

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

THÈSE présentée par :

Safia AYACHI

soutenue le : **20 Novembre 2017**

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

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

Implication des récepteurs à peptides RF-amide dans la modulation de la douleur et de l'hyperalgésie induite par les opiacés

THÈSE dirigée par :

M. Frédéric SIMONIN

Directeur de recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. Aziz MOQRICH

Directeur de recherche, CNRS-Université d'Aix-Marseille

M. Cyril RIVAT

Maître de conférences, Université de Montpellier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. Michel BARROT

Directeur de recherche, Université de Strasbourg

Remerciements

Je souhaite en premier lieu remercier le Dr. Aziz Mogrich, le Dr. Cyril Rivat et le Dr. Michel Barrot d'avoir accepté de prendre le temps d'évaluer mes travaux en tant que membres du jury.

Je souhaite également remercier chaleureusement le Dr Frédéric Simonin pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et avoir accepté de diriger ma thèse. Sans sa culture scientifique et son regard avisé, ce travail n'aurait pas pu devenir ce qu'il est.

Je souhaiterais remercier chaleureusement le Dr Sylvain Hugel sans qui une grande partie de ce projet n'aurait pu avoir lieu. Sa patience, sa persévérance et sa disponibilité ont été mises rudement à l'épreuve mais ont fini par faire avancer les choses !

Je souhaite également remercier le Dr Valérie Simonneaux pour l'aide technique dont elle m'a permis de bénéficier lors de la réalisation du cryodécoupage. Un grand merci à Anne Robé pour m'avoir initié à l'hybridation *in situ*, cette expérience n'aurait pas pu aboutir sans tes précieux conseils et ta patience ! Ma gratitude va également à Christine Lehalle pour son temps et Marcel Boeglin pour son assistance lors de mon utilisation du microscope confocal, mais aussi Olivia Wendling et Hugues Jacobs pour le temps qu'ils m'ont consacré lors de mes journées passées au scanner de lame, les résultats ont finis par être mis en évidence, ça y est ça a marché ! Mes remerciements vont également à Judith Vallet et Ambre Bender qui ont eu la gentillesse et la pédagogie de m'initier à la RTqPCR et au Dr Mélanie Kremer et Xavier Wurtz sans qui l'étude de l'effet spinal du 26RFa n'aurait pas pu être réalisé !

Mes pensées vont ensuite au Dr Brigitte Illien dont le soutien sans faille n'a rendu que meilleures ces années passées au laboratoire. Je souhaite également faire part de ma gratitude à l'ensemble de l'équipe sans qui ces années de thèse auraient été radicalement différentes, merci au Dr. Khadija Elhabazi dont les travaux préliminaires ont permis de faire émerger ce sujet de thèse et pour m'avoir introduit à l'expérimentation animale. Merci à Valérie Utard dont les marques d'affections m'ont profondément touchées dans les moments difficiles.

J'en viens ensuite à celles et ceux qui m'ont inspiré et dont la passion communicative et la pédagogie ont été indispensables à mon parcours, merci à Mme Sophie Roy d'avoir fait

germer en moi l'amour de la biologie, au Dr Corinne De La Salle de l'avoir entretenue et au Pr. Rémy Schlichter d'y avoir ajouté l'attrait pour l'électrophysiologie et les Neurosciences.

Parce qu'un travail de longue haleine sera toujours le fruit d'un fragile équilibre entre dévotion incalculable et capacité à prendre du temps pour soi, je souhaiterais remercier le groupe des Doctorants Vaillants, nos soirées ont été une soupape d'évacuation qui m'ont permis de reprendre dans de meilleures conditions le lendemain ! Merci à l'ensemble des membres de mon club d'art martial qui m'ont permis de m'épanouir dans une sphère diamétralement opposée à celle de la recherche. Merci à mes coachs Maxime Alves, Etienne Spenato et Nicolas Muller, l'équilibre que m'a permis d'atteindre les moments passés ensemble ont été déterminant à l'aboutissement de ce travail ! Merci à Camille, Meggane et Jérôme pour votre soutien inébranlable, votre présence au quotidien a été inestimable et à Julien pour son intarissable humour.

Mes remerciements vont enfin à ma famille et à tous ceux qui m'ont soutenu dans les bons moments mais aussi dans ceux plus difficiles et qui se reconnaîtront sans aucun doute...

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	5
Tables des illustrations	7
Abréviations	8
Publications et communications	9
I. Introduction.....	10
A. Douleur.....	11
1. Définition	11
2. Voies de la douleur	11
3. Traitements de la douleur	14
B. Les opiacés.....	14
C. Tolérance analgésique et hyperalgésie induite par les opiacés	18
1. Balance homéostatique.....	18
2. Tolérance cellulaire	20
3. Systèmes anti-opioïdes.....	22
D. Le système RF-amide.....	24
1. Description générale et implications dans la modulation de la nociception	24
2. Propriétés pharmacologiques et principales fonctions physiologique du système RF-amide chez les mammifères.....	39
II. Hypothèse et objectif du doctorat	89
III. Matériel et méthode non cités dans les articles	91
A. Animaux.....	92
B. Génération des KO NPFFR1 et NPFFR2	92
C. Hyperalgésie induite par le fentanyl	92
D. Symptôme de sevrage	93
E. RTqPCR	93
F. Cultures de ganglions rachidiens.....	95
G. Imagerie du calcium	96
IV. Résultats	97
A. Assessment of Morphine-induced Hyperalgesia and Analgesic Tolerance in Mice Using Thermal and Mechanical Nociceptive Modalities	98
B. Implications des récepteurs à peptide RF-amide dans l'hyperalgésie induite par le fentanyl	109

C.	Implication du récepteur NPFFR1 dans l'hyperalgésie induite par la morphine et la tolérance analgésique.....	111
1.	Résultats	111
2.	Discussion	113
D.	Implication du récepteur NPFFR2 dans l'hyperalgésie induite par la morphine et la tolérance analgésique.....	116
1.	Résultats	116
2.	Discussion	118
E.	Modulation du sevrage à la morphine par NPFFR1 et NPFFR2	121
F.	Implication du récepteur GPR103a et de son ligand endogène le 26Rfa dans l'HIO, la tolérance analgésique et la modulation de la douleur	124
G.	Changements adaptatifs induits par le traitement chronique à la morphine.....	195
1.	Récepteurs et peptides RF-amide	195
2.	Récepteurs et peptides opiacés	197
H.	Implication de GPR103a dans la sensibilisation latente à la douleur.....	201
1.	Résultats	201
2.	Discussion	204
I.	Etude des mécanismes cellulaires provoqués par le 26Rfa dans les cultures de DRG : modulation du niveau de calcium	205
J.	Interaction fonctionnelle entre GPR103a et NPFFR1	209
V.	Discussion	213
VI.	Annexes	218
VII.	Références bibliographiques (hors articles publiés)	236

Tables des illustrations

Figure 1- Voie nociceptive	12
Figure 2- Schématisation du système antéro-latéral.	13
Figure 3- Voies de signalisation intracellulaire du récepteur opioïde MOR.....	17
Figure 4- Schéma de la balance homéostatique	19
Figure 5- Cycle d'endocytose-recyclage d'un RCPG.	21
Figure 6-Analgésie et hyperalgésie induite par le fentanyl.....	109
Figure 7- Hyperalgésie induite par le fentanyl chez les KO des récepteurs RF-amide.....	110
Figure 8- Seuil basal nociceptif et hyperalgésie induite par la morphine chez les WT et KO NPFFR1.....	112
Figure 9- Tolérance à l'analgésie morphinique chez les KO NPFFR1.....	113
Figure 10- Seuil basal et hyperalgésie induite par la morphine chez les KO NPFFR2	117
Figure 11- Tolérance à l'analgésie morphinique chez les KO NPFFR2.....	118
Figure 12- Symptôme de sevrage chez les KO NPFFR1	122
Figure 13- Symptôme de sevrage chez les KO NPFFR2	123
Figure 14- Variation de l'expression des ARN des récepteurs et peptides RF-amide et opiacés dans les DRG (A) et dans la moelle épinière lombaire (B).	195
Figure 15- La sensibilisation latente induite par le fentanyl est révélée par la naltrexone	201
Figure 16-Le prétraitement au RF1156 empêche le développement de la sensibilisation latente induite par le fentanyl	202
Figure 17- Effet curatif du RF1156 sur une sensibilisation latente induite par le fentanyl.....	203
Figure 18- Effet du 26Rfa sur la concentration de calcium libre intracellulaire de cellules CHO exprimant le récepteur GPR103h.....	205
Figure 19- Effet du 26Rfa sur la concentration de calcium libre intracellulaire des neurones et cellules gliales des ganglions rachidiens en culture.	206
Figure 20- Le 26Rfa ne modifie pas la décroissance progressive des réponses aux applications répétées de capsaïcine (2 µM)	207
Figure 21- RTqPCR sur culture cellulaire de DRG de 24h	208
Figure 22- Effet du 26Rfa, du RFRP3, et du NPFF chez les WT et KO NPFFR1	210
Figure 23- Effet du RF1156 sur l'hyperalgésie induite par le RFRP3	211
Figure 24- Effet du RFRP3 et du NPFF chez les WT et KO GPR103a.....	212
Figure 25 –Phénotypage global des souris KO NPFFR1	219
Figure 26- Analyse du métabolisme des souris NPFFR1.....	220
Figure 27 –Phénotypage global des souris KO NPFFR2.....	221
Figure 28- Analyse du métabolisme des souris NPFFR2.....	222

CCK	cholécystokinine
DOR	Delta Opioid Receptor, récepteur δ opiacé
DRG	dorsal root ganglia, ganglions de la racine dorsale
GIRK	canaux potassiques de la rectification entrante
GRK	RCPG kinases
HIF	hyperalgésie induite par le fentanyl
HIM	hyperalgésie induite par la morphine
HIO	hyperalgésie induite par les opiacés
i.th.	intrathécale
MOR	Mu Opioid Receptor, récepteur μ opiacé
N/OFG	nociceptine/orphanine FQ
RCPG	récepteurs couplés aux protéines G
s.c.	sous cutanée
SNC	système nerveux central
TIT	Tail Immersion Test, tests d'immersion de queue
TPT	Tail Pressure Test, test de pression de la queue

Publications de thèse :

Neuropeptide FF increases M2 activation and self-renewal of adipose tissue macrophages.

Waqas SFH, Hoang AC, Lin YT, Ampem G, Azegrouz H, Balogh L, Thuróczy J, Chen JC, Gerling IC, Nam S, Lim JS, Martinez-Ibañez J, Real JT, Paschke S, Quillet R, Ayachi S, Simonin F, Schneider EM, Brinkman JA, Lamming DW, Seroogy CM, Röszer T. J Clin Invest. 2017 Jun 5

RF-amide neuropeptides and their receptors in Mammals: Pharmacological properties, drug development and main physiological functions. Quillet R, Ayachi S, Bihel F, Elhabazi K, Ilien B, Simonin F. Pharmacol Ther. 2016 Apr. Review.

Involvement of Mammalian RF-Amide Peptides and Their Receptors in the Modulation of Nociception in Rodents. Ayachi S, Simonin F. Front Endocrinol (Lausanne). 2014 Oct 2; Review.

Assessment of morphine-induced hyperalgesia and analgesic tolerance in mice using thermal and mechanical nociceptive modalities. Elhabazi K, Ayachi S, Ilien B, Simonin F. J Vis Exp. 2014 Jul 29

GPR103-26RFa is a new neuromodulator system involved in neuroadaptive changes associated with chronic opioid administration and inflammatory pain. Safia Ayachi, Khadija Elhabazi, Glenn-Marie Lecoq, Jérôme Zens, Sylvain Hugel, Jack H. Jhamandas, Martine Schmitt, Tania Sorg, Marie-France Champy, Hamid Meziane, Benoit Petit-demoulière, Vivian L. Tawfik, Andrew Shuster, Gregory Scherrer, François Caussade, Laurent Diop, Yassine Darbaky, Jean-Jacques Bourguignon, Frédéric Bihel and Frédéric Simonin (en cours de soumission)

Liste des communications orales et par affiches :

Poster « **Involvement of GPR103 and its ligand 26RFa in the modulation of nociception and opiates analgesia** » Safia AYACHI, Glenn-Marie LECOZ, Khadija ELHABAZI, Martine SCHMITT, Tania SORG, Jean-Jacques BOURGUIGNON, Frédéric BIHEL, Frédéric SIMONIN ; Medalis Public scientific Meeting 2016 “Drug Development in an Academic Environment” 6th December 2016 at College Doctoral European

Communication orale « **Involvement of GPR103A in opioid-induced hyperalgesia and tolerance** » Safia AYACHI, Khadija ELHABAZI, Glenn-Marie LECOZ, Martine SCHMITT, Tania SORG, Jean-Jacques BOURGUIGNON, Frédéric BIHEL, Frédéric SIMONIN ; 13ème Symposium douleur, Marseille le 17 et 18 Mars 2017.

I. Introduction

A. Douleur

1. Définition

Selon l'IASP (International Association for the Study of Pain), la douleur est définie comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle ou décrite en ces termes ». La douleur est donc une expérience subjective dans laquelle on distingue trois composantes (Melzack and Casey, 1968):

- **La composante sensori-discriminative** qui permet d'analyser la nature, la localisation, la durée et l'intensité de la stimulation.
- **La composante affectivo-émotionnelle et comportementale** qui confère le caractère désagréable, aversif et émotionnel et provoque des réactions comportementales d'attention, d'anticipation, ou de fuite. Cette composante est liée à la mise en jeu de régions corticales et limbiques.
- **La composante cognitive** qui intègre l'information nociceptive dans le contexte situationnel, mais aussi par rapport aux expériences antérieures et confère une signification à la douleur perçue.

La douleur constitue un système d'alarme pour l'organisme. En amont de la douleur, un réseau de neurones traite et intègre l'information sensorielle à l'origine du message nerveux provoquant la douleur. Ces neurones, appelés nocicepteurs, forment le **système nociceptif**. La nociception correspond à la sensibilité qui permet à l'organisme de détecter des stimuli potentiellement nocifs. La nociception est la composante sensorielle de la douleur, c'est une sensation, un phénomène physique, alors que le terme douleur renvoie à un phénomène psychologique, une perception, c'est-à-dire une interprétation consciente du stimulus nociceptif.

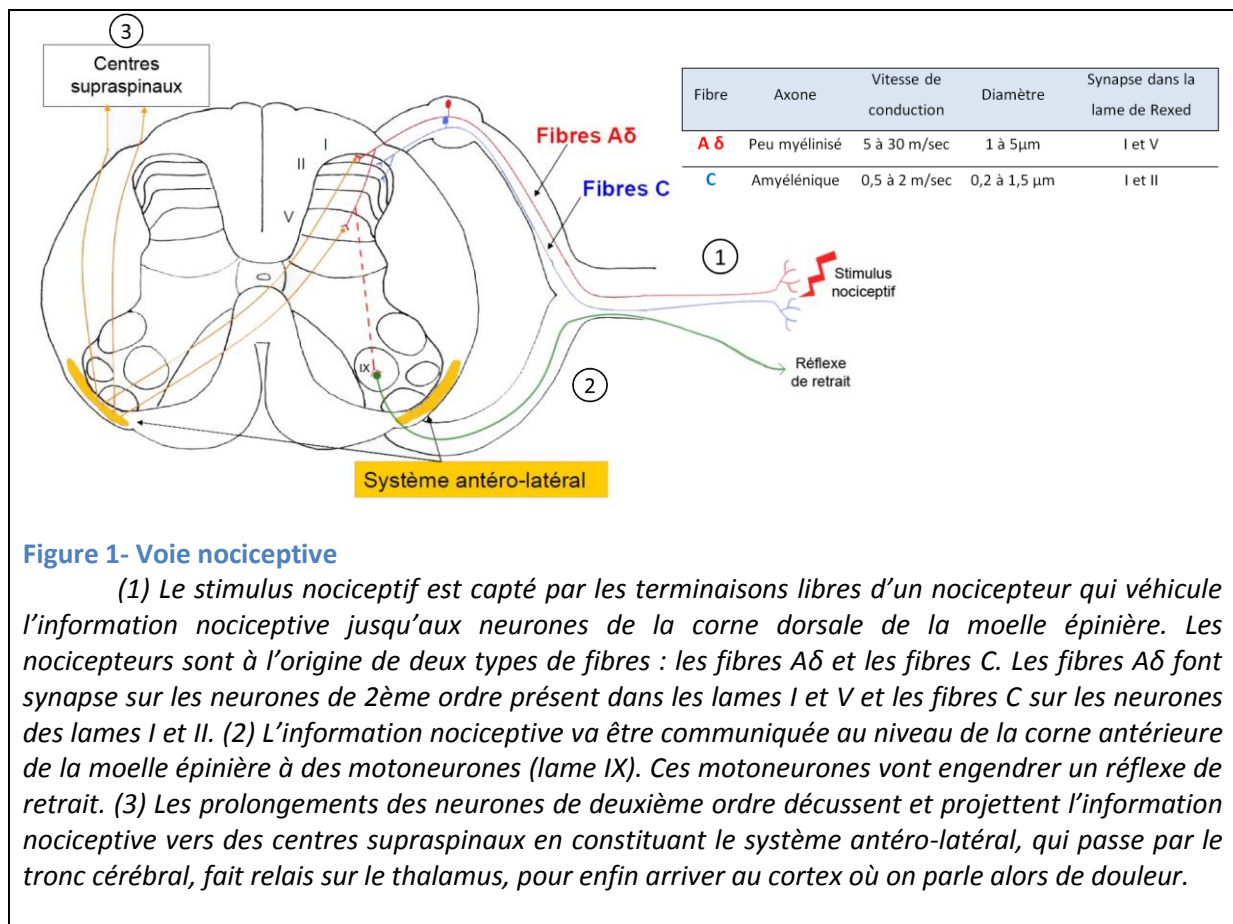
2. Voies de la douleur

Les voies de la douleur ont été fortement étudiées et un grand nombre de revues décrivent avec précision le cheminement qu'emprunte l'information nociceptive jusqu'à devenir douleur (D'Mello and Dickenson, 2008; Basbaum et al., 2009; Dubin and Patapoutian, 2010; Tracey and Dickenson, 2012; Mertens et al., 2014).

La stimulation nociceptive active les nocicepteurs qui véhiculent l'information vers des neurones présents dans la moelle épinière, lieu de la première intégration du message nociceptif (Figure 1). Les neurones de la moelle épinière vont transmettre l'information nociceptive jusqu'à des centres supraspinaux où le message nociceptif, en passant par le tronc cérébral et le thalamus, va finalement atteindre le cortex et être à l'origine de la douleur. Dans la moelle épinière, avant d'être projetée vers les centres supra spinaux, l'information nociceptive va aussi activer des motoneurones au niveau de la corne antérieure de la moelle épinière qui vont être responsables du réflexe nociceptif de retrait. Ces réflexes de retrait peuvent être quantifiés, ainsi, par extrapolation, on peut quantifier la

nociception. C'est sur cet aspect que sont construits les différents tests nociceptifs que j'ai utilisé dans ce travail.

Les nocicepteurs sont des neurones sensoriels à haut seuil d'activation qui constituent les fibres afférentes qui véhiculent l'information nociceptive. Les nocicepteurs sont des neurones pseudo unipolaires en T dont le corps cellulaire est localisé dans les ganglions de la racine dorsale (ou dorsal root ganglia, DRG). La partie distale de leurs axones s'arborisent en terminaison libre et innervent la jonction entre l'épiderme et le derme. Ces terminaisons libres portent des récepteurs membranaires qui opèrent la transduction des stimuli nociceptifs. Les nocicepteurs donnent naissance à deux types de fibres nerveuses : les fibres A δ et les fibres C. La partie proximale des axones rejoint la corne dorsale de la moelle épinière en passant par le tractus de Lissauer (Figure 1) et fait synapse sur les neurones de 2ème ordre.



Les neurones de 2ème ordre sont situés dans les lames de Rexed (aussi appelées couches de la moelle épinière) I, II et V. A ce niveau, l'information nociceptive peut être transmise jusqu'à des centres supra spinaux par l'intermédiaire de neurones de projections, mais aussi être modulée et intégrée par l'intermédiaire d'interneurones. Ces interneurones forment un réseau qui traite l'information localement avant d'être envoyée vers les neurones de projections. L'information nociceptive, véhiculée par les neurones de deuxième

ordre, croise la ligne médiane (décusse) et remonte du côté opposé dans le cadran antéro-latéral. Situé dans les $\frac{3}{4}$ antérieure de la substance blanche de la moelle épinière, ces fibres forment le système antérolatéral.

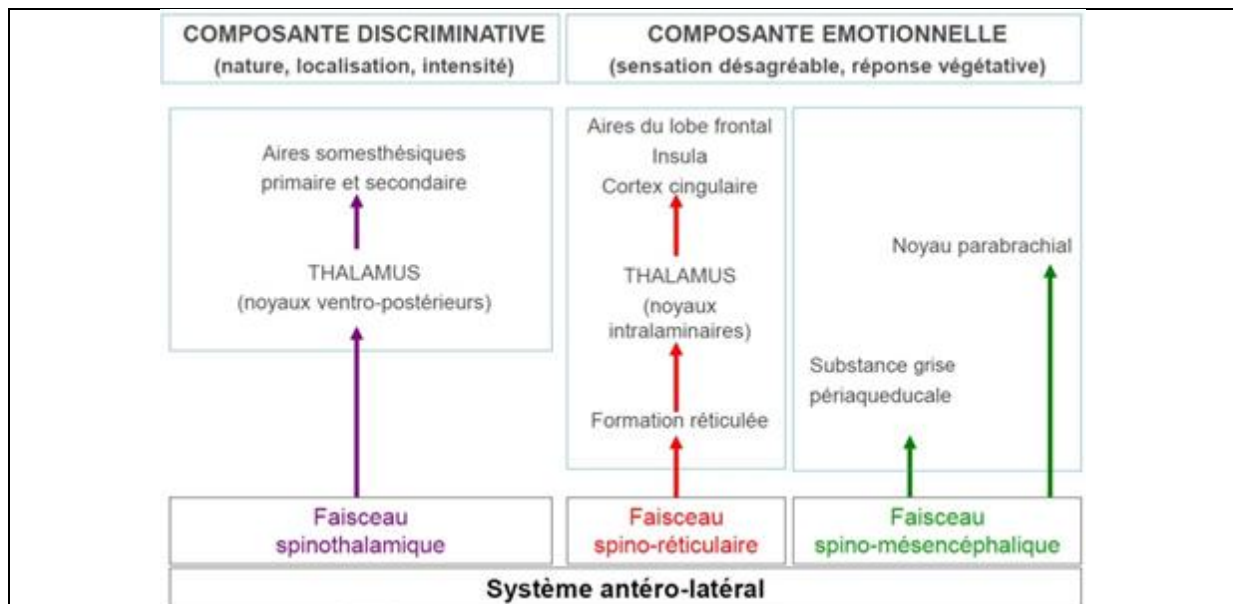


Figure 2- Schématisation du système antéro-latéral.

Le système antéro-latéral est composé de plusieurs faisceaux. Le faisceau spino-thalamique participe à la composante discriminative de la douleur. L'information nociceptive véhiculée par les faisceaux spino-réticulaire et spino-mésencéphalique est responsable de la composante émotionnelle de la douleur.

Le système antérolatéral est constitué de plusieurs faisceaux (Figure 2) tels que : faisceau spinothalamique, voie ascendante principale des messages nociceptifs responsable de la composante discriminative, mais aussi du faisceau spino-réticulaire, ou spino-mésencéphalique responsables des aspects motivationnels et affectifs de la douleur. Les axones du faisceau spinothalamique projettent directement sur le thalamus, alors que les axones des faisceaux spino-réticulaire et spino-mésencéphalique font respectivement relais d'abord dans la formation réticulée et la substance grise périaqueducale puis projettent sur le thalamus. L'information nociceptive atteint ensuite le cortex somesthésique primaire et secondaire, où elle va gagner en intégration et être propagée dans d'autres aires corticales jusqu'à devenir consciente ; dès lors on ne parle plus de nociception, mais de douleur.

Enfin, les centres supra spinaux projettent à leur tour vers la moelle épinière par l'intermédiaire de contrôles descendants. Ces voies efférentes modulent l'intégration du signal nociceptif et peuvent ainsi provoquer de l'analgésie. Par exemple, des régions du tronc cérébral telles que la substance grise périaqueducale et les noyaux du raphé envoient des efférences inhibitrices (sérotonine, noradrénaline, enképhalines) vers les segments spinaux responsables d'une inhibition de l'entrée nociceptive et ainsi d'une analgésie. Pour revue voir (Millan, 2002).

3. Traitements de la douleur

La douleur est un problème de santé publique majeur qui réduit la qualité de vie des patients et engendre un coût élevé pour la société. Il a en effet été estimé que le coût socioéconomique de la douleur aux Etats-Unis est de l'ordre de 500 à 630 milliards de dollar/an et qu'un tiers de la population américaine souffrirait de douleur chronique (Reuben et al., 2015).

Différents médicaments nommés antalgiques (pour réduire la douleur via une action périphérique) ou analgésiques (pour éliminer la douleur via une action centrale,) sont destinés à réduire la douleur. Un classement établi par l'Organisation Mondiale de la Santé a réparti les différentes substances qui composent ces médicaments en trois niveaux selon le critère de l'intensité de la douleur :

- Les médicaments du **palier 1** sont préconisés pour le traitement des douleurs d'intensité faible à modérée, ils inhibent la cyclooxygénase, l'enzyme limitante dans la production des prostaglandines qui participent à l'inflammation et sensibilisent les nocicepteurs (anti-inflammatoires non stéroïdiens : aspirine, ibuprofène).

- Les médicaments du **palier 2** sont utilisés dans le traitement des douleurs modérées non soulagées par les antalgiques du premier palier. Ces médicaments sont des opiacés faibles tels que la codéine.

- Le **palier 3** est utilisé pour traiter les douleurs intenses ou résistantes aux antalgiques des paliers précédents. Les antalgiques appartenant à cette catégorie sont principalement les opiacés.

Actuellement, de nouveaux traitements ne ciblant pas les récepteurs opiacés sont également disponibles, comme les antagonistes des récepteurs NMDA, les inhibiteurs de la recapture des monoamines (en particulier les antidépresseurs tricycliques) ou les anticonvulsivants (Kissin, 2010). Cependant ces molécules font preuve d'une efficacité limitée (Kissin, 2010; Woolf, 2010). Malgré les efforts actuels fournis pour développer de nouveaux analgésiques, les opiacés restent ainsi le moyen le plus efficace de réduire la douleur moyenne à intense.

B. Les opiacés

Le système opioïde est un système neuromodulateur constitué de trois familles de peptides : β -endorphines, enképhalines et dynorphines, eux même issus du clivage des peptides précurseurs suivant : POMC, pro-enkephaline et pro-dynorphine. Ces peptides agissent sur trois récepteurs μ , δ et κ dont la nomenclature a varié en fonction du temps. Le Tableau 1 récapitule l'appellation des récepteurs et illustre sur quel récepteur chaque peptide se fixe avec la meilleure affinité. Les trois récepteurs opioïdes sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de type Gi/o dont l'activation conduit à une inhibition de l'activité neuronale (Kieffer and Evans, 2009).

Des études ont montré une forte homologie de séquence entre le récepteur nociceptine/orphanine FQ (N/OFQ) et les récepteurs opioïdes. Le récepteur N/OFQ est également un RCPG capable de fixer un neuropeptide endogène, la nociceptine. Le gène de la nociceptine a également une forte homologie de séquence avec ceux codant pour les précurseurs des peptides opioïdes (Mollereau et al., 1996). Les similarités structurales que le système N/OFQ partage avec le système opioïde lui a valu d'être considéré comme le quatrième récepteur opioïde. Cependant, des données pharmacologiques vont remettre en question cet aspect en prouvant que les peptides opioïdes enképhalines et endorphines n'activent pas ce récepteur et que la naloxone, un antagoniste opiacé, ne se fixe pas sur le récepteur nociceptine. Le système N/OFQ est aujourd'hui considéré comme appartenant à une branche du système opioïde séparée de celle portant MOR, DOR, et KOR et ne sera donc pas inclus dans la description du système opioïde qui suit. Pour revue concernant le système N/OFQ traitant de la biologie moléculaire de ce système, de sa distribution tissulaire, de son effet sur la douleur, ou sur d'autres comportements tels que la locomotion, l'anxiété ou la prise alimentaire voir (Mogil and Pasternak, 2001).

Nomenclature du récepteur	Précurseur	Peptide
μ, mu, MOR, MOP	POMC	β-Endorphine
δ, delta, DOR, DOP	Pro-enkephaline	Enkephaline
κ, kappa, KOR, KOP	Pro-dynorphine	Dynorphine

Tableau 1- Liste des récepteurs opioïdes et de leurs peptides et précurseurs respectifs.

L'existence des récepteurs opioïdes endogènes a été décrite de façon quasi simultanée par trois groupes de recherche en 1973 (Pert & Snyder, 1973; Simon, 1973; Terenius, 1973). Depuis, la large expression des récepteurs opioïdes dans le système nerveux central a été démontrée, incluant de nombreuses structures fondamentales dans la modulation de la douleur (Mansour et al., 1995; Erbs et al., 2014). Les récepteurs opioïdes sont également exprimés dans le système nerveux périphérique. Des terminaisons libres nociceptives, en passant par les DRG et les terminaisons centrales des afférences primaires dans la corne dorsale de la moelle épinière ainsi que par les neurones de second ordre, les récepteurs opioïdes sont des acteurs clés de la modulation de la nociception (Besse et al., 1990; Kohno et al., 1999; Spike et al., 2002; Marker et al., 2005; Scherrer et al., 2009; Heinke et al., 2011). Pour revue voir Pan et al., 2008; Taylor and Corder, 2014; Bodnar, 2017.

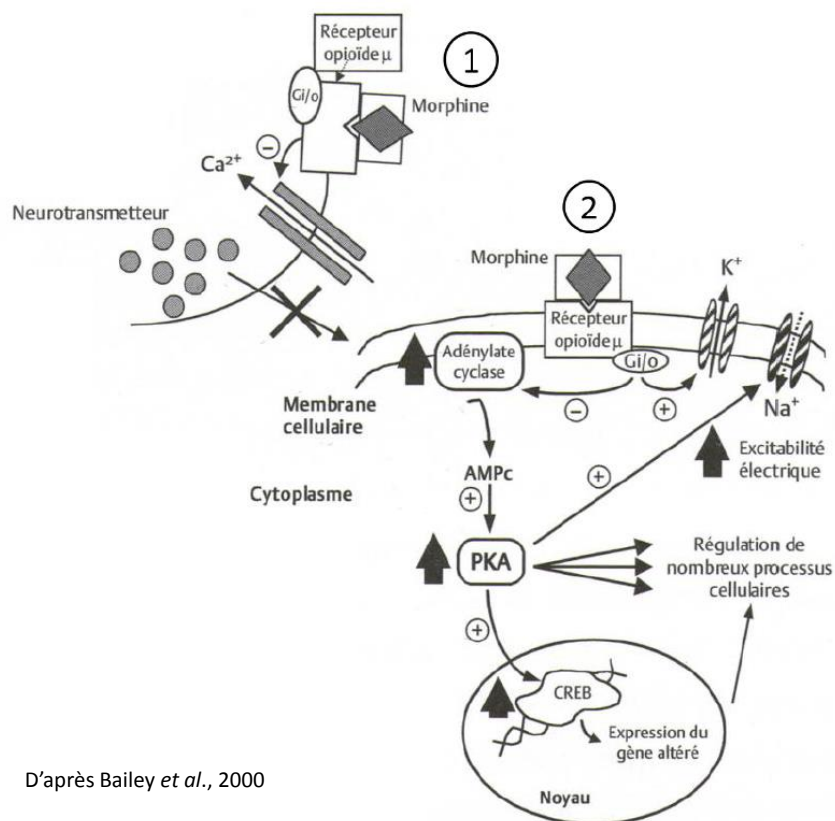
En cohérence avec leur large expression tissulaire, les récepteurs opioïdes sont impliqués dans de nombreuses fonctions (Cahill et al., 2016). L'activation de DOR produit de l'analgésie dans les états de douleur chronique et les industriels développent des agonistes

de DOR pour le traitement de l'anxiété et des migraines (Charles and Pradhan, 2016; Gendron et al., 2016). Le récepteur KOR a quant à lui été décrit comme impliqué dans la régulation émotionnelle et son activation reconnue comme induisant un état anxiogène et des effets dysphoriques (Bruchas et al., 2010).

Les analgésiques opiacés exercent leurs effets en activant principalement le récepteur MOR, c'est donc sur la signalisation de ce récepteur que nous allons nous focaliser (Matthes et al., 1996). Au niveau cellulaire, les opiacés provoquent une diminution de la transmission du message nociceptif qui va ainsi diminuer la perception de la sensation douloureuse et ce, par deux mécanismes (Figure 3):

- **Au niveau présynaptique**, les opiacés provoquent l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants de type N entraînant une diminution de la libération de glutamate et de substance P au niveau de la moelle épinière, deux molécules impliquées dans la transmission nociceptive (Jessell and Iversen, 1977; Duggan and North, 1983; Yaksh et al., 1988; Chang et al., 1989; Hori et al., 1992; Suarez-Roca and Maixner, 1992; Glaum et al., 1994; Terman et al., 2001).

- **Au niveau postsynaptiques**, les opiacés induisent une diminution de l'excitabilité des neurones postsynaptiques de la moelle épinière par l'ouverture de canaux potassiques de la rectification entrante (GIRK) entraînant une hyperpolarisation des neurones qui diminue l'influx nociceptif et donc la douleur (Willcockson et al., 1984; Jeftinija, 1988; Schneider et al., 1998; Kohno et al., 1999; Aicher et al., 2000).



D'après Bailey et al., 2000

Figure 3- Voies de signalisation intracellulaire du récepteur opioïde MOR.

