous a permis de montrer que cette répétition d'incisions a provoqué une chronicisation douloureuse chez l'animal, illustrée par

une augmentation de l'intensité et la durée de l'hypersensibilité mécanique et thermique (Annexe I, figure 2), l'apparition de comportements anxiodépressifs induits par la douleur chronique (Annexe I, figure 1 et figure suppl1) et une forte activation microgliale spinale (Annexe I, figure 2) et de marqueurs pronociceptifs tels que cGRP (Annexe I, figure suppl4), comparé à une simple incision ou à des animaux naïfs. Dans ce modèle, l'inhibition génique de FLT3 a également permis de bloquer la chronicisation douloureuse dans ce modèle (Annexe I, figures 3), à la fois au niveau de la composante sensorielle, et notamment l'hypersensibilité mécanique, et émotionnelle. A l'inverse, des injections répétées de FL ont provoqué, en plus d'une hypersensibilité mécanique, le développement de comportement anxiodépressifs importants (Annexe I, figure 4). En revanche, aucun effet du blocage de FLT3 n'a pu être observé sur la l'hypersensibilité thermique du modèle postopératoire de double incision (résultat non montré).

L'étude de l'expression en ARNm de FLT3 au niveau de la corne dorsale de souris dont le récepteur CX3CR1, marquant les macrophages comprenant la microglie, est couplé à la protéine fluorescente eGFP, a montré que FLT3 ne semble pas exprimé dans les populations gliales en condition chronique (Annexe I, figure S7). Enfin, l'emploi d'un anticorps fonctionnel bloquant FLT3 spécifiquement en périphérie a permis d'obtenir des résultats similaires à l'emploi d'une lignée transgénique n'exprimant plus FLT3, suggérant ainsi un rôle du FLT3 neuronal situé au niveau des afférences primaires, dans ces processus de chronicisation douloureuse (Annexe I, figure 6).

Dans la douleur postopératoire également, des résultats préliminaires suggèrent que la délétion génique de FLT3 ne bloque pas la mise en place d'une sensibilisation latente (figure 37).

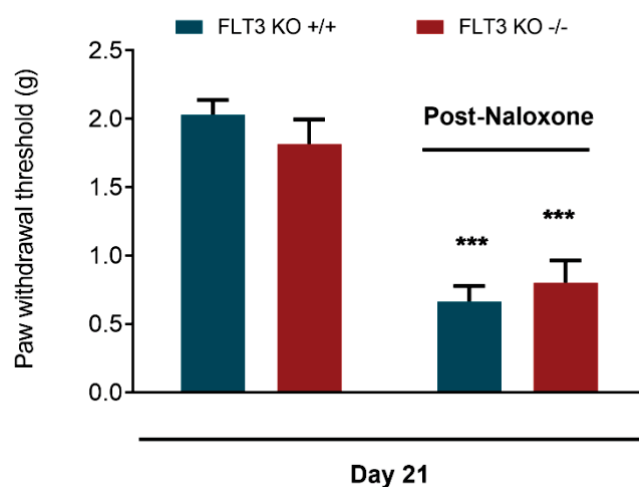


Figure 37. Effet du blocage de l'EOS sur un modèle postopératoire de souris n'exprimant pas FLT3

2.3. Douleur inflammatoire

Enfin, l'implication de FLT3 a également été étudiée dans deux modèles différents de douleur inflammatoire, induite par injection de CFA ou de formaline. De façon intéressante, et au contraire des autres RTKs de classe III, l'inhibition de FLT3 n'a eu aucun effet sur l'hypersensibilité mécanique dans ces deux modèles (figure 38).

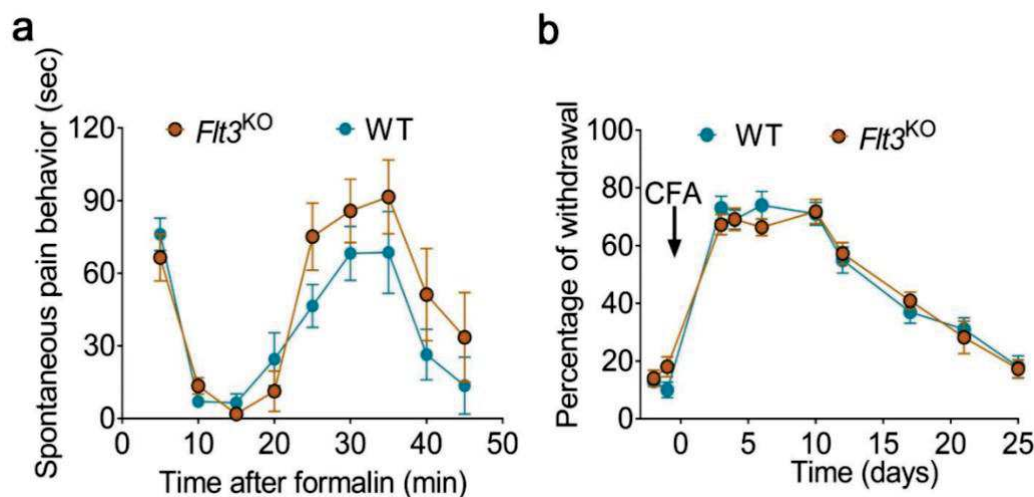


Figure 38. Effet de la perte d'expression de FLT3 dans différents modèles de douleur inflammatoire
Rivat et al., 2018

Ainsi, si l'activation de FLT3 participe à la surexpression de nombreux acteurs pronociceptifs et induits des douleurs mécaniques en particulier, son inhibition permet de prévenir la mise en place d'une hypersensibilité mécanique dans des modèles de douleurs neuropathiques et postopératoires spécifiquement.

3. Implication dans les effets secondaires de la morphine

Pour finir, le laboratoire a également démontré dans une dernière étude l'implication de FLT3 dans la mise en place d'une tolérance et d'une OIH à la morphine (Annexe 2). En effet, le blocage de FLT3 lors d'un traitement chronique de morphine permet d'empêcher le développement de cette tolérance et OIH au niveau comportemental, et au niveau moléculaire la surexpression des acteurs moléculaires impliqués classiquement dans les effets d'OIH, notamment cGRP dans les DRGs, et cGRP, iba1 et GFAP au niveau de la moelle épinière

(Annexe 2, figure 3). Ce blocage de FLT3 permet également une potentialisation des effets analgésiques de la morphine, et notamment dans des modèles de douleur inflammatoire où le blocage de FLT3 seul n'a pas d'effet (Annexe II, figures 4 et 6). D'un point de vue translationnel, outre l'inhibition de la tolérance et des hyperalgésies, le blocage de FLT3 permet également d'atténuer partiellement les autres effets secondaires de la morphine, à savoir les effets motivationnels induits par la morphine, ainsi que les constipations et dépressions respiratoires (Annexe II, figure 5).

Enfin, le laboratoire a pu démontrer que ces effets de FLT3 sur la tolérance et l'OIH à la morphine passent par une interaction fonctionnelle entre FLT3 et le récepteur MOR, au niveau des DRGs. En condition de traitement chronique à la morphine, il existe une augmentation significative des neurones MOR-positifs co-exprimant FLT3 dans le DRG (Annexe II, figure 3). De plus, un traitement aigu de morphine associé à une injection de FL suffit à reproduire les effets de tolérance et d'OIH observés après un traitement chronique de morphine. Associé à cela, on observe une potentialisation de l'activation des voies Erk et mTOR lors de l'activation conjointe de FLT3 et MOR par le FL et la morphine respectivement, totalement bloquée par l'inhibition de FLT3 (Annexe II, figure 2). De même, l'augmentation de l'AMPc observée dans des cultures neuronales de DRGs traitées chroniquement à la morphine, et associée classiquement à un échange de couplage entre MOR et les protéines Gi et Gs, est totalement prévenue dans des cultures issues d'animaux n'exprimant pas FLT3 (Annexe II, figure 3). De façon intéressante, les effets de tolérance et d'hyperalgésie induits par l'administration conjointe de FL et la morphine sont prévenus en bloquant le complexe EIF4F, démontrant pour la première fois l'implication de ce complexe dans ces effets, et suggérant qu'il serait régulé par FLT3 (Annexe II, figure 2).

Ces résultats montrent donc qu'une interaction fonctionnelle entre le récepteur MOR et le récepteur FLT3 pourrait être à l'origine de la mise en place de la tolérance et l'OIH induites par un traitement chronique de la morphine, en suractivant les différentes voies de signalisation impliquées dans la mise en place de ce processus. Le blocage de FLT3 est suffisant pour empêcher l'activation de ces voies, et restaurer, voire potentialiser, l'effet analgésique de la morphine. En revanche, les mécanismes par lesquels FLT3 et MOR interagissent restent à être élucidés.

Dans ce dernier chapitre, nous avons pu voir les différents processus impliqués dans la chronicisation douloureuse, à savoir notamment la présence d'une **suractivation persistante des nombreux acteurs du système excitateur de la douleur**, cumulée à l'**inhibition anormale des systèmes inhibiteurs**. Cette dérégulation persistante de la balance entre les systèmes excitateurs et inhibiteurs est due en particulier à la **mise en place d'un état de vulnérabilité de l'organisme** au cours de la vie, suite à la présence de différents événements douloureux ou psychiatriques, même aigus. Cet état de vulnérabilité fait suite aux **processus de plasticité du circuit nociceptif** se mettant en place progressivement lors de ces événements, ainsi qu'à la mise en place de **processus de contre-adaptation** où l'activation du système inhibiteur va venir compenser l'activation du système excitateur. Cela entraîne une rémission de l'organisme et une diminution de la sensation douloureuse suite à ces événements. Toutefois, un nouvel état d'équilibre, dit **allostatique ou de sensibilisation latente**, entre ces deux systèmes peut s'établir, participant à cet état de vulnérabilité pouvant entraîner une chronicisation douloureuse au long terme.

De nombreux mécanismes ont déjà été identifiés, en particulier au niveau du système excitateur, comme étant impliqués dans ces processus de chronicisation douloureuse, en fonction du type de douleur chronique. **Au niveau du système inhibiteur en revanche, et en particulier du EOS, il reste encore à caractériser la modulation et le rôle précis des différents acteurs composant ce système**, en fonction du type de douleur chronique.

Ces dernières années, le laboratoire a identifié **le RTK FLT3 comme un acteur important de la chronicisation douloureuse**, et plus spécifiquement dans le cas de **douleurs neuropathiques ou postopératoires**. De manière intéressante, une **interaction existe également entre FLT3 et un acteur du système opioïdérique endogène, le récepteur MOR, dans les processus de tolérance et d'OIH induits par la morphine**. Etant donné la grande similarité entre les processus d'OIH et de chronicisation douloureuse, il est ainsi intéressant d'étudier cette possible interaction entre FLT3 et l'EOS dans les douleurs chroniques.

OBJECTIFS

Les premières études du laboratoire réalisées sur le récepteur FLT3 dans un contexte de douleur chronique, ont démontré son implication spécifiquement dans un contexte de douleur chronique neuropathique ou postopératoire, mais pas inflammatoire. Plus spécifiquement encore, son inhibition permet de prévenir la mise en place d'une hypersensibilité mécanique faisant suite à une lésion nerveuse ou une incision. Cependant, les mécanismes responsables de cette récupération rapide suite au blocage de FLT3 ne sont pas encore connus.

D'autres résultats préliminaires ont également montré qu'inhiber FLT3 ne permet pas de bloquer la mise en place d'une sensibilisation latente dans ces modèles de douleur neuropathique ou postopératoire, révélée par la réapparition d'une hypersensibilité lors du blocage du système opioïdérique endogène. La présence de cette hypersensibilité suggérant que le système excitateur de la douleur est toujours activé chez les animaux n'exprimant pas FLT3, leur récupération plus rapide serait ainsi due à une activation renforcée des systèmes inhibiteurs de la douleur, et notamment du système opioïdérique endogène.

Enfin, d'autres résultats ont également montré que dans un contexte de traitement à la morphine, FLT3 est capable d'interagir avec un des acteurs du système opioïdérique endogène, le récepteur MOR. Cette interaction est à l'origine de la mise en place des effets secondaires de la morphine. Le blocage de FLT3 suffit à prévenir ces effets secondaires et restaurer un effet analgésique de la morphine et du récepteur MOR.

Ainsi, d'après tous ces résultats et des données de la littérature, nous avons établi deux hypothèses :

- Premièrement, différents acteurs du système opioïdérique endogène seraient responsables de la récupération douloureuse, acteurs différemment impliqués en fonction du type de douleur et de la modalité sensorielle étudiée
- Deuxièmement, FLT3 interagirait spécifiquement avec le système opioïde endogène impliqué dans la récupération de l'hypersensibilité mécanique induite par une lésion nerveuse. En particulier, l'activation de FLT3 provoquerait l'inhibition de ce système, tandis que l'inhibition de FLT3 permettrait son activation, expliquant une récupération des douleurs plus rapide.

Ainsi, le but de mon projet de thèse est i) de mieux caractériser l'implication spécifique des différents récepteurs opioïdiques dans les mécanismes de récupération aux douleurs chroniques neuropathiques, postopératoires ou inflammatoires, et ii) d'étudier une éventuelle modulation par FLT3 des acteurs identifiés comme étant impliqués spécifiquement dans les douleurs neuropathiques et postopératoires.

MATERIEL
&
METHODES

I. Animaux

Les procédures ont été approuvées par le ministère français de la recherche, et suivent les directives européennes 2010/63/UE. Les expériences ont été réalisées sur des rats Sprague-Dawley (Janvier, France), ou différentes lignées murines issues du fond génétique C57BL/6. Les souris étaient âgées de 6 à 8 semaines et pesaient 25-30g au début des expériences. Les animaux ont été maintenus dans un cycle jour-nuit de 12h, avec accès *ad libitum* à l'eau et la nourriture. Les mâles et femelles présentant des niveaux d'hypersensibilité similaires dans les différents modèles de douleur chronique, les expériences ont été principalement réalisées sur des mâles, sauf indication contraire.

Les expériences ont été réalisées sur différentes lignées murines :

- Une lignée sauvage **C57BL/6** (Janvier, France)
- Une lignée **FLT3^{-/-}** portant une délétion homozygote de *flt3*
- Une lignée **FLT3-Cre : Ribotag** issue du croisement entre les lignées FLT3^{cre} et Ribotag^{loxP/loxP}, nous permettant d'identifier les neurones exprimant FLT3
- Une lignée **FLT3-Cre**, nous permettant l'injection de virus AAV Cre-dépendants

II. Modèles expérimentaux

1. Souris

1.1. Douleur chronique postopératoire

Le modèle de double incision (Cabañero et al., 2009) a été utilisé lors de la thèse. Après anesthésie à l'isoflurane (2,5% vol/vol), une incision de 0.7 cm a été réalisée sur la peau et le fascia de la patte arrière gauche de l'animal à l'aide d'un scalpel (lame 11). Le muscle sous-cutané a ensuite été exposé, et incisé longitudinalement. Après avoir effectué l'hémostase, 2 points de suture ont été réalisés en surjet à l'aide d'un fil 6.0 résorbable, avant de placer les souris dans une cage de réveil. Une semaine après la première chirurgie, la même procédure a été réalisée sur la patte arrière opposée.

Pour les groupes « sham », les animaux ont été seulement anesthésiés à l'isoflurane.

1.2. Douleur chronique neuropathique

Le modèle de « cuff » (Yalcin et al., 2014) a été employé. Après anesthésie à l'isoflurane (2,5% vol/vol), la peau a été incisée et le nerf sciatique exposé unilatéralement en écartant le muscle biceps fémoral. Un tube en polyéthylène (PE-20 ; DI 0,38mm ; DE 1,09mm ; Harvard Apparatus) de 2mm de longueur a ensuite été inséré autour du nerf sciatique, et une légère pression a été exercée à chaque extrémité du tube. La peau a ensuite été refermée à l'aide d'agrafes, avant de placer les souris dans une cage de réveil.

Pour les groupes « sham », les animaux ont été anesthésiés à l'isoflurane, la peau a été incisée et le nerf sciatique isolé temporairement, avant de refermer à l'aide d'agrafes.

1.3. Douleur chronique inflammatoire

Le modèle de douleur inflammatoire induite par l'adjuvant de Freund (« Complete Freund Adjuvant », CFA) a été utilisé : après anesthésie à l'isoflurane (2,5% vol/vol), une injection intraplantaire de 20µL d'une solution de 1mg/ml de *mycobacterium tuberculosis* (Sigma-Aldrich) a été effectuée sur la patte arrière gauche de l'animal, avant de placer les souris dans une cage de réveil.

Pour les groupes « sham », une injection intraplantaire de 20µL d'une solution saline a été réalisée.

2. Rat

Mise en place du modèle FL + morphine

Une injection de FL est d'abord réalisée en intrathécal, à l'aide d'une aiguille 30 G attachée à une seringue Hamilton qui est insérée entre les vertèbres L4 et L5 de rats anesthésiés à l'isoflurane. Le réflexe de la queue est utilisé pour confirmer la localisation du site d'injection. Un volume total de 20µL est injecté 30 minutes avant l'injection de morphine, à une concentration de 138nM. La morphine sulfate est administrée par voie sous-cutanée à une dose de 2mg/kg.

III. Produits pharmacologiques

1. Inhibiteurs pharmacologiques du système opioïdérique endogène

Différents antagonistes du système opioïdérique endogène ont été utilisés lors de la thèse, répertoriés dans le tableau ci-dessous, afin de discriminer le rôle spécifique de chacun des acteurs de ce système dans les différents modèles de douleur chronique, ainsi que la part périphérique et centrale dans ces effets. Les volumes d'injection intrapéritonéale (i.p.) et intrathécale (i.t.) étaient de 200µL et 5µL par souris respectivement.

Dans le cas d'une inhibition chronique du DOR, des pompes osmotiques ont été employées afin de diffuser de façon continue l'agent pharmacologique en sous-cutané. Les pompes osmotiques (Alzet, #1002) ont été implantées sous anesthésie à l'isoflurane (2,5% vol/vol) au moment de la réalisation de la seconde incision du modèle de douleur chronique postopératoire, pour un débit de diffusion de 0,25µL/h pendant 14 jours.

Inhibiteur pharmacologique	Cible	Méthode d'injection	Quantité injectée	Fournisseur
Naloxone	Système opioïdérique endogène	i.p.	1mg/kg	Sigma
Naloxone méthiodide	Système opioïdérique endogène <i>(Ne passe pas la barrière hémato-encéphalique)</i>	i.p.	5mg/kg	Sigma
		i.t.	5µg	
CTAP	MOR	i.t.	5µg	Sigma
		i.p.	5mg/kg	
Naltrindole	DOR	i.t.	10µg	Sigma
		i.p.	10mg/kg	
		Sous-cutanée <i>(pompes osmotiques)</i>	1,5mg/kg/jour	
Nor-BNI	KOR	i.t.	5µg	Tocris

2. Autres produits pharmacologiques

Produit pharmacologique	Cible	Méthode d'injection	Quantité injectée	Fournisseur
SNC80	Agoniste peptidergique du récepteur DOR	i.t.	20µg	Tocris
BDT001	Modulateur allostérique négatif du récepteur FLT3	i.p.	5mg/kg	Biodol
Morphine	Agoniste du système opioïdergique	i.p.	1,5mg/kg	Francopia
Clonidine	Agoniste récepteur adrénergique α_2	i.t.	5µg	Sigma
Minocycline	Inhibiteur macrophages (Sorge et al., 2015)	i.t.	300µg	Sigma
NKY80	Antagoniste AC5	i.t.	5µg	Tocris
STO34307	Antagoniste AC1	i.t.	5µg	Sigma

3. Stratégies virales

Un virus AAV-Flex-TdTomato PHP.S (Addgene # 28306-PHP.S) a été utilisé sur la lignée FLT3-Cre afin d'obtenir une expression de la TdTomato uniquement dans les cellules FLT3-positives du SNP. Les injections ont été réalisées en i.p. (2µL/souris) à P2, et les tissus prélevés au moins 5 semaines après injection.

IV. Tests comportementaux

1. Souris

1.1. Test des filaments de Von Frey

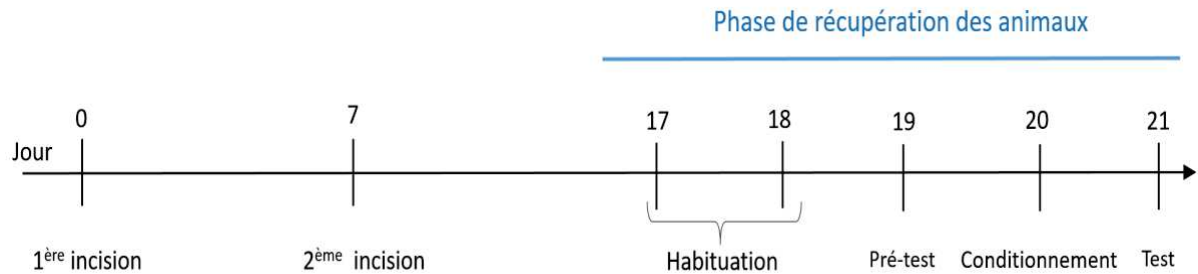
Afin de mesurer l'hypersensibilité mécanique des animaux, le seuil de retrait tactile a été évalué par l'usage de 8 filaments de Von Frey (exerçant chacun une pression allant de 0,04g à 8g), selon la méthode du « up and down » (Chaplan et al., 1994). Les animaux ont été isolés dans des boîtes individuelles en plexiglas situées sur une grille surélevée. Les filaments ont été appliqués sur la patte arrière de l'animal ; en cas de retrait prononcé de la patte, le filament supérieur était ensuite appliqué, jusqu'à obtenir 4 mesures après le premier retrait de l'animal.

1.2. Test du Hargreaves

Afin de mesurer l'hypersensibilité thermique au chaud des animaux, le test du Hargreaves a été effectué. Une source de chaleur radiante (IITC Life Sciences, USA) était appliquée sur la voute plantaire de l'animal à 30% de sa puissance maximale, et la latence au retrait de la patte était mesurée. 3 mesures successives étaient réalisées et moyennées à chaque test.

1.3. Test de préférence de place conditionnée (CPP)

a. Mesure de la douleur spontanée en phase de récupération, après injection d'antagonistes



Afin de mesurer la douleur spontanée suite à l'injection d'antagonistes du système opioïdergique sur le modèle de douleur postopératoire, en parallèle aux mesures de douleurs évoquées par le test des filaments de Von Frey, le test de préférence de place conditionnée (King et al., 2009) a été employé. Le test débute 10 jours après la réalisation de la seconde incision. Les 3 premiers jours, les animaux avaient un accès libre pendant 15 minutes à deux compartiments principaux (20 x 18 x 25 cm) reliés entre eux par un compartiment neutre (20 x 7 x 25 cm). Chaque compartiment est différencié visuellement par des motifs et couleurs spécifiques. Le 3^{ème} jour du test, correspondant au pré-test, le temps passé dans chacun des compartiments a été enregistré et quantifié à l'aide d'une caméra de « video tracking » et du logiciel Ethovision, afin de vérifier que les souris n'ont pas de préférence pour l'un des deux compartiments. Les animaux ayant passé plus de 80% ou moins de 20% dans un des deux compartiments ont été exclus pour la suite du test. Le 4^{ème} jour, correspondant à l'étape de conditionnement, les souris ont d'abord reçu le matin une injection i.p. d'antagonistes (naltrindole, CTAP, ou un contrôle saline), suivi 15 minutes plus tard d'une injection i.t. de solution saline. Les animaux ont ensuite été placés dans un des deux compartiments pendant 20 minutes, sans accès aux autres pièces du CPP. 5h après la 1^{ère} injection, les animaux ont reçu une seconde injection i.p. d'antagonistes (naltrindole, CTAP, ou contrôle saline), suivi 15 minutes plus tard d'une injection intrathécale de clonidine. Les souris ont ensuite été placées dans le compartiment opposé à celui associé à l'injection saline. Enfin, le 5^{ème} jour, correspondant au test, les animaux avaient à nouveau accès libre à chaque compartiment pendant 15 minutes, et le temps passé dans chacun des compartiments a été enregistré et quantifié.

Ainsi, les animaux présentant une douleur spontanée suite au blocage du système opioïdérique auront associé l'effet antalgique de la clonidine au compartiment conditionné, passant donc un temps plus élevé dans ce compartiment le jour du test.

Le score de CPP a ensuite été calculé suivant l'équation suivante, où C_1 représente le compartiment associé à la clonidine, et C_2 le compartiment associé à la solution saline :

$$CPP\ Score = \frac{C_1 - C_2}{C_1 + C_2}$$

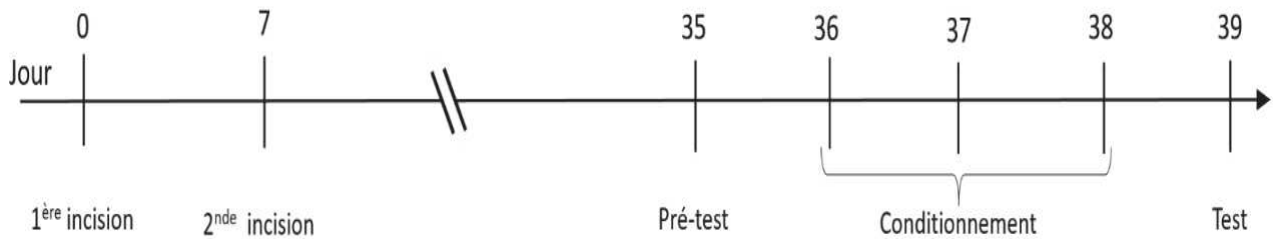
Ainsi, plus les souris auront passé du temps dans le compartiment clonidine, plus le score sera élevé.

b. Mesure de la douleur spontanée en phase d'hypersensibilité

Afin de mesurer la douleur spontanée en phase d'hypersensibilité, le test de CPP a également été employé. Un protocole similaire à précédemment a été employé, avec un conditionnement différent, les animaux ayant reçu premièrement une injection intrathécale de solution saline, suivie 4h après d'une injection intrathécale de $5\mu\text{g}/5\mu\text{L}$ de clonidine, un antalgique non renforçant agoniste des récepteurs adrénergiques α_2 .

Ainsi, les animaux présentant une douleur spontanée auront associé l'effet antalgique de la clonidine au compartiment conditionné, passant donc un temps plus élevé dans ce compartiment le jour du test.

c. Mesure des effets motivationnels de la morphine



En plus de l'étude de la douleur spontanée, le test du CPP a été employé afin d'étudier les effets motivationnels induits par la morphine en condition de douleur chronique postopératoire. Le test débute environ 2 semaines après récupération complète des animaux de la seconde incision. Dans ce protocole, le pré-test a été effectué le 1^{er} jour, et le conditionnement les 3 jours suivants, où les animaux ont reçu 2 injections intrapéritonéales par jour à 4h d'intervalle soit d'une solution saline, soit de morphine à 1,5mg/kg qui n'a pas d'effet renforçant à cette concentration chez des animaux naïfs.

Une augmentation du temps passé dans le compartiment associé à l'injection de morphine illustre ainsi une vulnérabilité aux effets motivationnels induits par la morphine, pouvant être associé à une vulnérabilité aux phénomènes d'addiction.

1.4. Tests d'anxiodépression

Afin d'étudier le comportement anxiodépressif des animaux, 3 tests complémentaires ont été utilisés : le « splash test » (ST), le « Novelty Suppressed Feeding Test » (NSFT), et le « Forced Swim Test » (FST). Ces tests ont été réalisés dans cet ordre sur 3 jours consécutifs et durant la nuit, correspondant à la période d'éveil des animaux.

a. Le « Splash Test »

Les souris ont été isolées, et une solution de 10% de sucrose a été appliquée en spray sur le dos de l'animal. Le temps de toilettage a ensuite été chronométré sur une période fixe de 5 minutes. Une baisse du comportement de toilettage, considéré comme un comportement motivationnel chez le rongeur, peut être interprété comme un symptôme d'anxiodépression.

b. Le « Novelty Suppressed Feeding Test »

Les animaux ont été mis à jeun 24h avant le début du test, avant d'être placé dans le coin d'une arène (50cm x 50cm x 50cm), où un pellet de nourriture a été préalablement placé au centre. La latence de l'animal à aller croquer le pellet a été mesurée, avec un délai maximal de 5 minutes. Plus l'animal présente du stress, plus il met du temps à s'aventurer dans le centre de l'arène jusqu'au pellet. Ainsi, une augmentation de la latence à aller manger peut être interprété comme un signe d'anxiété.

c. Le « Forced Swim Test »

Les souris ont été placées dans un réservoir cylindrique en verre (12,5 cm de diamètre x 17,5 cm de hauteur) contenant 11,5 cm d'eau à température ambiante. Après 2 minutes d'adaptation, l'immobilité des animaux a été mesurée sur une période fixe de 4 minutes. Une augmentation du temps d'immobilité est interprétée comme un signe de dépression.

1.5. Tests de motricité

a. Rotarod

Afin d'évaluer la coordination motrice des animaux, les souris étaient placées sur une barre rotative, dont la vitesse de rotation était réglée à 10 rpm pendant 60 secondes, avant une accélération progressive jusqu'à 80 rpm au bout de 5 minutes. Le délai de chute de la barre des animaux était mesuré, et 3 mesures ont été réalisées et moyennées par test.

b. Openfield

Les animaux sont placés dans une arène (50cm x 50cm x 50cm), et leurs déplacements sont enregistrés à l'aide d'un logiciel de vidéotracking pendant 10 minutes. L'activité locomotrice des animaux est ainsi évaluée ; en particulier, la distance parcourue était mesurée.

De plus, le temps passé au centre et aux bords de l'arène était également évalué, nous renseignant sur le comportement anxieux de l'animal, en complément des tests d'anxiodépression.

2. Rat

Mesure de l'effet analgésique de la morphine et développement d'OIH : test du Randall-Selitto

Le seuil nociceptif des rats est déterminé par une variante de la méthode de Randall-Selitto qui consiste à écouter les vocalisations par pression sur la patte. Après l'arrivée au laboratoire, les animaux sont laissés 4 jours dans leur chambre de colonie pour qu'ils s'habituent à leur habitat. Afin d'éviter tout stress résultant de conditions expérimentales, les expérimentations sont réalisées par le même expérimentateur dans des conditions calmes. 2 semaines avant les expérimentations, les animaux sont habitués à la chambre expérimentale en étant laissés 1h pour qu'ils soient accoutumés à leur environnement. Ils sont ensuite manipulés avec précaution pendant 5 minutes et exposés à l'appareil de mesure sans stimulation. Le jour de l'expérimentation, une pression qui augmente de manière constante est appliquée sur la patte arrière du rat tenu à la main jusqu'au cri sonore du rat, qui détermine en grammes le seuil nociceptif de l'animal. Un analgésimètre Basile (diamètre de la pointe du stylet de 1mm ; Bioseb, France) est employé et un cut-off maximal de 600g est appliqué pour prévenir de dommages tissulaires. Avant de commencer les expérimentations, le seuil nociceptif basal des animaux est mesuré durant 2 jours.

Lors des traitements, une mesure est effectuée avant traitement afin de vérifier la stabilité du seuil nociceptif. L'injection intrathécale de FL est réalisée 1h avant la mesure du seuil nociceptif. L'injection sous-cutanée de morphine ou de solution saline est effectuée 30 minutes avec mesure du seuil nociceptif. Pour mesurer l'effet analgésique dans le temps, une mesure est réalisée toutes les 30 minutes pendant 2h30 afin d'obtenir le décours de l'effet analgésique de la morphine jusqu'au retour à un seuil nociceptif basal.

Pour les inhibiteurs, 3 injections journalières en intrathécale ont été réalisées pour 4EGI-1, le jour correspondant au test et les 2 jours précédent. L'inhibiteur AG490 a été injecté le jour du test, 2h avant l'injection de FL.

V. Hybridation *in situ*

1. Hybridation *in situ* (réaction enzymatique peroxydase)

1.1. Préparation des tissus

Les souris ont reçu une injection intrapéritonéale de 25 μ L de pentobarbital (Euthasol Vet), suivie d'une perfusion intracardiaque au PBS 1X. Le cerveau, la moelle épinière et les DRGs lombaires ont ensuite été prélevés.

Une post-fixation de 4% de paraformaldéhyde (PFA) a été réalisée sur la nuit pour les cerveaux, et 15 et 30 minutes pour les DRGs et la moelle épinière respectivement. Après rinçage au PBS 1X froid, les cerveaux ont été coupés en tranches coronales de 50 μ m d'épaisseur au vibratome avant d'être conservés dans du PBS azide 0,02% à 4°C, et les DRGs et la moelle épinière ont été plongés dans une solution de 30% de sucrose sur la nuit. Les DRGs et ME ont ensuite été placés dans des moules à inclusion contenant de l'O.C.T. avant d'être conservés à -80°C. Enfin, les tissus ont été coupés à l'aide d'un cryostat en tranches de 12 μ m pour les DRGs et 14 μ m pour la ME, et conservés sur lame à -20°C.

1.2. Hybridation *in situ*

La sonde anti-sens marquée à la digoxigénine (DIG) a été générée à partir d'un clone ADNc de Flt3 murin (IRAMp995N1310Q, Genome-CUBE Source Bioscience) dans une solution de 20 μ L contenant le plasmide linéarisé et digéré avec l'enzyme de restriction NheI,

MATERIEL & METHODES

en utilisant le mix de marquage DIG-RNA et la polymérase Sp6. La sonde anti-Flt3 a ensuite été purifiée sur des colonnes G50 MicroSpin.

Au préalable de l'expérimentation, la sonde anti-Flt3 a été chauffée à 68°C pendant 10 minutes afin de la dérouler, avant de la diluer dans un tampon d'hybridation (1mL 10X Salt, 5mL formamide, 2mL 50% sulphate de dextran, 1mL de levure tRNA à 10mg/mL, 200µL de denhardt's 50X, et 800µL d'eau DEPC).

Après décongélation des lames de DRGs ou ME, et rinçage au PBS pour supprimer les restes d'O.C.T., 350µL de tampon d'hybridation a été appliqué sur chaque lame, avant de les recouvrir de lamelles et de les incuber à 70°C sur la nuit dans une boîte hermétique imbibée de formamide 50%.

Le lendemain, 2 rinçages de 30 minutes dans un tampon 50% formamide à 70°C ont été effectués, suivis de 2 rinçages à température ambiante avec une solution MABT (30mL de MAB 5X -58g d'acide maléïque et 44g NaCl dilués dans 1L d'eau- 150µL de tween20, et 120mL d'eau DEPC). 400µL d'une solution de blocage (0,12mL d'agent bloquant, 1,2mL de sérum de mouton, 4,68mL de MABT) ont ensuite été appliqués sur chaque lame pendant 2h à température ambiante, dans une boîte hermétique imbibée d'eau stérile. Enfin, 300µL d'une solution d'anticorps anti-DIG ont été appliqués sur chaque lame dans la même boîte hermétique, sur la nuit.

Le dernier jour, 3 rinçages avec une solution de MABT et 4 rinçages avec du tampon B3 (10mL Tris pH9.5 1M, 2,5mL NaCl 4M, 5mL NaCl 4M, 5mL MgCl2 1M, 82.5mL d'eau mQ, 100µL tween20) ont été effectués. Enfin, 300µL de substrat (2,5mL tampon B3, 3,5µL de NBT, 2,75µL de BCIP et 10µL levamisole 0,5M) ont été appliqués sur chaque lame. La révélation s'est faite dans le noir dans une boîte hermétique à température ambiante, avec un suivi régulier sous une loupe binoculaire. Pour stopper la réaction, 2 rinçages à l'eau mQ ont été effectués, et 60µL d'un milieu de montage mowiol ont été déposés sur chaque lame pour monter les lamelles. Dans les cas où des immunohistochimies ont été réalisées suite à l'hybridation in situ, un milieu de montage temporaire (90% glycérol, 10% PBS) a été utilisé. Enfin, les lames ont été conservées à 4°C, et les images ont été prises sur un scanner de lame Axio Scan.

2. RNAscope

2.1. Préparation des tissus

Les souris ont reçu une injection intrapéritonéale de 25µL de pentobarbital (Euthasol Vet), suivie d'une perfusion intracardiaque au PBS 1X. La moelle épinière et les DRGs lombaires ont ensuite été prélevés.

Une post-fixation de 4% de paraformaldéhyde (PFA) a été réalisée pendant 4h. Les tissus ont ensuite été plongés dans une solution de 30% de sucrose sur la nuit, puis placés dans des moules à inclusion contenant de l'OCT avant d'être conservés à -80°C. Enfin, les tissus ont été coupés à l'aide d'un cryostat en tranches de 12µm pour les DRGs et 14µm pour la ME, et conservés sur lame à -20°C.

2.2. Hybridation *in situ*

Le 1^{er} jour, les lames sont mises à température ambiante pendant 30 minutes, puis rincées au PBS 1X 10 minutes pour retirer le surplus d'OCT. Les tissus sont ensuite déshydratés en les plongeant dans trois bains successifs à 50, 70 et 100% d'éthanol respectivement, 5 minutes chacun. Les lames sont ensuite incubées 1h30 à 60°C afin de permettre la bonne adhésion des coupes sur la lame, avant de les incuber pendant 10 minutes dans une solution de *RNAscope peroxyde d'hydrogène* à température ambiante. Une étape de démasquage avec une solution *1X de RNAscope Target Retrieval Reagent* a ensuite lieu, pendant 5 minutes à 98-100°. Après un rinçage à l'eau mQ et un rinçage à 100% d'éthanol, une barrière hydrophobe est ensuite tracée autour des coupes d'intérêt. Enfin, les lames sont maintenues à température ambiante sur la nuit afin de laisser sécher la barrière hydrophobe.

Le 2^{ème} jour, les lames sont incubées 6 minutes à 40°C avec 60µL de *protéase IV* dans le four à RNAscope, avant d'effectuer un rinçage à l'eau mQ. La sonde d'intérêt est ensuite déposée sur les coupes, et les lames sont mises à incuber 2 heures à 40°C, suivi de trois rinçages de 5 minutes au *1X RNAscope wash buffer*, les lames sont ensuite incubées successivement avec une solution *RNAscope multiplex FLv2Amp1* 30 minutes à 40°C, *FLv2Amp2* 30 minutes à 40°C, *FLv2Amp3* 15 minutes à 40°C, et enfin *FLv2 HRP1* 15 minutes à 40°C, avec trois rinçages de 5 minutes au *1X RNAscope wash buffer* à la fin de chaque incubation. Enfin, l'opale fluorophore est déposée et les lames incubées 30 minutes à 40°C, puis rincées et incubées 15 minutes à 40°C avec *l'HRP blocker*, et rincées à nouveau. A partir de cette étape, soit le protocole

d'immunohistochimie classique est réalisé (en incubant les anticorps primaires 48h), soit une incubation de 30s avec du DAPI et effectuée, avant d'effectuer un montage entre lame et lamelle avec du *Prolong Gold Antifade Mountant*.

VI. Immunohistochimie

1. Préparation des tissus

Les souris ont reçu une injection intrapéritonéale de 25µL de pentobarbital (Euthazol Vet), suivie d'une perfusion intracardiaque au PBS 1X. Selon les expériences, le cerveau, la moelle épinière, les DRGs lombaires, le nerf sciatique et la peau glabre et pileuse de la patte ont ensuite été prélevés.

Une post-fixation de 4% de paraformaldéhyde (PFA) a été réalisée sur la nuit pour les cerveaux, pendant 15 minutes pour la peau et le nerf sciatique, 1h pour les DRGs lombaires, et 2h pour la moelle épinière. Après rinçage du PFA au PBS 1X froid, les cerveaux ont été coupés en tranches coronales de 50µm d'épaisseur au vibratome avant d'être conservés dans du PBS azide 0,02% à 4°C. Les autres tissus ont été plongés dans une solution de 30% de sucrose sur la nuit, avant d'être placés dans des moules à inclusion contenant de l'O.C.T. et conservés à -80°C. Enfin, les tissus ont été coupés à l'aide d'un cryostat en tranches de 12µm pour les DRGs et le nerf sciatique, 14µm pour la ME, 25µm pour la peau, et conservés sur lame à -20°C.

2. Marquage et anticorps

Après décongélation des lames, et rinçage au PBS pour supprimer les restes d'O.C.T., 300µL de solution de perméabilisation cellulaire (*PBS 1X, 0,1% triton X-100, 10% sérum d'âne*) ont été appliqués sur chaque lame pendant 30 minutes à température ambiante. 300µL de la solution contenant les anticorps primaires (*PBS 1X, 0,1% triton X-100, 1% sérum d'âne*) ont été appliqués sur la nuit à 4°C, ou pendant 48h dans le cas d'un couplage avec l'hybridation *in situ*. La liste des anticorps utilisés est répertoriée dans le tableau ci-dessous.

Le lendemain, 3 rinçages au PBS ont été effectués, avant d'appliquer sur chaque lame 300µL de la solution contenant les anticorps secondaires (*PBS 1X, 0,1% triton X-100, 1% sérum d'âne*) et l'agent intercalant Hoechst utilisé pour marquer les noyaux des cellules, pendant 1h30 à température ambiante. Enfin, 3 rinçages au PBS ont été effectués, et 60µL d'un milieu de montage mowiol ont été déposés sur chaque lame pour monter les lamelles. Enfin, les lames

ont été conservées à 4°C, et les images ont été prises sur un microscope confocal Carl Zeiss LSM 880.

Pour l'immunohistochimie sur tranches de cerveaux, les tranches ont été préalablement monté sur lames avant de réaliser le même protocole que précédemment.

Cible	Espèce	Dilution	Fournisseur
HA	Rat	1/500	Sigma
CGRP	Lapin	1/1000	Abcam
NeuN	Cochon d'Inde	1/1000	Millipore
NF200	Souris	1/1000	Sigma
Iba1	Lapin	1/300	Wako
Pax2	Lapin	1/500	In Vitrogen
TLX3	Cochon d'Inde	1/10 000	Don de Carmen Birchmeier
Lmx1b	Cochon d'Inde	1/10 000	Don de Carmen Birchmeier

VII. Imagerie calcique

1. Modèle Cuff et traitement in vivo

Le modèle cuff a été employé pour instaurer une douleur neuropathique. L'intervention a été réalisée sur des souris adultes mâles C57BL/6 âgées de 6 à 7 semaines sous anesthésie. Le blocage pharmacologique de FLT3 a été réalisé durant la phase d'hypersensibilité mécanique des souris Cuff déterminée expérimentalement. Pour cela, l'inhibiteur de FLT3, le BDT001, a été injecté quotidiennement en intrapéritonéal (5mg/kg), durant la semaine précédant la culture des DRGs.

2. Culture de DRGs

Les DRGs du nerf sciatique (L4, L5, L6) sont prélevés entre la 4^{ème} et 6^{ème} semaine post-intervention, du côté ipsilatéral et controlatéral au cuff chez des souris traitées ou non au BDT001. Les DRGs sont séparés de leurs racines centrales et périphériques puis dissociés

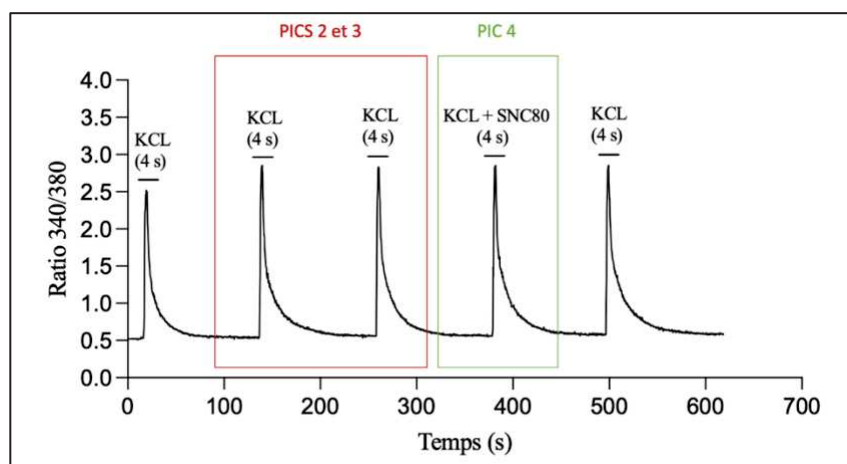
enzymatiquement et mécaniquement. Les cellules isolées sont recueillies par centrifugation et mises en suspension dans un milieu de culture Neurobasal, placées à une densité de 3500 neurones par boîte et incubées dans une atmosphère humidifiée à 95% d'air, 5% de CO₂ à 37°C.

3. Imagerie calcique

L'imagerie calcique a été réalisée sur les cultures cellulaires entre 24 et 48h après l'ensemencement. Les cellules ont été chargées avec la sonde fluorescente ratiométrique Fura-2 AM pendant 45 minutes puis observées sur un microscope inversé Zeiss Axiovert 200 avec un objectif × 20 à immersion d'huile. Des régions d'intérêt ont été identifiées dans le soma à partir desquelles des mesures quantitatives de l'intensité de fluorescence à 505 nm avec une double excitation 340/380 nm ont été enregistrées sous forme d'images numériques à l'aide du logiciel MetaFluor Ratio Imaging. Le KCl (50 mM) a été utilisé comme activateur neuronal et le SNC80 (10 μM) comme agoniste du DOR selon le protocole de stimulation suivant : 3 stimulations KCl suivies d'une stimulation KCl+SNC80 puis d'une dernière stimulation KCl.

4. Analyse de la réponse au SNC80

Le calcul suivant a été réalisé pour étudier la réponse des cellules au SNC80 :



$$\text{Réponse SNC80} = \left(\frac{\text{PIC 4}}{\text{Moyenne PIC 2 + 3}} \right) * 100$$

Nous avons classé la réponse au SNC80 en trois sous-populations avec des neurones répondeurs inhibés, répondeurs excités ou non répondeurs.

- Neurones non répondeurs : [100 – 2 écarts-types ; 100 + 2 écarts types]
- Neurones répondeurs excités : > 100 + 2 écarts-types
- Neurones répondeurs inhibés : < 100 – 2 écarts-types

5. Analyse des données

La proportion de neurones répondeurs inhibés entre la condition sans et avec injection de BDT001 du côté ipsilatéral et controlatéral est comparée par la méthode d'analyse des tableaux de contingence, en utilisant le test du X².

La règle est que la somme des lignes doit être égale au nombre total de cellules enregistrées. Les proportions sont ensuite calculées en prenant en compte que la somme totale des cellules d'une condition est sur la ligne.

Une fois les proportions en pourcentage obtenues dans les différentes conditions (avec ou sans BDT001 du côté ipsilatéral et controlatéral), un test statistique du X² est réalisé, donnant une différence avec une p-value globale.

VIII. RT-qPCR

Les cornes dorsales de la moelle épinière lombaire et les DRGs lombaires L4 ipsi et contra ont été prélevés à différents temps post- chirurgie et conservés à -80°C en attendant l'extraction des ARNs grâce à la méthode TRI reagent / chloroforme (Sigma) selon le protocole du fournisseur. Suite à l'extraction, les échantillons sont traités avec de la DNase (M610A, Promega) et rétro-transcrits. Les réactions de Q-PCR sont réalisées sur des plaques 96 puits sous un volume final de 10µL comprenant 3µL d'ADNc (dilution final :1/90), 0.5µM de primer forward et reverse et 5µL de SyberGreen I master mix (Roche Life Sciences). La lecture est réalisée grâce à un LightCycler 480 (Roche). Les résultats sont normalisés par la moyenne géométrique de 2 gènes de référence, DDX48 et Ube2e3, préalablement déterminés par une expérience de screening de gènes ubiquitaires sur les différents échantillons. La quantification relative des produits de PCR se fait en utilisant la méthode delta-CT (Vandesompele J et al, 2002).

MATERIEL & METHODES

Un tableau récapitulatif des sondes utilisées est disponible ci-dessous :

Gène	Primer Forward	Primer Reverse
OPRM1	ACAGGCAGGGGTCCATAGAT	AATACAGCCACGACCACCAG
OPRD1	GGCTGTGCTCTCCATTGACT	GACTGGGGAACCTGGAGCATG
OPRK1	CTCCGGCCATCCCTGTTATC	TGCGGTCTTCATCTTCGTGT
PDYN	GCCCTCTAATGTTATGGCGGA	GCATGTCTCCCACTCCTCTG

RESULTATS

RÉSULTATS PRINCIPAUX

I. Implication des récepteurs opioïdiques endogènes dans la récupération aux différents types de douleurs chroniques

La première partie de mon projet de thèse avait donc pour objectif de mieux caractériser l'implication des différents récepteurs aux opioïdes dans les processus de récupération, en fonction du type de douleur chronique. Pour cela, j'ai utilisé différents modèles de douleurs chroniques chez la souris : le modèle de double incision décrit lors de l'introduction afin d'établir une douleur postopératoire, le modèle de « cuff » consistant à réaliser une constriction du nerf sciatique grâce à un tube en polyéthylène pour étudier la douleur neuropathique, et le modèle d'injection intraplantaire de CFA pour induire une douleur inflammatoire (figure 39).

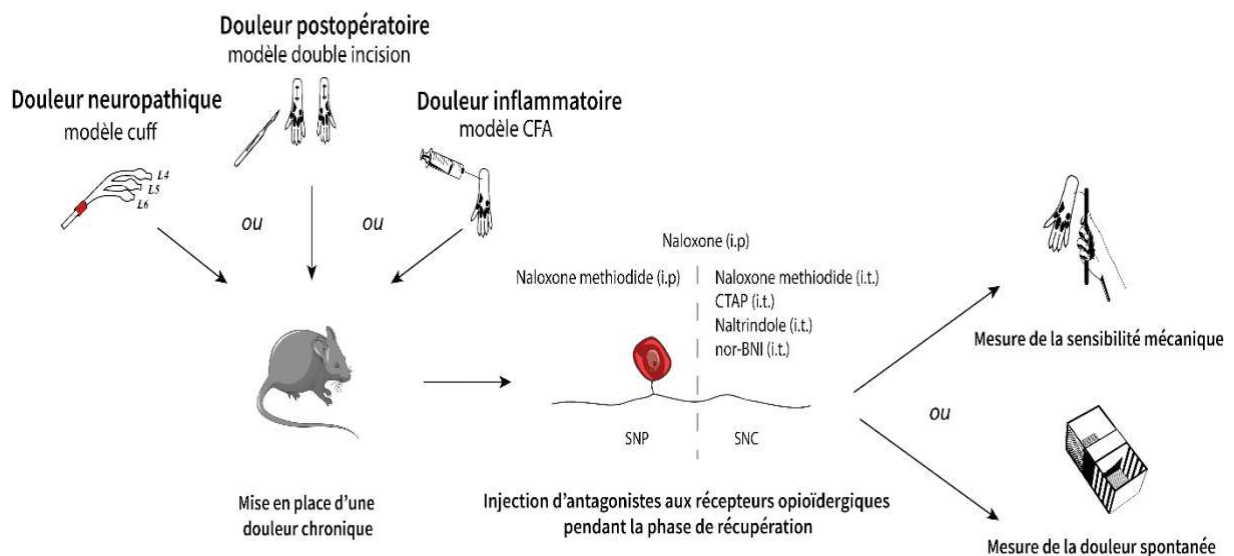


Figure 39. Protocole d'expérimentation *in vivo* de l'étude du système opioïdique endogène dans la récupération à la douleur chronique

J'ai ensuite effectué un suivi de l'hypersensibilité mécanique des animaux par le test des filaments de Von Frey en « up and down », jusqu'au retour à un seuil de sensibilité proche du seuil basal, puis j'ai injecté différents antagonistes du système opioïdérique (cf. détails dans matériel & méthodes) :

- Une injection de naloxone en intrapéritonéal (i.p., 1mg/kg)) pour bloquer l'entièreté de l'EOS dans l'organisme, me permettant de vérifier son implication dans la récupération de chaque type de douleur chronique
- Une injection de naloxone méthiodide (NM), analogue de la naloxone ne passant pas la barrière hématoencéphalique, soit en i.p. (5mg/kg) pour cibler le SNP spécifiquement, ou en intrathécal (i.t., 5µg/souris) pour cibler à la fois les DRGs et la ME, me permettant de distinguer l'implication de l'EOS périphérique de celle de l'EOS central
- Des injections i.t. d'antagonistes ciblant spécifiquement le récepteur MOR (CTAP, 5µg/souris), le récepteur DOR (Naltrindole, 10µg/souris) ou le récepteur KOR (nor-BNI, 5µg/souris) au niveau des DRGs et de la ME.

Une nouvelle mesure de la sensibilité mécanique des animaux a été réalisée 30 minutes après l'injection.

1. Douleur postopératoire

Ces expériences ont tout d'abord été réalisées sur le modèle de double incision, lors de la phase de récupération suite à la seconde incision. Les mesures ont été réalisées sur la patte arrière droite ayant subi la seconde incision, où la récupération débute environ 6 jours après la chirurgie, jusqu'à rémission complète environ 2 semaines après l'incision (figure 40A). Lors de l'injection des antagonistes non spécifiques de l'EOS, j'ai pu observer chez ces animaux que les injections i.p. de naloxone et i.t. de NM ont réinstauré une hypersensibilité mécanique, contrairement à l'injection i.p. de NM. Ainsi, cela confirme le rôle de l'EOS dans la récupération à la douleur postopératoire (figure 40B). Plus spécifiquement, c'est l'EOS exprimé au niveau central qui semble être impliqué. A noter que les mêmes injections réalisées sur des animaux naïfs n'ont eu aucun effet, montrant que l'activation de l'EOS est présente uniquement en cas de lésion (figure 40D). Enfin, lors de l'injection des antagonistes spécifiques, seuls les animaux dont le récepteur DOR a été inhibé ont présenté à nouveau une hypersensibilité

RESULTATS

mécanique (figure 39C), suggérant un rôle spécifique de ce récepteur dans les processus de récupération à la douleur postopératoire.

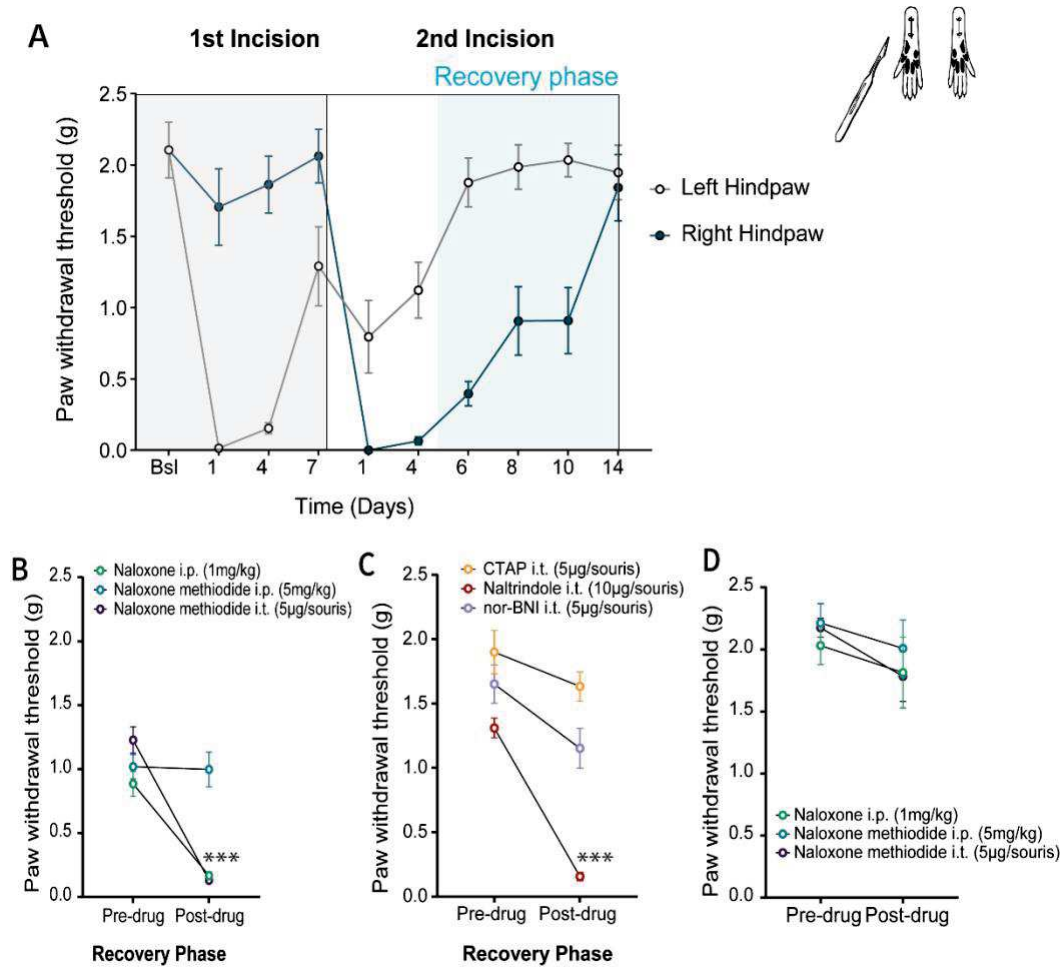


Figure 40. Le récepteur DOR central est impliqué dans la récupération de la douleur postopératoire

A) Suivi de la sensibilité mécanique des animaux suite aux deux incisions. Seuil de sensibilité mécanique des animaux avant et 30 min après injections B) d'antagonistes non spécifiques ou C) d'antagonistes spécifiques des récepteurs de l'EOS pendant la phase de récupération de la douleur postopératoire, ou D) d'antagonistes non spécifiques de l'EOS chez des animaux naïfs. Les valeurs représentent la moyenne + S.E.M. (n=8), Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 par rapport au seuil avant injection

Afin de confirmer de façon plus précise l'implication de ce récepteur, j'ai ensuite réalisé deux expériences supplémentaires sur ce modèle de double incision. Premièrement, lors de la réalisation de la seconde incision, j'ai placé en sous-cutané des mini-pompes osmotiques délivrant de façon continue une faible dose de naltrindole aux animaux pendant 14 jours, en effectuant un suivi régulier de la sensibilité mécanique. Les animaux ayant reçu les mini-pompes de naltrindole n'ont pas présenté de rémission à la seconde incision durant toute la durée où les pompes étaient présentes, au contraire des animaux ayant reçu des mini-

RESULTATS

pompes délivrant du sérum physiologique (figure 41A). Suite au retrait des mini-pompes le 14^{ème} jour, le groupe naltrindole a ensuite présenté une rémission progressive de leur hypersensibilité mécanique, jusqu'à retrouver un seuil basal au bout d'une semaine. Cette expérience confirme ainsi le rôle majeur du récepteur DOR, au contraire des récepteurs MOR et KOR, dans les processus de récupération à l'hypersensibilité mécanique induite par une chirurgie.

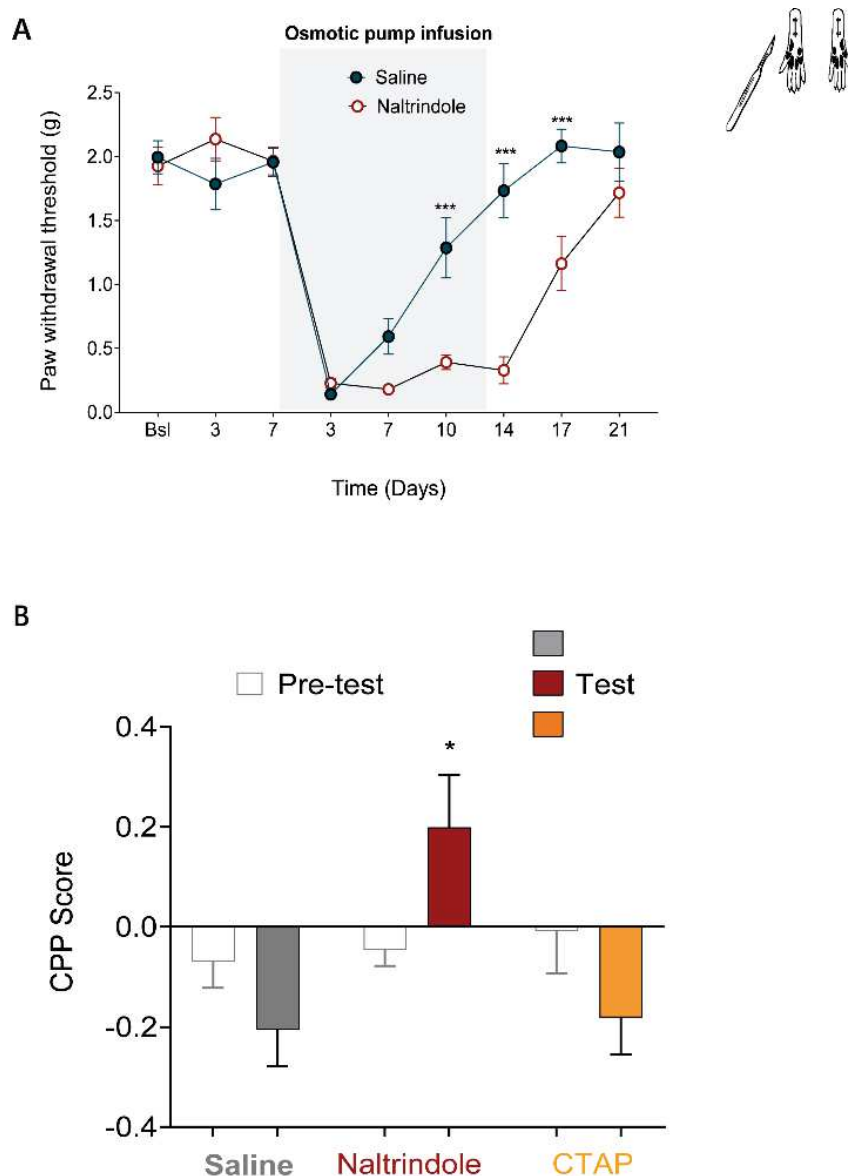


Figure 41. L'inhibition du récepteur DOR empêche une récupération à la douleur postopératoire, et réinstaure une douleur spontanée chez des animaux incisés

A) Suivi de la sensibilité mécanique des animaux suite à la seconde incision, en présence de mini-pompes osmotiques délivrant du sérum physiologique ou de la naltrindole. B) Test de préférence de place conditionnée induite par l'effet analgésique de la clonidine, après injection d'inhibiteur des récepteurs MOR, DOR, ou de sérum physiologique, pendant la phase de récupération de la douleur postopératoire. Les valeurs représentent le score de CPP + S.E.M. (n=10), Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, *P<0.05 par rapport au contrôle

RESULTATS

Il est à noter que le test de Von Frey ne permet d'étudier que l'aspect « évoqué » de la douleur, par des stimulations répétées, mais ne permet pas d'étudier la douleur dite spontanée, présente sans stimulus externe, et dont le laboratoire a montré la présence lors de la phase d'hypersensibilité dans ce modèle (Annexe I, figure 2). De plus, le test de Von Frey est parfois l'objet de critiques, notamment du fait que le réflexe de retrait de la patte de l'animal peut porter à une interprétation suggestive en fonction de l'expérimentateur. De plus, en étudiant les réflexes de l'animal, l'intégration supra-spinale, et donc de la composante émotionnelle et cognitive de l'animal, n'est pas prise en compte. Afin de remédier à cela, j'ai utilisé le test de préférence de place conditionnée (CPP pour « Conditioning Place Preference ») pour étudier la douleur spontanée (cf protocole détaillé dans matériel et méthodes). Le protocole utilisé consistait à créer une association pour les animaux de l'injection seule d'un des antagonistes spécifiques des récepteurs opioïdiques à un des compartiments du CPP, et l'injection couplée de ces mêmes antagonistes avec la clonidine, un analgésique non renforçant, à l'autre compartiment. Si le blocage d'un des récepteurs opioïdiques provoque la réapparition d'une douleur spontanée, les animaux auront développé une aversion pour le compartiment associé à l'injection d'antagonistes seuls, et une préférence pour celui associé à la clonidine. Suite à ce conditionnement, seules les souris ayant été injectées avec la naltrindole ont présenté un score de CPP significativement plus élevé comparé au pré-test c'est-à-dire avant conditionnement, au contraire des souris injectées avec le CTAP, ou avec du sérum physiologique (confirmant qu'au moment de l'expérience, les souris ne présentaient plus de douleur spontanée) (figure 41B). Il est à noter que le nor-BNI, ayant une action perdurant plusieurs semaines, a été exclu lors de cette expérience.

Ainsi, ces différentes données confirment le rôle spécifique du récepteur DOR dans les processus de récupération à l'hypersensibilité mécanique observée dans les douleurs chroniques postopératoires.

2. Douleur neuropathique

Afin d'étudier le rôle de l'EOS dans la récupération à la douleur neuropathique, j'ai pu mettre au point le modèle cuff au sein du laboratoire. En effet ce modèle présente l'avantage d'être fortement reproductible d'un animal à l'autre contrairement aux autres modèles de lésion nerveuse périphérique présentés lors de l'introduction. De plus, il est associé à des changements émotionnels présents sur le long-terme et notamment au développement d'une anxiodépression, en faisant un modèle d'étude fiable dans le cadre de la douleur chronique et des comorbidités associées. J'ai d'abord validé la présence d'une hypersensibilité mécanique chronique suite à la mise en place du modèle, perdurant entre 2 et 3 mois chez tous les animaux (figure 42A). De plus, 8 semaines après la lésion nerveuse, j'ai confirmé chez les animaux en douleur neuropathique la présence d'une anxiodépression, illustrée par une diminution du temps de toilettage chez ces animaux lors du splash test (figure 42B), une augmentation de la latence à aller manger lors du NSFT (figure 42C), et une augmentation du temps d'immobilisation lors du FST (figure 42D), comparé à des animaux sham. Ces tests m'ont ainsi permis de valider l'utilisation de ce modèle au sein du laboratoire, retrouvant les mêmes effets que ceux déjà décrits dans la littérature.

Suite à cela, j'ai réalisé les mêmes expériences que précédemment, avec suivi de la sensibilité mécanique des animaux par le test du Von Frey, avant et après injections d'antagonistes de l'EOS, lors de la récupération à la douleur neuropathique. J'ai obtenu des résultats similaires à ceux des expériences réalisées sur le modèle de douleur postopératoire, à savoir une implication spécifique de l'EOS central dans les processus de récupération (figure 42E), et plus particulièrement du récepteur DOR (figure 42F).

Ces expériences ont donc montré que le récepteur DOR central est spécifiquement impliqué dans les processus de récupération aux douleurs postopératoires et neuropathiques.

RESULTATS

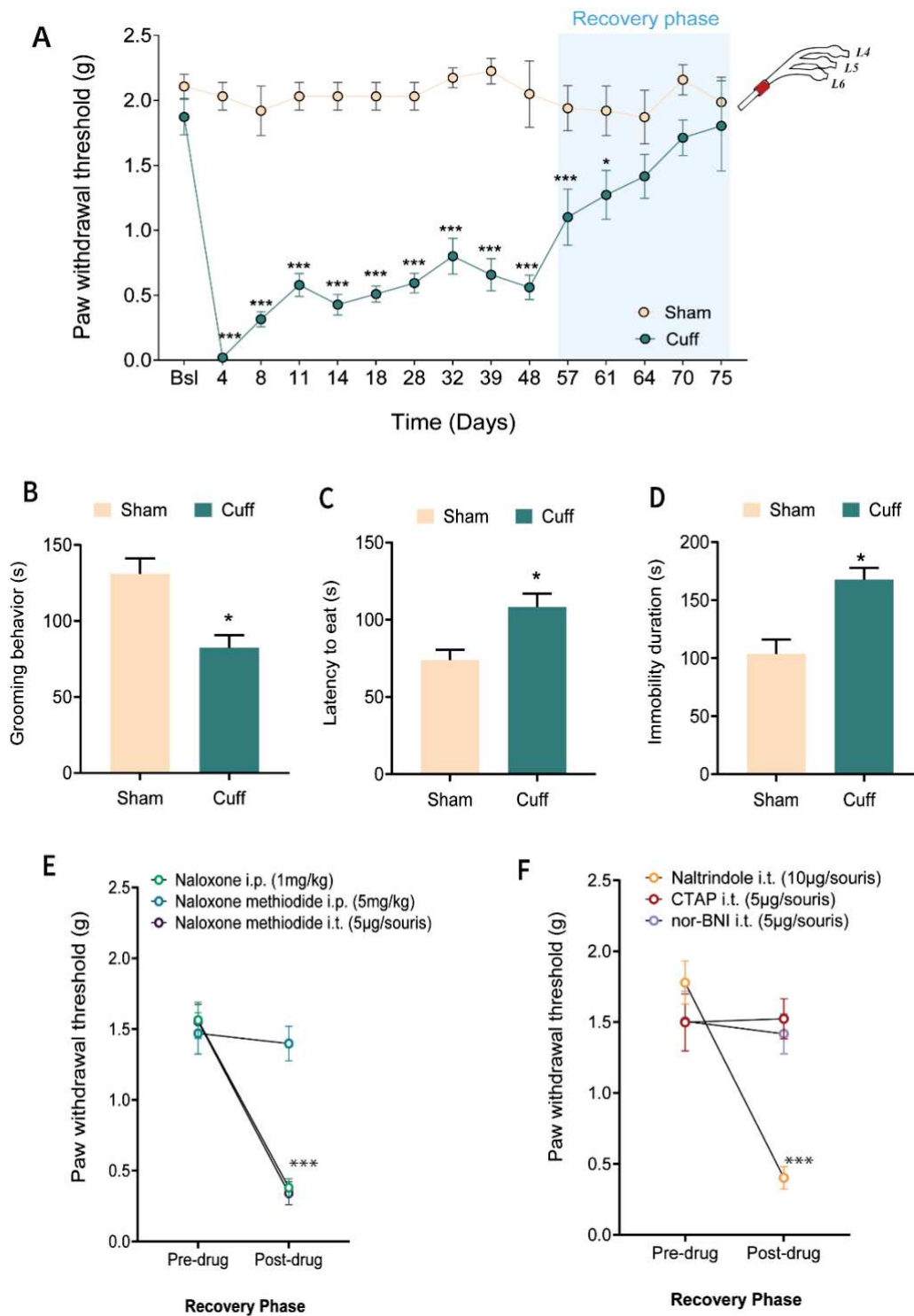


Figure 42. Le récepteur DOR central est impliqué dans la récupération à la douleur neuropathique

A) Suivi de la sensibilité mécanique des animaux sham ou en douleur neuropathique induite par un cuff. B) Temps de toilettage mesuré à l'aide du SP, C) temps de latence à aller manger mesurée à l'aide du NSFT et D) mesure du temps d'immobilisation lors du FST, 8 semaines après procédure sham ou cuff. Seuil de sensibilité mécanique des animaux avant et 30 min après injections E) d'antagonistes non spécifiques ou F) d'antagonistes spécifiques des récepteurs de l'EOS pendant la phase de récupération de la douleur neuropathique. Les valeurs représentent la moyenne + S.E.M. (n=12), (A, E, F) Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, (B, C, D) Student t test ; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 par rapport au contrôle (A à D) ou par rapport au seuil avant injection (E, F)

3. Douleur inflammatoire

Enfin, ces expériences ont été réalisées sur le modèle de douleur inflammatoire, présentant une hypersensibilité mécanique durant environ 3 semaines (figure 43A). De façon intéressante, si l'EOS central semble également être spécifiquement impliqué dans la récupération à la douleur inflammatoire (figure 43B), l'inhibition du récepteur DOR n'a cette fois eu aucun effet sur l'hypersensibilité mécanique des animaux, au contraire de l'inhibition du récepteur MOR (figure 43C).