La stimulation de MOR par son ligand (ici morphine) provoque au niveau présynaptique (1) une inhibition des canaux calciques et donc une diminution de la libération de neurotransmetteurs. Au niveau post synaptique (2), l'activation de MOR provoque une ouverture des canaux potassiques de la rectification entrante responsable d'une hyperpolarisation membranaire, mais aussi par l'intermédiaire de sa protéine G_i/o une inhibition de l'adénylate cyclase qui provoque une diminution du taux d'AMPc, et de l'activité de la PKA, défavorisant ainsi l'ouverture de canaux Na^+ et engendrant une diminution de l'excitabilité neuronale. Ainsi les effets pré et postsynaptique de MOR engendrent une diminution de l'excitabilité neuronale.

En contrepartie de leur efficacité analgésique, les opiacés présentent de nombreux effets secondaires indésirables incluant la constipation, des nausées ou vomissements, une dépression respiratoire ainsi que le développement d'une dépendance. On observe également lors d'une utilisation prolongée, le développement d'une **tolérance** c.-à-d. une perte de l'efficacité analgésique et l'apparition d'une hypersensibilité à la douleur appelée **hyperalgésie induite par les opiacés** (HIO). L'HIO a été identifiée dans des modèles animaux, et confirmée chez l'Homme (Célèrier et al., 2000, 2001; Angst and Clark, 2006; Chu et al., 2008). Pour pallier au développement de la tolérance analgésique et de l'hyperalgésie, il devient alors nécessaire d'augmenter les doses administrées. Mais cette augmentation des doses s'accompagne également d'une augmentation des effets secondaires précédemment décrits. On entre alors dans un cercle vicieux où l'arrêt du traitement sera envisagé pour éviter une dépression respiratoire. Ainsi, aux Etats Unis, le nombre de patients souffrant de troubles de la consommation d'opiacés a été estimé à 2.1 millions et 44 morts par jours sont

attribués à une overdose d'opiacés (Trang et al., 2015). Dès lors l'importance de déchiffrer les mécanismes responsables de ces effets secondaires s'impose.

C. Tolérance analgésique et hyperalgésie induite par les opiacés

1. Balance homéostatique

L'homéostasie est définie comme un processus de régulation par lequel l'organisme maintient les différentes constantes de son milieu intérieur entre les limites des valeurs normales. L'organisme va maintenir cet équilibre à l'aide de l'action de systèmes aux effets inverses qui s'opposent et dont la résultante crée l'**équilibre homéostatique**. Il a été proposé que l'équilibre qui régit l'homéostasie de la douleur fasse intervenir un système opioïde *anti-nociceptif* et un système anti opioïde *pro-nociceptif*, qui en s'opposant, vont permettre d'atteindre un équilibre qui définira le seuil nociceptif basal. Ce modèle de la balance homéostatique a été décrit par Simonnet et Rivat (Simonnet and Rivat, 2003).

Dans ce modèle, l'administration d'opiacé va activer le système opioïde et produire de l'analgésie. Mais cette administration d'opiacé exogène vient perturber l'équilibre homéostatique du corps. Dans un souci d'atteindre à nouveau son équilibre homéostatique, l'organisme va réagir en mettant en place des **changements adaptatifs** qui vont stimuler le système inverse c.-à-d. le système anti opioïde dont les effets pro-nociceptifs vont contrebalancer les effets opioïdes et ainsi rétablir l'équilibre. Lors d'une stimulation chronique du système opioïde, durant un traitement chronique à la morphine par exemple, la dose administrée est constante, mais l'effet pro-nociceptif généré par l'organisme, lui, va monter en puissance au fur et à mesure de l'administration, pour finalement venir s'opposer fortement à l'effet analgésique. Pour surpasser l'activation du système anti opioïde et reproduire un effet analgésique, il est alors nécessaire d'augmenter les doses d'opiacé expliquant ainsi la **tolérance** décrite suite aux traitements chroniques aux opiacés. De plus lorsqu'on arrête le traitement aux opiacés, le système opioïde n'est plus activé, par contre le système anti opioïde le reste. L'activité anti-opioïde prédomine alors, expliquant ainsi l'**hyperalgésie** observée suite à l'arrêt d'un traitement chronique à la morphine. Ce concept permet également de définir le terme d'**allostasie**. En effet, à la fin du traitement chronique, l'hyperalgésie va s'estomper au fur et à mesure jusqu'à disparaître. A ce moment, les animaux semblent être retournés à leur seuil nociceptif de base, ils ont effectivement à nouveau atteint un équilibre mais celui-ci est un nouvel équilibre qui prend en compte tous les changements adaptatifs qui ont eu lieu en réponse à l'administration répétée. Ce nouvel équilibre est appelé allostasie et ne serait pas lié à une diminution de l'activité des systèmes anti-opioïdes mais à une augmentation de l'activation endogène du système opioïde. Ce phénomène illustrerait un état de **sensibilisation latente à la douleur** dans lequel l'activité des systèmes opioïdes et anti-opioïdes demeure élevée par opposition à l'équilibre initial (animaux naïfs) dans lequel le niveau d'activation de ces deux systèmes endogènes est bas (Célèrier et al., 2001). La Figure 4 schématise l'ensemble de ces notions. Cet état de

D'autre part, les douleurs chroniques et celles liées au cancer ne répondent souvent pas aux opioïdes et sont fréquemment associées à une hypersensibilité à la douleur suggérant que les systèmes anti-opioïdes pourraient être impliqués de manière critique dans leurs développements. Ces observations suggèrent que les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'HIO et à la douleur chronique pourraient impliquer les mêmes acteurs. Des traitements capable de bloquer les systèmes anti-opioïdes fourniraient ainsi une stratégie prometteuse pour traiter les douleurs chroniques résistantes aux opiacés.



Schéma simplifié de la théorie de la balance homéostatique de la douleur. (1.) Avant la première exposition aux opiacés, le seuil nociceptif de base est obtenu par équilibre entre le système opioïde anti-nociceptif et le système opioïde pro-nociceptif (Homéostasie). (2.) Le traitement aux opiacés induit une hyperalgésie, qui est causée par une stimulation du système anti-opioïde pro-nociceptif en réponse à l'administration de molécules opiacés exogènes. (3.) Après l'arrêt du traitement opiacé, le déséquilibre est compensé par une activation endogène du système opioïde anti-nociceptif qui mène à un nouvel état d'équilibre (Allostasie).

19

astrocytes, ou les cellules microgliales (Roedel et al., 2016). De par leur action contraire au système opiacé, ces systèmes sont décrits comme ayant des propriétés anti opioïdes. Différents systèmes ont été décrits comme ayant des propriétés anti opioïdes et seront succinctement expliqué ci-dessous, mais nous allons d'abord traiter des acteurs impliqués dans les changements adaptatifs au niveau cellulaire. L'ensemble de ces acteurs sont regroupés dans l'hypothèse de la tolérance cellulaire (Waldhoer et al., 2004).

2. Tolérance cellulaire

Un grand nombre de recherche a porté sur les mécanismes responsables de la tolérance cellulaire. Ce domaine très vaste ne sera que brièvement expliqué ici. Des revues récentes récapitulent les mécanismes soupçonnés d'induire la tolérance en portant principalement sur la désensibilisation du récepteur et énoncent les causes soupçonnées d'en être responsable notamment la phosphorylation du récepteur, le découplage, l'internalisation ou encore les mécanismes régulant la voie post endocytose du récepteur (pour revue voir Waldhoer et al., 2004; Williams et al., 2013; Allouche et al., 2014).

L'hypothèse de la tolérance cellulaire implique une perturbation du cycle d'endocytose/recyclage à la membrane du récepteur. Comme illustré dans la Figure 5, suite à la liaison avec son agoniste, le récepteur est phosphorylé par des GRK (RCPG kinases). La β -arrestine interagit alors avec la partie phosphorylée du récepteur, ce qui entraîne la désensibilisation du récepteur. Le RCPG est ensuite endocyté par l'intermédiaire de puits recouverts de clathrine et va être soit recyclé soit dégradé. On comprend dès lors qu'une perturbation de ce cycle d'internalisation-recyclage du récepteur peut engendrer une diminution de sa densité à la surface cellulaire, et ainsi une diminution de la réponse à l'agoniste et expliquerait ainsi la tolérance analgésique.

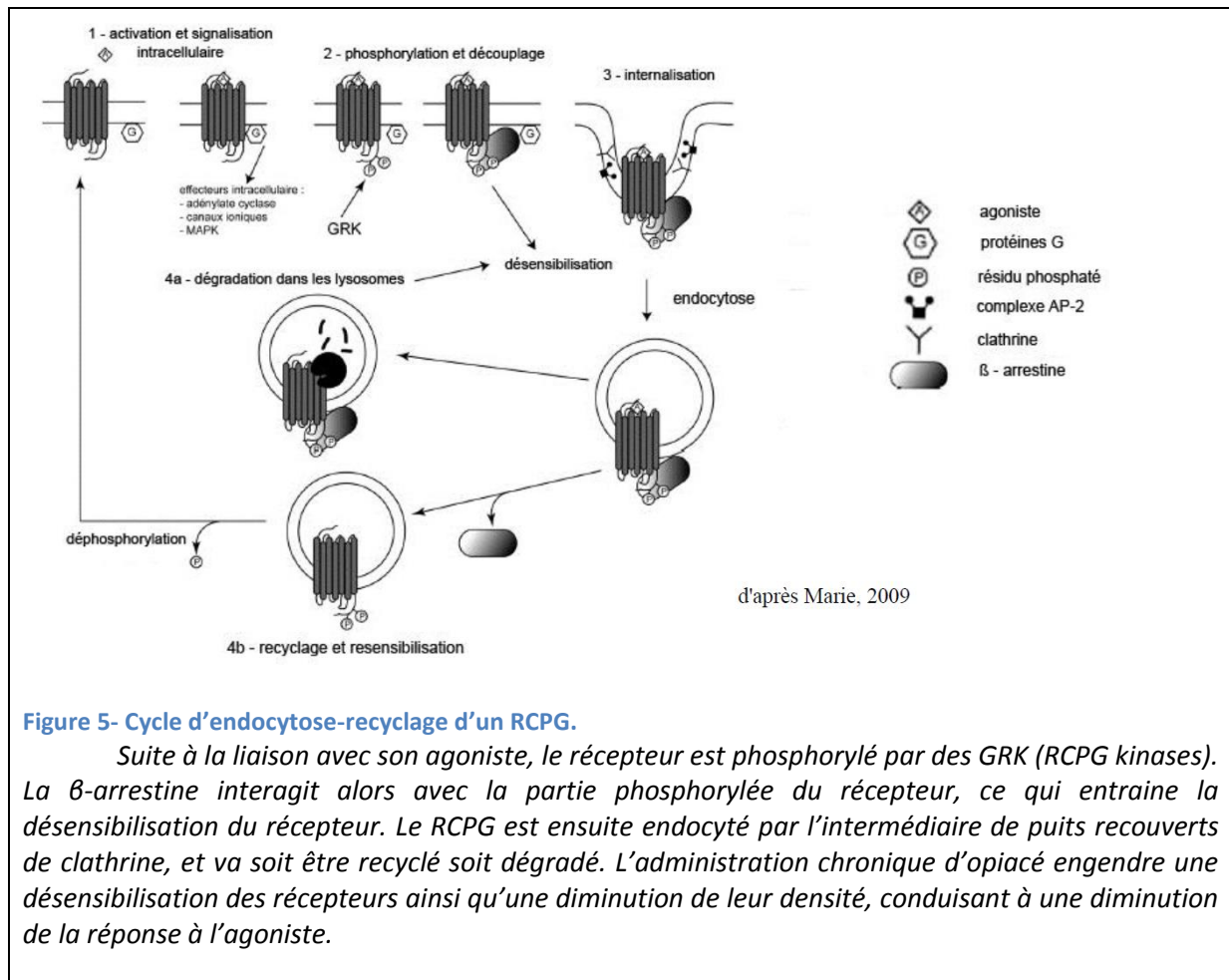


Figure 5- Cycle d'endocytose-recyclage d'un RCPG.

Suite à la liaison avec son agoniste, le récepteur est phosphorylé par des GRK (RCPG kinases). La β -arrestine interagit alors avec la partie phosphorylée du récepteur, ce qui entraîne la désensibilisation du récepteur. Le RCPG est ensuite endocyté par l'intermédiaire de puits recouverts de clathrine, et va soit être recyclé soit dégradé. L'administration chronique d'opiacé engendre une désensibilisation des récepteurs ainsi qu'une diminution de leur densité, conduisant à une diminution de la réponse à l'agoniste.

a) Accélération de la désensibilisation de MOR

Plusieurs perturbations du cycle de recyclage des récepteurs opiacés ont été décrites suite à une administration chronique d'opiacé. Parmi elles on peut citer l'accélération de la désensibilisation des récepteurs opioïdes, de leur internalisation, mais aussi une down-régulation et une phosphorylation de ces récepteurs.

Une revue récente fait le point sur le sujet, voir Williams et al., 2013. Il a ainsi été montré qu'une exposition chronique à la morphine provoque une **accélération de la désensibilisation** induite par des agonistes de MOR (Dang, 2004; Dang and Williams, 2005; Ingram et al., 2008; Quillinan et al., 2011a). Cette augmentation de la désensibilisation de MOR semble être due à une **diminution du recyclage du récepteur après endocytose** (Dang et al., 2011; Quillinan et al., 2011b).

b) Augmentation de l'activité constitutive de MOR

L'activité constitutive a été décrite comme une activation du récepteur en l'absence de son agoniste (Kenakin, 2004). Plusieurs études ont démontré l'existence de l'activité constitutive de MOR *in vitro* et *in vivo* (Devlin et al., 2004; Sadée et al., 2005; Wang et al., 2007; Bilsky et al., 2010; Connor and Traynor, 2010). L'activité constitutive de MOR a été décrite comme impliquée dans le phénomène de tolérance. Ainsi, en augmentant la signalisation de MOR, l'activité constitutive provoquerait également une augmentation de la

désensibilisation de MOR, et serait ainsi susceptible de provoquer de la tolérance via les mêmes mécanismes d'internalisation du récepteur cités précédemment. Soutenant cette hypothèse, plusieurs études ont montré une augmentation de l'activité constitutive de MOR suite à une exposition prolongée aux agonistes (Liu and Prather, 2001, 2002; Wang et al., 2007; Divin et al., 2009). Cette augmentation de l'activité constitutive a été suggérée comme jouant un rôle dans le développement de la tolérance et de la dépendance (Liu et al., 2001; Liu and Prather, 2002; Raehal, 2005; Walker and Sterious, 2005a; Divin et al., 2009; Sirohi et al., 2009a; Navani et al., 2011a).

3. Systèmes anti-opioïdes

Différents systèmes ont été décrits comme ayant des propriétés anti opioïde. En particulier la cholécystokinine, le système NMDA, la nociceptine orphane FQ, et leurs actions anti-opioïdes, déjà décrites dans plusieurs revues, ne seront que brièvement abordées ici (Rothman, 1992; McNally, 1999; Ossipov et al., 2003; Moulédous et al., 2010; Toll et al., 2016).

a) NMDA

L'implication du système NMDA dans le développement de la tolérance a été décrite, et il a été montré que le blocage des récepteurs NMDA diminue l'activation des systèmes pro nociceptifs déclenchée par les opioïdes et prévient ainsi le développement de la tolérance. Une administration d'un antagoniste du récepteur NMDA (s.c. ; i.th. ou i.c.v.) empêche le développement de l'HIO chez les rats et les souris (Larcher et al., 1998; Célèrier et al., 2001; Li et al., 2001; Ohnesorge et al., 2013; Aroust et al., 2015). Il a également été montré que le traitement chronique à la morphine induit une augmentation de l'expression du récepteur NMDA (Ohnesorge et al., 2013). Une augmentation de l'activité présynaptique du NMDA dans la moelle épinière a également été observée suite à un traitement chronique à la morphine, soupçonnée d'être responsable d'une plus forte libération de glutamate et donc d'une sur-stimulation de la synapse qui pourrait expliquer l'hyperalgésie (Zhao et al., 2012). Ce phénomène ainsi que d'autres cibles moléculaires qui semblent impliquées dans le développement de l'HIO sont développées plus amplement dans une revue récente (Roedel et al., 2016). La contribution des astrocytes et de la microglie est également discutée dans cette revue.

b) Le système cholécystokinine

La cholécystokinine (CCK) est un neuropeptide largement distribué dans le système nerveux central (SNC) ainsi que dans les DRG. La CCK se fixe sur deux RCPG respectivement appelés CCK-A et CCK-B. Le système cholécystokinine a été décrit comme ayant des propriétés anti-opioïdes. Pour revue voir Wiesenfeld-Hallin et al., 2002. Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence qu'une administration systémique, i.th. ou i.c.v. de CCK réduit l'effet analgésiant d'une injection opiacée (Wiesenfeld-Hallin and Xu, 1996). Il a aussi été observé qu'une douleur inflammatoire ou neuropathique provoque à la fois une augmentation de CCK et de ses récepteurs. La forte plasticité du système CCK qu'engendrent

ces états douloureux chroniques suggère fortement son implication dans la modulation de la balance homéostatique de la douleur.

c) Le système nociceptine orphanine FQ

Comme décrit précédemment le système nociceptine orphanine FQ est composé d'un neuropeptide, la nociceptine qui agit en activant un RCPG appelé nociceptine/orphanine FQ (N/OFQ). Ce système a montré de nombreux effets anti opioïdes. Le récepteur de la nociceptine est exprimé dans de nombreuses régions du cerveau, dans la moelle épinière, ainsi que dans les DRG (Neal et al., 1999; Mollereau and Mouledous, 2000). Une injection i.c.v. de nociceptine bloque l'analgésie opiacée, accordant ainsi à la nociceptine ses propriétés anti-opioïde (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995). Néanmoins, une injection i.th. de nociceptine induit un effet anti nociceptif (Xu et al., 1996; Jhamandas et al., 1998) suggérant une interaction avec le système opioïde plus complexe qu'espérée mais venant appuyer son importance dans la modulation de la nociception. Appuyant son effet anti-opioïde, il a été montré que le blocage du système nociceptine à l'aide d'un anticorps dirigé contre la nociceptine ou d'un antagoniste supprime partiellement la tolérance analgésique induite par un traitement chronique à la morphine (Ueda et al., 1997; Tian and Han, 2000; Chung et al., 2006). Une récente revue fait le point sur le système N/OFQ en détaillant sa distribution tissulaire dans le CNS, les mécanismes de désensibilisation du récepteur, ainsi que les effets sur l'analgésie, la tolérance et le système de récompense (Toll et al., 2016).

D. Le système RF-amide

Un autre système a été décrit comme ayant d'importantes propriétés anti-opioïdes et qui, en modulant les effets des opiacés serait responsable de la tolérance analgésique et de l'HIO : le système des peptides et récepteurs RF-amide.

1. Description générale et implications dans la modulation de la nociception

Les peptides RF-amide, constituent une famille de cinq groupes de neuropeptides codés par cinq gènes différents. Ils tirent leurs noms du fait qu'ils partagent tous une séquence Arg-Phe-NH₂ (RF-amide) à leur extrémité Carboxyl-Terminale. Ils agissent par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G : les récepteurs à peptide RF-amide. Il existe à l'heure actuelle 5 récepteurs RF-amide identifiés chez l'Homme: NPFFR1, NPFFR2, GPR10, GPR54, GPR103 (qui chez la souris existe sous forme GPR103a et b). La nomenclature de ces récepteurs a varié en fonction des équipes qui les ont décrits, et un tableau récapitulant l'ensemble de ces changements est fourni dans la suite. Chaque groupe de peptide se lie et active principalement un récepteur: le groupe peptidique lié au RFRP se lie au récepteur NPFFR1, le groupe neuropeptide FF (NPFF) au récepteur NPFFR2, le groupe peptidique RF-amide pyroglutamylé (QRFP) au récepteur GPR103 (QRFP), le groupe de peptide « prolactine- releasing » (PrRP) se fixe au récepteur GPR10 (PrRP), et le groupe kisspeptine à GPR54 (Kiss1R). Ces peptides et leurs récepteurs sont impliqués dans de nombreuses fonctions et sont largement distribués dans le monde animal. Un récent « research topic » rassemble les avancées majeures dans la connaissance du système RF-amide chez les mammifères et non-mammifères et traite de l'évolution du système RF-amide à travers les espèces, et de ses fonctions physiologiques (Rousseau et al., 2015).

Parmi ses implications, le NPFF est impliqué dans plusieurs fonctions physiologiques telles que la modulation hormonale, et la régulation cardiovasculaire et thermique (Mollereau et al., 2005). L'injection intraveineuse de NPFF provoque une augmentation transitoire de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque chez les rats (Roth et al., 1987; Allard et al., 1995).

Concernant Kisspeptine ce peptide a d'abord été identifié comme suppresseur des métastases (Lee and Welch, 1997; Ohtaki et al., 2001; Shirasaki et al., 2001), et son rôle dans le cancer a ainsi été largement étudié (pour revue voir Makri et al., 2008). Kisspeptine et son récepteur GPR54 sont également exprimés par les artères coronaires, l'aorte et les veines ombilicales suggérant l'implication de ce système dans la modulation de la pression artérielle. Venant appuyer cette hypothèse, il a été montré que l'administration de kisspeptine produit une vasoconstriction (Mead et al., 2007). La présence de kisspeptine et de son récepteur GPR54 a également été montré dans l'hippocampe de rat et son implication dans la transmission neuronale a été décrite (Arai and Orwig, 2008) suggérant une implication de ce système dans la neurogenèse. Pour revue voir (Kirby et al., 2010).

Le système 26RFa-GPR103a a également été décrit comme étant impliqué dans la prise alimentaire puisque le 26RFa induit une hyperphagie (Moriya et al., 2006). Ce système semble impliqué dans d'autre fonction physiologique puisqu'il a été décrit comme ayant un rôle dans l'activité locomotrice. En effet, une injection i.c.v. de 26RFa a été décrite comme provoquant une augmentation de l'activité locomotrice (do Rego et al., 2006). Une implication de ce système a également été montrée dans la formation osseuse (Baribault et al., 2006). Ainsi, chez des souris dont l'exon 1 de GPR103a a été délété constitutivement, on observe une ostéopénie accompagnée d'une diminution de la densité osseuse. Il faut tout de même noter que dans notre étude sur les KO GPR103a développée plus amplement dans la suite, ce phénotype n'a pas été observé. GPR103a-26RFa a également un rôle modulateur de la pression sanguine et il a été montré qu'une injection intraveineuse provoque un changement bi-phasique de la pression sanguine chez le rat (Fang et al., 2009). Une injection systémique de 43RFa (la forme allongé du 26RFa) induit une augmentation du niveau plasmatique d'aldostérone en cohérence avec la distribution de GPR103 dans la zone glomérulaire du cortex surrénalien (Fukusumi et al., 2003). Pour revue voir (Chartrel et al., 2011).

L'implication de PrRP et de GPR10 dans différentes fonctions physiologiques est détaillée dans (Fukusumi et al., 2006; Lin, 2008). L'implication de PrRP dans le stress a été corrélée à sa capacité à moduler la libération d'ocytocine (Zhu and Onaka, 2003). L'injection i.c.v. de PrRP est également responsable d'une augmentation de la pression artérielle (Samson et al., 2000). Se basant sur la présence de GPR10 dans le noyau thalamique réticulaire décrit comme étant impliqué dans la régulation du sommeil, il a été montré qu'une injection i.c.v. de PrRP induit une augmentation du sommeil paradoxal et du sommeil lent chez les rats (Zhang et al., 2000, 2001) mettant ainsi en évidence l'implication de PrRP et GPR10 dans la régulation du sommeil.

Les données de la littérature fournissent également des preuves émergentes que tous les peptides RF-amide et leurs récepteurs sont impliqués dans la modulation de la nociception et ont des propriétés anti-opioïdes.

Faisant un compte rendu des connaissances actuelles, nous avons rédigé une revue littéraire qui répertorie les implications, chez les rongeurs, des cinq récepteurs RF-amide et de leurs peptides endogènes respectifs dans la modulation de la nociception dans les conditions de la douleur basale et chronique ainsi que leurs effets modulateurs sur les effets analgésiques des opiacés. Cette revue «**Involvement of Mammalian RF-Amide Peptides and Their Receptors in the Modulation of Nociception in Rodents**» a été publiée dans «*Frontiers in Endocrinology*». Pour cette revue, j'ai effectué l'ensemble du travail bibliographique en amont de l'écriture, et ai rédigé l'ensemble du texte sous la supervision du Dr Frédéric Simonin.



Involvement of mammalian RF-amide peptides and their receptors in the modulation of nociception in rodents

Safia Ayachi and Frédéric Simonin*

UMR 7242 CNRS, Laboratory of Excellence Medalis, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch, France

Edited by:

Karine Rousseau, Muséum National d'Histoire Naturelle, France

Reviewed by:

Joao Carlos Dos Reis Cardoso, University of Algarve, Portugal
Tatsushi Onaka, Jichi Medical University, Japan

*Correspondence:

Frédéric Simonin, UMR 7242 CNRS, Laboratory of Excellence Medalis, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Université de Strasbourg, 300 Boulevard Sébastien Brant, Illkirch 67412, France
e-mail: simonin@unistra.fr

Mammalian RF-amide peptides, which all share a conserved carboxyl-terminal Arg-Phe-NH₂ sequence, constitute a family of five groups of neuropeptides that are encoded by five different genes. They act through five G-protein-coupled receptors and each group of peptide binds to and activates mostly one receptor: RF-amide related peptide group binds to NPFFR1, neuropeptide FF group to NPFFR2, pyroglutamylated RF-amide peptide group to QRFRP, prolactin-releasing peptide group to prolactin-releasing peptide receptor, and kisspeptin group to Kiss1R. These peptides and their receptors have been involved in the modulation of several functions including reproduction, feeding, and cardiovascular regulation. Data from the literature now provide emerging evidence that all RF-amide peptides and their receptors are also involved in the modulation of nociception. This review will present the current knowledge on the involvement in rodents of the different mammalian RF-amide peptides and their receptors in the modulation of nociception in basal and chronic pain conditions as well as their modulatory effects on the analgesic effects of opiates.

Keywords: pain, nociception, GPCRs, RF-amide, opiates, opioid-induced hyperalgesia

INTRODUCTION

A tetrapeptide Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRF-NH₂) has been isolated in 1977 by Price and Greenberg and was described as having cardioexcitatory properties in the neverid clam *Macrocallista nimbosa* (1). Thereafter, using specific antibodies for the COOH-terminus of this peptide, FMRF-NH₂ immunoreactive peptides were identified in several species including mouse (2, 3) and the first two mammalian FMRF-NH₂-like peptides, neuropeptides FF and AF, were further isolated from bovine brain (4). They represent the first members of the family of mammalian RF-amide peptides, which all share a conserved carboxy-terminal Arg-Phe-NH₂ sequence. Additional members of this family and their receptors were identified and cloned in the late 90s and early 2000s (5). At present, five groups of mammalian RF-amide peptides have been described including neuropeptide FF (NPFF), RF-amide related peptide (RFRP), pyroglutamylated RF-amide peptide (QRFP), prolactin-releasing peptide (PrRP), and kisspeptin groups. The sequences of human and rodents RF-amide peptides, their different names as well as the name of their receptors are listed in Table 1.

Several RF-amide peptide receptors have been discovered: NPFFR1 (alias GPR147), NPFFR2 (alias GPR74), QRFRP (alias GPR103), prolactin-releasing peptide receptor (PrRPR) (alias GPR10), and Kiss1R (alias GPR54). They all belong to the G-protein-coupled receptor family, and share approximately 50% homology. Each receptor binds mostly one group of RF-amide

peptide: NPFFR1 binds RFRP peptides, NPFFR2-NPFF group, QRFRP-QRFP group, PrRPR-PrRP group, and Kiss1R-kisspeptin group. However, *in vitro* it has been shown that NPFFR1/2 display a good affinity for all mammalian RF-amide peptides, whereas, QRFRP, PrRPR, and Kiss1R show a high level of discrimination for their endogenous peptides (6).

In this review, we will focus on the involvement of the five mammalian RF-amide peptide groups and their respective receptors in the modulation of nociception in rodents.

NPFF, RFRP, AND NPFF RECEPTORS 1/2

Neuropeptide FF group of peptides includes NPFF and neuropeptide AF (NPAF), while RFRP group comprises RFRP-1 and -3 (also called NPSF and NPVF). NPFF and NPAF are derived from the same precursor, whereas RFRP-1 and RFRP-3 are generated from another precursor (7–10). These different peptides can all activate NPFFR1 and NPFFR2, but RFRP group displays better activity for NPFFR1, and NPFF group preferentially activates NPFFR2 (5). NPFFR1 and NPFFR2 are both coupled to G_i (9, 11–13). They display around 50% amino acid identity, and are encoded by two different genes concomitantly identified in 2000 by different research teams (9, 11, 12). NPFFR1 and NPFFR2 are also called OT7T022/GPR147 and HLWAR77/GPR74, respectively (see Table 1). They are expressed in all vertebrate species examined and are highly conserved, underlining their important role (14).

NPFF, NPAF, AND NPFFR2

Localization in the pain pathways

NPFF and NPAF. Neuropeptide FF and NPAF were first isolated from bovine medulla oblongata and described as having anti-opioid activity on morphine-induced analgesia in the rat (4, 15). The distribution of NPFF/NPAF peptides and mRNA

Abbreviations: ASIC, acid-sensing ion channels; CNS, central nervous system; DOR, δ -opioid receptor; DRG, dorsal root ganglia; i.c.v., intracerebroventricular; i.th., intrathecal; KOR, κ -opioid receptor; MOR, μ -opioid receptor; NPAF, neuropeptide AF; NPFF, neuropeptide FF; PrRP, prolactin-releasing peptide; QRFP, pyroglutamylated RF-amide peptide; RFRP, RF-amide related peptide.

Table 1 | Summary of nomenclature and sequences for mammalian RF-amide peptides and their receptors.

Group	Peptide	Species	Uniprot accession number	Sequence	Receptor name
NPFF	NPFF	Human	O15130	SOAFLFQPRF-NH2	NPFFR2
		Rat	Q9WVA9	NPAFLFQPRF-NH2	GPR74
		Mouse	Q9WVA8	SPAFLFQPRF-NH2	HLWAR77
	NPAF (NPSF for the last eight residues)	Human	O15130	AGEGLNSQFWSLAAPQRF-NH2	
		Rat	Q9WVA9	EFWSLAAPQRF-NH2	
		Mouse	Q9WVA8	QFWSLAAPQRF-NH2	
RFRP	RFRP-1 (NPSF, GnIH)	Human	Q9HCQ7	MPHSF ANLPLRF-NH2	NPFFR1
		Rat	Q9ESQ9	VPHSA ANLPLRF-NH2	GPR147
		Mouse	Q9ESQ8		OT7T022
	RFRP-3 (NPVF)	Human	Q9HCQ7	VPN LQRF-NH2	
		Rat	Q9ESQ9	ANMEAGTMSHFPS LQRF-NH2	
		Mouse	Q9ESQ8	VNMEAGTRSHFPS LQRF-NH2	
QRFP	QRFP43 (43RFa, P518)	Human	P83859	<EDEGSEATGFLPAAGEKTSGLPLGNLAEELNG YSRKKG GFSFRF-NH2	QRFP
		Rat	P83860	<EDSGSEATGFLPTDSEKASGPLGTLAEELSS YSRRKGG FSFRF-NH2	GPR103
		Mouse	Q8CE23	<EDGSSEAAGFLPADSEKASGPLGTLAEELSS YSRRKGG FSFRF-NH2	AQ27
	QRFP26 (26RFa)	Human	P83859	TSGPLGNLAEELNG YSRKKGGFSFRF-NH2	SP9155
		Rat	P83860	ASGPLGTLAEELSS YSRRKGGFSFRF-NH2	
		Mouse	Q8CE23		
	PrRP31	Human	P81277	SRTHRHSMEIRTPDINPAWYAS RGIRPVGRF-NH2	PrRPR
		Rat	P81278	SRAHQHSMETRTPDINPAWYTGR RGIRPVGRF-NH2	GPR10
		Mouse	B7U2G4		hGR3
PrRP	PrRP20	Human	P81277	TPDINPAWYAS RGIRPVGRF-NH2	UHR-1
		Rat	P81278	TPDINPAWYTGR RGIRPVGRF-NH2	
		Mouse	B7U2G4		
	Kisspeptin-54 (metastatin)	Human	Q15726	GTSLSPPESSGSPQQPGLSAPHSRQIPAPQGAVLVQR	Kiss1R
				EKDLPN YNWNSFGLRF-NH2	GPR54
Kisspeptin	Kisspeptin-52	Rat	Q7TSB7	TSPCPPVENPTGHQRPPCATRSRLIPAPRGSVLVQREKDMA	OT7T175
				YNWNSFGLRY-NH2	AXOR12
		Mouse	Q6Y4S4	SSPCPPVEGPAGRQRPLCASRSRLIPAPRGAVLVQREKDL	
	Kisspeptin-10			TYNWNSFGLRY-NH2	
		Human	Q15726	YNWNSFGLRF-NH2	
		Rat	Q7TSB7	YNWNSFGLRY-NH2	
		Mouse	Q6Y4S4		

Sequences in bold correspond to the conserved carboxyl-terminal sequence between human, rat and mouse peptides.

has been extensively reviewed by Yang and collaborators (14). In this review, the authors pointed out that one must remain vigilant regarding the NPFF distribution by immunohistochemistry or radioimmunoassay, because the antibodies first used were against the COOH-terminus of NPFF, which is shared by other RF-amide peptides, thus results may be non-specific to NPFF. Nevertheless, NPFF presence in rodents has largely been reported in discrete central nervous system (CNS) areas by radioimmunoassay, immunohistochemistry, or *in situ* hybridization studies. The highest levels recorded were in the dorsal horn of the spinal cord

and in the posterior lobe of the pituitary gland [see Ref. (14, 16)]. Fibers containing NPFF in the spinal cord seems to have intrinsic spinal origin (17). Most studies have reported the absence of NPFF mRNA or immunoreactivity in dorsal roots ganglia (DRG) except Allard et al. (18) who showed the presence of NPFF immunoreactivity in DRG, but at low level and only after blocking axonal transport [see Ref. (16)].