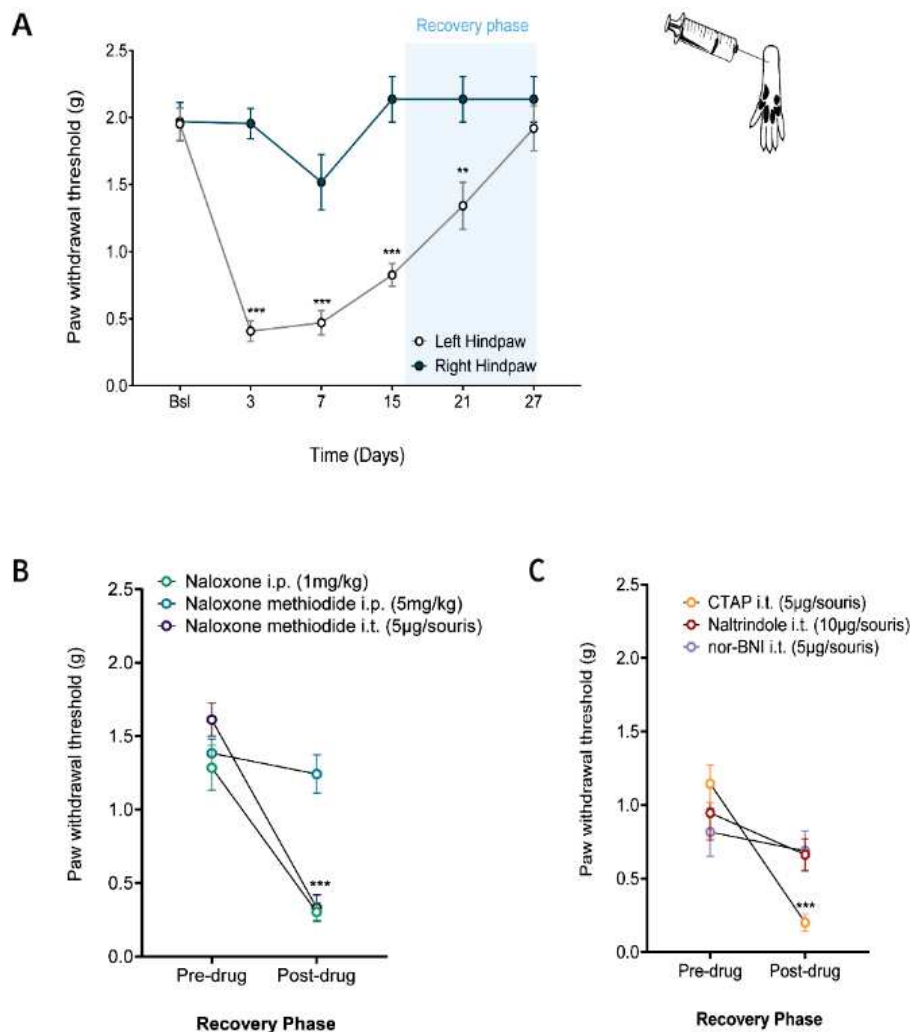


Figure 43. Le récepteur MOR central est impliqué dans la récupération à la douleur inflammatoire

A) Suivi de la sensibilité mécanique des animaux suite à l'injection de CFA. Seuil de sensibilité mécanique des animaux avant et 30 min après injections B) d'antagonistes non spécifiques ou C) d'antagonistes spécifiques des récepteurs de l'EOS pendant la phase de récupération de la douleur inflammatoire. Les valeurs représentent la moyenne + S.E.M. (n=8), Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 par rapport au contrôle (A) ou au seuil avant injection (B, C)

Ces résultats confirment ainsi notre première hypothèse, à savoir que différents récepteurs opioïdiques semblent être impliqués dans les processus de récupération, en fonction du type de douleur. En particulier, le récepteur DOR serait impliqué spécifiquement dans les mécanismes de récupération aux douleurs chroniques neuropathiques et postopératoires, tandis que le récepteur MOR serait impliqué dans les mécanismes de récupération aux douleurs inflammatoires.

4. Etude des voies de signalisation impliquées

Nous avons également voulu étudier les voies de signalisation intracellulaires responsables de l'hypersensibilité modulées par le récepteur DOR. L'implication de différentes isoformes de l'AC a été évoqué dans différents types d'hyperalgésie ainsi que des différences dans les isoformes modulés par chacun des récepteurs opioïdiques. Par exemple, une étude a montré en 2013 l'activation du récepteur MOR spinal pendant la phase de sensibilisation latente instaurée par une douleur inflammatoire (Corder et al., 2013), le blocage du MOR après rémission totale des animaux provoquant la réapparition d'une hypersensibilité mécanique. Cette étude a également démontré que cette hypersensibilité est due à une activation de l'AC1 normalement modulée par le MOR, et donc de la voie AMPc. Aussi, nous avons voulu étudier l'implication de la voie AMPc dans la réinduction d'une hypersensibilité mécanique suite au blocage du DOR à la fin de la récupération de douleurs neuropathiques ou postopératoires des animaux. Comme cela a été évoqué dans l'introduction, si AC1 est généralement associée à MOR, d'autres isoformes sont quant à elles associés à DOR, et notamment l'AC5. J'ai donc couplé une injection de naltrindole lors de la rémission des animaux avec des inhibiteurs pharmacologiques de l'AC1 (STO4307), ou de l'AC5 (NKY80). J'ai pu observer que lors du blocage de l'AC5, l'injection de naltrindole n'a pas provoqué la réapparition d'hypersensibilité, que ce soit dans le modèle postopératoire (figure 44A), ou neuropathique (figure 44B), contrairement au blocage de l'AC1. Ces résultats suggèrent donc une implication de l'isoforme AC5, et de la voie AMPc, dans l'hypersensibilité ré-induite par le blocage du DOR. Cependant, il est à noter que ces inhibiteurs pharmacologiques ne présentent qu'une faible spécificité pour chacun de ces isoformes. Des stratégies plus spécifiques permettront de valider de façon plus sûre ces résultats.

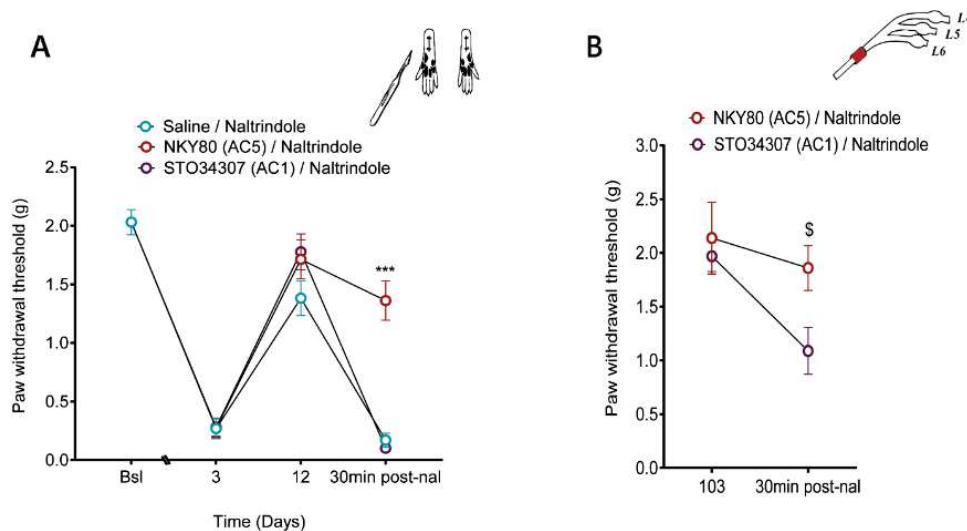


Figure 44. L'hypersensibilité mécanique induite par le blocage du récepteur DOR passe par une activation de l'AC5

Suivi de la sensibilité mécanique des animaux en douleur A) postopératoire ou B) neuropathique, avant et 30 minutes après l'injection d'antagonistes d'AC1 ou d'AC5 (5µg/souris) couplés à la naltrindole, pendant la phase de récupération. Les valeurs représentent la moyenne + S.E.M. (n=8), Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 par rapport au seuil avant injection, #P<0.05 par rapport seuil de l'autre groupe après injection

II. Etude des récepteurs opioïdiques endogènes impliqués dans la récupération induite par le blocage de FLT3

Les résultats obtenus par le laboratoire démontrent une récupération des animaux lors du blocage de FLT3 uniquement dans des modèles de lésion nerveuse ou d'incision, et non dans des modèles purement inflammatoires. Par ailleurs, notre équipe a montré le rôle critique de FLT3 dans les effets indésirables induits par l'administration de morphine. L'ensemble de nos résultats pourraient ainsi suggérer une interaction entre les récepteurs FLT3 et EOS et plus spécifiquement avec le DOR en condition neuropathique ou postopératoire. L'inhibition de FLT3 permettrait une activation du récepteur DOR à l'origine d'une récupération plus rapide.

Nous avons donc déterminé si la récupération plus rapide, observée après inhibition de FLT3, était également dépendante du récepteur DOR. Pour cela, le même protocole que précédemment a été utilisé, sur des souris exprimant ou non le récepteur FLT3, en condition de douleurs neuropathique ou postopératoire. De plus, j'ai également étudié l'implication de l'EOS dans la récupération à l'hypersensibilité thermique induite par la douleur postopératoire (figure 45).

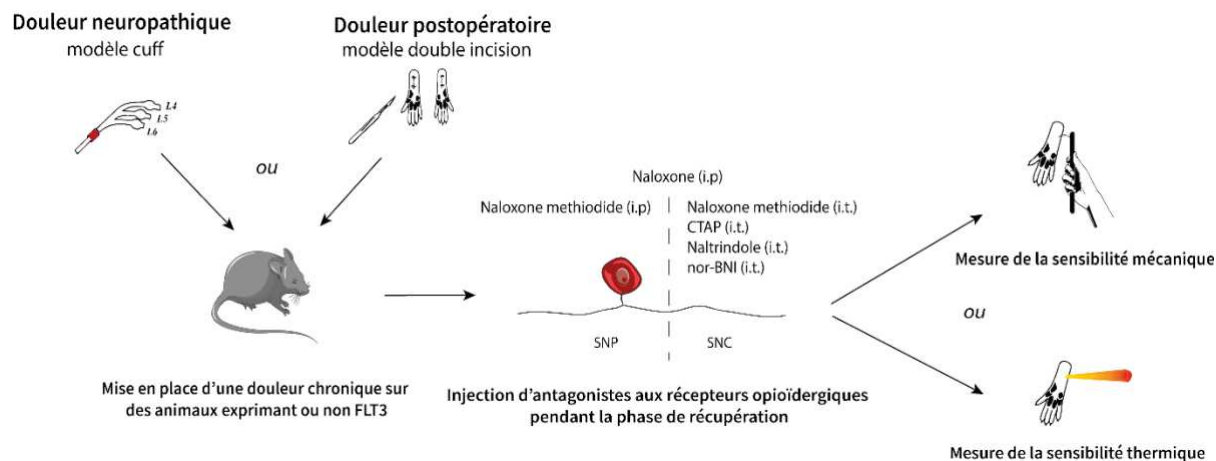


Figure 45. Protocole d'expérimentation *in vivo* de l'étude du système opioïdique endogène dans la récupération à la douleur chronique chez des animaux n'exprimant pas FLT3

1. Douleur postopératoire

Dans le cadre de l'hypersensibilité mécanique induite par la douleur postopératoire, l'implication de l'EOS dans les mécanismes de récupération a été étudiée et comparée entre des souris mâles ou des souris femelles où FLT3 a été déleté génétiquement (FLT3^{-/-}), et des souris où le blocage de FLT3 a été effectué pharmacologiquement par un traitement chronique au BDT001.

Premièrement, j'ai pu observer un effet similaire à ce que le laboratoire avait déjà démontré précédemment, à savoir que l'inhibition génique de FLT3 a bien provoqué une récupération plus rapide chez les animaux mâles, qui sont revenus à un seuil de sensibilité mécanique similaire à avant l'opération 4 jours après la seconde incision, contre 14 jours pour les animaux exprimant encore le récepteur (FLT3^{+/+}) (figure 46 A et B). Ensuite, de façon similaire à ce qui a été observé jusqu'alors, l'inhibition du récepteur DOR central a réinstauré une hypersensibilité mécanique chez les animaux (figure 46 C et D).

Chez les femelles FLT3^{-/-}, une récupération similaire à celle des mâles a été observée, avec un retour à un seuil basal de sensibilité mécanique dès la 1^{ère} semaine suivant la seconde incision (figure 47 A et B). A nouveau, l'inhibition du DOR central a provoqué la réapparition d'une hypersensibilité mécanique chez les animaux femelles, exprimant FLT3 ou non (figure 47 C et D). Ainsi, de façon intéressante, s'il semble exister des différences inter-sexe dans les mécanismes pronociceptifs responsables de la chronicisation douloureuse, les mécanismes de récupération dépendants de l'EOS semblent quant à eux identiques entre chaque sexe.

RESULTATS

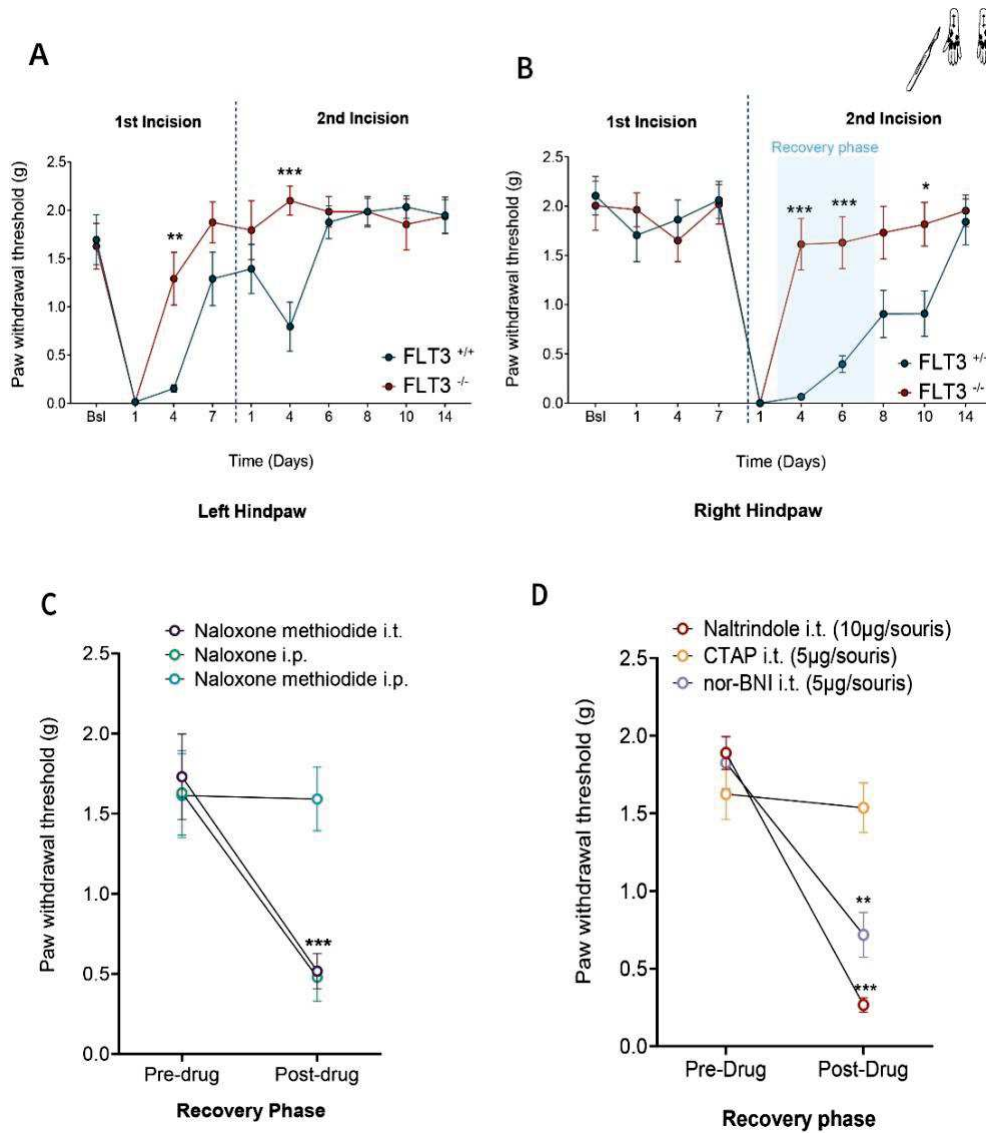


Figure 46. La récupération induite par l'inhibition génique de FLT3 est dépendante du DOR spinal chez les souris mâles dans la douleur postopératoire

Suivi de la sensibilité mécanique d A) la patte arrière gauche et B) la patte arrière droite suite aux deux incisions, chez des animaux exprimant ou non FLT3. Seuil de sensibilité mécanique des animaux avant et 30 min après injections C) d'antagonistes non spécifiques ou D) d'antagonistes spécifiques des récepteurs de l'EOS pendant la phase de récupération de la douleur postopératoire. Les valeurs représentent la moyenne + S.E.M. (n=8), Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 par rapport au seuil avant injection

Enfin, les animaux où FLT3 a été inhibé pharmacologiquement grâce à des injections répétées de BDT001 ont présenté des résultats similaires à ceux obtenus suite à une inhibition génique du récepteur, tant au niveau de la durée de leur récupération (figure 48 A et B), que des récepteurs impliqués dans cette récupération (figure 48 C).

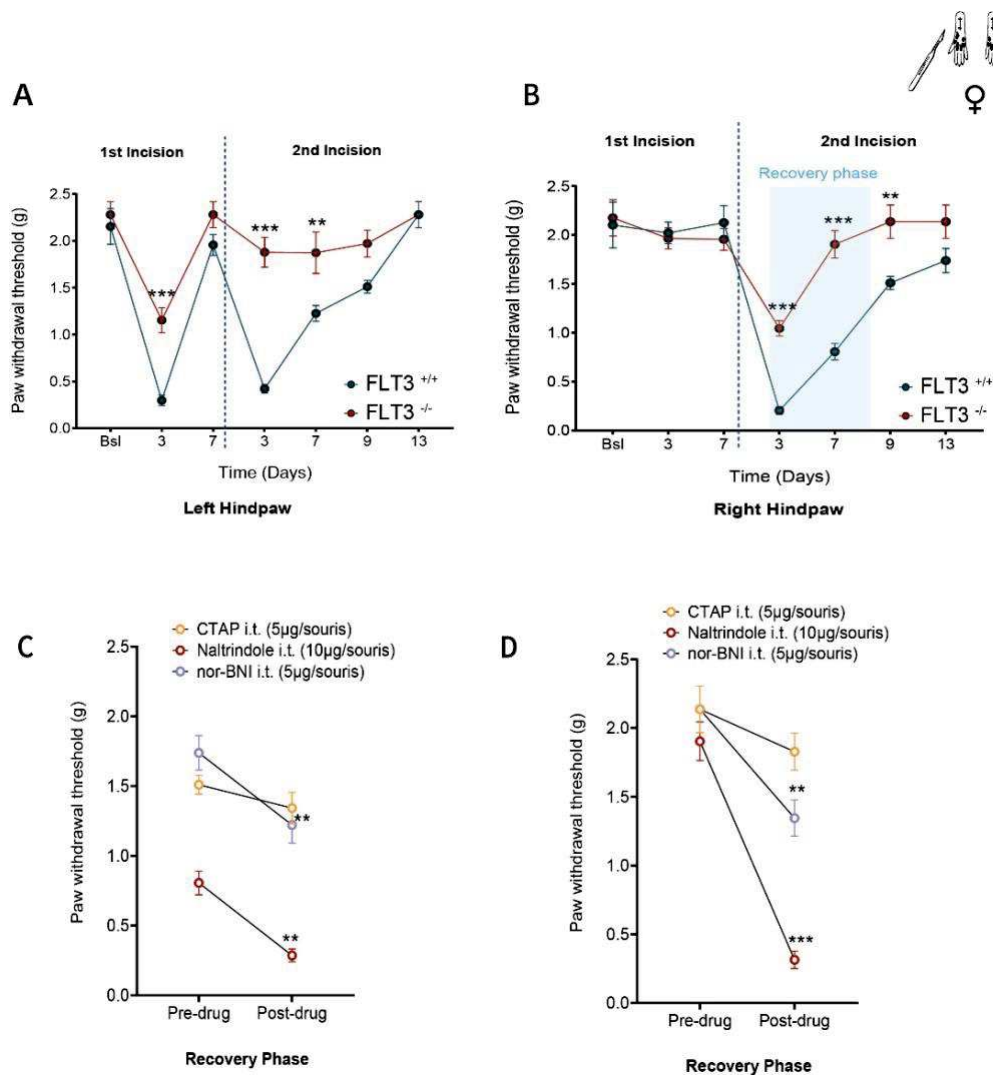


Figure 47. La récupération induite par l'inhibition génique de FLT3 est dépendante du DOR spinal chez les souris femelles dans la douleur postopératoire

Suivi de la sensibilité mécanique d A) la patte arrière gauche et B) la patte arrière droite suite aux deux incisions, chez des animaux exprimant ou non FLT3. Seuil de sensibilité mécanique des animaux avant et 30 min après injections C) d'antagonistes non spécifiques ou D) d'antagonistes spécifiques des récepteurs de l'EOS pendant la phase de récupération de la douleur postopératoire. Les valeurs représentent la moyenne + S.E.M. (n=8), Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 par rapport au seuil avant injection

Néanmoins, on peut noter une différence importante par rapport aux résultats obtenus dans la partie I : Chez tous ces animaux n'exprimant pas FLT3, le blocage du récepteur KOR a également instauré, dans une moindre mesure, une hypersensibilité mécanique. En étudiant les jours d'injection de nor-BNI dans mes différentes expériences, j'ai pu constater une hypersensibilité plus importante après blocage du KOR lorsque celui-ci est inhibé à un temps plus proche de l'incision. A l'inverse, à un temps plus éloigné de l'incision (comme c'est le cas notamment pour les animaux exprimant FLT3, où la récupération est plus lente), son inhibition

RESULTATS

n'a eu que peu ou pas d'effet, suggérant un rôle transitoire du KOR dans la récupération, au contraire du récepteur DOR.

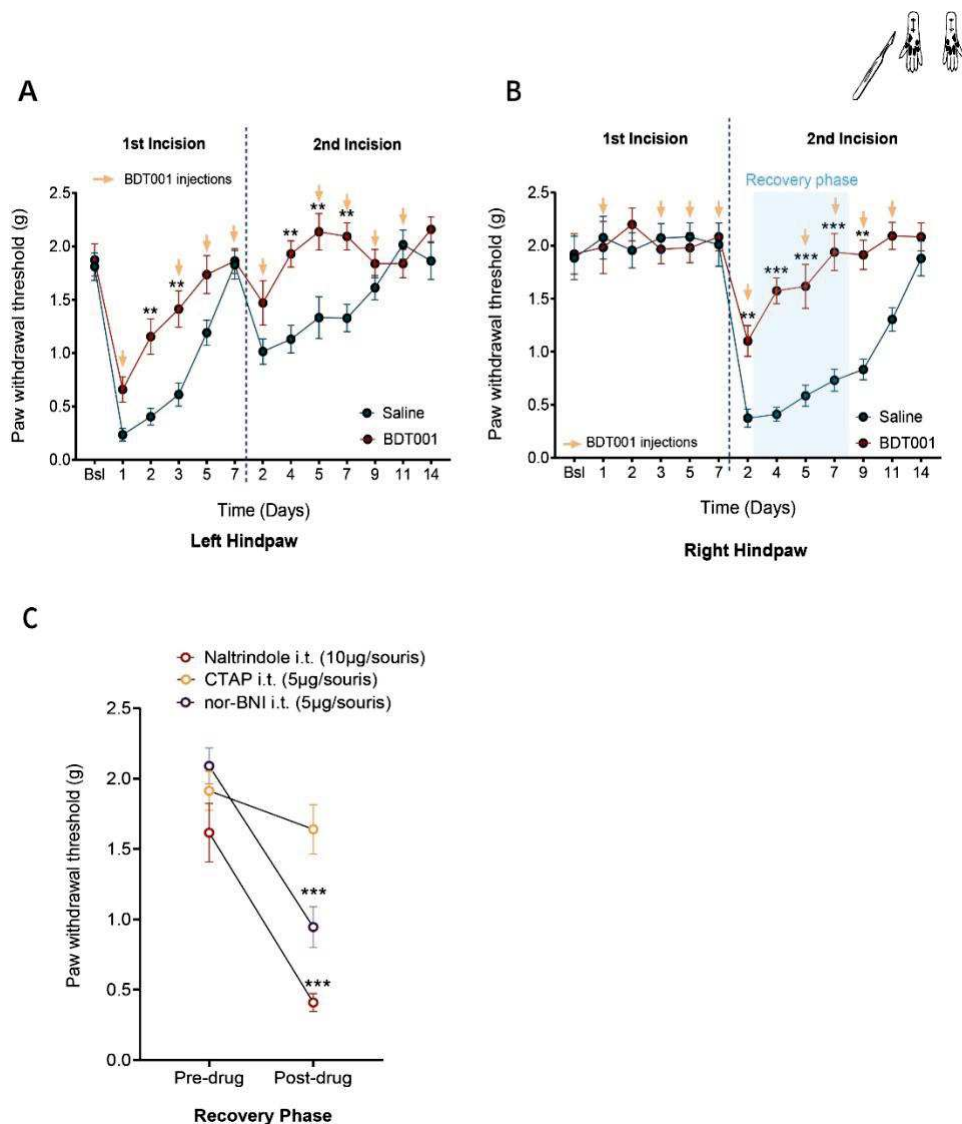


Figure 48. La récupération induite par l'inhibition pharmacologique de FLT3 est dépendante du DOR spinal dans la douleur postopératoire

Suivi de la sensibilité mécanique d A) la patte arrière gauche et B) la patte arrière droite suite aux deux incisions, chez des animaux exprimant ou non FLT3. Seuil de sensibilité mécanique des animaux avant et 30 min après injections C) d'antagonistes spécifiques des récepteurs de l'EOS pendant la phase de récupération de la douleur postopératoire. Les valeurs représentent la moyenne + S.E.M. (n=8), Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 par rapport au seuil avant injection

Afin de valider cette observation, j'ai ensuite injecté la nor-BNI en i.t., qui a une durée d'action sur l'inhibition du KOR décrite comme durant entre 30 et 40 jours dans la littérature, au moment de la seconde incision, sur des animaux exprimant ou non FLT3. Dans les deux cas, j'ai pu observer une récupération plus lente sur les animaux injectés avec la nor-BNI, comparé

RESULTATS

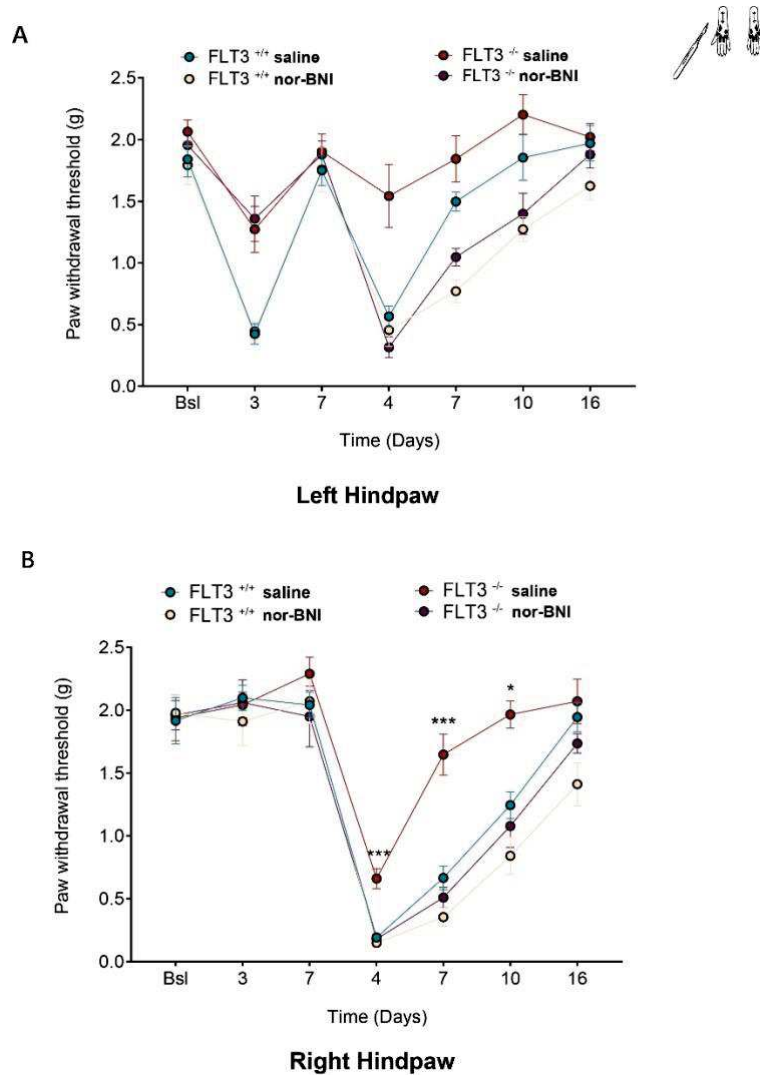


Figure 49. Le blocage chronique du récepteur KOR retarde, mais n'empêche pas, la récupération à la douleur postopératoire

Suivi de la sensibilité mécanique d A) la patte arrière gauche et B) la patte arrière droite suite aux deux incisions, chez des animaux exprimant ou non FLT3, après blocage du KOR lors de la seconde incision. Les valeurs représentent la moyenne + S.E.M. (n=8), Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 par rapport aux autres groupes

aux animaux ayant reçu une injection de sérum physiologique (figure 49 A et B). Ces résultats diffèrent donc de ceux obtenus lors du blocage chronique du DOR, où la récupération était entièrement prévenue.

Ainsi, si DOR semble être nécessaire dans la récupération à la douleur postopératoire, chez les animaux exprimant ou non FLT3, KOR semble avoir un rôle plus transitoire dans ces mécanismes.

RESULTATS

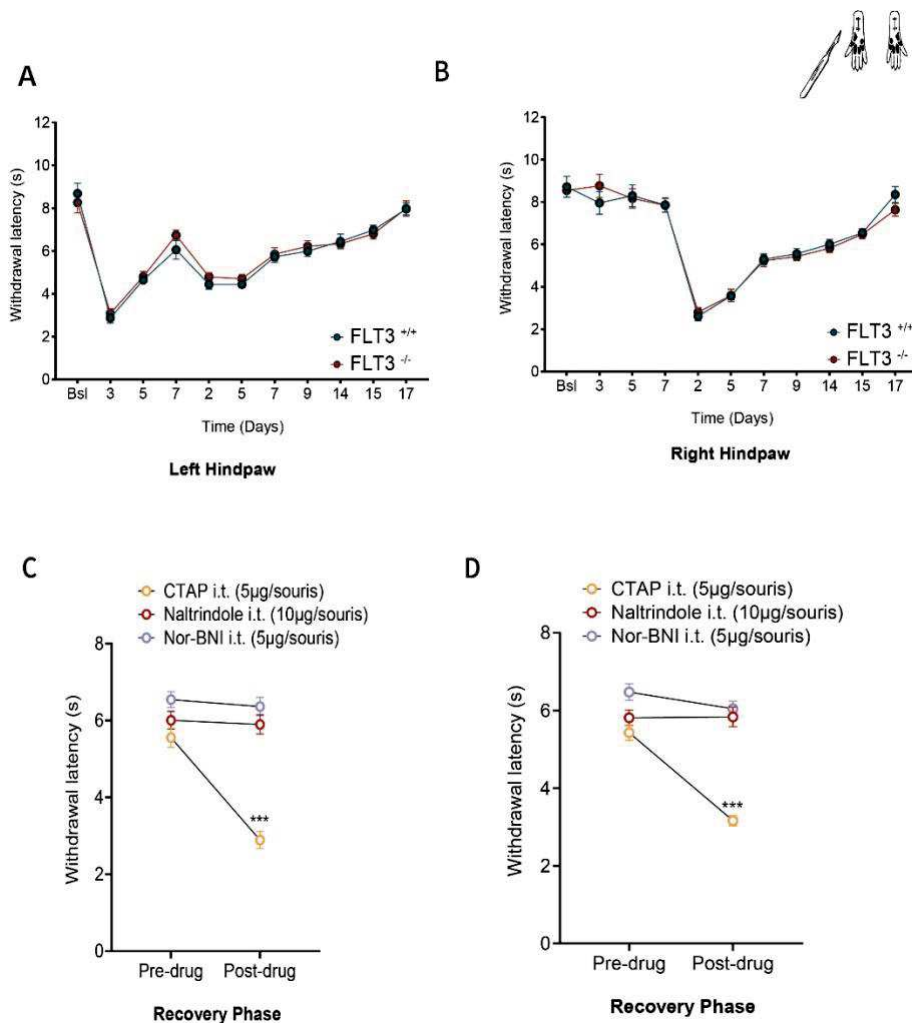


Figure 50. La récupération à l'hypersensibilité thermique, où le blocage de FLT3 n'a pas d'effet, est dépendante du récepteur MOR spinal dans la douleur postopératoire

Suivi de la sensibilité thermique d A) la patte arrière gauche et B) la patte arrière droite suite aux deux incisions, chez des animaux exprimant ou non FLT3. Seuil de sensibilité thermique des animaux avant et 30 min après injections C) d'antagonistes non spécifiques ou D) d'antagonistes spécifiques des récepteurs de l'EOS pendant la phase de récupération de la douleur postopératoire. Les valeurs représentent la moyenne + S.E.M. (n=8), Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 par rapport au seuil avant injection

Enfin, j'ai réalisé ces mêmes expériences sur des animaux exprimant ou non FLT3 en faisant un suivi de la sensibilité thermique des animaux à l'aide du test du Hargreaves sur le modèle postopératoire. De façon similaire à ce que l'équipe avait déjà observé, je n'ai noté aucune différence dans le temps de récupération des animaux selon qu'ils expriment ou non FLT3 (figure 50 A et B). Par ailleurs, seul le blocage du récepteur MOR a provoqué la réapparition d'une hypersensibilité thermique chez ces animaux (figure 50 C et D). Ces résultats semblent ainsi appuyer les études suggérant que DOR et MOR sont exprimés dans des sous-populations neuronales différentes, et contrôlent respectivement les modalités mécaniques et

thermiques. Cependant, l'implication de MOR dans la récupération à l'hypersensibilité mécanique induite par les douleurs inflammatoires semble contredire cela, au moins en partie, ou éventuellement suggérer une implication de différentes fibres sensorielles dans la mise en place d'une hypersensibilité mécanique, en fonction du type de douleur. Une étude plus approfondie serait nécessaire afin de pouvoir répondre à ces questions.

2. Douleur neuropathique

Pour finir sur cette seconde partie, j'ai également effectué un suivi de l'hypersensibilité mécanique induite par le cuff, chez des animaux exprimant FLT3 ou non. Pareillement à ce que le laboratoire avait déjà observé dans plusieurs autres modèles de douleur neuropathique, le blocage de FLT3 a provoqué une récupération plus rapide sur le modèle de cuff ; les animaux revenant à leur seuil basal environ 40 jours après la lésion nerveuse (figure 51A). A nouveau, sur ces animaux, seul le blocage du récepteur DOR central a provoqué la réapparition d'une hypersensibilité mécanique chez ces animaux (figure 51 B et C).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats montre que le blocage de FLT3 n'a d'effet bénéfique que sur les types de douleurs chroniques et/ou modalités sensorielles dans lesquels le DOR est impliqué dans la récupération. Ceci suggère que l'activation de FLT3 par les lésions nerveuses ou chirurgicales modulerait de manière négative l'activation du DOR entraînant alors une récupération plus lente se manifestant par le maintien d'hypersensibilité à la douleur. Cela tend ainsi à conforter la 2^{ème} hypothèse de mon projet de thèse suggérant ainsi fortement une interaction fonctionnelle entre ces deux récepteurs. La suite de mon projet de thèse s'est donc portée sur la caractérisation de leur interaction.

RESULTATS

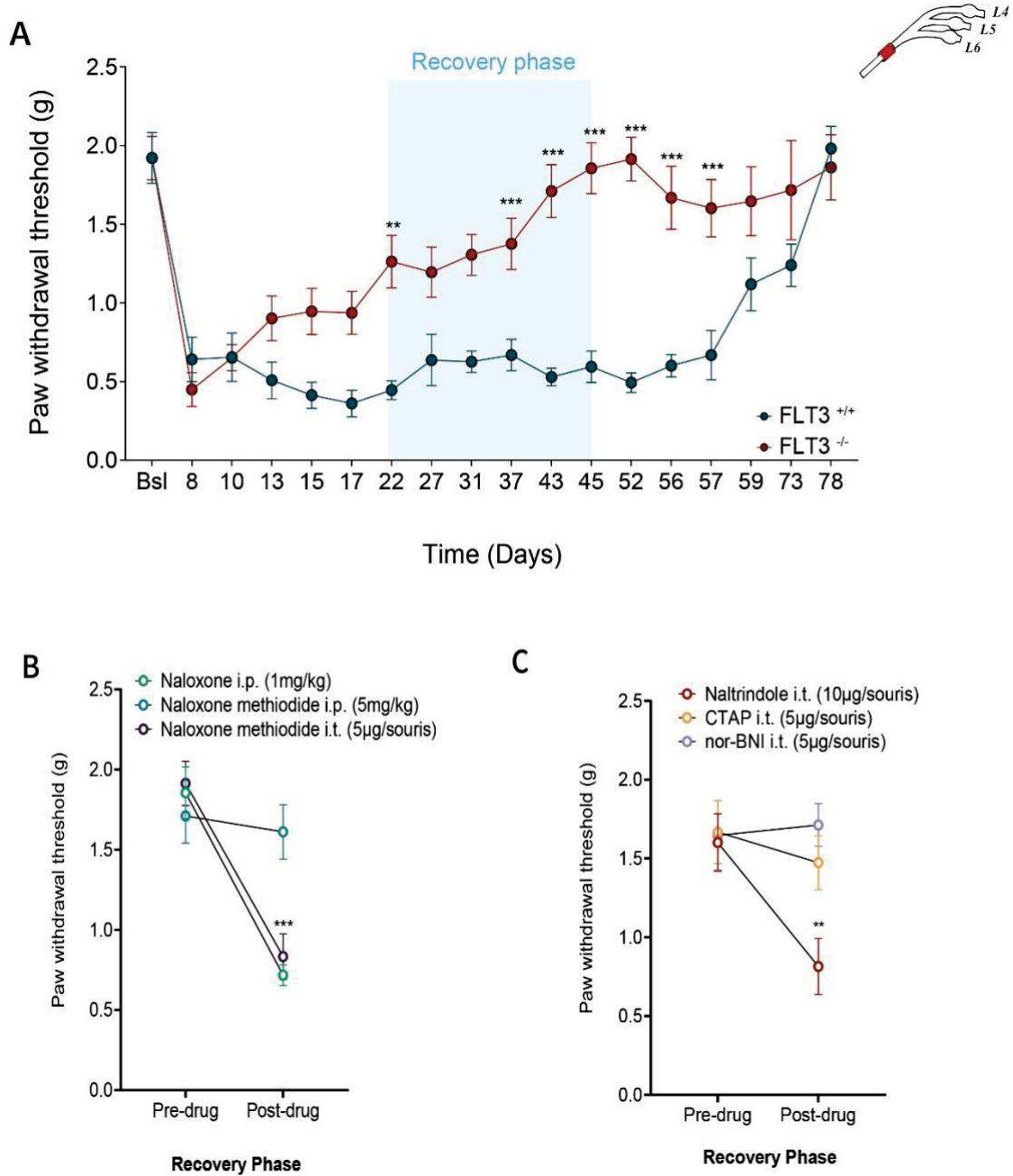


Figure 51. La récupération induite par l'inhibition génique de FLT3 est dépendante du DOR spinal dans la douleur neuropathique

Suivi de la sensibilité mécanique d A) la patte arrière gauche suite à un cuff, chez des animaux exprimant ou non FLT3. Seuil de sensibilité mécanique des animaux avant et 30 min après injections B) d'antagonistes non spécifiques ou C) d'antagonistes spécifiques des récepteurs de l'EOS pendant la phase de récupération de la douleur neuropathique. Les valeurs représentent la moyenne + S.E.M. (n=8), Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 par rapport au seuil avant injection

III. Caractérisation de l'interaction fonctionnelle entre les récepteurs DOR et FLT3

1. Etude des variations d'expression génique de l'EOS

Afin d'étudier la présence d'une modulation de DOR par FLT3 en condition de douleur chronique, plusieurs expériences ont été réalisées (figure 52). Tout d'abord, nous avons mesuré l'expression des récepteurs et ligands de l'EOS dans la ME, et des récepteurs dans les DRGs, entre des animaux exprimant ou n'exprimant pas FLT3, en condition naïve ou de douleur postopératoire. Ensuite, en comportement et en imagerie calcique, nous avons étudié l'efficacité d'un agoniste spécifique du DOR sur l'hypersensibilité mécanique ou l'excitabilité neuronale dans ces mêmes conditions, avec ou sans blocage de FLT3.

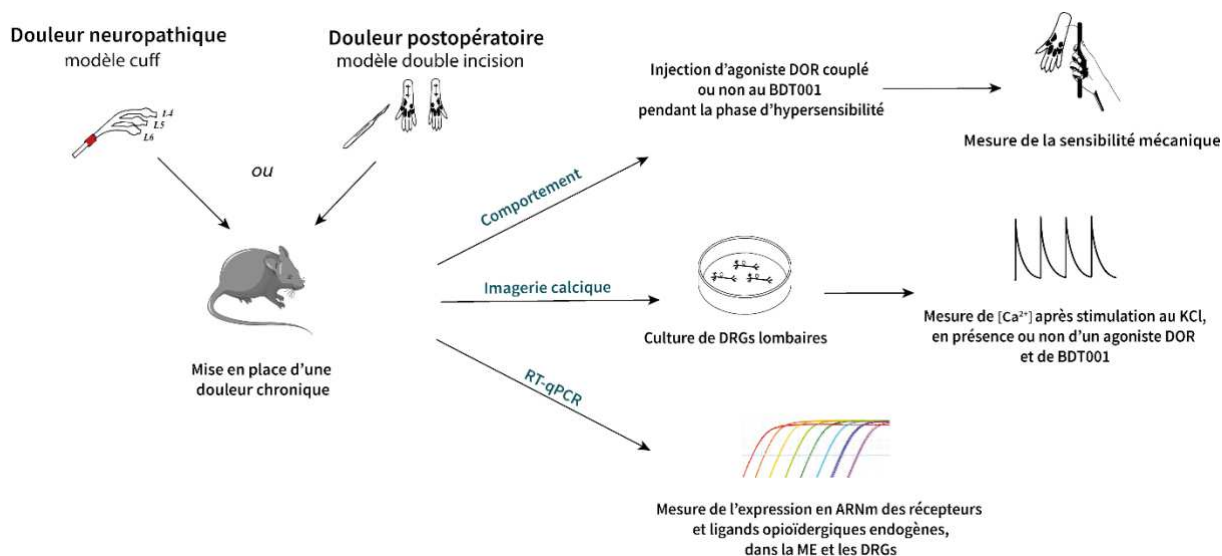


Figure 52. Protocole d'expérimentation de l'étude de la modulation du récepteur DOR par FLT3 dans la douleur chronique

Pour étudier l'expression des acteurs de l'EOS, une analyse par RT-qPCR a été réalisée sur la corne dorsale de ME issues d'animaux $FLT3^{-/-}$ ou $FLT3^{+/+}$, sham ou doublement incisés (DI), 3 jours après la seconde incision. A ce temps-là, nous avons démontré une augmentation de l'expression des transcrits de plusieurs acteurs pronociceptifs (Annexe I, figure 2), et avons donc voulu voir la modulation des acteurs de l'EOS à ce même temps. Une augmentation de la $Pdyn$ chez les animaux $FLT3^{+/+}$ DI, participant à la mise en place d'une hypersensibilité (cf

RESULTATS

chapitre III de l'introduction), est également observée dans une moindre mesure chez les animaux n'exprimant pas FLT3. A côté de cela, aucune variation significative au niveau de l'EOS n'a pu être mise en évidence entre les différentes conditions (figure 53A). De même, une première expérience a été réalisée pour étudier l'expression des récepteurs opioïdiques au niveau des DRGs. Le laboratoire ayant observé préalablement que les changements moléculaires induits par l'incision au niveau périphérique sont situés exclusivement au niveau du DRG lombaire L4 (Annexe I, figure S2), seuls les L4 ipsilatéraux à la seconde incision ont été prélevés et regroupés pour cette expérience. Aucune variation significative de l'expression en ARNm des récepteurs opioïdiques n'a pu être observée entre les différentes conditions (figure 53B). Il est ainsi possible qu'il n'y ait pas de variation au niveau de l'expression en ARNm de l'EOS en condition chronique, ou que ces variations ne soient présentes que dans certaines sous-populations neuronales discrètes l'analyse des lysats totaux de corne dorsale et DRGs. D'autres tests sont donc nécessaires pour établir une conclusion précise.

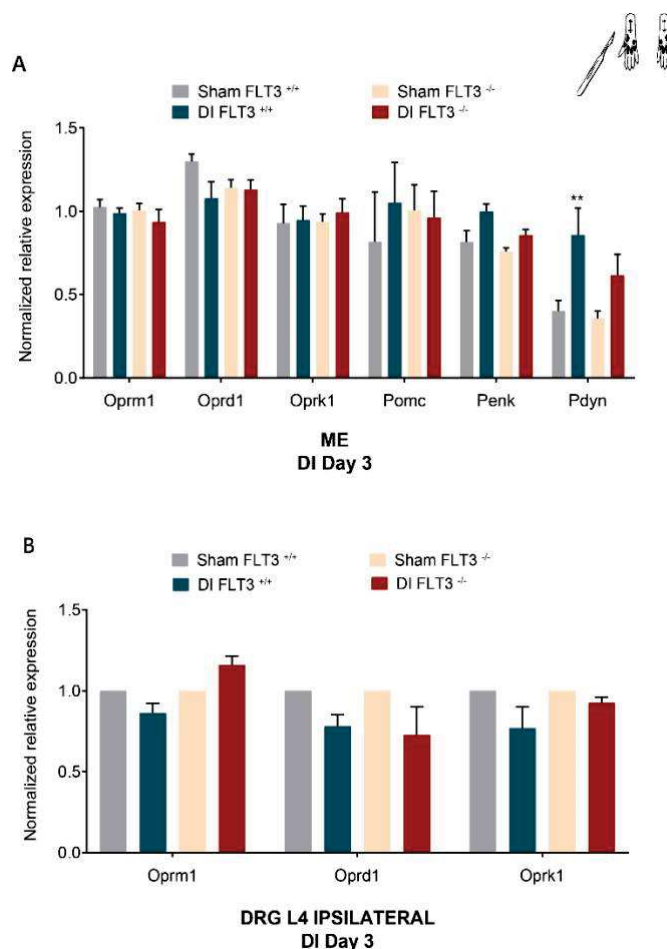


Figure 53. L'expression en ARNm des récepteurs et ligands de l'EOS n'est pas modulée par la mise en place d'une douleur postopératoire et/ou le blocage génique de FLT3

Expression relative normalisée en ARNm des acteurs de l'EOS mesuré par RT-qPCR au niveau de A) la corne dorsale spinale ou B) des DRGs L4 ipsilatéraux à la seconde incision d'animaux sham ou doublement incisés exprimant ou non FLT3. Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, *P<0.05; **P<0.01 comparé au contrôle sham

2. Etude fonctionnelle des récepteurs DOR

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude de l'activité fonctionnelle du récepteur DOR en condition de douleur chronique, avec ou sans FLT3, via l'usage d'un agoniste spécifique au DOR, le SNC80. Classiquement, l'activation du DOR via l'application de SNC80 est connue pour avoir un effet analgésique sur l'hypersensibilité mécanique, mais pas thermique, induite par des stimuli nocifs aigus (Scherrer et al., 2009). Plusieurs études ne montrent en revanche aucun effet sur des animaux naïfs sur la sensibilité tactile lors de l'application de stimuli non-nociceptifs, et/ou également une perte d'efficacité de cet agoniste en condition de douleur chronique, notamment neuropathique (Woolf, 2009 ; Ceredig et al., 2020) même si ces observations divergent en fonction des études. Pour notre part, nous avons tout d'abord étudié les effets de cet agoniste au niveau des neurones sensoriels, par imagerie calcique. Pour cela, nous avons prélevés et mis en culture les DRGs ipsi- ou controlatéraux issus d'animaux FLT3^{+/+} traités ou non avec du BDT001, ou d'animaux FLT3^{-/-}, pendant la phase d'hypersensibilité induite par le modèle de cuff. Nous avons ensuite enregistré la réponse de ces neurones en culture après leur dépolarisation via l'application de chlorure de potassium (KCl), en présence ou non de SNC80 (cf détails dans matériel & méthodes). Du côté controlatéral, nous avons pu distinguer deux sous-populations neuronales différentes selon leur réponse à l'application de SNC80, en proportions similaires entre les animaux FLT3^{+/+} traités ou non avec le BDT001 et les animaux FLT3^{-/-} : une sous-population neuronale sans effet de l'agoniste c'est-à-dire n'inhibant pas la dépolarisation produite par l'application de KCl, et une sous-population neuronale où l'application de l'agoniste a inhibé la dépolarisation (figure 54A). Une étude précise du diamètre des neurones enregistrés est en cours, il semblerait néanmoins qu'une majorité des neurones répondant au SNC80 soient des neurones de moyen ou large diamètre, correspondant à des fibres A β , où DOR serait exprimé majoritairement *in vivo*. En revanche, du côté ipsilatéral, nous avons pu observer l'apparition d'une 3^{ème} sous-population neuronale présentant une réponse différente après application du SNC80 chez les animaux FLT3^{+/+}. En conditions de cuff. En effet, dans cette sous-population, l'application de SNC80 potentialise l'excitabilité neuronale induite par le KCl (figure 54B). Cet effet exciteur n'a néanmoins jamais été retrouvé chez les animaux FLT3^{+/+} traités avec le BDT001, ou chez les animaux FLT3^{-/-}. A notre connaissance, une seule étude datant de 2003 n'a jusqu'alors évoqué une possible excitation neuronale induite par l'activation du DOR qui provoquerait l'augmentation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire, bien que présente uniquement dans un cas d'application prolongée du SNC80, et n'ait jamais été reproduite ensuite (Bao et al.,

RESULTATS

2003). Ainsi, nous ne pouvons pas conclure pour le moment sur les mécanismes responsables de cette excitation observée suite à l'application de SNC80, et présente seulement du côté ipsilatéral d'animaux en condition de douleur neuropathique exprimant toujours le récepteur FLT3.

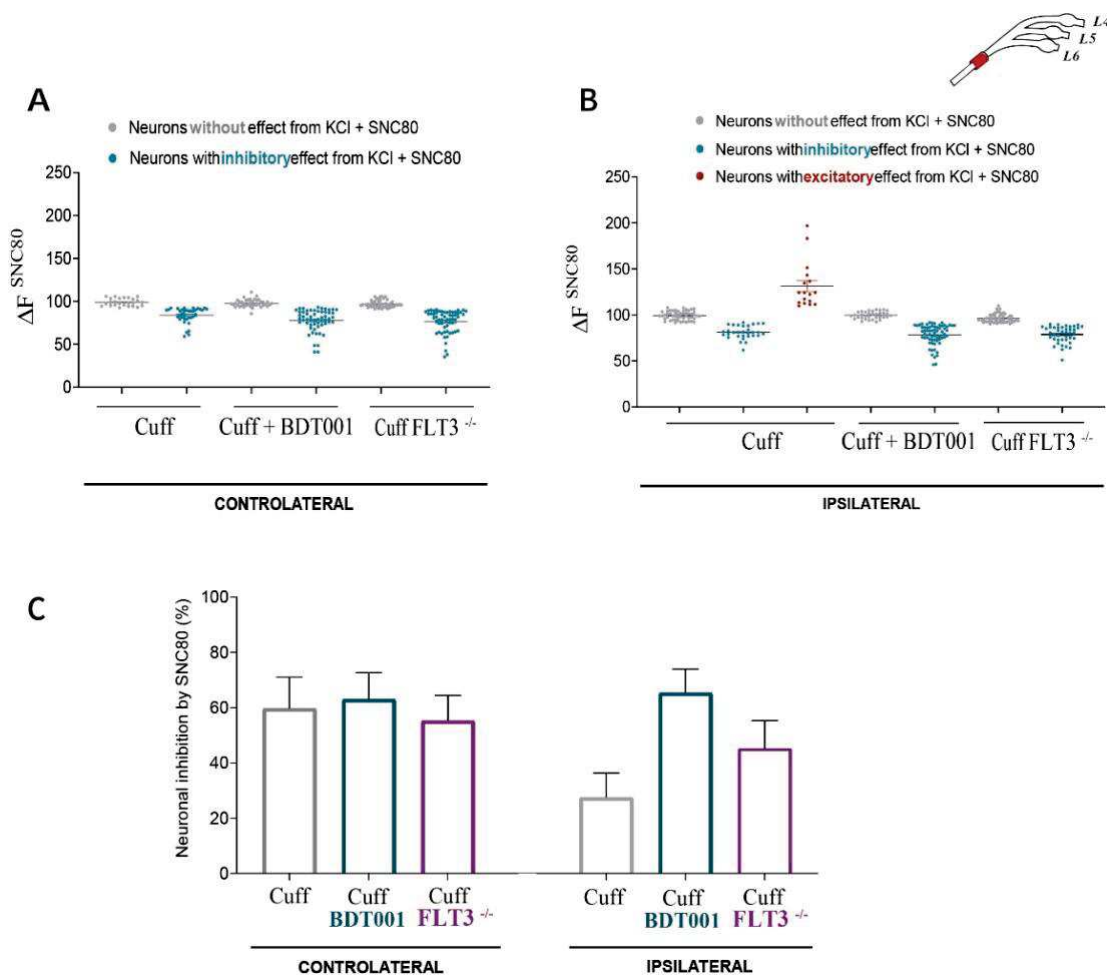


Figure 54. L'instauration d'une douleur neuropathique induit une perte d'effet d'un agoniste DOR sur l'inhibition de l'activité neuronale *in vitro* du côté ipsilatéral spécifiquement, restauré par le blocage de FLT3

Réponse neuronale en imagerie calcique suite à l'application de KCl + SNC80 sur des cultures de DRGs issues d'animaux cuff FLT3^{+/+} avec ou sans BDT001 ou FLT3^{-/-}, du côté A) Controlatéral ou B) ipsilatéral au cuff. C) Pourcentage d'inhibition neuronale induite par le SNC80. Les valeurs représentent la moyenne + S.E.M. Test de Kruskal-Wallis (A et B) ou test du chi carré (C), n = 2 à 4 animaux par conditions, 70 à 150 neurones enregistrés par conditions.

Le fait que cette excitation ne soit pas présente sur les animaux où le récepteur a été inhibé génétiquement ou pharmacologiquement tend néanmoins à confirmer la présence d'une modulation de l'activité fonctionnelle de DOR par FLT3 en condition chronique conduisant à des effets excitateurs du DOR. Enfin, en étudiant plus particulièrement le pourcentage de neurones inhibés par l'application de SNC80, on note une diminution du nombre de neurones inhibés (figure 54C), ainsi d'une perte d'effet de l'agoniste, uniquement du côté ipsilatéral des

RESULTATS

animaux exprimant FLT3. L'inhibition de ce dernier permet de restaurer l'efficacité de l'agoniste. Ainsi, au niveau des neurones sensoriels, il semblerait qu'il y ait une modulation de l'activité fonctionnelle de DOR par FLT3. Mes expériences précédentes ayant démontré que les effets de l'EOS sur la récupération à la douleur chronique se situent spécifiquement au niveau du SNC, et plus particulièrement au niveau spinal, pourraient ainsi suggérer une implication du DOR exprimé à la synapse centrale des afférences primaires dans ces effets, bien que des expériences supplémentaires soient à réaliser pour confirmer cela.

Enfin, les expériences réalisées par imagerie calcique consistaient à étudier l'efficacité d'un agoniste DOR lors de la phase d'hypersensibilité à la douleur chronique des animaux, et non l'impact du blocage du récepteur lors de la phase de récupération comme mes expériences précédentes de comportement. J'ai donc ensuite évalué les effets du SNC80 *in vivo*, en condition de douleur neuropathique ou postopératoire. Pour cela, j'ai étudié l'hypersensibilité mécanique des animaux, 3 jours après la seconde incision, ou 12 jours après la mise en place d'un cuff, moments correspondant à la présence d'une importante hypersensibilité à la douleur. Le traitement consistait à réaliser une injection en i.p. de BDT001 ou de sérum physiologique, suivie 1h plus tard d'une injection i.t. de SNC80 ou de sérum physiologique, et de la mesure de l'hypersensibilité 30 minutes après l'injection de SNC80. Dans les deux modèles, l'injection seule de SNC80 ou de BDT001 n'a eu aucun effet significatif sur l'hypersensibilité mécanique des animaux (figure 55 A et B). De façon concordante avec plusieurs études déjà citées, je n'ai donc observé aucune efficacité lors de l'activation du DOR en condition de douleur chronique. L'absence d'efficacité du BDT001 90 minutes après son injection était également attendue, nos résultats précédents n'ayant démontré des effets positifs apparents sur l'hypersensibilité qu'environ 4h après son injection, pour un maximum d'efficacité à 24h (exemple sur le modèle cuff, figure 55C). En revanche, dans chacun de ces modèles, le blocage préventif de FLT3 par le BDT001 avant l'application de SNC80 a permis de restaurer les effets analgésiques de celui-ci, les animaux présentant un seuil de sensibilité mécanique très proche du seuil basal. Ainsi, même si les effets du BDT001 ne sont observés que plusieurs heures après son implication, l'inhibition de FLT3 semble déjà provoquer des changements sous-jacents à plus court terme, et notamment sur le DOR, révélés par le SNC80. Sur des animaux naïfs, l'application de BDT001 et de SNC80 n'a pas provoqué d'augmentation du seuil de sensibilité, démontrant à nouveau une activité de ces récepteurs uniquement en condition de lésion, et concordant avec les études suggérant une faible expression physiologique du DOR.

RESULTATS

Ainsi, bien que nous n'ayons observé aucune modification des transcrits des différents acteurs de l'EOS en condition chronique et en présence ou non de FLT3, ces expériences de comportement et d'imagerie calcique confortent la présence d'une interaction fonctionnelle entre les récepteurs FLT3 et DOR en condition de douleur neuropathique ou postopératoire.

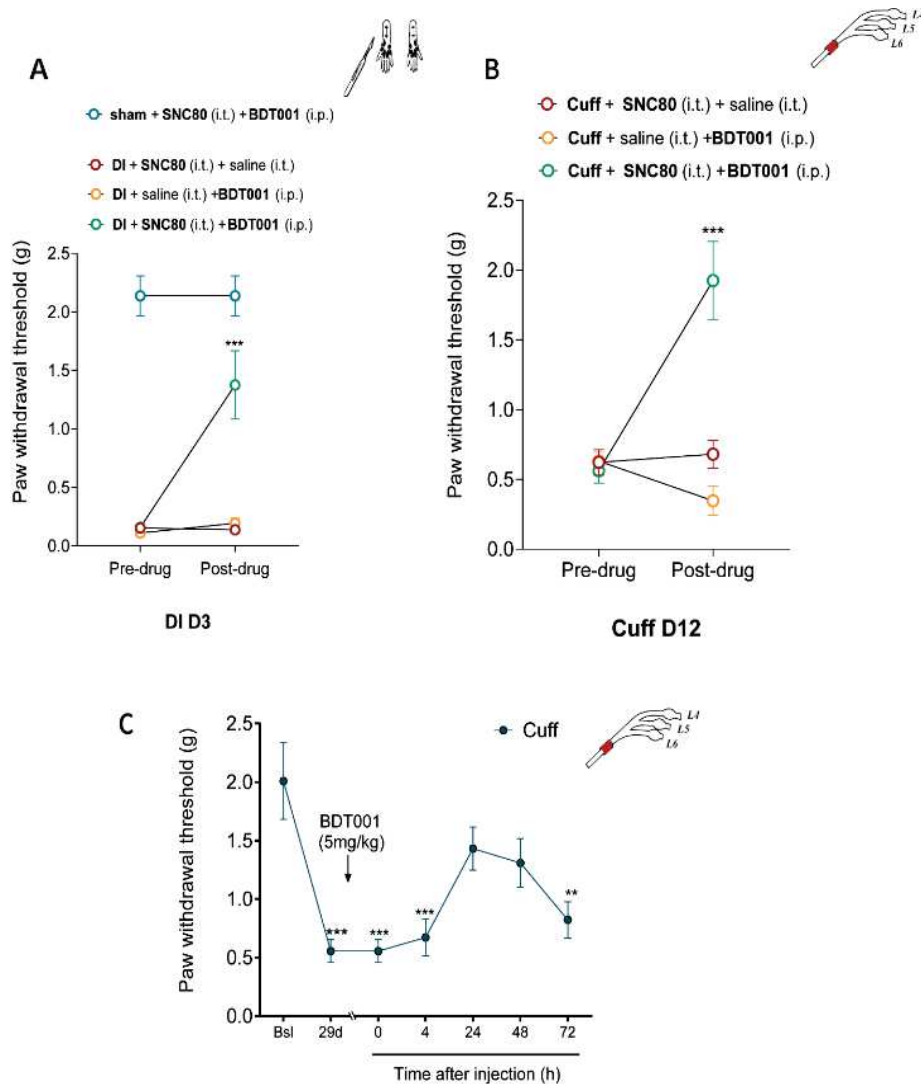


Figure 55. L'instauration d'une douleur neuropathique induit une perte d'effet d'un agoniste DOR sur l'inhibition de l'hypersensibilité mécanique *in vivo*, restauré par le blocage de FLT3

Mesure du seuil de sensibilité mécanique chez des animaux en condition de douleur A) postopératoire ou B) neuropathique, avant et après injections de SNC80 et/ou BDT001. C) Suivi de la sensibilité mécanique d'animaux en douleur neuropathique, avant et 4h, 24h, 48h, et 72h après injection de BDT001. Les valeurs représentent la moyenne + S.E.M. (n=8), Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 par rapport au seuil avant injection

Afin de mieux caractériser l'expression et la modulation de chacun de ces récepteurs en condition de douleur chronique, et surtout leur interaction, la dernière partie de mon projet s'est portée sur l'étude de leur localisation précise au sein du système somatosensoriel. Cependant comme cela a été évoqué lors de l'introduction, cette étude de la localisation de DOR, ou de

façon plus générale de l'EOS, est rendue difficile par le manque d'outils spécifiques existants. De manière similaire, si différents anticorps permettent d'étudier et quantifier de façon simple et efficace l'expression et la localisation de FLT3 dans le système immunitaire en immunofluorescence ou par des techniques de western blot, nombre de ces outils se sont révélés peu ou pas efficaces lors de leur utilisation par le laboratoire pour étudier la protéine exprimée au niveau du système nerveux. Aussi, une part importante de mon travail de thèse, travail toujours en cours, a porté sur le développement et la validation de nouveaux outils spécifiques permettant d'étudier de manière spécifique les récepteurs DOR, ou FLT3.

IV. Développement de nouveaux outils spécifiques dans l'étude de l'interaction entre DOR et FLT3

1. Caractérisation préliminaire de l'expression de FLT3 dans le système nerveux

Afin d'étudier l'expression de FLT3 au sein du système nerveux, la stratégie employée par le laboratoire jusqu'à présent était le développement et l'emploi d'une sonde ciblant l'ARNm de FLT3, permettant son marquage par réaction enzymatique en hybridation *in situ*. Cette technique a permis d'effectuer une première caractérisation de l'expression de FLT3 dans le système nerveux, avec notamment la démonstration de son expression au sein de certains

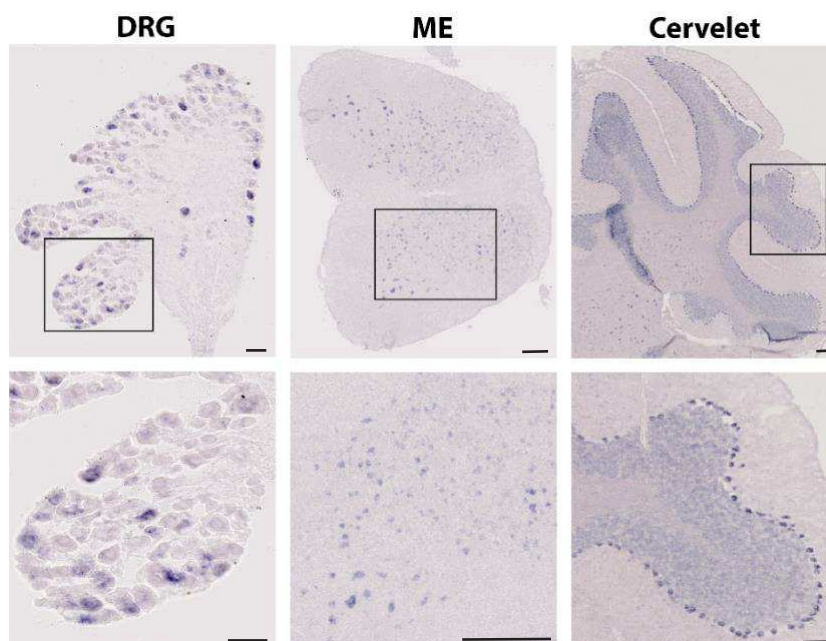


Figure 56. Représentation de l'expression en ARNm de FLT3 en hybridation *in situ* par réaction enzymatique dans différentes structures du système nerveux (DRG, ME, cervelet)
La barre d'échelle correspond à 50 μ M.

neurones du DRGs, de certains motoneurons de la corne ventrale et certains neurones des couches profondes de la corne dorsale au niveau de la ME, et enfin une expression importante au niveau des cellules de Purkinje du cervelet (figure 56). Cependant, cette technique présentait plusieurs limitations, notamment la présence d'un biais apporté par sa révélation via une réaction enzymatique, un manque de reproductibilité dans l'efficacité de son marquage, une difficulté à synthétiser et amplifier une sonde spécifique à FLT3, et des difficultés à associer cette technique à l'immunofluorescence ou la double hybridation *in situ* pour co-marquer FLT3 avec différents marqueurs de sous-populations présentés lors du chapitre I de l'introduction, afin de caractériser sa localisation précise au sein du système somatosensoriel.

Aussi, lors de ma thèse, j'ai pu développer et valider 3 stratégies différentes nous permettant d'étudier et caractériser l'expression de FLT3.

La 1^{ère} stratégie développée était la mise en place de la technique d'hybridation *in situ* fluorescente par RNAscope au sein du laboratoire, présentant l'avantage d'être plus robuste et reproductible dans le marquage de l'ARNm, de pouvoir être associée plus facilement à l'immunofluorescence, et de s'affranchir du biais apporté par l'emploi d'une réaction enzymatique.

Avec l'emploi de cette technique, j'ai pu retrouver une expression de l'ARNm similaire à ce qu'on avait pu observer préalablement au sein de certaines cellules du DRG (figure 57). Un co-marquage avec NeuN en immunofluorescence a permis de confirmer que cette expression est spécifique aux populations neuronales du DRG, le signal de FLT3 étant limité aux cellules marquées par NeuN. Au niveau de la ME également, comme précédemment, j'ai pu observer une expression en ARNm principalement au niveau des motoneurons de la corne ventrale, ainsi qu'une expression de certains neurones des laminae III à V de la ME. Enfin, au niveau du cervelet, l'expression importante en ARNm de FLT3 facilement identifiable au niveau des cellules de Purkinje s'est également retrouvée par la technique de RNAscope.

L'emploi de la technique de RNAscope se révèle donc efficace pour étudier l'expression de FLT3, présentant des résultats cohérents avec le profil d'expression déjà décrit par le laboratoire, et permettant l'emploi conjointement de technique d'immunofluorescence. L'emploi du RNAscope m'a notamment permis de valider l'expression de FLT3 *via* l'emploi des deux autres stratégies, décrites ci-dessous.

RESULTATS

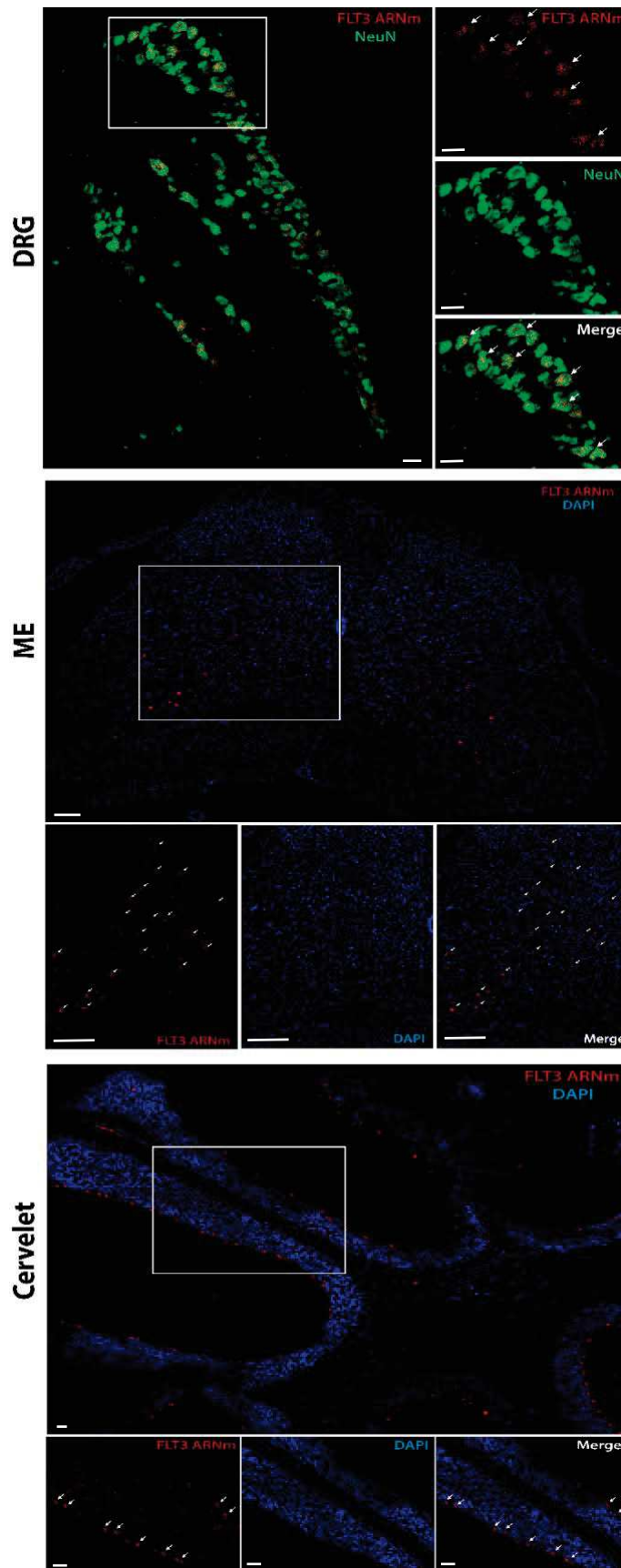


Figure 57. Représentation de l'expression en ARNm de FLT3 en RNAscope dans différentes structures du système nerveux (DRG, moelle épinière et cervelet)

Co-marquage de l'ARNm de FLT3 (rouge) couplé à NeuN (vert) dans le DRG, ou DAPI (bleu) dans la ME et le cervelet par immunofluorescence. Les flèches blanches montrent des exemples de cellules FLT3-positives. La barre d'échelle correspond à 50 μ M.

RESULTATS

La seconde stratégie a été de développer une nouvelle lignée de souris Flt3-Cre : Ribotag, issue du croisement entre la lignée Flt3-Cre et la lignée Ribotag présentant un allèle modifié au niveau du gène Rpl22, et permettant une induction Cre-dépendante de l'expression de la protéine Hémagglutinine (HA) au niveau de la protéine ribosomale Rpl22 (Sanz et al., 2019). Ainsi, dans cette nouvelle lignée Flt3-Cre : Ribotag, les cellules exprimant FLT3 peuvent être marquées via l'emploi d'un anticorps ciblant HA en immunofluorescence. Afin de déterminer de possibles variations de l'expression de Flt3 au cours du développement qui limiteraient l'utilisation de la souris Flt3-CRE-Ribotag, j'ai combiné l'emploi de la technique de RNAscope pour marquer l'ARNm de FLT3 associé au marquage en immunofluorescence de HA. Suite à cela, j'ai également pu effectuer une première caractérisation préliminaire de l'expression de FLT3 dans les différents tissus du système nerveux. Ainsi, dans le DRG, j'ai ainsi pu montrer la présence de FLT3 dans les cellules marquées par l'anticorps HA (Figure 58 A). En effet, toutes les cellules marquées avec l'anticorps HA présentent une expression en ARNm de FLT3. Aussi, environ 70 à 80% des cellules exprimant Flt3 en ARNm sont marquées par HA, validant l'utilisation de cette nouvelle lignée pour étudier l'expression de FLT3.

D'après les data en transcriptomique obtenues par le laboratoire de Ernfors, FLT3 semble être majoritairement exprimé dans les populations NF du DRG. L'emploi d'un anticorps anti-NeuN a d'abord confirmé une expression neuronale ces cellules HA-positives (figure 58 B), et l'utilisation d'un anticorps anti-NF200 conjointement avec l'anticorps HA semble confirmer un profil d'expression de FLT3 au sein des populations NF (figure 58 C). En effet, plus de 90% des cellules HA-positives sont également NF200-positives. Une étude plus poussée est à présent en cours au sein du laboratoire, en utilisant des anticorps dirigés contre divers marqueurs spécifiques à chaque sous-population, notamment TrkA (ciblant les nocicepteurs), TrkB (ciblant les A δ -LTMRs et A β RAI-LTMRs), TrkC (A β SAI-LTMRs, A β Field-LTMRs et propriorécepteurs), ou encore cGRP (nocicepteurs peptidergiques) ou IB4 (nocicepteurs non-peptidergiques).

RESULTATS

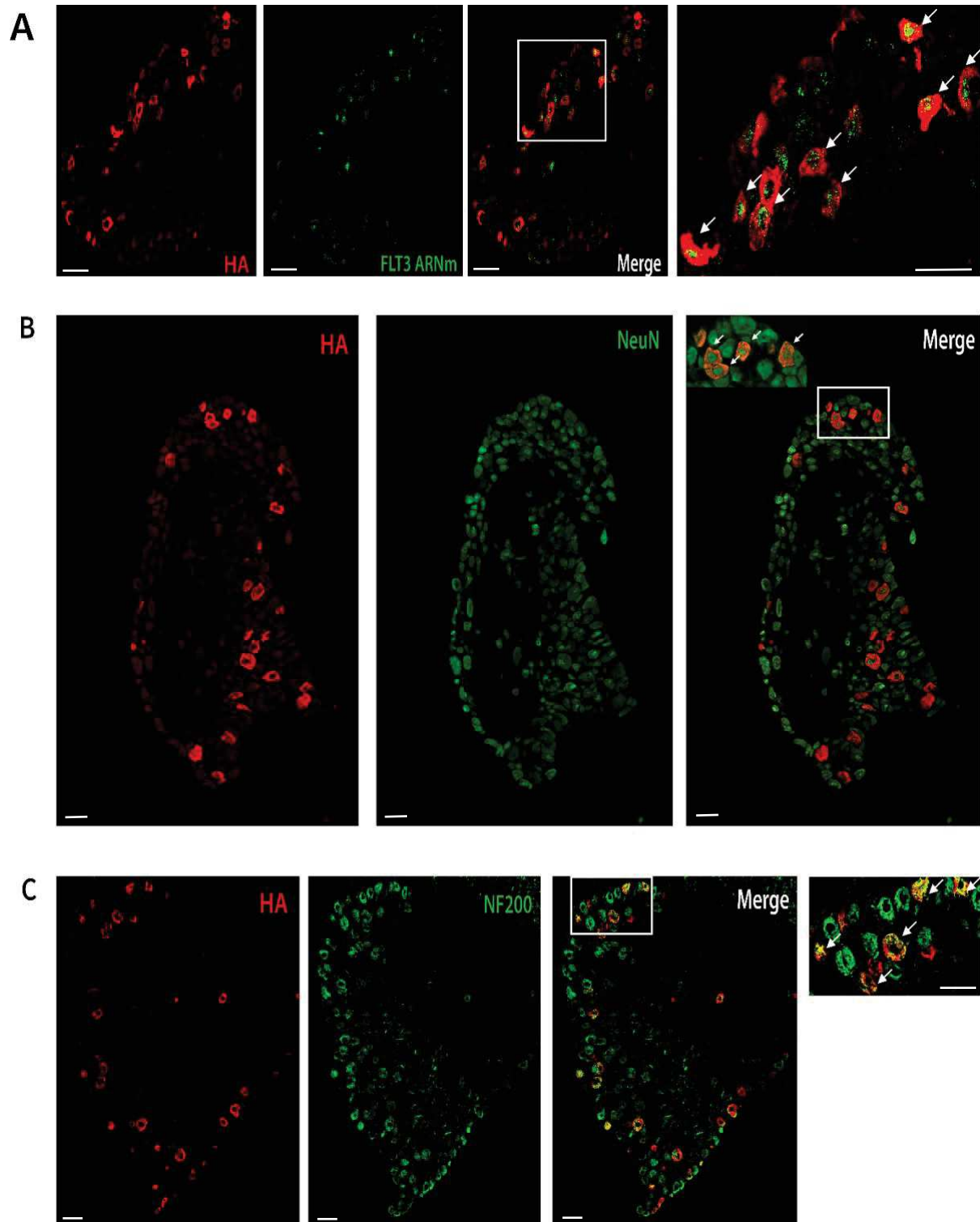


Figure 58. Caractérisation de la lignée *FLT3-Cre* : Ribotag dans les DRGs issus d'animaux naïfs. Co-marquage de l'anticorps HA (rouge) avec A) l'ARNm de FLT3 marqué par RNAscope (vert), B) l'anticorps NeuN (vert) ou C) l'anticorps NF200, dans les DRG de la lignée *FLT3-Cre* : Ribotag. Les flèches blanches montrent des exemples de co-localisation entre les double-marquages. La barre d'échelle correspond à 50μM.

RESULTATS

Une première observation de son expression au niveau de la peau glabre et de la peau poilue de la patte a également été réalisée. Il semblerait ainsi que l'expression se limite également aux terminaisons nerveuses exprimant NF200, et en particulier au niveau des corpuscules de Meissner au niveau de la peau glabre (indiqués par une flèche blanche), et les terminaisons encapsulant les follicules pileux au niveau de la peau poilue (figure 59). Une étude plus poussée et sur un plus grand nombre d'animaux est en cours actuellement afin de valider ces observations préliminaires.

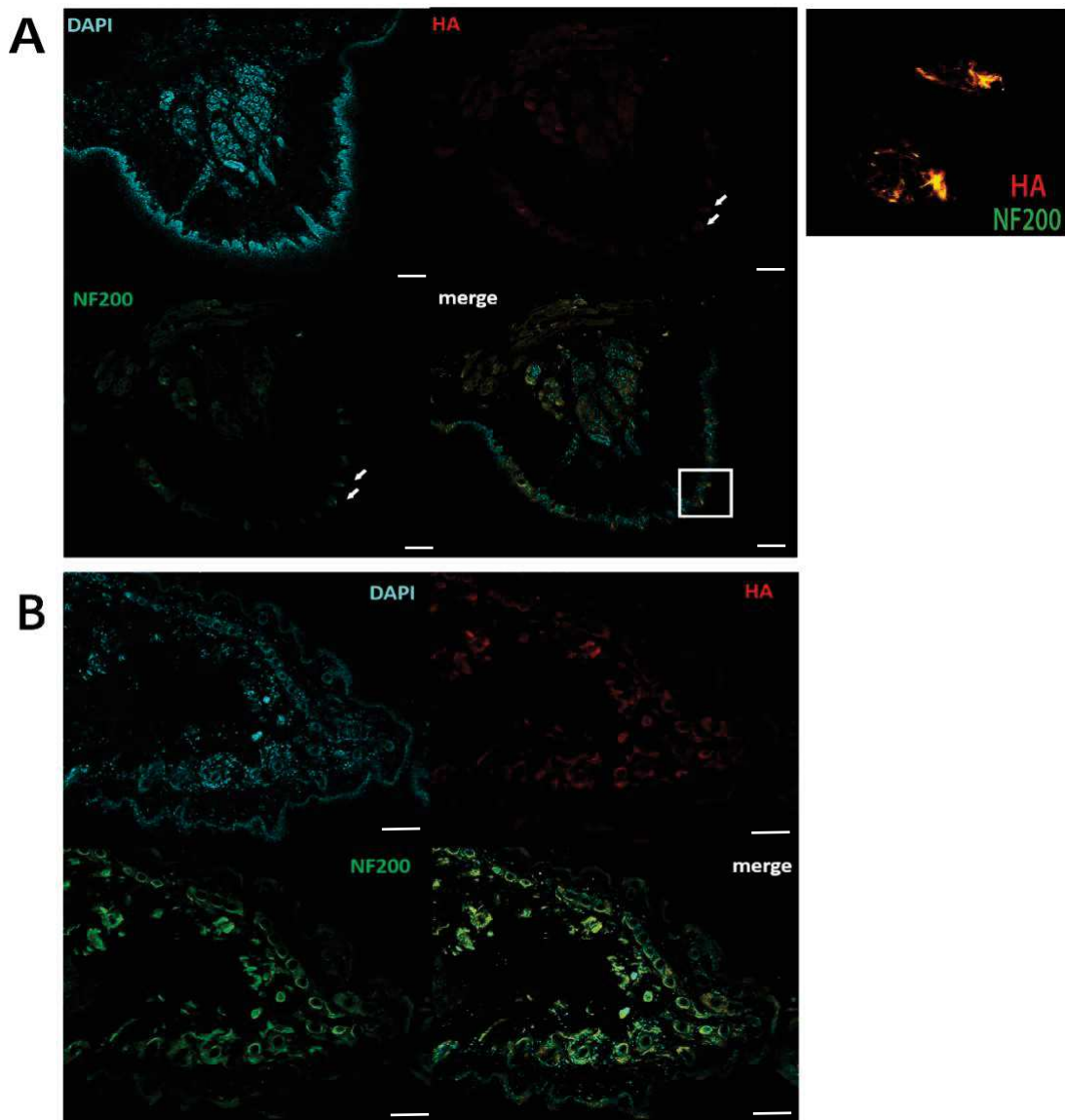


Figure 59. Caractérisation de la lignée *FLT3-Cre* : Ribotag au niveau de la peau glabre et poilue de la patte issues d'animaux naïfs.

Co-marquage de l'anticorps HA (rouge) avec le DAPI (bleu) ou l'anticorps NF200 (vert) au niveau de A) la peau glabre ou B) la peau poilue de la lignée *FLT3-Cre* : Ribotag. Les flèches blanches indiquent une expression dans les corpuscules de Meissner. La barre d'échelle correspond à 1mm.

RESULTATS

Au niveau de la moelle épinière, toutes les cellules HA-positives expriment également l'ARNm de FLT3 (figure 60 A). Un co-marquage avec NeuN a permis de valider une expression spécifiquement neuronale de FLT3 au sein de la ME (figure 60 B), confirmant une première étude réalisée par le laboratoire avec l'hybridation *in situ* (Annexe 1, figure S8). En utilisant différents anticorps : anti-cGRP pour marquer les laminae superficielles, ceux dirigés anti-Lmx1b ou TLX3 pour marquer les sous-populations excitatrices de la ME, ou un anticorps anti-Pax2 pour cibler les populations inhibitrices (figure 60 C et D), il semblerait qu'une colocalisation soit plus présente entre les interneurons excitateurs marqués par Lmx1b et les neurones HA-positifs, bien qu'une petite partie semble aussi colocaliser avec des interneurons inhibiteurs Pax2-positifs. Une amélioration du marquage Pax2, notamment au niveau des laminae plus profondes, semble néanmoins nécessaire afin de révéler toutes les populations inhibitrices de la corne dorsale, qui ne semblent pas toutes représentées sur cette expérience préliminaire. Enfin, Il sera intéressant de quantifier avec précision sa présence dans chacune de ces populations, et d'utiliser des marqueurs spécifiques des populations composant chaque lamina.

Pour finir, j'ai effectué une première caractérisation de l'expression de FLT3 au niveau des structures cérébrales, jusque-là majoritairement inconnue à l'exception du cervelet. Dans celui-ci tout d'abord, on note à nouveau que les cellules de Purkinje HA-positives expriment également l'ARNm de FLT3 (figure 61). Un résumé de l'ensemble des structures cérébrales exprimant FLT3 sont résumées dans le tableau ci-dessous (figure 62). Dans toutes ces structures, FLT3 semble exclusivement neuronal, comme la co-expression avec le marquage NeuN, au contraire d'Iba1 pour marquer la microglie, le révèle. De façon intéressante, on note que la très grande majorité des structures exprimant FLT3, à l'exception du cortex piriforme (impliqué dans l'olfaction), jouent un rôle dans la composante sensori-discriminative, émotionnelle, ou cognitive de la douleur (y compris l'aire restrospléniale, impliquée dans les processus de mémorisation).

RESULTATS

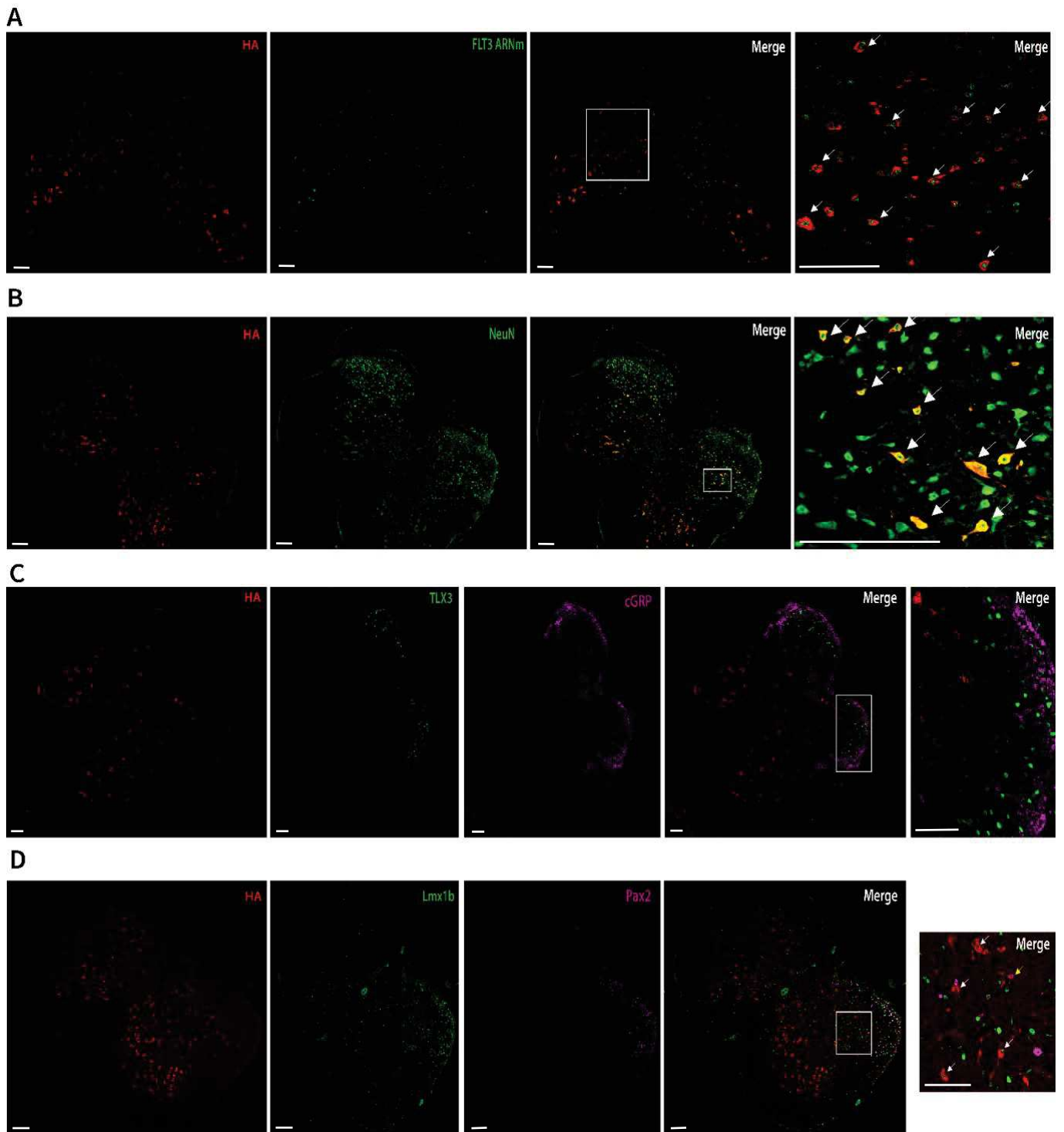


Figure 60. Caractérisation de la lignée *FLT3*-Cre : Ribotag dans les ME issus d'animaux naïfs.

Co-marquage de l'anticorps HA (rouge) avec A) l'ARNm de *FLT3* (vert), B) *NeuN* (vert), C) *TLX3* (vert) et *cGRP* (violet) ou D) *Lmx1b* (vert) et *Pax2* (violet), au niveau de ME issues de la lignée *FLT3*-Cre : Ribotag. Les flèches blanches indiquent une co-expression entre HA, et l'ARNm *FLT3* ou *NeuN* ou *Lmx1b*, les flèches jaunes indiquent une co-expression entre HA et *Pax2*. La barre d'échelle correspond à 50 μ M.

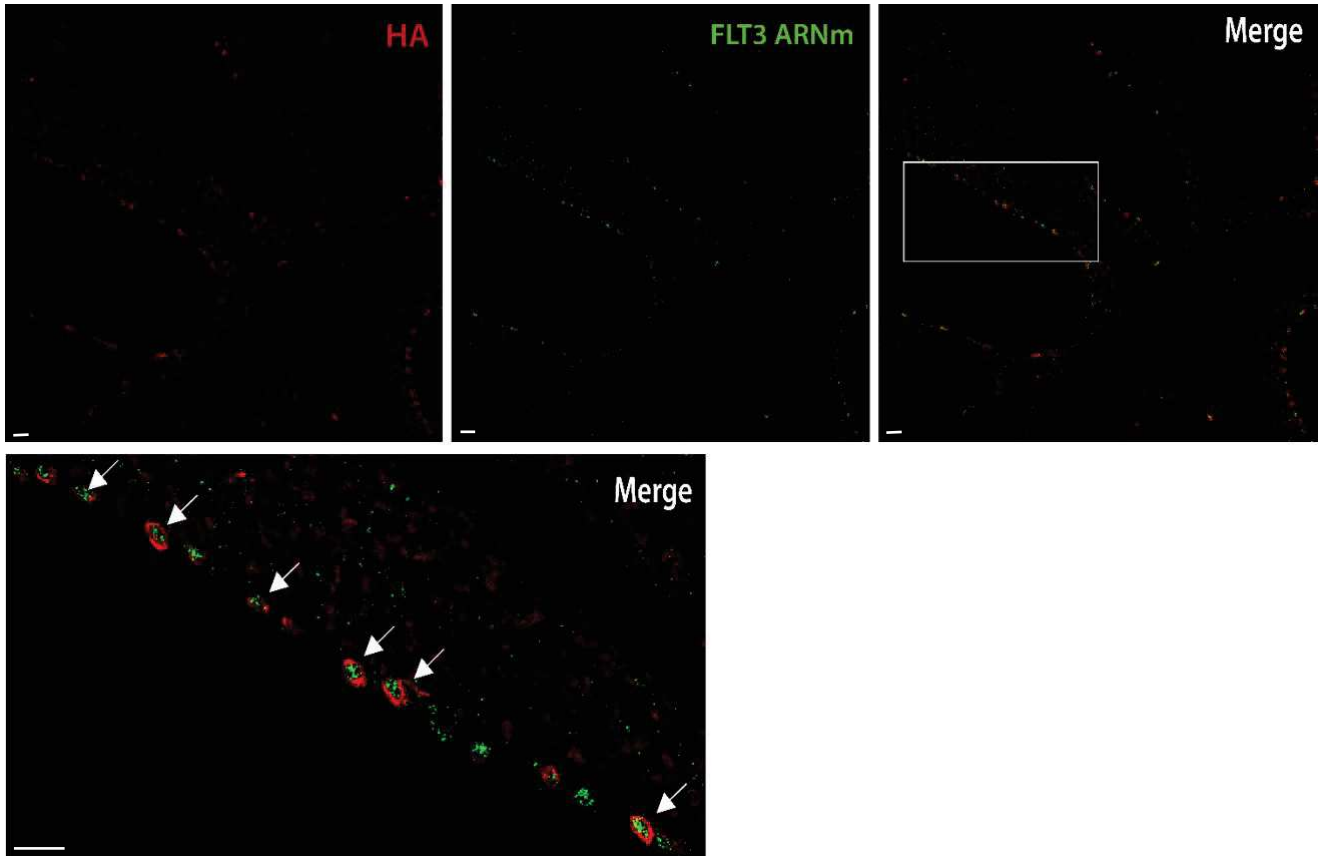
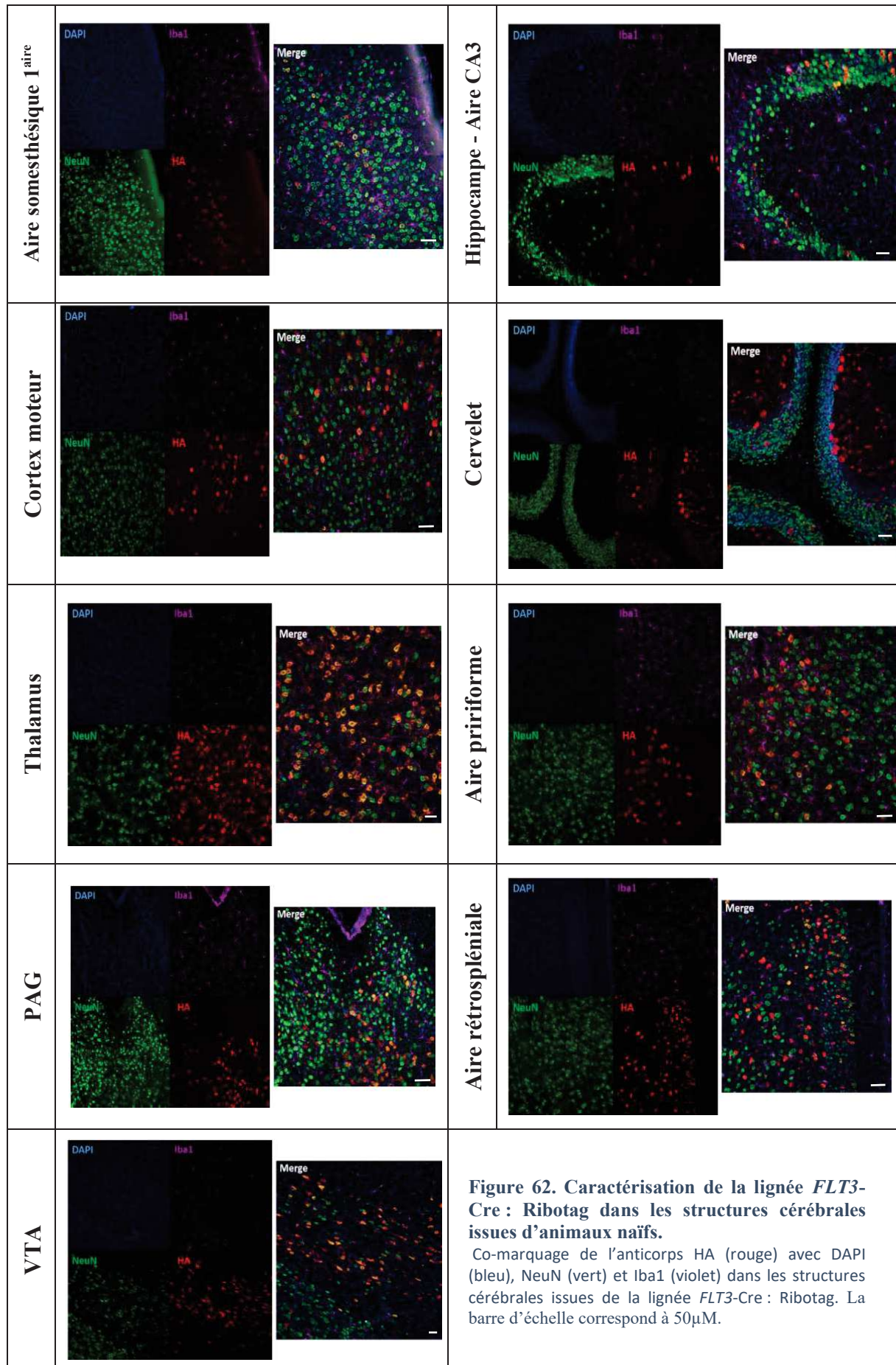


Figure 61. Caractérisation de la lignée *FLT3-Cre* : Ribotag dans le cervelet issu d'animaux naïfs.

Co-marquage de l'anticorps HA (rouge) avec l'ARNm de FLT3 (vert) de cervelets issus de la lignée *FLT3-Cre* : Ribotag. Les flèches blanches indiquent une co-expression entre HA et l'ARNm FLT3. La barre d'échelle correspond à 50µM.

RESULTATS



RESULTATS

Enfin, grâce à l'obtention de la lignée simple *Flt3-Cre*, la dernière stratégie pour marquer FLT3 a été l'emploi d'un virus pAAV-FLEX-TdTomato avec un capsid PHP.S, dont le tropisme permet l'expression de la TdTomato dans les cellules exprimant FLT3 uniquement au niveau du SNP (Chan et al., 2017). De façon similaire à la lignée *Flt3-Cre* : Ribotag, l'étude du signal en fluorescence de la TdTomato, couplée à la technique de RNAscope pour marquer l'ARNm de *Flt3*, a permis de confirmer la présence d'un signal TdTomato spécifiquement dans les neurones du DRG exprimant FLT3 (figure 63). De plus, cette stratégie présente l'avantage de marquer les projections centrales au niveau de la corne dorsale de la ME formées par les fibres afférentes exprimant FLT3. Un co-marquage avec NeuN a confirmé au niveau du DRG un signal spécifique aux neurones, tout comme avec le RNAscope et la *FLT3-Cre* : Ribotag, et au niveau de la ME la formation de synapses des fibres exprimant FLT3 spécifiquement avec des cellules neuronales (figure 64 A et B). Grâce à cela, une caractérisation des populations spinales formant des connexions synaptiques avec ces fibres est également en cours d'étude. De façon intéressante, les premiers résultats obtenus suggèrent que les afférences exprimant FLT3 semblent projeter vers les laminae II à IV, et majoritairement vers des neurones spinaux inhibiteurs des couches profondes marqués par Pax2 (figure 64 C).

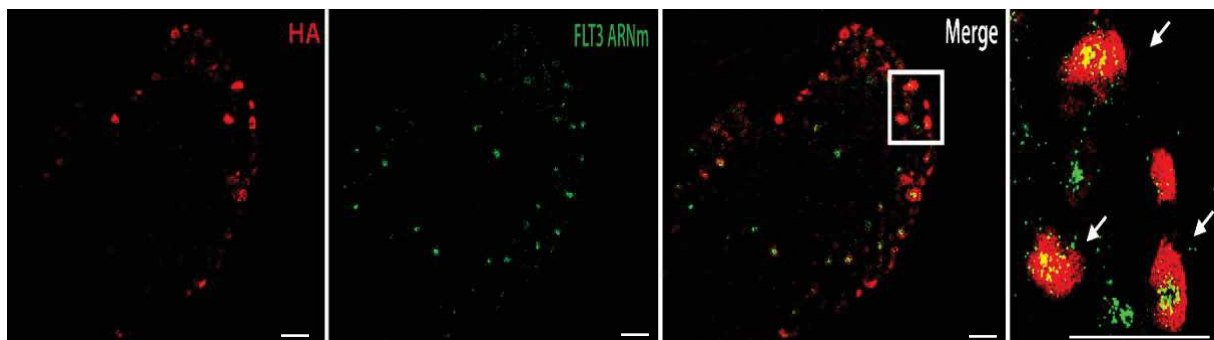


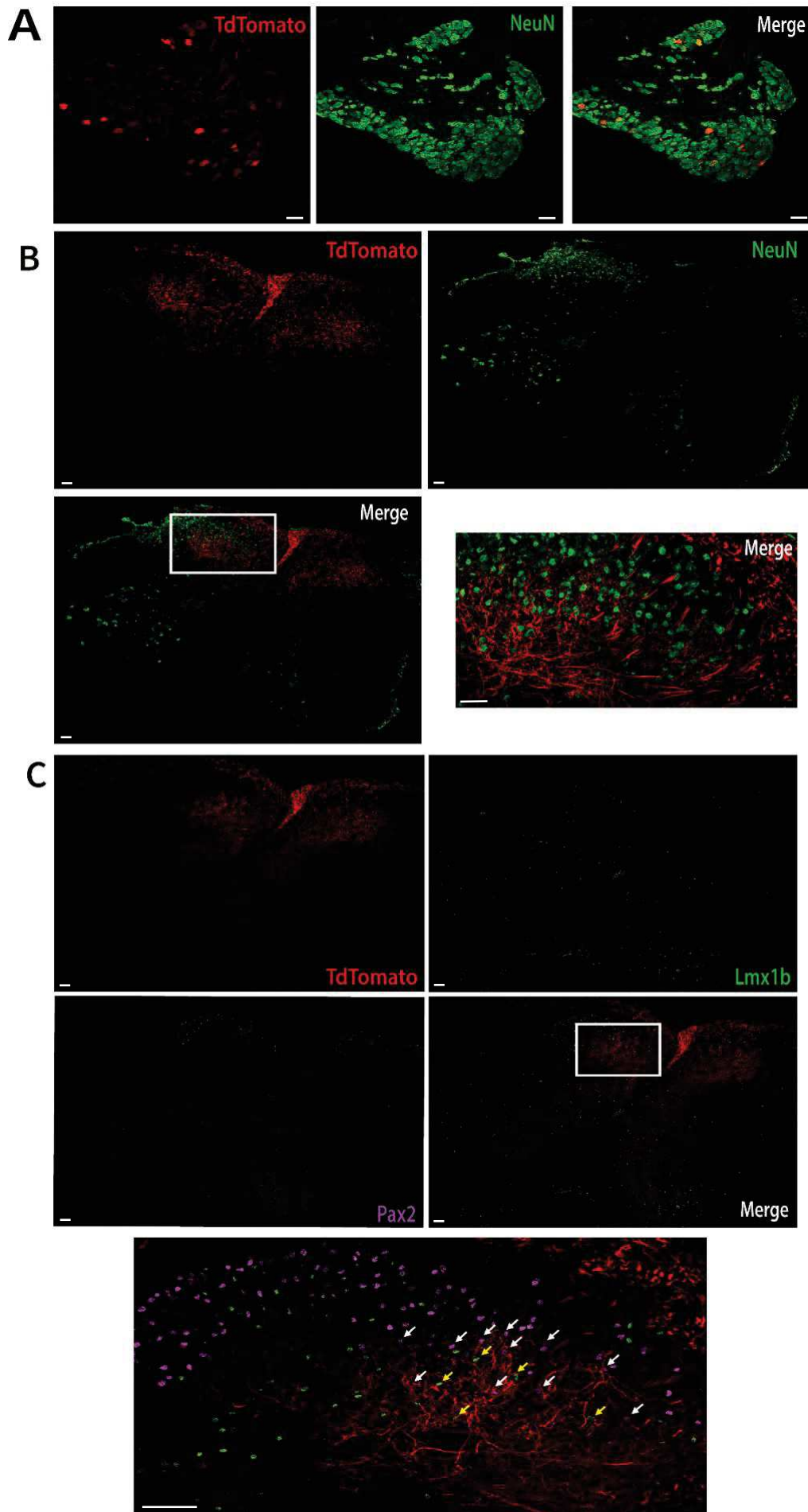
Figure 63. Expression de FLT3 dans les DRGs de la souris FLT3-Cre après injection d'un virus AAV-flex-Tdtomato PHP.S

Signal de la Tdtomato (rouge), co-marqué avec l'ARNm de FLT3 (vert) de DRGs issus de la lignée *FLT3-Cre* : Ribotag. Les flèches blanches indiquent une co-expression entre TdTomato et l'ARNm FLT3. La barre d'échelle correspond à 50 μ M.

Figure 64 (Page suivante). Expression de FLT3 dans les DRGs et projections centrales de la souris FLT3-Cre après injection d'un virus AAV-flex-Tdtomato PHP.S

Signal de la Tdtomato (rouge), co-marqué avec A) NeuN (vert) au niveau des DRGs, B) NeuN (vert) au niveau de la ME, ou C) Lmx1b (vert) et Pax2 (violet) au niveau de la ME, issus de la lignée *FLT3-Cre* : Ribotag. Les flèches blanches indiquent les connexions centrales formées entre TdTomato et Pax2, les flèches jaunes celles formées entre TdTomato et Lmx1b. La barre d'échelle correspond à 50 μ M.

RESULTATS



2. Etude de la co-expression des récepteurs DOR et FLT3

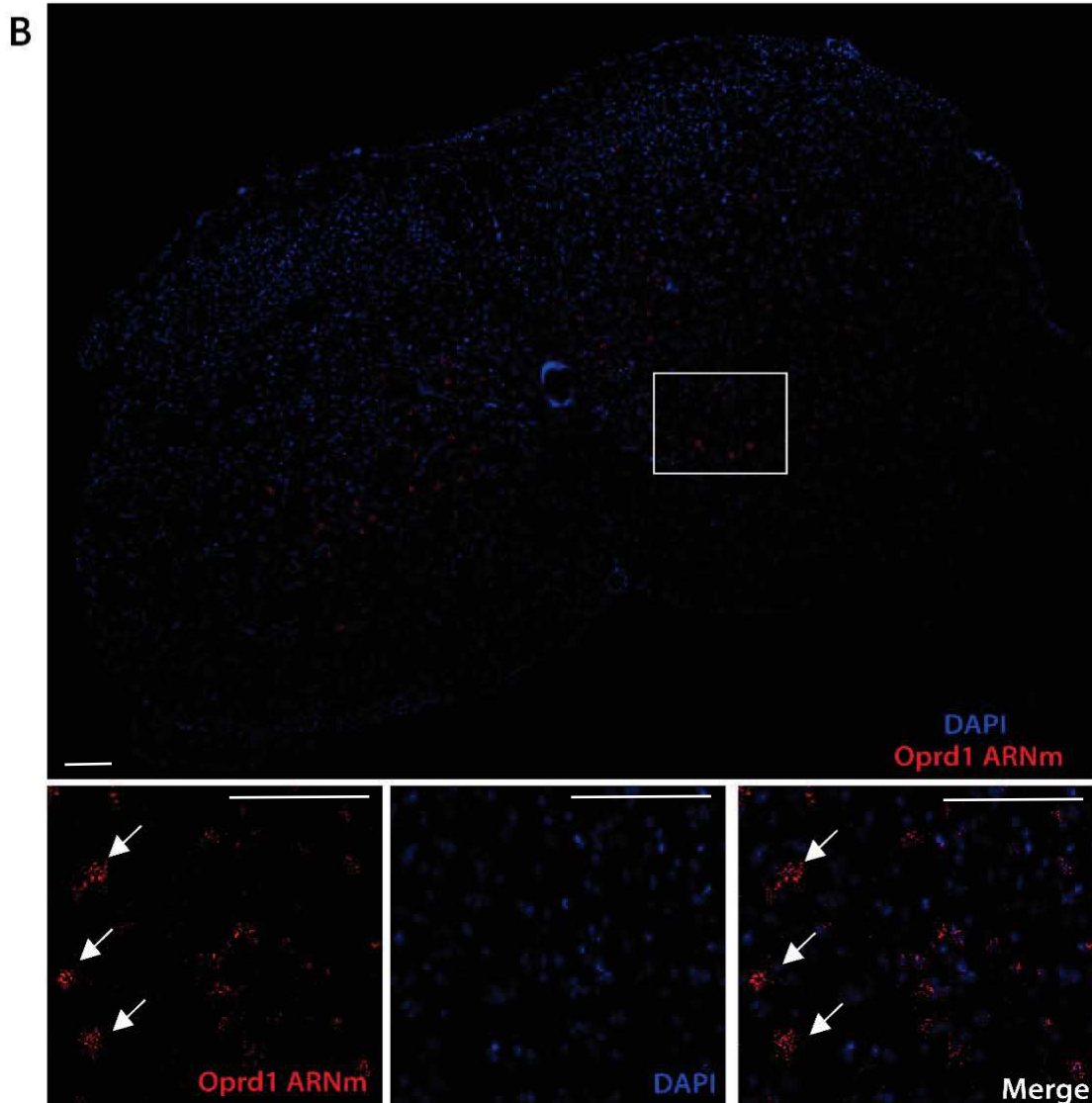
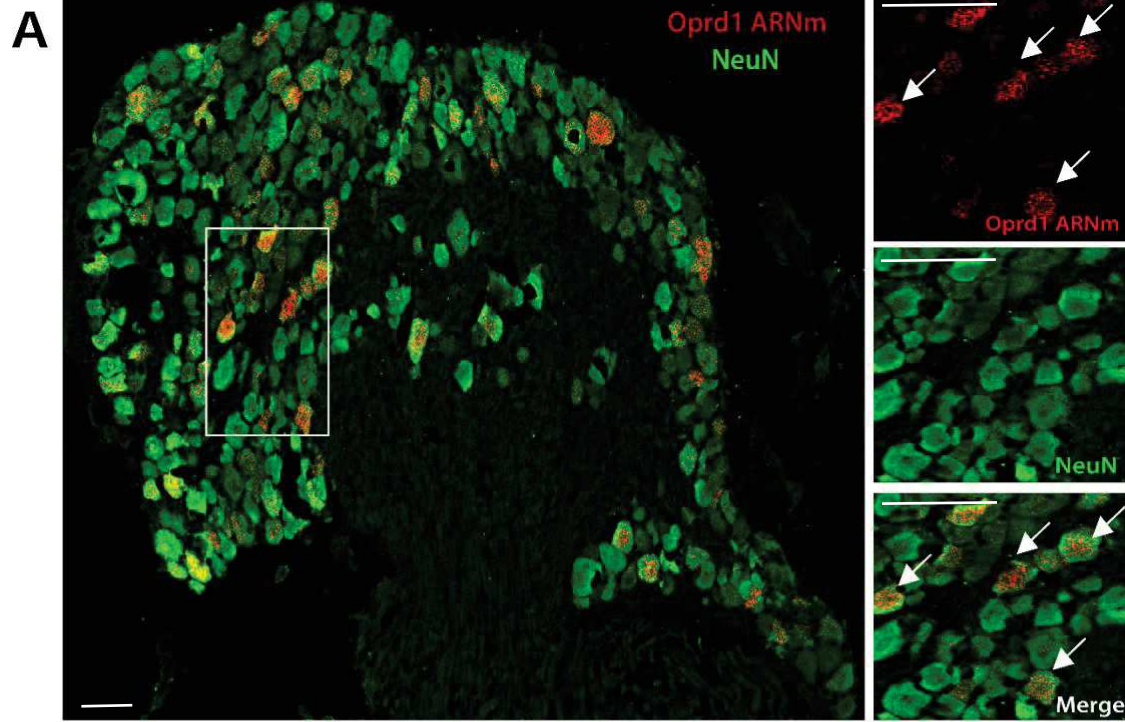
Afin de pouvoir étudier la co-expression de DOR et FLT3 dans le système nerveux, il fallait également développer des outils plus spécifiques nous permettant d'observer la localisation de DOR. Pour cela, deux approches ont initialement été développées. La première approche a été l'emploi de la lignée transgénique DOR-eGFP évoquée lors de l'introduction. Les premiers tests d'immunofluorescence réalisés sur cette souris ont cependant donné des résultats peu convaincants (résultats non montrés), et la nécessité sur ces souris de réaliser des injections de l'agoniste SN80 afin de pouvoir observer le signal du DOR apportant un biais important dans notre étude, l'usage de cette lignée a cependant été abandonné.

La seconde stratégie a donc été d'employer la technique de RNAscope afin de marquer l'ARNm de DOR. Grâce à cette technique, j'ai pu observer une expression similaire à ce qui a été décrit précédemment dans la littérature au niveau des neurones du DRG et de la ME (figure 65 A et B) (Bardoni et al., 2014).

Suite au développement de l'ensemble de ces différents outils permettant l'étude de l'expression génique de *Flt3* et du DOR, j'ai également pu faire une première caractérisation de la co-localisation éventuelle entre les 2 récepteurs en combinant la technique de RNAscope et l'immunohistochimie anti-HA à partir de coupes provenant d'animaux *Flt3*-Ribotag. De façon intéressante, je n'ai pu observer qu'une très faible co-localisation (moins de 5%) entre les deux récepteurs au niveau des DRGs, que ce soit en condition sham (figure 66 A), ou en condition de douleur postopératoire, 3 jours après à la seconde (figure 66 B). Ainsi, l'interaction fonctionnelle entre DOR et FLT3 au niveau des neurones de premier ordre, suggérée par nos expériences d'imagerie calcique, ne semble pas passer par une interaction physique.

Figure 65 (Page suivante). Représentation de l'expression en ARNm de *Oprd1* en RNAscope dans différentes structures du système nerveux (DRG et ME) Co-marquage de l'ARNm de *Oprd1* (rouge) couplé à A) NeuN (vert) dans le DRG, ou B) DAPI (bleu) dans la ME par immunofluorescence. Les flèches blanches montrent des exemples de cellules DOR-positives. La barre d'échelle correspond à 50µM.

RESULTATS



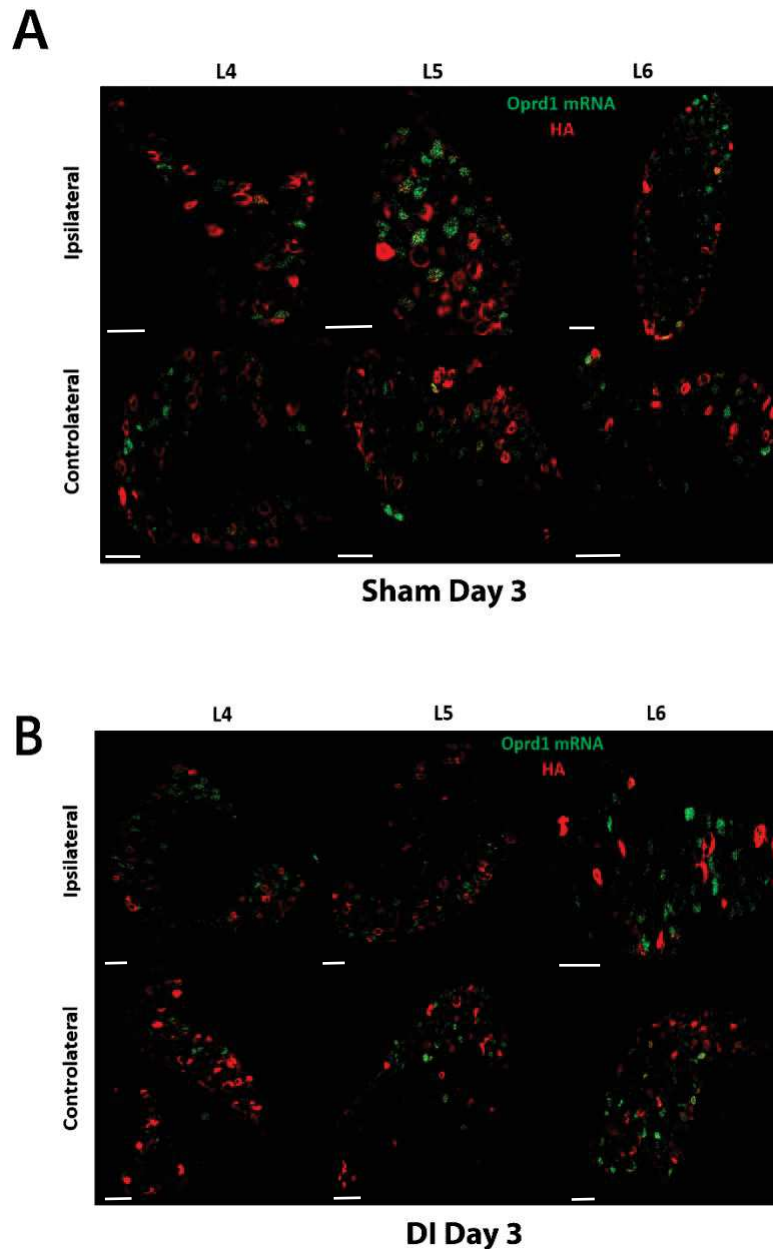


Figure 66. *FLT3* et *Oprd1* ne sont pas exprimés par les mêmes sous-populations neuronales du DRG, en condition naïve ou de douleur chronique
 Co-marquage de l'ARNm de *Oprd1* (vert) couplé à un marquage HA (rouge) dans les DRGs issus d'animaux A) sham ou B) doublement incisés, 3 jours après la seconde incision. La barre d'échelle correspond à 50 μ M.

Toutefois, au niveau de la corne dorsale de la ME, il semblerait qu'en condition physiologique, il y ait une forte co-expression entre les deux récepteurs, notamment au niveau des laminae III à V (figure 67 A). De plus, 3 jours après la seconde incision, il semblerait qu'il y ait une perte de cette co-localisation, dans les deux cornes dorsales (figure 67 B). Cette observation a été faite sur des moelles épinières issues de deux animaux différents par

RESULTATS

condition, et ce n sera doublé prochainement afin de confirmer ces observations. Si cette observation est confirmée, il sera également intéressant d'étudier l'expression d'*Oprd1* suite à un traitement au BDT001, afin de voir si une co-expression entre DOR et FLT3 peut à nouveau être observée. Compte tenu de la modulation de la FLT3 sur les effets excitateurs du DOR dans les DRG et la différence de co-expression entre les 2 récepteurs au niveau de la corne dorsale, cela suggère que l'interaction fonctionnelle que nous observons entre FLT3 et DOR en conditions de douleur chronique pourrait avoir lieu au niveau des neurones sensoriels mais également dans les neurones spinaux.

Pour conclure, un travail important reste donc à réaliser avec ces différents outils pour étudier avec précision la localisation de FLT3 dans les différentes sous-populations du système somatosensoriel, la présence du co-localisation avec DOR, et leur modulation respective en condition de douleur chronique.

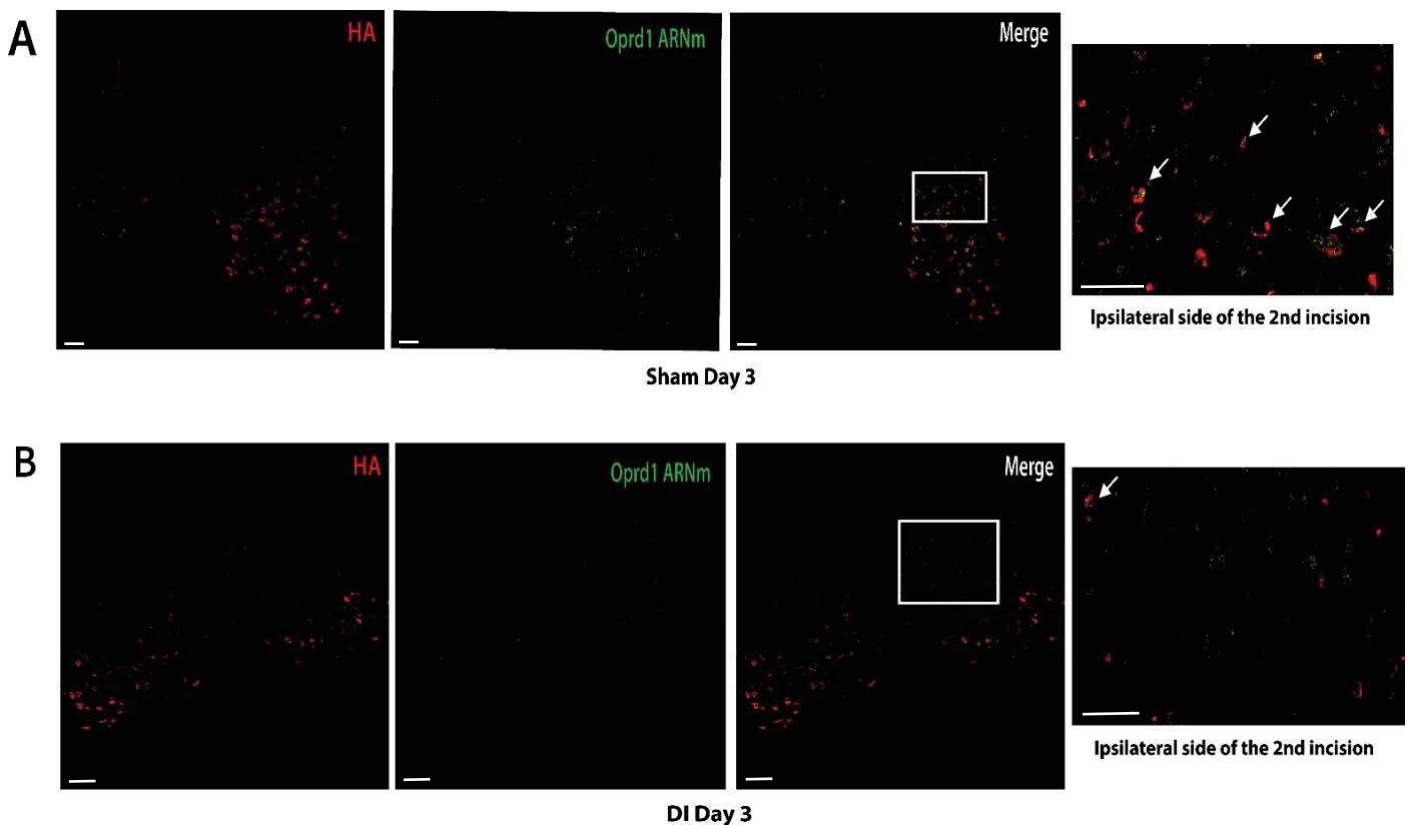


Figure 67. Co-expression de *Oprd1* et FLT3 dans la ME en condition naïve et de douleur postopératoire.

Co-marquage de l'ARNm de *Oprd1* (vert) couplé à un marquage HA (rouge) dans les ME issus d'animaux A) sham ou B) doublement incisés, 3 jours après la seconde incision. Les flèches blanches indiquent la présence d'une co-localisation. La barre d'échelle correspond à 50µM.

RESULTATS

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

I. Implication des récepteurs opioïdiques endogènes dans la sensibilisation latente induite par les différents types de douleur chronique

A côté de l'étude de l'implication de l'EOS dans les mécanismes de récupération aux douleurs chroniques, j'ai également étudié leur implication dans les mécanismes de sensibilisation latente, suite à la mise en place d'une douleur post-opératoire ou inflammatoire, chez des animaux exprimant ou non FLT3. En effet, comme décrit lors de l'introduction, des résultats préliminaires du laboratoire ont démontré la présence d'une sensibilisation latente chez les animaux n'exprimant pas FLT3, et révélée via le blocage de l'EOS par injection de naloxone.

1. Douleur postopératoire

Pour l'étude de la sensibilisation latente induite par la double incision, j'ai d'abord effectué une injection i.t. de NM 30 jours après rémission complète des animaux (figure 68 A). La réapparition d'une hypersensibilité mécanique suite à l'injection, indépendamment de l'expression de FLT3, a ainsi confirmé les résultats préliminaires déjà obtenus par le laboratoire, mais a également montré qu'un mois après rémission complète, cette sensibilisation latente est toujours présente chez les animaux ayant développé une douleur postopératoire. Enfin, l'usage d'antagonistes spécifiques a démontré des résultats similaires à ceux obtenus lors de la récupération, à savoir une implication spécifique du récepteur DOR dans ce modèle (figure 68 B à D). Ainsi, l'activation de DOR permettant la récupération des animaux est toujours présente au long terme après la rémission totale, participant au phénomène de sensibilisation latente. En revanche, même chez les animaux n'exprimant pas FLT3, l'inhibition de KOR n'a eu aucun effet, confirmant son activation transitoire lors de la récupération.

Enfin, lors de la caractérisation du modèle de double incision, le laboratoire a démontré l'implication de la microglie dans les processus de sensibilisation, dont l'inhibition via l'injection de minocycline avait permis de restaurer un seuil basal de sensibilité mécanique (Annexe I, figure 2). De façon intéressante, l'injection de minocycline après rémission des

RESULTATS

animaux a résulté en une augmentation du seuil de retrait de la patte, confirmant ainsi une activation persistante des acteurs du système inhibiteur de la douleur (Figure 68 E).

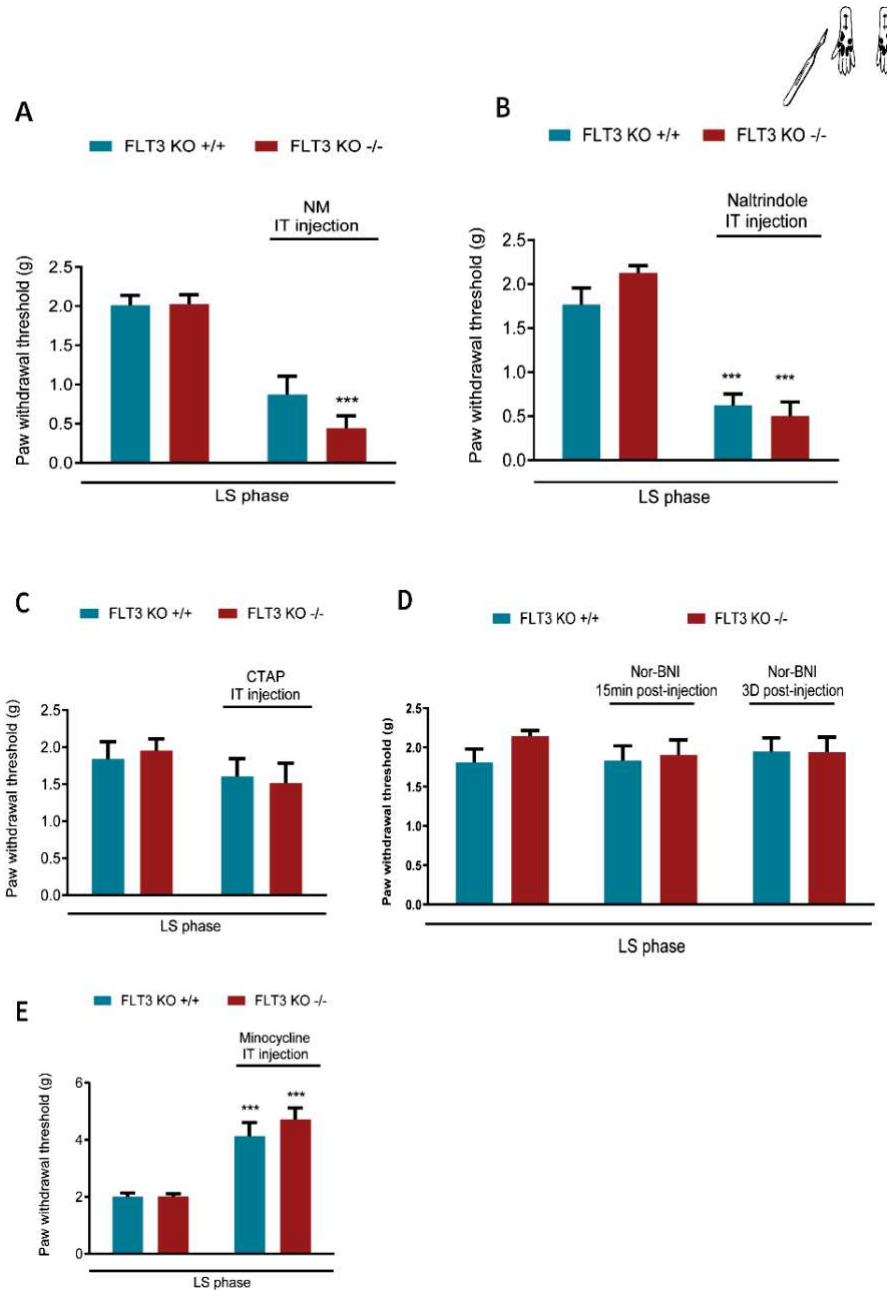


Figure 68. Le récepteur DOR central est impliqué dans les processus de sensibilisation latente induite par la douleur postopératoire

Seuil de sensibilité mécanique lors de la phase de sensibilisation latente induite par la douleur postopératoire, chez des animaux exprimant ou non FLT3, avant et 30 min après injection A) de NM i.t. B) Naltrindole C) CTAP D) nor-BNI ou E) minocycline. Les valeurs représentent la moyenne + S.E.M. (n=8), Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 par rapport au seuil avant injection

RESULTATS

2. Douleur inflammatoire

Dans la sensibilisation latente induite par la douleur inflammatoire, mes résultats sont en accord avec ceux déjà obtenus dans la littérature et évoqués plus hauts à savoir que le récepteur MOR responsable de la récupération, reste activé au long terme et participe à la mise en place d'une sensibilisation latente dans ce modèle (figure 69).

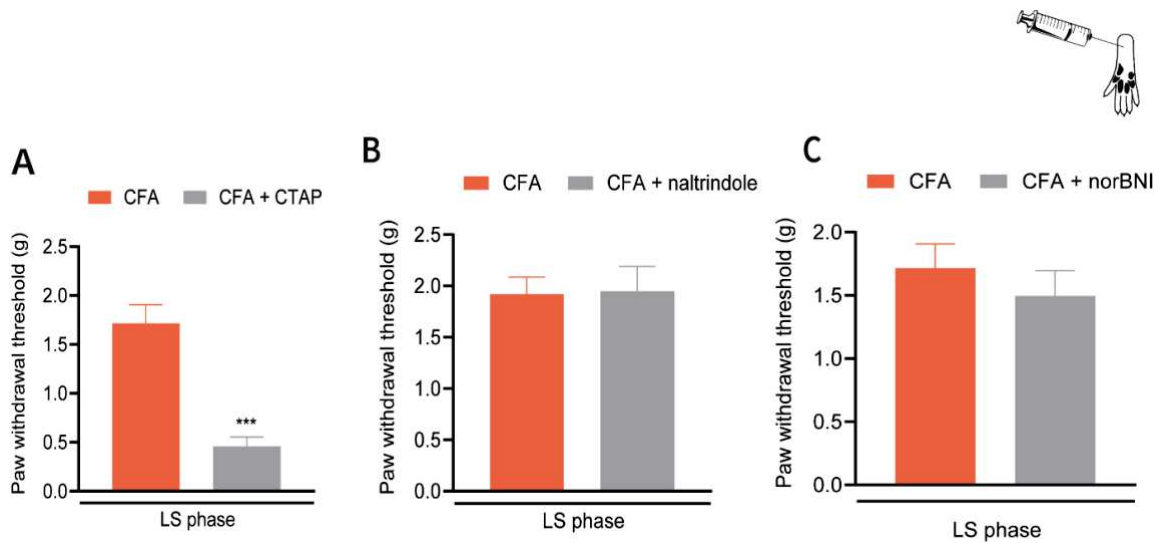


Figure 69. Le récepteur MOR central est impliqué dans les processus de sensibilisation latente induite par la douleur inflammatoire

Seuil de sensibilité mécanique lors de la phase de sensibilisation latente induite par la douleur inflammatoire, avant et 30 min après injection A) CTAP B) Naltrindole C) nor-BNI. Les valeurs représentent la moyenne + S.E.M. (n=8), Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 par rapport au seuil avant injection

RESULTATS

II. Etude de l'impact de la sensibilisation latente induite par la douleur postopératoire, sur la composante motivationnelle induite par la morphine

Pour finir, je me suis intéressé à l'impact de la présence de cette sensibilisation au long terme sur la composante émotionnelle de la douleur postopératoire, et notamment sur les comorbidités associées à la douleur chronique. Le laboratoire ayant montré une disparition des comportements anxiodépressifs entre la 4^{ème} et la 5^{ème} semaine après incision, j'ai étudié en particulier l'impact au long terme sur la vulnérabilité à l'addiction induite par la douleur. Pour cela, environ 4 semaines après rémission totale des animaux (soit 6 semaines après la seconde incision), j'ai étudié grâce au test de CPP les effets motivationnels induits par une faible dose de morphine, en associant un des compartiments du CPP avec une injection i.p. d'une dose de 1,5mg/kg de morphine, et l'autre des compartiments avec du sérum physiologique. Cette faible dose de morphine n'était pas suffisante pour provoquer le développement d'une préférence de place sur des animaux sham (figure 70A). De façon intéressante, sur les animaux ayant subi une double incision 6 semaines avant le conditionnement, on note l'apparition d'une préférence importante pour le compartiment associé à l'injection de morphine. Cette préférence démontre ainsi que cette faible dose de morphine a suffi à induire un comportement motivationnel chez ces animaux. Ainsi, ces résultats pourraient suggérer la modification des processus motivationnels à long terme après chirurgie qui pourrait être associée à une vulnérabilité à l'addiction, même après rémission complète des animaux. De façon intéressante, comme observé en clinique, on note une variabilité interindividuelle assez importante dans le développement de cette vulnérabilité, avec certains animaux se montrant résistants. En isolant la population vulnérable, l'effet de préférence de place induit par la morphine est ainsi encore plus flagrant chez les animaux doublement incisés (figure 70B).

RESULTATS

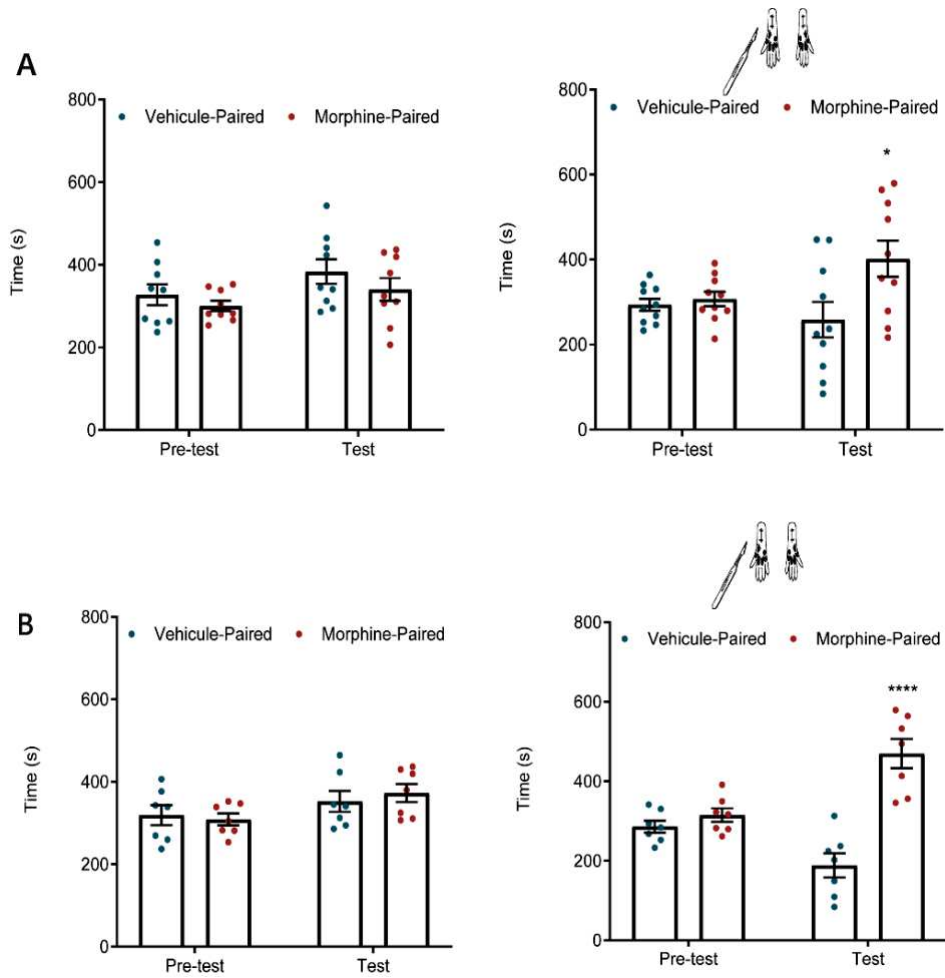


Figure 70. La mise en place d'une douleur chronique postopératoire induit une vulnérabilité aux effets motivationnels induits par la morphine sur le long terme

Test de préférence de place conditionnée induite par les effets motivationnels de la morphine sur des animaux sham ou en phase de sensibilisation latente suite à une douleur postopératoire. Les valeurs représentent la moyenne + S.E.M. du temps passé dans chaque compartiment A) n=10 ou B) n=7, Two-way ANOVA et test Holm-Sidak, *P<0.05 par rapport au contrôle

RESULTATS

IMPLICATION DANS LES AUTRES PROJETS DE L'ÉQUIPE

En plus de l'étude de l'interaction entre l'EOS et FLT3 dans les mécanismes de modulation de la douleur chronique, qui a constitué mon projet de thèse principal, j'ai également pu participer aux deux autres études de l'équipe déjà décrites dans l'interaction, consistant d'une part à caractériser le modèle double incision de douleur postopératoire et étudier l'implication de FLT3 dans ce modèle, et d'autre part étudier l'implication de FLT3 dans les effets de tolérance et OIH induits par la morphine. Les principaux résultats obtenus dans chacune de ces deux études sont résumés ci-dessous.

I. Activation of peripheral neuronal FLT3 promotes exaggerated sensorial and emotional pain-related behaviors facilitating the transition from acute to chronic pain

1. Etude de la douleur spontanée induite par la douleur postopératoire chez des animaux exprimant ou non le récepteur FLT3

Dans l'étude de l'implication de FLT3 dans le modèle de double incision, j'ai notamment réalisé une expérience de préférence de place conditionnée aux effets analgésiques de la clonidine, afin d'étudier la douleur spontanée induite par la douleur postopératoire sur des animaux exprimant ou non FLT3 (cf. protocole détaillé dans matériel & méthodes). Cette expérience faisait suite aux résultats déjà obtenus par le doctorant Adrien Tassou, qui avait :

- D'une part, démontré la présence d'une douleur spontanée, 3 jours après l'opération, spécifiquement chez les animaux ayant subi une double incision, comparée aux animaux sham ou n'ayant subi qu'une seule incision (SI) (Annexe I, figure 2),

- D'autre part, observé pour la première fois la présence d'une récupération à l'hypersensibilité mécanique induite par la double incision plus rapide chez les animaux n'exprimant pas FLT3 à l'aide du test du Von Frey (Annexe I, figure 3).