Neuropeptide AF (also called NPSF in rodents; see **Table 1**) has been detected in mouse and rat spinal cord as well as in human cerebrospinal fluid [see Ref. (14, 19–21)].

NPFFR2. The detailed distribution in rodents of both protein and mRNA for NPFFR2 is reviewed in Ref. (14–16, 22, 23). NPFFR2 mRNA has been detected by *in situ* hybridization and qRT-PCR in several brain regions of rodents including thalamic nuclei, hypothalamus, and superficial layers of spinal cord (10–12, 24). Using immunohistochemistry and western blot, the presence of NPFFR2 has also been detected in ventral tegmental area, hippocampus, hypothalamus olfactory tubercle, and spinal cord (25). NPFFR2 distribution in rodents has been widely described by using binding experiments (11, 26–32). The highest NPFFR2 binding sites are found in the olfactory bulb (of mice but not rat), in several thalamic nuclei, and in superficial layers of the spinal cord. However, it must be noted that, in these studies, the radiolabeled ligands used for the detection of NPFFR2 are not highly selective for this receptor and could therefore limit the relevance of the conclusions.

Like for NPFF, results concerning the presence of NPFFR2 and its mRNA in DRG or in primary afferent terminals in the spinal cord are controversial, with some studies supporting their presence and other their absence in this region [see Ref. (14–16)]. NPFFR2 mRNA has been detected in rat dorsal root ganglia and trigeminal ganglia (11). Different studies have shown a decrease of NPFFR2 binding in rats after dorsal rhizotomy, neonatal capsaicin treatment, sciatic nerve section, or spinal cord ligation (29, 33) while Lombard and collaborators did not see any decrease of binding sites after neonatal capsaicin treatment or dorsal rhizotomy suggesting that, in the rat spinal cord, NPFF receptors are mostly post-synaptically expressed (34).

Overall, the plurality of techniques leading to the same distribution pattern supports the presence of NPFFR2 in different brain structures and spinal cord and is consistent with its potential role in the modulation of nociception and sensory input.

Modulation of nociception

Effects of NPFF/NPAF on basal nociception and opiate analgesia. The modulation of nociception by NPFF/NPAF has been largely studied and reviewed in Ref. (5, 14–16, 22, 23, 35). Table 2 summarizes the effect of the different RF-amide peptides on nociception. NPFF has been described as having two different effects on pain perception depending on the site of administration. When administrated by intrathecal (i.th.) injection, NPFF showed anti-nociceptive effect, which may be considered opioid-like effect as it provoked analgesia and potentiated opioid effects. When administrated at the supra spinal level via intracerebroventricular (i.c.v.) injection, NPFF had a pro-nociceptive effect characterized by a reversal of morphine analgesia, indicating that it displays anti-opioid properties [for details, see Ref. (15)]. Furthermore, inhibition of morphine analgesia induced by i.c.v. injection of NPFF in mice was blocked when NPFF was co-administered with RF9 (either i.c.v. or subcutaneously), a selective antagonist of NPFFR1/2 (6, 36–38). RF9, also potentiated opiate analgesic effects and blocked opioid-induced hyperalgesia and analgesic tolerance both in mice and rats (38, 39). Altogether, these results support that NPFF action on nociception and opiate analgesia is mediated by NPFF receptors and that this peptide and its receptor are part of an anti-opioid system that is involved in the homeostatic control of opiates action. Hypothesis explaining NPFF anti-opioid

properties are further described below. We can notice that in most reports, NPFF alone had no effect on basal nociceptive threshold but efficiently reversed morphine analgesia, suggesting that NPFF anti-opioid properties depend on opioid receptors stimulation and points to their interconnected mechanisms of action. However, it is noteworthy that in few studies, NPFF administered alone by i.c.v. lowered the nociceptive threshold measured by the tail flick test in rat, which is consistent with anti-opioid properties of this peptide (4, 40). Interestingly, in PrRPR lacking mice, NPFF administration did not reverse morphine analgesia any more, indicating that at least some NPFF actions require a functional PrRPR [see below; (41)]. Finally, NPFF-related peptides delayed the rate of acid-sensing ion channels (ASIC) desensitization causing an enhancement of acid gated currents (42), which are known to have pain modulatory properties (43). In addition, it has been demonstrated that expression of ASIC3 increased under inflammatory conditions (44). Therefore, NPFF may also modulate pain through ASICs. However, these results were obtained with high concentrations of RF-NH₂ peptides, thus questioning the physiological relevance of these observations.

Neuropeptide AF has been shown to display NPFF-like bioactivity. NPAF injection, in the lateral ventricle of mice, increased or decreased morphine-induced analgesia in the tail flick test depending on NPAF and morphine amounts used (50) while another study showed that i.c.v. administration of NPAF in mice potently reversed morphine-induced analgesia in the tail flick test (19). I.th. administration of a low dose of NPAF in the rat potentiated morphine anti-nociception in tail flick and paw-pressure tests and efficiently reversed morphine analgesic tolerance (49). Altogether, these results demonstrate NPAF implication in opioid-modulating system. Like NPFF, NPAF can increase the amplitude of the sustained current of ASIC (57) indicating its eventual role in neuron excitability and then in nociception. However, in ASIC3 knockout mice, nociceptive behavior induced by NPAF subcutaneous injection is similar than in wild type animals, suggesting that ASIC3 is not involved in this effect (58).

Anti-opioid properties. Tolerance is defined by the loss of efficacy of a given compound after prolonged treatment, which leads to the necessity to increase the dose to reach the same effect. Two different hypotheses have been proposed to explain tolerance to morphine. One is based on different molecular mechanisms including functional selective desensitization of receptor signaling, receptor endocytosis, and degradation (59–63). The second one proposes the existence of a homeostatic equilibrium between the anti-nociceptive opioid system and pro-nociceptive anti-opioid systems (64, 65). In this model, activation of the opioid system by an exogenous opiate produces analgesia, but also stimulates the release of endogenous anti-opioid molecules, which produces a pro-nociceptive effect. This pro-nociceptive effect ramps up during chronic administration of the opiate and thus opposes to its analgesic effect. It is then necessary to increase opiate doses to overcome the activation of anti-opioid systems and produce an analgesic effect, thus explaining the tolerance described following chronic opioid treatment. Moreover, upon cessation of the opiate treatment, the opioid system is no longer activated while the anti-opioid system remains activated by

Table 2 | Summary of the effects of mammalian RF-amide peptides on the modulation of nociception.

Group	Peptide	Injection	Basal nociception	Inflammatory pain	Neuropathic pain
NPFF	NPFF (or analog)	i.th.	Analgesia and potentiation of opioid effects [see Ref. (15)]	Attenuates allodynia and thermal hyperalgesia (45, 46)	Attenuates allodynia (45–47)
		i.c.v.	No effect or decreases basal nociceptive threshold and reverses morphine analgesia [see Ref. (15)]		Attenuates tactile allodynia (46, 47)
		Intraperitoneal		Attenuates flinching behavior in formalin test (48)	Decreases mechanical hypersensitivity (48)
	NPAF	i.th.	Potentiates morphine analgesia and reverses morphine analgesic tolerance (49)		
		i.c.v.	Increases/decreases morphine analgesia (19, 50)		
RFRP	RFRP-1 (NPSE, GnIH)	i.th.			Thermal anti-nociception and tactile anti-allodynia (51)
		i.c.v.	Decreases morphine analgesia (10)	Decreases morphine analgesia (10)	
	RFRP-3 (NPVF)	i.c.v.	Decreases thermal nociceptive threshold (6); potentiates/decreases/no effect on morphine analgesia (6, 37, 50)		
QRFP	QRFP26 (26RFa)	i.th.	No effect on mechanical or thermal nociception (52, 53)	Decreases mechanical allodynia; inhibits agitation behavior in formalin test (52, 54)	Antiallodynic effect (53)
		i.c.v.	No effect on thermal nociception (54); decreases thermal nociceptive threshold (6)	Inhibits agitation behavior in formalin test (52, 54)	
PrRP	PrRP20	i.th.	No effect (55)		Attenuates tactile allodynia (periaqueductal gray, nucleus tractus solitarius) or no effect [caudal ventrolateral medulla; (55)]
		Intracerebral	Analgesia [nucleus tractus solitarius; (55)]		
		i.c.v.	Hyperalgesia (6, 41, 55)		
Kisspeptin	kisspeptin-54	Intraplantar	Nocifensive response; decreases thermal pain threshold (56)		
	kisspeptin-10	i.c.v.	Hyperalgesia and anti-morphine activity (6)		

endogenous anti-opioid molecules, which explains the decrease in the basal nociceptive threshold or hyperalgesia observed following disruption of chronic morphine treatment. This phenomenon is called opioid-induced hyperalgesia.

Neuropeptide FF has been shown to participate in the adaptive processes that counteract the opioid effects or change in the nociceptive threshold leading to opioid-induced hyperalgesia and tolerance. Indeed, increase in NPFF-like immunoreactivity has been observed in the brain and spinal cord during chronic or acute morphine treatment (66–68), supporting the key role of NPFF in these processes [see Ref. (35, 64)]. It has also been shown that reducing NPFF expression by central administration

of antibodies or antisense oligonucleotides attenuated the tolerance to morphine analgesia (69, 70). Moreover, when NPFFR1/2 were pharmacologically blocked in rats or mice with RF9, there was a potentiation of opiate analgesic effects, a prevention of the development of opiate tolerance and an abolition of hyperalgesia induced by acute or chronic administration of different opiates including, fentanyl, heroin, and morphine (38, 39). Furthermore, triple knockout mice for μ -, δ -, κ -opioids receptors (corresponding to MOR, DOR, and KOR, respectively) are hyperalgesic, which supports the idea that MOR/DOR/KOR deletion certainly affects the balance between opioid and anti-opioid systems, and then, may lead to an increase in NPFF system efficacy.

Accordingly, MOR/DOR/KOR triple knockout mice showed an increase in NPFFR2 binding sites in several brain region and spinal cord (71). Finally, it has been shown that chronic i.c.v. infusion of NPFF downregulated MOR binding sites in the rat brain (72), whereas injection of antiserum against NPFF (anti-NPFF IgG) upregulated MOR binding sites (73). This suggests that density of MOR is regulated by NPFF, raising another possible way to induce anti-opioid effects.

Regarding morphine withdrawal and rewarding effects, NPFF also shows anti-opioid properties. NPFF i.c.v. injection produced an abstinence syndrome in morphine-dependent rats (66), and IgG i.c.v. injection from an antiserum against NPFF attenuated naloxone-induced withdrawal syndrome (70, 74), suggesting that NPFF modulates the different effects of opioids. I.c.v. injection of NPFF analog (dNPA) in mice counteracted the c-Fos expression induced by morphine in the shell of nucleus accumbens (75) known to be required for the acquisition of morphine-conditioned place preference (76). NPFFR1/R2 blockade with RF9 increased morphine-induced conditioned place preference and decreased naltrexone-precipitated withdrawal syndrome (38). Accordingly, injection of the NPFF analog (1DMe)-NPYF inhibited the rewarding effect of morphine (77), and acute administration of NPFF inhibited morphine-induced hyperlocomotion (78).

Overall, these results suggest that NPFF/NPFFRs system opposes to opioid effects, highlighting its role as an anti-opioid system.

Cellular effect. Hypothesis to explain the activation of NPFF/NPFFRs anti-opioid system, by the stimulation of the opioid system, may be that the neuronal circuitry implicated in both systems is interconnected, or it may exist a crosstalk between receptors in the same neurons involving a correlation/crosscheck in the cellular effects (79). In agreement with this second hypothesis, it has been shown that in rat spinal ganglion neurons the NPFF analog (1DMe)-NPYF reversed the inhibition by DAMGO of depolarization-evoked rise in intracellular Ca^{2+} (80), suggesting that NPFF could block the inhibition of morphine analgesia by reversing the effect of mu agonists on Ca^{2+} channels. Another possibility to explain anti-opioid activity of NPFFR2 receptors is based on physical interaction between NPFFR2 and MOR. In fact, it has been shown that NPFF agonist promoted a heteromeric association between NPFFR2 and MOR that changed the lateral diffusion of MOR, which seems to move MOR away from its signaling partners, thus reducing response to opioids (81). Moreover, NPFF have been shown to modify the G-protein environment of MOR, which may also participate in the mechanism by which this peptide reduces the inhibitory activity of opioids (82). More generally, stimulation of NPFF receptor seems to provoke changes in MOR-associated signaling that could occur by receptor heteromerization and/or alteration in signaling transduction pathways [see Ref. (35)].

Concerning the pro-opioid properties, Mollereau et al. have shown that, similarly to opioid agonists, NPFF increased voltage-dependent potassium outward currents in F-11 DRG cell line (hybridoma derived from rat DRG and mouse neuroblastoma), which may explain the similar anti-nociceptive actions of NPFF and opioid agonists at the spinal level (83). Regarding the opioid

potentiating effect of intrathecally injected NPFF, it has been proposed that activation of NPFF receptors could result in a functional blockade of δ opioid autoreceptors in the spinal cord, which are involved in an inhibitory feedback on Met-enkephalin release (84). However, the molecular mechanisms involved in this effect are still unclear and this hypothesis is not supported by studies in Chinese hamster ovary cell line showing that NPFF analog (1DMe)-NPYF had no intrinsic activity but enhanced DOR-mediated inhibition of forskolin-stimulated cAMP accumulation and phosphorylation of ERK2 (85).

Involvement of NPFF system in persistent pain. Neuropeptide FF and NPFFR2 seem to be implicated in inflammatory pain. Indeed, several studies, using different models of inflammatory pain, have shown that inflammation-induced modulation of NPFF or NPFFR2 at the mRNA and protein levels [see Table 3 in Ref. (14)]. For instance, persistent pain induced by carrageenan inflammation upregulated NPFF and NPFFR2 gene expressions in the rat spinal cord, suggesting an involvement of spinal NPFF system in inflammatory pain (8, 24, 86). In the rat, it has also been shown that during acute colonic inflammation there is an up-regulation of supraspinal NPFFR2 (86). Moreover, in the spinal cord of rats with tibio-tarsal joint inflammation (induced by *Mycobacterium butyricum* in Freund's adjuvant injected into the tibio-tarsal joint), there is an increase of [125 I]-1DMe-NPYF binding (87) while carrageenan induced an increase of NPFF immunoreactive cell bodies in spinal cord (88) and an increase of NPFFR2 immunoreactivity in primary afferent terminals (24). Otherwise, it has been shown that NPFF administration (i.th. or i.c.v.) attenuated allodynia induced by injection of Freund's Complete Adjuvant in the rat paw (46) while (1DMe)-NPYF i.th. administration decreased mechanical allodynia and thermal hyperalgesia induced by carrageenan inflammation (45). More recently, another study showed that an intraperitoneal injection of the NPFFR2 agonist AC-263093 attenuated flinching behavior in formalin test, and thermal hyperalgesia induced by carrageenan injection in hotplate test (48). Very recently, an *in vitro* study using LPS-stimulated macrophages has shown that NPFF suppressed the production of nitric oxide, an important signal transmitter during inflammatory processes, suggesting a possible anti-inflammatory action of this peptide (89). This effect was blocked by a pretreatment with RF9, indicating that it is mediated by NPFF receptors. Finally, in mice with chronic inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant, the decrease of morphine rewarding properties were associated with an increase of NPFFR2 agonist [125 I]-EYWSLAAPQRF-NH₂ binding in several brain regions involved in morphine reward including the shell of the nucleus accumbens, the major islands of Calleja and the ventral endopiriform nucleus. Altogether, these data indicate that NPFF and NPFFR2 are probably upregulated in different models of inflammatory pain in rodents and that NPFF displays antiallodynic and anti-hyperalgesic effects in these models.

In rats with neuropathic pain, NPFF mRNA was not upregulated neither in the spinal cord nor in the brainstem, while NPFFR2 mRNA was slightly upregulated only in the brainstem (8, 86). NPFF administrations either i.c.v., i.th. or directly into the periaqueductal gray attenuated tactile allodynia induced by

chronic neuropathy in rats (46, 47). Moreover, i.th. administration of the NPFF analog (1DMe)-NPYF decreased cold and mechanical allodynia observed in rats with spinal nerve ligation (45) and intraperitoneal injection of NPFFR2 agonist AC-263093 attenuated mechanical hypersensitivity in the same model of neuropathy (48). In summary, although NPFF and NPFFR2 mRNA do not seem to be strongly regulated in neuropathic pain models, NPFF and NPFF-related compounds display antiallodynic properties in neuropathic animals.

In a model of cancerous pain induced by melanoma cells injected in the hind paw of the mouse, the binding of NPFFR2 agonist [125 I]-EYWSLAAPQRF-NH₂ increased in several brain areas involved in the rewarding properties of opiates, similarly to what was observed in a model of chronic inflammation (see above). This increase of binding was associated with a decrease of morphine's motivational properties tested with the place preference paradigm. These data suggest that NPFF contributes to the suppression of morphine rewarding effects in this model of cancerous pain (90).

Overall, NPFF and NPFF-related compounds have been shown to display antiallodynic/hyperalgesic properties in different models of chronic pain, which contrast with the pro-nociceptive anti-opioid properties of NPFF that have been observed in animals that were chronically treated with opiates.

RFRP-1, RFRP-3, AND NPFFR1

The gene encoding RFRP-1 and RFRP-3 have been identified and cloned in the beginning of 2000s by two research teams through databases searches (9, 10). These two different peptides, also known as NPSF and NPVF, derived from the same precursor protein and constitute the RFRP group [(9, 10); see **Table 1**]. RFRP-1 seems to be the mammalian homolog of LPLRF-amide, a peptide isolated in 1983 in avian brain (3) and of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) characterized from quail brain (91). RFRP-1 and RFRP-3 activate preferentially NPFFR1, which triggers the G_{i/o} signal transduction pathway (9, 11).

Localization in the pain pathways

RFRP-1 and RFRP-3. Neurons containing RFRP-1 and RFRP-3 proteins and RFRP mRNA have been found by using immunohistochemical analyses and *in situ* hybridization in rat and mouse CNS (9, 10, 92–96). Their highest level has been found in the hypothalamus (periventricular and ventromedial nucleus), and fibers containing RFRP-1 and RFRP-3 are widely distributed in the brain (94). These results were confirmed very recently by the analysis of transgenic rats expressing an enhanced green fluorescent protein tagged to the RFRP promoter (97). Neurons containing RFRP immunoreactivity and mRNA are distinct from those containing NPFF (94). In mice, RFRP-immunoreactive fibers were found in the superficial layer of spinal trigeminal nucleus and dorsal horn of the spinal cord (93), while in rats, low levels of RFRP-1 immunoreactivity and no mRNA were detected in these regions (51, 94). From these observations, Pertovaara et al. (51) suggested that RFRP neurons localized in rat hypothalamus may contribute to well-known descending pain modulatory pathways (98), which project to nucleus of the solitary tract and spinal cord.

NPFFR1. NPFFR1 transcript was identified both in RT-qPCR and *in situ* hybridization experiments in several structures of the rat CNS. Highest signals were detected in the lateral septum and in various hypothalamic and thalamic nuclei (9–11). Accordingly, a high level of NPFFR1 binding sites was found in these regions both in the rat and mouse (30–32). NPFFR1 mRNA and binding sites were weakly or not detectable in the superficial layers of the spinal cord, depending on the strains of rodents used (10, 11, 31). Overall, there is a good correlation between the distribution of NPFFR1 receptor and its endogenous ligands RFRP-1/-3.

Modulation of nociception

Modulatory effects of both RFRP-1 and RFRP-3 on nociception have been reported (see **Table 2**). I.c.v. injection of RFRP-1, when given alone, had no effect on hot plate latencies in the rat but when co-administrated with morphine, it decreased or blocked morphine analgesia in hot plate and formalin tests (10). These data suggest that, like NPFF, RFRP-1 action depends on opioid receptors activation, supporting its role in an anti-opioid system related to the opioid system. In neuropathic rats, RFRP-1 produced pain suppressive effects depending on the modality of the noxious test and the localization of the injection (51). Indeed, i.th. injection of RFRP-1 induced thermal anti-nociception (tail flick test) and tactile anti-allodynia (Von Frey filament), while injection in the solitary tract nucleus produced only mechanical anti-hyperalgesia (paw-pressure test). Furthermore, tactile anti-allodynia produced by RFRP-1 was attenuated by naloxone, indicating that opioid receptors are involved in the spinal action of RFRP-1.

In mice, i.c.v. injection of VPNLQRF-NH₂ (human RFRP-3) in the lateral ventricle has been reported to either potentiate morphine analgesia at high doses [10–32 nmol; (50)] or decrease morphine analgesia at similar doses [20 nmol; (37)]. Conversely, i.c.v. injection in mice of RFRP-3 from mouse origin (10 nmol) had no effect on morphine analgesia but significantly decreased thermal nociceptive threshold when injected alone and this effect was reversed by RF9 (6). In SH-SY5Y cells transfected with NPFFR1 and endogenously expressing mu and delta opioid receptors, RFRP-3 acted like opioids by inhibiting adenylyl cyclase activity and voltage-gated Ca²⁺ currents, whereas preincubation of those cells with RFRP-3 induced an anti-opioid activity characterized by a decrease of response to opioids on calcium signaling (99). Finally, NPFFR1 was shown to be downregulated in several brain regions of triple MOR/DOR/KOR knockout mice, suggesting an interaction between opioid and RFRP/NPFFR1 systems (71).

Altogether, these results indicate that RFRP-1/3 play a role in the modulation of nociception and opioid effects, presumably via their receptor NPFFR1. However, if we consider that no NPFFR1 has been found in the spinal cord of rodents and that RFRP-1/-3 peptides can bind to NPFFR2 subtype, this receptor may be involved in the spinal nociceptive modulating effect of these peptides (6). Moreover, RFRPs as well as NPFF and NPAF have also been shown to bind and activate some MrGs (mas-related genes), which are G-protein-coupled receptor expressed in DRG by a specific subset of sensory neurons (100, 101), suggesting that these receptors could also represent relevant targets for nociceptive effects of these peptides.

QRFP AND QRFP RECEPTOR

Pyroglutamylated RF-amide peptide and its receptor QRFP are the most recently discovered mammalian RF-amide peptide and receptor, respectively (102–104). QRFP is also known as GPR103, AQ27, SP9155, and QRFP as P518, 26RFa/43RFa (see **Table 1**). 43RFa is a NH₂-terminally elongated form of 26RFa. Both peptides arise from the same precursor and were isolated from human hypothalamus and spinal cord, while only 43RFa was isolated from rat brain (102, 105). The primary sequences of human and rodent 26RFa display more than 80% identity (102). The nomenclature QRFP26 and QRFP43 will be used throughout the text for 26 and 43RFa, respectively. QRFP have been shown to activate the G_q/G_i signal transduction pathways in heterologous cells (103, 104), while QRFP26 has been shown to stimulate cAMP production by rat pituitary cells (102). In rodents, two receptor subtypes have been identified QRFP1 and QRFP2 (105, 106). Human QRFP shares 83/84 and 79/82% amino acid identity with mouse and rat QRFP1 and QRFP2, respectively, while mouse QRFP1 and R2 share with each other 75% amino acid identity (105). QRFP26 and 43 have also been shown to display high affinity for and agonist activity at both NPFF receptor subtypes (6, 107).

LOCALIZATION IN THE PAIN PATHWAYS

Pyroglutamylated RF-amide peptide mRNA distribution has been studied in detail in mouse and rat CNS by *in situ* hybridization (102, 103, 105, 106). QRFP transcript was detected almost exclusively in the hypothalamus including ventromedial hypothalamic nucleus, the lateral hypothalamic area, the arcuate nucleus, the retrochiasmatic area, and periventricular nucleus [see Ref. (108)]. In mouse, low levels of QRFP transcript were identified by RT-qPCR in spinal cord (105). In naive rat, QRFP-like immunoreactivity was observed in the L5 DRG (52, 53) where it was mainly located in small to medium sized neurons suggesting a relationship with C-fibers and therefore nociceptive transmission (53). Similar observations were made after a partial spinal nerve ligation (53).

Conversely to QRFP transcript, QRFP1 and R2 mRNAs are widely distributed in the CNS of rodents including spinal cord [see Ref. (108)]. High expression levels were observed in several different hypothalamic and thalamic nuclei as well as brainstem nuclei including dorsal raphe nucleus and the locus coeruleus that are critical regions involved in pain control. In mice, the mRNA distribution of QRFP1 and R2 displayed no overlap with each other (105). However, the transcript for both receptor subtypes has been detected in the spinal cord (105, 109). Like QRFP transcripts, QRFP binding sites are widely distributed in the brain and the spinal cord with a high density in the superficial layers of the dorsal horn [see Ref. (108)]. QRFP binding sites have been described in nuclei involved in processing of pain, such as the parafascicular thalamic nucleus, the locus coeruleus, the dorsal raphe nucleus, the parabrachial nucleus. However, in the rat, QRFP1 mRNA-containing cells are particularly expressed in the midbrain, the pons, and the medulla oblongata, while QRFP binding sites are widely distributed throughout the brain and the spinal cord. These differences may be explained by the fact that QRFP also bind to NPFFR2 (110). QRFP-like immunoreactivity was observed in the superficial lamina of the spinal dorsal horn but not in DRG (52). Taken together, these data suggest the involvement

of QRFP-QRFP system in the nociceptive transmission and/or integration.

MODULATION OF NOCICEPTION

As summarized in **Table 2**, in naive rats, i.th. injection of QRFP26 had no effect neither on mechanical nor on thermal nociception [tested with the hotplate test and Von Frey filaments, respectively; (52, 53)], and i.c.v. injections had no effect on thermal nociception (54). However, a recent study showed that i.c.v. administration of QRFP26 in mice provoked a decrease of thermal nociceptive threshold (6). This discrepancy could be explained by several differences between these studies including the species (rat versus mouse) and nociceptive test used (hot plate versus tail immersion) as well as amount of QRFP injected (three or four times higher in the rat study than in the mouse study).

The effect of QRFP26 has also been examined in different models of persistent pain in rats including inflammatory pain (carrageenan and formalin tests) and neuropathic pain (partial sciatic nerve ligation). Concerning inflammatory pain, it has been shown that i.th. injection of QRFP26 attenuated the level of mechanical allodynia induced by paw carrageenan injection, while i.th. or i.c.v. injections of this peptide inhibited the phase 1 and phase 2 of the agitation behavior induced by paw formalin injection (52, 54). Similarly, i.th. and i.c.v. injections of QRFP produced an antiallodynic effect in a model of partial sciatic nerve ligation (53).

These data together with the observations made on naive animals in the same studies suggest that QRFP modulates nociceptive transmission only during inflammation or neuropathy and has no effect on physiological nociceptive transmission. In addition, Yamamoto et al. pointed out that i.th. but not i.c.v. injection of QRFP suppressed the expression of Fos-like immunoreactivity induced by paw formalin injection in the superficial layers of the spinal dorsal horn, suggesting thus, an implication of QRFP in spinal sensitization induced by paw formalin, carrageenan injection, or partial spinal nerve ligation (52).

Recently, a novel QRFP peptide named TC26RFa has been identified from Chinese tree shrews (111). I.p. injection of TC26RFa in mice induced analgesia in thermal nociceptive tests (tail flick and hot plate tests), in a model of visceral pain, and in the formalin test, and stimulated secretion of anti-inflammatory factors from RAW 264.7 cells (111). In the future, it will be important to determine whether these effects occur through the direct activation of mouse QRFP1 and which receptor subtype is involved in these effects.

PrRP AND PrRP RECEPTOR

Prolactin-releasing peptide, named as such for its prolactin-releasing activity, has been first isolated by Hinuma and collaborators as stimulator of arachidonic acid release from cells expressing an orphan G-protein-coupled receptor cloned from human pituitary and called hGR3 (112). This receptor is nearly identical to a previously cloned orphan receptor called GPR10 (113) and its rat ortholog was cloned from hypothalamus and called UHR-1 (114). Its official name is presently prolactin-releasing peptide receptor (PrRP). Both short (PrRP20) and NH₂-terminally elongated (PrRP31) forms of PrRP originate from the same precursor protein of 98 amino acids [see **Table 1** and Ref. (115)]. Several results suggest that PrRP is coupled to either G_q or G_{i/o}. Indeed, in

CHO cells expressing PrRPR, PrRP induced intracellular Ca^{2+} influx and a decrease of forskolin-stimulated intracellular cAMP production (112). It has also been shown that PrRP, in rat pituitary tumor cells, stimulated the activation of ERK that was blocked by inactivating $G_{i/o}$ by pertussis toxin (116) while in HEK293 cells, PrRPR stimulation induced intracellular Ca^{2+} influx but had no effect on cAMP production (117). Interestingly, Lin et al. have shown that PrRPR can associate with PSD-95/Disk-large/ZO-1 (PDZ) domain proteins (118). PDZ domain proteins are involved in mechanisms of scaffolding and targeting of proteins to specific subcellular domains [see Ref. (119)]. It has also been shown that PDZ domain proteins can interact with AMPA receptors, suggesting that PrRPR may modulate neurotransmission at glutamatergic synapses (118). Both PrRP20 and 31 bind with very high affinity to PrRPR, but they have also been described to display high affinity for and agonist activity at both NPFFR1 and NPFFR2 (6, 107, 120).

LOCALIZATION IN THE PAIN PATHWAYS

Prolactin-releasing peptide and PrRPR are widely distributed in the nervous system. Their detailed distribution in rodent CNS has been recently reviewed [see Ref. (23, 115, 121)]. In the rat (and human) PrRP mRNA is expressed in several regions that have been involved in the processing of nociceptive inputs including the medulla oblongata and the nucleus of solitary tract as well as dorsomedial hypothalamic nucleus. PrRP-immunoreactive fibers are present in many brain regions including several areas important for pain control including ventrolateral medulla, basolateral amygdaloid nucleus, and bed nucleus of the stria terminalis. No PrRP has been detected in the spinal cord using immunohistochemistry or *in situ* hybridization (55).

Prolactin-releasing peptide receptor mRNA is broadly expressed in the brain and the highest expression is in the anterior lobe of the pituitary (122). PrRPR mRNA has also been shown to be highly expressed in lateral and medial parabrachial nuclei, which are key region involved in the central processing of nociceptive inputs from spinal lamina I–II and spinal trigeminal cells (123). Autoradiographic binding experiments with [^{125}I]-PrRP31 only identified a strong signal in the reticular nucleus of the thalamus as well as light binding in the periventricular nucleus (124).

Overall, there is a good correlation between the localization of PrRP fibers and its receptor. However, there are some discrepancies that suggest that PrRPR might not be the only receptor for PrRP. As *in vitro* binding experiments have shown that PrRP also display high affinity for NPFFR1 and NPFFR2 (6, 107, 120), it is tempting to speculate that these receptors could also represent endogenous targets of PrRP in some brain areas. In agreement with this hypothesis, we have shown that in rats the increase in blood pressure and heart rate induced by i.c.v. administration of PrRP is blocked by the NPFFR1/R2 selective antagonist RF9, while they are still present in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat strain, in which the GRP10 receptor gene was mutated (125).

MODULATION OF NOCICEPTION

Prolactin-releasing peptide modulates nociception in various ways (see Table 2). Indeed, when administered in rats by i.th. injection, PrRP20 produced no significant anti-nociception, while

intracerebral injection of PrRP20 in the nucleus tractus solitarius provoked a strong analgesia in tail flick and paw-pressure tests (55). Conversely, PrRP induced significant hyperalgesia in tail immersion test when administered i.c.v. in mice (6, 41) and provoked a weak hyperalgesia in paw-pressure test when injected in the rat caudal ventrolateral medulla (55), a structure known to be involved in descending control of pain (126–128). These data indicate that PrRP modulates nociception in rats and mice under basal condition and nociceptive or anti-nociceptive actions of this peptide depend on the site of injection.

It has also been shown that PrRP plays a role in the modulation of nociception under neuropathic conditions. Indeed, in rats with spinal nerve ligation, PrRP attenuated tactile allodynia when it was injected in the periaqueductal gray or in the nucleus tractus solitarius, but had no effect when administered in the caudal ventrolateral medulla (55).

Based on the hypothesis that PrRPR participates to an anti-opioid system, Laurent et al. studied the consequence of PrRPR deletion on opiate response (41). They showed that, compared to wild type, PrRPR-knockout mice have higher nociceptive thresholds and stronger stress-induced analgesia, and these differences are suppressed by naloxone. Moreover, the hyperalgesic effect of i.c.v. administration of PrRP as well as its capacity to block morphine analgesia was absent in PrRPR-knockout mice. These animals also displayed a potentiation of morphine induced analgesia, a reduction of morphine tolerance, an enhancement of acquisition of morphine-induced conditioned place preference and a decrease of the severity of naloxone precipitated morphine withdrawal syndrome. These results suggest that PrRP–PrRPR system participate in an anti-opioid system (41). More recently, we have shown that the hyperalgesic and anti-morphine effects of PrRP in wild type mice were blocked by the selective NPFFR1/R2 antagonist RF9, indicating that NPFF receptors are also critically involved in these effects. Altogether, these data show that PrRPR and NPFF receptors are both mandatory for the action of PrRP on nociception. Similarly, these receptors seem both essential for the action of NPFF since its anti-morphine effect was absent in PrRPR-knockout animals (41) and was blocked in wild-type mice by RF9 (6).

Overall, these data indicate the existence of a functional interaction between NPFFR1/2 and PrRPR that is critical for the effect of NPFF and PrRP on nociception. Whether this interaction occurs through direct heterodimerization of these receptors or whether it is due to expression of both receptors in different cells from the same circuit remains to be investigated.