Ainsi, 4 jours après la seconde incision, à un temps où on observe des différences importantes au niveau de la douleur évoquée entre les animaux exprimant ou non FLT3, j'ai effectué le même protocole d'étude de douleur spontanée que celui utilisé dans la comparaison

RESULTATS

entre animaux naïfs, ayant subi une seule incision, ou ayant subi une double incision, cette fois-ci entre animaux DI exprimant ou non FLT3 (figure 71). En comparaison au pré-test avant le conditionnement à la clonidine, j'ai observé une augmentation significative du temps passé dans le compartiment associé à la clonidine chez les animaux FLT3^{+/+}, reproduisant ainsi les résultats déjà obtenus par l'équipe, mais qui n'était pas présente chez les animaux FLT3^{-/-}.

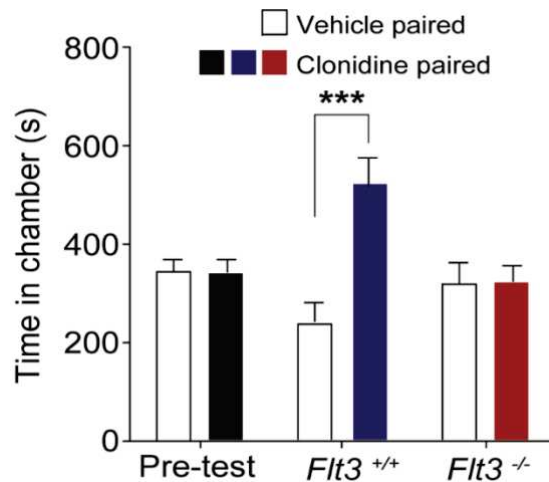


Figure 71. La douleur spontanée induite par une double-incision est prévenue chez les animaux n'exprimant pas FLT3

Ainsi, la délétion génique de FLT3 permet de prévenir la mise en place d'une douleur spontanée, 4 jours après la seconde incision.

2. Etude de l'implication microgliale dans les composantes sensorielles et émotionnelles de la douleur postopératoire

Dans cette étude, j'ai également participé à la caractérisation du rôle de la microglie dans les effets sensoriels et émotionnels de la douleur postopératoire. Les premiers résultats de l'équipe avaient en effet montré que 15 minutes après l'inhibition de la microglie par injection de minocycline en i.t., les animaux DI ne présentaient plus d'hypersensibilité mécanique, au contraire des animaux SI. Pour compléter ces résultats, j'ai réalisé un suivi de la sensibilité mécanique des animaux suite à une injection préventive de GW 2580, inhibiteur de CSF-1R qui bloque ainsi la prolifération des macrophages -dont la microglie-, au moment de la

RESULTATS

réalisation de chaque incision. J'ai pu observer un retour à un seuil basal de sensibilité mécanique bien plus rapide chez les animaux injectés avec le GW 2580 comparé à ceux injectés avec du sérum physiologique (figure 72 A & B). De façon intéressante, cet effet était présent dès la première incision, alors que l'injection de minocycline n'avait eu un effet que chez les animaux DI. Enfin, cette inhibition microgliale semble avoir eu également un effet bénéfique sur la composante émotionnelle, possiblement de façon indirecte *via* son effet sur l'hypersensibilité mécanique, les animaux injectés avec le GW 2580 ne présentant pas les comportements associés à l'anxiodépression, observés classiquement lors des tests de ST, NSF et FST après la double incision, et présents chez les animaux injectés avec du sérum physiologiques (figure 72 D, E et F).

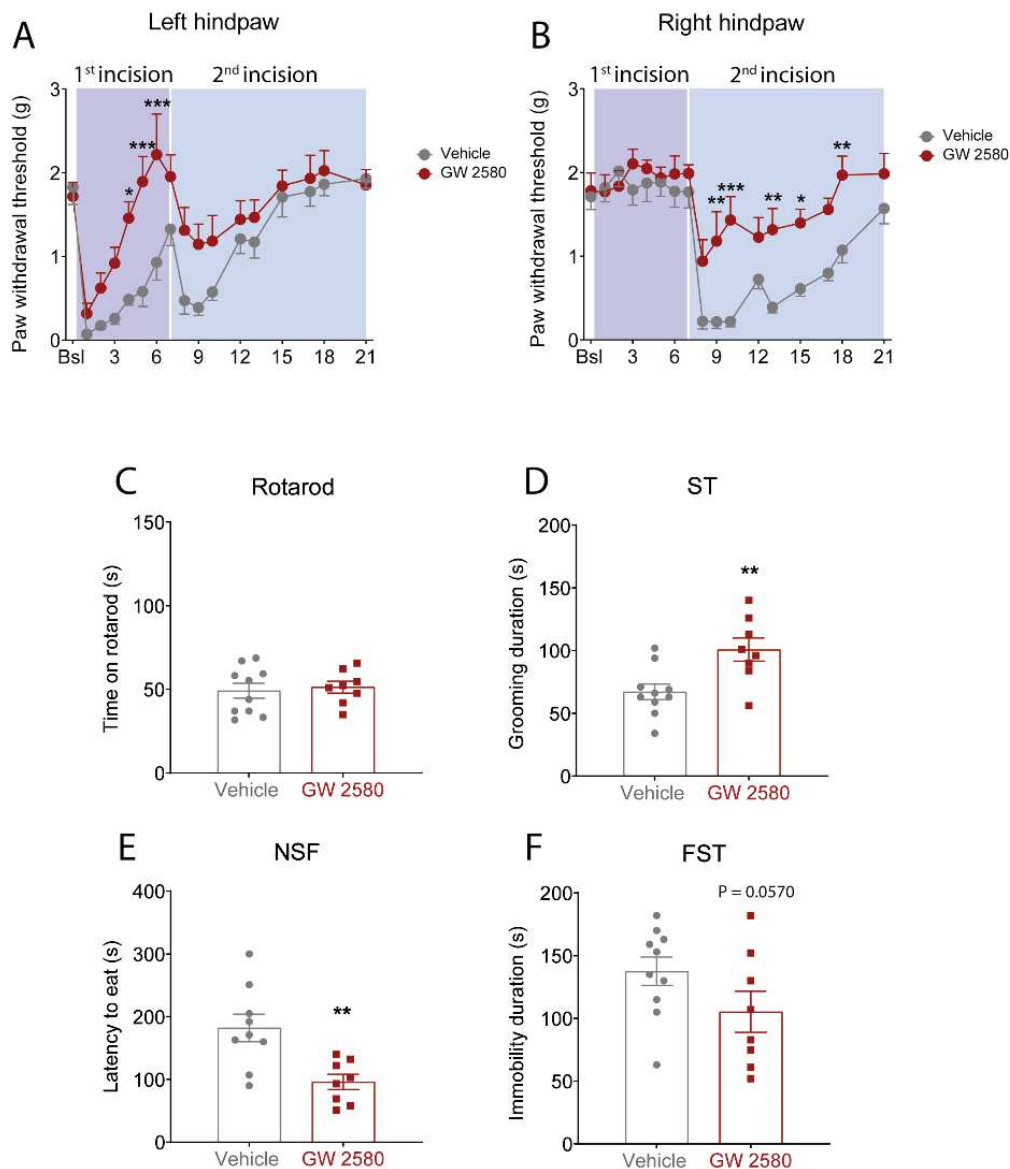


Figure 72. L'inhibition chronique de la microglie prévient la mise en place d'une hypersensibilité mécanique et de comportements anxiodépressifs induits par la douleur postopératoire

RESULTATS

Pour finir, dans cette caractérisation du rôle de FLT3 et de la microglie dans les douleurs postopératoires, j'ai également réalisé un marquage de l'ARNm de FLT3 par réaction enzymatique en hybridation *in situ*, au niveau de cornes dorsales issues de souris sham ou DI de la lignée CX3CR1-eGFP (figure 73). La comparaison du signal de CX3CR1, permettant de labelliser les macrophages, au marquage de l'ARNm de *flt3*, cette expérience a permis de montrer une expression de FLT3 au niveau neuronal spécifiquement dans la ME, et non glial.

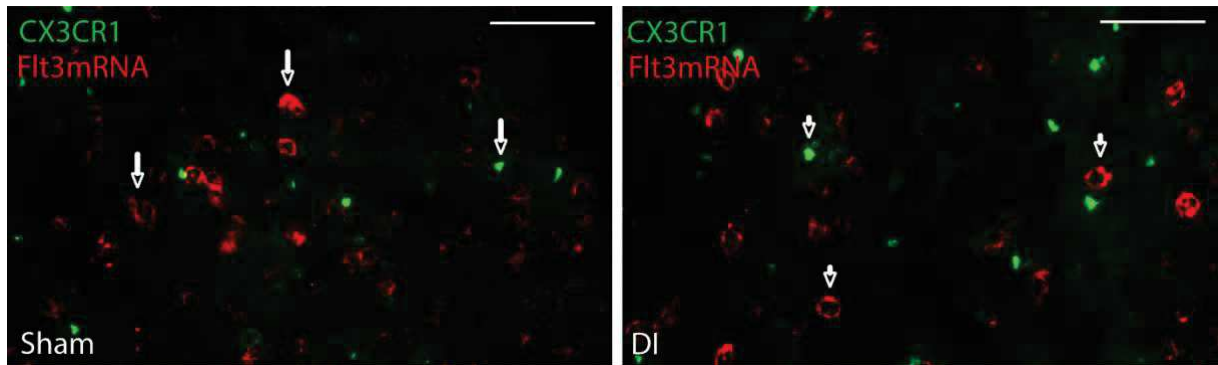


Figure 73. L'expression en ARNm de FLT3 au niveau de la corne dorsale n'est pas localisée dans les populations macrophagiques

RESULTATS

II. Cross-talk between MOR and FLT3 in sensory neurons reveals a cellular mechanism opposing morphine analgesia

1. Etude de l'expression des marqueurs de l'OIH dans la ME d'animaux exprimant ou non FLT3

Dans la caractérisation du rôle de FLT3 dans la mise en place de tolérance et OIH après un traitement chronique à la morphine, j'ai d'abord étudié par immunofluorescence l'effet d'une inhibition génique de FLT3 sur l'activation de différents acteurs déjà décrits comme étant impliqués dans les effets secondaires de la morphine, à savoir les astrocytes (marqués par un anticorps anti-GFAP), la microglie (marqués avec l'anticorps anti-Iba1) et cGRP (figure 74 A et B).

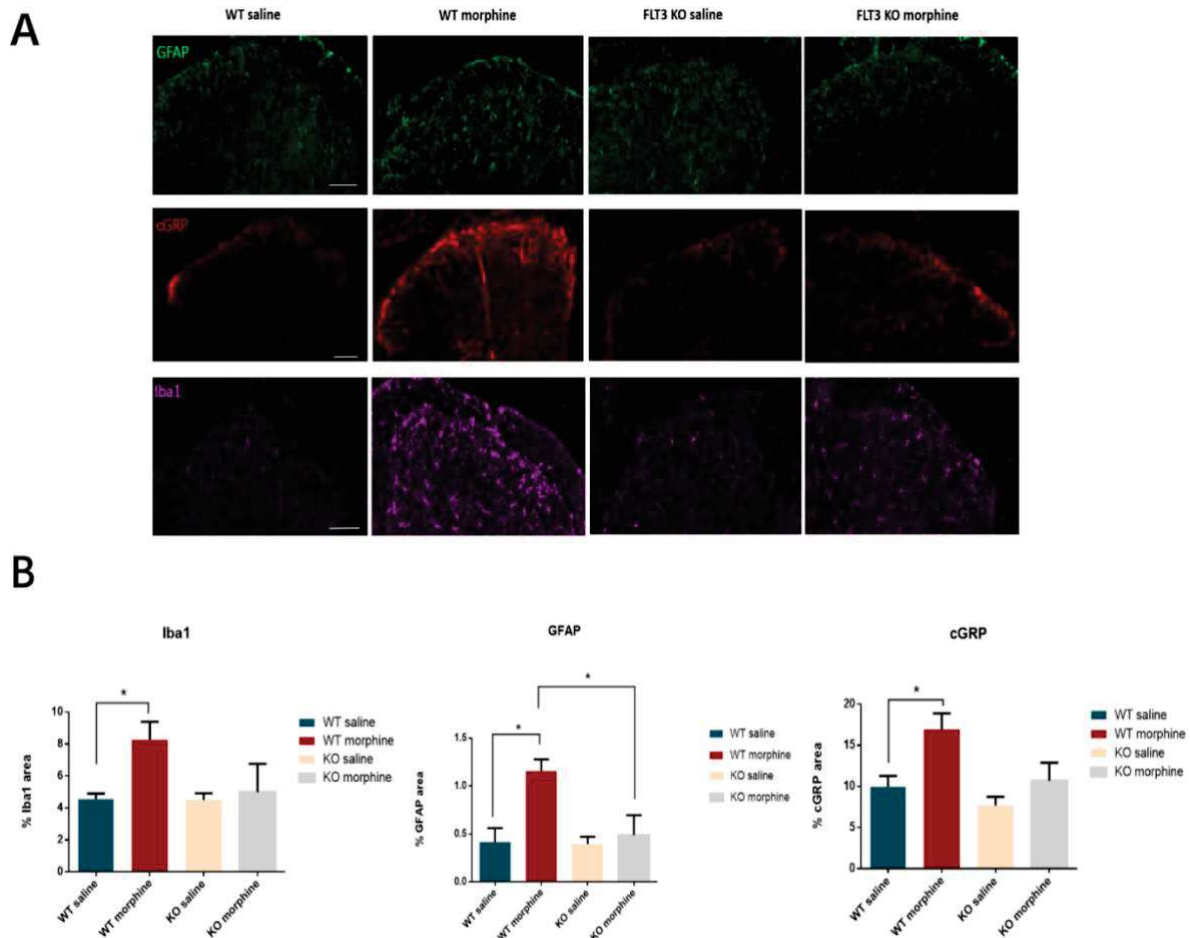


Figure 74. Le blocage de FLT3 prévient l'augmentation de l'expression des marqueurs moléculaires impliqués dans l'OIH au niveau de la ME, lors d'un traitement chronique à la morphine

RESULTATS

Les quantifications de la densité des différents marquages au niveau de la corne dorsale ont ainsi montré une augmentation d'Iba1, cGRP et GFAP suite à un traitement chronique chez les animaux FLT3^{+/+}, majoritairement prévenue par la délétion de FLT3.

2. Etude de l'implication des voies de signalisation dépendantes de FLT3 dans les processus de tolérance et d'OIH

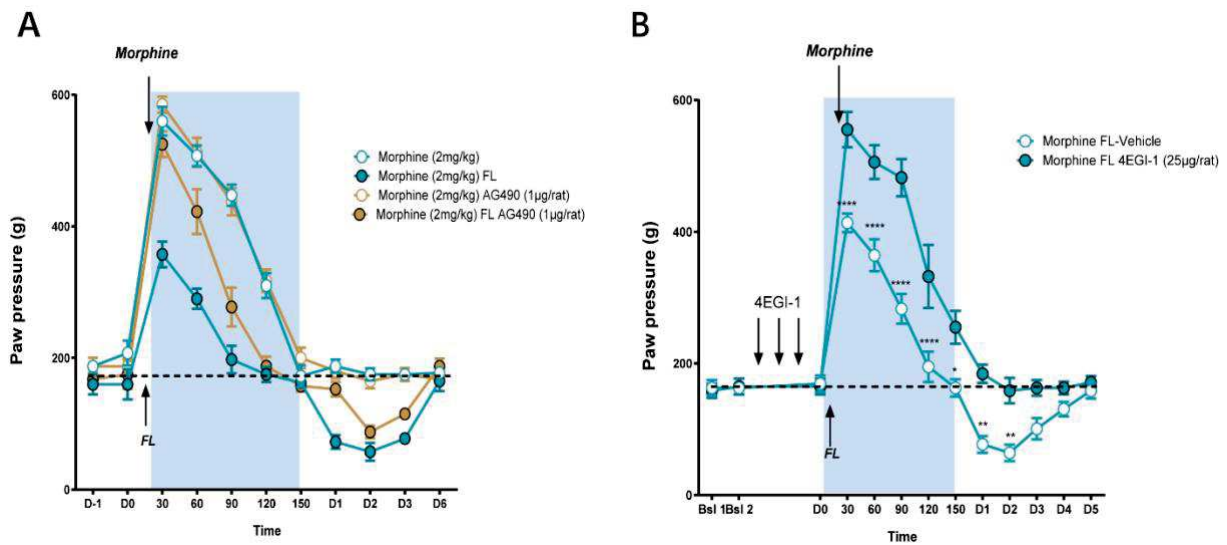


Figure 75. La voie Jak/STAT et le complexe EIF4F sont impliqués dans les processus de tolérance et OIH à la morphine induits par l'injection de FL

Enfin, les résultats du doctorant Antoine Jouvenel avaient montré l'implication de la voie PI3K/mTOR et MAPK/Erk dans les effets de tolérance et d'OIH induits dans notre modèle d'injection de FL et morphine. L'implication de la dernière voie étant associée à FLT3, la voie JAK/Stat était cependant inconnue. Ainsi, j'ai réalisé à l'aide du test de Randall-Selitto un suivi de l'effet analgésique de la morphine sur la sensibilité mécanique et étudié le développement d'une OIH les premiers jours suivant une injection de morphine chez des rats, associée ou non à une injection de FL et/ou d'AG490 pour inhiber la voie JAK/Stat (figure 75 A). De façon intéressante, le blocage de cette voie semble bloquer partiellement la mise en place d'une tolérance et d'OIH à la morphine lors de l'injection de FL, sans la bloquer contrairement. Enfin, le complexe EIF4F étant la voie de convergence des 3 voies de signalisation activées par FLT3, qui semblent donc impliquées dans l'OIH et la tolérance, j'ai également réalisé la même expérience que précédemment, cette fois après un blocage du complexe EIF4F après 3

RESULTATS

injections journalières de son inhibiteur 4EGI-1. De façon intéressante, les animaux injectés par 4EGI-1 ont retrouvé un effet analgésique de la morphine même en présence de FL, et n'ont pas développé d'OIH les jours suivants, comparé aux animaux contrôles (figure 75 B).

DISCUSSION

Comprendre les mécanismes impliqués dans la chronicisation douloureuse, afin de développer des stratégies thérapeutiques plus sûres et efficaces, représente encore aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique (Andrew et al., 2013). Parmi les stratégies thérapeutiques employées à l'heure actuelle, l'emploi de molécules ciblant les récepteurs opioïdiques reste l'une des plus couramment utilisées en clinique. Toutefois, une hétérogénéité importante quant à leur efficacité selon le type de douleur associée à de nombreux effets délétères tels que le développement d'une tolérance et d'une OIH limite leur usage (Rosenblum et al., 2008). Notre méconnaissance des acteurs et circuits impliqués dans les processus de sensibilisation, mais également de récupération, et de leurs altérations à l'origine du développement des douleurs chroniques, limite le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. En particulier, malgré une avancée importante ces dernières années pour caractériser l'expression des différents acteurs de l'EOS au sein du système somatosensoriel en condition physiologique, leur modulation précise en contexte pathologique reste majoritairement inconnue, ou parfois contradictoire entre les différentes études existantes (Corder et al., 2018 ; Al-Hasani & Bruchas, 2011). Un travail important reste ainsi à réaliser pour caractériser la modulation de l'EOS, mais aussi de façon plus générale, celle des différents acteurs des systèmes excitateur et inhibiteur de la nociception, en fonction du type de douleur.

Parmi ceux-ci, un nouvel acteur a été identifié ces dernières années par le laboratoire, le récepteur tyrosine kinase FLT3. Les différents travaux de l'équipe ont notamment démontré son implication dans les processus de chronicisation douloureuse, dans un contexte incisionnel ou de lésion nerveuse (Rivat et al., 2018). En particulier, son inhibition prévient le développement de douleurs chroniques neuropathiques ou postopératoires. Cependant, dans les modèles précliniques de douleur purement inflammatoire, son blocage n'a aucun impact dans le développement d'une chronicisation douloureuse. Si le laboratoire a démontré que lors de son activation, on observe la surexpression de différents acteurs pronociceptifs identifiés dans les douleurs chroniques neuropathiques et postopératoires, les mécanismes précis dépendant de FLT3 et participant au développement d'une douleur persistante restaient à être élucidés. De plus, l'implication de FLT3 dans le développement d'une tolérance et d'une OIH lors d'un traitement chronique de morphine, l'un des opiacés les plus couramment utilisés en clinique, a été démontré. Cette implication passe notamment par une interaction physique et fonctionnelle au niveau des neurones de premier ordre, entre FLT3 et le récepteur MOR. La présence de cette interaction dans un contexte de traitement aux opiacés, associée à l'observation d'une

récupération plus rapide lors de l'inhibition de FLT3 dans un contexte de douleur chronique neuropathique ou postopératoire, nous ont amené à émettre l'hypothèse d'une régulation de l'EOS par FLT3 dans la mise en place d'une douleur persistante. Cependant, cette régulation semble être spécifique d'un contexte physiopathologique étant donné que l'inhibition de FLT3 ne permet pas de bloquer l'ensemble des douleurs chroniques. Mes travaux de thèse avaient donc pour but de mieux comprendre l'interaction fonctionnelle que l'on pouvait avoir entre l'EOS et FLT3 dans différents contextes de douleur chronique permettant ainsi de mieux caractériser les acteurs de l'EOS impliqués dans les processus de récupération mais également de mieux comprendre les mécanismes moléculaires contrôlés par FLT3.

I. Implication du système opioïdérique endogène dans la récupération à la douleur chronique

L'objectif de cette partie de mon travail de thèse était d'identifier les acteurs de l'EOS impliqués dans la récupération de douleur chronique neuropathique, postopératoire, ou inflammatoire. En utilisant une approche pharmacologique permettant le blocage des différents récepteurs MOR, DOR et KOR, j'ai ainsi montré l'implication spécifique de l'EOS au niveau spinal dans les processus de récupération ; son blocage au niveau périphérique n'ayant eu aucun effet sur la phase de rémission après lésion. Il est important de noter que lors de cette étude, je me suis focalisé uniquement sur les récepteurs MOR, DOR, et KOR. En effet, le manque d'outils spécifiques et la méconnaissance bien plus grande existant à l'heure actuelle pour le récepteur NOR, nous avons en effet exclu l'étude de ce récepteur dans mon travail de thèse.

Mes résultats ont plus particulièrement montré l'implication spécifique du récepteur DOR dans les mécanismes de récupération à l'hypersensibilité mécanique induite par des douleurs neuropathiques ou postopératoires, son blocage prévenant entièrement la rémission des animaux dans ces modèles. De même, les processus de récupération à la douleur spontanée présente chez les animaux suite à la DI semblent être dépendants spécifiquement du récepteur DOR. En revanche, les approches pharmacologiques utilisées ne m'ont pas permis de conclure sur la localisation précise de l'EOS au niveau spinal participant à la récupération. En effet, étant donné l'expression des récepteurs opioïdériques au niveau des terminaisons centrales formées par les neurones sensoriels de premier ordre dans la corne dorsale de la ME, mais également leur expression dans certaines sous-populations d'interneurones spinaux, la récupération

induite par DOR pourrait s'effectuer au niveau pré- et/ou post-synaptique des synapses formées par les afférences primaires et interneurons spinaux (François et al., 2017). Afin d'élucider le rôle éventuel du récepteur DOR exprimé à la pré-synapse, de celui situé à la post-synapse, j'ai développé au cours de ma thèse une nouvelle lignée transgénique *Advilin-Cre : Oprd1^{fl/fl}*, n'exprimant plus le récepteur DOR spécifiquement au niveau des afférences primaires. Mes premiers résultats sur cette lignée, récemment obtenus, n'ont pas montré d'altération de la sensibilité mécanique et thermique, ou de la motricité, chez ces animaux naïfs ne présentant pas de lésions (résultats non montrés). Les prochaines expériences consisteront à réaliser une lésion nerveuse ou chirurgicale chez cette lignée de souris transgéniques permettant ainsi de discriminer de façon plus précise la localisation du récepteur DOR responsable de la rémission des animaux après lésion.

Cependant, si ce récepteur semble être suffisant et nécessaire dans ces mécanismes de récupération, mes résultats semblent suggérer également un rôle, néanmoins plus transitoire, du récepteur KOR, en particulier dans un temps plus proche du trauma à l'origine du développement d'une douleur chronique. Ainsi son blocage précoce, après une incision notamment, provoque un retard dans la rémission des animaux, sans la prévenir totalement. A l'inverse, son blocage à un temps plus éloigné n'aura que peu ou pas d'effet. De plus, le fait que le blocage du DOR seul suffise à prévenir totalement la récupération, même lorsque KOR n'a pas été inhibé, apporte des questionnements supplémentaires sur son rôle précis. Une des hypothèses pouvant expliquer ces résultats serait que l'activation de KOR au début de la récupération serait dépendante de celle de DOR. Comme cela a été évoqué lors de l'introduction, certaines études ont d'ailleurs suggéré la présence d'hétérodimères DOR-KOR impliqués dans ces processus de récupération, hypothèse supportée par leur profil d'expression similaires, notamment dans les sous-populations neuronales des afférences primaires (Jacobs et al., 2018). Il pourrait ainsi être intéressant d'étudier à l'avenir cette possible interaction entre les deux récepteurs, et de comprendre les mécanismes à l'origine des différences importantes dans leur durée d'activation lors de la phase de récupération.

Enfin, mes résultats ont démontré que le récepteur MOR était spécifiquement impliqué dans les mécanismes de récupération à l'hypersensibilité mécanique induite par une douleur chronique inflammatoire. Ces résultats confirment ainsi une différence dans l'implication des récepteurs opioïdiques dans les processus de récupération, en fonction du type de douleur chronique (Woolf, 2009 ; Scherrer et al., 2009). Néanmoins, ces différences ne sont pas observées uniquement en fonction du type de douleur chronique mais également en fonction de

la modalité sensorielle testée. En effet, mes résultats ont également montré que si MOR ne semble pas être impliqué dans la récupération à l'hypersensibilité mécanique dans un modèle de douleur postopératoire, il est en revanche responsable de la récupération à l'hypersensibilité thermique. Ces observations semblent ainsi être en accord avec les différentes études suggérant une implication plus spécifique de DOR dans la régulation des signaux mécanoréceptifs, et de MOR dans celle des signaux thermoréceptifs. Cette hypothèse semble être cependant au moins en partie inexacte, étant donné son rôle majeur dans la modulation de l'hypersensibilité mécanique dans un modèle de douleur inflammatoire. Une des hypothèses pour expliquer ces observations pourrait être une différence dans l'implication des fibres sensorielles impliquées dans l'hypersensibilité mécanique en fonction du type de douleur. Par exemple, les fibres A β mécanoréceptrices, dans lesquelles DOR est fortement exprimé à l'inverse de MOR, et qui sont dérégulées suite à des lésions nerveuses, pourraient être majoritairement responsables de l'hypersensibilité mécanique observée dans ce type de douleur, mais n'interviendrait pas ou peu dans l'hypersensibilité mécanique induite par une douleur inflammatoire. A l'inverse, les fibres A δ et C, exprimant majoritairement MOR et connues dans la régulation de signaux mécanonociceptifs ou thermo(noci)ceptifs, pourraient être responsables de l'hypersensibilité thermique observée dans les différents modèles, mais n'interviendrait que dans l'hypersensibilité mécanique induite par la composante inflammatoire. Cette hypothèse permettrait d'ailleurs d'expliquer les différences d'efficacité de la morphine, ciblant majoritairement MOR, et présentant une bien plus grande efficacité dans le traitement de l'hypersensibilité thermique, ou l'hypersensibilité mécanique des douleurs chroniques majoritairement inflammatoires, au contraire des douleurs neuropathiques (Martinez et al., 2010). Il pourrait ainsi être intéressant d'étudier par la suite les circuits et sous-populations neuronales modulés spécifiquement par DOR ou MOR dans la récupération en fonction du type de douleur chronique et de modalité. De même, ces différences pourraient également venir des voies de signalisation modulées par DOR ou MOR. Un résultat préliminaire obtenu lors de ma thèse montre notamment que ces récepteurs inhibent différentes isoformes de l'AC, et plusieurs études ont également montré que ces isoformes sont chacune impliquées dans différents contextes pathologiques (Kim et al., 2006). Une étude plus approfondie de cette modulation de différentes voies de signalisation par les récepteurs opioïdiques, en employant des outils plus spécifiques, pourraient ainsi permettre une meilleure caractérisation des mécanismes régulés par l'EOS selon le contexte pathologique.

A ce niveau du projet, nous n'avons pas étudié le rôle éventuel des différents ligands des récepteurs opioïdiques lors de la récupération de façon précise. Notre étude s'est limitée à mesurer l'expression génique des différents précurseurs en condition DI sur des cornes dorsales, à un temps où on avait déjà observé une augmentation d'expression de plusieurs marqueurs pronociceptifs. Nous avons pu retrouver l'augmentation de *Pdyn* déjà décrite dans la littérature (Zhu et al., 2006), mais sans mettre en évidence une régulation des autres précurseurs, ou même des récepteurs. Ces résultats pourraient ainsi suggérer qu'il n'y a pas de modulation au niveau transcriptomique des acteurs de l'EOS lors de l'induction d'une douleur postopératoire. Certaines études montrent pourtant un rôle important de ceux-ci dans l'activité fonctionnelle des récepteurs. Par exemple, comme cela a été décrit dans l'introduction, le blocage des interneurons inhibiteurs spinaux *Penk*, est capable d'empêcher la libération d'enképhaline au niveau de la pré-synapse, et donc d'empêcher l'activation du récepteur DOR, étant à l'origine d'une hypersensibilité mécanique, mais pas thermique. Cela constitue ainsi un mécanisme d'activation de DOR important, et ce blocage présente d'ailleurs des similitudes avec les effets que j'ai pu observer lors du blocage de DOR au niveau spinal. Il sera ainsi important par la suite de discriminer le rôle de ces ligands, dans les effets de récupération passant par DOR ou MOR.

Enfin, il aurait également été intéressant d'étudier la participation de l'EOS au niveau des structures supraspinales, dans ces processus de récupération. En effet, lors de cette étude, je me suis focalisé uniquement sur le SNP, et sur le SNC au niveau spinal. En effet, différentes études ayant montré un effet antinociceptif de l'activation de l'EOS directement au niveau de différentes structures supraspinales (Bodnar, 2016), il pourrait être intéressant d'étudier si le blocage des différents récepteurs dans les structures cérébrales permet ou non d'obtenir des résultats similaires, afin d'élucider la part des contrôles descendants dépendants des opioïdes dans les mécanismes de récupération.

II. Etude de l'interaction entre les récepteurs DOR et FLT3

L'implication du récepteur DOR dans la récupération à l'hypersensibilité mécanique et non dans l'hypersensibilité thermique, induites par une douleur neuropathique ou postopératoire, s'est révélée particulièrement intéressante. En effet, DOR semblerait contrôler les processus de récupération dans les conditions physiopathologiques dans lesquelles FLT3 semblerait être impliqué. J'ai donc premièrement vérifié l'implication du récepteur DOR dans

la récupération plus rapide induite par le blocage de FLT3. Mes résultats ont ainsi confirmé que suite à une inhibition génique ou pharmacologique de FLT3, la rémission précoce des animaux est bien dépendante du récepteur DOR. De plus, si un dimorphisme sexuel a été démontré dans plusieurs études dans les mécanismes et acteurs impliqués dans la chronicisation douloureuse (Sorge et al., 2015), et notamment des différences dans l'implication microgliale, cela ne semble pas être le cas pour les mécanismes impliquant FLT3 ou le récepteur DOR. En effet, j'ai pu observer des résultats similaires entre mâles et femelles dans le cas d'une douleur chronique postopératoire, dans les effets induits par le blocage de FLT3, et de l'implication du DOR. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que l'activation de FLT3, suite à une lésion nerveuse ou chirurgicale, favoriserait le développement d'une hypersensibilité mécanique persistante par un blocage du récepteur DOR exprimé au niveau central.

Dans un contexte de douleur chronique, on note plusieurs différences dans la régulation de l'EOS par FLT3, par rapport à un contexte d'OIH induite par un traitement chronique de morphine. Dans ce dernier cas, c'est une régulation du récepteur MOR par FLT3 au sein du SNP qui semblerait être à l'origine de l'OIH. Le laboratoire a d'ailleurs démontré que lors d'un traitement chronique à la morphine, on observe un changement de l'expression de FLT3 au sein des sous-populations neuronales des afférences primaires. En particulier, une augmentation de l'expression de FLT3 dans les sous-populations exprimant MOR a été montrée. Ces différences de modulation des récepteurs opioïdiques en fonction du contexte pathologique pourraient ainsi dépendre des neurones dans lesquels FLT3 est exprimé. En revanche, les mécanismes à l'origine d'un changement d'expression de FLT3 lors d'un traitement aux opiacés restent encore inconnus à l'heure actuelle. De plus, si nous avons montré que dans ce contexte les effets de FLT3 passent par une interaction physique avec MOR, à l'origine d'une activation de différentes voies de signalisation impliquées dans l'OIH, et notamment les voies AMPc, Erk et mTOR, les mécanismes d'interaction entre DOR et FLT3 restaient à être élucidés.

Dans la continuité de mon travail, je me suis donc intéressé à caractériser cette interaction entre DOR et FLT3. Pour cela, la première étape a été de mesurer un taux d'expression d'ARNm des différents acteurs de l'EOS en phase d'hypersensibilité à la douleur postopératoire chez des animaux exprimant ou non FLT3. Cependant, l'analyse effectuée sur l'entièreté de la corne dorsale de plusieurs animaux, ou au niveau des DRGs L4 ipsilatéraux à la seconde incision, n'a pas révélé de modifications significatives des récepteurs et ligands de l'EOS entre les animaux exprimant ou non FLT3. Comme décrit plus haut, cela pourrait suggérer une absence de modifications de l'EOS au niveau transcriptomique dans les mécanismes de

chronicisation à la douleur postopératoire, dépendantes ou non de FLT3. Cependant, une autre explication pourrait être que cette modulation de l'EOS ne soit présente que dans certaines sous-populations, et que notre analyse ne soit pas assez affine pour faire ressortir ces modifications transcriptomiques. Le développement de notre lignée *flt3*-Cre : Ribotag pourra nous permettre de palier en partie à ce possible biais. Un tag HA nous permettra de réaliser une immunoprécipitation de ces cellules FLT3-positives, notamment au niveau de la corne dorsale, afin d'effectuer sur celles-ci une analyse des transcrits de l'EOS. Il sera ainsi intéressant de voir non seulement une co-expression des différents acteurs de l'EOS au niveau de leur ARNm avec FLT3, et d'étudier d'éventuelles modulation de leur expression en condition de douleur chronique. Au niveau des DRGs en revanche, la quantité de matériel disponible est un facteur assez limitant, puisque seul le DRG L4 semble être impliqué dans le modèle incisionnel. Afin de réaliser une analyse spécifique des sous-populations exprimant FLT3, des techniques différentes, telles que l'analyse en « single-cell », devront être envisagées. Une autre alternative serait d'utiliser le modèle de douleur neuropathique afin de s'affranchir de cette limitation, comme cela a été le cas pour les expériences d'imagerie calcique sur culture de DRGs.

En parallèle de cette étude comportementale, différentes expériences ont été effectuées pour déterminer la localisation de l'interaction entre DOR et FLT3. En particulier, si les effets de DOR semblent s'effectuer au niveau central, et notamment au niveau de la ME, les expériences *in vivo* ne permettaient pas de conclure sur un effet au niveau pré- ou post-synaptique, qui pourrait nous renseigner sur la présence d'une interaction entre les deux récepteurs au niveau des neurones sensoriels de premier ordre, ou des neurones spinaux. Pour répondre à cela, la première approche utilisée a été l'emploi d'imagerie calcique sur des cultures de DRGs issus d'animaux en condition de douleur neuropathique afin d'étudier une possible interaction fonctionnelle entre DOR et FLT3 au niveau des corps cellulaires des neurones sensoriels du DRG. D'après les résultats de ces expériences, il semblerait qu'au niveau des neurones sensoriels, il y ait des modifications de l'activité fonctionnelle du DOR, illustrées par une perte des effets inhibiteurs de son agoniste, le SNC80, du côté ipsilatéral à la lésion nerveuse. L'inhibition génique ou pharmacologique de FLT3 permettrait de restaurée les effets inhibiteurs de l'agoniste DOR. Les résultats complémentaires *in vivo* obtenus sur le modèle postopératoire et neuropathique semblent confirmer cette restauration d'un effet analgésique d'un agoniste DOR après le blocage de FLT3, bien que les injections ne soient pas spécifiques du SNP. Cependant, ces résultats d'imagerie calcique apportent également un questionnement par rapport aux résultats obtenus *in vivo* démontrant une implication spécifique du récepteur

DISCUSSION

DOR au niveau central. La présence d'une modulation de l'activité fonctionnelle directement au niveau du DRG pourrait ainsi être témoin d'une modulation de son expression dans les neurones sensoriels primaires, impactant son rôle fonctionnel à la pré-synapse. Cela pourrait donc également sous-tendre un rôle du DOR pré-synaptique dans les effets observés *in vivo*. En revanche, l'implication du FLT3 périphérique avait déjà été montrée par le laboratoire dans les mécanismes de douleur postopératoire ; son blocage dans les afférences primaires par l'administration d'un anticorps ne passant pas la barrière hémato-encéphalique permettant de retrouver les mêmes effets que lors de son inhibition génique dans l'entièreté de l'organisme (Annexe I, figure 6). Aussi, afin d'étudier plus en détail cette modulation périphérique, une collaboration est en cours avec l'équipe de Patrick Delmas à Marseille, dans le but d'étudier l'excitation neuronale *ex-vivo* sur des préparations nerf-peau issues d'animaux en condition de douleur neuropathique, et l'influence de l'activation du récepteur DOR en présence ou non de FLT3 sur cette excitation neuronale. En complément des expériences d'imagerie calcique, cette étude apportera des informations importantes sur une éventuelle interaction des deux récepteurs au niveau des terminaisons périphériques. De plus, une seconde collaboration avec Perrine Inquimbert et Sylvain Hugel dans l'équipe de Rémy Schlichter à Strasbourg, permettra quant à elle de discriminer de façon plus précise le rôle du DOR pré- et post-synaptique au niveau spinal dans la modulation de l'hyperexcitabilité neuronale induite par la douleur chronique neuropathique. Plus particulièrement, un protocole de « paired-pulse » consistant à stimuler les afférences primaires en présence ou non d'un agoniste DOR et de mesurer la fréquence et l'amplitude des courants excitateurs post-synaptiques au niveau des couches profondes de tranches de moelle épinière, en présence ou non de FLT3.

Grâce aux différents outils développés et mis en place au cours de ma thèse (RNAscope pour marquer l'ARNm de *Flt3* ou *Oprd1*, lignée *Flt3-Cre* : Ribotag, stratégies virales), un travail de caractérisation de l'expression de ces deux récepteurs au sein du système somatosensoriel, et leur éventuelle co-localisation, est en cours de réalisation. Cette étude devrait nous permettre d'étudier les sous-populations neuronales exprimant chacun de ces récepteurs apportant ainsi de nombreuses informations sur les mécanismes mis en jeu dans leur interaction. Mes résultats préliminaires suggèrent, en accord avec les data de transcriptomique réalisée par Ernfors et Linnarsson, qu'au niveau du DRG, DOR et FLT3 sont exprimés dans des sous-populations neuronales différentes, que ce soit en condition physiologique ou pathologique (usoskin et al., 2014). Ainsi, cela complexifie les résultats obtenus par imagerie calcique, et suggère un type d'interaction entre FLT3 et DOR différent de celui que nous avons

DISCUSSION

déjà caractérisé entre FLT3 et MOR. En effet, cette interaction, si elle est bien présente au niveau périphérique, ne serait pas une interaction physique.

Ces résultats montrent également que les projections d'afférences primaires FLT3-positives semblent former des connexions au niveau des couches profondes de la corne dorsale, et majoritairement avec des interneurons inhibiteurs. Au niveau post-synaptique, le récepteur semble exprimé à la fois au niveau des populations excitatrices et inhibitrices de la ME. De plus, au niveau spinal, il semblerait qu'il y ait une expression de l'ARNm de DOR dans les cellules FLT3-positives en condition physiologique. De façon intéressante, cette co-expression semble en grande partie perdue dans un contexte postopératoire. Cela pourrait suggérer une modulation directe de l'expression de DOR par FLT3, au sein des mêmes cellules spinales. En revanche, à ce stade de notre étude il est difficile de donner une explication quant à la signification de l'altération de la co-expression du DOR et FLT3 en condition pathologique. Les expériences d'électrophysiologie en cours de réalisation seront donc d'autant plus importantes pour élucider la localisation précise de l'interaction des 2 récepteurs. En parallèle, le développement d'une dernière lignée transgénique conditionnelle *Flt3-Cre : Oprd1^{fl/fl}* permettant de bloquer l'expression du DOR dans l'ensemble des neurones exprimant FLT3 devrait nous renseigner sur l'importance de la co-expression des deux récepteurs, sans préciser toutefois le niveau de la localisation, dans la chronicisation douloureuse. La première caractérisation comportementale de ces souris indique que les seuils de sensibilité thermique, mécanique, ainsi que l'activité locomotrice ne sont pas altérés. Prochainement, l'étude de la récupération de ces animaux suite à l'induction d'une douleur postopératoire ou neuropathique sera étudiée, en présence ou non de BDT001 pour inhiber FLT3. Si une perte des effets bénéfiques d'un traitement chronique de BDT001 est observée sur ces souris, cela nous confirmera la présence d'une interaction intercellulaire entre DOR et FLT3.

Enfin, grâce à cette lignée et les différentes approches développés pour marquer DOR et FLT3, il pourra également être intéressant d'étudier leur éventuelle interaction au niveau supraspinal dans les structures de la matrice douloureuse. En effet, la caractérisation de l'expression du DOR dans ces structures cérébrales disponible dans la littérature, associée à la caractérisation de l'expression supraspinales de FLT3 que j'ai pu effectuer lors de ma thèse, suggère leur expression commune dans plusieurs structures de la matrice douloureuse. De plus, une étude a récemment établi un interactome du récepteur DOR en condition physiologique, sur des homogénats de cerveau (Degrandmaison et al., 2020). Parmi les protéines identifiées dans cet interactome, on retrouve de façon très intéressante le récepteur FLT3. Étudier les conséquences sur la composante émotionnelle (et notamment la présence d'une

anxiodépression), de la délétion de DOR dans les neurones FLT3-positifs, sera donc très intéressant, que l'on observe un effet ou non sur la composante sensorielle après délétion de FLT3.

III. Etude des mécanismes de la sensibilisation latente

En complément de la caractérisation de l'EOS dans les mécanismes de récupération de la douleur, je me suis également intéressé à leur rôle dans la mise en place d'une sensibilisation latente. En effet, comme cela a été décrit plus haut, les systèmes inhibiteurs jouent un rôle important dans la mise en place d'une allostasie, à l'origine d'une vulnérabilité à la douleur à long terme et pouvant favoriser la chronicisation douloureuse. Mes résultats ont également confirmé l'activation au long terme des récepteurs opioïdiques responsables de la récupération des différents types de douleur chronique, participant ainsi à la mise en place d'un état allostatique suite à la rémission complète des animaux. Ainsi, dans les douleurs postopératoires, le récepteur DOR reste activé au long terme, même un mois après rémission totale des animaux. Son blocage suffit à révéler une hypersensibilité mécanique similaire à celle provoquée directement par l'incision, démontrant également l'activation persistante du système excitateur de la douleur, responsable de cette hypersensibilité. A l'inverse, l'inhibition d'un des acteurs pronociceptifs des douleurs postopératoires, à savoir la microglie, suffit à engendrer une hyposensibilité mécanique chez les animaux, démontrant également l'activation persistante du système inhibiteur. Enfin, dans les douleurs inflammatoires, mes résultats sont concordants avec ce qui a été publié dans la littérature, à savoir la présence d'une activation persistante du récepteur MOR responsable en partie d'une sensibilisation latente.

De manière intéressante, l'inhibition de FLT3 ne prévient pas le développement d'une sensibilisation latente engendrée par une lésion nerveuse ou une incision. Si cela concorde avec la démonstration d'une modulation des acteurs du système inhibiteur par FLT3 dans les douleurs chroniques, son inhibition résultant ainsi en une activation plus rapide de ce système inhibiteur, cela complexifie également l'interprétation de certains résultats obtenus lors de ce projet, et d'autres résultats du laboratoire. Notamment, l'équipe a démontré que l'activation microgliale importante observée au niveau spinal suite à une double incision (Annexe I, figure 2), était fortement réduite chez les animaux n'exprimant pas FLT3 (Annexe I, figure II). Cela pourrait ainsi suggérer une modulation directe ou indirecte des acteurs du système excitateur par FLT3. De même, l'inhibition microgliale par la minocycline pendant la phase de

sensibilisation latente chez des animaux n'exprimant pas FLT3 suffit à provoquer une analgésie chez ces animaux, suggérant ainsi un rôle de la microglie également chez ces animaux, alors que nous n'avons pu observer aucune activation de celle-ci suite au blocage de FLT3. De même, plusieurs marqueurs pronociceptifs surexprimés suite à une lésion nerveuse retrouvent un taux d'expression physiologique suite à la délétion de FLT3 (Rivat et al., 2018). Pourtant, dans ces différents modèles, la mise en place d'une sensibilisation latente suggère malgré tout une suractivation toujours présente du système excitateur chez les animaux n'exprimant pas FLT3. Un travail reste ainsi à faire afin d'identifier plus en détails les acteurs pronociceptifs qui restent activés à long terme pouvant expliquer le développement des hypersensibilités à la douleur après le blocage de l'EOS même après inhibition du récepteur FLT3.

Enfin, dans le cadre de la caractérisation de la sensibilisation latente suite à la douleur postopératoire, nous nous sommes également intéressé aux conséquences de celles-ci sur le développement de comorbidités associées à la douleur chronique, et notamment dans la mise en place d'une vulnérabilité à l'addiction. En effet, de manière générale, la mise en place d'une vulnérabilité à l'addiction passerait également par le développement d'une allostasie dans les structures supraspinales de la récompense, associée (de manière similaire à la douleur chronique) à divers facteurs de risques et dépendants de l'histoire du patient. Notamment, le système de récompense se retrouve suractivé, tandis que le système opposant (en anglais, « anti-reward system ») est inhibé, résultant en une vulnérabilité de l'organisme et une réponse exacerbée, lors de la consommation de substances possédant des effets renforçants par exemple. Etant donné la présence d'une sensibilisation au niveau supraspinal des structures de la matrice douloureuse, dont plusieurs sont communes au système de récompense, il est ainsi suggéré que des mécanismes communs d'allostasie à la douleur et à l'addiction se mettent en place chez les patients douloureux chroniques (Elman & Borsook, 2016). Dans notre modèle, nous avons ainsi voulu étudier si la sensibilisation latente présente au niveau des systèmes excitateurs et inhibiteurs de la douleur, était également présente au niveau du « reward » et « anti-reward » system. Grâce au test du CPP, j'ai pu observer que même un mois après rémission complète des animaux, et donc après disparition complète de l'hypersensibilité et des comportements d'anxiodépression, ceux ayant développé une douleur chronique postopératoire développaient une préférence de place conditionnée à une faible dose de morphine, au contraire des animaux naïfs. Cette vulnérabilité aux effets motivationnels de la morphine pourrait ainsi être associée à la présence d'une vulnérabilité à l'addiction. De façon intéressante, une variabilité a pu être observée entre les différents individus, certains démontrant à l'inverse une résistance à ces

effets. Ces observations pourraient mener à différentes études visant à cibler les mécanismes impliqués dans la mise en place d'une résistance ou une vulnérabilité en fonction des individus, aux implications translationnelles importantes. En effet, pouvoir identifier des biomarqueurs associés à une vulnérabilité à l'addiction et notamment suite à la mise en place d'une allostase après une douleur chronique, pourrait aider à la mise en place de traitements spécifiques en fonction des patient, et limiter les risques de développer une dépendance aux traitements, l'une des causes majeures de la crise actuelle des opioïdes par exemple. Pour finir, étudier le rôle du récepteur DOR au sein du laboratoire, et une éventuelle implication de FLT3 dans ces effets, pourrait également se révéler intéressant. En effet, comme cela avait été évoqué lors de l'introduction, il semblerait que DOR soit en grande partie responsable de ces effets de préférence de place conditionnée pour la morphine ; sa délétion prévenant ces effets (Jiang et al., 2021). Ainsi, réaliser ces expériences sur les souris *Flt3* KO présentant une délétion génique totale de FLT3, et les souris *Flt3-Cre : Oprd1^{fl/fl}*, pourrait apporter des éléments supplémentaires pour caractériser leur interaction. En particulier, si déléter FLT3 permet de rétablir un rôle fonctionnel du DOR au niveau spinal résultant en un effet antinociceptif sur la composante spinale, les conséquences au niveau supraspinal restent inconnues. Ainsi, si la présence d'une préférence de place aggravée pour la morphine est observée chez les souris *Flt3* KO, cela pourrait suggérer également une modulation positive de DOR au niveau supraspinal. A l'inverse, si une perte des effets motivationnels induits par la morphine est observée chez les animaux souris *Flt3-Cre : Oprd1^{fl/fl}*, cela pourrait également suggérer la présence d'une interaction intracellulaire présente en supraspinal entre DOR et FLT3 qui participerait à la composante émotionnelle et au développement de certaines comorbidités associées à la douleur chronique. Ainsi, le récepteur DOR au niveau supraspinal étant connu pour avoir des effets anxiolytiques et antidépresseurs, il pourrait être intéressant d'étudier si la perte des comportements anxiodépresseurs observée chez les souris *FLT3^{-/-}* n'est due qu'à une hypersensibilité sensorielle réduite, ou si une modulation de l'activité du DOR supraspinal pourrait être impliquée dans ces effets.

IV. Limitations expérimentales

Il est important d'évoquer les limitations expérimentales rencontrées lors de ma thèse, et notamment dans le cadre des expérimentations *in vivo*. En effet, celles-ci s'appuient majoritairement sur l'emploi de stratégies pharmacologiques pour inhiber les récepteurs opioïdiques, ainsi que le test du Von Frey. Comme cela a déjà été évoqué dans les résultats, ce test consistant à évaluer un réflexe chez l'animal, l'intégration supraspinale des différentes composantes de la douleur, pourtant importante dans la modulation du signal nociceptif, n'est pas forcément prise en compte. De plus, il peut exister une certaine subjectivité dépendante de l'expérimentateur, ou des différences dans la procédure lors de l'application des filaments au niveau de la voute plantaire de l'animal. Associées aux stratégies pharmacologiques, parfois critiquées au sein de la littérature par leur manque de spécificité en fonction de la dose employée, cela peut être l'une des causes de divergence dans les résultats obtenus en fonction des laboratoires. Notamment, une étude sortie en 2019 ayant réalisée une étude similaire à celle que j'ai pu réaliser au cours de ma thèse, sur l'implication des récepteurs aux opioïdes impliqués dans la sensibilisation latente suite à une incision, a obtenue des résultats contradictoires à ceux observés au cours de ma thèse (Custodio-Patsey et al., 2019). En effet, cette étude suggère que les récepteurs MOR et KOR, et non DOR, seraient impliqués dans la sensibilisation latente chez ces animaux, avec la présence d'un dimorphisme sexuel, où KOR serait plus particulièrement impliqué chez la femelle. Une des différences entre cette étude et mon projet qui aurait pu expliquer ces divergences est l'emploi d'un modèle de simple incision, ou de double incision respectivement. J'ai cependant étudié l'implication de l'EOS dans la récupération et la sensibilisation latente après une simple incision, avec des résultats similaires à ce que j'ai pu observer lors d'une double incision (résultats non montrés). L'autre différence majeure porte notamment sur la durée d'application des filaments, chaque filament étant appliqué 5 secondes au maximum dans le protocole établi dans cette étude, contre 2 secondes au maximum dans les protocoles établis par le laboratoire afin de garantir qu'en cas de retrait de la patte de l'animal, celui-ci est bien dû à un réflexe. Ces divergences montrent ainsi les biais apportés possiblement par les tests de Von Frey. Cependant, dans le cadre de la récupération, la mise en place d'un protocole de CPP me permettant d'étudier la douleur spontanée, de façon indépendante à l'évaluation de l'expérimentateur et sans stimuli tend à conforter l'implication des DOR dans les processus de récupération après une douleur postopératoire. De même, le développement de nouvelles lignées transgéniques, et l'emploi de techniques complémentaires telles que

l'électrophysiologie, nous permettra de renforcer les observations faites sur l'implication du DOR dans la récupération, suite à une lésion nerveuse ou une incision.

V. Conclusion générale

Les résultats obtenus au cours de mon projet de thèse ont ainsi pu apporter plusieurs éléments de réponse quant aux mécanismes induits par FLT3 lors de la chronicisation douloureuse. Plus particulièrement, j'ai pu démontrer que la récupération plus rapide des animaux observée lors du blocage du récepteur FLT3, au niveau de l'hypersensibilité mécanique induite par des douleurs neuropathiques ou postopératoires, passe par la restauration de l'activité fonctionnelle du récepteur DOR. De plus, le manque d'efficacité de l'inhibition de FLT3 au niveau de l'hypersensibilité thermique, ou de l'hypersensibilité mécanique induite par des douleurs inflammatoires, s'explique par une différence de l'implication des récepteurs opioïdiques dans la récupération, selon les modalités et types de douleur chronique. Ainsi, ces différentes observations suggèrent la présence d'une interaction spécifique entre DOR et FLT3 dans la persistance douloureuse suite à une lésion nerveuse ou une chirurgie. Ces résultats, associés aux études précédemment réalisées par le laboratoire, démontrent ainsi l'intérêt thérapeutique que pourrait représenter FLT3 dans le traitement de certains types de douleurs chroniques, où son inhibition pourrait restaurer une activité endogène du récepteur aux opioïdes DOR, en évitant éventuellement certains effets secondaires observés lors de son activation directe par des opiacés exogènes. Cependant, il reste à mieux caractériser l'interaction entre DOR et FLT3 afin de mieux comprendre le niveau d'interaction (directe ou indirecte) entre les 2 récepteurs. Le développement de plusieurs lignées transgéniques et de nouveaux outils spécifiques au cours de ma thèse, ainsi que les différentes collaborations, nous permettront ainsi d'approfondir cette caractérisation.

BIBLIOGRAPHIE

Aley, K. O., Robert O. Messing, Daria Mochly-Rosen, et Jon D. Levine. 2000. « Chronic Hypersensitivity For Inflammatory Nociceptor Sensitization Mediated by the ϵ Isozyme of Protein Kinase C ». *The Journal of Neuroscience* 20 (12): 4680-85.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-12-04680.2000>.

Alhadeff, Amber L., Zhenwei Su, Elen Hernandez, Michelle L. Klima, Sophie Z. Phillips, Ruby A. Holland, Caiying Guo, Adam W. Hantman, Bart C. De Jonghe, et J. Nicholas Betley. 2018. « A Neural Circuit for the Suppression of Pain by a Competing Need State ». *Cell* 173 (1): 140-152.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.057>.

Al-Hasani, Ream, et Michael R. Bruchas. 2011. « Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior ». *Anesthesiology* 115 (6): 1363-81.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318238bba6>.

Al-Khater, Khulood M., et Andrew J. Todd. 2009. « Collateral Projections of Neurons in Laminae I, III, and IV of Rat Spinal Cord to Thalamus, Periaqueductal Gray Matter, and Lateral Parabrachial Area ». *The Journal of Comparative Neurology* 515 (6): 629-46.
<https://doi.org/10.1002/cne.22081>.

Alles, Sascha R. A., Max A. Odem, Van B. Lu, Ryan M. Cassidy, et Peter A. Smith. 2021. « Chronic BDNF Simultaneously Inhibits and Unmasks Superficial Dorsal Horn Neuronal Activity ». *Scientific Reports* 11 (1): 2249. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81269-6>.

Almeida, Tatiana F., Suely Roizenblatt, et Sergio Tufik. 2004. « Afferent Pain Pathways: A Neuroanatomical Review ». *Brain Research* 1000 (1-2): 40-56.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.10.073>.

Andrew, R., Sheena Derry, Rod S. Taylor, Sebastian Straube, et Ceri J. Phillips. 2014. « The Costs and Consequences of Adequately Managed Chronic Non-Cancer Pain and Chronic Neuropathic Pain ». *Pain Practice* 14 (1): 79-94. <https://doi.org/10.1111/papr.12050>.

Bäckryd, Emmanuel, Markus Heilig, et Mikael Hoffmann. 2021. « Opioid Availability Statistics from the International Narcotics Control Board Do Not Reflect the Medical Use of Opioids: Comparison with Sales Data from Scandinavia ». *Scandinavian Journal of Pain* 21 (4): 696-706. <https://doi.org/10.1515/sjpain-2021-0023>.

Bai, Ling, Brendan P. Lehnert, Junwei Liu, Nicole L. Neubarth, Travis L. Dickendesher, Pann H. Nwe, Colleen Cassidy, C. Jeffery Woodbury, et David D. Ginty. 2015. « Genetic Identification of an Expansive Mechanoreceptor Sensitive to Skin Stroking ». *Cell* 163 (7): 1783-95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.060>.

Bannister, Kirsty, et A. H. Dickenson. 2017. « The Plasticity of Descending Controls in Pain: Translational Probing: Top-down Pain Processing and Monoaminergic Imbalances ». *The Journal of Physiology* 595 (13): 4159-66. <https://doi.org/10.1113/JP274165>.

Bao, Lan, Shan-Xue Jin, Chen Zhang, Li-Hua Wang, Zhen-Zhong Xu, Fang-Xiong Zhang, Lie-Chen Wang, et al. 2003. « Activation of Delta Opioid Receptors Induces Receptor Insertion and Neuropeptide Secretion ». *Neuron* 37 (1): 121-33.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01103-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01103-0).

- Bardin, Laurent. 2011. « The Complex Role of Serotonin and 5-HT Receptors in Chronic Pain ». *Behavioural Pharmacology* 22 (5 and 6): 390-404. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e328349aae4>.
- Bardoni, Rita, Vivianne L. Tawfik, Dong Wang, Amaury François, Carlos Solorzano, Scott A. Shuster, Papiya Choudhury, et al. 2014. « Delta Opioid Receptors Presynaptically Regulate Cutaneous Mechanosensory Neuron Input to the Spinal Cord Dorsal Horn ». *Neuron* 81 (6): 1312-27. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.044>.
- Barkai, Omer, Stephanie Puig, Shaya Lev, Ben Title, Ben Katz, Luba Eli-Berchoer, Howard B. Gutstein, et Alexander M. Binshtok. 2019. « Platelet-Derived Growth Factor Activates Nociceptive Neurons by Inhibiting M-Current and Contributes to Inflammatory Pain ». *Pain* 160 (6): 1281-96. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001523>.
- Barthas, Florent, Muris Humo, Ralf Gilsbach, Elisabeth Waltisperger, Meltem Karatas, Samuel Leman, Lutz Hein, et al. 2017. « Cingulate Overexpression of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 as a Key Factor for Depression ». *Biological Psychiatry* 82 (5): 370-79. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.01.019>.
- Basbaum, Allan I., et Howard L. Fields. 1984. « Endogenous Pain Control Systems: Brainstem Spinal Pathways and Endorphin Circuitry ». *Annual Review of Neuroscience* 7 (1): 309-38. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.07.030184.001521>.
- Basso, Lilian, Reem Aboushousha, Churmy Yong Fan, Mircea Iftinca, Helvira Melo, Robyn Flynn, Francina Agosti, et al. 2019. « TRPV1 Promotes Opioid Analgesia during Inflammation ». *Science Signaling* 12 (575): eaav0711. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aav0711>.
- Bessière, Baptiste, Philippe Richebé, Emilie Laboureyras, Jean-Paul Laulin, Angelo Contarino, et Guy Simonnet. 2007. « Nitrous Oxide (N₂O) Prevents Latent Pain Sensitization and Long-Term Anxiety-like Behavior in Pain and Opioid-Experienced Rats ». *Neuropharmacology* 53 (6): 733-40. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.08.003>.
- Bodnar, Richard J. 2018. « Endogenous Opiates and Behavior: 2016 ». *Peptides* 101 (mars): 167-212. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.01.011>.
- Borsook, D., C. Linnman, V. Faria, A.M. Strassman, L. Becerra, et I. Elman. 2016. « Reward Deficiency and Anti-Reward in Pain Chronification ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 68 (septembre): 282-97. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.05.033>.
- Bouali-Benazzouz, Rabia, Marc Landry, Abdelhamid Benazzouz, et Pascal Fossat. 2021. « Neuropathic Pain Modeling: Focus on Synaptic and Ion Channel Mechanisms ». *Progress in Neurobiology* 201 (juin): 102030. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2021.102030>.
- Brauchi, S. 2006. « A Hot-Sensing Cold Receptor: C-Terminal Domain Determines Thermosensation in Transient Receptor Potential Channels ». *Journal of Neuroscience* 26 (18): 4835-40. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5080-05.2006>.

Brown, A. G. 1982. « REVIEW ARTICLE THE DORSAL HORN OF THE SPINAL CORD ». *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 67 (2): 193-212. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1982.sp002630>.

Cabañero, David, Ana Campillo, Evelyne Célérier, Asunción Romero, et Margarita M. Puig. 2009. « Pronociceptive Effects of Remifentanyl in a Mouse Model of Postsurgical Pain ». *Anesthesiology* 111 (6): 1334-45. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181bfab61>.

Cahill, Catherine M., Sarah V. Holdridge, Shiwei (Steve) Liu, Lihua Xue, Claire Magnussen, Edmund Ong, Patrick Grenier, Anne Sutherland, et Mary C. Olmstead. 2020. « Delta Opioid Receptor Activation Modulates Affective Pain and Modality-specific Pain Hypersensitivity Associated with Chronic Neuropathic Pain ». *Journal of Neuroscience Research*, juillet, jnr.24680. <https://doi.org/10.1002/jnr.24680>.

Cain, David M., Sergey G. Khasabov, et Donald A. Simone. 2001. « Response Properties of Mechanoreceptors and Nociceptors in Mouse Glabrous Skin: An In Vivo Study ». *Journal of Neurophysiology* 85 (4): 1561-74. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.4.1561>.

Campillo, Ana, David Cabañero, Asunción Romero, Paula García-Nogales, et Margarita María Puig. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.01.059>.

Campos, Carlos A., Anna J. Bowen, Carolyn W. Roman, et Richard D. Palmiter. 2018. « Encoding of Danger by Parabrachial CGRP Neurons ». *Nature* 555 (7698): 617-22. <https://doi.org/10.1038/nature25511>.

Caston, Rose M., Elliot H. Smith, Tyler S. Davis, et John D. Rolston. 2020. « The Cerebral Localization of Pain: Anatomical and Functional Considerations for Targeted Electrical Therapies ». *Journal of Clinical Medicine* 9 (6): 1945. <https://doi.org/10.3390/jcm9061945>.

Caterina, Michael J., Tobias A. Rosen, Makoto Tominaga, Anthony J. Brake, et David Julius. 1999. « A Capsaicin-Receptor Homologue with a High Threshold for Noxious Heat ». *Nature* 398 (6726): 436-41. <https://doi.org/10.1038/18906>.

Ceko, Marta, Nevena Milenkovic, Philipp le Coutre, Jörg Westermann, et Gary R. Lewin. 2014. « Inhibition of C-Kit Signaling Is Associated with Reduced Heat and Cold Pain Sensitivity in Humans ». *Pain* 155 (7): 1222-28. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.03.010>.

Ceredig, Rhian Alice, Florian Pierre, Stéphane Doridot, Unai Alduntzin, Pierre Hener, Eric Salvat, Ipek Yalcin, Claire Gaveriaux-Ruff, Michel Barrot, et Dominique Massotte. 2020. « Peripheral Delta Opioid Receptors Mediate Formoterol Anti-allodynic Effect in a Mouse Model of Neuropathic Pain ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 12 (février): 324. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00324>.

Ceredig, Rhian Alice, Florian Pierre, Stéphane Doridot, Unai Alduntzin, Eric Salvat, Ipek Yalcin, Claire Gaveriaux-Ruff, Michel Barrot, et Dominique Massotte. 2018. « Peripheral Delta Opioid Receptors Mediate Duloxetine Antiallodynic Effect in a Mouse Model of

Neuropathic Pain ». *European Journal of Neuroscience* 48 (5): 2231-46.
<https://doi.org/10.1111/ejn.14093>.

Chakrabarti, Sumita, Annette Regec, et Alan R. Gintzler. 2005. « Biochemical Demonstration of Mu-Opioid Receptor Association with Gs α : Enhancement Following Morphine Exposure ». *Molecular Brain Research* 135 (1-2): 217-24.
<https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.12.016>.

Chan, Ken Y, Min J Jang, Bryan B Yoo, Alon Greenbaum, Namita Ravi, Wei-Li Wu, Luis Sánchez-Guardado, et al. 2017. « Engineered AAVs for Efficient Noninvasive Gene Delivery to the Central and Peripheral Nervous Systems ». *Nature Neuroscience* 20 (8): 1172-79.
<https://doi.org/10.1038/nn.4593>.

Chaplan, S.R., F.W. Bach, J.W. Pogrel, J.M. Chung, et T.L. Yaksh. 1994. « Quantitative Assessment of Tactile Allodynia in the Rat Paw ». *Journal of Neuroscience Methods* 53 (1): 55-63. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9).

Chen, Shu-Ping, Ya-Qun Zhou, Dai-Qiang Liu, Wen Zhang, Anne Manyande, Xue-Hai Guan, Yu-ke Tian, Da-Wei Ye, et Deeq Mohamed Omar. 2017. « PI3K/Akt Pathway: A Potential Therapeutic Target for Chronic Pain ». *Current Pharmaceutical Design* 23 (12): 1860-68.
<https://doi.org/10.2174/1381612823666170210150147>.

Chiang, Michael C., Eileen K. Nguyen, Martha Canto-Bustos, Andrew E. Papale, Anne-Marie M. Oswald, et Sarah E. Ross. 2020. « Divergent Neural Pathways Emanating from the Lateral Parabrachial Nucleus Mediate Distinct Components of the Pain Response ». *Neuron* 106 (6): 927-939.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.03.014>.

Choi, Seungwon, Junichi Hachisuka, Matthew A. Brett, Alexandra R. Magee, Yu Omori, Noor-ul-Aine Iqbal, Dawei Zhang, et al. 2020. « Parallel Ascending Spinal Pathways for Affective Touch and Pain ». *Nature* 587 (7833): 258-63. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2860-1>.

Chu Sin Chung, Paul, Annie Boehrer, Aline Stephan, Audrey Matifas, Grégory Scherrer, Emmanuel Darcq, Katia Befort, et Brigitte L. Kieffer. 2015. « Delta Opioid Receptors Expressed in Forebrain GABAergic Neurons Are Responsible for SNC80-Induced Seizures ». *Behavioural Brain Research* 278 (février): 429-34. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.029>.

Corder, G., S. Doolen, R. R. Donahue, M. K. Winter, B. L. Jutras, Y. He, X. Hu, et al. 2013. « Constitutive μ -Opioid Receptor Activity Leads to Long-Term Endogenous Analgesia and Dependence ». *Science* 341 (6152): 1394-99. <https://doi.org/10.1126/science.1239403>.

Corder, Gregory, Biafra Ahanonu, Benjamin F. Grewe, Dong Wang, Mark J. Schnitzer, et Grégory Scherrer. 2019. « An Amygdalar Neural Ensemble That Encodes the Unpleasantness of Pain ». *Science* 363 (6424): 276-81. <https://doi.org/10.1126/science.aap8586>.

Corder, Gregory, Daniel C. Castro, Michael R. Bruchas, et Grégory Scherrer. 2018. « Endogenous and Exogenous Opioids in Pain ». *Annual Review of Neuroscience* 41 (1): 453-73. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-061522>.

Corder, Gregory, Vivianne L Tawfik, Dong Wang, Elizabeth I Sypek, Sarah A Low, Jasmine R Dickinson, Chaudy Sotoudeh, et al. 2017. « Loss of μ Opioid Receptor Signaling in Nociceptors, but Not Microglia, Abrogates Morphine Tolerance without Disrupting Analgesia ». *Nature Medicine* 23 (2): 164-73. <https://doi.org/10.1038/nm.4262>.

Cordero-Erausquin, Matilde, Perrine Inquimbert, Rémy Schlichter, et Sylvain Hugel. 2016. « Neuronal Networks and Nociceptive Processing in the Dorsal Horn of the Spinal Cord ». *Neuroscience* 338 (décembre): 230-47. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.048>.

Coste, Bertrand, Jayanti Mathur, Manuela Schmidt, Taryn J. Earley, Sanjeev Ranade, Matt J. Petrus, Adrienne E. Dubin, et Ardem Patapoutian. 2010. « Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically Activated Cation Channels ». *Science* 330 (6000): 55-60. <https://doi.org/10.1126/science.1193270>.

Crook, Robyn J., Katharine Dickson, Roger T. Hanlon, et Edgar T. Walters. 2014. « Nociceptive Sensitization Reduces Predation Risk ». *Current Biology* 24 (10): 1121-25. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.043>.

Custodio-Patsey, Lilian, Renée R. Donahue, Weisi Fu, Joshua Lambert, Bret N. Smith, et Bradley K. Taylor. 2020. « Sex Differences in Kappa Opioid Receptor Inhibition of Latent Postoperative Pain Sensitization in Dorsal Horn ». *Neuropharmacology* 163 (février): 107726. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107726>.

Dado, Robert J., P. Y. Law, Horace H. Hoh, et Robert Elde. 1993. « Immunofluorescent Identification of a Delta (δ)-Opioid Receptor on Primary Afferent Nerve Terminals ». *NeuroReport* 5 (3): 341-44. <https://doi.org/10.1097/00001756-199312000-00041>.

Dahlhamer, James, Jacqueline Lucas, Carla Zelaya, Richard Nahin, Sean Mackey, Lynn DeBar, Robert Kerns, Michael Von Korff, Linda Porter, et Charles Helmick. 2018. « Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults — United States, 2016 ». *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 67 (36): 1001-6. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6736a2>.

Darcq, Emmanuel, et Brigitte Lina Kieffer. 2018. « Opioid Receptors: Drivers to Addiction? ». *Nature Reviews Neuroscience* 19 (8): 499-514. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0028-x>.