KISSPEPTIN AND Kiss1 RECEPTOR

Kisspeptin is a 54-amino acid peptide first discovered as a metastasis suppressor, hence was also named metastatin (129). In the human, Kiss1 gene codes for a 145-amino acid precursor protein, which is cleaved to the 54-amino acid protein (kisspeptin-54) or into shorter products (kisspeptin-10, -13, -14) that all share the same COOH-terminal Arg–Phe–NH₂ sequence (130). In rodents, the largest proteolytic product of the kisspeptin precursor is composed of 52 amino acids (kisspeptin-52), and the RF-amide sequence is substituted by an Arg–Tyr–NH₂ motif (see Table 1). Kisspeptin activates Kiss1R (also named GPR54, AXOR12, or

OT7T175). This receptor has first been cloned from the rat brain (131) and was orphanized in 2001 by three independent research groups (130, 132, 133). GPR54 is known to act via G_q/G_{11} signal transduction pathways [see Ref. (134)]. Kisspeptin has also been described as capable to activate different set of interconnected signals in a cell type-dependent manner [see Ref. (135–138)]. It has also been shown that kisspeptin-10, -13, and -54 display high affinity binding and activate both NPFF receptor subtypes (6, 139, 140). Although Kisspeptin was originally identified as a metastasis suppressor, this peptide and its receptor Kiss1R are now largely recognized to have a central effect on neuroendocrine regulation of reproduction. This aspect has recently been reviewed in details by Pinilla and collaborators (141).

LOCALIZATION IN THE PAIN PATHWAYS

In the mouse and rat brain, kisspeptin transcript and protein have been detected in several hypothalamic nuclei that are involved in the control of gonadotropin secretion [see Ref. (142)]. Outside of hypothalamus, kisspeptin-immunoreactive fibers were identified in relatively few regions of mouse brain, some of which being critically involved in the control of nociception including the paraventricular thalamic nucleus, periaqueductal gray, and locus coeruleus (143). In this study, the antisera specificity was controlled with brains of Kiss1 knockout mice thus insuring that the immunoreactivity observed is due to kisspeptin and not other RF-amide peptides. In the rat, kisspeptin mRNA and immunoreactivity have been found in the dorsal horn of the spinal cord and in L4/L5 DRG (144, 145). In DRG, kisspeptin is expressed in large-sized neurons and also in unmyelinated small- and medium-sized neurons, which are considered like nociceptors (145).

Kiss1 receptor mRNA has been detected in several regions of rodents' brain [see Ref. (142)]. In the mouse, by using X gal histochemistry in a transgenic Kiss1RLacZ knock-in mouse, Herbison et al. identified Kiss1R positive cells mainly in hypothalamus and hippocampus, and in several discrete brain regions such as periaqueductal gray and cuneate nucleus of brainstem, which are involved in pain control (146). Kiss1 immunostaining have been found in rat DRG neurons and in lamina I and II of the dorsal horn of the spinal cord. In DRG, Kiss1R distribution is similar to that of kisspeptin (145). Kiss1R has also been found, by immunohistochemical analysis, in peripheral nerve endings of PGP9.5-positive sensory fibers in the mouse skin (56).

All these data suggest that kisspeptin/Kiss1R system may play a role in the modulation of nociception.

MODULATION OF NOCICEPTION

There are few reports that describe the effect of kisspeptin on nociception in rodents (see **Table 2**). In naïve mice, intraplantar injection of kisspeptin induced a small nocifensive response and a decrease of thermal pain threshold in the hot plate test (56) while i.c.v. administration of kisspeptin-10 induced hyperalgesia and anti-morphine activity (6). However, these latter effects were blocked by the NPFF1R/2R antagonist RF9 indicating that these receptors are important for the effects of kisspeptin-10 on nociception. If we consider that kisspeptins display high affinity for Kiss1R and NPFF1R/2R, the receptor(s) that constitutes the direct target of kisspeptins in these effects still remains to clarify.

In addition to its involvement in basal nociception, i.th. and intraplantar injections of kisspeptin have been shown to provoke hyperalgesia in the first and second phases of the formalin test and to enhance TRPV1 phosphorylation at Ser800 at the site of injection and ERK1/2 phosphorylation in the dorsal horn (56). Moreover, in formalin test, the blockade of the endogenous action of kisspeptin using an antagonist of Kiss1R, p234 (intraplantar and i.th.), caused analgesia. From these results, Spampinato et al. proposed that kisspeptin, by activating Kiss1R, may lead to peripheral nociceptive sensitization through the modulation of TRPV1 phosphorylation as well as to central sensitization via the activation of the ERK/MAPK pathway in the dorsal horn of the spinal cord (56). Finally, in a model of chronic inflammatory pain (complete Freund adjuvant), kisspeptin and Kiss1R transcripts and proteins were upregulated in DRG and dorsal horn neurons (145).

Altogether, these data attest that kisspeptin regulates pain and/or nociceptive sensitization in mice, and may be predominantly implicated during inflammatory pain.

CONCLUSION

Mammalian RF-amide peptides and their receptors have been implicated in the modulation of several functions including feeding, reproduction, and cardiovascular regulation. Data from the literature, including tissue distribution and *in vivo* activity of RF-amide peptides, now provide emerging evidence that, not only NPFF/NPFFR2 system but all RF-amide peptides and their receptors are involved in the modulation of nociception, either in basal or chronic pain conditions. Moreover, several of these peptides and their receptors seem to participate to an anti-opioid pro-nociceptive system that controls anti-nociceptive and possibly other functions of opiates. Future studies, by using genetic and selective pharmacological tools, will be necessary to clearly delineate the role of each of these systems in the modulation of nociceptive inputs. Ultimately, these studies should lead to the identification of novel targets for pain treatment and for improving the efficacy of opiates and limit the development of tolerance following chronic treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been published within the LABEX ANR-10-LABX-0034_Medalis and received financial support from the French government, managed by the «Agence Nationale de la Recherche» under the «Programme d'investissement d'avenir». This work was supported by the CNRS and Strasbourg University. Safia Ayachi was supported by a Ph.D. fellowship from the French «Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche».

REFERENCES

1. Price DA, Greenberg MJ. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science* (1977) **197**:670–1. doi:10.1126/science.877582
2. Boer HH, Schot LP, Veenstra JA, Reichelt D. Immunocytochemical identification of neural elements in the central nervous systems of a snail, some insects, a fish, and a mammal with an antiserum to the molluscan cardio-excitatory tetrapeptide FMRF-amide. *Cell Tissue Res* (1980) **213**:21–7. doi:10.1007/BF00236917
3. Dockray GJ, Reeve JR, Shively J, Gayton RJ, Barnard CS. A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamide. *Nature* (1983) **305**:328–30. doi:10.1038/305328a0

4. Yang HY, Fratta W, Majane EA, Costa E. Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1985) **82**:7757–61. doi:10.1073/pnas.82.22.7757
5. Simonin F. Neuropeptide FF receptors as therapeutic targets. *Drugs Future* (2006) **31**:1–7. doi:10.1358/dof.2006.031.07.1007143
6. Elhabazi K, Humbert J-P, Bertin I, Schmitt M, Bihel F, Bourguignon J-J, et al. Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPFF receptors. *Neuropharmacology* (2013) **75**:164–71. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.07.012
7. Perry SJ, Yi-Kung Huang E, Cronk D, Bagust J, Sharma R, Walker RJ, et al. A human gene encoding morphine modulating peptides related to NPFF and FMRFamide. *FEBS Lett* (1997) **409**:426–30. doi:10.1016/S0014-5793(97)00557-7
8. Vilim FS, Aarnisalo AA, Nieminen ML, Lintunen M, Karlstedt K, Kontinen VK, et al. Gene for pain modulatory neuropeptide NPFF: induction in spinal cord by noxious stimuli. *Mol Pharmacol* (1999) **55**:804–11.
9. Hinuma S, Shintani Y, Fukusumi S, Iijima N, Matsumoto Y, Hosoya M, et al. New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol* (2000) **2**:703–8. doi:10.1038/35036326
10. Liu Q, Guan XM, Martin WJ, McDonald TP, Clements MK, Jiang Q, et al. Identification and characterization of novel mammalian neuropeptide FF-like peptides that attenuate morphine-induced antinociception. *J Biol Chem* (2001) **276**:36961–9. doi:10.1074/jbc.M105308200
11. Bonini JA, Jones KA, Adham N, Forray C, Artymyshyn R, Durkin MM, et al. Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF. *J Biol Chem* (2000) **275**:39324–31. doi:10.1074/jbc.M004385200
12. Elshourbagy NA, Ames RS, Fitzgerald LR, Foley JJ, Chambers JK, Szekeres PG, et al. Receptor for the pain modulatory neuropeptides FF and AF is an orphan G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* (2000) **275**:25965–71. doi:10.1074/jbc.M004515200
13. Kotani M, Mollereau C, Dethieux M, Le Poul E, Brézillon S, Vakili J, et al. Functional characterization of a human receptor for neuropeptide FF and related peptides. *Br J Pharmacol* (2001) **133**:138–44. doi:10.1038/sj.bjp.0704038
14. Yang H-YT, Tao T, Iadarola MJ. Modulatory role of neuropeptide FF system in nociception and opiate analgesia. *Neuropeptides* (2008) **42**:1–18. doi:10.1016/j.nepe.2007.06.004
15. Roumy M, Zajac JM. Neuropeptide FF, pain and analgesia. *Eur J Pharmacol* (1998) **345**:1–11. doi:10.1016/S0014-2999(97)01604-X
16. Yang H-YT, Iadarola MJ. Modulatory roles of the NPFF system in pain mechanisms at the spinal level. *Peptides* (2006) **27**:943–52. doi:10.1016/j.peptides.2005.06.030
17. Kivipelto L, Panula P. Origin and distribution of neuropeptide-FF-like immunoreactivity in the spinal cord of rats. *J Comp Neurol* (1991) **307**:107–19. doi:10.1002/cne.903070110
18. Allard M, Rousselot P, Lombard MC, Theodosis DT. Evidence for neuropeptide FF (FLFQRamide) in rat dorsal root ganglia. *Peptides* (1999) **20**:327–33. doi:10.1016/S0196-9781(99)00039-X
19. Bonnard E, Burlet-schiltz O, Francés B, Mazarguil H, Monsarrat B, Zajac JM, et al. Identification of neuropeptide FF-related peptides in rodent spinal cord. *Peptides* (2001) **22**:1085–92. doi:10.1016/S0196-9781(01)00425-9
20. Bonnard E, Burlet-Schiltz O, Monsarrat B, Girard J-P, Zajac J-M. Identification of proneuropeptide FFA peptides processed in neuronal and non-neuronal cells and in nervous tissue. *Eur J Biochem* (2003) **270**:4187–99. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03816.x
21. Burlet-Schiltz O, Mazarguil H, Sol J-C, Chaynes P, Monsarrat B, Zajac J-M, et al. Identification of neuropeptide FF-related peptides in human cerebrospinal fluid by mass spectrometry. *FEBS Lett* (2002) **532**:313–8. doi:10.1016/S0014-5793(02)03686-4
22. Panula P, Aarnisalo AA, Wasowicz K. Neuropeptide FF, a mammalian neuropeptide with multiple functions. *Prog Neurobiol* (1996) **48**:461–87. doi:10.1016/0301-0082(96)00001-9
23. Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S. Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides* (2006) **27**:1073–86. doi:10.1016/j.peptides.2005.06.031
24. Yang H-YT, Iadarola MJ. Activation of spinal neuropeptide FF and the neuropeptide FF receptor 2 during inflammatory hyperalgesia in rats. *Neuroscience* (2003) **118**:179–87. doi:10.1016/S0306-4522(02)00931-4
25. Wu C-H, Tao P-L, Huang EY-K. Distribution of neuropeptide FF (NPFF) receptors in correlation with morphine-induced reward in the rat brain. *Peptides* (2010) **31**:1374–82. doi:10.1016/j.peptides.2010.03.036
26. Allard M, Geoffroy S, Legendre P, Vincent JD, Simonnet G. Characterization of rat spinal cord receptors to FLFQQRamide, a mammalian morphine modulating peptide: a binding study. *Brain Res* (1989) **500**:169–76. doi:10.1016/0006-8993(89)90311-9
27. Allard M, Zajac J-M, Simonnet G. Autoradiographic distribution of receptors to FLFQQRamide, a morphine-modulating peptide, in rat central nervous system. *Neuroscience* (1992) **49**:101–16. doi:10.1016/0306-4522(92)90078-G
28. Dupouy V, Zajac JM. Neuropeptide FF receptors in rat brain: a quantitative light-microscopic autoradiographic study using [125I][D-Tyr1, (NMe)Phe3]NPFF. *Synapse* (1996) **24**:282–96. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(199611)24:3<282::AID-SYN11>3.0.CO;2-Z
29. Gouardères C, Roumy M, Advokat C, Jhamandas K, Zajac JM. Dual localization of neuropeptide FF receptors in the rat dorsal horn. *Synapse* (2000) **35**:45–52. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(200001)35:1<45::AID-SYN6>3.0.CO;2-0
30. Gouardères C, Quelven I, Mollereau C, Mazarguil H, Rice SQJ, Zajac JM. Quantitative autoradiographic distribution of NPFF1 neuropeptide FF receptor in the rat brain and comparison with NPFF2 receptor by using [125I]YVP and [(125I)EYF as selective radioligands. *Neuroscience* (2002) **115**:349–61. doi:10.1016/S0306-4522(02)00419-0
31. Gouardères C, Faura CC, Zajac J-M. Rodent strain differences in the NPFF1 and NPFF2 receptor distribution and density in the central nervous system. *Brain Res* (2004) **1014**:61–70. doi:10.1016/j.brainres.2004.04.005
32. Gouardères C, Puget A, Zajac J-M. Detailed distribution of neuropeptide FF receptors (NPFF1 and NPFF2) in the rat, mouse, octodon, rabbit, guinea pig, and marmoset monkey brains: a comparative autoradiographic study. *Synapse* (2004) **51**:249–69. doi:10.1002/syn.10305
33. Gouardères C, Kar S, Zajac JM. Presence of neuropeptide FF receptors on primary afferent fibres of the rat spinal cord. *Neuroscience* (1996) **74**:21–7. doi:10.1016/0306-4522(96)00122-4
34. Lombard MC, Simonnet G, Zajac JM, Besson JM, Allard M. Distribution of neuropeptide FF (FLFQQRamide) receptors in the adult rat spinal cord: effects of dorsal rhizotomy and neonatal capsaicin. *Neuroscience* (1995) **68**:1229–35. doi:10.1016/0306-4522(95)00182-I
35. Moulédous L, Mollereau C, Zajac J-M. Opioid-modulating properties of the neuropeptide FF system. *Biofactors* (2010) **36**:423–9. doi:10.1002/biof.116
36. Fang Q, Wang Y-Q, He F, Guo J, Chen Q, Wang R. Inhibition of neuropeptide FF (NPFF)-induced hypothermia and anti-morphine analgesia by RF9, a new selective NPFF receptors antagonist. *Regul Pept* (2008) **147**:45–51. doi:10.1016/j.regpep.2007.12.007
37. Fang Q, Jiang T, Li N, Han Z, Wang R. Central administration of neuropeptide FF and related peptides attenuate systemic morphine analgesia in mice. *Protein Pept Lett* (2011) **18**:403–9. doi:10.2174/092986611794654012
38. Elhabazi K, Trigo JM, Mollereau C, Moulédous L, Zajac J-M, Bihel F, et al. Involvement of neuropeptide FF receptors in neuroadaptive responses to acute and chronic opiate treatments. *Br J Pharmacol* (2012) **165**:424–35. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01563.x
39. Simonin F, Schmitt M, Laulin J-P, Laboureyras E, Jhamandas JH, MacTavish D, et al. RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) **103**:466–71. doi:10.1073/pnas.0502090103
40. Oberling P, Stinus L, Le Moal M, Simonnet G. Biphasic effect on nociception and antinociceptive activity of the neuropeptide FF (FLFQQRamide) in the rat. *Peptides* (1993) **14**:919–24. doi:10.1016/0196-9781(93)90067-Q
41. Laurent P, Becker JA, Valverde O, Ledent C, de Kerchove d'Exaerde A, Schiffmann SN, et al. The prolactin-releasing peptide antagonizes the opioid system through its receptor GPR10. *Nat Neurosci* (2005) **8**:1735–41. doi:10.1038/nn1585
42. Lingueglia E, Deval E, Lazdunski M. FMRFamide-gated sodium channel and ASIC channels: a new class of ionotropic receptors for FMRFamide and related peptides. *Peptides* (2006) **27**:1138–52. doi:10.1016/j.peptides.2005.06.037

43. Chen C-C, Zimmer AA, Sun W-H, Hall J, Brownstein MJ. A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) **99**:8992–7. doi:10.1073/pnas.122245999
44. Voilley N, de Weille J, Mamez J, Lazdunski M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci* (2001) **21**: 8026–33.
45. Xu M, Kontinen VK, Panula P, Kalso E. Effects of (1DMe)NPYF, a synthetic neuropeptide FF analogue, in different pain models. *Peptides* (1999) **20**:1071–7. doi:10.1016/S0196-9781(99)00100-X
46. Altier N, Dray A, Ménard D, Henry JL. Neuropeptide FF attenuates allodynia in models of chronic inflammation and neuropathy following intrathecal or intracerebroventricular administration. *Eur J Pharmacol* (2000) **407**:245–55. doi:10.1016/S0014-2999(00)00668-3
47. Wei H, Panula PA, Pertovaara A. A differential modulation of allodynia, hyperalgesia and nociception by neuropeptide FF in the periaqueductal gray of neuropathic rats: interactions with morphine and naloxone. *Neuroscience* (1998) **86**:311–9. doi:10.1016/S0306-4522(98)00027-X
48. Lameh J, Bertozzi F, Kelly N, Jacobi PM, Nguyen D, Bajpai A, et al. Neuropeptide FF receptors have opposing modulatory effects on nociception. *J Pharmacol Exp Ther* (2010) **334**:244–54. doi:10.1124/jpet.109.164384
49. Jhamandas K, Milne B, Sutak M, Gouarderes C, Zajac J-M, Yang H-YT. Facilitation of spinal morphine analgesia in normal and morphine tolerant animals by neuropeptide SF and related peptides. *Peptides* (2006) **27**:953–63. doi:10.1016/j.peptides.2005.09.017
50. Quelven I, Roussin A, Zajac J. Comparison of pharmacological activities of neuropeptide FF1 and neuropeptide FF2 receptor agonists. *Eur J Pharmacol* (2005) **508**:107–14. doi:10.1016/j.ejphar.2004.12.002
51. Pertovaara A, Ostergård M, Anko M-L, Lehti-Koivunen S, Brandt A, Hong W, et al. RFamide-related peptides signal through the neuropeptide FF receptor and regulate pain-related responses in the rat. *Neuroscience* (2005) **134**:1023–32. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.04.050
52. Yamamoto T, Wada T, Miyazaki R. Analgesic effects of intrathecally administered 26RFa, an intrinsic agonist for GPR103, on formalin test and carrageenan test in rats. *Neuroscience* (2008) **157**:214–22. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.08.061
53. Yamamoto T, Miyazaki R, Yamada T, Shinozaki T. Anti-allodynic effects of intrathecally and intracerebroventricularly administered 26RFa, an intrinsic agonist for GRP103, in the rat partial sciatic nerve ligation model. *Peptides* (2011) **32**:1262–9. doi:10.1016/j.peptides.2011.03.008
54. Yamamoto T, Miyazaki R, Yamada T. Intracerebroventricular administration of 26RFa produces an analgesic effect in the rat formalin test. *Peptides* (2009) **30**:1683–8. doi:10.1016/j.peptides.2009.05.027
55. Kalliomäki M-L, Pertovaara A, Brandt A, Wei H, Pietilä P, Kalmari J, et al. Prolactin-releasing peptide affects pain, allodynia and autonomic reflexes through medullary mechanisms. *Neuropharmacology* (2004) **46**:412–24. doi:10.1016/j.neuropharm.2003.09.021
56. Spampinato S, Trabucco A, Biasiotta A, Biagioni F, Cruccu G, Copani A, et al. Hyperalgesic activity of kisspeptin in mice. *Mol Pain* (2011) **7**(7):90. doi:10.1186/1744-8069-7-90
57. Deval E, Baron A, Lingueglia E, Mazarguil H, Zajac J-M, Lazdunski M. Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability. *Neuropharmacology* (2003) **44**:662–71. doi:10.1016/S0028-3908(03)00047-9
58. Yudin YK, Tamarova ZA, Krishtal OA. Peripherally applied neuropeptide SF is equally algogenic in wild type and ASIC3^{-/-} mice. *Neurosci Res* (2006) **55**:421–5. doi:10.1016/j.neures.2006.04.011
59. Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* (2004) **73**:953–90. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073940
60. Bailey CP, Connor M. Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. *Curr Opin Pharmacol* (2005) **5**:60–8. doi:10.1016/j.coph.2004.08.012
61. Martini L, Whistler JL. The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. *Curr Opin Neurobiol* (2007) **17**:556–64. doi:10.1016/j.conb.2007.10.004
62. Christie MJ. Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol* (2008) **154**:384–96. doi:10.1038/bjp.2008.100
63. Raehal KM, Schmid CL, Groer CE, Bohn LM. Functional selectivity at the μ -opioid receptor: implications for understanding opioid analgesia and tolerance. *Pharmacol Rev* (2011) **63**:1001–19. doi:10.1124/pr.111.004598
64. Rothman RB. A review of the role of anti-opioid peptides in morphine tolerance and dependence. *Synapse* (1992) **12**:129–38. doi:10.1002/syn.890120206
65. Simonnet G, Rivat C. Opioid-induced hyperalgesia: abnormal or normal pain? *Neuroreport* (2003) **14**:1–7. doi:10.1097/00001756-200301200-00001
66. Malin DH, Lake JR, Fowler DE, Hammond MV, Brown SL, Leyva JE, et al. FMRF-NH2-like mammalian peptide precipitates opiate-withdrawal syndrome in the rat. *Peptides* (1990) **11**:277–80. doi:10.1016/0196-9781(90)90082-G
67. Devillers JP, Boissier F, Laulin JP, Larcher A, Simonnet G. Simultaneous activation of spinal antioioid system (neuropeptide FF) and pain facilitatory circuitry by stimulation of opioid receptors in rats. *Brain Res* (1995) **700**:173–81. doi:10.1016/0006-8993(95)00948-P
68. Stinus L, Allard M, Gold L, Simonnet G. Changes in CNS neuropeptide FF-like material, pain sensitivity, and opiate dependence following chronic morphine treatment. *Peptides* (1995) **16**:1235–41. doi:10.1016/0196-9781(95)02019-S
69. Gelot A, Francés B, Gicquel S, Zajac JM. Antisense oligonucleotides to human SQA-neuropeptide FF decrease morphine tolerance and dependence in mice. *Eur J Pharmacol* (1998) **358**:203–6. doi:10.1016/S0014-2999(98)00625-6
70. Lake JR, Hammond MV, Shaddox RC, Hunsicker LM, Yang HY, Malin DH. IgG from neuropeptide FF antiserum reverses morphine tolerance in the rat. *Neurosci Lett* (1991) **132**:29–32. doi:10.1016/0304-3940(91)90425-S
71. Gouarderes C, Kieffer BL, Zajac J-M. Opposite alterations of NPFF1 and NPFF2 neuropeptide FF receptor density in the triple MOR/DOR/KOR-opioid receptor knockout mouse brains. *J Chem Neuroanat* (2004) **27**:119–28. doi:10.1016/j.jchemneu.2004.01.002
72. Rothman RB, Brady LS, Xu H, Long JB. Chronic intracerebroventricular infusion of the antioioid peptide, Phe-Leu-Phe-Gln-Pro-Gln-Arg-Phe-NH₂ (NPFF), downregulates mu opioid binding sites in rat brain. *Peptides* (1993) **14**:1271–7. doi:10.1016/0196-9781(93)90187-L
73. Rothman RB, Yang HY, Long JB. Upregulation of rat brain opioid receptors by the chronic administration of morphine: possible evidence for an anti-opiate model of tolerance and dependence. *NIDA Res Monogr* (1990) **105**:264–70.
74. Malin DH, Lake JR, Hammond MV, Fowler DE, Rogillio RB, Brown SL, et al. FMRF-NH2-like mammalian octapeptide: possible role in opiate dependence and abstinence. *Peptides* (1990) **11**:969–72. doi:10.1016/0196-9781(90)90018-Z
75. Moulédous L, Frances B, Zajac J-M. Modulation of basal and morphine-induced neuronal activity by a NPFF(2) selective agonist measured by c-Fos mapping of the mouse brain. *Synapse* (2010) **64**:672–81. doi:10.1002/syn.20774
76. Tolliver BK, Sganga MW, Sharp FR. Suppression of c-fos induction in the nucleus accumbens prevents acquisition but not expression of morphine-conditioned place preference. *Eur J Neurosci* (2000) **12**:3399–406. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00214.x
77. Marchand S, Betourne A, Marty V, Dumas S, Halley H, Lassalle J-M, et al. A neuropeptide FF agonist blocks the acquisition of conditioned place preference to morphine in C57Bl/6J mice. *Peptides* (2006) **27**:964–72. doi:10.1016/j.peptides.2005.07.023
78. Kotlinska J, Pachuta A, Dylag T, Silberring J. The role of neuropeptide FF (NPFF) in the expression of sensitization to hyperlocomotor effect of morphine and ethanol. *Neuropeptides* (2007) **41**:51–8. doi:10.1016/j.npep.2006.09.048
79. Moulédous L, Froment C, Dauvillier S, Burlet-Schiltz O, Zajac J-M, Mollereau C. GRK2 protein-mediated transphosphorylation contributes to loss of function of μ -opioid receptors induced by neuropeptide FF (NPFF2) receptors. *J Biol Chem* (2012) **287**:12736–49. doi:10.1074/jbc.M111.314617
80. Rebeyrolles S, Zajac JM, Roumy M. Neuropeptide FF reverses the effect of mu-opioid on Ca²⁺ channels in rat spinal ganglion neurons. *Neuroreport* (1996) **7**:2979–81. doi:10.1097/00001756-199611250-00036
81. Roumy M, Lorenzo C, Mazères S, Bouchet S, Zajac J-M, Mollereau C. Physical association between neuropeptide FF and micro-opioid receptors as a possible molecular basis for anti-opioid activity. *J Biol Chem* (2007) **282**:8332–42. doi:10.1074/jbc.M606946200
82. Kersanté F, Moulédous L, Zajac J-M, Mollereau C. Modulation by neuropeptide FF of the interaction of mu-opioid (MOP) receptor with G-proteins. *Neurochem Int* (2010) **56**:768–73. doi:10.1016/j.neuint.2010.02.014

83. Mollereau C, Roumy M, Zajac J. Neuropeptide FF receptor modulates potassium currents in a dorsal root ganglion cell line. *Pharmacol Rep* (2011) **63**:1061–5. doi:10.1016/S1734-1140(11)70623-5
84. Mauborgne A, Bourgoin S, Poliénor H, Roumy M, Simonnet G, Zajac JM, et al. The neuropeptide FF analogue, IDMe, acts as a functional opioid autoreceptor antagonist in the rat spinal cord. *Eur J Pharmacol* (2001) **430**:273–6. doi:10.1016/S0014-2999(01)01384-X
85. Ankö M-L, Panula P. Functional modulation of human delta opioid receptor by neuropeptide FF. *BMC Neurosci* (2005) **6**(6):21. doi:10.1186/1471-2202-6-21
86. Nystedt JM, Lemberg K, Lintunen M, Mustonen K, Holma R, Kontinen VK, et al. Pain- and morphine-associated transcriptional regulation of neuropeptide FF and the G-protein-coupled NPFF2 receptor gene. *Neurobiol Dis* (2004) **16**:254–62. doi:10.1016/j.nbd.2004.02.001
87. Lombard MC, Weil-Fugazza J, Ries C, Allard M. Unilateral joint inflammation induces bilateral and time-dependent changes in neuropeptide FF binding in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord: implication of supraspinal descending systems. *Brain Res* (1999) **816**:598–608. doi:10.1016/S0006-8993(98)01242-6
88. Kontinen VK, Aarnisalo AA, Idänpään-Heikkilä JJ, Panula P, Kalso E. Neuropeptide FF in the rat spinal cord during carrageenan inflammation. *Peptides* (1997) **18**:287–92. doi:10.1016/S0196-9781(96)00287-2
89. Sun Y, Zhang X, Sun T, He N, Li J-Y, Zhuang Y, et al. The anti-inflammatory potential of neuropeptide FF in vitro and in vivo. *Peptides* (2013) **47**:124–32. doi:10.1016/j.peptides.2013.07.003
90. Betourne A, Familiades J, Lacassagne L, Halley H, Cazales M, Ducommun B, et al. Decreased motivational properties of morphine in mouse models of cancerous- or inflammatory-chronic pain: implication of supraspinal neuropeptide FF(2) receptors. *Neuroscience* (2008) **157**:12–21. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.08.045
91. Satake H, Hisada M, Kawada T, Minakata H, Ukena K, Tsutsui K. Characterization of a cDNA encoding a novel avian hypothalamic neuropeptide exerting an inhibitory effect on gonadotropin release. *Biochem J* (2001) **354**:379–85. doi:10.1042/0264-6021:3540379
92. Fukusumi S, Habata Y, Yoshida H, Iijima N, Kawamata Y, Hosoya M, et al. Characteristics and distribution of endogenous RFamide-related peptide-1. *Biochim Biophys Acta* (2001) **1540**:221–32. doi:10.1016/S0167-4889(01)00135-5
93. Ukena K, Tsutsui K. Distribution of novel RFamide-related peptide-like immunoreactivity in the mouse central nervous system. *Neurosci Lett* (2001) **300**:153–6. doi:10.1016/S0304-3940(01)01583-X
94. Yano T, Iijima N, Kakiyama K, Hinuma S, Tanaka M, Ibayashi Y. Localization and neuronal response of RFamide related peptides in the rat central nervous system. *Brain Res* (2003) **982**:156–67. doi:10.1016/S0006-8993(03)02877-4
95. Yoshida H, Habata Y, Hosoya M, Kawamata Y, Kitada C, Hinuma S. Molecular properties of endogenous RFamide-related peptide-3 and its interaction with receptors. *Biochim Biophys Acta* (2003) **1593**:151–7. doi:10.1016/S0167-4889(02)00389-0
96. Legagneux K, Bernard-Franchi G, Poncet F, La Roche A, Colard C, Fellmann D, et al. Distribution and genesis of the RFRP-producing neurons in the rat brain: comparison with melanin-concentrating hormone- and hypocretin-containing neurons. *Neuropeptides* (2009) **43**:13–9. doi:10.1016/j.npep.2008.11.001
97. Soga T, Kitahashi T, Clarke IJ, Parhar IS. Gonadotropin-inhibitory hormone promoter-driven enhanced green fluorescent protein expression decreases during aging in female rats. *Endocrinology* (2014) **155**:1944–55. doi:10.1210/en.2013-1786
98. Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* (2002) **66**:355–474. doi:10.1016/S0301-0082(02)00009-6
99. Kersanté F, Mollereau C, Zajac J-M, Roumy M. Anti-opioid activities of NPFF1 receptors in a SH-SY5Y model. *Peptides* (2006) **27**:980–9. doi:10.1016/j.peptides.2005.07.025
100. Dong X, Han S, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* (2001) **106**:619–32. doi:10.1016/S0092-8674(01)00483-4
101. Han S-K, Dong X, Hwang J-I, Zylka MJ, Anderson DJ, Simon MI. Orphan G protein-coupled receptors MrgA1 and MrgC11 are distinctively activated by RF-amide-related peptides through the Galphq11 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) **99**:14740–5. doi:10.1073/pnas.192565799
102. Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, Leprince J, Decker A, Clerens S, et al. Identification of 26RfA, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**:15247–52. doi:10.1073/pnas.2434676100
103. Fukusumi S, Yoshida H, Fujii R, Maruyama M, Komatsu H, Habata Y, et al. A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *J Biol Chem* (2003) **278**:46387–95. doi:10.1074/jbc.M305270200
104. Jiang Y, Luo L, Gustafson EL, Yadav D, Laverty M, Murgolo N, et al. Identification and characterization of a novel RF-amide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155. *J Biol Chem* (2003) **278**:27652–7. doi:10.1074/jbc.M302945200
105. Takayasu S, Sakurai T, Iwasaki S, Teranishi H, Yamanaka A, Williams SC, et al. A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) **103**:7438–43. doi:10.1073/pnas.0602371103
106. Kampe J, Wiedmer P, Pfluger PT, Castaneda TR, Burget L, Mondala H, et al. Effect of central administration of QRFP(26) peptide on energy balance and characterization of a second QRFP receptor in rat. *Brain Res* (2006) **1119**:133–49. doi:10.1016/j.brainres.2006.08.055
107. Gouardères C, Mazarguil H, Mollereau C, Chartrel N, Leprince J, Vaudry H, et al. Functional differences between NPFF1 and NPFF2 receptor coupling: high intrinsic activities of RFamide-related peptides on stimulation of [35S]GTPgammaS binding. *Neuropharmacology* (2007) **52**:376–86. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.07.034
108. Chartrel N, Alonzeau J, Alexandre D, Jeandel L, Alvear-Perez R, Leprince J, et al. The RFamide neuropeptide 26RfA and its role in the control of neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol* (2011) **32**:387–97. doi:10.1016/j.yfrne.2011.04.001
109. Baribault H, Danao J, Gupta J, Yang L, Sun B, Richards W, et al. The G-protein-coupled receptor GPR103 regulates bone formation. *Mol Cell Biol* (2006) **26**:709–17. doi:10.1128/MCB.26.2.709-717.2006
110. Bruzzone F, Lécuyer B, Alexandre D, Jégou S, Mounien L, Tollemer H, et al. Distribution of 26RfA binding sites and GPR103 mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* (2007) **503**:573–91. doi:10.1002/cne.21400
111. Zhu Y, Duan Z, Mo G, Shen C, Lv L, Chen W, et al. A novel 26RfA peptide containing both analgesic and anti-inflammatory functions from Chinese tree shrew. *Biochimie* (2014) **102**:112–6. doi:10.1016/j.biochi.2014.02.014
112. Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, et al. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* (1998) **393**:272–6. doi:10.1038/30515
113. Marchese A, Heiber M, Nguyen T, Heng HHQ, Saldivia VR, Cheng R, et al. Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* (1995) **29**:335–44. doi:10.1006/geno.1995.9996
114. Welch SK, O'Hara BE, Kilduff TS, Heller HC. Sequence and tissue distribution of a candidate G-coupled receptor cloned from rat hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* (1995) **209**:606–13. doi:10.1006/bbrc.1995.1543
115. Lin SH. Prolactin-releasing peptide. *Results Probl Cell Differ* (2008) **46**:57–88. doi:10.1007/400_2007_048
116. Kimura A, Ohmichi M, Tasaka K, Kanda Y, Ikegami H, Hayakawa J, et al. Prolactin-releasing peptide activation of the prolactin promoter is differentially mediated by extracellular signal-regulated protein kinase and c-Jun N-terminal protein kinase. *J Biol Chem* (2000) **275**:3667–74. doi:10.1074/jbc.275.5.3667
117. Langmead CJ, Szekeres PG, Chambers JK, Ratcliffe SJ, Jones DN, Hirst WD, et al. Characterization of the binding of [(125)I]-human prolactin releasing peptide (PrRP) to GPR10, a novel G protein coupled receptor. *Br J Pharmacol* (2000) **131**:683–8. doi:10.1038/sj.bjp.0703617
118. Lin SH, Arai AC, Wang Z, Nothacker HP, Civelli O. The carboxyl terminus of the prolactin-releasing peptide receptor interacts with PDZ domain proteins involved in alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor clustering. *Mol Pharmacol* (2001) **60**:916–23.
119. Craven SE, Bredt DS. PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell* (1998) **93**:495–8. doi:10.1016/S0092-8674(00)81179-4
120. Engström M, Brandt A, Wurster S, Savola J-M, Panula P. Prolactin releasing peptide has high affinity and efficacy at neuropeptide FF2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* (2003) **305**:825–32. doi:10.1124/jpet.102.047118