De Gregori, Simona, Manuela De Gregori, Guglielmina Nadia Ranzani, Massimo Allegri, Cristina Minella, et Mario Regazzi. 2012. « Morphine Metabolism, Transport and Brain Disposition ». *Metabolic Brain Disease* 27 (1): 1-5. <https://doi.org/10.1007/s11011-011-9274-6>.

Degrandmaison, Jade, Khaled Abdallah, Véronique Blais, Samuel Génier, Marie-Pier Lalumière, Francis Bergeron, Catherine M. Cahill, et al. 2020. « In Vivo Mapping of a GPCR Interactome Using Knockin Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (23): 13105-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917906117>.

Descoeur, Juliette, Vanessa Pereira, Anne Pizzoccaro, Amaury Francois, Bing Ling, Violette Maffre, Brigitte Couette, et al. 2011. « Oxaliplatin-induced Cold Hypersensitivity Is Due to

Remodelling of Ion Channel Expression in Nociceptors ». *EMBO Molecular Medicine* 3 (5): 266-78. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100134>.

Dietis, N., R. Guerrini, G. Calo, S. Salvadori, D.J. Rowbotham, et D.G. Lambert. 2009. « Simultaneous Targeting of Multiple Opioid Receptors: A Strategy to Improve Side-Effect Profile ». *British Journal of Anaesthesia* 103 (1): 38-49. <https://doi.org/10.1093/bja/aep129>.

Donica, Courtney L., Yan Cui, Shanping Shi, et Howard B. Gutstein. 2014. « Platelet-Derived Growth Factor Receptor- β Antagonism Restores Morphine Analgesic Potency against Neuropathic Pain ». Édité par Shilpa J. Buch. *PLoS ONE* 9 (5): e97105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097105>.

Elman, Igor, et David Borsook. 2016. « Common Brain Mechanisms of Chronic Pain and Addiction ». *Neuron* 89 (1): 11-36. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.027>.

Endres-Becker, Jeannette, Paul A. Heppenstall, Shaaban A. Mousa, Dominika Labuz, Alexander Oksche, Michael Schäfer, Christoph Stein, et Christian Zöllner. 2007. « μ -Opioid Receptor Activation Modulates Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Currents in Sensory Neurons in A Model of Inflammatory Pain ». *Molecular Pharmacology* 71 (1): 12-18. <https://doi.org/10.1124/mol.106.026740>.

Esteban-Villarrubia, Jorge, Juan José Soto-Castillo, Javier Pozas, María San Román-Gil, Inmaculada Orejana-Martín, Javier Torres-Jiménez, Alfredo Carrato, Teresa Alonso-Gordoa, et Javier Molina-Cerrillo. 2020. « Tyrosine Kinase Receptors in Oncology ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (22): 8529. <https://doi.org/10.3390/ijms21228529>.

Fillinger, Clémentine, Ipek Yalcin, Michel Barrot, et Pierre Veinante. 2017. « Afferents to Anterior Cingulate Areas 24a and 24b and Midcingulate Areas 24a' and 24b' in the Mouse ». *Brain Structure and Function* 222 (3): 1509-32. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1290-1>.

François, Amaury, Sarah A. Low, Elizabeth I. Sypek, Amelia J. Christensen, Chaudy Sotoudeh, Kevin T. Beier, Charu Ramakrishnan, et al. 2017. « A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins ». *Neuron* 93 (4): 822-839.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.008>.

François, Amaury, et Grégory Scherrer. 2017. « Delta Opioid Receptor Expression and Function in Primary Afferent Somatosensory Neurons ». In *Delta Opioid Receptor Pharmacology and Therapeutic Applications*, édité par Emily M. Jutkiewicz, 247:87-114. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/164_2017_58.

Gasser, H. S., et Joseph Erlanger. 1927. « THE RÔLE PLAYED BY THE SIZES OF THE CONSTITUENT FIBERS OF A NERVE TRUNK IN DETERMINING THE FORM OF ITS ACTION POTENTIAL WAVE ». *American Journal of Physiology-Legacy Content* 80 (3): 522-47. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1927.80.3.522>.

Gavériaux-Ruff, Claire, et Brigitte Lina Kieffer. 2011. « Delta Opioid Receptor Analgesia: Recent Contributions from Pharmacology and Molecular Approaches ». *Behavioural Pharmacology* 22 (5 and 6): 405-14. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32834a1f2c>.

Gendron, Louis, Nitish Mittal, Hélène Beaudry, et Wendy Walwyn. 2015. « Recent Advances on the δ Opioid Receptor: From Trafficking to Function: Update on the δ Opioid Receptor ». *British Journal of Pharmacology* 172 (2): 403-19. <https://doi.org/10.1111/bph.12706>.

Geren, B. B., et F. O. Schmitt. 1954. « THE STRUCTURE OF THE SCHWANN CELL AND ITS RELATION TO THE AXON IN CERTAIN INVERTEBRATE NERVE FIBERS ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 40 (9): 863-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.40.9.863>.

Guan, Zhonghui, Julia A Kuhn, Xidao Wang, Bradley Colquitt, Carlos Solorzano, Smitha Vaman, Andrew K Guan, et al. 2016. « Injured Sensory Neuron-Derived CSF1 Induces Microglial Proliferation and DAP12-Dependent Pain ». *Nature Neuroscience* 19 (1): 94-101. <https://doi.org/10.1038/nn.4189>.

Häring, Martin, Amit Zeisel, Hannah Hochgerner, Puneet Rinwa, Jon E. T. Jakobsson, Peter Lönnerberg, Gioele La Manno, et al. 2018. « Neuronal Atlas of the Dorsal Horn Defines Its Architecture and Links Sensory Input to Transcriptional Cell Types ». *Nature Neuroscience* 21 (6): 869-80. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0141-1>.

Hasegawa, H., S. Abbott, B.-X. Han, Y. Qi, et F. Wang. 2007. « Analyzing Somatosensory Axon Projections with the Sensory Neuron-Specific Advillin Gene ». *Journal of Neuroscience* 27 (52): 14404-14. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4908-07.2007>.

Heinricher, M.M., I. Tavares, J.L. Leith, et B.M. Lumb. 2009. « Descending Control of Nociception: Specificity, Recruitment and Plasticity ». *Brain Research Reviews* 60 (1): 214-25. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.009>.

Hua, Thuy, Bin Chen, Dongye Lu, Katsuyasu Sakurai, Shengli Zhao, Bao-Xia Han, Jiwoo Kim, et al. 2020. « General Anesthetics Activate a Potent Central Pain-Suppression Circuit in the Amygdala ». *Nature Neuroscience* 23 (7): 854-68. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0632-8>.

Hughes, David I, et Andrew J Todd. 2020. « Central Nervous System Targets: Inhibitory Interneurons in the Spinal Cord ». *Neurotherapeutics* 17 (3): 874-85. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00936-0>.

Inquimbert, Perrine, Jean-Luc Rodeau, et Rémy Schlichter. 2007. « Differential Contribution of GABAergic and Glycinergic Components to Inhibitory Synaptic Transmission in Lamina II and Laminae III-IV of the Young Rat Spinal Cord: Synaptic Inhibition in the Dorsal Spinal Cord ». *European Journal of Neuroscience* 26 (10): 2940-49. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05919.x>.

Irvine, Karen-Amanda, et J David Clark. 2018. « Chronic Pain After Traumatic Brain Injury: Pathophysiology and Pain Mechanisms ». *Pain Medicine* 19 (7): 1315-33. <https://doi.org/10.1093/pm/pnx153>.

Ishida, Kumiko, Tomoyuki Kawamata, Satoshi Tanaka, Takayuki Shindo, et Mikito Kawamata. 2014. « Calcitonin Gene-Related Peptide Is Involved in Inflammatory Pain but

Not in Postoperative Pain ». *Anesthesiology* 121 (5): 1068-79.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000364>.

Jacobs, Blaine A., Miryam M. Pando, Elaine Jennings, Teresa A. Chavera, William P. Clarke, et Kelly A. Berg. 2018. « Allosterism within δ Opioid– κ Opioid Receptor Heteromers in Peripheral Sensory Neurons: Regulation of κ Opioid Agonist Efficacy ». *Molecular Pharmacology* 93 (4): 376-86. <https://doi.org/10.1124/mol.117.109975>.

Janak, Patricia H., et Kay M. Tye. 2015. « From Circuits to Behaviour in the Amygdala ». *Nature* 517 (7534): 284-92. <https://doi.org/10.1038/nature14188>.

Ji, Miao-Jin, Jiao Yang, Zhi-Qiang Gao, Liang Zhang, et Chao Liu. 2021. « The Role of the Kappa Opioid System in Comorbid Pain and Psychiatric Disorders: Function and Implications ». *Frontiers in Neuroscience* 15 (février): 642493.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.642493>.

Jiang, Changyou, Xueying Wang, Qiumin Le, Peipei Liu, Cao Liu, Zhilin Wang, Guan hong He, Ping Zheng, Feifei Wang, et Lan Ma. 2021. « Morphine Coordinates SST and PV Interneurons in the Prelimbic Cortex to Disinhibit Pyramidal Neurons and Enhance Reward ». *Molecular Psychiatry* 26 (4): 1178-93. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0480-7>.

Joshi, Girish P., et Babatunde O. Ogunnaike. 2005. « Consequences of Inadequate Postoperative Pain Relief and Chronic Persistent Postoperative Pain ». *Anesthesiology Clinics of North America* 23 (1): 21-36. <https://doi.org/10.1016/j.atc.2004.11.013>.

Kaas, Jon H. 2009. « Evolution of the Somatosensory System in Mammals ». In *Encyclopedia of Neuroscience*, édité par Marc D. Binder, Nobutaka Hirokawa, et Uwe Windhorst, 1416-19. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_3169.

Kardon, Adam P., Erika Polgár, Junichi Hachisuka, Lindsey M. Snyder, Darren Cameron, Sinead Savage, Xiaoyun Cai, et al. 2014. « Dynorphin Acts as a Neuromodulator to Inhibit Itch in the Dorsal Horn of the Spinal Cord ». *Neuron* 82 (3): 573-86.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.046>.

Kibaly, Cherkaouia, Chi Xu, Catherine M. Cahill, Christopher J. Evans, et Ping-Yee Law. 2019. « Non-Nociceptive Roles of Opioids in the CNS: Opioids' Effects on Neurogenesis, Learning, Memory and Affect ». *Nature Reviews Neuroscience* 20 (1): 5-18.
<https://doi.org/10.1038/s41583-018-0092-2>.

Kiguchi, Norikazu, Daichi Kobayashi, Fumihiko Saika, Shinsuke Matsuzaki, et Shiroh Kishioka. 2018. « Inhibition of Peripheral Macrophages by Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists Suppresses Spinal Microglial Activation and Neuropathic Pain in Mice with Peripheral Nerve Injury ». *Journal of Neuroinflammation* 15 (1): 96.
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1133-5>.

Kim, K.-S., J. Kim, S. K. Back, J.-Y. Im, H. S. Na, et P.-L. Han. 2007. « Markedly Attenuated Acute and Chronic Pain Responses in Mice Lacking Adenylyl Cyclase-5 ». *Genes, Brain and Behavior* 6 (2): 120-27. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00238.x>.

Kim, K.-S., K.-W. Lee, K.-W. Lee, J.-Y. Im, J. Y. Yoo, S.-W. Kim, J.-K. Lee, E. J. Nestler, et P.-L. Han. 2006. « Adenylyl Cyclase Type 5 (AC5) Is an Essential Mediator of Morphine Action ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (10): 3908-13.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0508812103>.

Kim, Young-Jin, Jeong-Hyun Byun, et In-Sung Choi. 2015. « Effect of Exercise on M-Opioid Receptor Expression in the Rostral Ventromedial Medulla in Neuropathic Pain Rat Model ». *Annals of Rehabilitation Medicine* 39 (3): 331. <https://doi.org/10.5535/arm.2015.39.3.331>.

King, Tamara, Louis Vera-Portocarrero, Tannia Gutierrez, Todd W Vanderah, Gregory Dussor, Josephine Lai, Howard L Fields, et Frank Porreca. 2009. « Unmasking the Tonic-Aversive State in Neuropathic Pain ». *Nature Neuroscience* 12 (11): 1364-66.
<https://doi.org/10.1038/nn.2407>.

Klenowski, Paul, Michael Morgan, et Selena E Bartlett. 2015. « The Role of δ -Opioid Receptors in Learning and Memory Underlying the Development of Addiction: Role of Delta Opioid Receptors in Addiction ». *British Journal of Pharmacology* 172 (2): 297-310.
<https://doi.org/10.1111/bph.12618>.

Koch, Stephanie C., David Acton, et Martyn Goulding. 2018. « Spinal Circuits for Touch, Pain, and Itch ». *Annual Review of Physiology* 80 (1): 189-217.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034303>.

Kondo, Masahiro, et Ikuko Shibuta. 2020. « Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK) 1 and 2 as a Key Molecule in Pain Research ». *Journal of Oral Science* 62 (2): 147-49.
<https://doi.org/10.2334/josnusd.19-0470>.

Koob, George F., et Michel Le Moal. 2008. « Addiction and the Brain Antireward System ». *Annual Review of Psychology* 59 (1): 29-53.
<https://doi.org/10.1146/annurev.psych.59.103006.093548>.

Kum, Elena, Norman Buckley, Oscar de Leon-Casasola, Mark Lema, et Jason W. Busse. 2020. « Attitudes Towards and Management of Opioid-Induced Hyperalgesia: A Survey of Chronic Pain Practitioners ». *The Clinical Journal of Pain* 36 (5): 359-64.
<https://doi.org/10.1097/AJP.0000000000000814>.

LaGraize, S.C., W. Guo, K. Yang, F. Wei, K. Ren, et R. Dubner. 2010. « Spinal Cord Mechanisms Mediating Behavioral Hyperalgesia Induced by Neurokinin-1 Tachykinin Receptor Activation in the Rostral Ventromedial Medulla ». *Neuroscience* 171 (4): 1341-56.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.040>.

Lai, Helen C., Rebecca P. Seal, et Jane E. Johnson. 2016. « Making Sense out of Spinal Cord Somatosensory Development ». *Development* 143 (19): 3434-48.
<https://doi.org/10.1242/dev.139592>.

Lalanne, Laurence, Gulebru Ayranci, Brigitte L. Kieffer, et Pierre-Eric Lutz. 2014. « The Kappa Opioid Receptor: From Addiction to Depression, and Back ». *Frontiers in Psychiatry* 5 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fpsy.2014.00170>.

Lalisse, Sarah, Jennifer Hua, Manon Lenoir, Nathalie Linck, François Rassendren, et Lauriane Ulmann. 2018. « Sensory Neuronal P2RX4 Receptors Controls BDNF Signaling in Inflammatory Pain ». *Scientific Reports* 8 (1): 964. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19301-5>.

Lallemend, François, et Patrik Ernfors. 2012. « Molecular Interactions Underlying the Specification of Sensory Neurons ». *Trends in Neurosciences* 35 (6): 373-81. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.03.006>.

Liang, M., A. Mouraux, et G. D. Iannetti. 2011. « Parallel Processing of Nociceptive and Non-Nociceptive Somatosensory Information in the Human Primary and Secondary Somatosensory Cortices: Evidence from Dynamic Causal Modeling of Functional Magnetic Resonance Imaging Data ». *Journal of Neuroscience* 31 (24): 8976-85.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6207-10.2011>.

Lister, Kevin C., Sioui Maldonado Bouchard, Teodora Markova, Andrea Aternali, Pelin Denecli, Stephania Donayre Pimentel, Mariam Majeed, Jean-Sebastien Austin, Amanda C. de C. Williams, et Jeffrey S. Mogil. 2020. « Chronic Pain Produces Hypervigilance to Predator Odor in Mice ». *Current Biology* 30 (15): R866-67.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.025>.

Liu, Feng-Yu, Xiao-Xiu Qu, Xu Ding, Jie Cai, Hong Jiang, You Wan, Ji-Sheng Han, et Guo-Gang Xing. 2010. « Decrease in the Descending Inhibitory 5-HT System in Rats with Spinal Nerve Ligation ». *Brain Research* 1330 (mai): 45-60.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.010>.

Lorenzo, Louis-Etienne, Claire Magnussen, Andrea L Bailey, Manon St Louis, Yves De Koninck, et Alfredo Ribeiro-da-Silva. 2014. « Spatial and Temporal Pattern of Changes in the Number of GAD65-Immunoreactive Inhibitory Terminals in the Rat Superficial Dorsal Horn Following Peripheral Nerve Injury ». *Molecular Pain* 10 (janvier): 1744-8069-10-57.
<https://doi.org/10.1186/1744-8069-10-57>.

Lutz, Pierre-Eric, et Brigitte L Kieffer. 2013. « The Multiple Facets of Opioid Receptor Function: Implications for Addiction ». *Current Opinion in Neurobiology* 23 (4): 473-79.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.02.005>.

Lyden, Jennifer, et Ingrid A. Binswanger. 2019. « The United States Opioid Epidemic ». *Seminars in Perinatology* 43 (3): 123-31. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2019.01.001>.

Ma, Qiufu. 2010. « Labeled Lines Meet and Talk: Population Coding of Somatic Sensations ». *Journal of Clinical Investigation* 120 (11): 3773-78.
<https://doi.org/10.1172/JCI43426>.

———. 2012. « Population Coding of Somatic Sensations ». *Neuroscience Bulletin* 28 (2): 91-99. <https://doi.org/10.1007/s12264-012-1201-2>.

Machelska, Halina, et Melih Ö. Celik. 2020. « Opioid Receptors in Immune and Glial Cells—Implications for Pain Control ». *Frontiers in Immunology* 11 (mars): 300.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00300>.

Markovic, Tamara, Christian E. Pedersen, Nicolas Massaly, Yvan M. Vachez, Brian Ruyle, Caitlin A. Murphy, Kavitha Abiraman, et al. 2021. « Pain Induces Adaptations in Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons to Drive Anhedonia-like Behavior ». *Nature Neuroscience* 24 (11): 1601-13. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00924-3>.

Martinez, Valéria, Nadine Attal, Didier Bouhassira, et Michel Lantéri-Minet. 2010. « Les douleurs neuropathiques chroniques : diagnostic, évaluation et traitement en médecine ambulatoire. Recommandations pour la pratique clinique de la Société française d'étude et de

traitement de la douleur ». *Douleurs : Evaluation - Diagnostic - Traitement* 11 (1): 3-21.
<https://doi.org/10.1016/j.douler.2009.12.009>.

Martucci, Katherine T., et Sean C. Mackey. 2018. « Neuroimaging of Pain ». *Anesthesiology* 128 (6): 1241-54. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002137>.

Marvizon, Juan Carlos, Wendy Walwyn, Ani Minasyan, Wenling Chen, et Bradley K. Taylor. 2015. « Latent Sensitization: A Model for Stress-Sensitive Chronic Pain ». *Current Protocols in Neuroscience* 71 (1). <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0950s71>.

Massotte, D. 2015. « In Vivo Opioid Receptor Heteromerization: Where Do We Stand? : In Vivo Opioid Receptor Heteromers ». *British Journal of Pharmacology* 172 (2): 420-34.
<https://doi.org/10.1111/bph.12702>.

Maxwell, David J., Mino D. Belle, Ornsiri Cheunsuang, Anika Stewart, et Richard Morris. 2007. « Morphology of Inhibitory and Excitatory Interneurons in Superficial Laminae of the Rat Dorsal Horn: Spinal Interneurons ». *The Journal of Physiology* 584 (2): 521-33.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.140996>.

McEWEN, Bruce S. 1998. « Stress, Adaptation, and Disease: Allostasis and Allostatic Load ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 840 (1): 33-44.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09546.x>.

Meda, Karuna S., Tosha Patel, Joao M. Braz, Ruchi Malik, Marc L. Turner, Helia Seifkar, Allan I. Basbaum, et Vikaas S. Sohal. 2019. « Microcircuit Mechanisms through Which Mediodorsal Thalamic Input to Anterior Cingulate Cortex Exacerbates Pain-Related Aversion ». *Neuron* 102 (5): 944-959.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.042>.

Melemedjian, Ohannes K., et Arkady Khoutorsky. 2015. « Translational Control of Chronic Pain ». In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 131:185-213. Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2014.11.006>.

Meltzer, Shan, Celine Santiago, Nikhil Sharma, et David D. Ginty. 2021. « The Cellular and Molecular Basis of Somatosensory Neuron Development ». *Neuron* 109 (23): 3736-57.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.09.004>.

Melzack, Ronald, et Patrick D. Wall. 1965. « Pain Mechanisms: A New Theory: A Gate Control System Modulates Sensory Input from the Skin before It Evokes Pain Perception and Response. » *Science* 150 (3699): 971-79. <https://doi.org/10.1126/science.150.3699.971>.

Mennicken, Françoise, Ji Zhang, Cyrla Hoffert, Sultan Ahmad, Alain Beaudet, et Dajan O'Donnell. 2003. « Phylogenetic Changes in the Expression of Delta Opioid Receptors in Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia ». *The Journal of Comparative Neurology* 465 (3): 349-60. <https://doi.org/10.1002/cne.10839>.

Mercer Lindsay, Nicole, Chong Chen, Gadi Gilam, Sean Mackey, et Grégory Scherrer. 2021. « Brain Circuits for Pain and Its Treatment ». *Science Translational Medicine* 13 (619): eabj7360. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj7360>.

- Mills, Sarah E.E., Karen P. Nicolson, et Blair H. Smith. 2019. « Chronic Pain: A Review of Its Epidemiology and Associated Factors in Population-Based Studies ». *British Journal of Anaesthesia* 123 (2): e273-83. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.03.023>.
- Minett, Michael S., Vanessa Pereira, Shafaq Sikandar, Ayako Matsuyama, Stéphane Lolignier, Alexandros H. Kanellopoulos, Flavia Mancini, et al. 2015. « Endogenous Opioids Contribute to Insensitivity to Pain in Humans and Mice Lacking Sodium Channel Nav1.7 ». *Nature Communications* 6 (1): 8967. <https://doi.org/10.1038/ncomms9967>.
- Mitsi, Vasiliki, et Venetia Zachariou. 2016. « Modulation of Pain, Nociception, and Analgesia by the Brain Reward Center ». *Neuroscience* 338 (décembre): 81-92. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.017>.
- Moulton, Eric A., Jeremy D. Schmahmann, Lino Becerra, et David Borsook. 2010. « The Cerebellum and Pain: Passive Integrator or Active Participant? ». *Brain Research Reviews* 65 (1): 14-27. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.05.005>.
- Moy, Jamie K., Thomas Szabo-Pardi, Dipti V. Tillu, Salim Megat, Grishma Pradhan, Moeno Kume, Marina N. Asiedu, Michael D. Burton, Gregory Dussor, et Theodore J. Price. 2019. « Temporal and Sex Differences in the Role of BDNF/TrkB Signaling in Hyperalgesic Priming in Mice and Rats ». *Neurobiology of Pain* 5 (janvier): 100024. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2018.10.001>.
- Mussio, Casey A., Steven E. Harte, et George S. Borszcz. 2020. « Regional Differences Within the Anterior Cingulate Cortex in the Generation Versus Suppression of Pain Affect in Rats ». *The Journal of Pain* 21 (1-2): 121-34. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2019.06.003>.
- Nadeau, Stephen E., Jeffrey K. Wu, et Richard A. Lawhern. 2021. « Opioids and Chronic Pain: An Analytic Review of the Clinical Evidence ». *Frontiers in Pain Research* 2 (août): 721357. <https://doi.org/10.3389/fpain.2021.721357>.
- Norrsell, Ulf, Stanley Finger, et Clara Lajonchere. 1999. « Cutaneous Sensory Spots and the “Law of Specific Nerve Energies”: History and Development of Ideas ». *Brain Research Bulletin* 48 (5): 457-65. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(98\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(98)00067-7).
- Ogawa, Hisashi, Katsushi Morimoto, et Yoshiro Yamashita. 1981. « PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF LOW THRESHOLD MECHANORECEPTOR AFFERENT UNITS INNERVATING FROG SKIN ». *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 66 (2): 105-16. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1981.sp002538>.
- Ossipov, Michael H., Kozo Morimura, et Frank Porreca. 2014. « Descending Pain Modulation and Chronification of Pain ». *Current Opinion in Supportive & Palliative Care* 8 (2): 143-51. <https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000055>.
- Ozawa, Akihiko, Gloria Brunori, Daniela Mercatelli, Jinhua Wu, Andrea Cippitelli, Bende Zou, Xinmin (Simon) Xie, et al. 2015. « Knock-In Mice with NOP-EGFP Receptors Identify Receptor Cellular and Regional Localization ». *The Journal of Neuroscience* 35 (33): 11682-93. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5122-14.2015>.

- Paixão, Sónia, Laura Loschek, Louise Gaitanos, Pilar Alcalà Morales, Martyn Goulding, et Rüdiger Klein. 2019. « Identification of Spinal Neurons Contributing to the Dorsal Column Projection Mediating Fine Touch and Corrective Motor Movements ». *Neuron* 104 (4): 749-764.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.08.029>.
- Paré, Michel, Allan M. Smith, et Frank L. Rice. 2002. « Distribution and Terminal Arborizations of Cutaneous Mechanoreceptors in the Glabrous Finger Pads of the Monkey: Distribution of the Monkey Mechanoreceptors ». *Journal of Comparative Neurology* 445 (4): 347-59. <https://doi.org/10.1002/cne.10196>.
- Paricio-Montesinos, Ricardo, Frederick Schwaller, Annapoorani Udhayachandran, Florian Rau, Jan Walcher, Roberta Evangelista, Joris Vriens, Thomas Voets, James F.A. Poulet, et Gary R. Lewin. 2020. « The Sensory Coding of Warm Perception ». *Neuron* 106 (5): 830-841.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.02.035>.
- Pasternak, Gavril W., et Ying-Xian Pan. 2013. « Mu Opioids and Their Receptors: Evolution of a Concept ». Édité par David R. Sibley. *Pharmacological Reviews* 65 (4): 1257-1317. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007138>.
- Paul, Alok K., Craig M. Smith, Mohammed Rahmatullah, Veeranoot Nissapatorn, Polrat Wilairatana, Mariana Spetea, Nuri Gueven, et Nikolas Dietis. 2021. « Opioid Analgesia and Opioid-Induced Adverse Effects: A Review ». *Pharmaceuticals* 14 (11): 1091. <https://doi.org/10.3390/ph14111091>.
- Peirs, Cedric, Radhouane Dallel, et Andrew J. Todd. 2020. « Recent Advances in Our Understanding of the Organization of Dorsal Horn Neuron Populations and Their Contribution to Cutaneous Mechanical Allodynia ». *Journal of Neural Transmission* 127 (4): 505-25. <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02159-1>.
- Peirs, Cedric, et Rebecca P. Seal. 2016. « Neural Circuits for Pain: Recent Advances and Current Views ». *Science* 354 (6312): 578-84. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8933>.
- Pignatelli, Michele, et Anna Beyeler. 2019. « Valence Coding in Amygdala Circuits ». *Current Opinion in Behavioral Sciences* 26 (avril): 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.10.010>.
- Pineyro, Graciela, et Karim Nagi. 2021. « Signaling Diversity of Mu- and Delta- Opioid Receptor Ligands: Re-Evaluating the Benefits of β -Arrestin/G Protein Signaling Bias ». *Cellular Signalling* 80 (avril): 109906. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109906>.
- Podvin, Sonia, Tony Yaksh, et Vivian Hook. 2016. « The Emerging Role of Spinal Dynorphin in Chronic Pain: A Therapeutic Perspective ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 56 (1): 511-33. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103042>.
- Polgár, E., et A.J. Todd. 2008. « Tactile Allodynia Can Occur in the Spared Nerve Injury Model in the Rat without Selective Loss of GABA or GABAA Receptors from Synapses in Laminae I–II of the Ipsilateral Spinal Dorsal Horn ». *Neuroscience* 156 (1): 193-202. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.07.009>.

- Prato, Vincenzo, Francisco J. Taberner, James R.F. Hockley, Gerard Callejo, Alice Arcourt, Bassim Tazir, Leonie Hammer, et al. 2017. « Functional and Molecular Characterization of Mechanoinsensitive “Silent” Nociceptors ». *Cell Reports* 21 (11): 3102-15. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.066>.
- Raffa, R. B., G. Burdge, J. Gambrah, H. E. Kinecki, F. Lin, B. Lu, J. T. Nguyen, et al. 2017. « Cebranopadol: Novel Dual Opioid/NOP Receptor Agonist Analgesic ». *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 42 (1): 8-17. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12461>.
- Raja, Srinivasa N., Daniel B. Carr, Milton Cohen, Nanna B. Finnerup, Herta Flor, Stephen Gibson, Francis J. Keefe, et al. 2020. « The Revised International Association for the Study of Pain Definition of Pain: Concepts, Challenges, and Compromises ». *Pain* 161 (9): 1976-82. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>.
- Reiss, David, Tando Maduna, Hervé Maurin, Emilie Audouard, et Claire Gaveriaux-Ruff. 2020. « Mu Opioid Receptor in Microglia Contributes to Morphine Analgesic Tolerance, Hyperalgesia, and Withdrawal in Mice ». *Journal of Neuroscience Research*, avril. <https://doi.org/10.1002/jnr.24626>.
- Rexed, Bror. 1952. « The Cytoarchitectonic Organization of the Spinal Cord in the Cat ». *The Journal of Comparative Neurology* 96 (3): 415-95. <https://doi.org/10.1002/cne.900960303>.
- Richebé, Philippe, Xavier Capdevila, et Cyril Rivat. 2018. « Persistent Postsurgical Pain ». *Anesthesiology* 129 (3): 590-607. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002238>.
- Richebé, Philippe, Cyril Rivat, Jean-Paul Laulin, Pierre Maurette, et Guy Simonnet. 2005. « Ketamine Improves the Management of Exaggerated Postoperative Pain Observed in Perioperative Fentanyl-Treated Rats ». *Anesthesiology* 102 (2): 421-28. <https://doi.org/10.1097/00000542-200502000-00028>.
- Rivat, Cyril, et Jane Ballantyne. 2016. « The Dark Side of Opioids in Pain Management: Basic Science Explains Clinical Observation ». *PAIN Reports* 1 (2): e570. <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000570>.
- Rivat, Cyril, Emilie Laboureyras, Jean-Paul Laulin, Chloé Le Roy, Philippe Richebé, et Guy Simonnet. 2007. « Non-Nociceptive Environmental Stress Induces Hyperalgesia, Not Analgesia, in Pain and Opioid-Experienced Rats ». *Neuropsychopharmacology* 32 (10): 2217-28. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301340>.
- Rivat, Cyril, Jean-Paul Laulin, Jean-Benoît Corcuff, Evelyne Célèrier, Laure Pain, et Guy Simonnet. 2002. « Fentanyl Enhancement of Carrageenan-Induced Long-Lasting Hyperalgesia in Rats ». *Anesthesiology* 96 (2): 381-91. <https://doi.org/10.1097/00000542-200202000-00025>.
- Rivat, Cyril, Chamroeun Sar, Ilana Mechaly, Jean-Philippe Leyris, Lucie Diouloufet, Corinne Sonrier, Yann Philipson, et al. 2018. « Inhibition of Neuronal FLT3 Receptor Tyrosine Kinase Alleviates Peripheral Neuropathic Pain in Mice ». *Nature Communications* 9 (1): 1042. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03496-2>.

- Roeckel, Laurie-Anne, Glenn-Marie Le Coz, Claire Gavériaux-Ruff, et Frédéric Simonin. 2016. « Opioid-Induced Hyperalgesia: Cellular and Molecular Mechanisms ». *Neuroscience* 338 (décembre): 160-82. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.029>.
- Roeckel, Laurie-Anne, Valérie Utard, David Reiss, Jinane Mouheiche, Hervé Maurin, Anne Robé, Emilie Audouard, et al. 2017. « Morphine-Induced Hyperalgesia Involves Mu Opioid Receptors and the Metabolite Morphine-3-Glucuronide ». *Scientific Reports* 7 (1): 10406. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11120-4>.
- Rosenblum, Andrew, Lisa A. Marsch, Herman Joseph, et Russell K. Portenoy. 2008. « Opioids and the Treatment of Chronic Pain: Controversies, Current Status, and Future Directions. » *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 16 (5): 405-16. <https://doi.org/10.1037/a0013628>.
- Russ, Daniel E., Ryan B. Patterson Cross, Li Li, Stephanie C. Koch, Kaya J. E. Matson, Archana Yadav, Mor R. Alkaslasi, et al. 2021. « A Harmonized Atlas of Mouse Spinal Cord Cell Types and Their Spatial Organization ». *Nature Communications* 12 (1): 5722. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25125-1>.
- Sadana, Rachna, et Carmen W. Dessauer. 2009. « Physiological Roles for G Protein-Regulated Adenylyl Cyclase Isoforms: Insights from Knockout and Overexpression Studies ». *Neurosignals* 17 (1): 5-22. <https://doi.org/10.1159/000166277>.
- Sahbaie, Peyman, Xiaoyou Shi, Tian-Zhi Guo, Yanli Qiao, David C. Yeomans, Wade S. Kingery, et David J. Clark. 2009. « Role of Substance P Signaling in Enhanced Nociceptive Sensitization and Local Cytokine Production after Incision ». *Pain* 145 (3): 341-49. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.06.037>.
- Salaffi, Fausto, Giovanni Giacobazzi, et Marco Di Carlo. 2018. « Chronic Pain in Inflammatory Arthritis: Mechanisms, Metrology, and Emerging Targets—A Focus on the JAK-STAT Pathway ». *Pain Research and Management* 2018: 1-14. <https://doi.org/10.1155/2018/8564215>.
- Saleh, Reem, Ming-Chin Lee, Stella H. Khiew, Cynthia Louis, Andrew J. Fleetwood, Adrian Achuthan, Irmgard Förster, Andrew D. Cook, et John A. Hamilton. 2018. « CSF-1 in Inflammatory and Arthritic Pain Development ». *The Journal of Immunology* 201 (7): 2042-53. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800665>.
- Sanz, Elisenda, Jonathan C. Bean, Daniel P. Carey, Albert Quintana, et G. Stanley McKnight. 2019. « RiboTag: Ribosomal Tagging Strategy to Analyze Cell-Type-Specific mRNA Expression In Vivo ». *Current Protocols in Neuroscience* 88 (1). <https://doi.org/10.1002/cpns.77>.
- Scherrer, Grégory, Noritaka Imamachi, Yu-Qing Cao, Candice Contet, Françoise Mennicken, Dajan O'Donnell, Brigitte L. Kieffer, et Allan I. Basbaum. 2009. « Dissociation of the Opioid Receptor Mechanisms That Control Mechanical and Heat Pain ». *Cell* 137 (6): 1148-59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.019>.

Scholz, Joachim, Nanna B. Finnerup, Nadine Attal, Qasim Aziz, Ralf Baron, Michael I. Bennett, Rafael Benoliel, et al. 2019. « The IASP Classification of Chronic Pain for ICD-11: Chronic Neuropathic Pain ». *Pain* 160 (1): 53-59.
<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001365>.

Ségaly, Aude I., Marta Tellez-Gabriel, Marie-Françoise Heymann, et Dominique Heymann. 2015. « Receptor Tyrosine Kinases: Characterisation, Mechanism of Action and Therapeutic Interests for Bone Cancers ». *Journal of Bone Oncology* 4 (1): 1-12.
<https://doi.org/10.1016/j.jbo.2015.01.001>.

Sharif, Behrang, Ariel R. Ase, Alfredo Ribeiro-da-Silva, et Philippe Séguéla. 2020. « Differential Coding of Itch and Pain by a Subpopulation of Primary Afferent Neurons ». *Neuron* 106 (6): 940-951.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.03.021>.

Snyder, Lindsey M., Michael C. Chiang, Emanuel Loeza-Alcocer, Yu Omori, Junichi Hachisuka, Tayler D. Sheahan, Jenna R. Gale, et al. 2018. « Kappa Opioid Receptor Distribution and Function in Primary Afferents ». *Neuron* 99 (6): 1274-1288.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.044>.

Solomon, Richard L., et John D. Corbit. 1974. « An Opponent-Process Theory of Motivation: I. Temporal Dynamics of Affect. » *Psychological Review* 81 (2): 119-45.
<https://doi.org/10.1037/h0036128>.

Sorge, Robert E, Josiane C S Mapplebeck, Sarah Rosen, Simon Beggs, Sarah Taves, Jessica K Alexander, Loren J Martin, et al. 2015. « Different Immune Cells Mediate Mechanical Pain Hypersensitivity in Male and Female Mice ». *Nature Neuroscience* 18 (8): 1081-83.
<https://doi.org/10.1038/nn.4053>.

Spofford, Christina M., et Timothy J. Brennan. 2012. « Gene Expression in Skin, Muscle, and Dorsal Root Ganglion after Plantar Incision in the Rat ». *Anesthesiology* 117 (1): 161-72.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31825a2a2b>.

Stachowski, Nicholas J., et Kimberly J. Dougherty. 2021. « Spinal Inhibitory Interneurons: Gatekeepers of Sensorimotor Pathways ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (5): 2667. <https://doi.org/10.3390/ijms22052667>.

Stagg, Nicola J., Heriberto P. Mata, Mohab M. Ibrahim, Erik J. Henriksen, Frank Porreca, Todd W. Vanderah, et T. Philip Malan. 2011. « Regular Exercise Reverses Sensory Hypersensitivity in a Rat Neuropathic Pain Model ». *Anesthesiology* 114 (4): 940-48.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318210f880>.

Sugiyama, Daisuke, Sinyoung Kang, et Timothy J. Brennan. 2017. « Muscle Reactive Oxygen Species (ROS) Contribute to Post-Incisional Guarding via the TRPA1 Receptor ». Édité par Alexander Binshtok. *PLOS ONE* 12 (1): e0170410.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170410>.

Sun, Jiaoli, Ningbo Li, Guangyou Duan, Yi Liu, Shanna Guo, Cong Wang, Changmao Zhu, et Xianwei Zhang. 2018. « Increased Nav 1.7 Expression in the Dorsal Root Ganglion

Contributes to Pain Hypersensitivity after Plantar Incision in Rats ». *Molecular Pain* 14 (janvier): 174480691878232. <https://doi.org/10.1177/1744806918782323>.

Sun, Yan-Gang, Neilia G. Gracias, Julie Kosto Drobish, Michael R. Vasko, Robert W. Gereau, et Zhou-Feng Chen. 2009. « The C-Kit Signaling Pathway Is Involved in the Development of Persistent Pain ». *Pain* 144 (1): 178-86. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.04.011>.

Szabo-Pardi, Thomas A., Luz R. Barron, Melissa E. Lenert, et Michael D. Burton. 2021. « Sensory Neuron TLR4 Mediates the Development of Nerve-Injury Induced Mechanical Hypersensitivity in Female Mice ». *Brain, Behavior, and Immunity* 97 (octobre): 42-60. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.06.011>.

Tan, Linette Liqi, et Rohini Kuner. 2021. « Neocortical Circuits in Pain and Pain Relief ». *Nature Reviews Neuroscience* 22 (8): 458-71. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00468-2>.

Tang, Jing-Shi, Chao-Ling Qu, et Fu-Quan Huo. 2009. « The Thalamic Nucleus Submedialis and Ventrolateral Orbital Cortex Are Involved in Nociceptive Modulation: A Novel Pain Modulation Pathway ». *Progress in Neurobiology* 89 (4): 383-89. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.10.002>.

The Placebo Imaging Consortium, Matthias Zunhammer, Tamás Spisák, Tor D. Wager, et Ulrike Bingel. 2021. « Meta-Analysis of Neural Systems Underlying Placebo Analgesia from Individual Participant fMRI Data ». *Nature Communications* 12 (1): 1391. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21179-3>.

Thompson, Scott J., Mark H. Pitcher, Laura S. Stone, Farid Tarum, Gang Niu, Xiaoyuan Chen, Dale O. Kiewewetter, Petra Schweinhardt, et M. Catherine Bushnell. 2018. « Chronic Neuropathic Pain Reduces Opioid Receptor Availability with Associated Anhedonia in Rat ». *Pain* 159 (9): 1856-66. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001282>.

Todd, A. J., D. I. Hughes, E. Polgár, G. G. Nagy, M. Mackie, O. P. Ottersen, et D. J. Maxwell. 2003. « The Expression of Vesicular Glutamate Transporters VGLUT1 and VGLUT2 in Neurochemically Defined Axonal Populations in the Rat Spinal Cord with Emphasis on the Dorsal Horn: VGLUTS in Spinal Cord ». *European Journal of Neuroscience* 17 (1): 13-27. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02406.x>.

Toll, Lawrence, Michael R. Bruchas, Girolamo Calo', Brian M. Cox, et Nurulain T. Zaveri. 2016. « Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Structure, Signaling, Ligands, Functions, and Interactions with Opioid Systems ». Édité par Macdonald J. Christie. *Pharmacological Reviews* 68 (2): 419-57. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009209>.

Torsney, Carole, et Amy B. MacDermott. 2006. « Disinhibition Opens the Gate to Pathological Pain Signaling in Superficial Neurokinin 1 Receptor-Expressing Neurons in Rat Spinal Cord ». *The Journal of Neuroscience* 26 (6): 1833-43. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4584-05.2006>.

Trang, Tuan, Simon Beggs, et Michael W. Salter. 2012. « ATP Receptors Gate Microglia Signaling in Neuropathic Pain ». *Experimental Neurology* 234 (2): 354-61. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.012>.

Trenker, Raphael, et Natalia Jura. 2020. « Receptor Tyrosine Kinase Activation: From the Ligand Perspective ». *Current Opinion in Cell Biology* 63 (avril): 174-85. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.01.016>.

Uhelski, Megan L., Matthew A. Davis, et Perry N. Fuchs. 2012. « Pain Affect in the Absence of Pain Sensation: Evidence of Asomaesthesia after Somatosensory Cortex Lesions in the Rat ». *Pain* 153 (4): 885-92. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.01.018>.

Ulmann, Lauriane, Hélène Hirbec, et François Rassendren. 2010. « P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain ». *The EMBO Journal* 29 (14): 2290-2300. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.126>.

Van't Veer, Ashlee, Anita J Bechtholt, Sara Onvani, David Potter, Yujun Wang, Lee-Yuan Liu-Chen, Günther Schütz, et al. 2013. « Ablation of Kappa-Opioid Receptors from Brain Dopamine Neurons Has Anxiolytic-Like Effects and Enhances Cocaine-Induced Plasticity ». *Neuropsychopharmacology* 38 (8): 1585-97. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.58>.

Verstraete, Kenneth, et Savvas N. Savvides. 2012. « Extracellular Assembly and Activation Principles of Oncogenic Class III Receptor Tyrosine Kinases ». *Nature Reviews Cancer* 12 (11): 753-66. <https://doi.org/10.1038/nrc3371>.

Walcher, Jan, Julia Ojeda-Alonso, Julia Haseleu, Maria K. Oosthuizen, Ashlee H. Rowe, Nigel C. Bennett, et Gary R. Lewin. 2018. « Specialized Mechanoreceptor Systems in Rodent Glabrous Skin: Glabrous Skin Mechanoreceptors ». *The Journal of Physiology* 596 (20): 4995-5016. <https://doi.org/10.1113/JP276608>.

Wall, P.D. 1978. « THE GATE CONTROL THEORY OF PAIN MECHANISMS: A RE-EXAMINATION AND RE-STATEMENT ». *Brain* 101 (1): 1-18. <https://doi.org/10.1093/brain/101.1.1>.

Wang, Chunyan, Yize Li, Haiyun Wang, Keliang Xie, Ruichen Shu, Linlin Zhang, Nan Hu, Yonghao Yu, et Guolin Wang. 2015. « Inhibition of DOR Prevents Remifentanil Induced Postoperative Hyperalgesia through Regulating the Trafficking and Function of Spinal NMDA Receptors in Vivo and in Vitro ». *Brain Research Bulletin* 110 (janvier): 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.12.001>.

Wang, Dong, Vivianne L. Tawfik, Gregory Corder, Sarah A. Low, Amaury François, Allan I. Basbaum, et Grégory Scherrer. 2018. « Functional Divergence of Delta and Mu Opioid Receptor Organization in CNS Pain Circuits ». *Neuron* 98 (1): 90-108.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.002>.

Wang, Dongmei, Juan Zeng, Qi Li, Jianzhong Huang, R ejean Couture, et Yanguo Hong. 2016. « Contribution of Adrenomedullin to the Switch of G Protein-Coupled μ -Opioid Receptors from Gi to Gs in the Spinal Dorsal Horn Following Chronic Morphine Exposure in

Rats: Adrenomedullin Induces Uncoupling of μ Receptor to Gi Protein ». *British Journal of Pharmacology* 173 (7): 1196-1207. <https://doi.org/10.1111/bph.13419>.

Wang, X., J. Ratnam, B. Zou, P. M. England, et A. I. Basbaum. 2009. « TrkB Signaling Is Required for Both the Induction and Maintenance of Tissue and Nerve Injury-Induced Persistent Pain ». *Journal of Neuroscience* 29 (17): 5508-15. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4288-08.2009>.

Wang, Y., J. Wu, R. Guo, Y. Zhao, Y. Wang, M. Zhang, Z. Chen, A. Wu, et Y. Yue. 2013. « Surgical Incision Induces Phosphorylation of AMPA Receptor GluR1 Subunits at Serine-831 Sites and GluR1 Trafficking in Spinal Cord Dorsal Horn via a Protein Kinase C γ -Dependent Mechanism ». *Neuroscience* 240 (juin): 361-70. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.051>.

Wei, B., T. Kumada, T. Furukawa, K. Inoue, M. Watanabe, K. Sato, et A. Fukuda. 2013. « Pre- and Post-Synaptic Switches of GABA Actions Associated with Cl⁻ Homeostatic Changes Are Induced in the Spinal Nucleus of the Trigeminal Nerve in a Rat Model of Trigeminal Neuropathic Pain ». *Neuroscience* 228 (janvier): 334-48. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.043>.

Willis, William D. 2002. « Long-Term Potentiation in Spinothalamic Neurons ». *Brain Research Reviews* 40 (1-3): 202-14. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(02\)00202-3](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(02)00202-3).

Woolf, Clifford J. 2009. « Mu and Delta Opioid Receptors Diverge ». *Cell* 137 (6): 987-88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.033>.

Xu, Ji-Tian, Jian-Yuan Zhao, Xiuli Zhao, Davinna Ligons, Vinod Tiwari, Fidelis E. Atianjoh, Chun-Yi Lee, et al. 2014. « Opioid Receptor-Triggered Spinal MTORC1 Activation Contributes to Morphine Tolerance and Hyperalgesia ». *Journal of Clinical Investigation* 124 (2): 592-603. <https://doi.org/10.1172/JCI70236>.

Yahiro, Takaki, Naoya Kataoka, Yoshiko Nakamura, et Kazuhiro Nakamura. 2017. « The Lateral Parabrachial Nucleus, but Not the Thalamus, Mediates Thermosensory Pathways for Behavioural Thermoregulation ». *Scientific Reports* 7 (1): 5031. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05327-8>.

Yalcin, Ipek, Salim Megat, Florent Barthas, Elisabeth Waltisperger, Mélanie Kremer, Eric Salvat, et Michel Barrot. 2014. « The Sciatic Nerve Cuffing Model of Neuropathic Pain in Mice ». *Journal of Visualized Experiments*, n° 89 (juillet): 51608. <https://doi.org/10.3791/51608>.

Yasaka, Toshiharu, Sheena YX Tiong, Erika Polgár, Masahiko Watanabe, Eiichi Kumamoto, John S Riddell, et Andrew J Todd. 2014. « A Putative Relay Circuit Providing Low-Threshold Mechanoreceptive Input to Lamina I Projection Neurons via Vertical Cells in Lamina II of the Rat Dorsal Horn ». *Molecular Pain* 10 (janvier): 1744-8069-10-13. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-10-3>.

Yen, Chen-Tung, et Pen-Li Lu. 2013. « Thalamus and Pain ». *Acta Anaesthesiologica Taiwanica* 51 (2): 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.aat.2013.06.011>.

- Yu, Xiaobing, Allan Basbaum, et Zhonghui Guan. 2021. « Contribution of Colony-Stimulating Factor 1 to Neuropathic Pain ». *PAIN Reports* 6 (1): e883. <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000883>.
- Zeisel, Amit, Hannah Hochgerner, Peter Lönnerberg, Anna Johnsson, Fatima Memic, Job van der Zwan, Martin Häring, et al. 2018. « Molecular Architecture of the Mouse Nervous System ». *Cell* 174 (4): 999-1014.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.021>.
- Zhao, Jennifer C., Sonal Agarwal, Hiba Ahmad, Kejal Amin, Jan Philipp Bewersdorf, et Amer M. Zeidan. 2021. « A Review of FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia ». *Blood Reviews*, novembre, 100905. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2021.100905>.
- Zhou, Hong-Yi, Shao-Rui Chen, Hee-Sun Byun, Hong Chen, Li Li, Hee-Dong Han, Gabriel Lopez-Berestein, Anil K. Sood, et Hui-Lin Pan. 2012. « N-Methyl-d-Aspartate Receptor- and Calpain-Mediated Proteolytic Cleavage of K⁺-Cl⁻ Cotransporter-2 Impairs Spinal Chloride Homeostasis in Neuropathic Pain ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (40): 33853-64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.395830>.
- Zhu, Xiaying, Michelle A. Vincler, Renee Parker, et James C. Eisenach. 2006. « Spinal Cord Dynorphin Expression Increases, but Does Not Drive Microglial Prostaglandin Production or Mechanical Hypersensitivity after Incisional Surgery in Rats ». *Pain* 125 (1): 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.04.027>.
- Zotterman, Yngve. 1939. « Touch, Pain and Tickling: An Electro-Physiological Investigation on Cutaneous Sensory Nerves ». *The Journal of Physiology* 95 (1): 1-28. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1939.sp003707>.

ANNEXES

Annexe I

**Activation of peripheral neuronal FLT3
promotes exaggerated sensorial and
emotional pain-related behaviors
facilitating the transition from acute to
chronic pain**

Activation of peripheral neuronal FLT3 promotes exaggerated sensorial and emotional pain-related behaviors facilitating the transition from acute to chronic pain

Adrien Tassou^{1,2§}, Maxime Thouaye^{1,2}, Damien Gilabert^{1,3}, Antoine Jouvenel^{1,2}, Jean-Philippe Leyris^{2,6}, Corinne Sonrier^{1,2,6}, Lucie Diouloufet^{1,2,6}, Ilana Mechaly^{1,2}, Myriam Chentouf^{1,5}, Madeline Neiveyans^{1,5}, Martine Pugnère^{1,5}, Pierre Martineau^{1,5}, Bruno Robert^{1,5}, Xavier Capdevila^{1,2,4}, Jean Valmier^{1,2}, Cyril Rivat^{1,2*}

Adresses : ¹ Univ Montpellier, Montpellier, France ; ² Inserm U-1298, Institut des Neurosciences de Montpellier, Montpellier, France ; ³ CNRS UMR 5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France ; ⁴ Département d'anesthésiologie, Hôpital Universitaire Lapeyronie, Montpellier, France ; ⁵ IRCM, INSERM U1194, ICM, Montpellier, F-34298, France, ⁶ BIODOL Therapeutics, Cap Alpha, Clapiers, France.

§ current address: University of North Carolina at Chapel Hill, Neuroscience center, Mary Ellen Jones, building, Chapel Hill, NC 27599, USA

* Corresponding author: cyril.rivat@umontpellier.fr

Abstract

Background. Acute pain events have been associated with persistent pain sensitization of nociceptive pathways increasing the risk of transition from acute to chronic pain. However, it is unclear whether injury-induced persistent pain sensitization can promote long-term mood disorders. The receptor tyrosine kinase FLT3 is causally required for peripheral nerve injury-induced pain chronification, questioning its role in the development of pain-induced mood alterations.

Methods. In a model of paw incisional pain, mice underwent single (SI) or double incision (DI) and went through behavioral and molecular phenotyping with the evaluation of both sensorial and emotional pain components. The role of FLT3 was then investigated either by inhibition using transgenic knock-out mice and functional antibodies or by activation with FLT3 ligand (FL) administrations.

Results. DI mice showed significant anxiodepressive-like and spontaneous pain behaviors while SI mice did not. DI also promoted and extended mechanical pain hypersensitivity compared to SI. This emotional and sensorial pain exaggeration correlated with a potentiation of spinal microglial activation after DI versus SI. Intrathecal minocycline, a microglial inhibitor, specifically reversed DI induced-mechanical hypersensitivity. Finally, FL injections in naive animals provoked mechanical allodynia and anxiodepressive-like disorders concomitant with a significant microglial activation while FLT3 inhibition blunted the development of persistent pain and depression after DI.

Conclusions. Our results show for the first time that the repetition of a peripheral lesion facilitates not only exaggerated nociceptive behaviors but also anxiodepressive disorders. The inhibition of FLT3 could become a promising therapy in the management of pain sensitization and related mood alterations.

Introduction

Understanding the transition from acute to chronic pain remains an important challenge to better manage pain in patients (1). This is specifically true in the context of surgery where chronic post-surgical pain (CPSP) is a significant debilitating and under-evaluated disease affecting several millions of people each year in the world (2–5). Pre-existing pain is one major risk factor as it profoundly modifies patient's internal homeostasis altering the degree of pain sensitization of the patient (6–8). Hence, sensitization after sensorial trauma appears to be a crucial event in the development of chronic pain by amplifying signaling in previously affected nociceptive pathways (9). Animal models called “hyperalgesic priming” are classically used to study the neuroplasticity underlying persistent pain sensitization (10–18). These models consist in performing an initial nociceptive stimulation that induces a prolonged period of susceptibility to exaggerated sensitization after a subsequent stimulation. This phenomenon has been named latent pain sensitization (19) and its mechanisms have been further studied (20–22). The clinical observation that the incidence of chronic pain after injury is largely associated with pre-injury pain status (6) suggests that the maintenance of latent sensitization may facilitate the transition from acute to persistent pain. Mood disorders such as depression and anxiety are frequently observed in patients suffering from chronic pain. It has been reported that at least 50% of chronic pain patients experience a major depressive disorder (23), making depression and chronic pain together a major comorbidity (24–26). Similarly, persistence of mood disorders becomes a maladaptive process maintained by neuropathological mechanisms that can aggravate the sensory abnormalities of chronic pain (27,28). Although this comorbidity is clinically well established, the underlying pathophysiological mechanisms remain poorly understood. It has been proposed that depression is a consequence of the presence of chronic pain (29,30) and that peripheral nociceptive inputs may act as a trigger for mechanisms that leave predisposed individuals at increased risk of anxiodepressive disorders. Thus, we hypothesize that peripheral nociceptive inputs may generate sustained neurochemical alterations (latent sensitization) leading to affective disorders after subsequent re-exposure to nociceptive stimuli as shown with exaggerated pain hypersensitivity in hyperalgesic priming models. To date, the affective dimension has never been studied in animal models of hyperalgesic priming. Importantly, this incomplete characterization has impeded the understanding of the role of peripheral nociceptive inputs in the development of affective disorders. Hence, to test our hypothesis, we characterize a model of repeated hind paw injuries where the animals underwent two hind paw surgery 7 days apart, by studying both sensorial and affective alterations with behavioral and molecular approaches. This allows us to determine whether repeated exposure to peripheral noxious stimuli can trigger both exaggerated pain hypersensitivity and maladaptive processes leading to anxiodepressive disorders.

Recently, we reported the expression of the *fms*-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) in the peripheral nervous system (31) and its implication in the development and maintenance of chronic

neuropathic pain *via* its ligand, the cytokine FL (FLT3 Ligand). Originally identified as part of the hematopoietic system, we showed that FLT3, expressed in rodent DRG neurons, induces long-term modifications in DRG neurons, leading to neuronal hyperexcitability giving rise to neuropathic pain symptoms. In contrast, the genetic and pharmacological inhibition of FLT3 prevents, but also reverses, hyperexcitability and pain-related behaviors associated with nerve injury. These results strongly highlight the key role of FLT3 in the development of long-term neuropathic pain sensitization. Although its role in the sensorial component of neuropathic pain is now well established, we are still lacking evidence about the extent to which peripheral FLT3 can be involved in the central consequences of latent sensitization, especially in the affective dimension of pain. Hence, in a second objective we reveal for the first time, a FLT3 dependent peripheral sensitization that triggers both exaggerated nociceptive and affective disorders after repeated surgical injury.

Methods and materials

All the procedures were approved by the French Ministry of Research (authorization #1006). Animals were maintained in a climate-controlled room on a 12 h light/dark cycle and allowed access to food and water *ad libitum*. Male and female mice were first considered separately in behavioral procedures. Both sexes showed mechanical hypersensitivity of same intensity after intrathecal FL injection and after surgery and were similarly affected by FLT3 deletion (ANOVA followed by Bonferroni's test, $n = 8$ for both sexes and genotypes for each experiment). Thereafter, experiments were performed only on male mice. Different approaches including mainly behavior, immunohistochemistry, real time polymerase chain reaction, the development and production of humanized antibody were used to evaluate the sensorial and emotional alterations produced by repeated injuries and the contribution of FLT3 in these phenomena.

Animals

Experiments were performed in C57BL/6 naive mice (Janvier, France), mice carrying a homozygous deletion of *Flt3* (*Flt3*^{-/-} mice) (1) or *CX3CR1*^{EGFP} mice and their littermates (WT) weighing 25-30 g. All the procedures were approved by the French Ministry of Research (authorization #1006). Animals were maintained in a climate-controlled room on a 12 h light/dark cycle and allowed access to food and water *ad libitum*. Male and female mice were first considered separately in behavioral procedures. Both sexes showed mechanical hypersensitivity of same intensity after intrathecal FL injection and after surgery and were similarly affected by *Flt3* deletion (ANOVA followed by Bonferroni's test, $n = 8$ for both sexes

and genotypes for each experiment). Thereafter, experiments were performed only on male mice.

Surgeries

Paw incision models: Mice C57Bl6/J were anesthetized under isoflurane (3% vol/vol). For single incision (SI) model (2), a 0.7cm incision was applied with a number 20 blade on the skin and fascia of left hindpaw plantar surface. Subcutaneous plantaris muscle was then isolated, exposed and longitudinally incised. After hemostasis, the wound was sutured with two 6.0 absorbable sutures and the mice were finally placed in recovery cages. For double incision (DI) model (3), the same procedure was repeated on the opposite hindpaw 1 week after the first incision. Control animals underwent a Sham procedure, which consisted in isoflurane (3% vol/vol) anesthesia alone.

Chronic constriction injury (CCI) model: CCI of the sciatic nerve was performed as described previously (4) and adapted for mice (5). Briefly, skin was incised and the sciatic nerve was exposed unilaterally at the mild-high level by dissecting through the biceps femoris. Three ligations (catgut 6.0) were loosely tied around the sciatic nerve with about 1 mm spacing to reduce blood flow. The skin was then closed with staples. In Sham-operated animals the sciatic nerve was exposed without ligation.

Injections

FL injections: To study FL induced microgliosis, human FL (50ng/5 μ l) produced as previously described (6) or vehicle was intrathecally injected daily for 3 days, spinal cords were then collected for immunohistochemistry. To know whether FL can induce anxiodepressive-like disorders, mice underwent FL or vehicle intrathecal injection (50ng/5 μ l) every 3 days during 15 days and were subjected to anxiodepression testing 24 hours after the last injection. Curative minocycline was intrathecally injected 3 days post-incision or sham at a dose of 300 μ g/5 μ l/mouse. Preventive GW2580 was intrathecally injected during surgery or sham at a dose of 1 μ g/5 μ l/mouse. Preventive administration of mAbA3 consisted in a single intraperitoneal injection (200 μ g in 200 μ l) during the first incision. Repeated injections consisted in 1 injection every 2 days during the first incision phase for a total of 4 injections for the evaluation of anxiodepressive-like behaviors 2 weeks post-injury.

Production of human recombinant FL (rh-FLT3-L)

Recombinant FL was produced in the E. coli Rosetta (DE3) strain (Novagen) in our laboratory using the pET15b-rhFL plasmid according to the protocol described (7) with some minor modifications. The rh-FL was checked for endotoxin content using the Pyrogen Recombinant Factor C endotoxin detection assay from LONZA (Walkersville MD, USA) and was found free of endotoxins.

Anti-FLT3 antibody development and production

Three anti-FLT3 human and murine cross-reacting scFv antibodies were selected by phage display from the human scFv synthetic library HuscI (8,9) after sequential panning against recombinant human-FLT3-hFc and murine FLT3-hFc (R&D systems). The human scFv were reformatted as a chimeric human/murine IgG2a with Fc N297A mutation to block FcγR binding and thus antibody-mediated immune cells and complement recruitment. Recombinant mAb was produced using HEK-293T cells after transfection with polyethylenimine PEI (Polyscience) and purified using protein A chromatography. Antibody was eluted at acidic pH (glycine.HCl pH 2.7), and the solution immediately neutralized with Tris.HCl buffer, pH 9.0. Antibody was concentrated and dialyzed against PBS using an ultrafiltration centrifugal device with a cut-off of 50 kDa, sterilized by 0.2 μm filtration and stored at 4 °C. A test for the presence of endotoxins was performed and was lower than 0.25 EU/mg.

Affinity measurements of Anti-FLT3 antibody for human and murine FLT3

The surface plasmon resonance (SPR) experiments were performed on a T200 apparatus at 25°C on CM5S dextran sensor chip in HBS-EP+ buffer (20mM Hepes Buffer pH7.4 containing 150mM of NaCl and 0.05% P20 surfactant). Recombinant human and murine FLT3 hFc Chimeric (R&Dsystems) were captured on anti-human Fc using Ab human Capture Kit (Cytiva) according to the manufacturer's instructions (Cytiva) and increasing concentrations (from 0.75 to 100mM) of anti-FLT3 were injected at 50μl/min. A pulse of 3M MgCl₂ was used as regenerant between cycles. The kinetic constants were evaluated from the sensorgrams after double-blank subtraction with T200 Evaluation software (Cytiva) using a bivalent fitting model.

Behavioral testing

Mechanical nociception assay: Tactile withdrawal threshold was determined in response to probing of the hindpaw with eight calibrated von Frey filaments (Stoeling, Wood Dale, IL, USA) in logarithmically spaced increments ranging from 0.04 to 8 g. Filaments were applied perpendicularly to the plantar surface of the paw. The 50% paw withdrawal threshold was determined in grams by the Dixon nonparametric test (10). The protocol was repeated until four changes in behaviour occurred.

Heat test: A radiant heat source (plantar test Apparatus, IITC Life Science, Woodland Hills, USA) was focused onto the plantar surface of the paw. The paw withdrawal latency was recorded. A maximal cut-off of 20 s was used to prevent tissue damage.

Anxiodepression testing: Splash test (ST), Novelty suppressed feeding test (NSF) and Forced swim test (FST) were conducted as previously described (11-131).

Rotarod test. The speed was set at 10 rpm for 60 s and subsequently accelerated to 80 rpm over 5 min. The time taken for mice to fall after the beginning of the acceleration was recorded.

Conditioned place preference (CPP). Pain-induced tonic aversive state can be unmasked by the administration of non-rewarding and rapidly acting analgesic drugs such as clonidine. All experiments were conducted by using the single trial CPP protocol as described previously for rodents (14). The apparatus (bioseb) consists in 2 chambers (size 20 cm x 18cm x 25 cm) distinguished by the texture of the floor and by the wall patterns connected to each other by a central chamber (size 20 cm x 7 cm x 25 cm). First, animals went through a 3-day pre-conditioning period with full access to all chambers for 20 minutes. Mice underwent surgery (SI or DI) the first day of this period. At this step, mice with a spontaneous preference up to 75% were removed from experiment. Day 4 is the conditioning day. Briefly, mice received saline intrathecal injection (5 μ l) and were restricted for 15 minutes to one chamber. 4 hours later, mice received clonidine intrathecal injection (1 μ g/5 μ l) and were restricted for 15 minutes to the opposite chamber. On the test day (d5), 20 h after the afternoon pairing and 4 days after surgery, mice were placed in the middle chamber of the CPP box with all doors open so animals could have free access to all chambers. The time spent in each chamber was recorded for 20 min for analysis of chamber preference.

Retrograde labelling

10µl of 1% Fluorogold was applied on the open wound incision during surgery. DRGs were then dissected 7 days after in PBS and post-fixed for 15 minutes in 4% paraformaldehyde (PFA). Tissues were rinsed twice in PBS before immersion overnight in 25% sucrose/PBS at 4°C and were finally frozen. Frozen DRGs were then subjected to cryosection and imaging. Images were collected using a Carl Zeiss LSM 700 confocal microscope and were processed with ZEN software.

Immunohistochemistry

Mice were transcardially perfused with PBS followed by 4% formaldehyde for all experiments. DRG (L4-L6), spinal cord (lumbar segment), and brains were collected and post-fixed in 4% paraformaldehyde between 10 min to 12 hours depending on the antibody and tissue before being cryoprotected in 30% sucrose in PBS. Tissues were then frozen in O.C.T (Sakura Finetek). Sections (DRG : 12 µm ; Spinal cord: 14µm) were prepared using the Cryostat Leica CM2800E. Brain sections were prepared using a Vibratome. For immunostaining, frozen sections were blocked and permeabilized in Ca²⁺/Mg²⁺-free PBS (PBS 1× -/-) containing 10% donkey serum and 0.1% or 0.3% Triton x-100 during 30 min. The sections were then incubated with primary antibodies, at 4 °C overnight in PBS 1× -/- containing 1% donkey serum and 0.1%, 0.01, or 0.03% Triton x-100. After extensive wash in PBS 1× -/- (3 times for 10 min minimum each) sections were incubated with appropriate secondary antibody conjugated to AlexaFluor and Hoechst (Sigma 1 µg/ml), in the same buffer as the primary antibodies, at room temperature for 1 h and then washing (three times for 15 min each) before mounting with Mowiol.

Immunostainings were performed with the following antibodies (see table 1): ATF3 (Santa Cruz), CSF1 (R&D), Iba1 (Wako), GFAP (abcam), CGRP (abcam), NeuN (Millipore), BrdU (Abcam), and fluorophore coupled secondary antibodies (Alexa Fluor 488, 555, 594, 647) (Invitrogen). Images were collected with a Carl Zeiss LSM 700 microscope or a Zeiss Axioscan slides scanner and were processed with Fiji/ImageJ (NIH). Corresponding images (e.g. ipsilateral vs. contralateral; FL vs vehicle; wt vs. mutant) were processed in an identical manner. Each experiment was performed in at least 3 animals. For proliferation assays, BrdU (Sigma) was injected intraperitoneally into adult mice (2 mg/animal), 24 hr before sacrifice. For BrdU detection, slides were incubated in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) at 95°C for 15 min, then at room temperature (RT) for 15 min and subjected to immunostaining.

Antigen	Specie	Dilution	Ref
NeuN	Guinea pig	1/2000	Millipore ABN90
ATF3	Rabbit	1/500	Santa cruz 188
CSF1	Goat	1/500	R&D AF416
IBA1	Rabbit	1/500	Wako
Brdu	Rat	1/500	Abcam ab6326
CGRP	Goat	1/300	Abcam ab36001
GFAP	Chicken	1/1000	Abcam ab4674

Table S1: Antibodies list for immunohistochemistry

RNA isolation and real time polymerase chain reaction

Dorsal spinal cords were dissected, ipsilateral and contralateral parts were separated and tissues were stored at -80°C until RNA extraction with the TRI reagent/ chloroform technique following the protocol of the manufacturer (sigma). After extraction, samples were treated with DNase (M610A, promega) and reverse transcribed. Q-PCR reactions were made in 96 well plates with a final volume of 10µl composed of 3µl cDNA (final dilution 1 : 90), 0.5µM of forward and reverse primers and 5µl of SybrGreen I master mix (Roche life Sciences). Measures were realized with a LightCycler 480 (Roche). Results were normalized with the geometric mean of 2 housekeeping genes, *Ddx48* and *Ywaz*, defined beforehand with a screening of 10 housekeeping genes on our samples. Relative quantification of PCR products was realized with delta-CT method (15).

Gene	Forward primers	Reverse primers
<i>Atf3</i>	ACAACAGACCCCTGGAGATG	CCTTCAGCTCAGCATTCA
<i>Sprr1a</i>	CCAGCAGAAGACAAAGCAGA	GGGCAATGTTAAGAGGCTCA
<i>Cd11b</i>	ACATGTGAGCCCCATAAAGC	AATGACCCCTGCTCTGTCTG
<i>Iba1</i>	GGATCAACAAGCAATTCCTCGA	AGCCACTGGACACCTCTCTA
<i>Csf1</i>	TGCTAAGTGCTCTAGCCGAG	CCCCAACAGTCAGCAAGAC
<i>Csf1r</i>	ACACGCACGGCCACCATGAA	GCATGGACCGTGAGGATGAGGC
<i>Gfap</i>	GCCACCAGTAACATGCAAGA	GCTCTAGGGACTCGTTCGTG
<i>Flt3</i>	ATCCCCAGAAGACCTCCAGT	CTGGGTCTCTGTACGTTCA
<i>Fl</i>	TTGTGGAGCCTCTTCCTAGC	AGGTGGGAGATGTTGGTCTG

<i>Ube2e3</i>	TGCTGGGCCTAAAGGAGATA	TCCCTGACTGTTGATGTTGC
<i>Ywaz</i>	TAGGTCATCGTGGAGGGTCG	GAAGCATTGGGGATCAAGAACTT

Table S2: Primers list for RT-qPCR

In situ hybridization

Sense and antisense digoxigenin (DIG)-labelled RNA probes were generated from a mouse Flt3 cDNA clone (IRAMp995N1310Q, GenomeCUBE Source Bioscience) in a 20 µl reaction containing 1 µg of linearized plasmid (digested with HindIII and NheI respectively) using the DIG RNA labelling mix (Roche Diagnostics) and T7 and Sp6 RNA polymerases respectively (Promega) following the manufacturer's instructions. DIG-labelled RNA probes were purified on MicroSpin G50 columns (GE Healthcare). Naive or DI-injured WT and CX3CR1^{EGFP} mice were euthanized by Euthasol vet injection (25µl). Spinal cords were dissected in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed for 30 min in 4% PFA at room temperature. Tissues were rinsed twice in PBS before immersion overnight in 25% sucrose/PBS at 4°C. In situ hybridization was performed with standard procedures on transverse sections of 14 µm as described (16). Image acquisition was done using an Axioscan slides scanner ZEISS.