121. Dodd GT, Luckman SM. Physiological roles of GPR10 and PrRP signaling. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2013) **4**:20. doi:10.3389/fendo.2013.00020
122. Fujii R, Fukusumi S, Hosoya M, Kawamata Y, Habata Y, Hinuma S, et al. Tissue distribution of prolactin-releasing peptide (PrRP) and its receptor. *Regul Pept* (1999) **83**:1–10. doi:10.1016/S0167-0115(99)00028-2
123. Gauriau C, Bernard J-F. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol* (2002) **87**:251–8. doi:10.1113/eph8702357
124. Roland BL, Sutton SW, Wilson SJ, Luo L, Pyati J, Huvar R, et al. Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery. *Endocrinology* (1999) **140**:5736–45. doi:10.1210/endo.140.12.7211
125. Ma L, MacTavish D, Simonin F, Bourguignon J-J, Watanabe T, Jhamandas JH. Prolactin-releasing peptide effects in the rat brain are mediated through the Neuropeptide FF receptor. *Eur J Neurosci* (2009) **30**:1585–93. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06956.x
126. Hall JG, Duggan AW, Morton CR, Johnson SM. The location of brainstem neurones tonically inhibiting dorsal horn neurones of the cat. *Brain Res* (1982) **244**:215–22. doi:10.1016/0006-8993(82)90080-4
127. Janss AJ, Gebhart GE. Brainstem and spinal pathways mediating descending inhibition from the medullary lateral reticular nucleus in the rat. *Brain Res* (1988) **440**:109–22. doi:10.1016/0006-8993(88)91163-8
128. Ness TJ, Follett KA, Piper J, Dirks BA. Characterization of neurons in the area of the medullary lateral reticular nucleus responsive to noxious visceral and cutaneous stimuli. *Brain Res* (1998) **802**:163–74. doi:10.1016/S0006-8993(98)00608-8
129. Lee J, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* (1996) **88**:1731–7. doi:10.1093/jnci/88.23.1731
130. Kotani M, Dethoux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden J-MM, Le Poul E, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* (2001) **276**:34631–6. doi:10.1074/jbc.M104847200
131. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* (1999) **446**:103–7. doi:10.1016/S0014-5793(99)00009-5
132. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* (2001) **411**:613–7. doi:10.1038/35079135
133. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* (2001) **276**:28969–75. doi:10.1074/jbc.M102743200
134. Makri A, Pissimissis N, Lembessis P, Polychronakos C, Koutsilieris M. The kisspeptin (KiSS-1)/GPR54 system in cancer biology. *Cancer Treat Rev* (2008) **34**:682–92. doi:10.1016/j.ctrv.2008.05.007
135. Evans BJ, Wang Z, Mobley L, Khosravi D, Fujii N, Navenot J-M, et al. Physical association of GPR54 C-terminal with protein phosphatase 2A. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) **377**:1067–71. doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.108
136. Castaño JP, Martínez-Fuentes AJ, Gutiérrez-Pascual E, Vaudry H, Tena-Sempere M, Malagón MM. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? *Peptides* (2009) **30**:10–5. doi:10.1016/j.peptides.2008.07.025
137. Navenot J-M, Fujii N, Peiper SC. Activation of Rho and Rho-associated kinase by GPR54 and KiSS1 metastasis suppressor gene product induces changes of cell morphology and contributes to apoptosis. *Mol Pharmacol* (2009) **75**:1300–6. doi:10.1124/mol.109.055095
138. Navenot J-M, Fujii N, Peiper SC. KiSS1 metastasis suppressor gene product induces suppression of tyrosine kinase receptor signaling to Akt, tumor necrosis factor family ligand expression, and apoptosis. *Mol Pharmacol* (2009) **75**:1074–83. doi:10.1124/mol.108.054270
139. Lyubimov Y, Engstrom M, Wurster S, Savola J-M, Korpi ER, Panula P. Human kisspeptins activate neuropeptide FF2 receptor. *Neuroscience* (2010) **170**:117–22. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.06.058
140. Oishi S, Misu R, Tomita K, Setsuda S, Masuda R, Ohno H, et al. Activation of neuropeptide FF receptors by kisspeptin receptor ligands. *ACS Med Chem Lett* (2011) **2**:53–7. doi:10.1021/ml1002053
141. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* (2012) **92**:1235–316. doi:10.1152/physrev.00037.2010
142. Kirby HR, Maguire JJ, Colledge WH, Davenport AP. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVII. Kisspeptin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev* (2010) **62**:565–78. doi:10.1124/pr.110.002774
143. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* (2009) **21**:673–82. doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01892.x
144. Dun SL, Brailoiu GC, Parsons A, Yang J, Zeng Q, Chen X, et al. Metastin-like immunoreactivity in the rat medulla oblongata and spinal cord. *Neurosci Lett* (2003) **335**:197–201. doi:10.1016/S0304-3940(02)01191-6
145. Mi W-L, Mao-Ying Q-L, Liu Q, Wang X-W, Li X, Wang Y-Q, et al. The distribution of kisspeptin and its receptor GPR54 in rat dorsal root ganglion and up-regulation of its expression after CFA injection. *Brain Res Bull* (2009) **78**:254–60. doi:10.1016/j.brainresbull.2008.12.003
146. Herbison AE, de Tassigny X, d'Anglemont Doran J, Colledge WH. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* (2010) **151**:312–21. doi:10.1210/en.2009-0552

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 22 July 2014; paper pending published: 25 August 2014; accepted: 17 September 2014; published online: 02 October 2014.

Citation: Ayachi S and Simonin F (2014) Involvement of mammalian RF-amide peptides and their receptors in the modulation of nociception in rodents. *Front. Endocrinol.* **5**:158. doi: 10.3389/fendo.2014.00158

This article was submitted to *Neuroendocrine Science*, a section of the journal *Frontiers in Endocrinology*.

Copyright © 2014 Ayachi and Simonin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

2. Propriétés pharmacologiques et principales fonctions physiologique du système RF-amide chez les mammifères

Une grande diversité de travaux de recherche sur les RF-amide a été réalisée, et ce, sur beaucoup de domaines différents. La nécessité de mettre en commun et regrouper toutes ces informations nous a paru incontournable. Nous avons ainsi rédigé une revue dans laquelle nous traitons des connaissances actuelles sur les systèmes RF-amide chez les mammifères, de leurs découvertes jusqu'aux éventuelles implications thérapeutiques. La revue « **Rf-Amide Neuropeptides And Their Receptors In Mammals : Pharmacological Properties, Drug Development And Main Physiological Functions** » a été publiée dans « Pharmacology & Therapeutics ».

La première partie de la revue traite de la découverte des peptides RF-amide. Que ce soit à partir d'extrait de cerveau de bœuf, ou de placenta humain, en passant par le cerveau de grenouille, la revue récapitule la découverte de chacun des peptides RF-amide. Elle traite ensuite de la maturation des preprotéines nécessaires à l'obtention des peptides RF-amide matures puis décrit leur maturation impliquant les pro-protein convertases, les carboxypeptidases et peptidyl α -amidating monooxygenase qui créent l'extrémité RF-amide propre à cette famille de peptide.

Nous avons ensuite étudié les récepteurs à peptide RF-amide en abordant leurs informations structurales, la localisation chromosomique et le nombre d'exon de leurs gènes. La revue traite également des propriétés pharmacologiques des récepteurs à peptides RF-amide, en faisant le point sur les études de binding qui ont été faites et en donnant une vue d'ensemble des radioligands disponibles, mais aussi en récapitulant les affinités des différents peptides envers leurs récepteurs. Nous nous sommes ensuite penchés sur la signalisation intracellulaire induite par l'activation des récepteurs RF-amide et citons toutes les voies de signalisation provoquées par l'activation de chaque récepteur. Après avoir traité des relations structure activité/affinité, la revue fait ensuite le point sur les agonistes/antagonistes des récepteurs à peptide RF-amide développés.

Pour étudier les rôles *in vivo* de chacun des récepteurs RF-amide, nous avons récapitulé tous leurs effets décrits en fonction de leurs répercussions physiologiques, et avons ainsi classé l'information selon l'implication dans la prise alimentaire, la reproduction et la douleur. Ce récapitulatif permet de montrer que tout au long de l'évolution, les peptides RF-amide et leurs récepteurs ont conservé des rôles fondamentaux dans la reproduction et l'alimentation, tant chez les vertébrés que chez les invertébrés. Concernant l'implication du système RF-amide dans la modulation de la douleur, l'ensemble des données montre une place grandissante de chacun des peptides et récepteurs RF-amide, suggérant que le système RF-amide semble être un système neuromodulateur important. Dans cette revue, j'ai rédigé et effectué le travail bibliographique en amont de l'écriture de la partie traitant de la douleur, sous la supervision du Dr Frédéric Simonin.

II. Hypothèse et objectif du doctorat

Comme souligné par les deux revues précédentes, le système RF-amide joue un rôle important dans différentes fonctions physiologiques comme la prise alimentaire ou la reproduction, et dans la composante d'intérêt particulier ici, la douleur. Certains de ces récepteurs et peptide RF-amide sont impliqués dans la modulation de la nociception mais aussi dans les conditions chroniques de douleur inflammatoire et neuropathique. L'importance des récepteurs à peptides RF-amide ainsi démontrée, l'objectif de ma thèse a d'abord été de déterminer quels récepteurs étaient impliqués spécifiquement dans l'HIO et la tolérance analgésique et d'étudier les mécanismes responsables de leurs mises en place.

Pour aborder cette question, des travaux précurseurs de l'équipe ont étudié le phénotype des cinq lignées de souris KO NPFFR1, NPFFR2, GPR10, 54, 103a et b dans la modulation de la nociception. Ces travaux ont montré l'importance des récepteurs NPFFR1, NPFFR2, et GPR103a dans l'hyperalgésie induite par le fentanyl.

Mes travaux de thèse ont donc commencé par l'étude de l'implication des récepteurs NPFFR1, NPFFR2 et GPR103a dans la modulation de la nociception, de l'HIO et de la tolérance analgésique. Pour ces travaux de recherche, un protocole innovant permettant d'étudier les trois phénomènes a été développé au laboratoire. Nous avons ensuite publié ce protocole en tant qu'article méthodologique dans la revue « Journal of visualized experiments : JoVE ».

Par la suite, GPR103a étant un nouvel acteur encore jamais décrit comme participant à ces phénomènes, nous avons décidé de focaliser mes recherches sur le rôle de GPR103a. Le travail principal de mon doctorat s'est donc porté sur l'étude de la modulation de la nociception, de l'HIO et de la douleur inflammatoire par GPR103a et son ligand endogène le 26RFa. Ce travail a permis la rédaction de l'article « **GPR103-26RFa is a new neuromodulator system involved in neuroadaptive changes associated with chronic opioid administration and inflammatory pain** » en cours de soumission. Après avoir ainsi démontré les nombreuses implications de GPR103a dans la douleur, nous avons voulu comprendre les mécanismes cellulaires qui en sont responsables. Des travaux supplémentaires ont alors été réalisés et ont étudié les changements adaptatifs induits par le traitement chronique à la morphine, l'implication de GPR103a dans la sensibilisation latente à la douleur, et l'effet du 26RFa sur la concentration de calcium intracellulaire dans des cellules de DRG.

J'ai également contribué à un travail récemment réalisé par l'équipe de Tamas Roeszer (ULM, Allemagne) qui traite de l'implication du récepteur NPFFR2 dans le métabolisme du tissu adipeux, mais n'étant pas directement lié à la thématique de recherche de mon doctorat, cet article est fourni en annexe.

III. Matériel et méthode non cités dans les articles

A. Animaux

Toutes les expériences concernant les animaux génétiquement modifiés ont été réalisées sur des souris mâles adultes de fond génétique pur C57BL/6N (générées à l'Institut Clinique de la Souris, Strasbourg) exceptée l'expérience concernant les animaux WT et KO NPFFR1 dont les cohortes étaient constituées de mâles et de femelles. Les souris étaient âgées de 10 à 14 semaines au début du protocole, et pesaient entre 20g et 30g. Les animaux ont été habitués aux conditions d'hébergement depuis le sevrage et ont été répartis en groupe de 1 à 5 souris par cage. Les cages sont ventilées individuellement et la température ambiante de la pièce est de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. L'éclairage est programmé selon un cycle lumière/obscurité 12/12. Toutes les souris disposent d'eau et de nourriture *ad libitum*, et les tests nociceptifs ont été réalisés durant la phase éclairée du cycle. Toutes les procédures expérimentales sont conformes aux lignes directrices européennes pour le soin des animaux de laboratoire (European Communities Council Directive 86/609/ECC) et ont été approuvées par le comité d'éthique local.

B. Génération des KO NPFFR1 et NPFFR2

Les souris mutantes NPFFR1-/- ont été établies à l'ICS. Un vecteur de ciblage a été généré, il porte l'exon 4 du gène codant pour NPFFR1 Floxé et une cassette de résistance à la néomycine elle-même portant de part et d'autre des séquences FRT qui permettront sa délétion. Ce vecteur de ciblage a été introduit dans des cellules souches embryonnaires par électroporation, et les cellules dans lesquelles il y a eu recombinaison ont été sélectionnées pour leur résistance à la néomycine. Les clones dans lesquels un événement de recombinaison homologue s'est déroulé ont ensuite été identifiés par PCR et confirmés par Southern blot. Un clone positif a été implanté dans un blastocyste de souris Balb/cN puis dans une souris femelle pseudo-gestante. Les souris chimériques ainsi obtenues ont été croisées avec des souris C57Bl/6N exprimant la Flip recombinase de façon constitutive, qui va supprimer le fragment contenu entre les séquences FRT. On obtient alors des animaux chez qui la cassette de résistance à la néomycine est supprimée, et portant l'exon 4 NPFFR1 floxé que l'on croise avec des souris C57Bl/6N exprimant la Cre recombinase de façon constitutive, qui va supprimer le fragment contenu entre les séquences LoxP. On obtient ainsi des souris où l'exon 4 du gène codant pour le récepteur NPFFR1 est supprimé. Le même protocole suivi pour la génération des souris KO NPFFR1 a été utilisé pour générer les souris KO NPFFR2 et GPR103a, par l'intermédiaire de leur délétion de l'exon 4. Les animaux KO et WT utilisés dans les expériences sont issus de croisement entre hétérozygotes.

C. Hyperalgésie induite par le fentanyl

Le protocole d'étude de l'hyperalgésie induite par le fentanyl est une variante de celui d'hyperalgésie induite par la morphine décrit dans (Elhabazi et al., 2014). Il se divise en quatre parties. La première partie est une phase d'habituation des souris à

l'expérimentateur ainsi qu'à être manipulées. Dans la deuxième partie du protocole, en utilisant le test d'immersion de la queue (Tail Immersion Test, TIT), le seuil nociceptif thermique des animaux est mesuré sur plusieurs jours, et ce jusqu'à ce qu'il soit stable. Dans la troisième partie du protocole, les animaux reçoivent quatre injections de fentanyl séparées de 15 min (4 x 60µg/kg s.c.). Puis l'analgésie induite par le fentanyl est suivie toutes les 60 min jusque 240 min après injections. Dans la dernière partie du protocole, le seuil nociceptif des souris va à nouveau être mesuré quotidiennement, et ce, sur cinq jours, et la baisse significatif de celui-ci sera représentatif de l'hyperalgésie développée.

D. Symptôme de sevrage

Le protocole de sevrage à la morphine utilisé a été décrit dans (Elhabazi et al., 2012). En bref, les souris recevaient deux injections par jour (une le matin et une l'après-midi) de doses croissantes de morphine selon le planning suivant : 10-20-20-30-30-40-40-50 mg/kg s.c. et ce en 5 jours . Le cinquième jour les souris recevaient une injection de naltrexone (5mg/kg, s.c.) et leurs symptômes de sevrage étaient scorés en prenant en compte différentes réactions (saut, diarrhée, tremblements des pattes, claquement des dents, piloérection, wet-dog shake...). Un score global est ensuite calculé en sommant les valeurs obtenues pour chaque symptômes d'après la méthode décrite par Papaleo *et al.*. A cet effet, 3 sauts ou 5 tremblements de pattes correspondaient à 1 point. Le nombre de point attribué aux autres symptômes de sevrage correspondait aux réelles valeurs absolues comptabilisées pendant le test (Papaleo and Contarino, 2006).

E. RTqPCR

Pour l'étude de la variation des taux d'ARN par RTqPCR, les animaux ont été traités quotidiennement et ce pendant 10 jours à la morphine (10mg/kg ; s.c.). Chaque jour les animaux recevaient une injection soit de saline soit de RF1156 (5mg/kg; s.c.) 20 min avant l'injection de morphine. Dix jours après le traitement, l'hyperalgésie induite par la morphine était maximale, et les animaux ont été euthanasiés puis la moelle épinière lombaire ainsi que les DRG ont été prélevés et placés dans un volume adapté de RNAlater en cohérence avec les instructions du fournisseur. Les ARN totaux ont ensuite été extraits à partir des échantillons biologiques avec un kit RNeasyLipid (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. En bref, les tissus ont été lysés à l'aide d'un Potter dans 1ml (moelle) ou 0.5 ml (DRG) de tampon de lyse à température ambiante, contenant du phénol/guanidine. Le sel de guanidine a pour effet de dénaturer totalement les RNases pour empêcher la dégradation de l'ARN. Les ARN totaux ont été extraits par le Qiazol selon la procédure décrite dans le kit. L'ARN pur concentré est élué dans 30µL d'eau ARNase free.

Une étape de reverse transcriptase a ensuite été faite avec le kit Maxima First Strand ADNc Synthesis (Thermo Scientific) en suivant les indications du fournisseur. Pour normaliser les différences de concentration d'ARN des différents échantillons, 100ng de matrice d'ARN

ont été utilisés dans chaque réaction. En bref, le mélange réactionnel contenait 2µL de Mix1 : 1µL de 10x dsDNAse Buffer et 1µL dsDNAse, 100ng d'ARN, complété par de l'eau RNase free jusqu'à un volume total de 10µL ; incubation à 37°C pendant 2 min ; rajout de 10µL de Mix2 : 4µL 5x reaction mix, 2µL Maxima enzyme mix, 4µL d'eau RNase free ; incubation 25°C pendant 10 min, 50°C pendant 15 min, 85°C pendant 5 min ; volume total final 20µL. Les aliquots d'ADNc sont conservés à -20°C.

Les ADNc ainsi produit ont ensuite été quantifiés par RTqPCR avec l'appareil StepOnePlus (AppliedBiosystems) à l'aide du Kapa SYBR FastqPCR Master Mix (Kapabiosystems). Les paramètres du cycle thermique recommandés par le fabricant ont été utilisés: 95 ° C pendant 3 min puis 40 cycles [95 ° C pendant 20 secondes; 60 ° C pendant 30 sec]. La composition du mix était: 1µL d'ADNc, 5µL Kappa Master mix, 0.2µL d'amorce Reverse (10µM) et 0.2µL d'amorce Forward (10µM), 3.6µL d'eau RNase free, pour un volume final de 10µL.

Une analyse de la qualité des ARN a également été faite avec le Bioanalyzer. La qualité de l'ARN est évaluée par spectrophotométrie en utilisant le Nanodrop (Thermo Scientific). Les concentrations d'ARN ainsi que les rapports d'absorbance A260/A280 et A260/A230 ont été mesurés. Les échantillons sont également analysés par électrophorèse à l'aide du Bioanalyseur (2100 Agilent technologies). Cet appareil indique le rapport ARN ribosomal (ARNr) 28S/18S et l'intégrité de l'ARN (RIN). Un ARN de haute qualité devrait afficher un rapport de A260/A280 d'environ de 2, un rapport A260/A230 > 2, un rapport ARNr 28S/18S >1,5 et un RIN > 7.

L'expression des gènes d'intérêts a été normalisée par la β-actine. Les données ont été analysées au moyen d'un procédé de comparaison de seuil des cycles (Ct) pour la quantification relative ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Une courbe de fusion ADN double-brin a été réalisée à la fin de la PCR [95 ° C, 20 sec; 65 ° C, 1 min; jusqu'à 95 ° C par incréments de 0,3 ° C toutes les 15 sec] pour vérifier qu'il n'y avait que l'amplification d'un seul fragment.

Les amorces utilisées pour la qPCR ont été achetées chez Sigma, leurs séquences respectives sont représentées dans le Tableau 1. Les amorces ont été validées au laboratoire auparavant par analyse de la courbe standard, courbe d'efficacité et courbe de fusion.

Tableau 1- Liste des amorces utilisées en qPCR

	Sequence (5'-3')
Actine	GACGGCCAGGTCATCACTAT
	CCACCGATCCACACAGAGTA
MOR	GAGCCACAGCCTGTGCCCT
	CGTGCTAGTGGCTAAGGCATC
DOR	GCTCGTCATGTTTGGCATC
	AAGTACTTGGCGCTCTGGAA
KOR	CCTGGCATCATCTGTTGGTA
	GGAAACTGCAAGGAGCATTC

PENK	AGCCAGGACTGCGCTAAAT
	AGGCAGCTGTCCTTCACATT
Pdyn	ATGATGAGACGCCATCCTTC
	TTAATGAGGGCTGTGGGAAC
POMC	ATGCCGAGATTCTGCTACAGT
	TCCAGCGAGAGGTCGAGTTT
NPFFR1	CCACAACCCTCGTGGACAAC
	CCTGTACCAAGCCGCTCAT
NPFFR2	GCTTCCGTCTTCACCTTGGTT
	ATCACAATCGTGACAAAGGCT
103a	CCCGAAGGGCTTTCACAATCT
	CCCACTCTTCCAAACAGCAG
103b	TGATGGTGACAGTCGTGGTT
	AGCAAAAATCATCTTGATTGTGA
GPR54	CTGGTCGGAAACTCATTGGT
	GTAGAGGAGTGCGGTGAAGG
GPR10	AGGGGTTGATCGTGATGCTG
	TTGCCAATGAGGAAGTTGGTC
NPFF	TGGACACACCTAGAAGGAGCC
	CCTGCGGATTTAGCTGTTCC
NPVF	TCACAGCAAAGAAGGTGACG
	CAGGGGCTGGACTCATCTTA
Kiss	TCCTCTGTGTCGCCACCTATG
	CTTTTCCCAGGCATTAACGAGT
QRFP	TCTGCCGTCCTTACCATCTCA
	TCTCAGGACTGTCCCAAAGGAG

F. Cultures de ganglions rachidiens.

Les souris âgées de 6-10 semaines ont été anesthésiées avec un mélange de ketamine (75 mg/kg) et de xylazine (5 mg/kg) par injection intraperitoneale et mises à mort par décapitation. Les ganglions des étages lombaires L4-L6 ont été prélevés et déposés dans une solution de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, Na₂HPO₄ 1,42 mM pH 7,4).

Après retrait des racines avec un scalpel sous loupe binoculaire, les ganglions ont été rincés avec du PBS et incubés dans du PBS contenant de la trypsine (0.5 g/L, Seromed, Vienne, Autriche) et de la collagénase (1 g/L, Sigma) durant 25 min à 37°C.

La dissociation enzymatique a été stoppée en ajoutant du milieu de culture. Le milieu de culture était composé de MEM- α , de sérum de cheval inactivé par la chaleur (10% v/v), de pénicilline (50 IU·m/L, Gibco) et de streptomycine (50 IU·m/L, Gibco). La dissociation mécanique a été effectuée par trituration à l'aide d'un pipetman P1000. Après une

centrifugation (5 min, 500 rpm), les cellules des DRG sont récupérées dans le culot, resuspendues dans 100 μ l de milieu de culture etensemencées. Les cellules sontensemencées sur des boîtes à fond de verre fabriquées au laboratoire à partir de boîtes de pétri de 35 mm (Corning) et traitées la nuit précédant la culture avec de la poly-L lysine (10 mg/mL, Sigma). Les cultures sont maintenues en atmosphère saturée en eau (95% air, 5% CO₂) à 37°C durant 24-48h.

G. Imagerie du calcium

Durant les expériences, les cellules ont été perfusées en permanence avec une solution saline contenant : NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1mM, glucose 10 mM, HEPES 5mM, pH 7.4. En plus de cette perfusion générale de la boîte de culture, le champ imagé était perfusé avec un système de perfusion locale permettant un changement rapide de la solution perfusée. Avant l'expérience, les cellules étaient chargées avec du Fura-2 par une incubation de 60 minutes à température ambiante avec 2 μ M de Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2/AM; Molecular Probes) et 0.001% (w/v) d'acide pluronique (Molecular Probes). Les cellules ont été rincées trois fois avec la solution saline avant et après le chargement de la sonde. La mesure de fluorescence de cellules individuelles a été effectuée sur un microscope inversé (Axiovert 35; Zeiss) avec un objectif à immersion à huile $\times$ 40 (Fluor 40, NA 1.30, Nikon) et un système d'acquisition comprenant une caméra CCD refroidie (CoolSnap HQ, Photometrics) commandée avec un logiciel d'acquisition dédié (Imaging Workbench 4.0 Software, Axon Instruments). L'excitation a été alternativement réalisée à 350 et 380 nm avec une roue porte filtre lambda-10 (Sutter Instruments) et la lumière émise au-dessus de 520 nm a été collectée. Les paires d'images ont été acquises toutes les 2 s. Le calcium libre intracellulaire est représenté sous forme de rapport de fluorescence mesuré aux deux longueurs d'onde d'excitation (ratio F350/F380), calculé après soustraction du bruit de fond. Toutes les expériences ont été réalisées à 34°C.

IV. Résultats

A. Assessment of Morphine-induced Hyperalgesia and Analgesic Tolerance in Mice Using Thermal and Mechanical Nociceptive Modalities

Khadija Elhabazi, Safia Ayachi, Brigitte Ilien, Frédéric Simonin

L'hyperalgésie induite par les opioïdes et la tolérance analgésique ont un impact important sur l'efficacité clinique des opiacés comme analgésiques chez les animaux et chez l'Homme. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces deux phénomènes ne sont pas encore bien compris et la conception de protocoles expérimentaux appropriés faciliterait leurs études.

Nous avons développé un protocole pour induire, enregistrer et quantifier l'hyperalgésie induite par la morphine ainsi que pour mettre en évidence la tolérance analgésique, en utilisant les tests d'immersion de queue (Tail Immersion Test, TIT) et le test de pression de la queue (Tail Pressure Test, TPT). Ce protocole a été publié dans la revue « Journal of visualized experiments : JoVE » sous forme d'article méthodologique, lui-même accompagné d'une vidéo (<http://www.jove.com/video/51264>) décrivant l'ensemble de la procédure.

Le protocole est divisé en cinq étapes. Les deux premières phases sont celles d'habituation des souris à l'expérimentateur et aux tests nociceptifs, puis celles de quantification des seuils basaux thermique et mécanique. Dans la troisième phase, l'administration chronique de morphine induit une hyperalgésie significative, mise en évidence par une augmentation de la sensibilité thermique et mécanique. Dans la quatrième phase du protocole, la comparaison des suivis cinétiques de l'analgésie obtenue chez les souris naïves à ceux obtenus après un traitement chronique à la morphine indique clairement le développement d'une tolérance manifestée par une diminution de l'analgésie. Ce protocole peut être adapté de manière similaire aux souris génétiquement modifiées afin d'évaluer le rôle des gènes cibles dans la modulation de la nociception et de l'analgésie morphinique. Ce protocole peut également être utilisé pour étudier l'efficacité d'agents thérapeutiques potentiels pour améliorer l'efficacité des analgésiques opiacés. Dans cet article méthodologique, j'ai réalisé l'ensemble des expériences et ai contribué à la rédaction ainsi qu'au tournage de la vidéo.

Video Article

Assessment of Morphine-induced Hyperalgesia and Analgesic Tolerance in Mice Using Thermal and Mechanical Nociceptive Modalities

Khadija Elhabazi¹, Safia Ayachi¹, Brigitte Ilien¹, Frédéric Simonin¹

¹Biotechnology and Cellular Signalling, UMR 7242 CNRS, Université de Strasbourg

Correspondence to: Frédéric Simonin at simonin@unistra.fr

URL: <http://www.jove.com/video/51264>

DOI: [doi:10.3791/51264](https://doi.org/10.3791/51264)

Keywords: Neuroscience, Issue 89, mice, nociception, tail immersion test, tail pressure test, morphine, analgesia, opioid-induced hyperalgesia, tolerance

Date Published: 7/29/2014

Citation: Elhabazi, K., Ayachi, S., Ilien, B., Simonin, F. Assessment of Morphine-induced Hyperalgesia and Analgesic Tolerance in Mice Using Thermal and Mechanical Nociceptive Modalities. *J. Vis. Exp.* (89), e51264, doi:10.3791/51264 (2014).

Abstract

Opioid-induced hyperalgesia and tolerance severely impact the clinical efficacy of opiates as pain relievers in animals and humans. The molecular mechanisms underlying both phenomena are not well understood and their elucidation should benefit from the study of animal models and from the design of appropriate experimental protocols.

We describe here a methodological approach for inducing, recording and quantifying morphine-induced hyperalgesia as well as for evidencing analgesic tolerance, using the tail-immersion and tail pressure tests in wild-type mice. As shown in the video, the protocol is divided into five sequential steps. Handling and habituation phases allow a safe determination of the basal nociceptive response of the animals. Chronic morphine administration induces significant hyperalgesia as shown by an increase in both thermal and mechanical sensitivity, whereas the comparison of analgesia time-courses after acute or repeated morphine treatment clearly indicates the development of tolerance manifested by a decline in analgesic response amplitude. This protocol may be similarly adapted to genetically modified mice in order to evaluate the role of individual genes in the modulation of nociception and morphine analgesia. It also provides a model system to investigate the effectiveness of potential therapeutic agents to improve opiate analgesic efficacy.

Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/51264/>

Introduction

Opioid-induced hyperalgesia (OIH) and analgesic tolerance limit the clinical efficacy of opiates in animals and humans¹⁻³. The involvement of pro-inflammatory^{4,5} or of pro-nociceptive (anti-opioid)^{6,7} systems are currently explored hypotheses. The elucidation of the mechanisms underlying OIH and tolerance necessitates a combination of *in vivo* and *in vitro* approaches, using appropriate animal models, experimental protocols and molecular tools.

Behavioral pharmacology is the dominant paradigm to monitor and quantify analgesic and hyperalgesic states in laboratory animals (rats, mice). The application of a noxious stimulus (thermal, mechanical or chemical) to a convenient body part (hindpaw, tail) of the animal leads to a nocifensive withdrawal that can be easily scored.

We propose here a methodological approach for inducing, recording and quantifying OIH and tolerance in wild-type mice, using the tail-immersion and tail pressure tests. The procedure allows an easy, sensitive and reproducible determination of thermal and mechanical nociceptive response values in mice. As demonstrated in the video protocol, C57BL/6 mice experience significant hyperalgesia following chronic morphine administration and maintain this for several days. Both thermal and mechanical nociceptive values are significantly reduced, compared to baseline measurements on naïve animals. Moreover, our experimental set-up allows to monitor, in addition to the development of OIH, the decline of the analgesic response to morphine (tolerance). Presented data support the view that hyperalgesia and tolerance may involve common cellular and molecular mechanisms^{8,9}, although this is disputed in the literature^{1,10-12}. Finally, this protocol may be similarly adapted to genetically modified mice in order to evaluate the role of individual genes in the modulation of pain. It also provides a model system to evaluate the effectiveness of potential therapeutic agents to improve opiate analgesic effects.

Protocol

All experiments were carried out in strict accordance with the European guidelines for the care of laboratory animals (European Communities Council Directive 86/609/ECC) and the ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals¹³. Male C57BL/6N Tac mice (10 weeks, 25 - 30 g) were housed in an institutional animal facility with a care staff in charge of operating the facility in compliance with environmental standards. Animals were housed in groups (maximum five mice per cage) under a 12 hr / 12 hr light / dark cycle at a constant

temperature (21 ± 1 °C) with free access to food and water. All experiments were performed at the same period of the day (10:00 am to 4:00 pm) using a cohort of 16 mice. Specific materials and equipment are indicated in the Materials table.