HTRF binding assay

Tag-lite binding assays were performed 24 h after transfection on fresh cells in 96-well plates. Cells were incubated with 0.5 nM Red-FL in the presence of increasing concentrations of anti-FLT3 mAb to be tested and incubated for 1h at Room temperature prior to the addition of Red-FL. Plates were then incubated at room temperature for overnight before signal detection.

HTRF autophosphorylation assay

RS4-11 cells were used to carry out this assay in suspension in 384-well small volume plates to determine the degree of phosphorylation of FLT3 receptor. In the plates containing RS4-11 cells, anti-FLT3 mAb to be tested were added and incubated for 90min at room temperature prior to the addition of rh-FL at 10 or 1 nM for 10 min at room temperature. After incubation, cells were lysed and a mix of anti-FLT3 and an anti-TYR-969 FLT3 antibodies labeled with Lumi4-Tb and d2 respectively were added to the cell lysate. Plates were then incubated at room temperature for 2h before signal detection. Autophosphorylation measured in the absence of FL

represents FLT3 constitutive activity whereas that measured in the presence of FL represents FL-induced activity

Statistical analysis

Data were analysed with graphpad prism 6. Area Under Curve (AUC) was calculated based on the trapezoidal rule to have the volume of area above or under the baseline across different time points until full recovery. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. All sample sizes were chosen based on our previous studies except for animal studies for which sample size has been estimated via a power analysis using the G-power software. The power of all target values was 80% with an alpha level of 0.05 to detect a difference of 50%. Statistical significance was determined by analysis of variance (ANOVA one-way or two-way for repeated measures, over time). In all experiments in which a significant result was obtained, the test was followed by Holms-Sidak post-hoc test for multiple comparisons, as appropriate. In case of two experimental groups, unpaired two-tailed t-test was applied. For cell counting, and area quantification, statistical analyses were performed using Mann-Whitney test. The applied statistical tests are specified in each figure legend

Results

Chronic pain is characterized by a variety of symptoms including mechanical allodynia, thermal hypersensitivity, spontaneous pain and a high susceptibility to develop depression. Therein, we first determined whether a mouse model of pain sensitization triggered by repeated hindpaw incision produced alteration of emotional-related behaviors associated with exaggerated sensory behaviors. For this purpose, mice were assessed in a set of behavioral tests to evaluate emotional (ST: Splash Test; NSF: Novelty Suppressed Feeding test; FST: Forced Swim Test) and sensorial (VF: Von Frey filament test; HG: Hargreaves test; CPP: Conditioned place preference test) components after repeated acute injuries.

SI (Single Incision, one incision on the left hindpaw) (32) and DI (Double Incision, first incision on the left hindpaw and second one on the right hindpaw) models were compared and tested at three different time points after surgery: the following days after surgery (1st week post-incision), just after nociceptive recovery (2nd week post-incision) and 1 month after incision. The first week after surgery, the rotarod test did not reveal any difference between Sham, SI and DI mice indicative of an absence of motor impairment in animals with SI or DI (Fig. S1A). SI and DI mice responded to the NSF with an increased latency to eat compared to Sham mice while only DI mice responded to ST and FST with a

decreased grooming behavior and immobility, respectively (Fig. S1B-D). During the 2nd week after surgery, no difference between Sham mice and SI mice were found in all the tests while DI mice showed sustained anxiodepressive-like behaviors (Fig. 1A-C). One month after surgery, all the experimental groups returned to Sham values (Fig. S1E-G). These results are resumed in Fig. 1D. Decreased neurogenesis at the level of the dentate gyrus has been associated with depression in humans (33) and animal (34,35) studies. We therefore hypothesized that DI-induced anxiodepressive-like behaviors could decrease the rate of newborn neurons in this region as evaluated with Brdu staining. Brdu stained neurons (Brdu/NeuN colocalisation) were substantially decreased in DI mice 7 days after the surgery compared to SI and Sham mice (Fig. 1E-F) supporting the development of mood disorder in DI mice.

We also tested the effect of SI vs. DI on sensory thresholds and ongoing pain. Six hours after the first surgery, mice mechanical thresholds as measured by the VF test strongly decreased up to ten-fold in ipsilateral hindpaw (left hindpaw) indicating the appearance of mechanical allodynia (Fig. 2A). Mice recovered a normal mechanical threshold after 7 days, and mechanical threshold was unchanged in the SI contralateral hindpaw (right hindpaw). By contrast to the first incision, the second incision induced a robust decrease of mice withdrawal thresholds at the ipsilateral hindpaw (right hindpaw) and at the contralateral

ANNEXE I

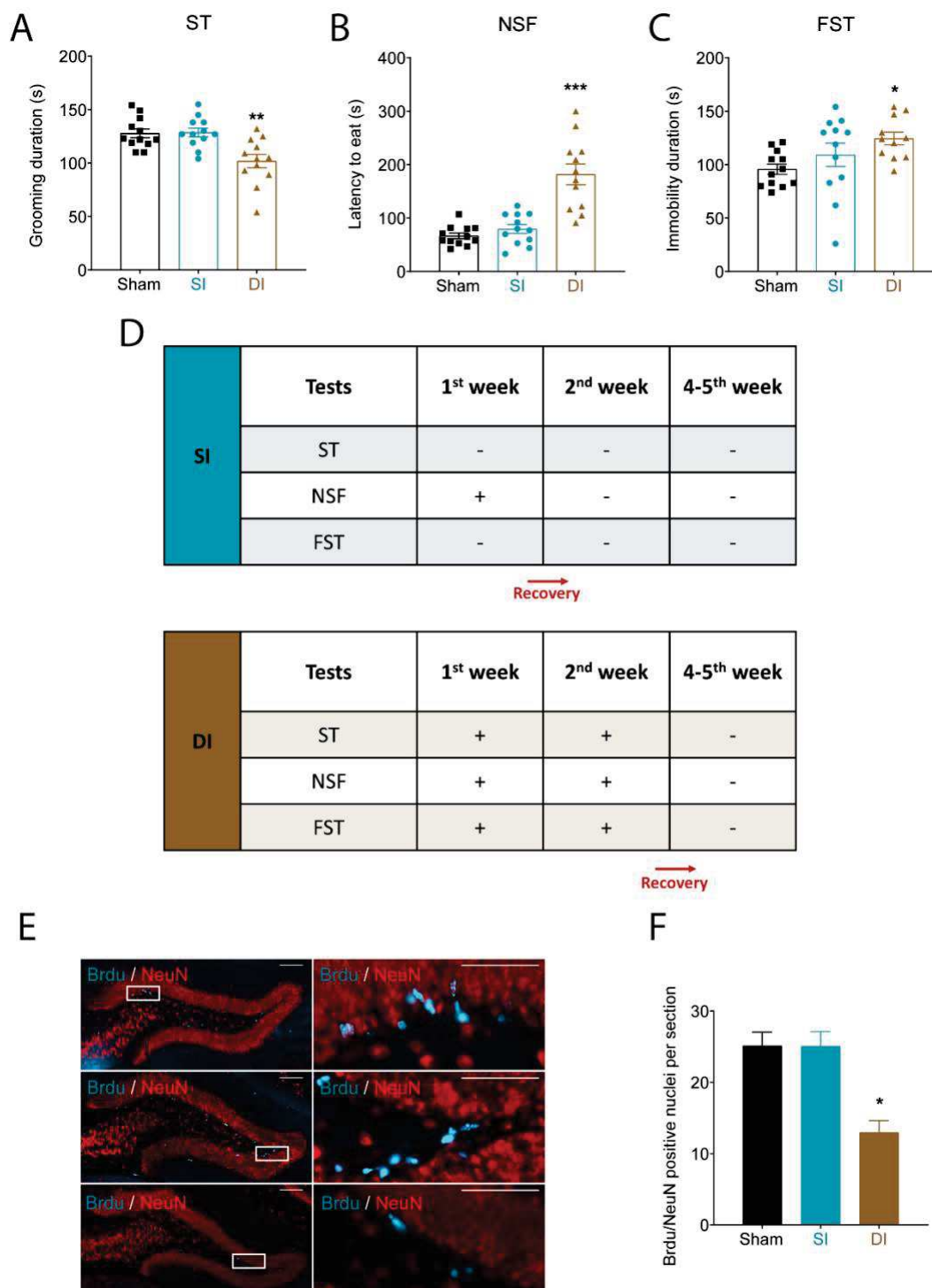


Figure 1: Influence of single (SI) or double incision (DI) on emotional related behaviors and neurogenesis. During the second week after surgery (Sham, SI, DI), (A) decreased grooming behavior in the splash test, (B) increased latency to eat in the novelty suppressed feeding test and (C) increased immobility duration in the forced swim test is observed only in DI mice compared to control mice. (D) Summary table of anxiodepressive-like behaviors in all tests at three different time points. (E) Brdu/NeuN positive nuclei per section in the dentate gyrus is significantly reduced only in DI mice 7 days post-injury (scale bars = 200µm) and (F) related quantification. All the values are means ± s.e.m. (n=12 except in E, F, n=4). One-way ANOVA and Holm-Sidak's test (A, B, C) or Kruskal-Wallis test (F); *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs. Sham.

hindpaw (left hindpaw; Fig. 2A). As reported in a previous work (36), recovery to a normal threshold of both hindpaws was delayed of 7 days compared to the first incision, with a full recovery at day 22. Area Under Curve (AUC) that represents the period of mechanical hypersensitivity observed the days after incision on the ipsilateral paw further confirmed that DI mice exhibited exaggerated mechanical pain hypersensitivity compared to SI mice (Fig. 2B). Mice also displayed prolonged thermal pain hypersensitivity after the second incision compared to the first one, as evaluated with the HG test (Fig. 2C). Therefore, we used CPP experiments 3 days after surgery (SI or DI) to assess spontaneous pain behaviors (37). Only the DI experimental group developed a place preference for the clonidine-paired chamber (Fig. 2D) indicative of significant ongoing pain in DI animals.

We then studied the peripheral nervous system alterations induced by the procedures through retrograde tracing of injured peripheral nerves. First, we administered Fluorogold to retrogradely label the DRG neurons affected by incision. At Day 7 (D7), most of the Fluorogold positive cells were found in L4 (DI: 27%; SI: 22%), few in L5 (DI, SI: ~3%) and 0% in L6 DRGs (Fig. S2A-B). Co-staining of ATF3 and CSF1, two important molecular factors specifically expressed after neuronal stress or injury (38,39) was realized at D7 (Fig. S2 C-E). Similarly, most of ATF3 and CSF1 positive neurons were found in L4 (10-15%), few in L5 (~3%) and 0% in L6 DRGs. No differences were found between SI and DI mice suggesting that these peripheral alterations are unlikely responsible for the exaggerated pain-related behaviors after DI. We next examined, using real time quantitative PCR, the expression of different markers of pain sensitization in the dorsal horn of the spinal cord. Interestingly, the nerve injury factors *Atf3* and *Sprr1a* mRNA in ipsilateral dorsal horn spinal cord were strongly increased after incision, with a potentiation in DI as compared to SI (Fig. S3). Because we found no changes in the relative expression of nerve-injury related proteins in DRG neurons and since pain-related markers mRNAs were increased in the spinal cord of DI compared to SI mice, we then investigated spinal cells alterations through the labeling of peptidergic neurons (CGRP) and glial cells (Iba1 and GFAP). CGRP staining was found increased in the injured side of SI dorsal horns compared to Sham. DI increased CGRP staining on both sides, without any significative difference between SI and DI (Fig. S4A-C). GFAP staining in astrocytes was found unchanged at D3 and D7 compared to control group (Fig. S4D-F). Markers associated with microglial activation were also quantified using RT-qPCR (Fig. 2E). Levels of *Cd11b*, *Iba1*, *Csf1* and *Csf1r* mRNA were all found higher after incision (SI or DI) but no differences were found between SI and DI conditions. By contrast, at D7, microglial *Iba1* staining density was found increased compared to Sham (SI vs. Sham: x 1.8) but also potentiated in DI compared to SI mice (DI vs. Sham: x 3.2; DI vs. SI: x 1.6) (Fig. 2F-G). To further show the implication of microglia in the exaggeration of nociceptive behaviors, we then treated Sham, SI and DI mice with a single intrathecal injection of microglial inhibitors (40), minocycline (300µg/5µl/animal) at D3, when incision-induced pain

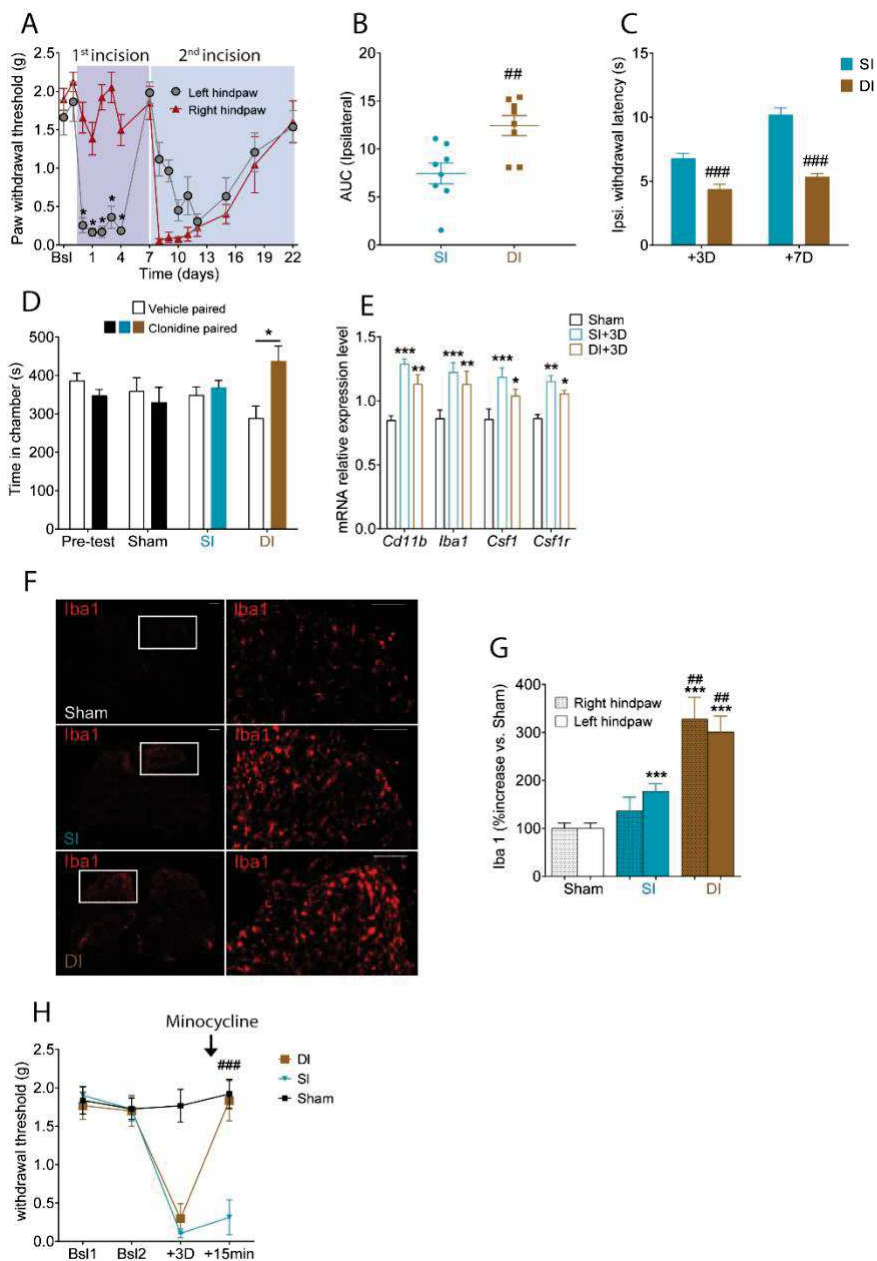


Figure 2: Influence of single (SI) or double (DI) incision on sensorial behaviors and microgliosis. (A) Mechanical hypersensitivity after incisions as measured by the Von Frey test and (B) cumulative area under curve representation show increased mechanical hypersensitivity after DI. (C) Cumulative area under curve representation of Hargreave’s test shows increased thermal hypersensitivity after DI. (D) Conditioned place preference induced by clonidine-evoked analgesia 4 days post-Sham, SI or DI. (E) Changes in spinal microgliosis related biomarkers mRNA expression as measured with RT-qPCR 3 days after Sham, SI or DI. (F) Iba1 immunoreactivity in the whole spinal cord (left panel) and zoomed dorsal horn (right panel) 7 days after Sham, SI or DI (scale bars = 200µm) and (G) related quantification. (H) Mechanical threshold of Sham, SI and DI animals before (3 days post-procedure) and 15 minutes after intrathecal injection of minocycline (300µg/mouse). All the values are means ± s.e.m. (n=8 except in D, n=10 and E-G, n=4). Two-way ANOVA and Holm-Sidak’s test (A); Student’s t-test (B-C); One-way ANOVA and Holm-Sidak’s test (D-H); *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs. Sham, baseline or vehicle paired; #P<0.05; ##P<0.01; ###P<0.001 vs. SI.

hypersensitivity was still observed. Strikingly, minocycline restored mechanical thresholds to normal values only in DI mice, whereas it had no effect in Sham or SI mice (Fig. 2H). Similar results were obtained with GW2580 (1 µg/5 µl/animal), another microglial inhibitor (41), when intrathecally administered at the time of the surgeries (Fig. S5A-B). Interestingly, mice treated with GW2580 displayed enhanced grooming behaviors during the ST and reduced latency to eat during the NSF compared to untreated mice suggesting that the inhibition of spinal microgliosis may also have an impact in the development of mood disorders (Fig. S5D-F). Collectively these data show that surgery repetition prolongs mechanical/thermal hypersensitivity and induces spontaneous pain behavior supported by potentiation of microglial activation in the spinal cord that seems responsible not only for mechanical hypersensitivity after DI but also mood disorders.

Our results here identify the overexpression of neuronal stress-related molecular markers (Sprr1a and Atf3) after DI suggesting a higher neuropathic component in DI compared to SI model. We recently showed that peripheral FLT3 inhibition prevents the development of neuropathic pain (31). Hence, we questioned the implication of FLT3 receptors in the development of exaggerated pain-related behaviors by assessing both sensorial and emotional behaviors after DI in *Flt3* Knock-out (*Flt3*^{-/-}) female and male mice. In the VF test, basal mechanical threshold was not affected by FLT3 silencing, as already described (31). After surgery, *Flt3*^{-/-} male mice displayed a faster recovery (Fig. 3A-C) along with reduced mechanical pain hypersensitivity to both the first and the second incision compared to male *Flt3* Wild Type (*Flt3*^{+/+}) mice. Similar results were observed in female *Flt3*^{-/-} mice (Fig. S6D-E). CPP experiments also confirm the presence of a place preference for the clonidine-paired chamber in the DI *Flt3*^{+/+} group. This place preference was totally prevented in DI *Flt3*^{-/-} animals (Fig. 3D). To check for a potential role of FLT3 in basal mood modulation, we compared anxiodepressive-like behaviors of *Flt3*^{-/-} with *Flt3*^{+/+} animals in naïve condition (Fig. S6A-C). No differences were observed between *Flt3*^{-/-} and *Flt3*^{+/+} mice in the ST and NSF but *Flt3*^{-/-} already displayed decreased immobility duration in the FST. Afterward, the effects of FLT3 silencing on DI-induced anxiodepressive like behaviors were evaluated. Because these behaviors require motor functions, locomotor activity and motor coordination were systematically assessed in all tested animals (Fig. 3E; Fig. S6F) and were found unchanged. *Flt3*^{-/-} animals showed no significant differences with WT mice in NSF but were significantly less immobile in the FST and presented increased grooming in the ST (Fig. 3F-H). At the molecular level, Iba1 staining in the dorsal horn of WT animals was increased whereas no change was found in *Flt3*^{-/-} animals after DI (Fig. 3I-L).

To evaluate whether local FLT3 activation alone can induce both sensorial and emotional alterations as displayed in the DI model, mice received intrathecal injections of FL (50ng/5 µl/animal) and were tested.

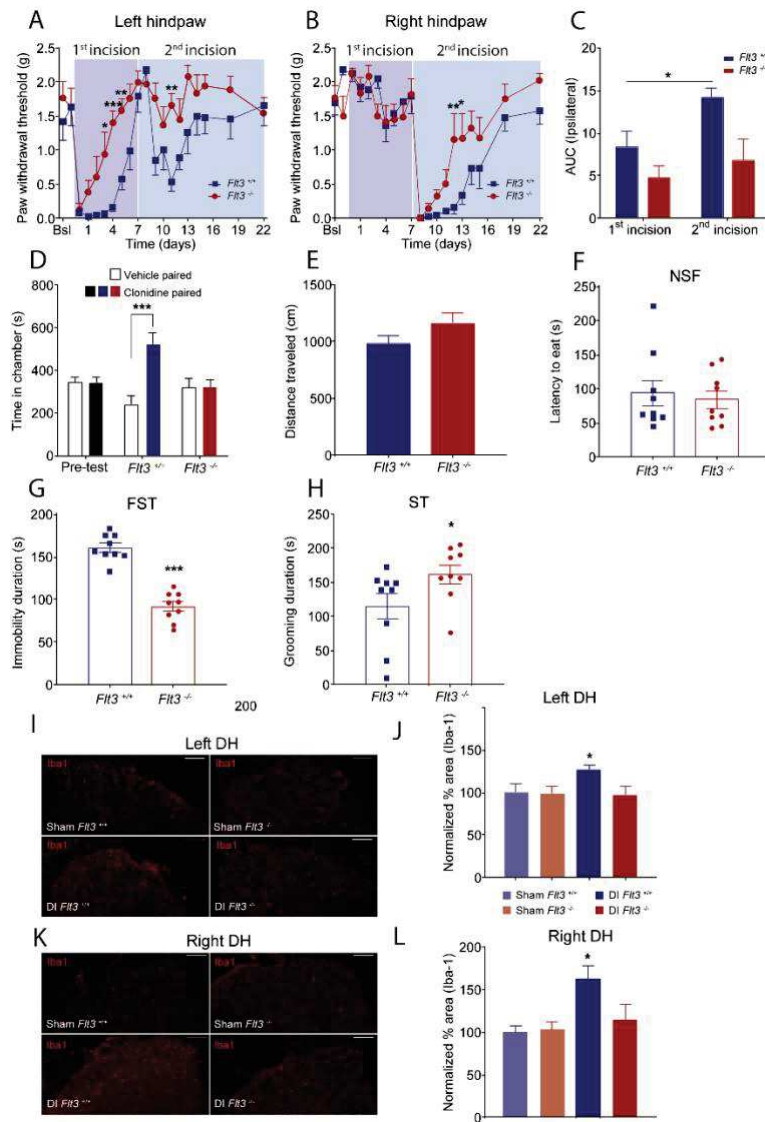


Figure 3: Silencing *Flt3* expression blocks DI-induced behavioral and molecular sensitization. (A, B) Left and right hindpaw mechanical hypersensitivity after incisions on *Flt3^{+/+}* or *Flt3^{-/-}* mice as measured by the Von Frey test and (C) cumulative area under curve representation highlight the absence of mechanical hypersensitivity exaggeration after DI in *Flt3^{-/-}*. (D) Conditioned place preference induced by clonidine-evoked analgesia 4 days post-injury is totally prevented in *Flt3^{-/-}*. Silencing *Flt3* expression did not change locomotor activity (E) and latency to eat in novelty suppressed feeding test (G), but increases grooming duration in splash test (F) and decreases immobility duration in forced swim test (H) compared to *Flt3^{+/+}* mice. (I) Iba1 immunoreactivity of spinal cord left dorsal horn dissected from Sham or DI (*Flt3^{-/-}* or control) mice and (J) related quantification show significantly higher labeling density in DI *Flt3^{+/+}* mice compared to Sham *Flt3^{+/+}*. (K) Iba1 immunoreactivity of spinal cord right dorsal horn dissected from Sham or DI (*Flt3^{-/-}* or control) mice and (L) related quantification show significantly higher labeling density in DI *Flt3^{+/+}* mice compared to Sham *Flt3^{+/+}*. All the values are means \pm s.e.m. (n=8/9 except in I-L, n=6/7). Two-way ANOVA and Holm-Sidak's test (A-B); Student's t-test (E-H); One-way ANOVA and Holm-Sidak's test (C, D, J, L); *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs. *Flt3^{+/+}* or Sham *Flt3^{+/+}* or Sham *Flt3^{-/-}*.

As previously shown, a single injection led to decreased mechanical threshold for at least 2 days (Fig. 4A). Strikingly, repeated intrathecal FL (2 weeks, 1inj/3days) failed to impair motor coordination but induced decreased grooming behavior, increased latency to eat and immobility duration on the ST, NSF and FST compared to vehicle-treated animals, respectively (Fig. 4B-E). All behaviors were significantly modified in all tests after repeated FL treatment, mimicking features of the DI model. At the cellular level, Iba1 staining was found quantitatively enhanced after repeated FL vs vehicle injections (Fig. 4F-G), confirming its effect on central changes in the spinal cord. To rule out a possible implication of FLT3 expression in microglia cells after surgery, we performed *Flt3 in situ* hybridization of spinal cord from the CX3CR1^{EGFP} mouse line, in which EGFP is expressed in CX3CR1+ cells, known as macrophages (including microglia). Our data revealed the absence of colocalization between *Flt3* mRNA and CX3CR1 (Fig. S7). These data suggest that the activation of microglia is not mediated by the microglia itself but likely through the activation of the peripheral FLT3 promoting central pain sensitization, causing emotional and sensorial alterations.

Lastly, we developed cross-reacting antibodies specifically directed against both human and mice FLT3. Functional antibodies have the interesting property to not cross the blood brain barrier and could be an advantageous tool for questioning peripheral FLT3 functions, and potentially treat postoperative pain in human. Among all the antibodies produced, the mAbA3 antibody was found to present high affinity for both receptors (Fig. 5A-B, Fig. S8). Moreover, Homogeneous Time Resolved Fluorescence (HTRF) signals of FLT3-expressing RS4-11 cells in the absence or presence of FL was strongly reduced in a dose dependent manner after exposure to mAbA3 (Fig. 5C-E). Because we know the therapeutic benefits of inhibiting FLT3 in neuropathic pain models, *in vivo* efficacy of the antibody was evaluated in the Chronic Constriction Injury (CCI) of the sciatic nerve model of neuropathic pain. Single or repeated (Fig. 6A, C) systemic injections of mAbA3 totally blocked mechanical pain hypersensitivity evaluated on the injured hindpaw. Inhibition of mechanical hypersensitivity started at a dose of 50 µg/animal of mAbA3 (Fig. 6B). We next tested the efficacy of mAbA3 in animals that underwent repeated incisions. A single preventive systemic injection of 200 µg of mAbA3 during the first incision strongly accelerated recovery to a basal mechanical threshold after both the first and the second incision on the ipsilateral hindpaw (Fig. S9A, B). Since a single injection was not able to block CPSP induced anxiodepressive like behaviors (Fig. S9D-F), several injections were made after the first incision (1 injection every 2 days until the second incision). Repeating preventive injections of mAbA3 not only reduced pain hypersensitivity but also totally prevented the development of anxiodepressive-like behaviors compared to vehicle-treated mice (Fig. 6D-H).

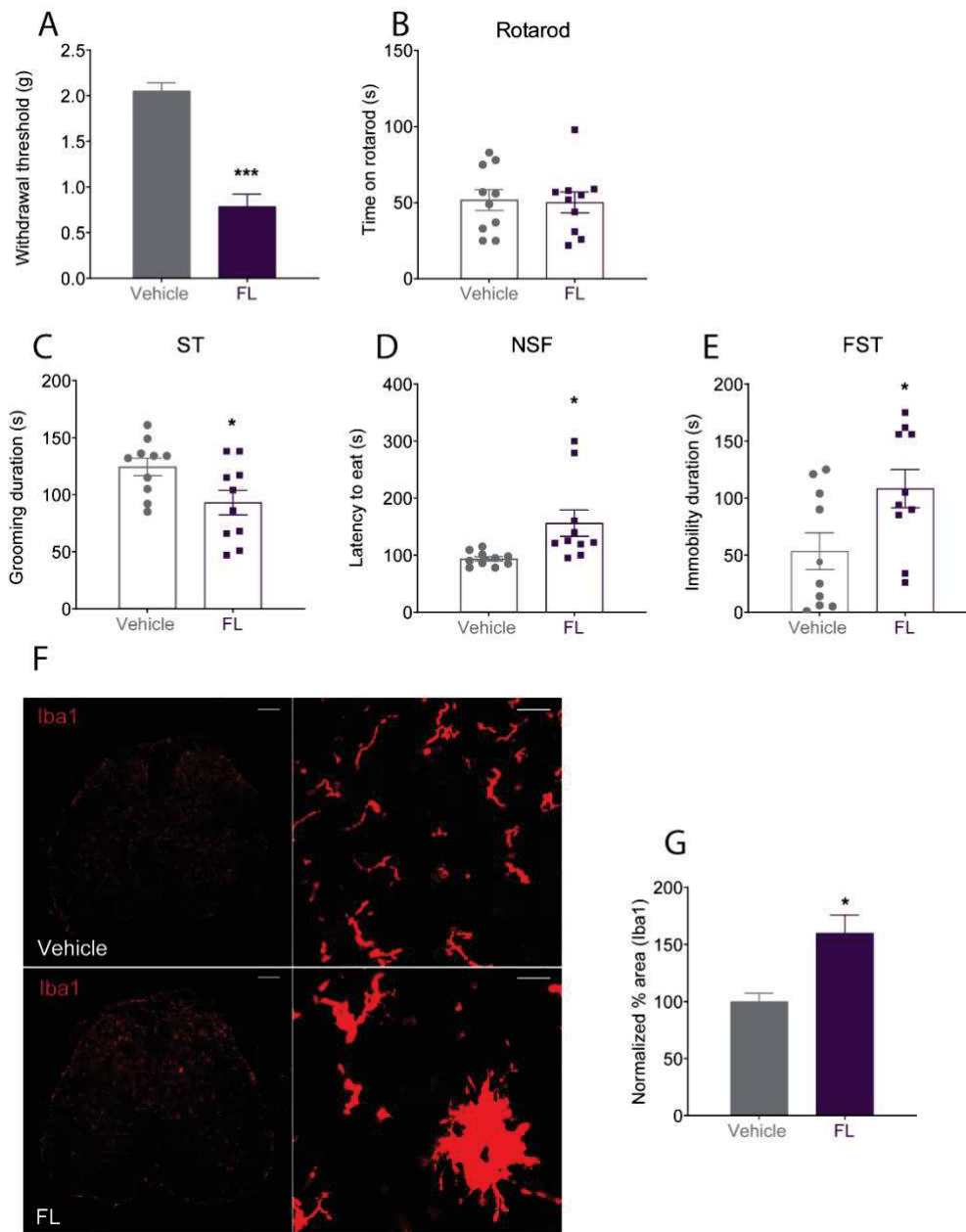


Figure 4: FL administration mimics DI induced behavioral and molecular alterations. (A) Mechanical hypersensitivity measures with Von Frey filaments after a single intrathecal injection of FL (50ng/5μl) or saline. (B) Repeated intrathecal injections of FL (50ng/5μl, 5 injections delivered across 15 days) fail to affect performance on rotarod, (C) decrease grooming duration in splash test, (D) increase latency to eat in novelty suppressed feeding test and (E) immobility duration in forced swim test compared to control injections. (F) Iba1 immunoreactivity of whole spinal cord dissected from saline injected and FL injected mice (50ng/5μl, daily injection for 3 days) 24 hours after the last injection (left scale bars = 200μm; right scale bars = 20μm) and (G) related quantification. All the values are means ± s.e.m. (n=10 except in F, G, n=4). Student's t-test (A-E); unpaired Mann-Whitney t-test (G); *P<0.05; ***P<0.001 vs. I.t. Vehicle.

Discussion

Our results show that the repetition of surgical incision (DI) leads to sustained depressive-like behaviors along with the exaggeration of nociceptive behaviors and the appearance of spontaneous pain recapitulating the different features of chronic pain in humans (42). These behaviors are associated with microglial activation in the spinal cord dorsal horn and decreased neurogenesis in the hippocampus supporting central alterations after DI. We report for the first time the implication of FLT3 in sustained pain sensitization produced by repeated injury. Strikingly, FLT3 activation alone is sufficient to recapitulate microglial activation and anxiodepressive-like behaviors observed after DI. Conversely, FLT3 deletion leads to the complete prevention of DI-related behavioral and molecular modifications. Finally, we developed an innovative therapeutic tool represented by the FLT3 human antibody (mAbA3) targeting both human and murine FLT3. Treatment with FLT3 antibodies not only blocked exaggerated pain behaviors produced by repeated surgical procedure but also the subsequent depressive-like behaviors.

To better examine the mechanisms involved in pain chronification after acute injury, we used an experimental procedure that consists of repeating a surgical incision on the opposite hindpaw of the same animals 7 days apart (36). Here, our main objective was to determine whether repeated acute injury may produce pain sensitization peripherally and centrally. To address this question, we characterized the differences observed between SI and DI at the behavioral and molecular levels. As previously reported, the pain hypersensitivity produced by the second surgery is largely enhanced compared to the one produced by the first surgery as it takes 7 days for the pain hypersensitivity to resolve after SI compared to 14 days after DI. Our data suggest that surgery, like inflammation, may produce a sustained sensitized state leading to increased vulnerability to develop persistent pain when sensitized individuals are challenged with subsequent nociceptive stimuli leading to exaggerated nociceptive behaviors (12,43). However, to our knowledge no study has evaluated the impact of such a repetition on the development of emotional disorders. Our data show for the first time that DI not only produces exaggerated pain behaviors but also leads to sustained anxiodepressive-like behaviors starting after the second injury and lasting 3 weeks post-injury. Of note, behavioral alterations are associated with reduced hippocampal neurogenesis which is consistent with the depressive phenotype described in both rodents and humans (44–47). Pre-clinical pain models already reported the existence of depressive-like behaviors that usually develop in 5-7 weeks after nerve injury (48–50). These models allow to identify the neuronal circuits supporting comorbidity of persistent pain and mood disorders (51,52). Our data shows that DI model is a very attractive model for evaluating the characteristics of peripheral and central processes induced by nociceptive inputs leading to fast and sustained pain and mood sensitization.

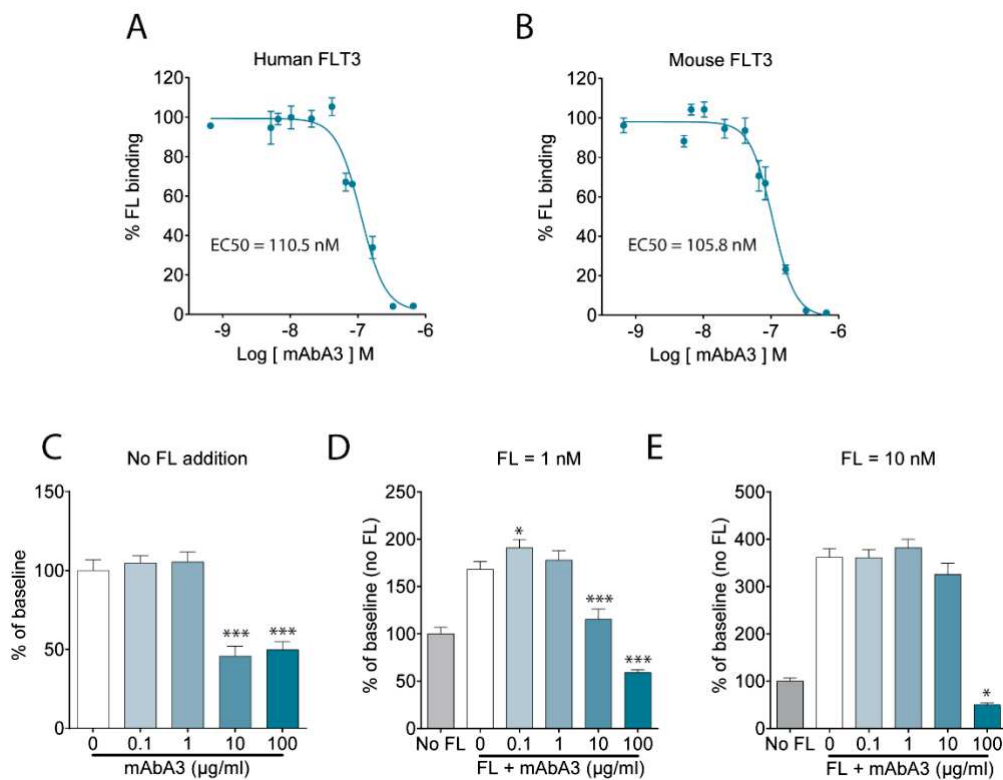


Figure 5: MAbA3 is a high affinity functional antibody against both human and murine FLT3 receptor. Binding curves of FL on human (A) and murine FLT3 (B) in presence of increasing doses of mAbA3. MAbA3 reduces in a dose dependent manner HTRF signal reporting mouse FLT3 constitutive activity (C) and FL-induced increased FLT3 activity after FL application at 1 nM (D) and 10 nM (E). All the values are means \pm s.e.m. (n=4); *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs. Baseline

As already proposed, the exaggeration of mechanical pain hypersensitivity produced by the second surgery performed in the non-operated hindpaw strongly suggests that pain sensitization is mainly affecting the central nervous system (43). This is further supported by the fact that we were unable to find a marker (ATF3 and CSF1) differentially expressed in DI compared to SI in DRG. Furthermore, retrograde labelling experiments highlight the small proportion of neurons affected by incision, mainly located in L4 DRGs. We then evaluated potential modifications in the spinal cord of these animals. We show that Iba1 immunoreactivity is significantly enhanced after DI compared to SI or control. The curative inhibition of microglial activation via minocycline or GW2580 leads to a quick recovery of pain sensitivity only after DI. Our observation agrees with previous data reporting that primed spinal microglia by neonatal incision is involved in the persistent pain in re-incised adult rat (53). Interestingly, the microglial inhibition via G2580 also reduces anxiodepressive-related behaviors. This indicates that spinal microglial overactivation

ANNEXE I

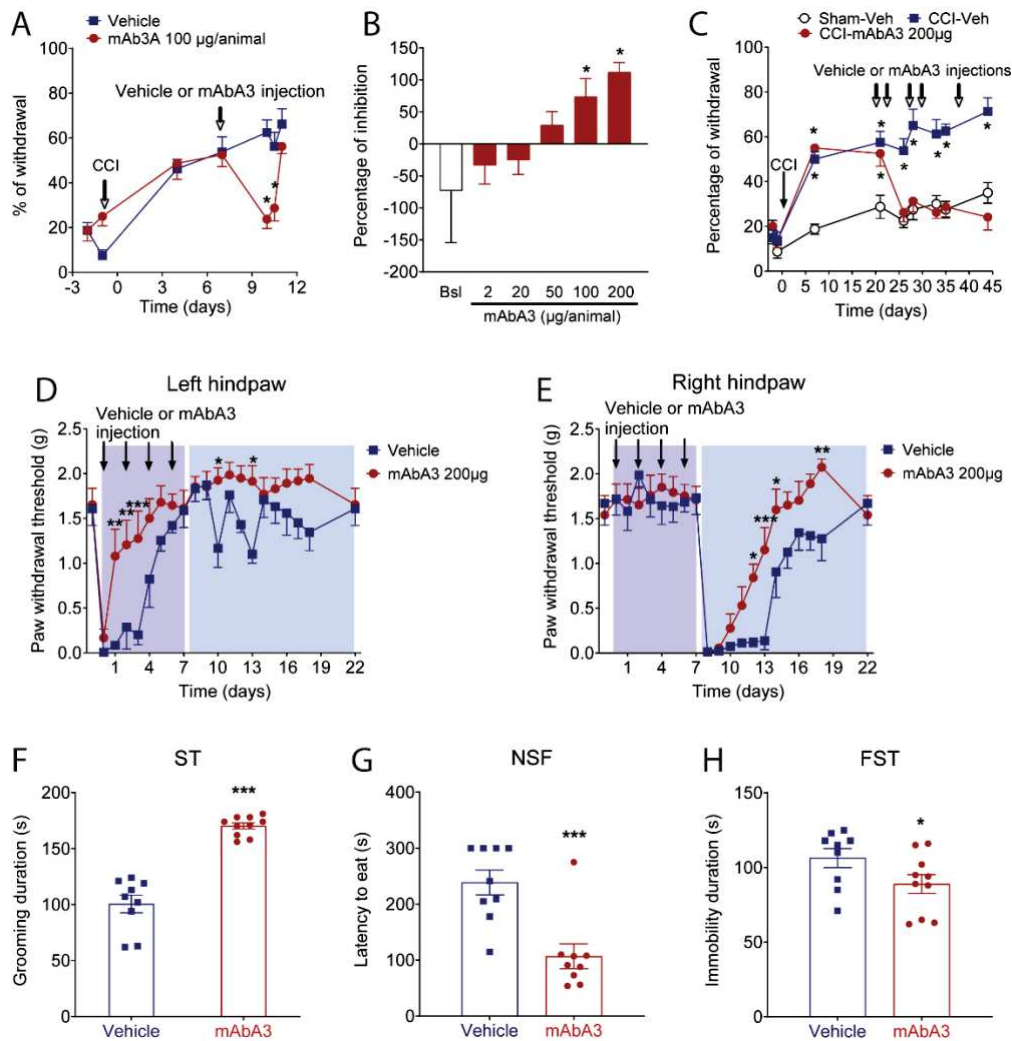


Figure 6: Functional antibodies treatment against FLT3 prevents the development of CPSP. **(A)** A single injection of mAbA3 (100µg/mouse, intraperitoneal) reduces CCI-related (9 days after chronic constriction injury of the sciatic nerve) mechanical hypersensitivity as measured 1, 1.5 and 2 days after injection in the Von Frey test. **(B)** Experiments were performed as in **A**, with doses of mAbA3 ranging from 2 to 200µg/animal. Data represent the maximum percentage of pain hypersensitivity inhibition. **(C)** Intraperitoneal vehicle (Veh) or mAbA3 injections (200µg/animal) were initiated 25 days after CCI of the sciatic nerve and repeated at times indicated by arrows. Mechanical hypersensitivity was recorded 26, 28, 33, 35 and 44 days after CCI. **(D-E)** Left and right hindpaw mechanical hypersensitivity after incisions in either vehicle or mAbA3 treated (arrows= 200µg/animal, intraperitoneal) mice as measured by the Von Frey test. Repeated intraperitoneal injections of mAbA3 (200µg/animal, 1 injection each 2 days during the first incision phase for a total of 4 injections) increases grooming duration in splash test **(F)**, decreases latency to eat in novelty suppressed feeding test **(G)** and immobility duration in forced swim test **(H)** in treated mice compared to control mice. Two-way ANOVA and Holm Sidak's test (**A-E**), Student's t-test (**F-H**); * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. Sham-Veh or Vehicle.

produced by repeated incisions promotes both the sensorial and emotional alterations caused by DI. Microglia-related genes (*Cd11b*, *Iba1*, *Csf1*, *Csf1r*) were all increased after incision, without any difference between SI and DI conditions suggesting that DI may likely induce post-transcriptional expression modifications rather than transcriptional alterations. Concerning astroglial activation, GFAP expression was not different in the spinal cord after SI or DI, as opposed to what has been reported (54). We can arguably propose that astrogliosis potentially appears later than the investigated timeframe. Furthermore, these observations were only made in rats. Altogether, our results show the strong involvement of peripheral neuron/central microglia interactions, an important mechanism of persistent central pain sensitization, in the exaggeration of nociceptive behaviors, as it has been already shown in other chronic pain models, especially after neuropathic pain (51). We further report that spinal microglia activation is also necessary in peripheral injury-induced depression-related behaviors.

In neuropathic pain models, microgliosis depends on CSF1 release by sensory neurons from DRG (39) that then reaches the spinal cord to activate microglial CSF1R. Our data emphasize a neuropathic-like component in the SI and DI models through the discovery of a peripheral CSF1 activation that is totally absent in an inflammatory pain model (55). This activation was associated with enhanced ATF3 expression in sensory neurons. Additional studies will be necessary to determine which mechanisms are critical for the over-activation of microglia after DI. Finally, the enhanced spinal expression of *Atf3* and *Sprr1a* mRNAs, two markers of nerve injury (38,56) confirms the strong neuropathic component in our models. Of note, the increased expression of these markers in DI vs. SI suggests a stronger neuropathic component in DI compared to SI supporting the clinical observation that persistent post-surgical pain is partially neuropathic in nature (57).

In the continuity of our previous work showing the involvement of FLT3 in neuropathic pain and considering the important neuropathic contribution in these models, we then evaluated the effects of FLT3 inhibition and activation in incision-induced central sensitization. Absence of *Flt3* expression in *null* mutant mice leads to faster recovery of pain hypersensitivity after incision, and to a total prevention of spontaneous pain and anxiodepressive-like behaviors. Beneficial behavioral effects of FLT3 silencing are common to both males and females. Spinal microgliosis activation is also reduced in *Flt3*^{-/-} animals. Interestingly, FL alone can activate microglia in the dorsal horn of the spinal cord and to recapitulate many aspects of pain sensitization exhibited in DI. The effect of FL seems to be neuron dependent since *Flt3* mRNA is absent in CX3CR1 positive cells. Moreover, since *Flt3* mRNA is totally absent in the

superficial dorsal horn layers of the spinal cord, it is tempting to speculate that the intrathecal injection of FL leads to the activation of peripheral FLT3. Altogether, our data suggest that FLT3 expressed in the DRG can produce persistent central pain sensitization via spinal microgliosis. We then developed functional antibodies (mAbA3) in order to reach high affinity and specificity for both mouse and human FLT3 using phage-display and a scFv synthetic library (58,59). Our data show that a single injection of mAbA3 is sufficient to prevent surgery-induced exaggerated pain hypersensitivity but insufficient to prevent the development of surgery-induced anxiodepressive disorders. We then considered the administration of repeated antibodies starting before the first surgery and repeated every two days until the second surgical challenge. The preventive use of mAbA3 also largely decreases the time of recovery and totally hinders the development of anxiodepressive disorders. These results clearly support the role of peripheral neuronal FLT3 in the development of pain sensitization after repeated injury as the crossing of functional antibodies into the central nervous system is impeded by the blood-brain barrier. Remarkably, we discovered that FLT3 is causally required for the pro-nociceptive effects of microglia. This important finding not only illuminates the neurobiology of pain and microglia function, but also emphasize the relevance of developing therapeutics, like functional antibodies targeting FLT3 for the treatment of chronic pain.

In conclusion, we demonstrate that repeated peripheral incisions lead both to sensorial and emotional alterations through central pain sensitization. These alterations correlate with spinal microglia over-activation which is responsible for DI-induced mechanical hypersensitivity. Increased expression of axonal regeneration genes and markers of neuropathy unveil the strong neuropathic component in our models, particularly in DI. Our study supports peripheral FLT3 as an important upstream neuronal modulator of spinal microgliosis involved in central pain sensitization leading to exaggerated pain-related behaviors and anxiodepressive disorders. Consequently, targeting FLT3 via functional antibodies against both human and mice FLT3 efficiently alleviates sensitization. Collectively, these data open new avenues for the management of the prevention of pain sensitization and chronification.

Author contribution

CR, JV designed the project; AT, DG, IM, MT, AJ, CS, LD, JPL did the experiments; MC, MN, BR, PM generated mAbA3; AT, DG analyzed the data; JV, CR provided resources; XC, CR directed the work; AT, CR and JV wrote the manuscript.

Acknowledgments and Disclosure

This work was supported by the University of Montpellier and grants from the READYNOV Région Occitanie and European community program, SFETD (Gisèle Guilbaud 2019 price), CBS2 doctoral school and BIODOL therapeutics. We are grateful to F. Perrin for providing CX3CR1^{EGFP} mouse line, to B. Pau to help for designing FLT3 antibody strategy, to P. Sokoloff, P. Carroll and I. Yalcin for constructive comments on the manuscript. MAbA3 was produced by GenAc platform funded by the French National Research Agency under the program “Investissements d’avenir” Grant Agreement LabEx MAbImprove: ANR-10-LABX-53 and by the SIRIC Montpellier-Cancer under Grant Agreement “INCa-DGOS-Inserm 6045.

Conflict of interest statement: **The authors declare no conflict of interests**

Bibliography

1. Price TJ, Gold MS (2018): From mechanism to cure: Renewing the goal to eliminate the disease of pain. *Pain Medicine (United States)*. <https://doi.org/10.1093/pm/pnx108>
2. Richebé P, Capdevila X, Rivat C (2018): Persistent Postsurgical Pain: Pathophysiology and Preventative Pharmacologic Considerations. *Anesthesiology*. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002238>
3. Fregoso G, Wang A, Tseng K, Wang J (2019): Transition from acute to chronic pain: Evaluating risk for chronic postsurgical pain. *Pain Physician* 22: 479–488.
4. Macrae WA (2008): Chronic post-surgical pain: 10 Years on. *Br J Anaesth* 101: 77–86.
5. Montes A, Roca G, Sabate S, Lao JI, Navarro A, Cantillo J, Canet J (2015): Genetic and Clinical Factors Associated with Chronic Postsurgical Pain after Hernia Repair, Hysterectomy, and Thoracotomy: A Two-year Multicenter Cohort Study. *Anesthesiology* 122: 1123–1141.
6. McGreevy K, Bottros MM, Raja SN (2011): Preventing chronic pain following acute pain: Risk factors, preventive strategies, and their efficacy. *Eur J Pain Suppl*. <https://doi.org/10.1016/j.eujps.2011.08.013>
7. Kehlet H, Jensen TS, Woolf CJ (2006): Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68700-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68700-X)
8. Aasvang EK, Gmaehle E, Hansen JB, Gmaehle B, Forman JL, Schwarz J, *et al.* (2010): Predictive risk factors for persistent postherniotomy pain. *Anesthesiology* 112: 957–969.
9. Glare P, Aubrey KR, Myles PS (2019): Transition from acute to chronic pain after surgery. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30352-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30352-6)
10. Dina OA, McCarter GC, De Coupade C, Levine JD (2003): Role of the sensory neuron cytoskeleton in second messenger signaling for inflammatory pain. *Neuron* 39: 613–624.
11. Parada CA, Reichling DB, Levine JD (2005): Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKC ϵ second messenger pathways. *Pain* 113: 185–190.
12. Reichling DB, Levine JD (2009): Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. *Trends in Neurosciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.07.007>
13. Bogen O, Alessandri-Haber N, Chu C, Gear RW, Levine JD (2012): Generation of a pain memory in the primary afferent nociceptor triggered by PKC ϵ activation of CPEB. *J Neurosci* 32: 2018–2026.
14. Moy JK, Khoutorsky A, Asiedu MN, Black BJ, Kuhn JL, Barragán-Iglesias P, *et al.* (2017): The MNK–eIF4E signaling axis contributes to injury-induced nociceptive plasticity and the development of chronic pain. *J Neurosci* 37: 7481–7499.
15. Kim J, Salim M, Moy JK, Asiedu MN, Galo M, Vagner J, Price TJ (2016): Neuroligin 2 regulates spinal

- GABAergic plasticity in hyperalgesic priming, a model of the transition from acute to chronic pain. *Pain* 157: 1314–1324.
16. Kim JY V., Tillu D V., Quinn TL, Mejia GL, Shy A, Asiedu MNK, *et al.* (2015): Spinal dopaminergic projections control the transition to pathological pain plasticity via a D1/D5-mediated mechanism. *J Neurosci* 35: 6307–6317.
 17. Asiedu MN, Tillu D V., Melemedjian OK, Shy A, Sanoja R, Bodell B, *et al.* (2011): Spinal protein kinase M ϵ underlies the maintenance mechanism of persistent nociceptive sensitization. *J Neurosci* 31: 6646–6653.
 18. Melemedjian OK, Asiedu MN, Tillu D V., Peebles KA, Yan J, Ertz N, *et al.* (2010): IL-6- and NGF-induced rapid control of protein synthesis and nociceptive plasticity via convergent signaling to the eIF4F complex. *J Neurosci* 30: 15113–15123.
 19. Rivat C, Laboureyras E, Laulin JP, Le Roy C, Richebé P, Simonnet G (2007): Non-nociceptive environmental stress induces hyperalgesia, not analgesia, in pain and opioid-experienced rats. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301340>
 20. Taylor B, Sinha G, Donahue R, Grachen C, Morón JA, Doolen S (2019): Opioid Receptors Inhibit the Spinal AMPA Receptor Ca²⁺ Permeability that Mediates Latent Pain Sensitization. *Exp Neurol* 314: 58–66.
 21. Marvizon JC, Walwyn W, Minasyan A, Chen W, Taylor BK (2015): Latent sensitization: A model for stress-sensitive chronic pain. *Curr Protoc Neurosci* 2015: 9.50.1-9.50.15.
 22. Custodio-Patsey L, Donahue RR, Fu W, Lambert J, Smith BN, Taylor BK (2020): Sex differences in kappa opioid receptor inhibition of latent postoperative pain sensitization in dorsal horn. *Neuropharmacology* 163: 107726.
 23. Maletic V, Raison CL (2009): Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. *Front Biosci*. <https://doi.org/10.2741/3598>
 24. Bair M, Robinson R, Katon W, Kroenke K (2003): Depression and Pain Comorbidity A Literature Review. *Arch Intern Med* 20: 2433–2445.
 25. McWilliams LA, Goodwin RD, Cox BJ (2004): Depression and anxiety associated with three pain conditions: Results from a nationally representative sample. *Pain* 111: 77–83.
 26. Simon G, VonKorff M, Piccinelli M, Fullerton C, Ormel J (1999): AN INTERNATIONAL STUDY OF THE RELATION BETWEEN SOMATIC SYMPTOMS AND DEPRESSION. *new Engl J Med* 341: 1329–1335.
 27. Arntz A, Dreessen L, De Jong P (1994): The influence of anxiety on pain: attentional and attributional mediators. *Pain* 56: 307–314.
 28. Ploghaus A, Narain C, Beckmann CF, Clare S, Bantick S, Wise R, *et al.* (2001): Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. *J Neurosci* 21: 9896–9903.
 29. Dworkin, Robert H., Gitlin M (n.d.): Clinical Aspects of Depression in Chronic Pain.4.pdf.
 30. Sheng J, Liu S, Wang Y, Cui R, Zhang X (2017): The Link between Depression and Chronic Pain: Neural Mechanisms in the Brain. *Neural Plast* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9724371>
 31. Rivat C, Sar C, Mechaly I, Leyris JP, Diouloufét L, Sonrier C, *et al.* (2018): Inhibition of neuronal FLT3 receptor tyrosine kinase alleviates peripheral neuropathic pain in mice. *Nat Commun*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03496-2>
 32. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF (1996): Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(95\)01441-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(95)01441-1)
 33. Eisch AJ, Petrik D (2012): Depression and hippocampal neurogenesis: A road to remission? *Science (80-)* 338: 72–75.
 34. Blugeot A, Rivat C, Bouvier E, Molet J, Mouchard A, Zeau B, *et al.* (2011): Vulnerability to depression: From brain neuroplasticity to identification of biomarkers. *J Neurosci* 31: 12889–12899.
 35. Bouvier E, Brouillard F, Molet J, Claverie D, Cabungcal JH, Cresto N, *et al.* (2017): Nrf2-dependent persistent oxidative stress results in stress-induced vulnerability to depression. *Mol Psychiatry* 22: 1701–1713.
 36. Cabañero D, Campillo A, Célérier E, Romero A, Puig MM (2009): Pronociceptive effects of remifentanyl in a mouse model of postsurgical pain: Effect of a second surgery. *Anesthesiology*. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181bfab61>

37. King T, Vera-Portocarrero L, Gutierrez T, Vanderah TW, Dussor G, Lai J, *et al.* (2009): Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nat Neurosci*. <https://doi.org/10.1038/nn.2407>
38. Obata K, Yamanaka H, Fukuoka T, Yi D, Tokunaga A, Hashimoto N, *et al.* (2003): Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Pain* 101: 65–77.
39. Guan Z, Kuhn JA, Wang X, Colquitt B, Solorzano C, Vaman S, *et al.* (2015): Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain. *Nat Neurosci* 19: 1–10.
40. Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, *et al.* (2013): Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis* 4: 1–9.
41. Conway JG, McDonald B, Parham J, Keith B, Rusnak DW, Shaw E, *et al.* (2005): Inhibition of colony-stimulating-factor-1 signaling in vivo with the orally bioavailable cFMS kinase inhibitor GW2580. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16078–16083.
42. Mills SEE, Nicolson KP, Smith BH (2019): Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. *Br J Anaesth*. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.03.023>
43. 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: 381–391.
44. Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH (1999): Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci*.
45. Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS (2000): Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry*. <https://doi.org/10.1176/ajp.157.1.115>
46. Duman RS, Monteggia LM (2006): A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.02.013>
47. Pittenger C, Duman RS (2008): Stress, depression, and neuroplasticity: A convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301574>
48. Suzuki T, Amata M, Sakaue G, Nishimura S, Inoue T, Shibata M, Mashimo T (2007): Experimental neuropathy in mice is associated with delayed behavioral changes related to anxiety and depression. *Anesth Analg*. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000261514.19946.66>
49. Gonçalves L, Silva R, Pinto-Ribeiro F, Pêgo JM, Bessa JM, Pertovaara A, *et al.* (2008): Neuropathic pain is associated with depressive behaviour and induces neuroplasticity in the amygdala of the rat. *Exp Neurol*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.04.043>
50. Yalcin I, Bohren Y, Waltisperger E, Sage-Ciocca D, Yin JC, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2011): A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. *Biol Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.07.017>
51. Zhou W, Jin Y, Meng Q, Zhu X, Bai T, Tian Y, *et al.* (2019): A neural circuit for comorbid depressive symptoms in chronic pain. *Nat Neurosci* 22. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0468-2>
52. Becker LJ, Journée SH, Lutz PE, Yalcin I (2020): Comorbidity of chronic pain and anxiodepressive disorders: Deciphering underlying brain circuits. *Neurosci Biobehav Rev* 115: 131–133.
53. Schwaller F, Beggs S, Walker SM (2015): Targeting p38 Mitogen-activated Protein Kinase to Reduce the Impact of Neonatal Microglial Priming on Incision-induced Hyperalgesia in the Adult Rat. *Anesthesiology* 122: 1377–1390.
54. Obata H, Eisenach JC, Hussain H, Bynum T, Vincler M (2006): Spinal Glial Activation Contributes to Postoperative Mechanical Hypersensitivity in the Rat. *J Pain*. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2006.04.004>
55. Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Kanda H, Yagi H, Noguchi K (2016): Macrophage-Colony Stimulating Factor Derived from Injured Primary Afferent Induces Proliferation of Spinal Microglia and Neuropathic Pain in Rats. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153375>
56. Méchaly I, Bourane S, Piquemal D, Al-Jumaily M, Ventéo S, Puech S, *et al.* (2006): Gene profiling during development and after a peripheral nerve traumatism reveals genes specifically induced by injury in dorsal root ganglia. *Mol Cell Neurosci* 32: 217–229.
57. Haroutiunian S, Nikolajsen L, Finnerup NB, Jensen TS (2013): The neuropathic component in persistent

- postsurgical pain: A systematic literature review. *Pain*. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.09.010>
58. Robin G, Martineau P (n.d.): *Synthetic Customized ScFv Libraries*. *Methods Mol Biol* 907, 109–22 (2012).
 59. Robin G, Sato Y, Desplancq D, Rochel N, Weiss E, Martineau P (2014): Restricted diversity of antigen binding residues of antibodies revealed by computational alanine scanning of 227 antibody-antigen complexes. *J Mol Biol* 426: 3729–3743.
 60. Mackarehtschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR (1995): Targeted disruption of the *flk2/flt3* gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* 3: 147–161.
 61. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF (1996): Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(95\)01441-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(95)01441-1)
 62. Cabañero D, Campillo A, Célérier E, Romero A, Puig MM (2009): Pronociceptive effects of remifentanyl in a mouse model of postsurgical pain: Effect of a second surgery. *Anesthesiology*. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181bfab61>
 63. Bennett GJ, Xie YK (1988): A peripheral mononeuropathy in rat that produces d... [Pain. 1988] - PubMed result. *Pain* 33: 87–107.
 64. Costa B, Comelli F, Bettoni I, Colleoni M, Giagnoni G (2008): The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB1, TRPV1 and PPAR γ receptors and neurotrophic factors. *Pain* 139: 541–550.
 65. Rivat C, Sar C, Mechaly I, Leyris JP, Diouloufet L, Sonrier C, et al. (2018): Inhibition of neuronal FLT3 receptor tyrosine kinase alleviates peripheral neuropathic pain in mice. *Nat Commun*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03496-2>
 66. Verstraete K, Koch S, Ertugrul S, Vandenberghe I, Aerts M, Vandriessche G, et al. (2009): Efficient production of bioactive recombinant human Flt3 ligand in *E. coli*. *Protein J* 28: 57–65.
 67. Philibert P, Stoessel A, Wang W, Sibler AP, Bec N, Larroque C, et al. (2007): A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. *BMC Biotechnol* 7: 1–17.
 68. Robin G, Sato Y, Desplancq D, Rochel N, Weiss E, Martineau P (2014): Restricted diversity of antigen binding residues of antibodies revealed by computational alanine scanning of 227 antibody-antigen complexes. *J Mol Biol*. 11;426(22):3729-3743.
 69. Dixon WJ (1980): Efficient Analysis of Experimental Observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.20.040180.002301>
 70. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977): Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments [27]. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/266730a0>
 71. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, et al. (2003): Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* (80-). <https://doi.org/10.1126/science.1083328>
 72. Barthas F, Humo M, Gilsbach R, Waltisperger E, Karatas M, Leman S, et al. (2017): Cingulate Overexpression of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 as a Key Factor for Depression. *Biol Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.01.019>
 73. King T, Vera-Portocarrero L, Gutierrez T, Vanderah TW, Dussor G, Lai J, et al. (2009): Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nat Neurosci*. <https://doi.org/10.1038/nn.2407>
 74. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
 75. Ventéo S, Bourane S, Méchaly I, Sar C, Samad OA, Puech S, et al. (2012): Regulation of the Na,K-ATpase gamma-subunit FXVD2 by *runx1* and *ret* signaling in normal and injured non-peptidergic nociceptive sensory neurons. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029852>

Supplementary information

Activation of peripheral neuronal FLT3 promotes exaggerated sensorial and emotional pain-related behaviors facilitating the transition from acute to chronic pain

Adrien Tassou^{1,2§}, Maxime Thouaye^{1,2}, Damien Gilabert^{1,3}, Antoine Jouvenel^{1,2}, Jean-Philippe Leyris^{2,6}, Corinne Sonrier^{1,2,6}, Lucie Diouloufet^{1,2,6}, Ilana Mechaly^{1,2}, Myriam Chentouf^{1,5}, Madeline Neiveyans^{1,5}, Martine Pugnière^{1,5}, Pierre Martineau^{1,5}, Bruno Robert^{1,5}, Xavier Capdevila⁴, Jean Valmier^{1,2}, Cyril Rivat^{1,2*}

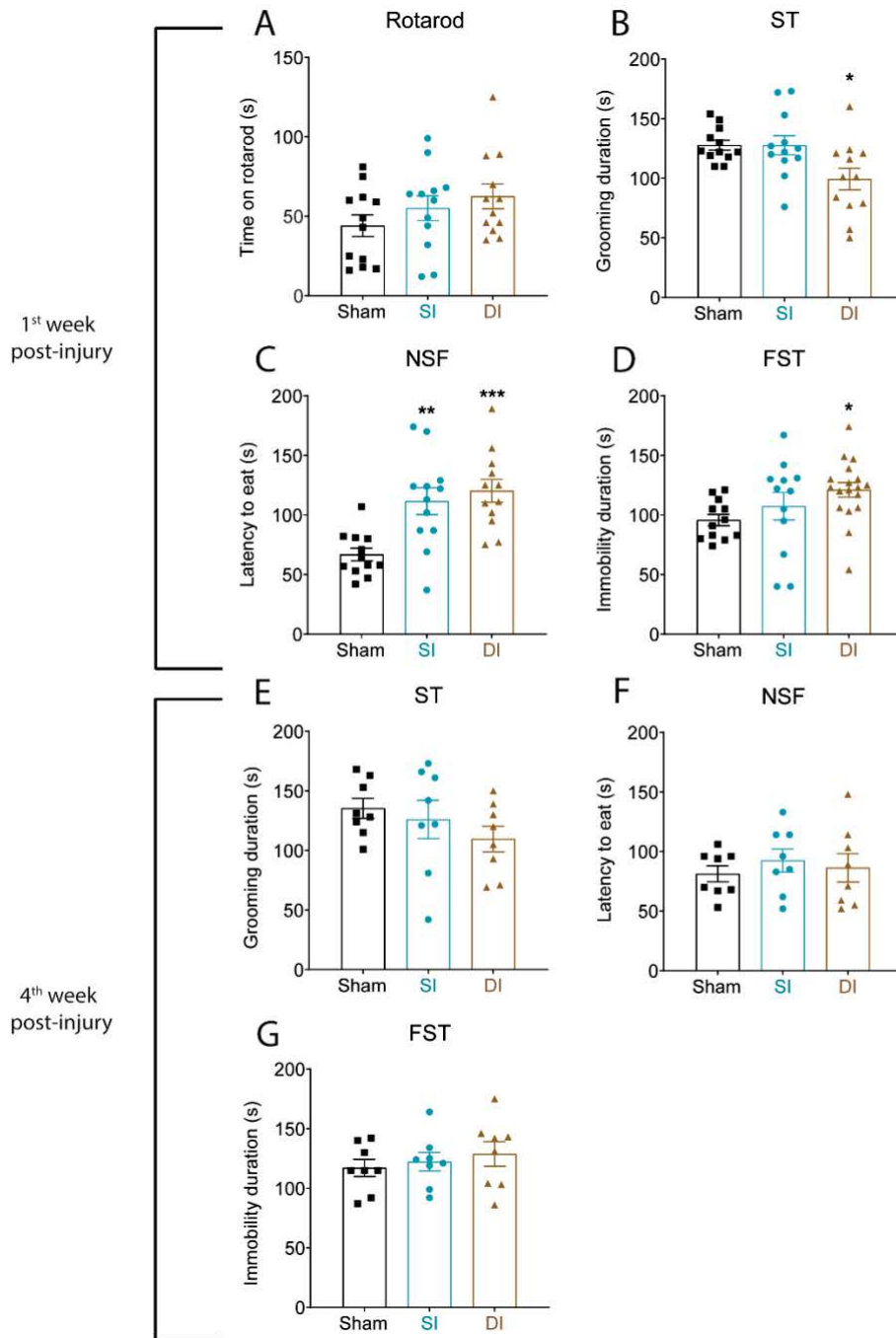
Adresses : ¹ Univ Montpellier, Montpellier, France ; ² Inserm U-1298, Institut des Neurosciences de Montpellier, Montpellier, France ; ³ CNRS UMR 5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France ; ⁴ Département d'anesthésiologie, Hôpital Universitaire Lapeyronie, Montpellier, France ; ⁵ IRCM, INSERM U1194, ICM, Montpellier, F-34298, France, ⁶ BIODOL Therapeutics, Cap Alpha, Clapiers, France.

.