A five-step procedure to monitor morphine induced-hyperalgesia and tolerance

The protocol is divided into five sequential steps (A-E) over a duration of 15 days **Figure 1**.

1. Mice Handling (Step A; d-7 to d-5)

1. Handle mice and habituate them to freely enter into the restrainer. This preliminary step reduces stress - thus minimizing any confusion with stress-induced analgesia - and allows the animals to be accustomed to the investigator, handling and manipulation into the mouse restrainer. Each mouse is gently handled for 5 min every day.

2. Basal Nociceptive Response (Step B; d-4 to d-1)

1. Measure tail withdrawal latencies using the Tail Immersion Test (TIT):
 1. Set the thermostat to 48 °C.
 2. Gently introduce the mouse into the restrainer. Dip the protruding 2/3 end of its tail into the water bath and start the chronometer.
 3. Stop the chronometer as soon as the mouse withdraws its tail from the hot water and record the latency time (in sec). In the absence of any nociceptive reaction, a 25 sec cut-off is used to prevent tissue damage.
 4. Replace the mouse in its cage and test the next one until the end of the series.
 5. Repeat the nociceptive response measurements two more times, taking measurements from the animals in the same order. The nociceptive response latency (sec) for each mouse is determined as the mean value for three successive determinations.
2. Measure mechanical responses using the Tail Pressure Test (TPT)
 1. Gently introduce the mouse into the restrainer and position its tail under the conic tip of the analgesimeter.
 2. Press the foot-switch to apply uniformly increasing pressure onto the proximal part of the tail until the first nociceptive reaction (struggling, squeaking) occurs. At the moment the animal reacts, record the current force (in grams) that elicits the nociceptive response. In the absence of any reaction, a 600 g cut-off value is used to avoid tissue damage.
 3. Repeat this measure on the median and distal parts of the tail of the same mouse. An interval of at least 30 sec is observed between measures on a given mouse to avoid adaptation or stress bias. Replace the mouse in its cage and test the next animal until the end of the series (*i.e.* all mice are tested). The nociceptive value (grams) for each mouse is taken as the mean value for three measurements (*i.e.* proximal, median and distal parts of the tail of each animal).
3. Repeat nociceptive testing (all the procedures outlined under step 2) on subsequent days, d-3 to d-1.

3. Measurement of Morphine Analgesia (Step C; d0)

1. Define the best combination of animals that allows the selection of two groups ($n=8$ per group) of mice with stable and comparable average nociceptive values, whichever nociceptive modality (TIT or TPT) is considered. This value will be taken as the basal nociceptive response of reference for future 'Saline' and 'Morphine' groups.
2. Measure the body weight of each animal.
3. Prepare a morphine solution (0.5 mg morphine per ml) in sterile physiological saline (NaCl 0.9%) for subcutaneous administration (5 mg morphine per kg of animal's body weight).
4. Measure the nociceptive response latency (taken as time point 0) for each mouse of both 'Saline' and 'Morphine' groups in the TIT (all steps under 2.1 above). Then measure nociception in the TPT (all steps under 2.2 above).
5. Inject subcutaneously morphine (typically 0.25 ml of a 0.5 mg/ml morphine solution per 25 g mouse weight) and saline (0.25 ml per 25 g mouse weight) to the 'morphine' and 'saline' groups, respectively.
6. Measure nociceptive values on the TIT and TPT (all procedures outlined above under steps 2.1 and 2.2, respectively) over a time-course (at 30 min interval) to assess morphine (5 mg/kg)-induced analgesia:
 1. After 30 min post-injection, measure the nociceptive response (single determination) for each mouse of the 'Saline' and 'Morphine' groups, using the TIT then the TPT.
 2. Then measure nociceptive response values (TIT and TPT) in all mice at time points (in hr): 1-1.5-2-2.5-3 and 3.5 post-injection.

4. Chronic Morphine Treatment - Morphine-induced Hyperalgesia (Step D; d1 to d6)

1. On Day: d1
 1. Measure nociceptive response values on the TIT and TPT as described above (steps 2.1 and 2.2). Carefully annotate withdrawal latencies and pressure limits for each animal.
 2. Prepare a fresh morphine solution as detailed in step 3.2.
 3. Inject subcutaneously morphine (5 mg/kg b.w.) to the entire 'Morphine' group and physiological saline (0.25 ml per 25 g mouse weight) to the 'Saline' group. Let the animals rest until the next day.
2. On Days: d2, d3, d4, d5 and d6 repeat the operations described under Section 4.1

5. Evidence for Analgesic Tolerance (Step E; d7)

1. Evaluate morphine-induced analgesia according to the time-course paradigm already detailed in Section 3.

6. Data Acquisition and Statistical Analyses

1. Assessment of Basal Nociceptive Response Values (Step B)
 1. Calculate for each day (over the d-4 to d-1 period) the mean $\pm$ SEM values ($n=8$) for basal nociceptive responses as afforded from TIT and TPT within the 'Saline' and 'Morphine' groups.
 2. Plot mean basal nociceptive values as a function of time (day) for both groups **Figure 2**.
2. Analysis of Morphine Analgesia Time-course at Days d0 (Step C) and d7 (Step E)
 1. Calculate, at each time point after morphine injection, the mean $\pm$ SEM values ($n=8$) for nociceptive responses as afforded from TIT (in sec) and TPT (in g) in each group.
 2. Plot mean nociceptive response values as a function of time for the 'Saline' and 'Morphine' groups at day 0 **Figure 3** and day 7 **Figure 5**.
3. Development of Morphine-induced Hyperalgesia (Step D)
 1. Calculate for each day (over the d0-d7 treatment period) the mean $\pm$ SEM values ($n=8$) for basal nociceptive response values as afforded from TIT and TPT within the 'Saline-treated' and 'Morphine-treated' groups.
 2. Plot mean basal nociceptive response values as a function of time (day) for the 'Saline-treated' and 'Morphine-treated' groups **Figure 4**.
4. Evidence for Analgesic Tolerance (Steps C and E)
 1. Determine from the morphine time-course experiment performed at d0 **Figure 3** the time value (or time range) required for morphine to induce a maximal analgesic response.
 2. Take this value (usually 30 min) as the reference time to estimate at d7 **Figure 5** the nociception baseline value (saline-treated group) and the actual analgesic response (morphine-treated group) to acute morphine.
 3. Nociceptive values taken at time point 30 min from morphine time-course experiments performed at d0 and d7 for the saline-treated and morphine-treated groups, are presented as histograms **Figure 6**.
 4. Statistics: Analyze data using one-way repeated measures ANOVA. The factors of variation were treatment (between subjects) and time (within subject). To check differences separately in each group, repeated measures ANOVA was performed. Comparisons between two groups were performed using unpaired *t*-test or paired *t*-test when appropriate.
5. The Level of Significance is Set at $P<0.05$. All Statistical Analyses are Carried out using the STATview Software.

Representative Results

Assessment of Basal Nociceptive Values of Naïve Mice (Step B)

TIT and TPT were sequentially applied to the whole cohort of mice ($n=16$), providing mean nociceptive response values. Best combination of animals allowed an *a posteriori* definition of two groups ($n=8$) of mice, referred to as Saline and Morphine, which display similar and stable basal nociceptive values **Figure 2**. The equivalence of both groups is valid whatever the nociceptive test (TIT: **Figure 2A**; TPT : **Figure 2B**) that was selected.

Time-course for Morphine Analgesia at Day 0 (Step C)

Morphine analgesia was evaluated following a single injection (s.c.) of morphine (5 mg/kg) in naïve mice using both TIT **Figure 3A** and TPT **Figure 3B**. In both tests, statistical analyses with one way repeated measures ANOVA reveal that there is a significant interaction between treatment and time for TIT ($F_{(7, 98)} = 72$, $p<0.001$) and TPT ($F_{(7, 98)} = 31$, $p<0.001$). TIT and TPT data analyses using repeated measures ANOVA indicate that there is no effect of saline injection ($F_{(7, 49)} = 0.49$, $p>0.05$) and $F_{(7, 49)} = 1.85$, $p>0.05$ respectively for TIT and TPT tests), whereas morphine injection induces a strong analgesia in mice ($F_{(7, 49)} = 92.46$, $p<0.001$) and $F_{(7, 49)} = 34.37$, $p<0.001$ respectively for TIT and TPT tests). The maximal analgesic effect of morphine was reached after 30 min in TIT and after 60 min in TPT as compared to saline-injected controls ($p<0.001$, unpaired *t*-test).

Repeated Morphine Administrations Induces Hyperalgesia in Mice (Step D)

Basal nociceptive values were measured every day before saline or morphine administration (see protocol). As shown in **Figure 4**, once daily morphine administrations over a 6 days treatment period induced a significant and progressive lowering of thermal ($F_{(7, 56)} = 11.6$, $p<0.001$, repeated measures ANOVA; **Figure 4A**) and mechanical ($F_{(7, 56)} = 15.55$, $p<0.001$, repeated measures ANOVA; **Figure 4B**) basal nociceptive values. Hyperalgesia developed rapidly as it started to be significant at day 1 in TIT ($p<0.01$, unpaired *t*-test, compared to saline-injected controls) and at day 2 in TPT ($p<0.05$, unpaired *t*-test, compared to saline-injected controls).

Time-course for Morphine Analgesia at Day 7, after Chronic Morphine Treatment (Step E)

On day 7, mice that received daily morphine or saline injections over a 7-day period (d0 to d6) were examined in TIT **Figure 5A** and TPT **Figure 5B** first for their basal nociceptive values and then for their analgesic response to acute morphine (5 mg/kg, sc.). In agreement with the development of hyperalgesia shown in **Figure 4**, the basal nociceptive value (time 0) of mice that were chronically treated with morphine was significantly lower than that of saline-injected control mice ($p<0.001$, unpaired *t*-test). Following acute morphine, the nociceptive response of the

chronic morphine-treated group significantly increased, but only slightly exceeded the basal nociceptive value of saline-injected control mice measured at 30 min in TIT and TPT ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, unpaired t -test, respectively) and at 60 min in TIT ($p < 0.05$; unpaired t -test). From 2 hr after morphine treatment until the end of experiment, nociceptive responses returned to lower values than those of control mice ($p < 0.001$, unpaired t -test).

Comparison of Maximum Analgesic Responses of Mice to Morphine before (Day 0) and after Chronic Morphine Treatment (Day 7).

Nociceptive threshold values presented in **Figure 6** are from TIT (**A**) and TPT (**B**) performed 30 min after saline or morphine injection as illustrated in **Figures 3** (day 0) and **5** (day 7). A strong decrease in morphine analgesia was observed in mice after chronic morphine treatment for 7 days in comparison with their initial analgesia response at day 0 in both nociceptive tests ($p < 0.001$ paired t -test). These data demonstrate that tolerance did develop in pain hypersensitive animals.

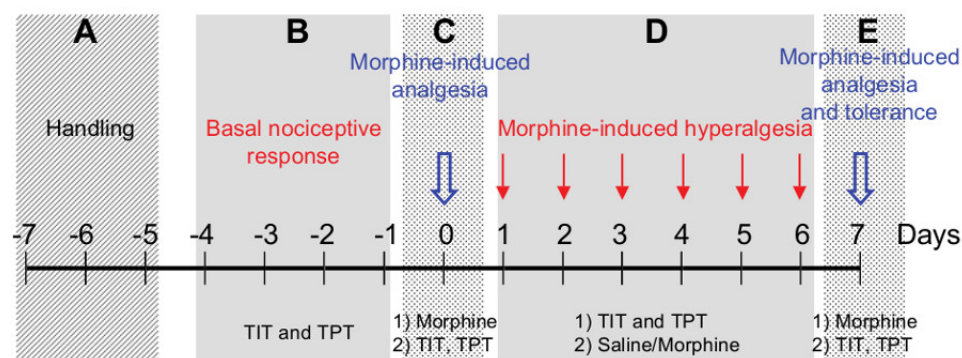


Figure 1. A five-step procedure to monitor morphine induced-hyperalgesia and tolerance. The protocol is divided into five sequential steps (A-E) over a total duration of 15 days.

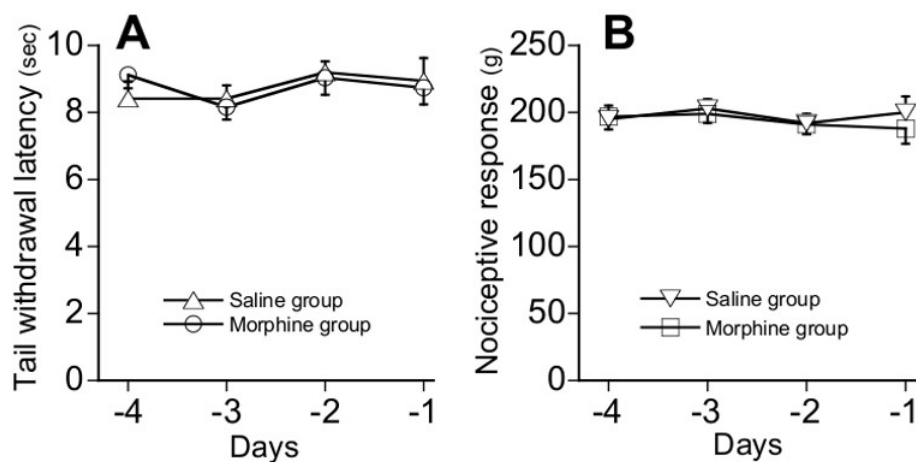


Figure 2. Definition of the basal nociceptive response values (Step B; d-4 to d-1). The tail immersion (TIT) (**A**) and tail pressure (TPT) (**B**) tests are applied to the whole series of animals in order to evaluate their basal nociceptive values. Thereafter, two groups of mice ($n=8$), referred to as 'Saline' and 'Morphine' groups, are defined so that they exhibit stable and comparable average nociceptive values, whatever the nociceptive modality that is considered.

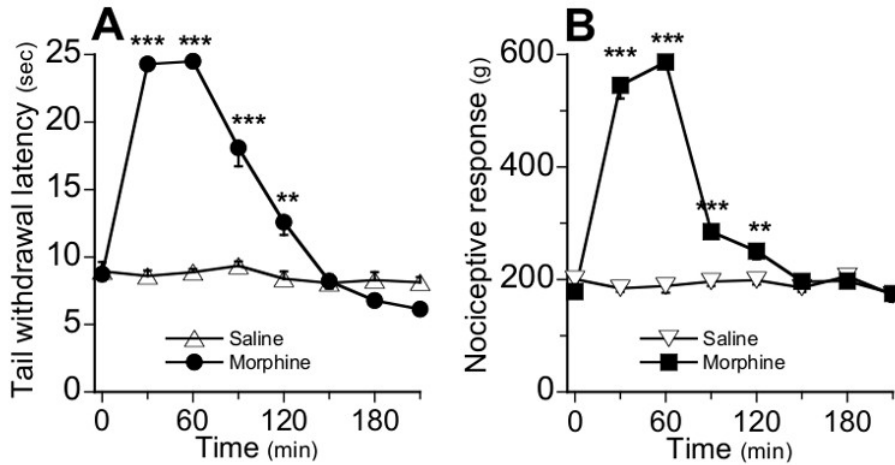


Figure 3. Time-course for morphine analgesia at day 0 (Step C) in TIT (A) and TPT (B). The basal nociceptive response value of mice was determined every 30 min after single morphine (5 mg/kg, sc.) or saline injections. Data are expressed as means $\pm$ SEM, $n=8$ mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, unpaired t -test as compared to control group.

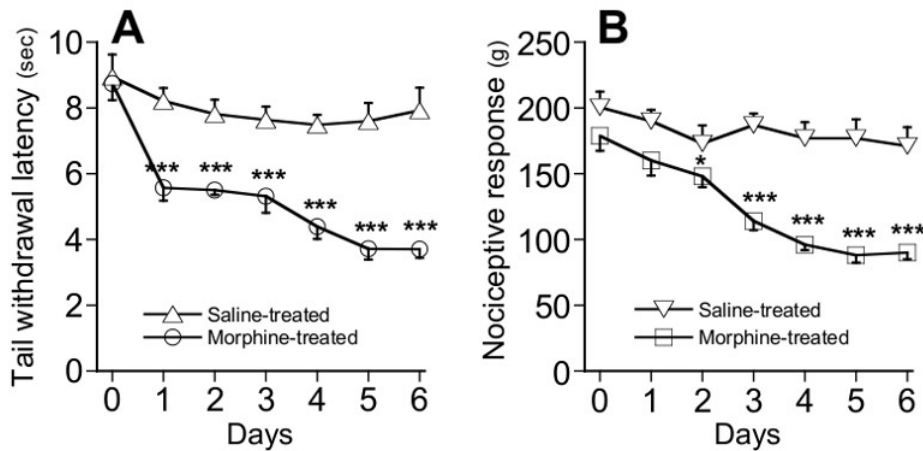


Figure 4. Development of hyperalgesia following repeated morphine administration (Step D; d1 to d6). The basal nociceptive value of mice was determined by TIT (A) and TPT (B) once daily before morphine (5 mg/kg, sc.) or saline administration. Data are expressed as mean values $\pm$ SEM, $n=8$ mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ by unpaired t -test as compared with the saline-treated control group.

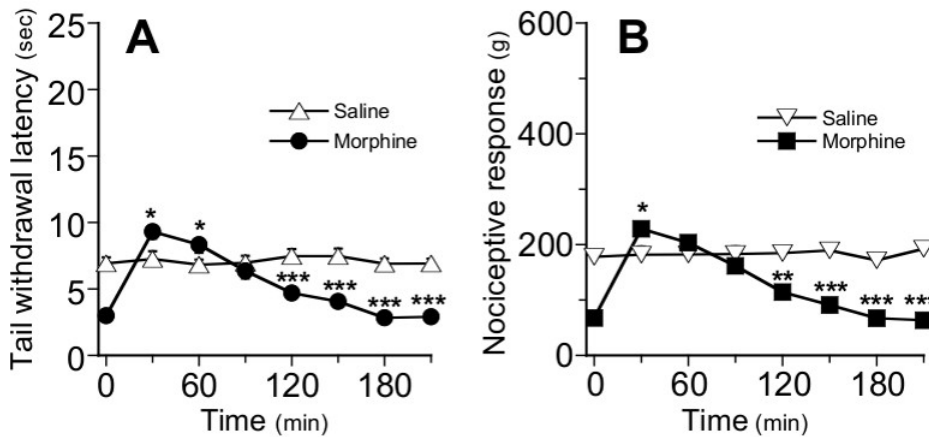


Figure 5. Time-course for morphine analgesia in chronic-morphine treated mice at day 7 (Step E) in TIT (A) and TPT (B). Mice that were chronically treated with morphine (black dots) or saline (white triangles) from day 0 to day 6, received on day 7 a single injection of morphine (5 mg/kg, sc.) or saline, respectively. The nociceptive response of mice was determined every 30 min after morphine or saline injection. Data are expressed as means $\pm$ SEM, $n=8$ mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by unpaired t -test as compared with the saline-treated control group. Error bars that do not exceed symbols size are hidden.

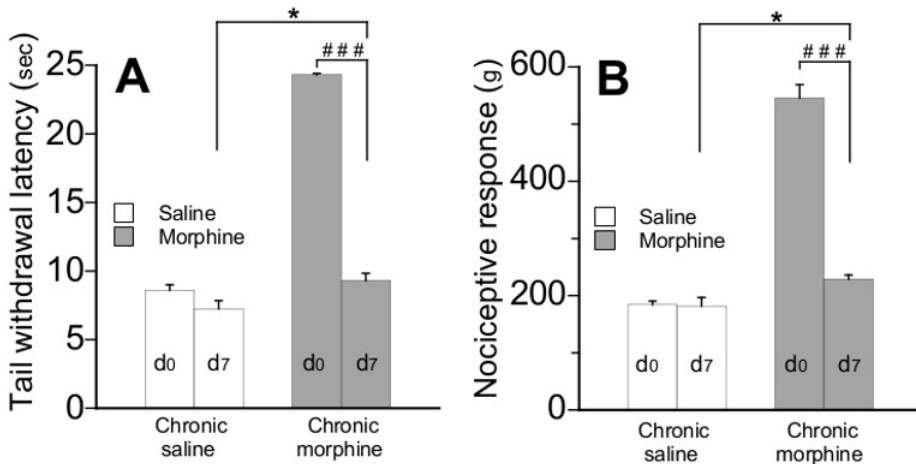


Figure 6. Comparison of maximum analgesic responses of mice to morphine (5 mg/kg, sc.) before (day 0) and after chronic morphine treatment (day 7). Values reported here are from experiments shown in Figure 3 and Figure 5. Nociceptive values were measured using TIT (A) and TPT (B) 30 min after morphine or saline injection. Data are expressed as means $\pm$ SEM, $n=8$ mice per group. *** $P < 0.001$ by paired t -test.

Discussion

Critical Steps

Choice of the animal model for nociception measurements

Variability in nociceptive and analgesic sensitivity among mice strains has been examined (reviews¹⁴⁻¹⁶) reviews using various pain models differing in their etiology (nociceptive, inflammatory, neuropathic), modality (thermal, chemical, mechanical), duration (acute, tonic, chronic) and site of administration (cutaneous, subcutaneous, visceral). When compared to other strains, C57BL/6J ("J" for Jackson Laboratory) mice became a popular animal model for pain studies as they exhibit a high basal nociceptive sensitivity^{17,18} and a moderate analgesic response to opiates^{14,19}. Following chronic morphine treatment, they also develop significant analgesic tolerance^{20,21}, hyperalgesia^{21,22} and dependence^{20,23}.

Here, experiments were performed on C57BL/6N Tac mice ("N" for National Institute of Health and "Tac" for Taconics farm) which belong to a separate branch of the B6 lineage. Although C57BL/6 mice have been long considered as interchangeable, recent studies pointed to significant behavioral differences among C57BL/6J and C57BL/6N strains²⁴. In particular, the lower sensitivity of the three C57BL/6N substrains (including the Tac one) to acute thermal pain may be regarded as an advantage for testing this phenotype.

Male mice were selected as the vast majority of pain studies, using mice as the animal model, are performed on juvenile males²⁵. In our hands, they provided robust and reproducible data when examined from the analgesia or hyperalgesia points of view. Occasionally, we noticed a tendency for C57BL/6N females to provide more variable responses, both in the TIT and TPT tests. Although this observation may reflect natural

variations linked to the hormonal status of females, overall mechanisms underlying sex differences in pain and analgesia still remain a matter of controversy. Some aspects of this hot debate will be briefly presented in the next 'Limitations of the technique' section.

Animal habituation

Mice were first allowed to get accustomed to the animal facility during one week. Similar to any other behavioral study, testing was performed following a 3 day-acclimatization period (**Figure 1**, step A). As nociceptive tests are sensitive to stress, first measures may give longer latencies than subsequent ones, especially in non-habituated mice^{26,27}. The habituation step allows also the obtention of more stable nociceptive response values within the same day and between days **Figures 2** and **4**. To reduce circadian effects on nociceptive and analgesic sensitivity^{28,29}, all testings were conducted between 10:00 am and 4:00 pm.

Selection of nociceptive tests

Nociceptive tests use either thermal, mechanical, chemical or electrical stimuli (review^{26,27,30}). Their choice is critical as different nociceptive modalities may be processed through different nociceptors and fibers^{18,31,32}.

We selected the tail immersion test (TIT)³³, a modified version of the classical tail flick test developed by D'amour and Smith³⁴, and the tail pressure test (TPT), adapted from Randall and Selitto³⁵, as examples of thermal and mechanical modalities to study morphine-induced analgesia, hyperalgesia and tolerance in mice. Both tests have been widely used in rats. A cut off time was systematically defined to avoid or limit the risk of tissue damage.

Morphine-induced analgesia, hyperalgesia and tolerance

Morphine, the prototypical mu-opiate agonist, was selected here as it is a potent analgesic and OIH-inducer, both in humans and mice^{1,2,36}. Morphine analgesic potency is known to vary with mice strains, routes of administration and nociceptive modalities. In C57BL/6 mice, reliable analgesia is usually obtained following subcutaneous injections of morphine in the 1-20 mg/kg dose range^{14,21}. Accordingly, we chose to study acute analgesia following a single administration (s.c.) of morphine at 5 mg/kg, close to its ED₅₀ value (7-20 mg/kg) assessed from thermal nociception^{19,21}.

Repeated morphine administration is often accompanied with analgesic tolerance (evidenced either from a rightward shift of the dose-response curve or from a decrease in analgesic response amplitude or duration) and hyperalgesia (an exacerbated sensitivity to painful stimuli evidenced from a decrease in basal nociceptive value). Both adverse phenomena depend on rodent strains, on the nature of the opiate compound which is selected and its dosage, on treatment duration and on nociceptive modalities²¹. For example, experimental paradigms to study tolerance and hyperalgesia consist in daily administration of high and constant (20 to 40 mg/kg per day)²² or of escalating (up to 50 or even 200 mg/kg)^{20,21} morphine doses. Accordingly, we promoted the development of hyperalgesia and tolerance in C57BL/6 mice through daily morphine administration (5 mg/kg; s.c.) over a 8-day period. This moderate morphine dose was preferred over higher ones to better mimic clinic usage.

Set up of TIT operational window

A possible pitfall in TIT might be related to the role of the tail in the thermoregulation of rodents^{26,37}. As ambient temperature is a key factor in nociceptive response variations, it should be kept constant (here at 21 °C) throughout experiments³⁸. Heat intensity is usually set up to detect a nociceptive response within 5 to 10 sec²⁷. Indeed, greater latencies may increase the risk for monitoring animal movements unrelated to the nociceptive stimulus, whereas shorter ones may reduce the differential power of the test. We performed TIT measurements at a fixed temperature of 48 °C. Tail withdrawal latencies were close to 9 sec (basal nociceptive value) and varied from 4 sec (hyperalgesia) to 25 sec (maximal analgesia; cut off). In addition to practical reasons, measurements of nociceptive response values at a fixed temperature may a priori involve the same repertoire of nociceptors and circuits, thereby facilitating data interpretation.

Possible Modifications

Optimization of the TIT operational window for analgesia and OIH measurements

When focusing on an analgesic response, low baseline values (higher heat intensity) may favor the detection of a delay in the response. In turn, to address the consequence of a painful stimulus or the development of OIH, higher baseline values (lower heat intensity; here 48 °C) may facilitate the detection of faster responses **Figure 4**.

Although we found morphine at 5 mg/kg a convenient dose to induce a robust analgesic response **Figure 3** and to promote (upon repeated administration) significant hyperalgesia **Figure 4**, its dosage may be adapted as mentioned before (Critical step : Morphine-induced analgesia, hyperalgesia and tolerance). For example, lower doses may be used to reduce analgesia amplitude (thereby avoiding cut-off limitations) whereas higher doses may be chosen to accelerate hyperalgesia onset and increase its amplitude.

Overall, optimization of the 'nociceptive window' should be adapted to the genetic background of mice under study and take into account the possibility for the involvement of distinct arrays of nociceptors and circuits.

Alternative opiate agonists (fentanyl, remifentanyl)

Although most clinically used opiates target the mu-opioid receptor as agonists, they differ considerably with respect to their pharmacological properties both *in vitro* and *in vivo*. For example, remifentanyl and fentanyl, in marked contrast with morphine, behave as full agonists and promote internalization of mu-opioid receptors³⁹. Opiate analgesics such as morphine and fentanyl have half-lives in the range of hours⁴⁰, while remifentanyl has an ultra-short half life of several minutes⁴¹. In humans, best evidence for OIH is from patients who received opiates during surgery, including short-acting compounds such as remifentanyl^{2,42}. Thus, fentanyl and remifentanyl may be valuable tools too to study the development of hyperalgesia and tolerance in mice, under TIT and TPT paradigms.

Alternative modes of induction of OIH (chronic vs acute administration)

OIH is seen in humans and animal models as a consequence of opiate administration, whether at very low or extremely high dosages^{1,2}. We report here on OIH development following chronic treatment of mice with moderate doses of morphine. Several days of treatment of C57BL/6N mice were necessary to evidence a clear and reproducible hyperalgesic state **Figure 4**. Daily morphine injections could be adequately replaced with implanted morphine pellets : upon their removal, both thermal hyperalgesia and mechanical allodynia have been already reported in mice⁴³. Infusion of opiates through a micro-osmotic pump is another possibility⁴⁴. In rodents, long-lasting hyperalgesia is also achievable following acute administration of fentanyl using a protocol mimicking the use of this mu-opioid agonist in human surgery^{36,45,46}.

Limitations of the Technique

Animal species and models for pain

Comparative studies of numerous mouse strains provided evidence for great variations in nociceptive responses to painful stimuli^{17,31,47} and in OIH levels following 4-days morphine treatment²². Whether mechanisms underlying pain processing and modulation in animal models (mice and rats) are relevant for chronic pain patients remains a fundamental and opened question. Thus, much caution should be paid to the interpretation of animal data and to their predictive validity for humans¹⁶.

Sex differences in pain and analgesia

Most preclinical studies on animal models for pain have been conducted on male rodents^{16,25,48}. Despite this selection bias, the emerging view was to consider males as better responders to opiate analgesics^{49,50}, less prone to develop opioid-induced hyperalgesia^{51,52} and more tolerant to morphine analgesia⁵³ than their female counterparts (review⁵⁴). However, sex differences with regard to nociception and analgesic drugs efficacy do not resume in such 'a one size fits all' paradigm. Indeed, a wealth of data now indicates that numerous variables may influence the magnitude and direction of sex differences such as opioid drug efficacy and selectivity, nociceptive assay, genetic background, age, gonado-hormonal status or social interaction^{48,54}. In humans, clinical pain is more prevalent in women but whether this fact reflects actual sex differences remains a matter of debate^{48,55,56}. For example, global analysis of fifty clinical trials indicated no significant differences in analgesic properties between genders whereas meta-analyses performed on patients-controlled subjects pointed to a significantly greater opioid efficacy in women⁵⁷. The latter observation, which markedly contrasts with what has been found in rodents, again raises several questions regarding the origin for such divergences^{16,48,55,57}. Altogether, sex differences in analgesia do exist and merit further focus on underlying mechanisms and clinical implications.

About nociceptive tests

The tail withdrawal test is a spinal reflex but it may be subject to supraspinal influences⁵⁸. TIT is relatively easy to perform on rats but requires more expertise in mice. A potential difficulty is to maintain the mouse in a correct posture without inducing unwanted stress. The proposed protocol may be adjusted according to cohort size. 16 animals (8 control and 8 treated) are easily managed as far as measurement of their basal nociceptive response values (using TIT first, then TPT for the whole series of mice) is under concern. Monitoring analgesia time courses requires the establishment of a precise time schedule and the evaluation of the maximal number of animals that may be tested (TIT first, then TPT) within the imparted time interval (here 30 min). The whole cohort of animals may thus be divided into subgroups to allow the experimenter to respect kinetic limitations.

Significance of the Technique with respect to Existing / Alternative Methods

OIH in rats versus mouse

Rats have been extensively used to study opioid analgesia, hyperalgesia and tolerance, following acute or chronic opiate administration^{46,59-61}. Indeed, for several practical reasons, they may be considered superior to mice as an animal model for pain experiments^{16,61}. However, until recently, the generation of genetically modified rats was not a straightforward procedure. As numerous genetically modified mouse strains are already available, our model offers the opportunity to study the contribution of numerous individual genes in OIH and tolerance development in mice.

TIT and TPT versus other nociceptive tests

TIT is a variant of the tail flick test, the most obvious difference being the area of stimulation. In contrast with radiant heat, immersion of the tail into hot water leads to a quick and uniform increase in its temperature. Compared to other forms of thermal nociception testing (hot-plate or Hargreaves tests), TIT provides fairly reproducible results both across and within subjects.

TPT is a very popular test for the study of mechanical nociception^{26,27,35} which probably involves distinct nociceptive fibers and molecular transducers than TIT³². It provides quick and reliable measurements⁵⁹ but requires some expertise from the experimenter and large animal cohorts. As an alternative to the analgesimeter used in the present study, other procedures or apparatus relying on strain gauges do exist (review²⁷). TPT is best suited for studying mechanical hyperalgesia whereas von Frey filaments are usually taken to evaluate mechanical allodynia (review²⁷).

Future Applications or Directions after Mastering this Technique

The experimental OIH/tolerance model we present here may be similarly adapted to genetically modified mice in order to evaluate the role of individual genes in the modulation of pain. It also provides a model system to investigate the effectiveness of potential therapeutic agents to relieve chronic pain.

Disclosures

The authors declare that they have no competing financial interests.

Acknowledgements

We thank Dr. J.-L. Galzi (UMR7242 CNRS; Illkirch, France) for his support.

This work was supported by the CNRS, INSERM, Université de Strasbourg, Alsace BioValley and by grants from Conectus, Agence National de la Recherche (ANR 08 EBIO 014.02) Conseil Régional d'Alsace (Pharmadol), Communauté Urbaine de Strasbourg (Pharmadol), ICFRC (Pharmadol), OSEO (Pharmadol), Direction Générale des Entreprises (Pharmadol).