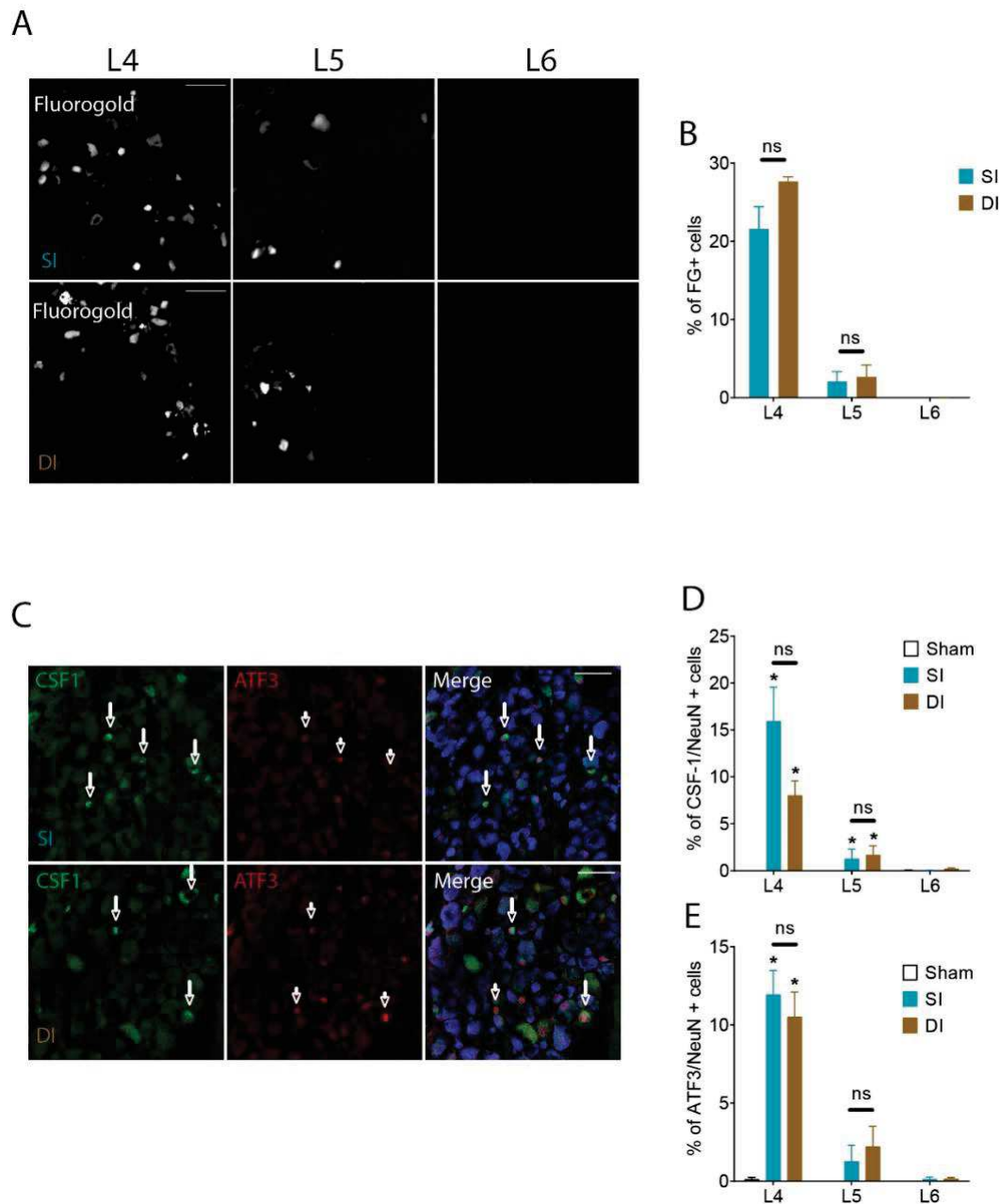
§ current address: University of North Carolina at Chapel Hill, Neuroscience center, Mary Ellen Jones, building, Chapel Hill, NC 27599, USA

* Corresponding author: cyril.rivat@umontpellier.fr

Supplementary figures: 9

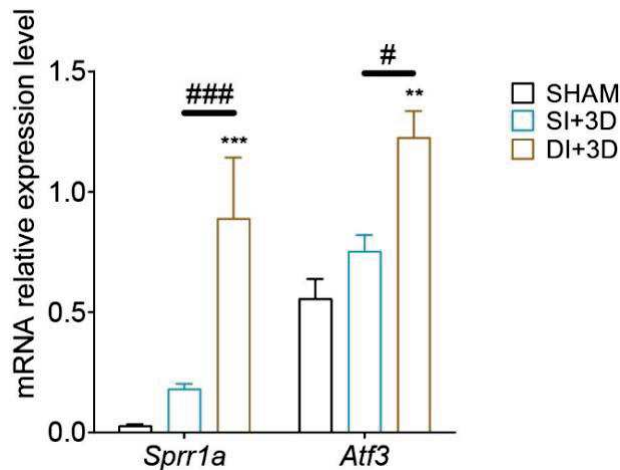


Supplementary figure S1: Influence of single (SI) or double incision (DI) on emotional related behaviors. During the first week post-injury, (A) Neither SI nor DI significantly reduces performance in the rotarod test. (B) Decreased grooming behavior in the splash test, (C) increased latency to eat in the novelty suppressed feeding test and (D) increased immobility duration in the forced swim test is observed in DI mice compared to control mice. During the 4th week, (E) no significant changes remained in splash test, (F) novelty suppressed feeding test and (G) forced swim test in DI mice compared with control mice. All the values are means \pm s.e.m. (n=12). One-way ANOVA and Holm-Sidak's test; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs. Sham.

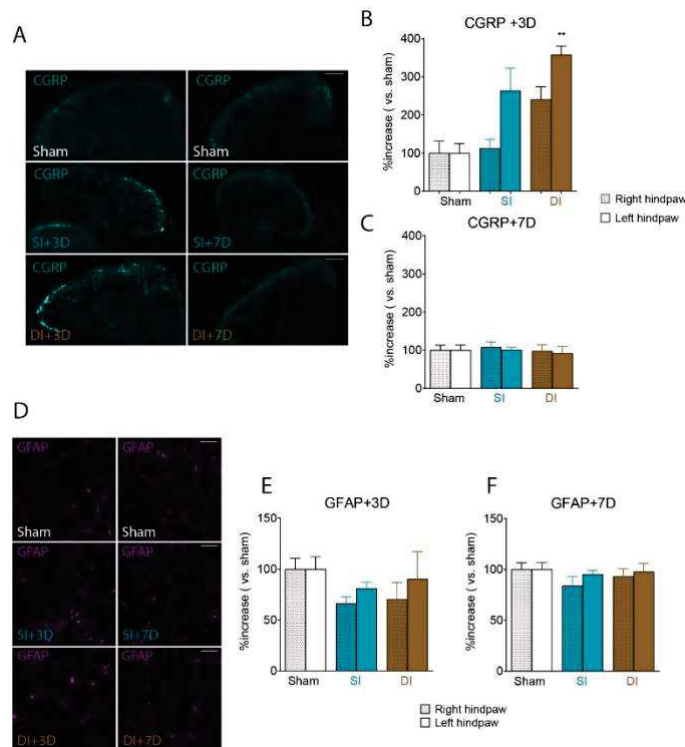


Supplementary figure S2: Influence of single (SI) or double incision (DI) on DRGs. (A) Fluorogold fluorescence in neurons of ipsilateral L4, L5 and L6 DRGs 7 days after SI or DI (scale bars = 100µm) and (B) related quantifications. (C) CSF1(long arrows) and ATF3 (short arrows) immunoreactivity in neurons of ipsilateral L4, L5 and L6 DRGs 7 days after SI and DI (merge = CSF1/ATF3/NeuN) and (D, E) related quantifications. All the values are means \pm s.e.m. (n=8). One-way ANOVA and Holm-Sidak's test; ns: non-significant, *P<0.05 vs. Sham.

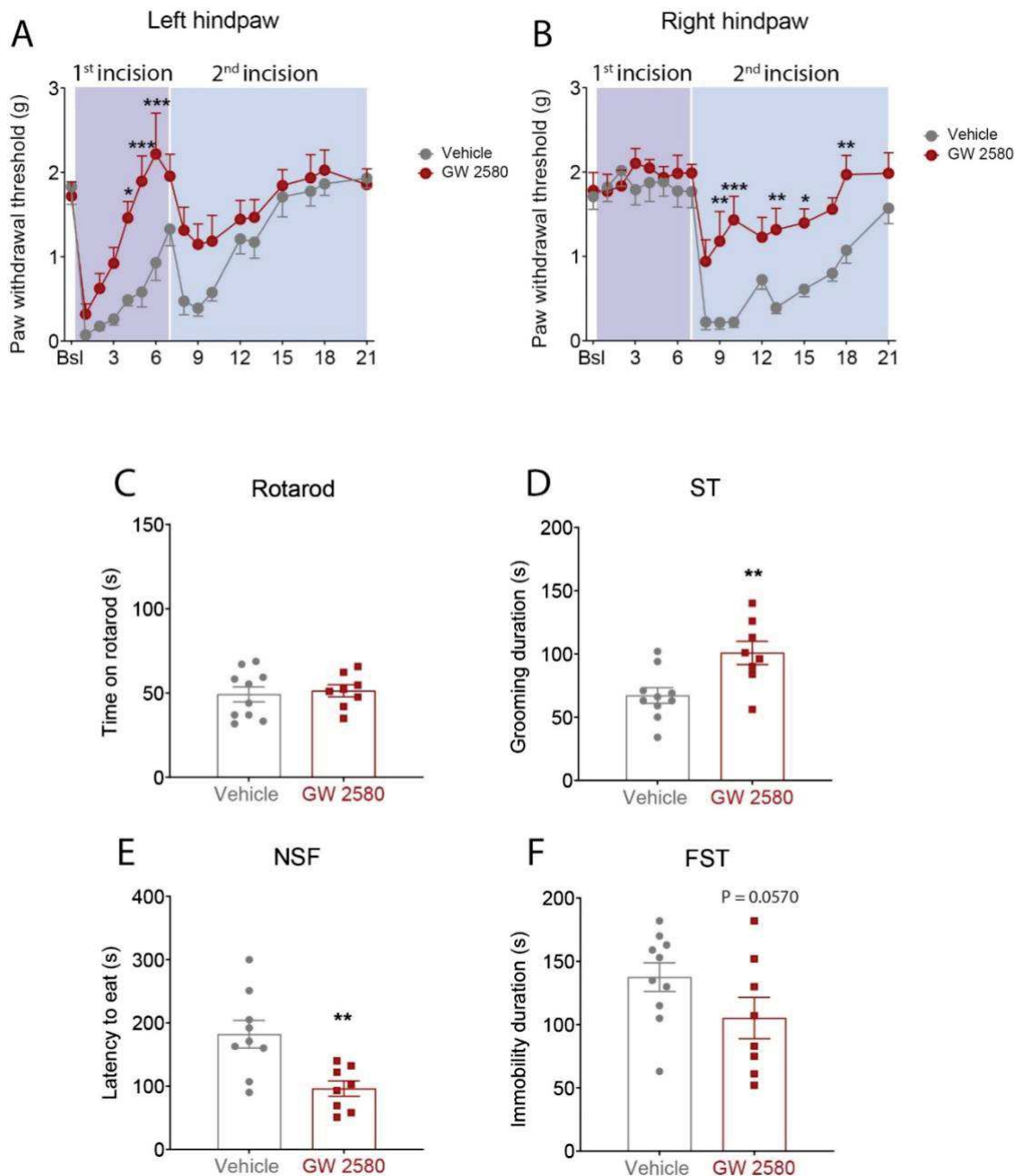
ANNEXE I



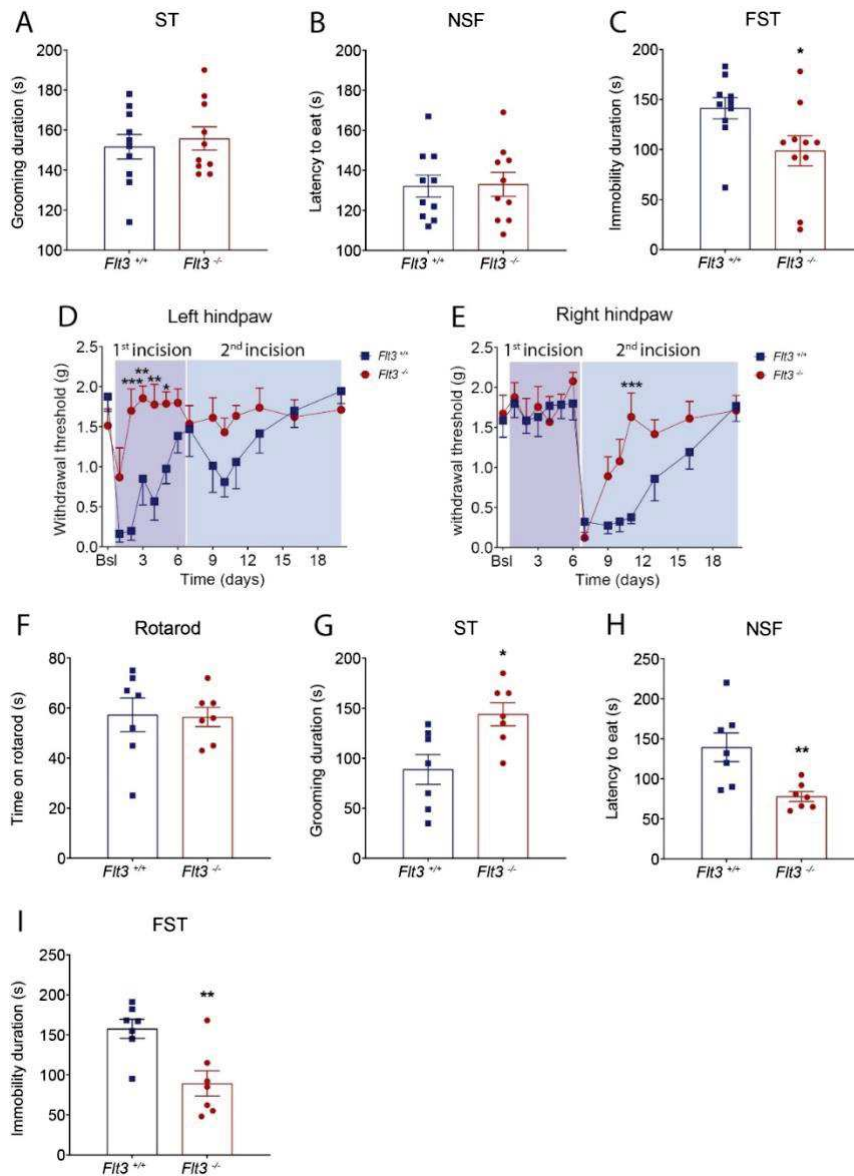
Supplementary figure S3: Relative expression level of *Sprr1a* and *Atf3* mRNA in ipsilateral dorsal horn spinal cord 3 days after Sham, SI and DI. All the values are means \pm s.e.m. (n=4). One-way ANOVA and Holm-Sidak's test; **P<0.05; ***P<0.05 vs Sham. #P<0.05; ###P<0.001 vs. SI.



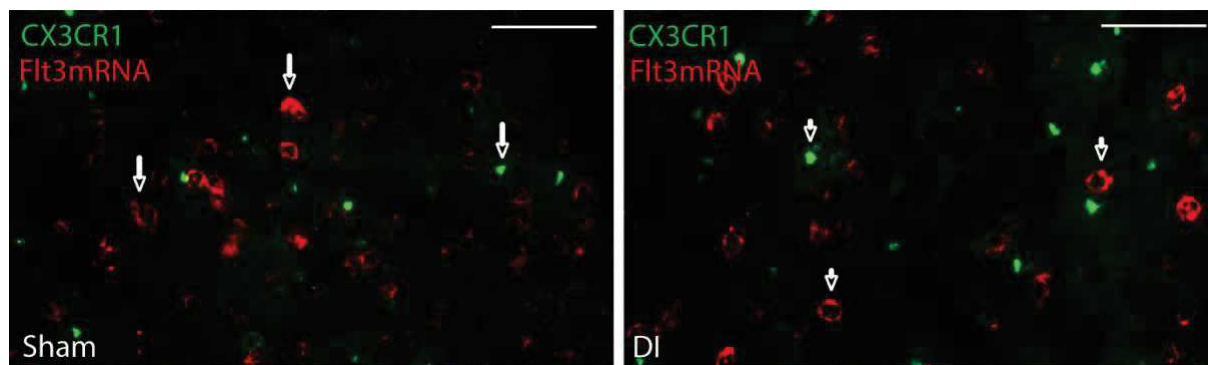
Supplementary figure S4: Influence of single (SI) or double incision (DI) on dorsal horn spinal cord cellular modifications. (A) CGRP immunoreactivity in dorsal horn spinal cord 3 and 7 days after Sham, SI and DI and (B, C) related quantifications. (D) GFAP immunoreactivity in dorsal horn spinal cord 3 and 7 days after Sham, SI and DI and (E, F) related quantifications. All the values are means \pm s.e.m. (n=4). One-way ANOVA and Holm-Sidak's test; **P<0.05 vs Sham



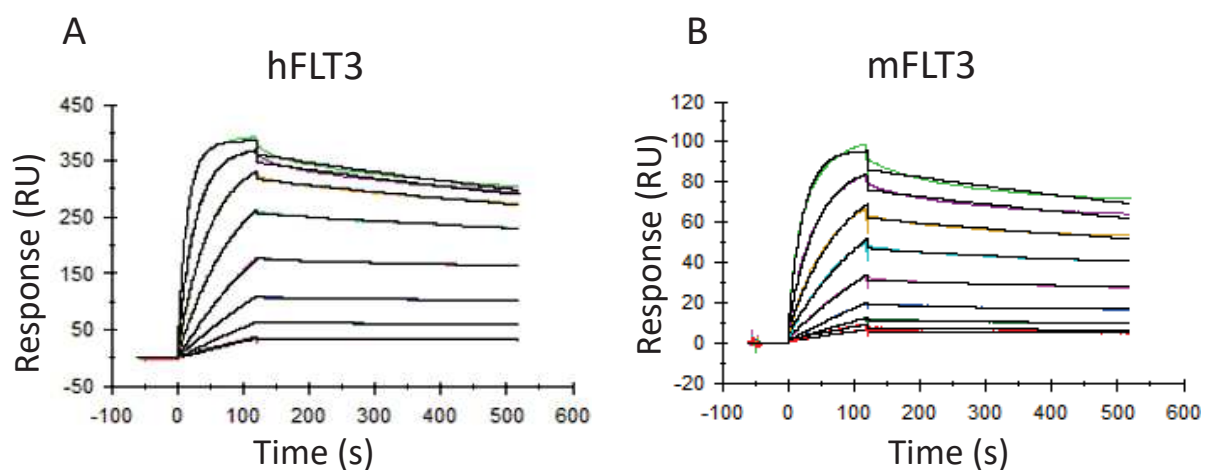
Supplementary figure S5: Effects of microglial inhibition on double incision (DI)-induced pain sensitization. (A, B) Intrathecal injections of GW 2580 (1 μ g/5 μ l, during the surgery) improve the recovery of a normal mechanical threshold after incision (SI or DI) as measured with Von Frey filaments. The same treatment fails to affect performance on rotarod (C), increases grooming duration in splash test (D), decreases latency to eat in novelty suppressed feeding test (E) and decreases immobility duration in forced swim test compared to control injections (F). All the values are means \pm s.e.m. (n=8). Two-way ANOVA and Holm Sidak's test (A, B), Student's t-test (C-F); *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs. i.t. Saline.



Supplementary figure S6: Behavioral phenotyping of *Flt3*^{-/-} female mice before and after DI. **(A)** Genetic *Flt3* silencing fails to affect grooming duration in the splash test, **(B)** latency to eat in the novelty suppressed feeding test and **(C)** decreases immobility duration in the forced swim test compared to control mice. **(D-E)** Left and right hindpaw mechanical hypersensitivity after incisions in either *Flt3*^{+/+} or *Flt3*^{-/-} female mice as measured by the Von Frey test. **(F)** Genetic *Flt3* silencing in female mice fails to affect performance on rotarod, **(G)** increases grooming behavior, **(H)** decreases latency to eat in novelty suppressed feeding test and **(I)** immobility duration in forced swim test compared to control mice two weeks after DI. All the values are means \pm s.e.m. (n=8). Two-way ANOVA and Holm Sidak's test (**D-E**), Student's t-test (**A-C**; **F-I**); *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs. *Flt3*^{+/+}.

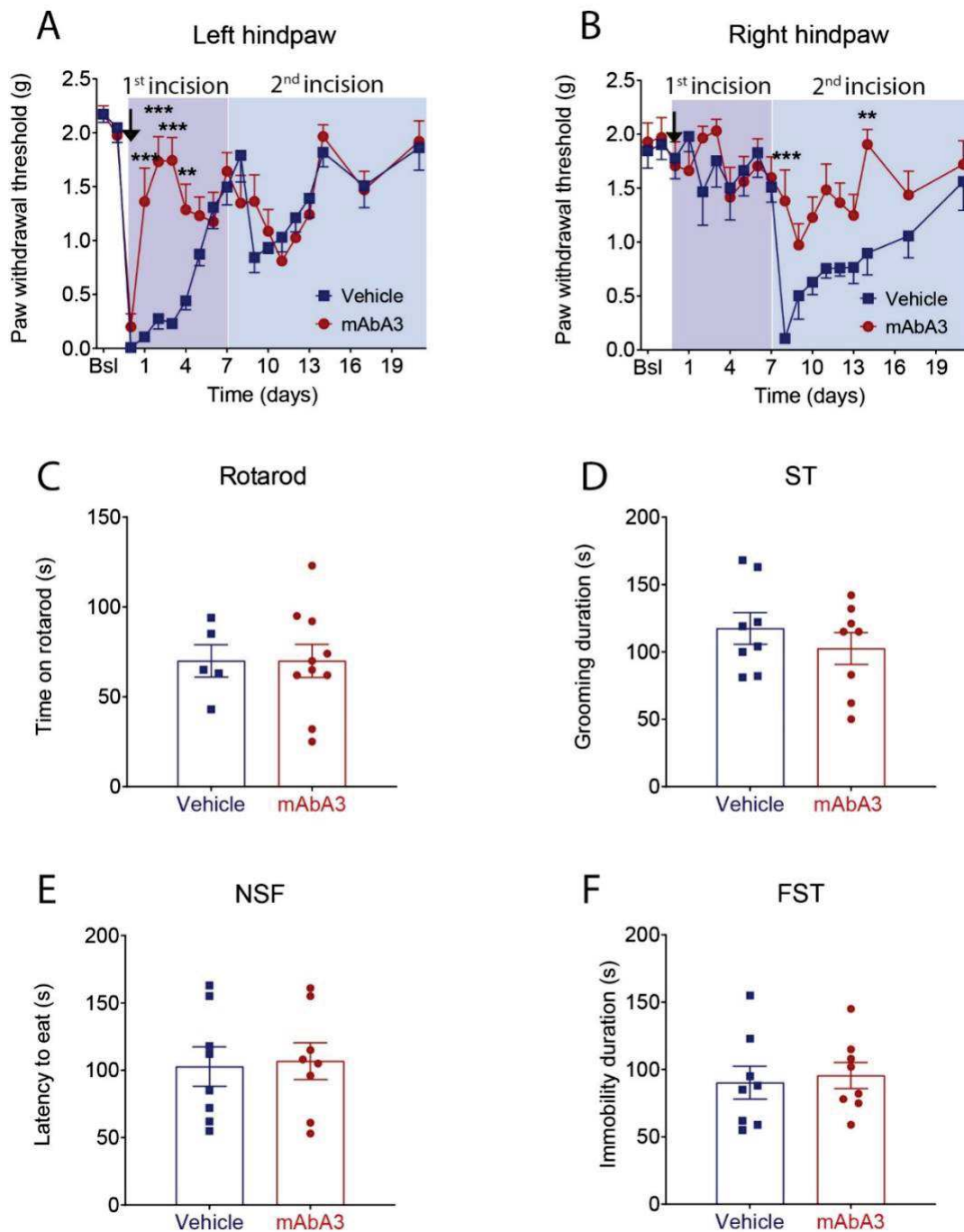


Supplementary figure S7: *Flt3* mRNA is not colocalized with CX3CR1. In situ hybridization of *Flt3* mRNA combined with immunoreactivity of CX3CR1 of spinal cord 7 days after Sham or DI. Cells from spinal cords are shown (scale bars = 100 μ m).



Sample	Ligand	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1	Chi ² (RU ²)
Anti-FLT3	hFLT3	3,05E+05	5,56E-04	1,82E-09	3,3
Anti-FLT3	mFLT3	2,09E+05	5,88E-04	2,82E-09	0,686

Supplementary figure S8: affinity measurements of anti-FLT3 mAbA3 on human and murine FLT3- Fc-captured on CM5S sensor Chip using T200 BIAcore apparatus. Increasing concentrations (0.75nM, 1.5nM, 3.1 nM, 6.2nM, 12.5nM, 25nM, 50nM, 100 nM) of anti-FLT3 mAbA3 were injected on human (A) and murine (B) FLT3. Black curves are the fitting curves obtained by using a bivalent model. Association constant (ka1) and dissociation constant (kd1) of mAbA3 for human FLT3 are in a similar range than for murine FLT3 (Table).



Supplementary figure S9: Single mAbA3 injection alleviates post-operative recovery but is not sufficient to prevent related anxiodepressive-like disorders. **(A-B)** Left and right hindpaw mechanical hypersensitivity after incisions in Vehicle or mAbA3 treated (arrow = 200 μ g/animal, intraperitoneal) mice as measured by the Von Frey test. **(C)** Single mAbA3 injection fails to affect motor coordination on rotarod, **(D)** grooming duration in splash test, **(E)** latency to eat in novelty suppressed feeding test and **(F)** immobility duration in forced swim test compared to control mice. All the values are means \pm s.e.m. (n=8). Two-way ANOVA and Holm Sidak's test **(A-B)**, Student's t-test **(C-E)**; **P<0.01; ***P<0.001 vs. Vehicle.

Annexe II

**Cross-talk between MOR and FLT3 in
sensory neurons reveals a cellular
mechanism opposing morphine analgesia**

Cross-talk between MOR and FLT3 in sensory neurons reveals a cellular mechanism opposing morphine analgesia

Antoine Jouvenel^{1,2§}, Adrien Tassou^{1,2§}, Maxime Thouaye^{1,2§}, Jean-Philippe Leyris^{2§}, Jérôme Ruel³, Myriam Antri⁴, Sylvie Mallié², Lucie Diouloufet², Franck Vandermoere⁵, Damien Maurel⁵, Rémi Sounier⁵, Sébastien Granier⁵, Corinne Sonrier², François Daubeuf⁶, Stéphanie Ventéo², Nelly Frossard⁶, Patrick Carroll², Ilana Mechaly^{1,2}, Didier Rognan⁶, Pierre Sokoloff², Radhouane Dallel⁴, Patrick Delmas³, Jean Valmier^{1,2*} and Cyril Rivat^{1,2*}.

Adresses: ¹Université de Montpellier, Montpellier, France ; ²Inserm U-1051, Institut des Neurosciences de Montpellier, Montpellier, France ; ³LNC UMR 7291, CNRS AMU, Marseille, France ; ⁴NeuroDol INSERM 1107, Clermont-Ferrand, France ; ⁵Institut de Génomique Fonctionnelle, CNRS UMR5203, INSERM U1191, Montpellier, France, ⁶Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, UMR7200 CNRS/Université de Strasbourg and LabEx MEDALIS, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67412 Illkirch, France ; ⁷Biodol Therapeutics, Cap Alpha, Clapiers 34830, France

[§]These authors contributed equally: Antoine Jouvenel, Adrien Tassou, Maxime Thouaye, Jean-Philippe Leyris,

* Correspondence and requests for materials should be addressed to C.R. (email: Cyril.rivat@umontpellier.fr) or to J.V. (email: jean.valmier@umontpellier.fr)

Conflict of interest statement: The authors declare no conflict of interests

Abstract

Although opioids are the most effective class of analgesics for the management of moderate to severe pain, chronic opioid pain medications have detrimental side effects such as analgesic tolerance and hyperalgesia that counteract opioid analgesia and induce dose escalation. Mu opioid receptors (MOR) expressed in the dorsal root ganglion (DRG) sensory neurons are recently known to drive part of opioid analgesia and to control opioid-induced tolerance and hyperalgesia. However, how peripheral MOR chronic activation regulates these maladaptive processes remain elusive, thus limiting the development of new therapeutic strategies to improve morphine analgesia. Here we report a molecular and functional crosstalk between MOR and FLT3 (the Fms-Like Tyrosine kinase 3 receptor) restricted to DRG neurons which induces acute morphine tolerance and hyperalgesia via the implication of different cellular signaling pathways including cAMP, ERK and mTOR. FLT3 genetic deletion or pharmacological inhibition abrogated chronic morphine-induced tolerance (MIT), hyperalgesia (MIH) and pronociceptive maladaptive processes associated with changes in the DRG neurons and the spinal cord. Importantly, BDT001, a specific FLT3 inhibitor, potentiated morphine analgesia in acute and chronic pain models while completely preventing MIT and MIH. Thus, our data provide evidence for a new role of FLT3 as a key trigger that controls morphine pronociceptive side effects and highlight FLT3 inhibition as a promising therapy to improve morphine use for chronic pain relief.

Introduction

Opioids remain the unsurpassed treatment for the management of moderate to severe pain and are widely prescribed. Despite their potent analgesic effectiveness, their long-term clinical use is limited by insufficient long-term efficacy due to the development of paradoxical hyperalgesia and analgesic tolerance leading to the enhanced opioid requirement to achieve the same analgesic effect¹⁻⁴. One clinical consequence of this is the non-optimal pain management and increased opioid side effects such as constipation, respiratory depression, dependence and addiction. However, these side effects are still clinically ineffectively managed by current drugs, indicating an urgent requirement of therapeutic strategies enable to increase opioid analgesia while alleviating associated tolerance and hyperalgesia.

Among the three opioid receptors types, the μ opioid receptors (MORs) are considered as the main mediator of morphine analgesia. Although MORs are present along pain neural circuits in a variety of central nervous system regions, MOR function in dorsal root ganglia (DRG) nociceptors appears to be the key molecular event that initiates morphine-induced pathological plasticity within the central pain circuits, thereby facilitating the onset of morphine-induced tolerance (MIT) and hyperalgesia (MIH)⁵⁻⁸. For example, mice lacking MORs in TRPV1⁺ nociceptors do not develop tolerance and MIH under chronic morphine treatment whereas pain relief is unaffected⁵. These data indicated that tolerance and MIH can be dissociated from analgesia and supported the need of a better understanding of chronic morphine-induced maladaptive activity in DRG neurons to improve patient therapeutic safety.

Tolerance and MIH have been proposed to share some common mechanisms since the prevention of MIH is able to restore opioid analgesic effects and, to be adaptive processes that modify MOR function including desensitization, internalisation, phosphorylation, heterodimerisation and/or changes of intracellular pathways^{8,9}. These molecular modifications in MOR functioning activate multiple pronociceptive processes in DRG and dorsal spinal cord (DSC). For example, chronic morphine treatment increases the proportions and the functioning of TRPV1 channels¹⁰⁻¹² and CGRP⁺ in sensory neurons^{13,14}, induces pro-nociceptive glutamate and peptide release (i.e. SP, CGRP), resulting in DRG fibers hyperexcitability and in increased central neurotransmission. Studies of the underlying molecular mechanism that modify MOR function have revealed high levels of complexity. Beside the canonical Gi/ β -arrestin2-dependent signaling pathway induced acute MOR desensitization¹⁵, chronically activated MOR has the properties to interact not only with other GPCRs but also with tyrosine kinase receptors

(RTK) through a mechanism called transactivation. Depending of the cell type, MOR activation can initiate several intracellular pathway, such as cAMP-PKA known as “cAMP super-activation”^{16–18}, MAPK¹⁹ and PI3K-mTOR²⁰ signaling pathway. Although peripheral MOR activation control the maladaptive processes underlying the development of tolerance and MIH, how chronic morphine modify MOR function in DRG neurons remains unresolved.

Interestingly, molecular mechanisms that control the onset of MIT and MIH present similarities with those implicated in the development of nerve injury-induced neuropathic pain (NP)^{21–24}. NP installation is controlled by the activation of the tyrosine kinase receptor class III (FLT3) expressed in sensory neurons. Like MOR, FLT3 is expressed in rodent and human DRG neurons and its sustained activation potentiates ion channels (*e.g.* TRPV1), excitatory peptide expression (*e.g.* CGRP) and induces long-term modifications leading to DRG neurons hyperexcitability and hyperalgesia²⁵. These similarities in the control of pain sensitization at DRG level between MOR and FLT3 prompt us to test that FLT3 expressed by DRG neurons controls molecular changes implicated in morphine tolerance and MIH blunting morphine analgesia.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Experiments were performed in male Sprague-Dawley rats (150-170g, Janvier, France), C57BL/6 naive mice (25-30g, Janvier, France), C57BL/6 mice carrying a homozygous deletion of FLT3 (*Flt3*^{-/-} mice) and their littermates (WT) weighing 25-30 g. All the procedures were approved by the French Ministry of Research (authorization #1006). Animals were maintained in a climate-controlled room on a 12 h light/dark cycle and allowed access to food and water ad libitum. Male and female mice were first considered separately in behavioral procedures. Both sexes showed mechanical hypersensitivity of same intensity after repeated morphine injection and were similarly affected by FLT3 deletion (ANOVA followed by Bonferroni’s test, $n = 8$ for both sexes and genotypes for each experiment). Thereafter, experiments were performed only on male mice.

Drug delivery

ANNEXE II

Opioids. Morphine sulfate was purchased from Francopia, dissolved in 0.9% sodium chloride and administered subcutaneously. For the chronic morphine administration protocol, morphine injections were performed twice a day with 8h of interval during 4 days. Rats and mice received 2 mg/kg and 10 mg/kg per injection, respectively. For acute morphine-FL treatment protocol in rats, one subcutaneous morphine injection (2 mg/kg) was performed 30 minutes after FL intrathecal injection. Buprenorphine was purchased from Centravet and was administered according to the same morphine protocol at the dose of 100 µg/kg.

FL. Human recombinant FL (FLT3 ligand) was obtained in the E. coli Rosetta (DE3) strain (Novagen) in our laboratory using the pET15b-rhFL plasmid and was dissolved in saline solution. For recombinant FL intrathecal injection, a 30 G needle attached to a Hamilton syringe was inserted between L4 and L5 vertebrae in lightly restrained, isoflurane-anaesthetized rats. The reflexive tail flick was used to confirm the puncture. A total volume of 10-20 µl was injected. Similar experiments were conducted with intraplantar injection of FL (138nM/50µl) performed in isoflurane-anaesthetized rats.

Pharmacological inhibitors. Different inhibitors were used for the *in vivo* experiments in rats. MNB was subcutaneously co-administered with morphine at 1 mg/kg. For the other inhibitors, intrathecal injections were performed as previously described for FL, 1h before intrathecal injection of FL. The PI3Kinase inhibitor HS-173 (#S7356 - Selleckchem) was administered at a concentration of 5µg/10µl, the PKA inhibitor PKI 14-22 (#2546 – Tocris) was administered at a concentration of 5µg/10µl, the JAK/STAT inhibitor AG490 (658411 - Calbiochem) was administered at a concentration of 1µg/20µl, the MEK inhibitor PD98059 (#P215 - Sigma-Aldrich) was administered at a concentration of 5µg/10µl, the mTORC1 inhibitor rapamycin (#553210 – Sigma-Aldrich) was administered at a concentration of 10µg/20µl and the eIF4E inhibitor 4EGI-1 (Sigma-Aldrich) was administered at a concentration of 25µg/20µl.

BDT001. BDT001 was synthesized by D. Rognan at Strasbourg (Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, UMR7200, CNRS – Université de Strasbourg, Illkirch 67400 France). BDT001 was dissolved in 7% Tween 20 in a saline solution with 6 sonication runs of 45 seconds. For chronic morphine protocol with BDT001 treatment, intraperitoneal injection of BDT001 was performed 2h before end of the evening morphine injection. BDT001 was injected at 5mg/kg in mice and at 2mg/kg in rats.

CFA. The model of complete Freund adjuvant (CFA)-induced pain has been used for assessing chronic inflammatory pain. Under isoflurane anesthesia, an intraplantar injection (50 μ L) of a solution of 1mg of mycobacterium tuberculosis (Sigma-Aldrich) per ml was performed in the right hindpaw of wild-type Sprague-Dawley rats. Once CFA-induced hypersensitivity is established, chronic morphine administration was performed as described above. For preventive experiments, morphine and BDT001 administration started on the same day for 4 days. For the curative experiments, chronic morphine was first administered and once analgesic tolerance and morphine-induced hyperalgesia was established, BDT001 was started with the following morphine injections.

Behavioral analysis

Before testing, rats and mice were acclimatized for 60 min in the temperature and light-controlled testing room within a plastic cylinder or on wire mesh. Experimenters were blinded to the genotype or the drug administered.

Tactile sensitivity. Tactile withdrawal threshold was determined in response to probing of the hindpaw with eight calibrated von Frey filaments (Stoeling, Wood Dale, IL, USA) in logarithmically spaced increments ranging from 0.41 to 15 g (4–150 mN). Filaments were applied perpendicularly to the plantar surface of the paw. The 50% paw withdrawal threshold was determined in grams by the Dixon nonparametric test²⁶. The protocol was repeated until three changes in behaviour occurred. This method was used both in rats and mice with adapted filaments.

Paw pressure test: To assess mechanical sensitivity in rats, a variant method of the Randall-Selitto method was performed as previously described²⁷. Briefly, increasing pressure was applied to the hind paw until the rat squeaks. The Basile analgesimeter (Apelex, Massy, France; stylus tip diameter, 1 mm) was used. A 600-g cutoff value was determined to prevent tissue damage. After their arrival to the laboratory, rats were kept in their colony room for 4 days. To avoid any experimental stress, experimentations were realized by the same experimenter in quiet conditions. Animals were habituated to both experimenters, experimental room and devices for at least 10 days before starting the experiments. Before starting the experiments, basal nociceptive threshold was measured during 2 days in a row and on the experimental day to verify nociceptive threshold stability. To assess morphine analgesia,

measurements were performed 30 minutes after morphine injection and in some experiments, the time course of morphine analgesia was determined by measuring nociceptive threshold every 30 minutes for 2h30 until return to a basal nociceptive threshold. To assess morphine induced pain hypersensitivity (MIH), basal nociceptive threshold was assessed once daily before twice daily morphine administration or after FL-morphine administration.

Heat sensitivity. To assess heat sensitivity, a radiant heat source (plantar test Apparatus, IITC Life Science, Woodland Hills, USA) was focused onto the plantar surface of rat hindpaw. The paw withdrawal latency was recorded. Each paw was tested 3 times with 10 min-intervals between each trial. A maximal cut-off of 20 s was used to prevent tissue damage. The data are expressed as paw withdrawal latency measured for each animal.

Morphine and BDT001 motivational effects. To evaluate morphine or BDT001 motivational effects, a 5 days CPP protocol was set. The apparatus (Bioseb, France) consists in 2 chambers (size 20 cm x 18cm x 25 cm) distinguished by the texture of the floor and by the wall patterns connected to each other by a central chamber (size 20 cm x 7 cm x 25 cm). During the first day, all the mice were able to move freely during 15 minutes in the whole apparatus. Their moves were recorded with a camera connected to Ethovision software. Mice with a spontaneous preference up to 75% were removed from the experiment. The next 3 days are the conditioning days. The morning, mice were restricted for 20 minutes to one chamber after morphine (1.5 or 5 mg/kg) or BDT001 (5 mg/kg) intraperitoneal injection. The afternoon, mice were again restricted for 20 minutes to the opposite chamber after vehicle intraperitoneal injection. Injections were switched off the next day in order to avoid time dependent conditioning. To evaluate the effects of BDT001 on morphine-induced motivational effects BDT001 or vehicle was administered in combination with morphine 2 hours before morphine or saline conditioning. The 5th day is the test day. Mice were placed in the center chamber with free access to all chambers and the time spent in each chamber was recorded for 15 minutes. The preference scores were expressed as the difference between the time spent in the morphine- and/or BDT001-paired chamber and the vehicle-paired chamber.

Morphine side effects: Respiratory depression measurement using whole body plethysmography Ventilatory parameters were recorded as previously described²⁸ in conscious C57BL/6N mice by whole-body barometric plethysmography (Emka Technologies, Paris, France). Mice were acclimatized with the plethysmograph chamber for 30 minutes until a stable baseline was obtained. Then, the animal was gently removed from the chamber for s.c. injection

of the tested drug at T0 and replaced in the chamber for the remaining measurements. Respiratory frequency (f) was recorded for 100 minutes and used as the index of respiratory depression. Accumulated faecal boli quantification was performed as previously described¹⁵. Mice were subcutaneously injected with vehicle or BDT001 (5 mg/kg) and 1.5h later they received saline or morphine (10 mg/kg) and individually placed into small Plexiglas boxes lined with filter paper. Faecal boli were collected and weighed every hour for 5h after the drug injections.

Physical dependence studies. After induction of chronic tolerance, withdrawal was precipitated by 1 mg/kg naloxone hydrochloride injection performed 2h after the last injection of morphine. Mice were individually placed in small Plexiglas boxes and observed and scored for 20 min for manifestation of different withdrawal signs, including jumping, grooming, rearing, forepaw shaking, genital licking and wet-dog shakes. A global withdrawal score, excluding weight loss, was calculated as previously described²⁹. The sum of all weighted signs produced a global withdrawal score for each mouse.

Statistical analysis. All experiments were randomized. Data are expressed as the mean \pm s.e.m. All sample sizes were chosen based on our previous studies except for animal studies for which sample size has been estimated via a power analysis using the G-power software. The power of all target values was 80% with an alpha level of 0.05 to detect a difference of 50%. Statistical significance was determined by analysis of variance (ANOVA one-way or two-way for repeated measures, over time), followed by Bonferonni's post-hoc test to compare with the control group. To quantitatively evaluate morphine analgesic tolerance (MIT), the % maximal possible effect (%MPE) was evaluated by normalization of nociceptive threshold values during analgesia on Randall-Selitto cut-off value, as following: [(nociceptive threshold value 30' after morphine injection) – (basal nociceptive threshold)] \div [(cut-off value) – (basal nociceptive threshold)]. To quantitatively evaluate morphine analgesia, the area under the curve (AUC) was determined as following. The surface areas were calculated by summing the nociceptive threshold values measured every day after the planned day of experimentation, as follows: Surface area = Σ (nociceptive threshold values at H + n) – basal value \times n, where n is the number of intervals. This total value is proportional to the surface area because the intervals between successive tests were similar (30 min). The results were expressed as a mean percentage (\pm SEM) of the reference AUC defined as the AUC calculated in morphine group alone (100% = AUC of morphine group). In this representation with unpaired data and without repeated measures, Mann-Witney tests were performed to evaluate results statistical

significance. To determine EC50 of morphine in presence of Vehicle or BDT001, a sigmoidal dose-response curve was generated with GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) based on AUC raw data.

Virus transfection.

The following oligonucleotides were used to build the AAVGFP-shRNA plasmids: shFLT3 (GATCGGTGTCGAGCAGTACTCTAAATCAAGAGTTTAGAGTACTGCTCGACACCTT TTT(top)); AGCTAAAAAGGTGTCGAGCAGTACTCTAAACTCTTGATTTAGAGTACTGCTCGAC ACC(bottom);Sigma-Aldrich (TRC00000378670); shcontrol (GATCCAACAAGATGAAGAGCACCAATCAAGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTT TTT (top)); AGCTAAAAACAACAAGATGAAGAGCACCAACTCTTGATTGGTGCTCTTCATCTTG TTG (bottom).The oligonucleotides were annealed and cloned BamHI–HindIII in a vector containing the U6 promoter sequence and the hGH polyadenylation sequence upstream and downstream, respectively, of the BamHI site. The U6-shRNA-hGH sequences were then cut using PmlI and HpaI and cloned in the pAAV-CMV-turbo GFP vector (Cell Biolabs Inc.) linearized with PmlI. All the constructs were checked by DNA sequencing. The viruses were produced by the Viral Vector Production Unit of Institut de la Vision, Paris, France. For in vivo experiments, 10 µl of AAV-turbo GFP-shFLT3 or AAV-turbo GFP- sh control solution were intrathecally injected in lightly restrained, unanaesthetized rats, as described above. The titer of the virus solution was 5.8×10^{12} genome copies (gc)/ml.

FLT3 transcript knockdown experiments with siRNAs.

Scrambled control small interfering (siRNA) based on the *Flt3* sequence and a pool of 4 specific siRNAs against *Flt3* (*Flt3*-siRNA) were used (On-target Plus SMART pools from Dharmacon, Perbio Science, Brebières, France; Dharmacon Catalog L-002000-00-0005 targeting FLT3) as previously described²⁵. For in vivo injections, XXX µg of specific or non-specific siRNAs were complexed with 1.8 µl of 200 µM linear low-molecular weight

polyethylenimine ExGen 500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France). *Flt3*-siRNA or a scrambled siRNA was intrathecally injected (2µg/rat) once daily 1 hour before each buprenorphine injection for 4 days.

ERK1/2 activation measurement

Cell culture. HEK293T cells, used for Phospho-ERK assays, were maintained in DMEM Glutamax (Invitrogen) supplemented with antibiotics (penicillin 50 U/ml, streptomycin 50 µg/ml) and 10% heat-inactivated Foetal Calf Serum. The HEK 293 T cells were transiently transfected with human FLT3 receptor cDNA and human MOR receptor cDNA (see below) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Transfections were performed in 96-well plates using a cell density of 50,000 cells per well. Prior to cell plating, wells were pre-coated with Poly-L-Ornithine (50 µl of 10 mg/ml) for 30 min at 37°C.

Transfection procedures. Transfection mixes were prepared using 50 ng of SNAP-FLT3 plasmid, 50ng of MOR-YFP, 0.25 µl of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and 50 µl Opti-MEM per well. Prior to their addition to plates, transfection mixes were preincubated for 20 min at room temperature. Then 100 µl of HEK293T cells at a density of 500,000 cells/ml were plated in each well and were incubated at 37°C under 5% CO₂ for 24h.

ERK1/2 time-resolved FRET assays. To determine the degree of phosphorylation of ERK after the stimulation of cells expressing MOR and FLT3 receptors, by different compounds, we used the CisBio assay (Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr 204) #64ERKPEH). Cells transiently transfected with the different receptors were cultured in a 96-well plates. Twenty-four hours after cell transfection, cells were starved overnight in DMEM-Glutamax serum free medium and then incubated in a total volume of 100 µl/well of the DMEM-Glutamax serum free medium, containing or not the different pharmacological compounds at the different concentrations as indicated. More precisely, cells were incubated with 10 µM of naloxone (#N7758 - Sigma-Aldrich), 10 µM of PD98059 (#P215 - Sigma-Aldrich ; MEK inhibitor), 0.1 µM of HS-173 (PI3Kinase inhibitor; #S7356 - Selleckchem), 10 µM of AG490 (658411 - Calbiochem), 0.1µM of rapamycin (#553210 – Sigma-Aldrich ; mTORC1 inhibitor) for 15min at 37°C and 50 µM of BDT001 (synthesized by Laboratoire d'Innovation Therapeutique, Strasbourg), 1 µM of AC220 (#S1526 – Selleckchem, FLT3 inhibitor) and 0.1 µM of PKI 14-22 (PKA inhibitor; #2546 - Tocris) for 90min at 37°C, prior to addition of 10 µM of morphine

during 15 min at 37°C, followed by 5nM of rhFL during 10min at 37°C. Cells were incubated at 37°C before the stimulation mix was removed and cells were then lysed in 50 µl/well of the supplemented lysis buffer for 60min at room temperature with shaking. Then 16 µl of each lysate was transferred into a 384-well small volume white plate and made up to the final volume of 20 µl/well with 2 µl of anti-ERK1/2-Europium/Terbium Cryptate and 2 µl of anti-Phospho-ERK1/2-d2 antibody solutions prepared in the detection buffer. The plate was then incubated for 2 h at room temperature before reading the fluorescence emission at 620 and 665 nm using a PHERAstar FS plate reader (BMG Labtech). Data are presented as per cent of Non Stimulated from HTRF ratios, which are calculated as the ratio between the emission at 665 nm and the emission at 620 nm ($\times 10,000$).

cAMP activation measurement

Adult sensory neuron culture. Neuron cultures were established from lumbar (L4–L6) dorsal root ganglia. Briefly, ganglia were successively treated by two incubations with collagenase A (1 mg/ml, Roche Diagnostic, France) for 45 min each (37°C) and trypsin-EDTA (0.25%, Sigma, St Quentin Fallavier, France) for 30 min. They were mechanically dissociated through the tip of a fire-polished Pasteur pipette in neurobasal (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum and DNase (50 U/ml, Sigma). Isolated cells were collected by centrifugation and suspended in neurobasal culture medium supplemented with 2% B27 (Life Technologies), 2mM glutamine, penicillin/streptomycin (20 U/ml, 0.2 mg/ml) plated at a density of 2500 neurons per well in 96-well plates and were incubated in a humidified 95% air-5% CO₂ atmosphere at 37°C.

cAMP time-resolved FRET assays. Measurement of cAMP accumulation in adult sensory neuron cells was performed using the cAMP-Gi immunoassay kits (Cisbio Bioassays) at 8DIV after seeding in a 96-well plate. The cAMP assay use a cryptate-conjugated anti-cAMP monoclonal antibody and d2-labeled cAMP. Prior to lysis and the addition of the cAMP-cryptate-antibody and cAMP-d2, cells were treated with the indicated test compounds in absence or in presence of Forskolin (FSK) at a concentration of 0.1 µM (to stimulate adenylate cyclase). Briefly, for acute treatment, the cells at 8DIV, were pretreated with the indicated concentrations of CTAP (#C6352 - Sigma-Aldrich) for 20 min at 37°C and stimulated 15 min at 37°C with 10µM of morphine (Francopia) in Stimulation Buffer containing 0.5mM of IBMX

(#I7018 – Sigma-Aldrich), prior the addition of 0.1 μM of forskolin (#F6886 - Sigma-Aldrich) during 15min at 37°C. The reaction was stopped by lysis buffer containing HTRF® assay reagents: the Europium Cryptate-labeled anti-cAMP antibody and the d2-labeled cAMP. The plate was then incubated for 1 h at room temperature before reading the fluorescence emission at 620 and 665 nm using a PHERAstar FS plate reader (BMG Labtech). For chronic treatment, the cells were treated every day with 10 μM of morphine, 24h after seeding in a 96-well plate and during seven days. At 8DIV, the same treatment protocol as that of the acute treatment was used to determine of the cAMP accumulation in DRG neurons.

HEK293T cell culture. The effects of morphine on cAMP production was determined in HEK293T cells transfected with MOR and/or FLT3 as described above. Morphine (10 μM) and/or the effects of the FLT3 inhibitor AC220 (1 μM) was tested on FSK-induced cAMP.

Immunohistochemistry

Mice were transcardially perfused with phosphate-buffered saline (PBS). DRG (L4-L6), spinal cord (lumbar segment) were collected and post-fixed in 4% paraformaldehyde between 10 min and 2 h depending on the antibody and tissue before being cryoprotected in 30% sucrose in PBS. Tissues were then frozen in O.C.T (Sakura Finetek). Sections (12 to 14 μm) were prepared using the Cryostat Leica CM2800E. For immunostaining, frozen sections were blocked and permeabilized in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free PBS containing 10% donkey serum 0.1% Triton x-100 during 30 minutes. The sections were then incubated with primary antibodies, at 4°C overnight in PBS free containing 1% donkey serum and 0.1% Triton x-100. After wash in PBS free (3 times for 10 min minimum each), sections were incubated with appropriate secondary antibody conjugated to AlexaFluor and Hoechst (Sigma 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), in the same buffer as the primary antibodies, at room temperature for 1 hour and then washing (3 times for 15 min each), before mounting with mowiol. Images were acquired under a Zeiss slide scanner Axio Scan Z.1 for quantification and under Zeiss LSM 700 Confocal microscope for illustration with ZEN software (Carl Zeiss Microscopy). The following primary antibodies were employed: anti-CGRP Abcam ab36001 (goat 1:1000), anti-GFAP Abcam ab4674 (chicken 1:1000), anti-Iba1 Wako (rabbit 1:500). The following secondary antibodies were used anti-rabbit AlexaFluor 555/488/647 (donkey 1:1000), anti-goat AlexaFluor 488 (donkey 1:1000) from Life Technologies.

The quantification of CGRP immunostaining in DRG neurons was realized by counting the number of cells expressing CGRP. Ratio with total neuron number was done in different conditions, and results were expressed in mean of obtained ratios (\pm SEM) and statistical significance was determined by variance analysis (ANOVA one-way) followed by Bonferroni post-hoc test. The number of neurons expressing the various molecular markers of sensory neurons (subtypes) was determined by counting cells with NeuN immunostaining. A minimum of six sections from lumbar DRG were counted from at least 6 animals for each genotype. For Iba1, GFAP and CGRP the quantification was assessed by determining staining surface among spinal cord dorsal horns with ImageJ software, after setting a density threshold above background. Results were shown in mean (\pm SEM) and statistical significance was determined by variance analysis (ANOVA one-way) followed by Bonferroni post-hoc test. A minimum of 5 sections of dorsal horn were quantified from at least 4 animals per condition.

In situ hybridization

Sense and antisense digoxigenin (DIG)-labelled RNA probes were generated from a mouse FLT3 cDNA clone (IRAMp995N1310Q, GenomeCUBE Source Bioscience) in a 20 μ l reaction containing 1 μ g of linearized plasmid (digested with NheI) using the DIG RNA labelling mix (Roche Diagnostics) and Sp6 RNA polymerases (Promega) following the manufacturer's instructions. DIG-labelled RNA probes were purified on MicroSpin G50 columns (GE Healthcare). Naive or CCI-injured WT and FLT3^{-/-} mice were euthanized by CO₂ inhalation followed by cervical dislocation. L4-L6 lumbar dorsal root ganglia and spinal cord were dissected in PBS, and fixed for 15 and 30 min, respectively, in 4% paraformaldehyde (PFA) at room temperature. Tissues were rinsed twice in PBS before immersion overnight in 30% sucrose/PBS at 4°C. *In situ* hybridization was performed with standard procedures on transverse sections of 14 μ m as described previously²⁵. Image acquisition was done using a Hamamatsu NanoZoomer using NDP view software.

Slices preparation and electrophysiological recordings

ANNEXE II

Spinal cord slices preparation. Mice (n = 28) were anaesthetized with an intraperitoneal (i.p.) overdose of chloral hydrate (7 %). A laminectomy was performed to remove the spinal cord in an ice-cold sucrose-based saline solution containing the following (in mM): 2 KCl, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 1.15 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 11 glucose, and 205 sucrose bubbled with 95% O₂, 5% CO₂. Transverse slices (350 µm thick) of the spinal thoraco-lumbar (T11-L3) were obtained using a vibratome (VT1200 S, Leica Microsystemes SAS, France). Slices were incubated at 37 °C in aCSF containing (in mM): 130 NaCl, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 0.6 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 10 glucose (pH 7.4) bubbled with 95 % O₂ and 5 % CO₂. After a 45 min recovery period, electrophysiological recordings were performed.

Whole-cell voltage-clamp recordings and drug application. Substantia gelatinosa neurons were visualized in spinal cord slices using an upright microscope fitted with fluorescence optics (AxioExaminer, Carl Zeiss, Germany) and linked to a digital camera QImaging Exi Aqua (Czech Republic). Patch pipettes (5-7 MΩ resistance) made from borosilicate glass (1.5 mm O.D; PG150T-15; Harvard Apparatus, UK) were filled with an internal solution containing (in mM): 135 KCl, 5 EGTA, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 2 ATP-Na₂, 0.2 GTP-Na₂ neurobiotin (0.05 %, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), dextran tetramethylrhodamine (10,000 MW, fluoro-ruby, 0.01 %, Life technologies, Saint Aubin, France), pH adjusted to 7.4 and osmolarity of 290-300 mOsm. Recorded neurons are maintained at a holding potential of -65 mV. Whole-cell voltage-clamp recordings of spontaneous excitatory post synaptic currents (sEPSCs) were made at room temperature (22 - 24°C). Series resistance was monitored at the beginning and end of each recording session, and data were rejected if values changed by > 20%. FL (100nM), the MOR agonist D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (DAMGO; 1µM) and a specific FLT3 extracellular inhibitor BDT001 (10µM) were bath applied for 10 min. The effects of FL and BDT001 on sEPSCs were also studied in the presence of DAMGO.

Analysis. Acquisitions were performed using Clampex 10 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) connected to a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) via a Digidata 1440A digitizer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Voltage-clamp data are low pass filtered at 2 kHz and digitized at 10 kHz. The frequency and amplitude of sEPSCs were analyzed offline using the Clampfit program (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and averaged every 3 minutes during the control, drugs application and the washout periods. All events were manually scrutinized to exclude spurious noise and include events that had failed to meet the trigger specifications.

Skin nerve preparation and *ex vivo* electrophysiological recordings

The *in vitro* glabrous skin-nerve preparation used was adapted from Zimmermann et al.³⁰ Briefly, adult male mice were euthanatized using an overdose of isoflurane (Piramal, UK) followed by a method of confirmation of euthanasia. The saphenous nerve and the skin of the hind limb were carefully dissected and placed in a custom-designed organ chamber (INT-CFMN, Aix-Marseille University, Marseille, France) containing warm oxygenated Synthetic Interstitial Fluid (SIF buffer; 30.5°C). The SIF buffer had the following composition (in mM): 120 NaCl, 3.5 KCl, 0.7 MgSO₄, 1.7 NaH₂PO₄, 5 Na₂HCO₃, 2 CaCl₂, 9.5 Na-Gluconate, 5.5 glucose, 7.5 sucrose, and 10 HEPES. The pH was set to 7.4 and the osmolarity was maintained at 300 mOsm/L. The skin was placed with the corium side up in the organ bath and the saphenous nerve was placed in an adjacent recording chamber filled with mineral oil. The skin was continuously superfused with oxygenated SIF buffer at a temperature of 30.5°C controlled with a CL-100 temperature controller (Warner Instrument, Harvard apparatus, USA). The saphenous nerve was kept in a recording chamber filled with mineral oil, gently teased, and groups of nerve fibers were placed on the gold recording electrode in order to isolate single-unit activity. Then, extracellular action potentials from single nerve fibers were recorded with an AC differential amplifier DAM 80 (WPI) and converted digitally using the CED Spike2 system (sampling rate of 20 kHz; Cambridge Electronic Design, UK). Spikes were discriminated off-line with the Spike2 software (Cambridge Electronic Design Limited, UK) and analyzed individually to avoid false positives. Mechanical-threshold of single saphenous nerve fiber was obtained by probing the skin flap with von Frey hairs (Friedrich-Alexander University, Erlanger, Germany). Nociceptors were probed for their high threshold (> 16 mN) and tonic discharges during long lasting mechanical stimulation. Low-threshold mechanoreceptors (potential non nociceptors) were defined as having mechanical threshold below 5.7 mN and rapidly or slow adapting discharges. Once a fiber has been characterized, a single 10 s-supraliminal mechanical stimulation of the receptive field was applied using a von Frey filament mounted on the arm of a computer-controlled piezoelectric stepper (PI E-861 Nexact® controller; Germany). The post-discharge (or afterdischarge) was defined as a prolonged activity occurring within a 5 min-period after the end of the mechanical stimulus. Ratio of firing rates determined 5 min after the stimulus (post-discharge) and 5 min before the stimulus was used to analyse the post-discharge.

RESULTS

FLT3 activation induces acute morphine tolerance and hyperalgesia through a molecular crosstalk between MOR and FLT3 in DRG neurons.

Since DRG sensory neurons are critical for MIT and MIH via MOR and for PNP via FLT3, we first examined the cellular localization of MOR and FLT3 in mouse lumbar DRG. Using MOR-mCherry expressing mouse combined with immunohistochemistry (IHC) and *Flt3* in situ hybridization (ISH) to examine the localization of MOR and *Flt3* mRNA, we found that $35\pm 1.6\%$ and $25.5\pm 2.3\%$ of sensory neurons were MOR- and *Flt3*-positive, respectively (**Fig. 1a,b**). A subset ($18.7\pm 3.6\%$) of *Flt3* neurons expressed MOR and $13\pm 1.6\%$ of MOR neurons were *Flt3*-positive (**Fig. 1b**). Hence, this co-localization between FLT3 and MOR led us to consider a physical interaction between the two receptors. To verify this hypothesis, we used an in vitro model via HEK293T cells co-transfected with a constant amount of Halo-FLT3 plasmid and increasing amounts of SNAP-MOR plasmid. Time-Resolved-FRET (TR-FRET) saturation curves showed that TR-FRET signal increased with increasing amounts of acceptor (SNAP-MOR) until all donor molecules (Halo-FLT3) are interacting with acceptor molecules (**Fig. 1c**). Therefore, a saturation level was achieved beyond which a further elevation of SNAP-MOR did not increase the TR-FRET signal, thereby reaching a maximal TR-FRET level (TR-FRET_{max}). These data indicate a specific interaction, less than 10 nm in our experimental conditions, between FLT3 and MOR in HEK293T cells and suggest a physical interaction between both receptors. To further examine this hypothesis, we performed immunoprecipitation followed by WB analysis experiments in DRG and DSC extracts using MOR-mCherry mice. FLT3 co-immuno-precipitated with native MOR expressed in DSC indicating the existence of a molecular complex between MOR and FLT3 (**Fig. 1d**). To ascertain the pre-(DRG level) and/or the post-synaptic localization (DSC level) of this complex, we analysed the possibility of a co-localisation of MOR and *Flt3* mRNA in DSC laminae I and II neurons where spinal MOR-positive neurons are exclusively localized³¹. There was no cellular co-localization between MOR protein and *Flt3* mRNA in DSC region indicating that the MOR-FLT3 complex is only present in DRG pre-synaptic central terminals (e.g. on primary afferent and not on dorsal horn neurons) (**Supplementary Fig.1a**).

The above results suggest the existence of interaction between FLT3 and MOR in DRG central terminals. This raises the question of whether and how FLT3/MOR complex may regulate the excitability of dorsal horn neurons at the DRG/DSC synapses. We thus investigated

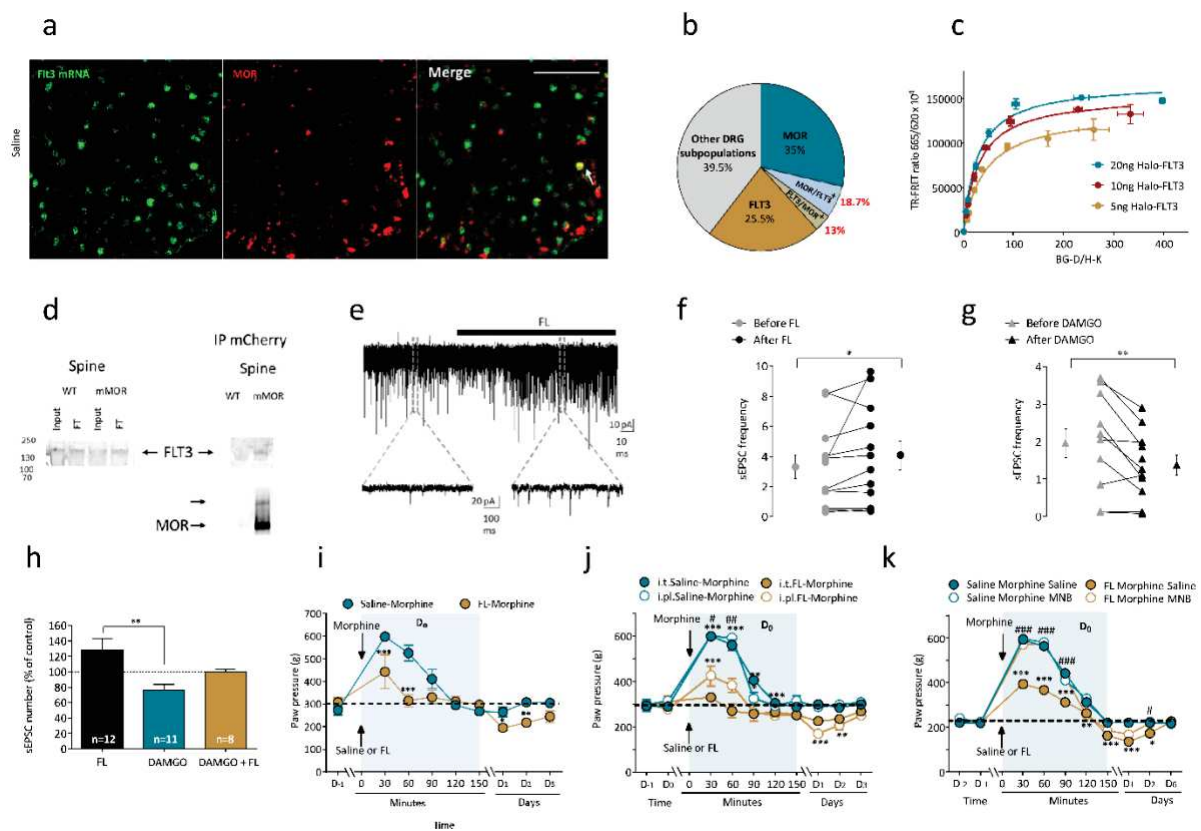


Figure 1 : Functional interaction in DRG sensory neurons between FLT3 and MOR decreases morphine analgesia and produces sustained pain hypersensitivity. (a, b) in situ hybridization of FLT3 mRNA in DRG sensory neurons from MOR mCherry mice showing the colocalization of MOR and FLT3. (c) Positive TR-FRET between MOR and FLT3 expressed in HEK293T cells. (d) Co-immunoprecipitation of mCherry and FLT3 in spinal cord from MOR mCherry mice. Panels show representative results from two independent experiments. (e-h) sEPSC frequency recording on spinal cord slices showing FL excitatory effect (e). sEPSCs frequency before and after FL (f) and before and after DAMGO (g). AUC quantification is represented in (h). Note that symbols at the left and right of each graph represent mean \pm SEM of n neurons per group. (i-k) Mechanical pain sensitivity assessed with the Randall-Selitto test in rats after morphine injection (s.c., 2mg/kg) in presence of i.t. saline or FL (138nM/20 μ L) (i), in presence of i.t. FL or i.p.l. FL (138nM/50 μ L) (j), or in presence of i.t. FL with or without MNB (s.c., 1mg/kg) (k) (n = 6 per all groups). All data are mean values \pm SEM. Student's t-test (f-h) and two-way ANOVA followed by the Bonferonni test (i-k) were used for statistical analyses.

the effects of FLT3 activation on spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) recorded in sensory neurons located in lamina I and II outer of DSC. Bath application of FL (100nM; **Fig. 1e**) significantly increased sEPSCs frequency (control = 3.3 ± 0.8 Hz, FL = 4.1 ± 0.9 Hz; $p=0.03$; **Fig. 1f**) but not sEPSCs amplitude (control = 15.2 ± 0.9 pA, FL = 14.7 ± 0.9 pA; $p=0.16$; data not shown). This strongly support a pre-synaptic action of FLT3 activation. As previously shown³² bath application of the MOR agonist DAMGO (1 μ M) for 5 minutes

initially reduced the frequency of sEPSCs (control=1.9±0.3, DAMGO=1.4 ± 0.2; p=0.006; **Fig. 1g**). Interestingly, the inhibitory effect of DAMGO on sEPSC frequency was partially suppressed by FL application (**Fig. 1h**). These results strongly support a pre-synaptic FLT3-dependent regulation of dorsal horn neurons to oppose MOR-induced acute depression.

We then assessed whether the cellular interactions between MOR and FLT3 are involved in nociception by measuring mechanical sensitivity using paw pressure method (see Methods). The activation of FLT3 by intrathecal injection (i.t.) of FL (138 nM/20µl) in rats reduced by 80% mechanical analgesia induced by subcutaneous morphine (2 mg/kg) and induced a sustained hyperalgesia (MIH) for 2 days (**Fig. 1i, supplementary Fig. 1b**). In order to highlight the localization of FLT3 in these deleterious effects, an intraplantar (i.pl.) FL injection was performed (138 nM/50µl) in comparison to the i.t. injection. Peripheral activation of FLT3 by i.pl. injection produced a similar phenotype to i.t. injection (**Fig. 1j, supplementary Fig. 1c**), indicating that FL effect results primarily from peripheral FLT3 signaling in DRG neurons. Furthermore, in FL-treated rats, morphine analgesia was completely restored by the preventive subcutaneous injection of methylnaltrexone bromide (MNB), a specific peripheral blocker of MOR³³ (**Fig. 1k, supplementary Fig. 1d**). Thus, bidirectional MOR-FLT3 functional interactions are likely to modulate acute morphine analgesia and MIH development in DRG neurons. Altogether, these data indicate a molecular crosstalk between MOR and FLT3 in DRG neurons which activation triggers acute MIT and MIH.

FLT3-dependent signaling pathways involved in the regulation of morphine analgesia

We next tested whether the functional interaction between MOR and FLT3 is important for the downstream signaling events conducted by MOR activation. We first investigated whether FLT3 can modulate acute morphine-induced inhibition of cAMP production, which occurs through MOR signaling coupled to the Gi pathway. Forskolin-induced cAMP production was examined in HEK293T cells transfected with either MOR or MOR and FLT3. Application of morphine (10 µM) totally inhibited cAMP production in HEK293T cells expressing MOR receptor, while morphine inhibition was reduced in HEK293T cells co-transfected with MOR and FLT3 receptors (**Fig. 2a**). At the behavioral level, the synthetic peptide inhibitor of PKA, PKI 14-22, restored morphine analgesia and prevented pain hypersensitivity produced by the administration of the FLT3 ligand FL (**Fig. 2b**). To validate

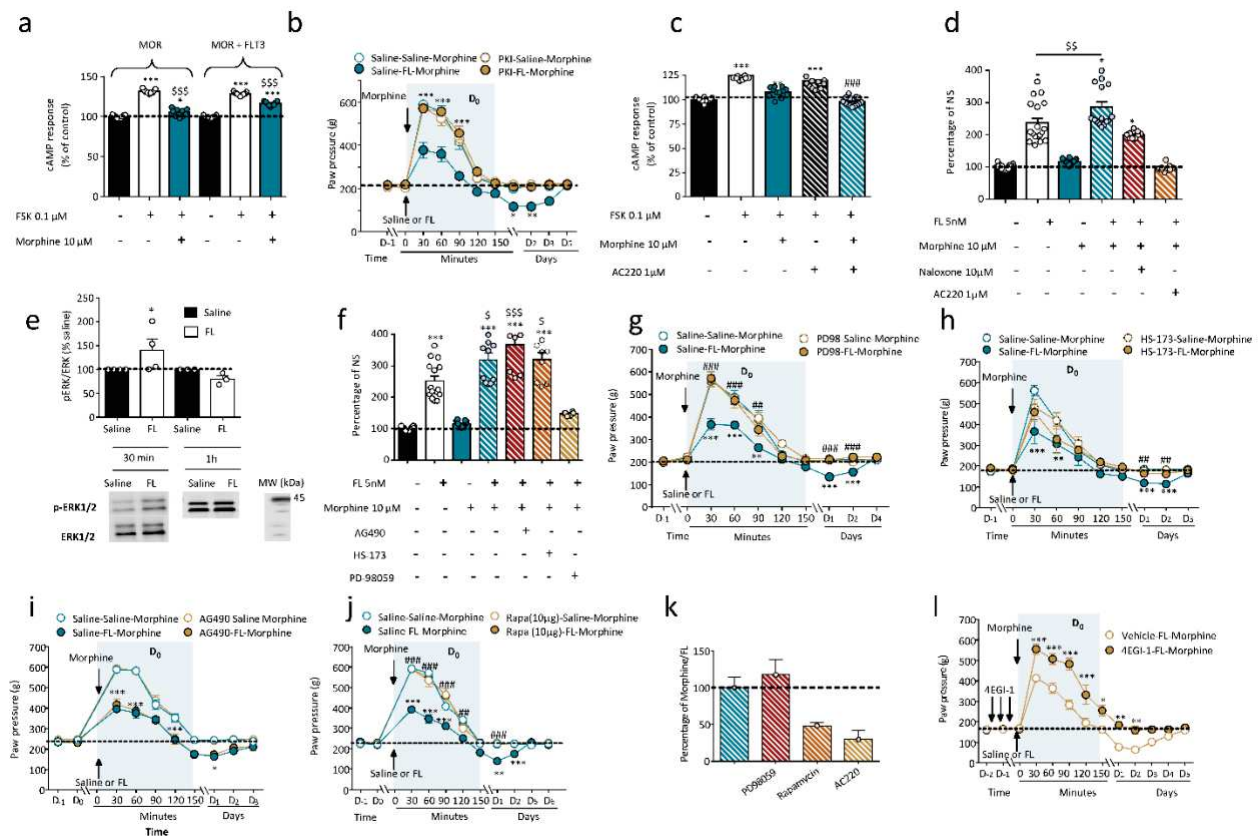


Figure 2 : A cross-talk between MOR and FLT3 regulates cAMP, ERK and mTOR signaling pathways to promote MIT and MIH. (a) cAMP response measured by TR-FRET on HEK293T cells transfected with MOR or MOR+FLT3 following FSK and morphine stimulation. **(b)** Baseline nociceptive sensitivity of Sprague-Dawley rats during morphine-induced analgesia in presence of i.t. FL with or without PKI. **(c)** cAMP response measured by TR-FRET on HEK293T cells transfected with MOR or MOR+FLT3 in presence of FSK, morphine and AC220. **(d)** ERK1/2 activation measured by HTRF in HEK293T cells co-transfected with MOR and FLT3 in presence or not of FL (5 M), morphine (10 μM), naloxone (10 μM) and AC220 (1 μM). **(e)** ERK1/2 activity increased in presence of FL 30 min post-injection but not 1h post-injection in Sprague-Dawley rats treated with i.t. FL (138nM/20 μL). **(f)** ERK1/2 activation measured by HTRF in HEK293T cells co-transfected with MOR and FLT3 in presence or not of FL (5 M), morphine (10 μM), AG490 (10 μM), HS-173 (0.1 μM) and PD98059 (10 μM). **(g-j)** Baseline nociceptive sensitivity of Sprague-Dawley rats measured by Randall-Selitto test during morphine-induced analgesia (s.c. injection, 2mg/kg) in presence of i.t. saline or i.t. FL (138nM/20 μL) with or without PD98059 **(g)**, HS-173 **(h)**, AG490 **(i)**, rapamycin **(j)**. **(k)** mTORC1 activity measured by quantitative western blot analysis expressed in percentage of Morphine/FL with different inhibitors (PD98059, rapamycin, AC220) in HEK293T cells co-transfected with MOR and FLT3. **(l)** Baseline nociceptive sensitivity of Sprague-Dawley rats measured by Randall-Selitto test during morphine-induced analgesia (s.c. injection, 2mg/kg) in presence of i.t. FL (138nM/20 μL) with or without 4EGI-1. All data are mean values ±SEM. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni's test for multiple comparisons **(b, h-l)** or the Dunnett's test **(a, c, f, k)** and Student's t-test **(e)** were used for statistical analyses.

the specificity of FLT3 on cAMP response, AC220 (an intracellular FLT3 inhibitor) was administered to HEK293T cells co-expressing FLT3 and MOR. AC220 administration confirmed the blockade of morphine inhibitory effect in a FLT3-dependent manner **(Fig. 2c)**.