References

1. Angst, M. S., & Clark, J. D. Opioid-induced hyperalgesia. A qualitative systematic review. *Anesthesiology*. **104**, 570-587 (2006).
2. Chu, L. F., Angst, M. S., & Clark, D. Opioid-induced hyperalgesia in humans. Molecular mechanisms and clinical considerations. *Clin. J. Pain*. **24**, 479-496 (2008).
3. Lee, M., Silverman, S., Hansen, H., Patel, V., & Manchikanti, L. A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. *Pain Physician*. **14**, 145-161 (2011).
4. Hutchinson, M. R., Shavit, Y., Grace, P. M., Rice, K. C., Maier, S. F., & Watkins L. R. Exploring the neuroimmunopharmacology of opioids: An integrative review of mechanisms of central immune signaling and their implications for opioid analgesia. *Pharmacol. Rev.* **63**, 772-810 (2011).
5. Wang, X. *et al.* Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**, 6325-6330 (2012).
6. Colpaert, F. C. System theory of pain and of opiate analgesia: No tolerance to opiates. *Pharmacol. Rev.* **48**, 355-402 (1996).
7. Simonnet, G., & Rivat, C. Opioid-induced hyperalgesia: abnormal or normal pain? *NeuroReport*. **14**, 1-7 (2003).
8. Mao, J., Sung, B., Ji, R. R., & Lim, G. Chronic morphine induces downregulation of spinal glutamate transporters: implications in morphine tolerance and abnormal pain sensitivity. *J. Neurosci.* **22**, 8312-8323 (2002).
9. King, T., Ossipov, M. H., Vanderah, T. W., Porreca, F., & Lai, J. Is paradoxical pain induced by sustained opioid exposure an underlying mechanism of opioid antinociceptive tolerance? *Neurosignals*. **14**, 194-205 (2005).
10. DuPen, A., Shen, D., & Ersek, M. Mechanisms of opioid-induced tolerance and hyperalgesia. *Pain Management Nursing*. **8**, 113-121 (2007).
11. Chu, L. F. *et al.* Analgesic tolerance without demonstrable opioid-induced hyperalgesia : A double-blinded, randomized, placebo-controlled trial of sustained-release morphine for treatment of chronic nonradicular low-back pain. *Pain*. **153**, 1583-1592 (2012).
12. Ferrini, F. *et al.* Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl⁻ homeostasis. *Nature Neurosci.* **16**, 183-192 (2013).
13. Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain*. **16**, 109—110 (1983).
14. Mogil, J. S. The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 7744-7751 (1999).
15. Mogil, J. S. *et al.* Screening for pain phenotypes : Analysis of three congenic mouse strains on a battery of nine nociceptive tests. *Pain*. **126**, 24-34 (2006).
16. Mogil, J. S. Animal models of pain : progress and challenges. *Nature Rev. Neurosci.* **10**, 283-294 (2009).
17. Mogil, J. S. *et al.* Heritability of nociception I : Responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain*. **80**, 67-82 (1999).
18. Larivière, W. R. *et al.* Heritability of nociception. III. Genetic relationships among commonly used assays of nociception and hypersensitivity. *Pain*. **97**, 75-86 (2002).
19. Elmer, G. I., Pieper, J. O., Negus, S. S., & Woods, J. H. Genetic variance in nociception and its relationship to the potency of morphine-induced analgesia in thermal and chemical tests. *Pain*. **75**, 129-140 (1998).
20. Eidelberg, E., Erspamer, R., Kreinick, C. J., & Harris, J. Genetically determined differences in the effects of morphine on mice. *Eur. J. Pharmacol.* **32**, 329— 36 (1975).
21. Kest, B., Hopkins, E., Palmese, C. A., Adler, M., & Mogil, J. S. Genetic variation in morphine analgesic tolerance: A survey of 11 inbred mouse strains. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **73**, 821-828 (2002).
22. Liang, D.-Y., Liao, G., Wang, J., Usuka, J., Guo, Y., Peltz, G., & Clark, J. D. A genetic analysis of opioid-induced hyperalgesia in mice. *Anesthesiology*. **104**, 1054-1062 (2006).
23. Kest, B., Palmese, C. A., Hopkins, E., Adler, M., Juni, A., & Mogil, J. S. Naloxone-precipitated withdrawal jumping in 11 inbred mouse strains : Evidence for common genetic mechanisms in acute and chronic morphine physical dependence. *Neurosci.* **115**, 463-469 (2002).
24. Bryant, C. D. *et al.* Behavioral differences among C57BL/6 substrains : Implications for transgenic and knockout studies. *J. Neurogenet.* **22**, 315-331 (2008).
25. Mogil, J. S., & Chanda, M. L. The case for the inclusion of female subjects in basic science studies of pain. *Pain*. **117**, 1-5 (2005).
26. Le Bars, D., Gozariu, M., & Cadden, S. W. Animal models of nociception. *Pharm. Rev.* **53**, 597-652 (2001).
27. Barrot, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neurosci.* **211**, 39-50 (2012).
28. Kavaliers, M., & Hirst, M. Daily rhythms of analgesia in mice: effects of age and photoperiod. *Brain Res.* **279**, 387-393 (1983).
29. Castellano, C., Puglisi-Allegra, S., Renzi, P., & Oliverio, A. Genetic differences in daily rhythms of pain sensitivity in mice. *Pharmacol. Biochem. & Behavior*. **23**, 91-92 (1985).
30. Sandkühler, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol. Rev.* **89**, 707-758 (2009).
31. Mogil, J. S. *et al.* Heritability of nociception II. 'Types' of nociception revealed by genetic correlation analysis. *Pain*. **80**, 83-93 (1999).
32. Scherrer, G. *et al.* Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell*. **137**, 1148—1159 (2009).
33. Janssen, P. A. J., Niemegeers, C. J. E., & Dony, J. G. H. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex. *Arzneimittelforsch.* **13**, 502—507 (1963).

34. Amour, F. E., & Smith, D. L. A method for determining loss of pain sensation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **72**, 74–79 (1941).
35. Randall, L. O., & Selitto, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **111**, 409–419 (1957).
36. Elhabazi, K. *et al.* Involvement of neuropeptides FF receptors in neuroadaptive responses to acute and chronic opiate treatments. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 424–435 (2012).
37. Berge, O.-G., Garcia-Cabrera, I., & Hole, K. Response latencies in the tail-flick test depend on tail skin temperature. *Neurosci. Lett.* **86**, 284–288 (1988).
38. Benoist, J.-M., Pinedé, I., Ballantyne, K., Plaghi, L., & Le Bars, D. Peripheral and central determinants of a nociceptive reaction: An approach to psychophysics in the rat. *PLoS ONE*. **3**, e3125 (2008).
39. Morgan, M.M., & Christie, M.J. Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *Br. J. Pharmacol.* **164**, 1322–1334 (2011).
40. Trescot, A. M., Datta, S., Lee, M., & Hansen, H. Opioid pharmacology. *Pain Physician*. **11**, S133–S153 (2008).
41. Egan, T. D. *et al.* The pharmacokinetics of the new short-acting opioid remifentanyl (GI87084B) in healthy adult male volunteers. *Anesthesiology*. **79**, 881–892 (1993).
42. Hansen, E. G., Duedahl, T. H., Rømsing, J., Hilsted, K. L., & Dahl, J. B. Intra-operative remifentanyl might influence pain levels in the immediate post-operative period after major abdominal surgery. *Acta Anaesthesiol Scand.* **49**, 1464–1470 (2005).
43. Li, X., Angst, M. S., & Clark, J. D. A murine model of opioid-induced hyperalgesia. *Mol. Brain Res.* **86**, 56–62 (2001).
44. Varnado-Rhodes, Y., Gunther, J., Terman, G. W., & Chavkin, C. Mu opioid analgesia and analgesic tolerance in two mouse strains: C57BL/6 and 129/SvJ. *Proc. West Pharmacol. Soc.* **43**, 15–17 (2000).
45. Celerier, E. *et al.* Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: preventive effect of ketamine. *Anesthesiology*. **92**, 465–472 (2000).
46. Celerier, E., Simonnet, G., & Maldonado, R. Prevention of fentanyl-induced delayed pronociceptive effects in mice lacking the protein kinase C gamma gene. *Neuropharmacol.* **46**, 264–272 (2004).
47. Larivière, W.R., Chesler, E.J., & Mogil, J.S. Transgenic studies of pain and analgesia: Mutation or background phenotype? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**, 467–473 (2001).
48. Mogil, J. S. Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nature Rev. Neurosci.* **13**, 859–866 (2012).
49. Kest, B., Wilson, S. G., & Mogil, J. S. Sex differences in supraspinal morphine analgesia are dependent on genotype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 1370–1375 (1999).
50. Kest, B., Sarton, E., & Dahan, A. Gender differences in opioid-mediated analgesia. *Anesthesiology*. **93**, 539–547 (2000).
51. Holtman, J. R., & Wala, E. P. Characterization of morphine-induced hyperalgesia in male and female rats. *Pain*. **114**, 62–70 (2005).
52. Juni, A. *et al.* Sex differences in hyperalgesia during morphine infusion: effect of gonadectomy and estrogen treatment. *Neuropharmacol.* **54**, 1264–1270 (2008).
53. Craft, R. M. *et al.* Sex differences in development of morphine tolerance and dependence in the rat. *Psychopharmacol.* **143**, 1–7 (1999).
54. Bodnar, R. J., & Kest, B. Sex differences in opioid analgesia, hyperalgesia, tolerance and withdrawal: central mechanisms of action and roles of gonadal hormones. *Hormones Behav.* **58**, 72–81 (2010).
55. Greenspan, J. D. *et al.* Studying sex and gender differences in pain and analgesia: A consensus report. *Pain*. **132**, S26–S45 (2007).
56. Fillingim, R. B., & Ness, T. J. Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **24**, 485–501 (2000).
57. Niesters, M. *et al.* Do sex differences exist in opioid analgesia? A systematic review and meta-analysis of human experimental and clinical studies. *Pain*. **151**, 61–68 (2010).
58. Millan, M. J. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* **66**, 355–474 (2002).
59. Celerier, 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.* **21**, 4074–4080 (2001).
60. Simonin, F. *et al.* RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 466–471 (2006).
61. Wilson, S. G., & Mogil, J. S. Measuring pain in the (knockout) mouse: big challenges in a small mammal. *Behav. Brain Res.* **125**, 65–73 (2001).

B. Implications des récepteurs à peptide RF-amide dans l'hyperalgésie induite par le fentanyl

Pour déterminer quels récepteurs RF-amide sont spécifiquement impliqués dans l'HIO, nous avons généré des animaux KO pour chacun des récepteurs RF-amide et nous avons décidé d'étudier l'hyperalgésie induite par le fentanyl chez chacune de ces lignées.

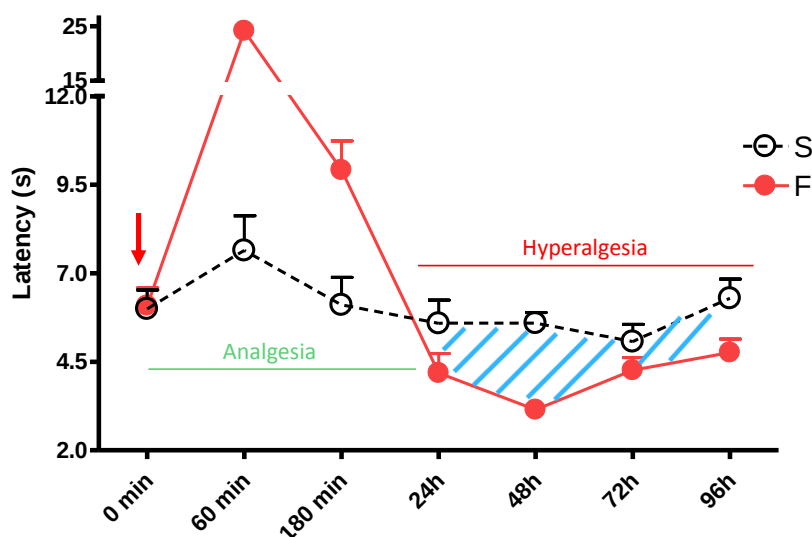


Figure 6-Analgésie et hyperalgésie induite par le fentanyl

L'effet d'une injection de fentanyl (flèche rouge, $4 \times 60 \mu\text{g/kg}$, s.c.) sur le seuil nociceptif thermique des souris est suivi en fonction du temps grâce au TIT. L'injection de fentanyl induit dans un premier temps une analgésie, puis une hyperalgésie. Les hachures bleues illustrent l'aire sous la courbe (AUC) qui sera utilisée dans la suite du travail pour exprimer l'hyperalgésie.

Comme montré dans la Figure 6, chez les WT, à court terme l'injection de fentanyl induit une analgésie qui est suivie dès le lendemain et jusqu'à 96h après injection d'une hyperalgésie. Pour faciliter la comparaison des résultats des différentes lignées de souris, l'hyperalgésie sera exprimée en aire sous la courbe (AUC).

Ce même protocole a donc été utilisé chez les cinq lignées de souris KO comme décrit dans la partie matériel et méthode et les résultats sont illustrés Figure 7. Cette expérience a montré qu'en comparaison aux animaux WT, l'hyperalgésie induite par le fentanyl (HIF) est significativement inférieure chez les lignées KO NPFFR1, NPFFR2, et GPR103a. Il n'y a pas de différence entre l'hyperalgésie induite par le fentanyl chez les KO GPR10, GPR54 et GPR103b. C'est donc sur l'implication des récepteurs NPFFR1, NPFFR2 et GPR103a que nous avons décidé de focaliser la suite de nos recherches.

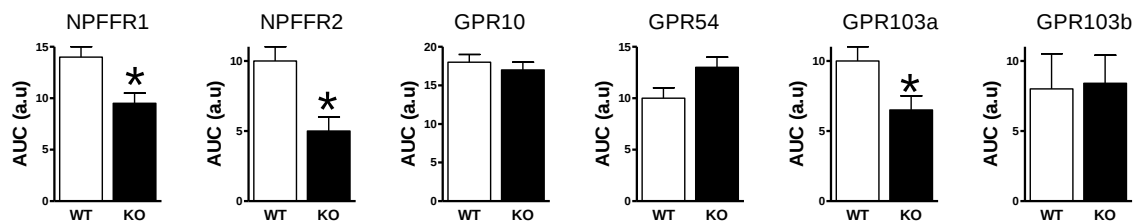


Figure 7- Hyperalgésie induite par le fentanyl chez les KO des récepteurs RF-amide

*Les animaux reçoivent une administration de fentanyl (4x60µg/kg, s.c.) puis leur seuil nociceptif thermique est mesurée quotidiennement à l'aide du TIT jusqu'à disparition de l'hyperalgésie. L'hyperalgésie développée est exprimée en AUC. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ S.E.M, n = 8-10, ***p < 0.001 test de Fisher.*

Nous avons commencé par étudier l'hyperalgésie induite par un traitement chronique à la morphine. Pour cela nous avons utilisé le protocole décrit précédemment dans « Assessment of Morphine-induced Hyperalgesia and Analgesic Tolerance in Mice Using Thermal and Mechanical Nociceptive Modalities ». C'est donc en mesurant le seuil nociceptifs des animaux tous les jours grâce au TIT et au TPT, puis en les injectant avec de la morphine (10mg/kg ; s.c.) que nous avons suivi le développement de l'hyperalgésie induite par la morphine (HIM). Les résultats concernant les animaux KO NPFFR1 seront traités ci-dessous, et seront suivit de ceux concernant les KO NPFFR2, et enfin de ceux sur les KO GPR103a.

C. Implication du récepteur NPFFR1 dans l'hyperalgésie induite par la morphine et la tolérance analgésique

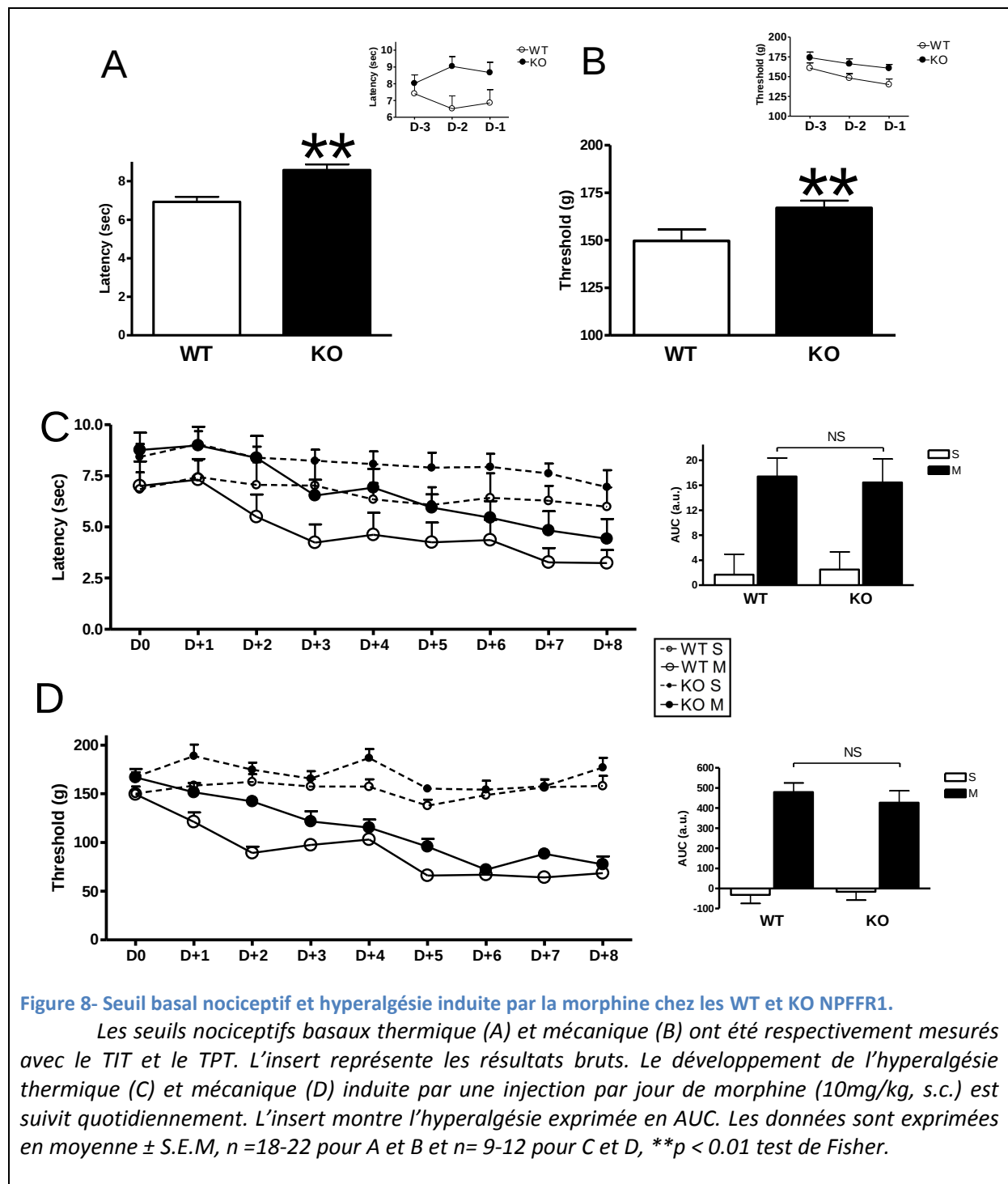
Avant de débiter l'approfondissement sur l'implication de NPFFR1 dans l'hyperalgésie induite par la morphine, nous avons étudié le phénotypage global des KO NPFFR1. Pour cela, le comportement des souris KO a été comparé à celui des WT dans treize tests comportementaux différents et une étude de leur métabolisme a également été faite. Les résultats de ce phénotypage global sont fournis en annexe (Figure 25 et Figure 26). Le comportement des KO NPFFR1 s'est révélé identique à celui des WT exceptée une légère diminution de la latence de première réaction en hot plate. Cette réponse plus rapide en hot plate suggérerait une sensibilité thermique accrue chez les KO NPFFR1, mais cette conclusion est atténuée par le fait que la latence au saut en hot plate est identique à celle des WT (Figure 25 K). De plus, les résultats en hot plate sur les premiers signes d'inconfort peuvent être représentatifs d'une réponse plus intégrée que celle observée en test d'immersion de la queue, nous avons alors continué d'étudier le rôle de NPFFR1 dans la nociception en utilisant le test d'immersion de la queue.

Nous avons d'abord étudié l'implication du récepteur NPFFR1 dans le seuil basal nociceptif, l'hyperalgésie induite par la morphine (HIM) et la tolérance analgésique.

1. Résultats

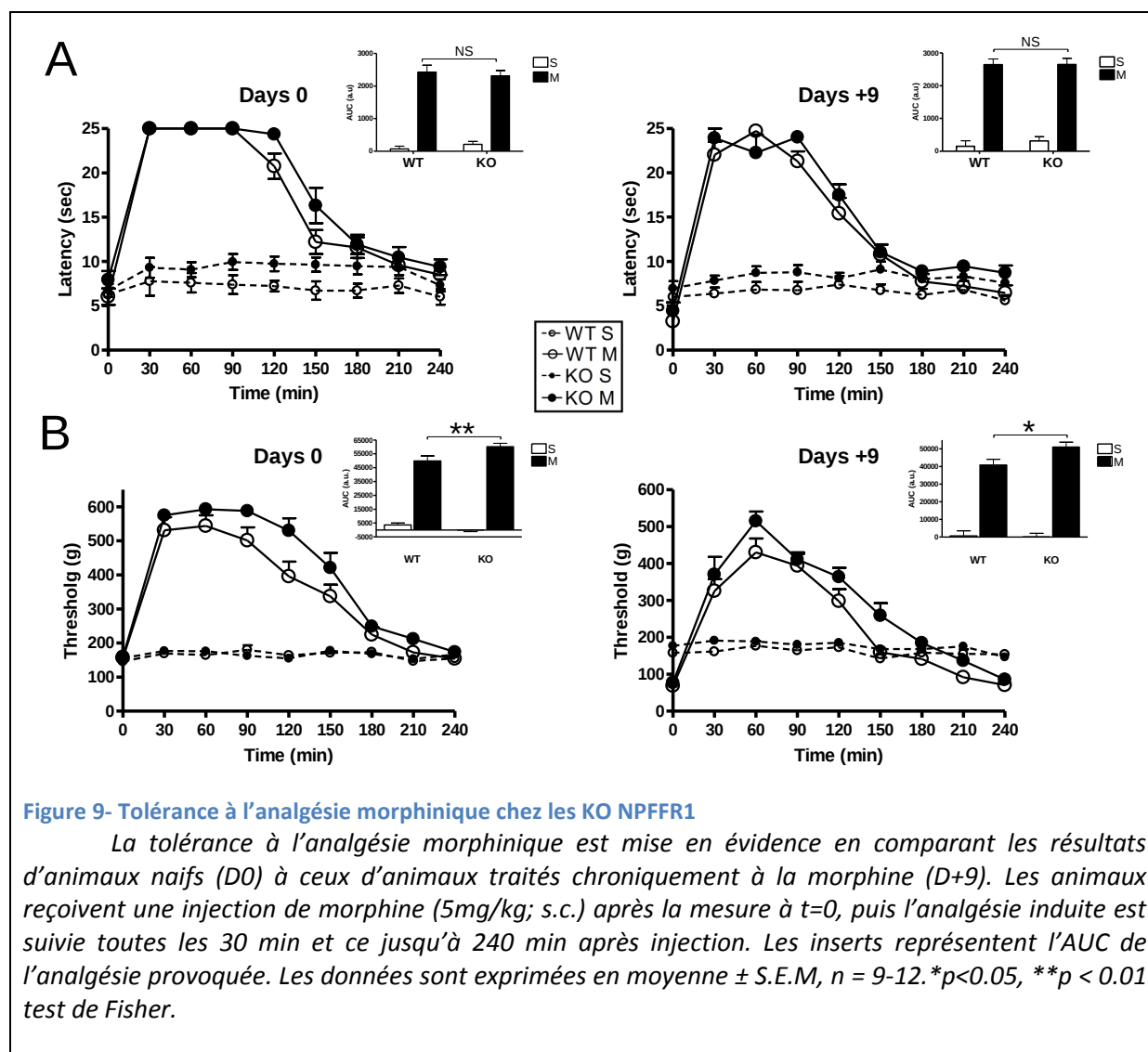
Comme montré dans la Figure 8, le seuil nociceptif basal des animaux KO NPFFR1 est légèrement supérieur à celui des animaux WT, et ce, aussi bien concernant la modalité thermique que mécanique (Figure 8 A et B ; TIT : WT=6.897±0.421, KO=8.512±0.316, Unpaired T-test, $p<0.001$; TPT : WT=149.739±3.821, KO=167.057±3.561, Unpaired T-test, $p<0.001$).

Dans la suite du protocole, les seuils nociceptifs thermiques (Figure 8 C) et mécaniques (Figure 8 D) sont suivis pendant 8 jours. Après chaque prise du seuil nociceptif, les souris reçoivent une injection de morphine (10mg/kg ; s.c.). On observe ainsi une hyperalgésie thermique et mécanique se mettre en place au fur et à mesure de l'administration de morphine. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre l'hyperalgésie développée par les animaux WT et KO.



Pour étudier la tolérance, l'analgésie produite par une injection de morphine (5mg/kg ; s.c.) chez des animaux naïfs (D0) et chez des animaux traités chroniquement à la morphine (D+9) est comparée. Comme montré dans la Figure 9, l'injection de morphine provoque une analgésie mise en évidence par une augmentation des seuils nociceptifs thermique (Figure 9 A) et mécanique (Figure 9 B). On observe que concernant la modalité thermique, les animaux KO NPFFR1 se comportent de façon similaire aux animaux WT. On observe également que dans la modalité mécanique l'analgésie induite par la morphine est

significativement supérieure chez les KO NPFFR1 et ce à D0 (AUC WT S: 3631.708±1426.194; WT M: 49856.375±3684.064; KO S: -99.188±1091.022; KO M:60117.037±2380.920; F(1, 36) = 9.703 ; p < 0.01, ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher p < 0.01) mais aussi à D+9 (AUC WT S: 701.667±2804.384; WT M: 40880±3187.93; KO S: 111.875±2004.877; KO M: 51093±2740.993; F(1, 36) =0.0494; p < 0.05, ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher p < 0.05).



2. Discussion

a) Seuil basal

La Figure 8 montre que les animaux KO NPFFR1 ont un seuil basal nociceptif thermique et mécanique supérieur à celui des WT. Cette information suggère que la délétion du récepteur NPFFR1 induit un nouvel équilibre entre les systèmes pro et anti nociceptifs responsables du seuil nociceptif basal. Ce nouvel équilibre engendre une diminution de la sensibilité aux stimuli nociceptifs résultant en un seuil nociceptif supérieur. Le récepteur NPFFR1 semble donc impliqué dans la modulation des inputs et outputs des voies

nociceptives dont l'intégration aboutit au seuil nociceptif basal. Ces résultats suggèrent également que NPFFR1 est un acteur pro-nociceptif puisque sa délétion a un effet anti-nociceptif. Les voies de la nociception thermique et mécanique ayant été décrites comme séparées dans les DRG en conditions physiologiques (Emery et al., 2016) puisque la délétion de NPFFR1 engendre la même augmentation de seuil nociceptif dans les deux modalités, ces données suggèrent soit que NPFFR1 est aussi bien exprimé par les nocicepteurs thermique que mécanique, soit que l'action modulatrice de NPFFR1 sur le seuil nociceptif de base se fait à un lieu d'intégration charnière entre ces deux modalités et ainsi en aval des DRG. Bien que variant selon les souches de souris étudiées, la présence de NPFFR1 dans la corne dorsale de la moelle épinière a été décrite (Bonini et al., 2000; Liu et al., 2001; Gouardères et al., 2004), en revanche dans les DRG, NPFFR1 ne semble exprimé qu'à 3% de son expression maximale (Bonini et al., 2000; Ayachi and Simonin, 2014). Ces données laissent supposer que c'est via son expression par les neurones spinaux que le récepteur NPFFR1 module le seuil nociceptif basal.

b) HIM et tolérance

A la vue de nos résultats (Figure 8), le récepteur NPFFR1 ne semble pas impliqué dans le développement de l'HIM, alors qu'il l'était dans l'HIF comme illustré dans la Figure 7. L'écart entre les résultats obtenus dans l'HIF et ceux de l'HIM pourrait être dû au fait que le fentanyl et la morphine n'induisent pas les mêmes conséquences sur le récepteur MOR. La morphine a en effet été décrite comme étant un agoniste au faible pouvoir internalisant, alors que le fentanyl est un agoniste qui induit une forte internalisation de MOR. Les conséquences que peuvent avoir des agonistes faiblement/fortement internalisant sont largement décrites dans la bibliographie, et la force d'internalisation d'un agoniste est suspectée d'être un des facteurs clés provoquant la mise en place de la tolérance analgésique, pour revue voir Pradhan et al., 2012; Cahill et al., 2016. Après confirmation de nos résultats avec les KO NPFFR1, il serait ainsi intéressant de confirmer ou non l'implication de NPFFR1 spécifiquement dans les voies de signalisation d'un agoniste de MOR a fort pouvoir internalisant.

Dans la Figure 9, les conditions expérimentales n'ont pas permis de mettre clairement en évidence une tolérance analgésique chez les WT en modalité thermique, cependant celle-ci est visualisée avec la modalité mécanique. En effet en regardant plus précisément on voit qu'à D0 les animaux atteignent la valeur cut-off fixée pour éviter tous dommages tissulaires, alors que ce n'est plus le cas à D+9. La morphine induit donc bien une analgésie moins forte suite au traitement chronique, mais la présence de ce cut-off masque une réponse analgésique probablement supérieure à celle observée. Pour s'affranchir de ce paramètre on pourrait changer les conditions expérimentales notamment en fixant la température du bain marie utilisé en TIT à une valeur supérieure (52°C p.ex. au lieu de 47+/-1°C). Une température supérieure provoquerait un retrait de la queue plus rapide ce qui, en permettant de voir une analgésie supérieure à D0, faciliterait la visualisation de la tolérance analgésique. L'étude de la modalité mécanique permet de confirmer qu'une tolérance

analgésique s'est effectivement développée suite à une administration de morphine répétée chez les animaux WT.

Concernant le comportement des souris KO NPFFR1, on observe que l'analgésie présentée est légèrement plus élevée que chez les WT aussi bien dans la modalité thermique que mécanique. L'aspect du cut-off décrit précédemment vient à nouveau masquer en TIT une éventuelle analgésie supérieure chez les KO comparé au WT. Cette analgésie supérieure à celle des WT est néanmoins visualisée avec le TPT. Concernant la tolérance, les résultats ne permettent donc pas de conclure vis-à-vis de la modalité thermique, mais le TPT met en évidence que la diminution d'analgésie induite par la morphine est inférieure chez les KO NPFFR1 comparé au WT. Cette légère diminution de la tolérance chez les KO NPFFR1 est significative, ces résultats indiquent donc que le récepteur NPFFR1 appartient bien à un système anti-opioïde impliqué dans le développement de la tolérance analgésique à la morphine. Des études supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer si NPFFR1 est principalement impliqué dans la tolérance en modalité mécanique, ou s'il l'est également dans la modalité thermique.

Il faut en revanche noter que les cohortes d'animaux utilisées dans cette expérience étaient à la fois constituées de mâles et de femelles. Le sexe des animaux ayant été décrit comme interférant avec leur réponse à la douleur (Craft et al., 2004; Mogil and Bailey, 2010; Rosen et al., 2017), ces résultats sont une étude préliminaire de l'implication du récepteur NPFFR1 dans l'HIM qu'il sera nécessaire de compléter. L'importance d'évaluer le rôle de NPFFR1 séparément chez les mâles et les femelles s'impose, notamment en sachant que le ligand endogène de NPFFR1, le RFRP1, a été décrit comme provoquant une diminution de la synthèse et libération des gonadotropines (Tsutsui et al., 2010), elles-mêmes connues pour réguler la douleur et l'analgésie (Craft et al., 2004; Mogil and Bailey, 2010; Rosen et al., 2017). L'effet modulateur des gonadotropines de NPFFR1 pourrait alors s'ajouter à son effet modulateur du système opioïde et l'étude des résultats séparément selon le sexe permettrait de s'affranchir d'une de ces variables. Néanmoins, et bien qu'étant à reproduire, ces données suggèrent tout de même que le récepteur NPFFR1 appartient à un système capable de moduler le système opioïde.

D. Implication du récepteur NPFFR2 dans l'hyperalgésie induite par la morphine et la tolérance analgésique

De façon similaire à celui réalisé chez les animaux KO NPFFR1, un phénotypage global des KO NPFFR2 a été réalisé et les résultats sont fournis en annexe. Le comportement des souris KO a ainsi été comparé à celui des WT dans treize tests comportementaux différents (Figure 27) et une étude de leur métabolisme a également été faite (Figure 28). Le comportement des KO NPFFR2 s'est révélé identique à celui des WT.

1. Résultats

Nous nous sommes intéressés à l'implication du récepteur NPFFR2 dans l'HIM. Pour cela le protocole décrit dans Elhabazi et al., 2014 a été utilisé. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 10, et montrent que le seuil nociceptif basal aussi bien thermique que mécanique des animaux KO NPFFR2 est identique à celui des animaux WT.

Concernant l'HIM, on observe au fur et à mesure des injections de morphine une diminution du seuil nociceptif des souris, illustrant la mise en place de l'hyperalgésie. Concernant l'hyperalgésie thermique, la Figure 10 C montre que les animaux WT et KO se comportent de façon similaire. Concernant la modalité mécanique (Figure 10 D), on observe que les souris KO développent moins d'HIM que les souris WT (AUC WT S: -8.152 ± 3.607 ; WT M : -425.544 ± 44.594 ; KO S : -11.003 ± 9.491 ; KO M : -216.158 ± 41.777 ; $F(1, 24) = 6.394$; $p < 0.05$, ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher $p < 0.001$). Le récepteur NPFFR2 semble donc impliqué dans le développement de l'HIM et ce uniquement dans la modalité mécanique.