Taken together, our data demonstrate a functional interaction between MOR and FLT3 that blunts morphine analgesia through an cAMP-dependent pathway.

We next analyzed ERK pathway which is a downstream effector of FLT3 signaling, critical for the development of analgesic tolerance and hyperalgesia^{17,34} and implicated in the transactivation of RTKs by GPCRs as well³⁵. Hence, we investigated the activation of ERK signaling via HTRF in HEK cells co-transfected with FLT3 and MOR. FL application induced ERK phosphorylation which was significantly increased by the co-application of morphine (**Fig. 2d**). The application of the opioid antagonist naloxone (10 μ M) or the FLT3 inhibitor AC220 (1 μ M) partially or totally reversed increased ERK phosphorylation, respectively (**Fig 2d**). Of note, morphine alone did not significantly change the level of ERK phosphorylation. ERK activation was also described *in vivo* in rats DRG 30 min after FL intrathecal injection (**Fig. 2e**). Next, we investigated which downstream FLT3-dependent signaling activates ERK signaling. Three main canonical signaling pathways can be activated by FLT3 including JAK2/STAT3, PI3k/Akt and MAPK pathway. To determine which signaling pathways were responsible for ERK phosphorylation, we evaluated the effects of different pharmacological inhibitors on ERK phosphorylation. Our results showed that the application of PD98059 (10 μ M) prevented ERK activation on HEK cells (**Fig. 2f**) and was highly effective in restoring morphine analgesia and blocking mechanical pain hypersensitivity after the administration of morphine and FL (**Fig. 2g**), showing the implication of MAPK pathway in ERK activation. Nevertheless, even if inhibition of JAK2/STAT3 and PI3k/Akt pathways were not effective on HEK cells in reducing ERK phosphorylation, intrathecal injection of their respective inhibitors HS-173 and AG490 (**Fig. 2h,i**) prevented FL-induced hyperalgesia. Similarly, intrathecal rapamycin (10 μ g) was able to abrogate FL deleterious effects and preserve morphine analgesia (**Fig. 2j**), highlighting the involvement of MTOR activation consequently to FLT3 stimulation. Interestingly, one molecular key actor of MTOR activity, eIF4E, can be activated both by MTOR and MAPK pathways and is involved in pain sensitization³⁶. We investigated the functional role of eIF4E through its inhibition via the administration of 4EGI-1. The intrathecal injection of 4EGI-1 (25 μ g) totally prevented FL-induced reduction of analgesia and hyperalgesia (**Fig. 2k**). Finally, we assessed the possible interconnection between the different signaling pathways involved in FLT3 induced-MIT and -MIH. In our *in vitro* model, we found that the application of PD98059 (10 μ M) did not reduce mTOR phosphorylation following FL and morphine application (**Fig. 2l**). Altogether, these data suggest a synergistic activation of ERK pathway by FLT3 and MOR

activation and the involvement of different downstream FLT3 signaling pathways that may trigger the translation initiation factor eIF4E.

Genetic deletion of FLT3 prevents morphine-induced sensitization involved in MIT and MIH

We next investigated the role of MOR/FLT3 interactions under chronic morphine exposure. We first examined the expression profiles of MOR and *Flt3* mRNA in sensory neurons after morphine exposure twice daily for 4 days. In an IHC staining study combined with ISH, immunoreactivity for MOR and transcripts for *Flt3* were detected in $41.6 \pm 1.6\%$ and $21 \pm 1.8\%$ of DRG neurons, respectively (**Fig. 3a, 3b**). Notably, co-expression of MOR in *Flt3*⁺ DRG neurons was increased to $34.9 \pm 2.3\%$ (**Fig. 3b**) compared to $18.7 \pm 3.6\%$ in normal conditions (**Fig. 1b**). Therefore, MOR/FLT3 interaction is likely to be increased after chronic morphine exposure.

To evaluate the role of FLT3 in the initiation of chronic morphine-induced pronociceptive maladaptive plasticity, we next analyzed mechanical hypersensitivity in *Flt3*^{-/-} mice and their littermate controls. We treated mice with intraperitoneal (i.p.) morphine (10 mg/kg) injection twice daily for 4 days and measured mechanical sensitivity before and during the treatment. Chronic administration of morphine resulted, both in WT males and females mice, in a progressive decrease of nociceptive threshold i.e. MIH. However, *Flt3*^{-/-} mice failed to develop MIH without no sex difference (**Fig. 3c; Supplementary Fig. 3a**). To further ascertain the role of peripheral FLT3 expressed in DRG neurons in MIH, we took advantage of the rat model to evaluate in the same animals, both morphine analgesia and basal nociceptive threshold. Rats were intrathecally injected with AAV9-*Flt3* shRNA virus that has already been shown to down-regulate FLT3 specifically in sensory neurons²⁵ (see also **Supplementary Fig. 3b**) and to block FL-induced mechanical pain hypersensitivity (**Supplementary Fig 3c**). Progressive mechanical pain hypersensitivity (**Fig. 3d**) and analgesic tolerance (**Fig. 3e**) were observed in animals treated with AAV-irrelevant shRNA after repeated morphine administration. Thermal hyperalgesia was also produced by chronic morphine treatment (**Supplementary Fig. 3d**). However, mechanical baseline nociceptive threshold (**Fig. 3d**) and morphine-induced analgesia (**Fig. 3e**) were totally maintained in animals receiving a single injection of AAV9-*Flt3* shRNA with no significant change on morphine-induced thermal pain hypersensitivity (**Supplementary Fig. 3d**). Similar effects were observed with the partial MOR agonist buprenorphine (100 µg/kg, subcutaneous) and the intrathecal administration of *Flt3*-siRNA

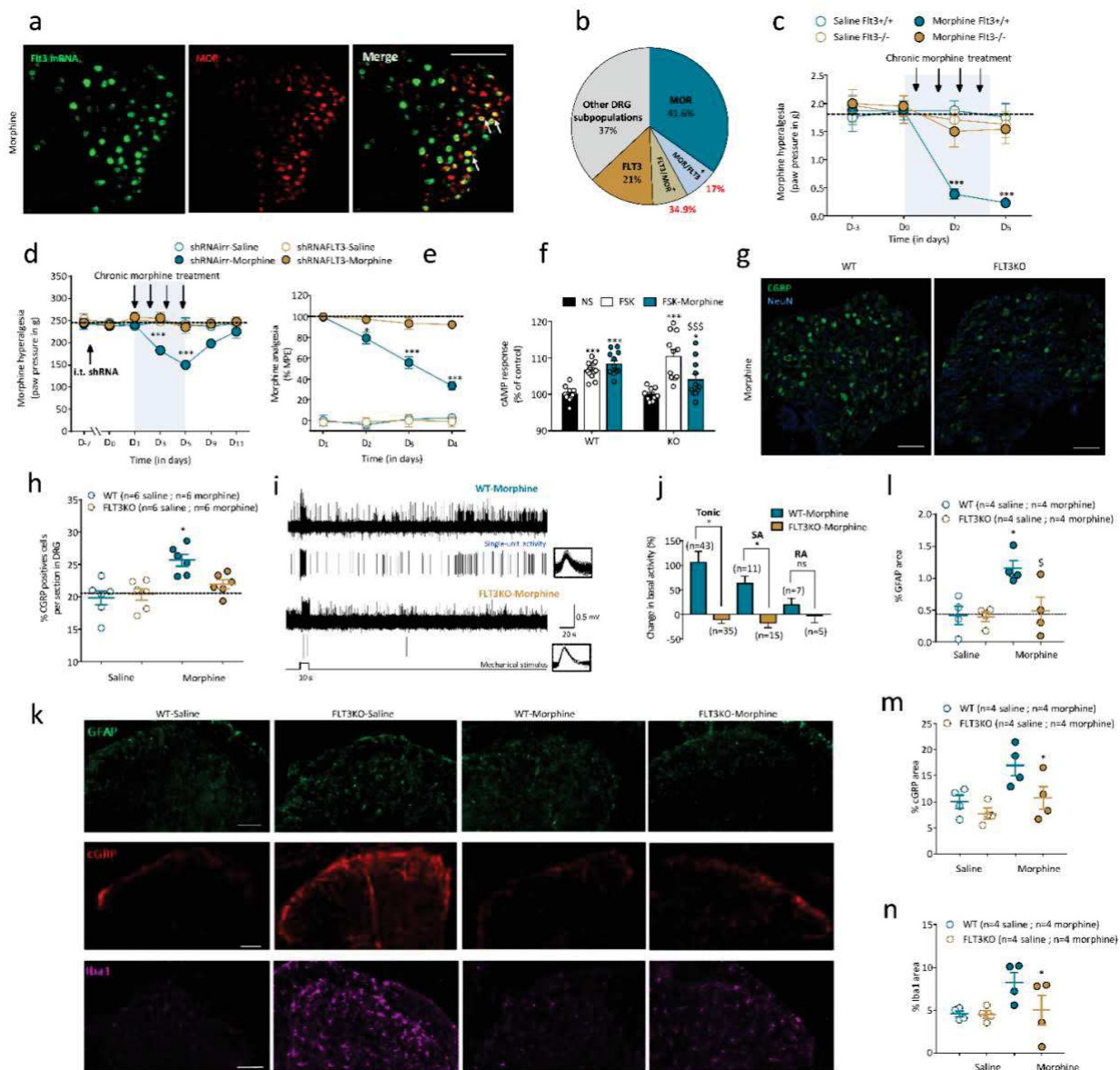


Figure 3 : FLT3 deletion in DRG sensory neurons blocks the onset of MIT and MIH and their associated molecular changes. (a, b) in situ hybridization of FLT3 mRNA in DRG sensory neurons from MOR mCherry mice showing the colocalization of MOR and FLT3 in mice chronically treated with morphine (10 mg/kg, intraperitoneal, twice a day for 4 days). Bars = 100 μ m. (c) Mechanical pain sensitivity of wild-type (WT) or FLT3-knockout (FLT3^{KO}) mice assessed by von Frey after chronic morphine treatment (intraperitoneal, morphine twice a day for 4 days, 10mg/kg). (d) Mechanical pain sensitivity of rats receiving a single i.t. injection of AAV9 irr-shRNA or AAV9 FLT3-shRNA virus before chronic morphine treatment (subcutaneous, morphine 2mg/kg twice a day for 4 days). (e) Representation of anti-nociception as the percentage of Maximal possible effect (MPE) after the first daily injection of morphine in AAV9 irr-shRNA- or AAV9 FLT3-shRNA-treated rats. (f) cAMP response following FSK stimulation of primary culture of DRG sensory neurons from WT or FLT3^{KO} mice. (g) CGRP immunoreactivity in DRG sensory neurons from WT and FLT3^{KO} mice after chronic morphine treatment (intraperitoneal, morphine twice a day for 4 days, 10mg/kg). Bars = 100 μ m. (h) Quantification of the experiments as in (g). (i-j) *Ex vivo* extracellular recordings of spontaneous- and mechanically evoked-activity from saphenous-nerve preparation of WT (top) and FLT3 KO (bottom) mice after chronic morphine treatment, highlighting the presence of aberrant post-discharges (Post-Ds) following a 10s-mechanical stimulation of high threshold C-mechanoreceptors only in WT mice. Single-unit activities derived from the raw action potentials (APs) (rightmost panel) are also shown. Note the lack of Post-Ds in a HTMR (stimulus as above) recorded from a morphine-treated

FLT3 KO mouse (i). Normalized firing of cutaneous mechanoreceptors recorded in WT mice treated with saline solution, FLT3 WT mice and in FLT3 KO exposed to chronic morphine (j). (k) GFAP, Iba1 and CGRP immunoreactivity in dorsal horn spinal cord from WT of FLT3^{-/-} mice treated with chronic saline or morphine treatment. Quantification of the experiments as in (k) for GFAP (l), CGRP (m) and Iba1 (n). All data are mean values ±SEM. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni's test for multiple comparisons (j, h,i) or the Dunnett's test (c, f, g) and Mann-Whitney's test (l-n) were used for statistical analyses.

which was able to prevent buprenorphine-induced hyperalgesia and analgesic tolerance (Supplementary Fig. 3 e, f). These results strongly support a key role of peripheral FLT3 in the development of pro-nociceptive maladaptive plasticity that induces opioid-induced tolerance and hyperalgesia while preserving opioid analgesia.

Pain hypersensitivity after chronic morphine exposure involves peripheral pro-nociceptive changes (e.g. cAMP super-activation, overexpression of CGRP, nerve hyperexcitability) that produces broad and prolonged changes in the DSC responsible for long-term central sensitization. Hence, we assessed the role of peripheral FLT3 in MOR-mediated cAMP response in sensory neurons of the DRG. As previously reported¹⁶⁻¹⁸, acute morphine reduced forskolin-stimulated cAMP levels in primary sensory neuron from WT mice and was dependent upon the activation of MOR as shown by the inhibitory effects of CTAP, a MOR inhibitor, on morphine-induced inhibition of cAMP production (Supplementary Fig. 3g). Conversely, after chronic morphine exposure, the ability of morphine to inhibit cAMP production was completely lost in WT DRG neurons (Fig. 3f). Consistent with the observation that pain hypersensitivity was blocked in *Flt3*^{-/-} mice, the ability of morphine to inhibit cAMP production was maintained in sensory neurons from *Flt3*^{-/-} mice (Fig. 3f) indicating the implication of FLT3 in chronic morphine-induced intracellular biochemical changes in DRG neurons. Next, our IHC analysis confirmed the increase in CGRP immunostaining in DRG neurons after 4 days morphine exposure in littermate controls³⁴ which was absent in *Flt3*^{-/-} mice (Fig. 3g, h). To further analyze the implication of FLT3 in peripheral nerve hyperexcitability associated with chronic morphine treatment, we recorded single nerve fiber activity using the ex vivo glabrous skin-saphenous-nerve preparation. As described previously³⁷ aberrant post-discharge activity was common in sensory fibers from morphine-treated mice but rare or absent in fibers from saline-treated mice (Fig. 3i, j). Sensory fibers from MOR mice continued to respond long after the termination of the mechanical stimulus. Consequently, the mean firing activity of all mechanosensory fibers following mechanical stimulation was significantly increased by 85% in *Flt3*^{+/+} mice treated with MOR (Fig. 3i, j). This accounted for an increase in activity in both high threshold mechanonociceptors (+106% ± 21.8, n=43) and low-threshold

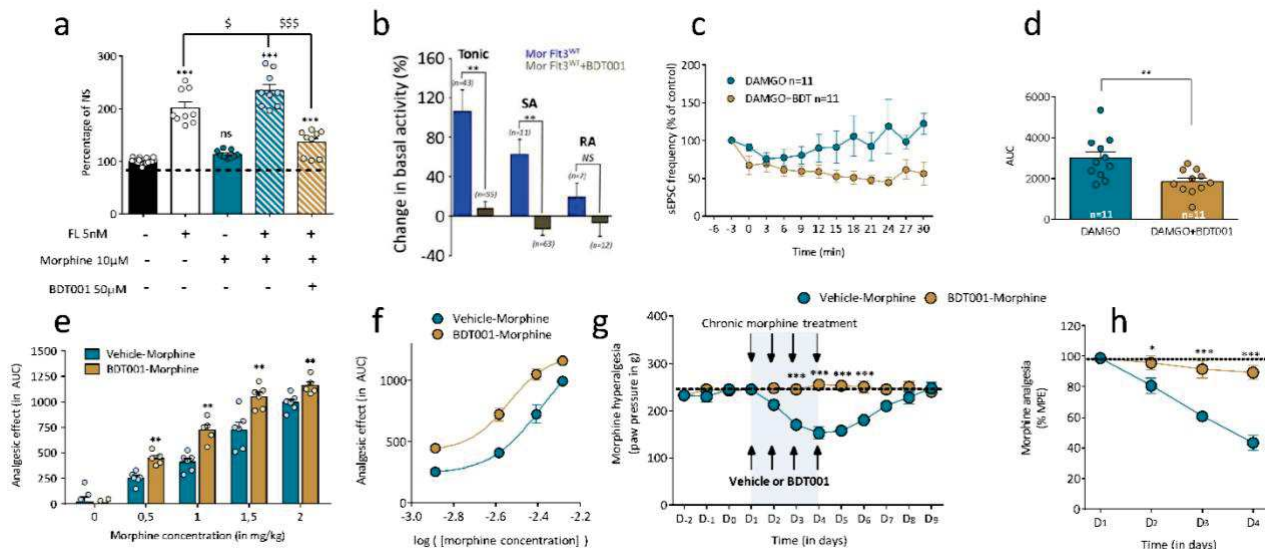


Figure 4 : Pharmacological inhibition of FLT3 by BDT001 potentiates morphine analgesia and prevents the onset of MIT and MIH. (a) ERK1/2 activation measured by TR-FRET in HEK-cells co-transfected with MOR and FLT3 in presence or not of FL, morphine, and BDT001. (b-c) sEPSC frequency recording on spinal cord slices showing BDT001 effects on DAMGO-induced inhibition of sEPSC frequency represented by the area under the curve (AUC, c). (d) Morphine antinociception evaluated by the Randall-Selitto test and represented by AUC in rats treated with DMSO or BDT001 (2 mg/kg, subcutaneous). (e, f) Dose-response curve of morphine analgesic effect expressed in area under curve (AUC) in presence or not of BDT001 showing a potentiative effect of BDT001 ($IC_{50} = 0.002895$) on morphine analgesic effect compared to vehicle-treated rats ($IC_{50} = 0.004147$). (g) Mechanical pain sensitivity of rats receiving Vehicle or BDT001 before chronic morphine treatment (subcutaneous, morphine 2mg/kg twice a day for 4 days). (h) Measurement of morphine antinociception (percentage of MPE) during chronic treatment after the first daily injection of morphine. All data are mean values \pm SEM. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni's test for multiple comparisons (f, g, h) or One-way ANOVA (a) or Mann-Whitney test (c) or Student t-test (d) were used for statistical analyses.

slowly-adapting mechanoreceptors ($+ 62\% \pm 8$, $n=11$). Low-threshold rapidly-adapting mechanoreceptors showed no obvious aberrant post-discharges following morphine treatment. Remarkably, no post-discharges were observed in morphine-treated FLT3 KO mice after mechanical stimulation, either in high threshold mechanonociceptors ($n=35$) or low-threshold slowly-adapting mechanoreceptors ($n=15$). These data strongly support the contribution of FLT3 to morphine-induced peripheral sensory nerve hyperexcitability.

Finally, morphine-induced central sensitization was examined in WT and *Flt3*^{-/-} mice. Morphine produced increased GFAP (Fig.3k, l), CGRP (Fig. 3k, m) and Iba1 (Fig. 3k,n) immunostaining in the spinal dorsal horn in WT mice. However, this was totally or partially suppressed in *Flt3*^{-/-} mice. This suggests the key role of peripheral FLT3 in the development of morphine-induced DSC plasticity. Altogether, these data indicate that FLT3 functioning is

sufficient to promote both peripheral and central sensitization after chronic morphine exposure that control both MIT and MIH, its inhibition preserving chronic morphine analgesia

Pharmacological blockade of FLT3 prevents the initiation of MIT and MIH

We previously generated a specific FLT3 extracellular inhibitor (BDT001) which prevents FL-induced FLT3 phosphorylation and abrogates nerve injury–induced chronic pain²⁵. We now reported that BDT001 alone had no effect on ERK signalling in HEK cells but reduced ERK phosphorylation induced by the application of FL and morphine (**Fig. 4a**). Next, we analyzed the action of BDT001 on opioid-induced peripheral nerve hyperexcitability using the mice saphenous skin-nerve preparation. Similarly to FLT3 genetic deletion (see **Fig. 3j**), BDT001 (5 mg/kg; i.p.) administered 30 min before morphine abolished morphine induced-aberrant post-discharges in both high-threshold mechanonociceptors (n=55) and low-threshold mechanoreceptors (n=63) (**Fig. 4b**).

Next we investigated at central level whether inhibition of FLT3 prevent the changes of superficial DSC neurons excitability induced by MOR activation. Brief application of DAMGO (1 μ M) initially reduced the frequency of sEPSCs and then induced an increase of sEPSCs frequency (and not amplitude, data not shown) during the washout period (**Fig. 4c**). Interestingly, inhibition of FLT3 with BDT001 bath application (10 μ M) reversed DAMGO-induced potentiation and further decrease the frequency of sEPSCs (Mean AUC in DAMGO condition: 2990 \pm 320; Mean AUC in DAMGO+BDT001 condition: 1830 \pm 181; p=0.005; **Fig. 4d**), without affecting their amplitudes (data not shown). Thus, these results suggest that BDT001 preclude the presynaptic pronociceptive effect of MOR activation on peripheral nerve and central synapse.

Based on these observations, we took advantage of our compound to evaluate whether BDT001 could be an innovative therapy strategy to improve morphine analgesia. Similarly to FLT3 genetic deletion, FLT3 pharmacological inhibition by BDT001 alone (2 mg/kg; i.p. injection) had no effect on basal mechanical sensitivity in naive rat and mice (**Supplementary Fig. 4a, b**) but significantly potentiated morphine analgesia (**Fig. 4 e; Supplementary Fig. b**): the leftward shift in the morphine dose-response curve represents a 10~50% reduction depending of the morphine dose (**Fig.4 f**). Similar results were obtained in mice with the analgesic effects produced by the i.p. morphine injection of 1.5 mg/kg that was enhanced by

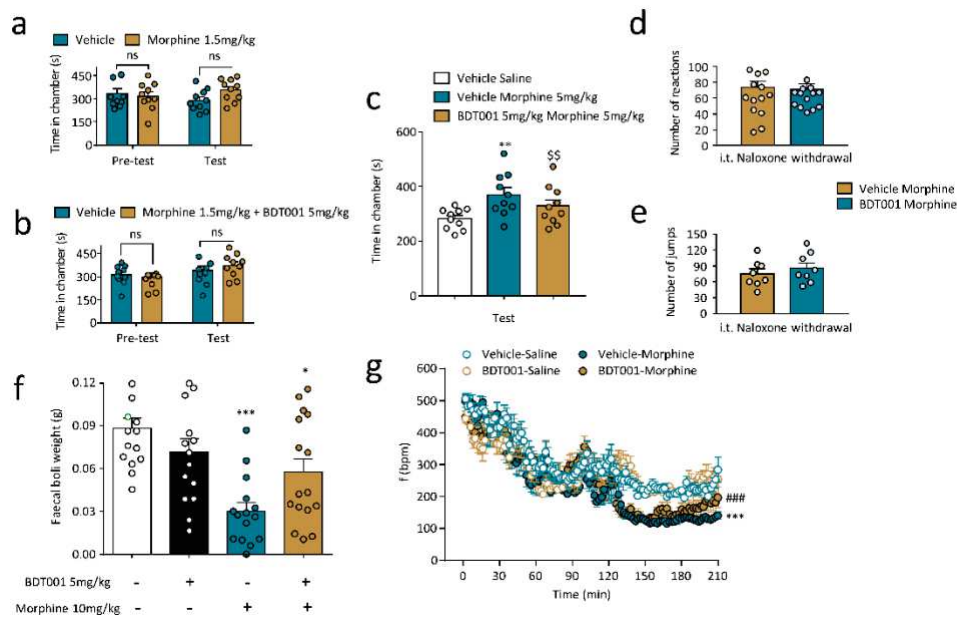


Figure 5 : Pharmacological inhibition of FLT3 by BDT001 prevents different morphine side effects. (a-c) Conditioned place preference in mice treated with low dose of morphine (1.5mg/kg, **a, b**) or high-dose of morphine (5mg/kg, **c**) with or without BDT001 (2.5 mg/kg, intraperitoneal, **b-c**). **(d-e)** Naloxone-induced number of reactions **(d)** and jumps **(e)** after chronic morphine in WT mice treated or with BDT001. **(f)** Constipation, measured by the weight of foecal boil in mice receiving saline or morphine (10 mg/kg, intraperitoneal) and vehicle or BDT001 (2.5 mg/kg, intraperitoneal). **(g)** Respiratory frequency after saline or morphine injection (10 mg/kg, intraperitoneal) in WT mice treated with vehicle or BDT001 (2.5 mg/kg, intraperitoneal). All data are mean values \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test **(g)** or the Dunnett's test **(c, f, g)** and Student t-test **(a-b, d-e)** were used for statistical analyses.

pre-treatment with BDT001 (5 mg/kg, i.p.) (**Supplementary Fig. 4a**). Finally, we investigated the effects of BDT001 on MIH and MIT produced by chronic morphine exposure. We showed that intraperitoneal injections of BDT001 totally prevented MIH and MIT (**Fig. 4 g, h**). Altogether, our data demonstrate that FLT3 pharmacological blockade with BDT001 combined with morphine not only potentiates morphine analgesia but also prevents morphine-induced peripheral hyperexcitability responsible for MIT and MIH without interfering with morphine deleterious effects.

Morphine is also known to produce several deleterious side effects that limit its clinical use^{4,38}. To emphasize the potential clinical efficacy and safety of BDT001 in patients on opioids, the effects of BDT001 on morphine-induced side effects were then investigated. First, the conditioned place preference paradigm that allows to assess morphine-induced motivational effects showed that the association of BDT001 with a small dose of morphine did not produce

any motivational effects as do BDT001 alone (**Fig. 5a, b**). Moreover, we demonstrated that morphine-induced place preference observed at 5mg/kg in animals untreated with BDT001 was completely prevented in animals receiving BDT001 in combination with morphine (**Fig. 5c**). Second, with regard to the other classical morphine deleterious effects, we reported that BDT001 did not change morphine withdrawal symptoms induced by naloxone injection (**Fig. 5, d, e; supplementary Fig. 5a**), and, did not alter neither morphine-induced constipation (**Fig. 5f**) nor respiratory depression (**Fig. 5g; supplementary Fig.5b, c**), two major morphine-induced side effects.

BDT001 in combination with morphine are effective in relieving acute and chronic pain- .

Because opioids are clinically prescribed to treat moderate to severe pain, we conducted experiments to evaluate the benefits of combining morphine and BDT001 therapy in animals with either acute post-surgical or persistent inflammatory pain. Using the incisional post-surgical pain model in mice³⁹, we found that 24h post-surgery, the nociceptive threshold was strongly decreased in control and morphine-treated animals with similar extend, indicating that the dose of morphine (1.5 mg/kg) was ineffective (**Fig. 6a**). In contrast, morphine-treated mice (1.5 mg/kg) with BDT001 (5 mg/kg) expressed an increase in the nociceptive threshold as compared to morphine-treated animals without BDT001 (**Fig. 6a**), indicating that the combination of BDT001 and morphine alleviates post-operative pain. Similarly, BDT001-morphine combination therapy alleviates chronic pain and prevent MIH and MIT in the Complete Freund's Adjuvant (CFA) model of persistent inflammatory pain⁴⁰. As classically described, paw CFA injection induced a decrease in mechanical nociceptive threshold (**Fig. 6b**). The first morphine injection produced a robust increase in the paw pressure on D₁, referred as analgesia, but progressively decreased after multiple morphine injections (**Fig. 6c**). BDT001 (5 mg/kg; i.p.) administered with morphine not only potentiated morphine analgesia on D₁ (**Fig. 6d**) but also prevented the loss of morphine analgesia observed on D₄ (**Fig. 6e**). Calculation of AUC showed a significant potentiation of morphine analgesia in presence of BDT001 on first and last treatment day (**Fig. 6f, g**). BDT001 completely prevented both morphine-induced exaggerated mechanical pain hypersensitivity referred as MIH (**Fig. 6h**) and the enhanced thermal pain hypersensitivity observed in morphine-treated animals (**Supplementary Fig. 6a**). The combination of morphine and BDT001 had modest effects on CFA-induced inflammation as evaluated by the diameter of the injected hindpaw (**Supplementary Fig 6b**). This

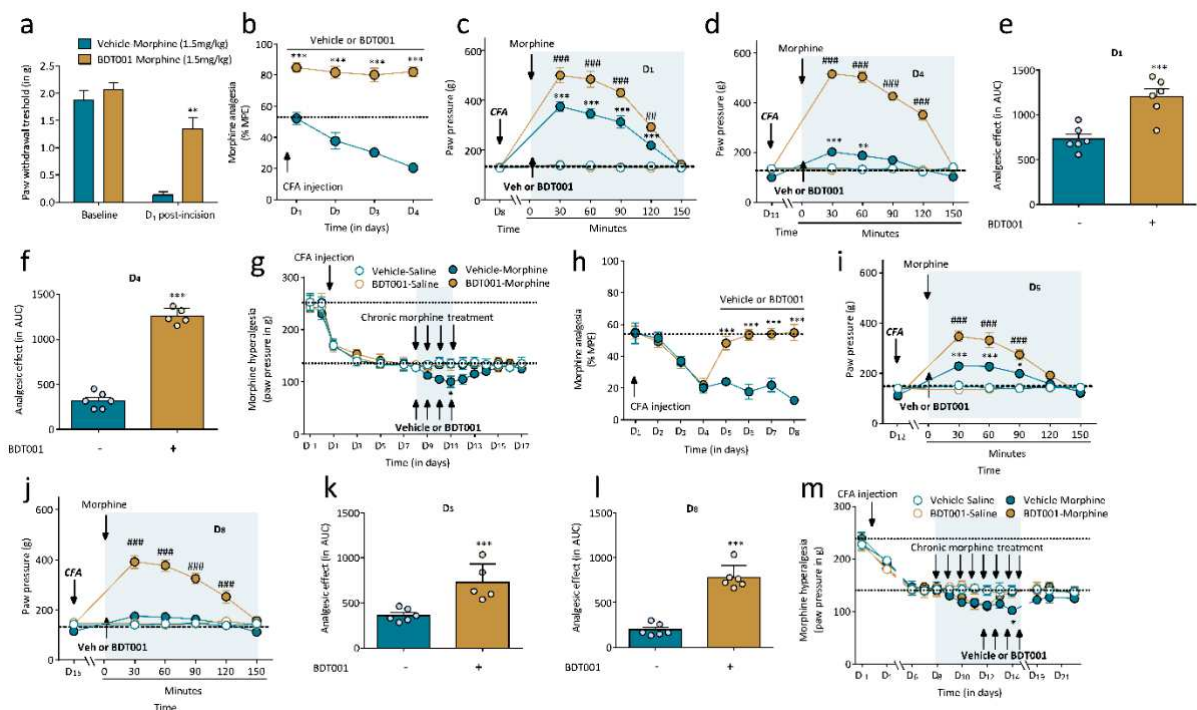


Figure 6 : Pharmacological inhibition of FLT3 by BDT001 improves morphine analgesia in acute and chronic inflammatory pain. (a) Paw withdrawal threshold measured by von Frey in WT mice receiving low dose of morphine (1.5mg/kg, intraperitoneal) with or without BDT001 (2.5 mg/kg, intraperitoneal) before and 24h after hindpaw incision. (b) Morphine antinociception (percentage of MPE) represented by the first daily injection of morphine in CFA-treated rats receiving preventive DMSO or BDT001. (c-d) Time course analysis of the first (c, D₁) or the last injection (d, D₄) of morphine in vehicle or BDT001 treated rats. (e-f) AUC representation of morphine-induced analgesia on D₁ and D₄. (g) Mechanical pain sensitivity assessed by the Randall-Selitto test in CFA-treated rats receiving chronic morphine treatment (subcutaneous morphine 2mg/kg twice a day for 4 days) from D₁ to D₄ in presence or not of preventive BDT001 treatment (intraperitoneal 2mg/kg). (h) Morphine antinociception (percentage of MPE) represented by the first daily injection of morphine in CFA-treated rats receiving curative DMSO or BDT001. (i-j) Time course analysis of the first (i, D₅) or the last injection (j, D₈) of morphine combined with BDT001 in CFA-treated rats. (k-l) AUC representation of morphine-induced analgesia on D₅ and D₈. (m) Mechanical pain sensitivity assessed by the Randall-Selitto test in CFA-treated rats receiving chronic morphine treatment (i.s. morphine 2mg/kg during 8 days) in presence or not of curative BDT001 treatment (i.p. 2mg/kg starting on 5th day of morphine treatment). All data are mean values \pm SEM. Two-way ANOVA followed by the Dunnett's test (a-d, g-j, m) and Student t-test (e-f, k-l) were used for statistical analyses.

observation suggests that the restoration of morphine analgesia was unlikely due to an action of BDT001 on peripheral inflammation. Similar experiments were conducted to evaluate the curative effects of BDT001 on MIT and MIH. On D₁, the first injection of morphine produced a time-depend analgesia in all animals as shown on **Supplementary Fig. 6c**. Then, all animals received morphine alone, twice daily for 4 days. Once MIH and MIT were established, morphine treatment was associated with BDT001 in some animals from D₅ to D₈ of treatment. Importantly, we observed that as soon as the first BDT001 injection was performed, morphine analgesia was increased (D₅; **Fig. 6i**) and restored at after 4 days of BDT001 treatment and 8 days of chronic morphine exposure (D₈; **Fig. 6j**). Calculation of AUC also showed a still significant potentiation of morphine analgesia both on first and last days of curative BDT001 treatment (**Fig. 6k, 6l**). The baseline nociceptive threshold measured before morphine administration was upper in animals treated with BDT001 indicative of the reduction of MIH after curative BDT001 injections as shown on **Fig. 6m**. Altogether, these data indicate that BDT001 therapy, in association with morphine, strongly improves acute and chronic morphine analgesia in pain models and both prevents and reverses MIT and MIH, limiting morphine dose escalation.

Discussion

The lack of fundamental knowledge about the mechanisms regulating long-term opioid efficacy has limited the identification of new, non-opiate specific targets for maintenance of adequate pain relief in chronic pain. Our study evidenced FLT3 signaling activation in primary afferent nociceptors during long-term morphine exposure, as the critical process that controls morphine-induced maladaptive plasticity within nociceptive neural circuits, resulting in MIT and MIH. Physical interaction of MOR and FLT3 at the level of DRG nociceptors along with the alteration of MOR-induced inhibitory effect by FLT3 selective activation both suggest a molecular and functional cross-talk between those two receptors. We propose that this cross-talk between MOR and FLT3 facilitates subsequent plasticity in CNS circuits involved in the development and maintenance of MIT and MIH. Thus, blockade of peripheral FLT3 functioning avoids MIT and MIH while largely improving morphine analgesic efficacy.

Functional interaction (e.g. heterodimerization, transactivation mechanisms) between GPCR and RTK are well documented to modulate opioid-induced analgesia and take part of

MIH and MIT^{35,41}. Here, we identify a new physical and functional interaction between MOR and FLT3 both at molecular and behavioral levels. Our results show that both receptors are co-localized in DRG neurons and FLT3 closely associates with MOR at the molecular level, as shown by fluorescence resonance energy transfer (FRET) and co-immunoprecipitation experiments. This physical interaction might be responsible for MIT and MIH development and maintenance as suggested by the analgesic tolerance and the mechanical pain hypersensitivity observed after subcutaneous morphine and intrathecal FL acute injections. Conversely, FLT3 inhibition in the DRG by genetic deletion (using AAV9-FLT3 shRNA virus and intrathecal anti-FLT3 siRNA) or MOR signalling by pharmacological approach (e.g. MNB) abolishes both MIT and MIH. This bidirectional molecular crosstalk appears restricted to DRG neurons since no co-localisation between MOR and FLT3 could be evidenced only in MOR DRG cells (but not in DSC; Supp. Fig. X). In the DRG, the subcellular localization of the MOR-FLT3 complex that contributes to MIT and MIH appears to be at least at the peripheral nerve terminals since *in vivo* local paw subcutaneous FL injection induce hyperexcitability (**Fig. 1 f**) but also at presynaptic central DRG/DSC synapses. Indeed, our electrophysiological studies revealed that FL-induced presynaptic FLT3 activation not only increases mEPSCs frequency in post-synaptic spinal neurons but also inhibits DAMGO-induced depression of spinal neurons mEPSCs frequency, indicating a pre-synaptic origin of these effects. Hence, we propose that a MOR-induced physical FLT3 transactivation contributes to the molecular, cellular and synaptic changes as well as subsequent networks signaling pathways adaptation resulting in MIH and MIT.

Although chronic peripheral MOR activation is now considered as a key player controlling MIH and MIT, the contribution of specific signalling pathways remains highly disputed (ref; Supplementary Note 2), especially those originated from the sensory neurons of the DRG. The rapid onset of FL on morphine analgesia suggests a direct intervention of FLT3 on signaling pathway supporting morphine analgesia. Acute modulation of AMPc by morphine is known to mediate its analgesic effects. We report that acute tolerance and hyperalgesia induced by FLT3 activation seems to be dependent of the classical cAMP-signaling. Our results showing FL-induced activation of ERK in rat DRG and the synergistic ERK activation by FL and morphine application on HEK cells are consistent with previous data reporting ERK activation following morphine exposure¹⁷. In addition, the pharmacological inhibition of ERK provide evidence for the critical role of FLT3-induced ERK activation in the development of MIT and MIH after morphine administration. Altogether, these observations suggest a shared

signaling mechanism between MOR and FLT3 receptors promoting MIH and MIT. Nevertheless, the complexity of signal transduction pathways induced by FL and morphine is highlighted by the positive effects of different inhibitors (HS-173, rapamycin) in our model, showing the involvement of others signaling pathways as mTORC1 activity. These results suggest the existence of different parallel downstream pathways, as shown by mTORC1 and ERK activation, which are able to induce independently the same behavioural phenotype in response to FLT3 and MOR activation. At this time, we cannot make definitive conclusions regarding one common target to these pathways but we suggest that eIF4E complex could be the convergent translation factor activated both by MAPK pathways and mTOR activity as previously described³⁶, due to attenuation of both acute MIT and MIH induced by FL and morphine injections after inhibition of eIF4E with its pharmacological inhibitor 4EG-I.

Because FLT3 activation by morphine chronic exposure can induce sustained pain hypersensitivity and tolerance, we thus focused on the effect of FLT3 inhibition either by genetic deletion (*FLT3*^{-/-} mice; AAV9-FLT3 shRNA virus and anti-FLT3 siRNA) or pharmacological inhibition (BDT001) in MIT and MIH. Morphine treatment increased co-localization of FLT3 and MOR in FLT3⁺ cells (Fig. 3a), suggesting an increase of the physical interaction between MOR and FLT3 after chronic opioid exposure. More importantly, we provided evidence that peripheral deletion of FLT3 in sensory neurons *via* the intrathecal injection of AAV9-shRNA virus prevents MIT and MIH development without disrupting opioid analgesia (Fig. 3). At biochemical levels, FLT3 deletion in DRG prevents not only the loss of morphine-induced inhibition on cAMP but also the overexpression of neuronal hyperexcitability markers as shown with decreased expression of CGRP in morphine-treated *FLT3*^{-/-} mice. Thus, chronic morphine-induced persistent peripheral sensitization seems to be abrogated by FLT3 deletion or inhibition. This is further supported by our electrophysiological studies showing the absence of post-discharges after mechanically stimulation of saphenous nerve in chronic morphine treated-*FLT3*^{-/-} or BDT001 mice as compared to morphine-treated *FLT3*^{+/+} animals. Previous reports also showed the impact of chronic morphine on central pain sensitization²⁴ which is confirmed in our study by the increased expression of glial (GFAP and Iba1) and neuronal (CGRP) markers 5 days after the beginning of morphine treatment. Importantly, our data indicate that the deletion of FLT3 prevented morphine-induced central sensitization as shown by the reduced expression of GFAP, Iba1 and CGRP in *FLT3*^{-/-} mice. Based on these results, our current hypothesis is that such a functional crosstalk between FLT3

and MOR within DRG neurons is mandatory for morphine-induced peripheral and central changes leading to MIT and MIH.

While opioids remain widely used in the treatment of inflammatory and post-operative pain, their side effects are positively correlated to dose escalation leading to an increase of morbidity and mortality, which underlies the present Opioid Crisis^{42,43}. Thus, prospective therapeutic strategies need to alleviate dose escalation without decreasing opioid analgesia. Our results indicate that inhibiting FLT3 signalling at DRG level could limit dose escalation following chronic opioid exposure by maintaining morphine-induced analgesia due to the blockade of FLT3-induced pain facilitation. In this sense, we showed here that inhibiting FLT3 by BDT001, a specific non-allosteric modulator of FLT3 known to inhibit neuropathic pain-induced hyperexcitability²⁹, not only prevents morphine analgesic tolerance but also potentiates morphine analgesia in naive animals, resulting in ~50% reduction of the morphine dose producing the same analgesic effect (Fig. 4e; see leftward shift in the morphine dose-response curve). The behavioral effects of BDT001 is associated with a reduction of morphine-induced potentiation of ERK activation *in vitro* and the potentiation of the MOR agonist D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (DAMGO)-induced inhibition at the pre-synaptic level. These data further support the activation of FLT3 by MOR agonist to mediate peripheral neuronal hyperexcitability blunting morphine inhibitory effects. Because clinical opioid medication is always associated with the relief of pain, we ascertain BDT001 therapeutic effects in both a model of chronic inflammatory pain through intraplantar CFA injection and a model of incisional post-operative pain. Importantly, BDT001 repeated injections yields stronger potentiation of morphine analgesia in these pain conditions (compared to naïve), prevents the development (preventive effect) and once installed, drastically reverses (curative effect) tolerance and MIH (Fig. 5), improving morphine analgesia during treatment of chronic pain. To date, pain relief in humans suffering from chronic pain treated with FLT3 inhibitor have been suggested in one clinical report⁴⁴. In this study, patients with androgen-independent prostate cancer were treated by sorafenib, a potent FLT3 inhibitor (IC₅₀ = 13 nM). Pain response, as measured by a two-point reduction in the Present Pain Intensity score (PPI, scored 1-5), without an increase in analgesic demand, or as a 50% or greater reduction in the analgesic demand without an increase in PPI, maintained for at least 3 weeks, was found in 15 patients out of 64. Among them, 3 stopped and 3 reduced by 75% the use of morphine. The results suggest a specific effect of sorafenib on pain and on opioid demand, rather than an indirect effect of tumor regression (14% and 78% of the patients have stable or progressive disease

respectively). Nevertheless, the response rate of patients on analgesics was not reported in the publication. In addition, BDT001 alone does not elicit the various morphine-induced side effects, nor it does potentiate these effects in combination with morphine, in particular respiratory depression and constipation, two major opioid-induced side effects. Surprisingly, when we assessed the abuse potential of BDT001 alone or in combination with morphine, by measuring the reinforcing effect in an unbiased Conditioned Place Preference (CPP) paradigm⁴⁵, BDT001 was also able to prevent morphine-induced place preference. Further studies are needed to better understand the role of FLT3 in the modulation of morphine-induced motivational effects.

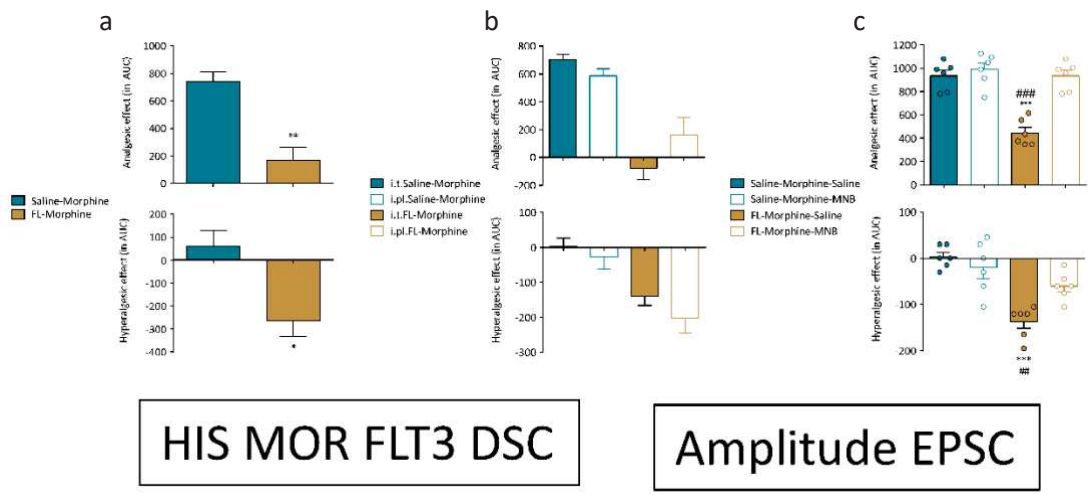
To conclude, we propose that FLT3 expressed on primary afferent nociceptors is involved in a cross-talk with MOR, altering MOR inhibitory properties following chronic opioid exposure. This functional interaction drives the initiation of adverse counter-adaptations to opioid, allowing the onset of MIT and MIH. Our data support the development of therapeutic strategies for disrupting FLT3 signaling in order to maintain adequate pain relief induced by morphine while limiting dose escalation and subsequent detrimental morphine-induced clinical side effects. This was tested by using BDT001, a new chemical entity, which blocked FLT3 signalling, preventing morphine tolerance and markedly enhancing morphine analgesia in chronic pain conditions. Hence, these finding could have important clinical implications, raising the exciting possibility that effective treatments might be available in a close future for the untold millions of patients suffering for chronic pain

References

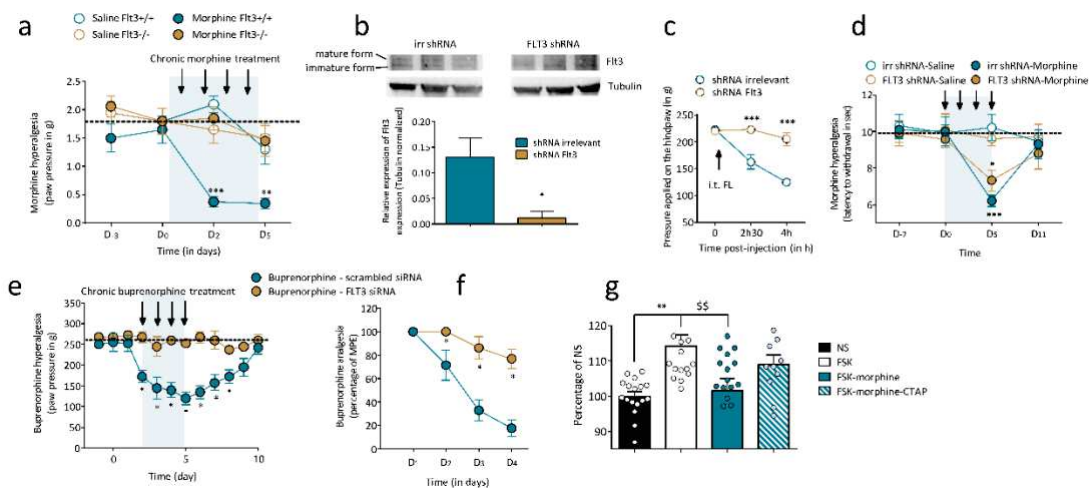
1. Bekhit, M. H. Opioid-induced hyperalgesia and tolerance. *Am. J. Ther.* **17**, 498–510 (2010).
2. Célèrier, E., Laulin, J. P., Corcuff, J. B., Le Moal, M. & Simonnet, G. Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: a sensitization process. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **21**, 4074–4080 (2001).
3. Mao, J., Price, D. D. & Mayer, D. J. Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **14**, 2301–2312 (1994).
4. Noble, M. *et al.* Long-term opioid management for chronic noncancer pain. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD006605 (2010) doi:10.1002/14651858.CD006605.pub2.
5. Corder, G. *et al.* Loss of μ opioid receptor signaling in nociceptors, but not microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesia. *Nat. Med.* **23**, 164–173 (2017).
6. Sun, J., Chen, S.-R., Chen, H. & Pan, H.-L. μ -Opioid receptors in primary sensory neurons are essential for opioid analgesic effect on acute and inflammatory pain and opioid-induced hyperalgesia. *J. Physiol.* **597**, 1661–1675 (2019).
7. Christie, M. J. Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br. J. Pharmacol.* **154**, 384–396 (2008).
8. Rivat, C. & Ballantyne, J. The dark side of opioids in pain management: basic science explains clinical observation. *Pain Rep.* **1**, e570 (2016).
9. Roeckel, L.-A., Le Coz, G.-M., Gavériaux-Ruff, C. & Simonin, F. Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. *Neuroscience* **338**, 160–182 (2016).
10. Ross, G. R., Gade, A. R., Dewey, W. L. & Akbarali, H. I. Opioid-induced hypernociception is associated with hyperexcitability and altered tetrodotoxin-resistant Na⁺ channel function of dorsal root ganglia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**, C1152–1161 (2012).
11. Vardanyan, A. *et al.* TRPV1 receptor in expression of opioid-induced hyperalgesia. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* **10**, 243–252 (2009).
12. Chen, Y., Geis, C. & Sommer, C. Activation of TRPV1 contributes to morphine tolerance: involvement of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 5836–5845 (2008).
13. Gardell, L. R. *et al.* Sustained morphine exposure induces a spinal dynorphin-dependent enhancement of excitatory transmitter release from primary afferent fibers. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **22**, 6747–6755 (2002).
14. Yue, X. *et al.* Sustained morphine treatment augments basal CGRP release from cultured primary sensory neurons in a Raf-1 dependent manner. *Eur. J. Pharmacol.* **584**, 272–277 (2008).
15. Raehal, K. M., Walker, J. K. L. & Bohn, L. M. Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 1195–1201 (2005).
16. Cahill, C. M., Walwyn, W., Taylor, A. M. W., Pradhan, A. A. A. & Evans, C. J. Allostatic Mechanisms of Opioid Tolerance Beyond Desensitization and Downregulation. *Trends Pharmacol. Sci.* **37**, 963–976 (2016).
17. Koshimizu, T.-A. *et al.* Complex formation between the vasopressin 1b receptor, β -arrestin-2, and the μ -opioid receptor underlies morphine tolerance. *Nat. Neurosci.* **21**, 820–833 (2018).

18. Sharma, S. K., Klee, W. A. & Nirenberg, M. Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 3092–3096 (1975).
19. Deng, M. *et al.* Mitogen-activated protein kinase signaling mediates opioid-induced presynaptic NMDA receptor activation and analgesic tolerance. *J. Neurochem.* **148**, 275–290 (2019).
20. Xu, J.-T. *et al.* Opioid receptor-triggered spinal mTORC1 activation contributes to morphine tolerance and hyperalgesia. *J. Clin. Invest.* **124**, 592–603 (2014).
21. Joseph, E. K., Reichling, D. B. & Levine, J. D. Shared mechanisms for opioid tolerance and a transition to chronic pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 4660–4666 (2010).
22. Reichling, D. B. & Levine, J. D. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. *Trends Neurosci.* **32**, 611–618 (2009).
23. Latremoliere, A. & Woolf, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* **10**, 895–926 (2009).
24. Mayer, D. J., Mao, J., Holt, J. & Price, D. D. Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7731–7736 (1999).
25. Rivat, C. *et al.* Inhibition of neuronal FLT3 receptor tyrosine kinase alleviates peripheral neuropathic pain in mice. *Nat. Commun.* **9**, 1042 (2018).
26. Dixon, W. J. Efficient analysis of experimental observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**, 441–462 (1980).
27. Rivat, C. *et al.* Fentanyl enhancement of carrageenan-induced long-lasting hyperalgesia in rats: prevention by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist ketamine. *Anesthesiology* **96**, 381–391 (2002).
28. Drieu la Rochelle, A. *et al.* A bifunctional-biased mu-opioid agonist-neuropeptide FF receptor antagonist as analgesic with improved acute and chronic side effects. *Pain* **159**, 1705–1718 (2018).
29. Matthes, H. W. *et al.* Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* **383**, 819–823 (1996).
30. Zimmermann, K. *et al.* Phenotyping sensory nerve endings in vitro in the mouse. *Nat. Protoc.* **4**, 174–196 (2009).
31. Kemp, T., Spike, R. C., Watt, C. & Todd, A. J. The mu-opioid receptor (MOR1) is mainly restricted to neurons that do not contain GABA or glycine in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* **75**, 1231–1238 (1996).
32. Zhou, H.-Y., Chen, S.-R., Chen, H. & Pan, H.-L. Opioid-Induced Long-Term Potentiation in the Spinal Cord Is a Presynaptic Event. *J. Neurosci.* **30**, 4460–4466 (2010).
33. Russell, J., Bass, P., Goldberg, L. I., Schuster, C. R. & Merz, H. Antagonism of gut, but not central effects of morphine with quaternary narcotic antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* **78**, 255–261 (1982).
34. Ma, W., Zheng, W. H., Powell, K., Jhamandas, K. & Quirion, R. Chronic morphine exposure increases the phosphorylation of MAP kinases and the transcription factor CREB in dorsal root ganglion neurons: an in vitro and in vivo study. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 1091–1104 (2001).
35. Araldi, D., Ferrari, L. F. & Levine, J. D. Role of GPCR (mu-opioid)-receptor tyrosine kinase (epidermal growth factor) crosstalk in opioid-induced hyperalgesic priming (type II). *Pain* **159**, 864–875 (2018).

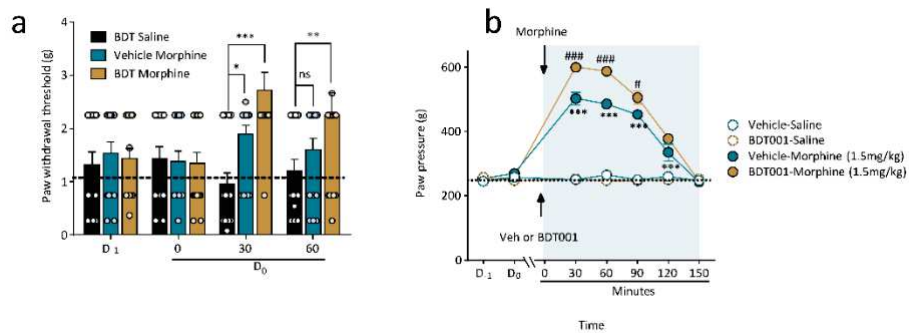
36. Moy, J. K. *et al.* The MNK-eIF4E Signaling Axis Contributes to Injury-Induced Nociceptive Plasticity and the Development of Chronic Pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **37**, 7481–7499 (2017).
37. Hogan, D., Baker, A. L., Morón, J. A. & Carlton, S. M. Systemic morphine treatment induces changes in firing patterns and responses of nociceptive afferent fibers in mouse glabrous skin. *Pain* **154**, 2297–2309 (2013).
38. Kalso, E., Edwards, J. E., Moore, R. A. & McQuay, H. J. Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. *Pain* **112**, 372–380 (2004).
39. Pogatzki, E. M. & Raja, S. N. A mouse model of incisional pain. *Anesthesiology* **99**, 1023–1027 (2003).
40. Gregory, N. S. *et al.* An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* **14**, 1255–1269 (2013).
41. Pak, Y., O’Dowd, B. F., Wang, J. B. & George, S. R. Agonist-induced, G protein-dependent and -independent down-regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 27610–27616 (1999).
42. Volkow, N. D. & Collins, F. S. The Role of Science in the Opioid Crisis. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1798 (2017).
43. Stein, C. New concepts in opioid analgesia. *Expert Opin. Investig. Drugs* **27**, 765–775 (2018).
44. Safarinejad, M. R. Safety and efficacy of sorafenib in patients with castrate resistant prostate cancer: a Phase II study. *Urol. Oncol.* **28**, 21–27 (2010).
45. Bespalov, A., Tokarz, M., Bowen, S., Balster, R. & Beardsley, P. Effects of test conditions on the outcome of place conditioning with morphine and naltrexone in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* **141**, 118–122 (1999).



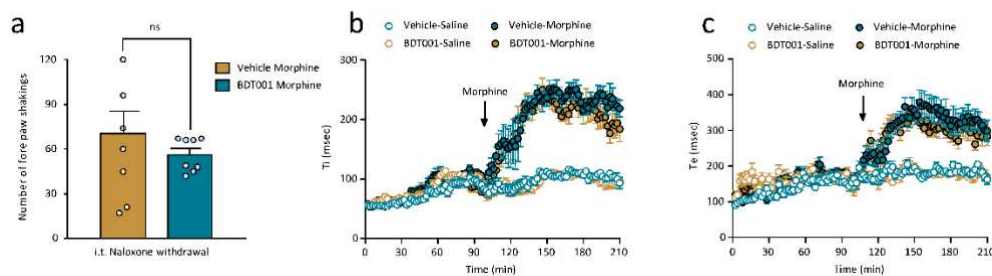
Supplementary figure S1 : Quantification of morphine analgesia and sustained hyperalgesia after FL injection. AUC representation of analgesia and hyperalgesia after subcutaneous morphine and intrathecal FL injections (**a**), after subcutaneous morphine and intrathecal or intraplantar FL injections (**b**) or after subcutaneous morphine coupled with MNB and intrathecal FL injections (**c**). All data are mean values \pm SEM. Two-way ANOVA followed by the Dunnett's test was used for statistical analyses.



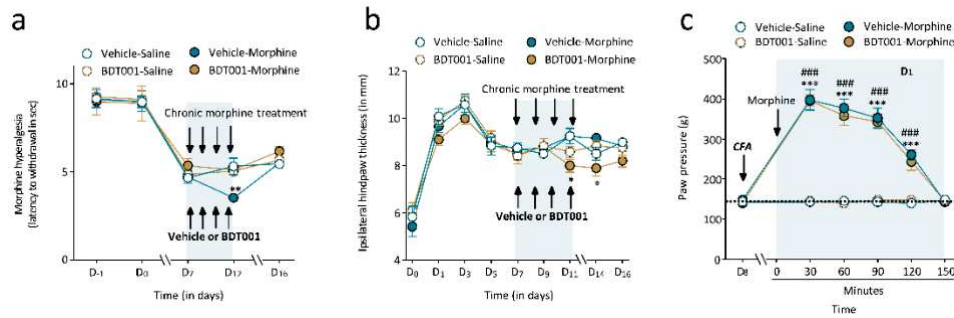
Supplementary figure S3 : FLT3 extinction in DRG sensory neurons avoid the onset of MIT and MIH and its associated molecular properties. (a) Baseline nociceptive hypersensitivity of WT female mice measured by Von Frey « up and down » method after chronic morphine treatment (i.p. morphine twice a day for 4 days, 10mg/kg) abolished in FLT3^{-/-} female mice. (b) FLT3 expression is extinguished in FLT3 shRNA treated rats but not irr FLT3 shRNA treated rats as shown with western blot quantification. (c) Baseline mechanical hypersensitivity induced by i.t. FL (138nM/20µL) in irr shRNA treated rats but not in FLT3 shRNA treated rats. (d) Baseline thermal hypersensitivity of Sprague-Dawley rats which received a single i.t. injection of AAV9 irr-shRNA or AAV9 FLT3-shRNA virus before chronic morphine treatment (i.s.c. morphine 2mg/kg twice a day for 4 days) measured with Hargreaves test. (e) Mechanical pain sensitivity of rats receiving a single i.t. injection of AAV9 irr-shRNA or AAV9 FLT3-shRNA virus before chronic buprenorphine treatment (subcutaneous, buprenorphine 0.05mg/kg) twice a day for 4 days (f) Representation of anti-nociception as the percentage of Maximal possible effect (MPE) after the first daily injection of buprenorphine in AAV9 irr-shRNA- or AAV9 FLT3-shRNA-treated rats. (g) cAMP response measured by TR-FRET on HEK293T cells transfected with MOR following FSK, morphine and CTAP stimulation highlighting the MOR-dependent inhibitory effect of morphine on cAMP response. All data are mean values ±SEM. One-way ANOVA (g) or two-way ANOVA followed by the Dunnett's test (a, c-f) and Student t-test (b) were used for statistical analyses.



Supplementary figure S4 : BDT001 potentiates morphine analgesia and prevents the onset of MIT and MIH. (a) Paw withdrawal threshold measured by von Frey in WT mice receiving low dose of morphine (1.5mg/kg, intraperitoneal) with or without BDT001 (2.5 mg/kg, intraperitoneal). **(b)** Time course analysis of morphine analgesia in Sprague-Dawley rats measured with Randall-Selitto assay after subcutaneous morphine injection (1.5mg/kg) showing the potentiative effect of BDT001 on morphine analgesic effect compared to vehicle-treated rats. All data are mean values \pm SEM. Two-way ANOVA followed by the Dunnett's test **(a, b)** was used for statistical analyses.



Supplementary figure S5 : Evaluation of morphine side-effects. (a) Naloxone-induced withdrawal on WT mice which has received chronic morphine treatment revealing no reinforcement of the number of fore paw shakings in BDT001-treated mice. **(b-c)** Acute morphine-induced respiratory depression measured as the respiratory time of inspiration **(b)** and expiration **(c)** highlighting the absence of exaggerating effect from BDT001 treatment. All data are mean values \pm SEM. Two-way ANOVA followed by the Dunnett's test **(b, c)** and Student t-test **(a)** were used for statistical analyses.



Supplementary figure S6 : (a) Baseline thermal hypersensitivity of CFA-injured Sprague-Dawley rats receiving chronic morphine treatment (i.sc. morphine 2mg/kg twice a day for 4 days) measured with Hargreaves test showing an absence of thermal hypersensitivity in BDT001-treated animals. (b) Hindpaw thickness measured (in mm) after CFA injection and during morphine and BDT001 chronic treatments highlighting a reduction of hindpaw thickness after pain medication with BDT001. (c) Time course analysis of first injection of morphine (D₁) during curative BDT001 protocol showing an identical analgesic effect in both populations as measured with Randall-Selitto test. All data are mean values \pm SEM. Two-way ANOVA followed by the Dunnett's test (a-c) was used for statistical analyses.

RÉSUMÉ

ABSTRACT

Chronic pain is defined as any kind of pain that lasts more than 3 months. About 20% of the global population is affected by chronic pain, with little to none effective treatment available, or with various side effects. Moreover, it has strong comorbidities with emotional disorders such as anxiety or depression or vulnerability to addiction. Better understanding of the mechanisms involved in pain sensitization and recovery is then needed to find out more efficient treatments. One particular system that is known to have a strong involvement in the recovery of pain as well as in its emotional component, is the Endogenous Opioid System. But the precise implication of each actor of this system in pain recovery, and their respective deregulation during each type of chronic pain remain debated.

Besides, in previous studies we have identified a key protein involved in chronic pain, the FLT3 receptor. The inhibition of this receptor in the peripheral nervous system allows a faster recovery in rodent models of neuropathic and postsurgical, but not of inflammatory pain, suggesting an interaction of FLT3 with the actors specifically responsible for the recovery from neuropathic and postsurgical pain.

In this study, using pharmacological approaches, we have explored the endogenous opioid system actors responsible for the recovery in mice expressing FLT3 or not, in various pain models. We found that the inhibition of the mu opioid receptor (MOR) in the spinal cord specifically reinstates a mechanical pain hypersensitivity in the chronic inflammatory pain model during the recovery, but not in the neuropathic or postsurgical pain model. In contrast, the inhibition of the delta opioid receptor (DOR) in the spinal cord induces pain hypersensitivity only in the neuropathic and postsurgical pain models. Importantly, the faster recovery observed in Flt3 knock-out animals in comparison with wild type animals after nerve injury or surgery is completely blocked by the administration of a DOR antagonist. Conversely, the known beneficial effects of a DOR agonist on mechanical hypersensitivity that were lost during chronic pain, were restored with the blocking of FLT3. Interestingly, we weren't able to observe any regulation of the opioid system by FLT3 at the RNA level. Therefore, we developed different specific tools and transgenic line to both be able to visualize the expression of FLT3 and DOR in the nervous system, and to inhibit DOR expression in specific neuronal subpopulations.

To resume, our results show that while MOR seems to be implicated in inflammatory pain recovery, DOR is responsible for the recovery of neuropathic and postsurgical mechanical pain. An interaction between the DOR and FLT3 receptors seems to downregulate the activity of DOR responsible for sustained pain hypersensitivity after nerve injury or surgery. Thanks to the development of new specific tools, we will be able to better characterize this interaction in the future. In all cases, the blocking of FTL3 could be a promising strategy to treat neuropathic and postsurgical pain by restoring endogenous activity of DOR

RÉSUMÉ

La douleur chronique est définie comme étant une douleur persistant plus de 3 mois. Cette pathologie touche environ 20% de la population mondiale, et les traitements actuels se révèlent peu efficaces sur le long terme, ou accompagnés de nombreux effets secondaires néfastes. De plus, plusieurs comorbidités sont associées à la douleur chronique, parmi lesquels on peut citer le développement d'une anxiodépression ou d'une vulnérabilité à l'addiction. Une meilleure compréhension des mécanismes responsables de la chronification douloureuse ou de la récupération à la douleur, est ainsi nécessaire pour développer de stratégies thérapeutiques plus efficaces. Un des systèmes déjà connu pour son implication importante dans la récupération à la douleur, mais également dans la composante émotionnelle liée à la douleur, est le système opioïdérique endogène.

Cependant, l'implication précise de chacun des acteurs composant ce système dans les mécanismes de récupération, et leur dérégulation respective dans les différents types de douleurs chroniques, reste largement débattu à l'heure actuelle.

Par ailleurs, nous avons identifié dans de précédentes études l'implication d'un acteur important dans ces mécanismes de douleurs chroniques, le récepteur FLT3. Son inhibition permet une récupération plus rapide dans des modèles animaux de douleur chronique neuropathique et postopératoire, mais pas inflammatoire. Cela suggère une interaction spécifique de FLT3 avec les acteurs impliqués dans la récupération à la douleur chronique neuropathique et postopératoire.

Dans cette étude, nous avons donc étudié par différentes approches pharmacologiques l'implication des différents récepteurs composant le système opioïde endogène dans la récupération à la douleur chronique, chez des animaux exprimant ou non FLT3. Nous avons ainsi observé que l'inhibition du récepteur opioïdérique mu (MOR) au niveau spinal spécifiquement, provoque la réapparition d'une hypersensibilité mécanique pendant la phase de récupération à la douleur inflammatoire, mais pas neuropathique ou postopératoire. A l'inverse, l'inhibition du récepteur opioïdérique delta (DOR) provoque une hypersensibilité mécanique spécifiquement dans des modèles de douleur neuropathique et postopératoire. Par ailleurs, la récupération plus rapide observée chez les animaux n'exprimant pas FLT3 suite à une lésion nerveuse ou des incisions chirurgicales est totalement prévenue par l'ajout d'un antagoniste DOR. A l'inverse, les effets bénéfiques classiques d'un agoniste DOR sur l'hypersensibilité mécanique qui sont perdus dans différents modèles de douleur chroniques, sont entièrement restaurés par l'inhibition de FLT3. De façon intéressante, nous n'avons pas pu observer de changements d'expression en ARN du système opioïdérique endogène en fonction de l'expression de FLT3. Nous avons ainsi développé différents outils spécifiques et lignées transgéniques afin de pouvoir étudier la localisation et l'expression de DOR et FLT3 dans le système nerveux dans différentes conditions, et de pouvoir inhiber l'expression de DOR dans certaines sous-populations neuronales spécifiques.

En conclusion, nos résultats montrent que si MOR semble être impliqué dans la récupération à la douleur inflammatoire, DOR est responsable de la récupération à la douleur chronique neuropathique et postopératoire. Une interaction entre DOR et FLT3 semble être responsable d'une inhibition de l'activité du DOR, responsable d'une hypersensibilité mécanique persistante après une lésion nerveuse ou une incision chirurgicale. Grâce aux développements de ces nouveaux outils, nous pourrions caractériser de façon précise les mécanismes entrant en jeu dans cette interaction. Néanmoins, nos résultats suggèrent d'ores et déjà que le blocage de FLT3 semble être une stratégie intéressante dans le traitement des douleurs neuropathiques et postopératoires, en restaurant l'activité endogène du récepteur DOR.