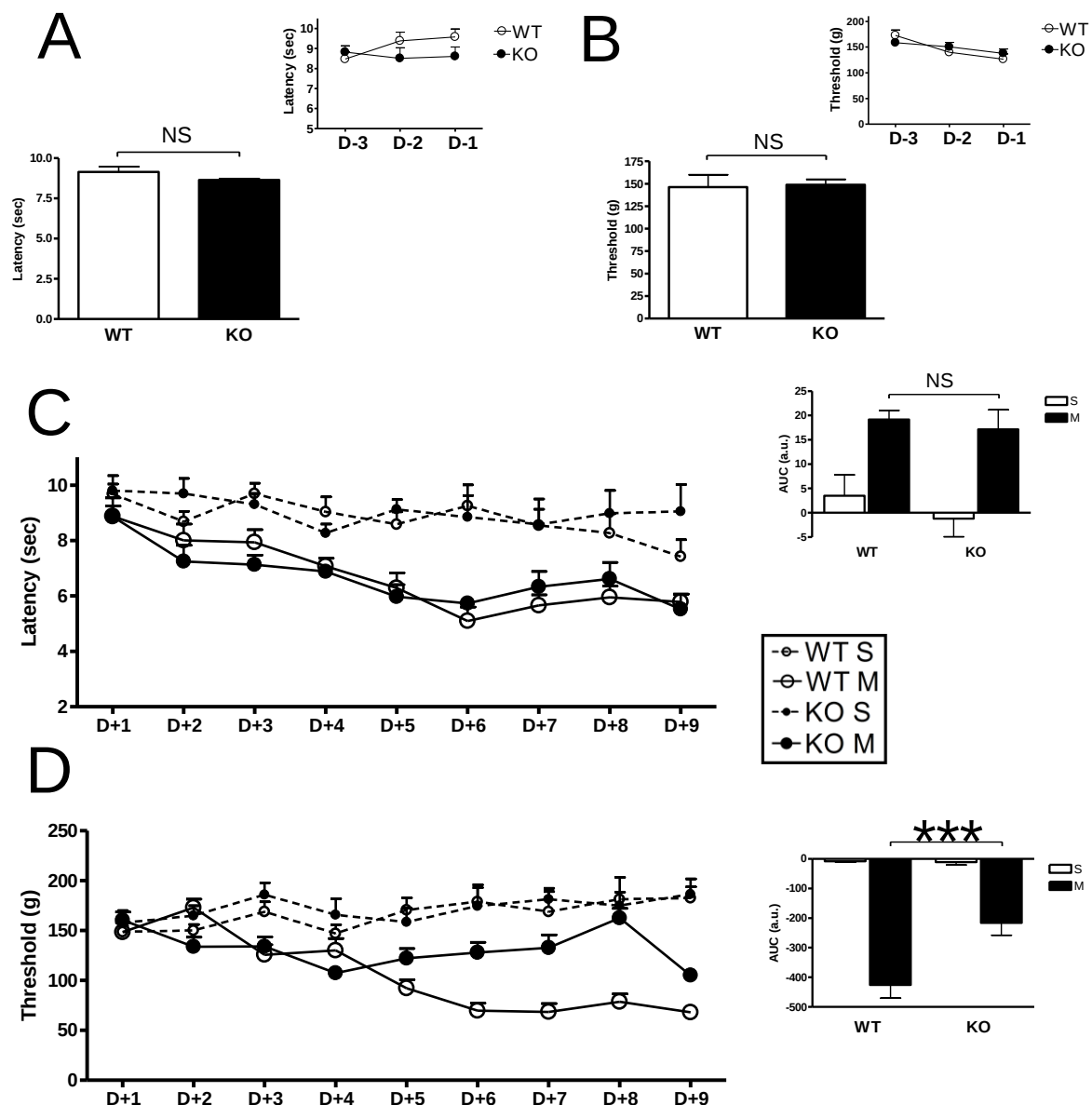
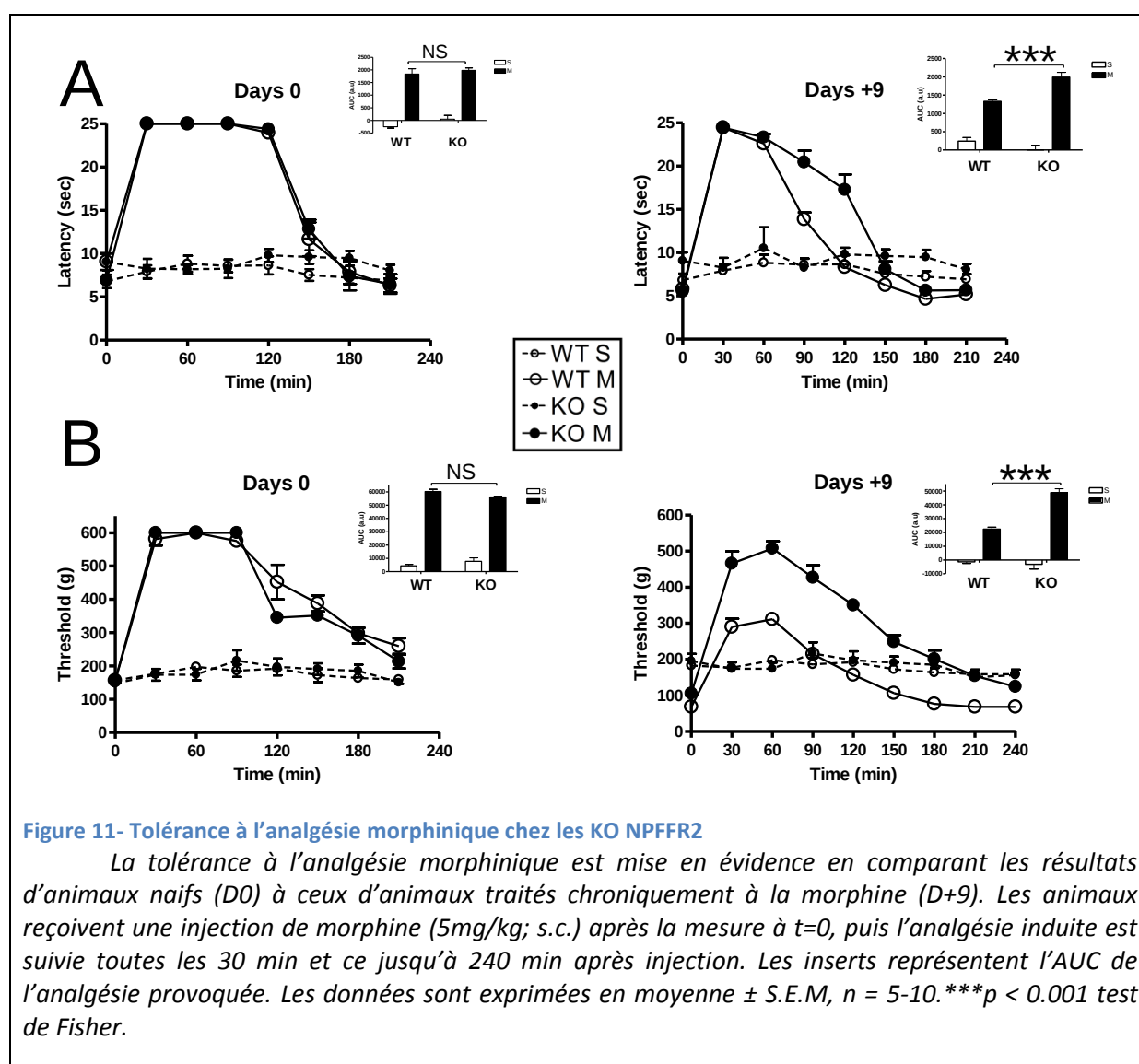


Figure 10- Seuil basal et hyperalgésie induite par la morphine chez les KO NPFFR2

Les seuils nociceptifs basaux thermique (A) et mécanique (B) ont été respectivement mesurés avec le TIT et le TPT. L'insert représente les résultats bruts. Le développement de l'hyperalgésie thermique (C) et mécanique (D) induite par une injection quotidienne de morphine (10mg/kg, s.c.) est suivie quotidiennement. L'insert montre l'hyperalgésie exprimée en AUC. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ S.E.M, $n = 13-17$ pour A et B et $n = 5-10$ pour C et D. *** $p < 0.001$ test de Fisher.

La Figure 11 présente les résultats concernant l'implication de NPFFR2 dans la tolérance à l'analgésie morphinique. En comparant l'analgésie induite à D0 à celle obtenue à D+9, on observe chez les WT que l'analgésie à D+9 est significativement inférieure. Ces résultats signifient que les animaux WT ont développé de la tolérance analgésique à la morphine. A l'inverse on observe que l'analgésie morphinique à D+9 des souris KO NPFFR2 est plus forte et dure plus longtemps que chez les WT (en TIT : AUC WT S : 242.7 ± 96.245 , WT

M : 1328.325 ± 42.292 , KO S : 0.630 ± 120.394 , KO M : 1987.425 ± 131.936 , $F(1, 24) = 14.559$; ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher $p < 0.001$; en TPT : AUC WT S : 1377 ± 1121.298 , WT M : 22381.875 ± 1438.237 , KO S : -3135 ± 3506.364 , KO M : 48840 ± 2886.895 , $F(1, 24) = 26.890$; ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher $p < 0.001$). Les KO NPFFR2 semblent donc présenter moins de tolérance à la morphine que les WT. Dans l'ensemble, ces données viennent appuyer l'hypothèse que NPFFR2 participe à un système anti-opioïde responsable de l'HIM et de la tolérance analgésique. A nouveau, on observe que les résultats diffèrent légèrement en fonction de la modalité nociceptive, et mettent plus facilement en évidence l'implication de NPFFR2 dans les voies de la nociception mécanique.



2. Discussion

a) Seuil basal

Les résultats présentés dans la Figure 10 indiquent que le récepteur NPFFR2 n'est pas impliqué dans la balance homéostatique responsable du seuil nociceptif basal. Ce récepteur

semble donc n'être impliqué que lors d'une stimulation opiacée. Cet aspect est en cohérence avec les effets du peptide endogène de NPFFR2, le NPFF. En effet, dans la majorité des études, le NPFF a été décrit comme n'ayant pas d'effet sur le seuil nociceptif en soi mais étant capable de diminuer l'analgésie provoquée par la morphine lorsqu'il est injecté simultanément (Yang et al., 1985; Oberling et al., 1993) pour revue voir Roumy and Zajac, 1998; Ayachi and Simonin, 2014. Dans certaines études une injection i.th. de NPFF induisait une analgésie mais cette analgésie reste dépendante de l'activation du système opiacé puisqu'un antagoniste de MOR ou de DOR la bloque (Gouardères et al., 1996). Ce récepteur semble ainsi impliqué dans un système anti-opioïde dont les effets ne se mettent en place que suite à l'activation du système opioïde. Appuyant cette hypothèse il a été montré qu'une administration de morphine induit une libération de NPFF bloquée par la naloxone (Tang et al., 1984; Devillers et al., 1995).

b) HIM et tolérance

Les résultats de la Figure 7 et ceux de la Figure 10 montrent que le récepteur NPFFR2 est impliqué dans l'hyperalgésie induite aussi bien avec par le fentanyl que par la morphine et donc via un agoniste opiacé à fort ou faible pouvoir internalisant. Ces résultats suggèrent que l'activation de NPFFR2 engendrerait des mécanismes cellulaires différents de celle de NPFFR1.

Les résultats de la Figure 10 concernant l'HIM montrent que la délétion de NPFFR2 diminue l'hyperalgésie mécanique mais n'a pas d'effet sur l'hyperalgésie thermique. Ces résultats suggèrent une implication différente de NPFFR2 selon la modalité nociceptive. Comme décrit dans Scherrer et al., 2009 les informations nociceptives mécaniques et thermiques semblent véhiculées par des fibres nociceptives différentes. Mises en corrélation avec nos résultats, ces données impliqueraient que NPFFR2 soit exprimé principalement par les fibres nociceptives mécaniques. Cette distribution suggérée, bien que nécessitant de plus amples investigations, est en cohérence avec la présence de NPFFR2 dans les DRG comme décrit dans la littérature (Bonini et al., 2000; Yang and Iadarola, 2006). Cependant, cette distribution de NPFFR2 uniquement dans les nocicepteurs mécaniques reste à confirmer puisque nos résultats concernant l'hyperalgésie induite par le fentanyl (Figure 7) montraient que les KO NPFFR2 développaient moins d'hyperalgésie thermique que les WT. Des études supplémentaires seront nécessaires pour trancher sur l'implication de NPFFR2 dans les nocicepteurs thermiques, mais ces résultats pourraient suggérer que le fentanyl et la morphine activent des récepteurs NPFFR2 localisés à des endroits différents. Autrement dit, le NPFFR2 activé par le fentanyl pourrait moduler l'information nociceptive à un niveau plus intégré que celui qui est activé par la morphine ce qui expliquerait que son blocage se répercute dans les deux modalités nociceptives.

Concernant la tolérance analgésique à la morphine, la Figure 11 indique que les KO NPFFR2 présentent moins de tolérance que les WT. Ces résultats suggèrent également un rôle de NPFFR2 prédominant dans la modalité mécanique, mais il est intéressant de noter

que même dans la modalité thermique les animaux KO NPFFR2 présentent une analgésie supérieure à celle des WT. Ce qui laisse une impression de rôle plus important dans la modalité mécanique que thermique, n'est pas une baisse du pouvoir analgésiant de la morphine chez les KO, mais plutôt une analgésie plus forte en thermique qu'en mécanique chez les WT. En effet, le protocole expérimental a plus facilement mis en évidence une tolérance mécanique que thermique chez les WT. Cette sous-estimation de la tolérance thermique est probablement explicable par le fait qu'à D0 les animaux atteignaient la valeur cut-off qui par conséquent masquait plausiblement une analgésie plus grande. Ainsi, le récepteur NPFFR2 semble impliqué dans le développement de la tolérance analgésique thermique et mécanique.

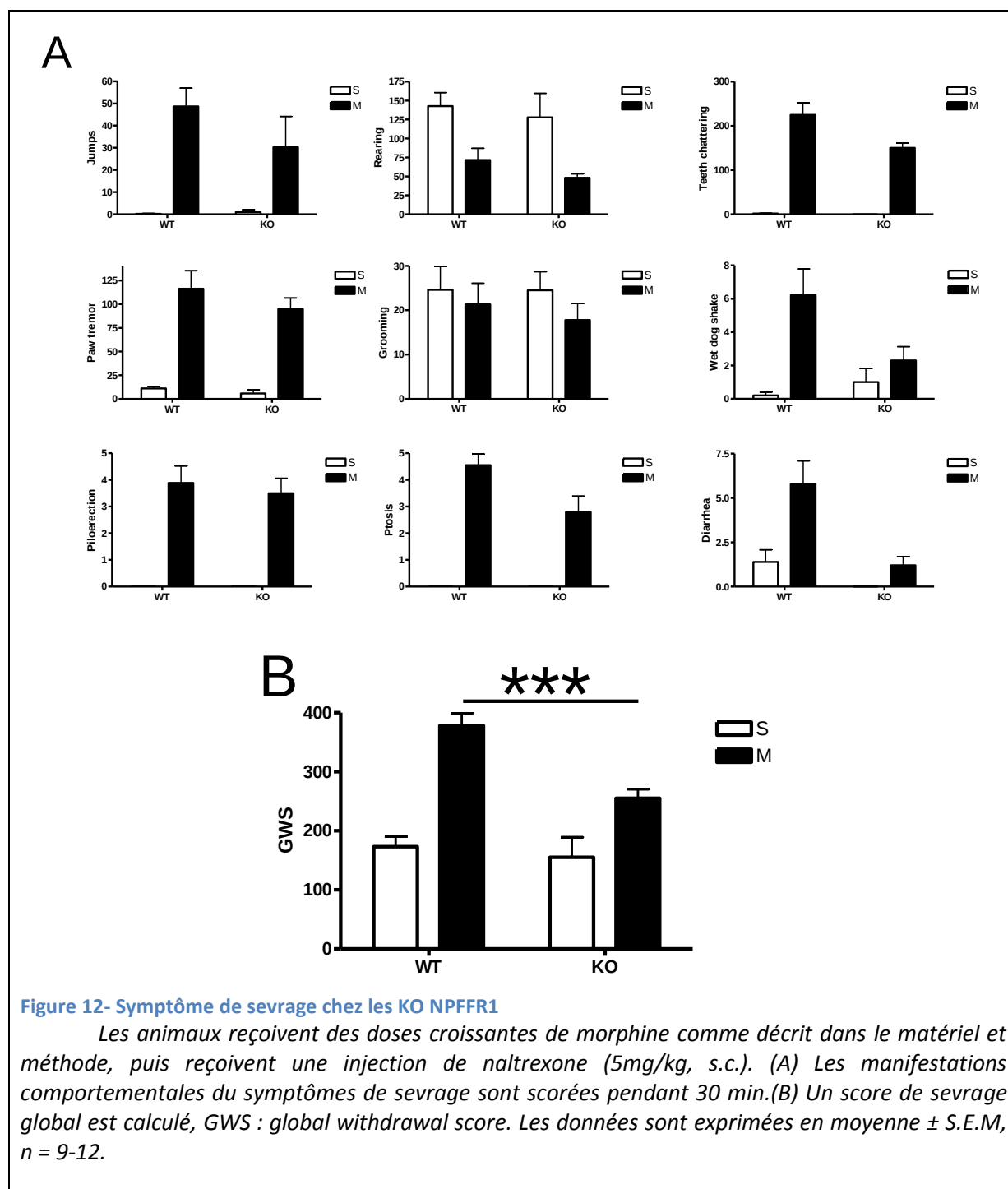
Soulever l'implication de NPFFR2 dans l'HIM uniquement en modalité mécanique, alors qu'il semble impliqué dans les deux modalités en tolérance analgésique, suggère que le récepteur NPFFR2 impliqué dans la tolérance le soit via un niveau d'intégration du signal plus élevé que dans l'HIM. Le récepteur NPFFR2 impliqué dans la tolérance semble agir lorsque l'information nociceptive n'est plus spécifique d'une modalité et impliquerait ainsi l'intervention de systèmes neuronaux des couches profondes de la moelle épinière, notamment les wide dynamic range (WDR), ou dans des centres supraspinaux, alors que le récepteur NPFFR2 impliqué dans l'HIM serait celui exprimé par les nocicepteurs mécaniques des DRG.

Cette action au niveau spinal ou supra spinal de NPFFR2 dans la tolérance analgésique est en cohérence avec le fait que l'analgésie induite par la morphine provienne d'une action spinale mais également via l'activation de multiples centres supraspinaux (McNally, 1999). Venant appuyer l'implication de NPFFR2 au niveau des centres supraspinaux, les travaux de l'équipe de Fang *et al.* ont montré que l'action anti-analgésique du NPFF était médié par une action au niveau central (Fang et al., 2011). Cette action anti-analgésique qu'induit NPFFR2 au niveau spinal serait donc en partie responsable de la tolérance analgésique. Les phénomènes sous tendant l'hyperalgésie et la tolérance analgésique impliqueraient ainsi des acteurs similaires tout en ne semblant pas nécessiter le même niveau d'intégration du signal.

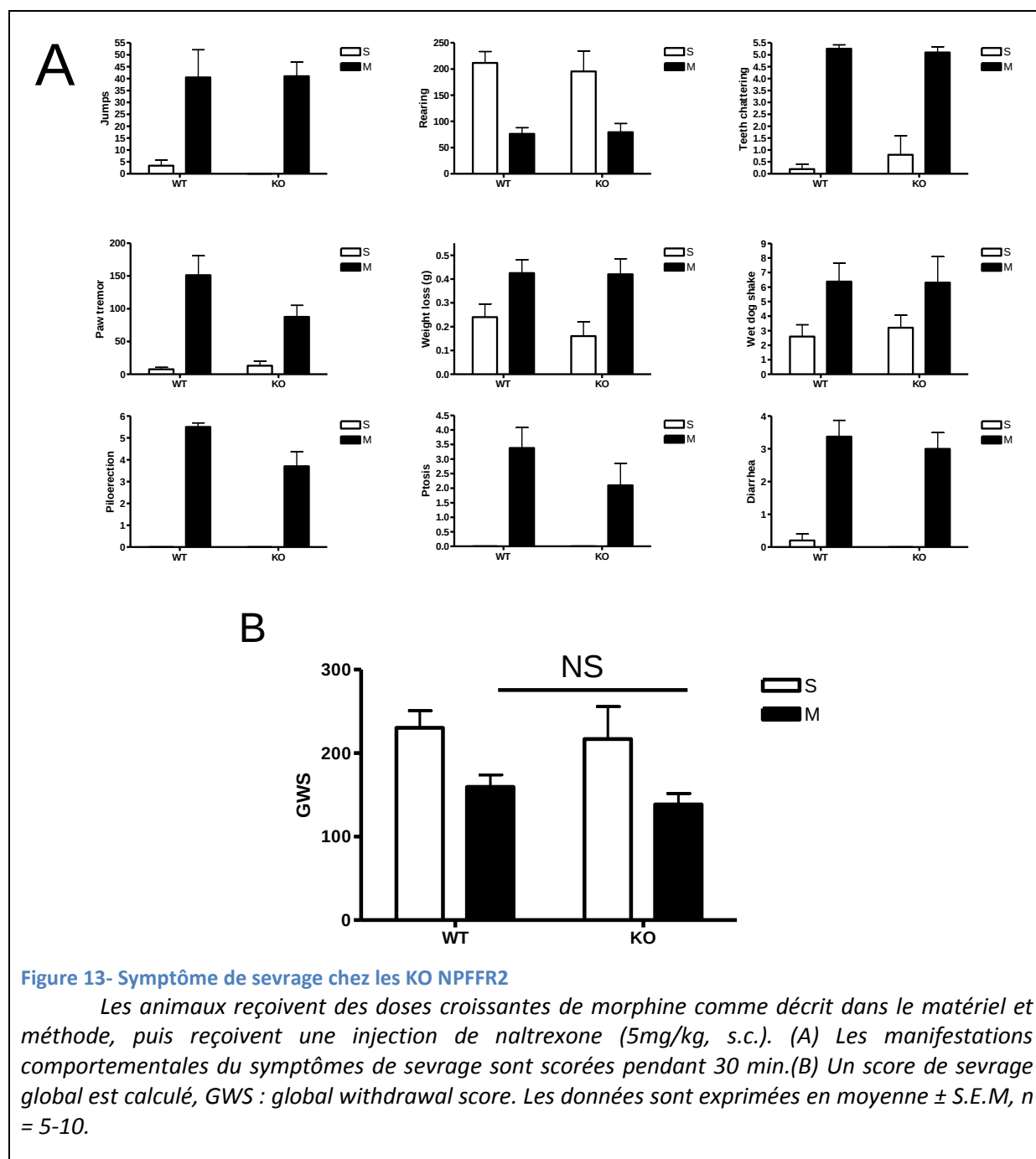
E. Modulation du sevrage à la morphine par NPFFR1 et NPFFR2

Après avoir évalué le rôle des récepteurs NPFFR1 et NPFFR2 dans la modulation de la nociception nous nous sommes intéressés à leurs implications dans le sevrage à la morphine. Comme précédemment montré par l'équipe, le RF9, un antagoniste sélectif des récepteurs NPFFR1 et NPFFR2 développé au laboratoire, est capable de diminuer le symptôme de sevrage opiacés, mettant en évidence l'implication de NPFFR1 et/ou NPFFR2 dans les propriétés récompensantes de la morphine et le développement de la dépendance physique aux opiacés (Elhabazi et al., 2012). Nous avons donc voulu savoir si la délétion génétique de NPFFR1 ou celle de NPFFR2 altérerait ce phénomène.

Le protocole de sevrage à la morphine décrit dans Elhabazi et al., 2012 a été utilisé et est décrit dans la partie matériel et méthode. Les résultats de l'étude du symptôme de sevrage chez les KO NPFFR1 sont présentés dans la Figure 12. La Figure 12A montre que les souris traitées uniquement avec du sérum physiologique (WT S et KO S) présentent un comportement semblable attestant du fait que la délétion génétique de NPFFR1 n'induit pas de changement radical dans le comportement des souris. On observe ensuite, qu'en comparaisons aux souris traitées uniquement au sérum physiologique (S), les animaux ayant reçus des doses croissantes de morphine (M) présentent un syndrome de sevrage caractérisé par des sauts, des tremblements de pattes, des diarrhées, une piloérection, un ptosis et des claquements de dents. Pris séparément, chacun des symptômes des animaux KO NPFFR1 est légèrement inférieur à celui des WT mais cette différence n'est pas significative. En revanche, comme illustré Figure 12B, si l'on établit un score global du symptôme de sevrage (global withdrawal score, GWS, Papaleo and Contarino, 2006) on observe que chez les animaux KO NPFFR1 le symptôme de sevrage est atténué comparé au WT (WT S: 173.147 ± 16.954 , WT M: 378.044 ± 21.537 , KO S: 155.250 ± 34.045 , KO M: 255.057 ± 15.476 , $F(3, 26) = 20.799$, ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher $p < 0.001$). Ces résultats indiquent que la délétion du récepteur NPFFR1 diminue le symptôme de sevrage à la morphine et ce en jouant sur l'état général de dépendance plutôt qu'en diminuant l'expression d'un signe particulier.



De la même façon que pour les KO NPFFR1, nous avons étudié le symptôme de sevrage chez les KO NPFFR2 et ces résultats sont présentés Figure 13. On observe ainsi que le symptôme de sevrage des KO NPFFR2 ne diffère pas de celui des animaux WT, et ce aussi bien en prenant chaque symptômes de façon séparée (Figure 13A), qu'en établissant un score de sevrage global (Figure 13B). Ces résultats indiquent ainsi que le récepteur NPFFR2 n'est pas impliqué dans les résultats trouvés par Elhabazi et al., 2012. Il semblerait donc que ce soit via le blocage du récepteur NPFFR1 et non NPFFR2 que le RF9 atténue le symptôme de sevrage.



Les expériences concernant le symptôme de sevrage réalisées chez les animaux KO NPFFR1 et NPFFR2 ont ainsi prouvé le rôle de NPFFR1 en tant qu'acteur modulateur de la dépendance physique à la morphine, et érige ainsi son blocage comme approche prometteuse pour traiter la dépendance aux opiacés. Les effets récompensant ayant été décrits comme liés à l'activité constitutive de MOR (Wang et al., 2001; Raehal, 2005; Walker and Sterious, 2005b; Sirohi et al., 2009b; Navani et al., 2011b; Corder et al., 2013), ceci pourrait indiquer que les effets anti-opioïde de NPFFR1 pourraient moduler l'activité constitutive de MOR, et de plus amples recherches seront nécessaires pour tester cette hypothèse.

F. Implication du récepteur GPR103a et de son ligand endogène le 26RFa dans l'HIO, la tolérance analgésique et la modulation de la douleur

Dans la suite de nos travaux, nous avons également étudié l'implication de GPR103a dans l'hyperalgésie induite par la morphine (HIM). Etant donné que GPR103a n'avait jamais été décrit comme ayant des propriétés anti-opioïdes, nous avons décidé de focaliser la suite de nos recherches spécifiquement sur ce récepteur. La suite de nos résultats a donc été utilisée pour écrire un article de recherche scientifique original qui rassemble la majorité de nos travaux portant sur GPR103a. L'article « **GPR103-26RFa is a new neuromodulator system involved in neuroadaptive changes associated with chronic opioid administration and inflammatory pain** » est en cours de soumission. Dans cette étude j'ai réalisé les expériences de caractérisation des animaux KO GPR103a, celles testant l'effet du RF1156 sur la douleur, ainsi que les expériences d'ISH et l'étude de la variation des messagers par RTqPCR. J'ai également rédigé l'article sous la supervision du Dr. Frédéric SIMONIN.

Cette étude avait donc débuté par la génération des souris KO constitutives pour les six gènes codant pour les récepteurs RF-amide et par l'étude de leur phénotype dans un modèle d'hyperalgésie aiguë induite par le fentanyl. Comme décrit précédemment, nous avons observé que l'hyperalgésie induite par cet opiacé fort était significativement atténuée chez les KO NPFFR1, NPFFR2 et GPR103a. Une plus ample caractérisation des animaux KO GPR103a a ensuite révélée qu'ils présentent moins d'HIM et moins de tolérance analgésique suite à l'administration chronique de morphine.

Nous avons ensuite identifié un composé montrant une bonne affinité et une activité antagoniste puissante pour le récepteur GRP103 humain: le RF1156, et l'avons caractérisé *in vivo*. Ainsi nous avons démontré que chez les souris, le RF1156 est capable de bloquer l'hyperalgésie centrale ainsi que l'augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque provoquées par le 26RFa, le ligand endogène de GPR103. En outre, le RF1156 empêche complètement le développement de l'HIO et de la tolérance analgésique lors de l'administration opiacée aiguë et chronique. Nous avons en outre montré que l'hyperalgésie induite par la carraghénine est atténuée chez les souris KO GPR103a et est totalement supprimée chez les souris WT par un blocage pharmacologique de ce récepteur.

Ayant démontré les effets de GPR103a, nous avons voulu déchiffrer les mécanismes d'action à l'origine de ces phénomènes. Nous avons alors montré, à l'aide d'expériences d'hybridation *in situ*, que le récepteur GPR103a et le 26RFa sont exprimés dans la corne dorsale de la moelle épinière et dans les DRG et que dans les deux structures, l'ARN de GPR103a est fortement colocalisé avec celui de DOR. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'activité électrique des neurones et avons démontré l'effet modulateur du 26RFa sur les courants post-synaptiques, et ce, à la fois dans corne dorsale de la moelle épinière et dans les neurones hypothalamiques du PVN. Enfin, l'analyse de la moelle épinière et des DRG par

RT-qPCR de souris traitées chroniquement à la morphine a révélé une modulation à la hausse ou à la baisse de plusieurs transcrits des récepteurs et peptides RF-amide et opioïdes, fournissant ainsi un aperçu des changements adaptatifs induits par le traitement chronique opiacé. Nous avons également mis en évidence que l'augmentation de DOR dans la moelle épinière provoquée par le traitement chronique est bloquée par le RF1156.

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent ainsi que le système GPR103-26RFa est un nouvel acteur impliqué dans l'HIO et la modulation de la douleur inflammatoire, et que les antagonistes ciblant GPR103 représentent de potentiels nouveaux agents thérapeutiques pour le traitement de la douleur.

GPR103-26RFa is a new neuromodulator system involved in neuroadaptive changes associated with chronic opioid administration and inflammatory pain

Safia Ayachi^{a,b}, Khadija Elhabazi^{a,b}, Glenn-Marie Lecoq^{a,b}, Jérôme Zens^{a,b}, Sylvain Hugel^c, Jack H. Jhamandas^d, Martine Schmitt^{a,e}, Tania Sorg^f, Marie-France Champy^f, Hamid Meziane^f, Benoit Petit-demoulière^f, Vivian L. Tawfik^{g,h,i,j}, Andrew Shuster^{g,h,i,j}, Gregory Scherrer^{g,h,i,j}, Mélanie Kremer^c, Xavier Wurtz^c, François Caussade^k, Laurent Diop^k, Yassine Darbaky^k, Jean-Jacques Bourguignon^{a,e}, Frédéric Bihel^{a,e} and Frédéric Simonin^{a,b,*}

Author affiliations:

^a Université de Strasbourg, Illkirch, France

^b Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR 7242 CNRS, Illkirch, France

^c Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR3212, Centre National de la Recherche Scientifique, 67084 Strasbourg, France

^d Division of Neurology, Department of Medicine, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2S2, Canada.

^e Laboratoire Innovation Thérapeutique, UMR 7200 CNRS, Illkirch, France

^f Institut Clinique de la Souris, PHENOMIN, IGBMC/ICS-MCI, Université de Strasbourg-CNRS-INSERM, Illkirch, France

^g Department of Anesthesiology, Perioperative and Pain Medicine, Stanford University, Stanford, California, USA.

^h Department of Molecular and Cellular Physiology, Stanford University, Stanford, California, USA.

ⁱ Department of Neurosurgery, Stanford University, Stanford, California, USA.

^j Stanford Neurosciences Institute, Stanford, California, USA.

^k ANS Biotech, Clermont-Ferrand, France

*** Corresponding author:**

Frédéric Simonin, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR 7242 CNRS/UdS

Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, 300, Boulevard Sébastien Brant, BP 10413. 67412 Illkirch Cedex, France.

Tel : +33 368 85 48 75; Fax : +33 368 85 46 83. E-mail address: simonin@unistra.fr

Abbreviation footnote: AUC, area under the curve; icv., intracerebroventricular; ith., intrathecal, MAP, mean arterial blood pressure; NPFF, neuropeptide FF; TIT, tail immersion test; TPT, tail pressure test.

Keywords: RFamide receptor - QRFP - pain - nociception - opioid-induced hyperalgesia

Abstract

Pain is a major health problem that not only reduces the quality of life but also imparts high social and economic costs. Opioid analgesics, such as morphine and fentanyl, remains the cornerstones for treating moderate to severe pain despite numerous side effects including respiratory depression, constipation, itching and, upon chronic administration, analgesic tolerance and addiction. In this study, we identified GPR103a -26RFa system as a novel pronociceptive system that is involved in hyperalgesia induced by opiates and inflammatory pain. More specifically, we have shown that both genetic and pharmacological blockade of this receptor prevents hyperalgesia induced by exogenous administration of its endogenous ligand 26RFa as well as hyperalgesia induced by fentanyl, morphine or carrageenan. We further showed by fluorescent in situ hybridization that GPR103a and 26RFa transcripts are expressed in the dorsal horn of the spinal cord and in the DRG and that 26RFa has a modulatory effect on post-synaptic currents both in spinal cord dorsal horn lamina II and in hypothalamic PVN neurons. Finally, RT-qPCR analysis of spinal cord and DRG revealed that several transcripts of RF-amide and opioids receptors and peptides are up- or down-regulated in mice chronically treated with morphine including DOR which up-regulation in spinal cord is blocked by our GPR103 antagonist. This result is in agreement with the strong co-localization of GPR103a and DOR we observed in both spinal cord and DRG and further suggests that GPR103 pronociceptive action could be functionally related to DOR. Altogether, our findings identify GPR103-26RFa as a new neuromodulatory system involved in OIH and inflammatory pain, and further suggest that antagonists targeting GPR103 represent novel potential therapeutic agents for pain treatment.

Introduction

Pain is a major health problem that substantially reduces quality of life and imparts high social and economic costs. Indeed, pain societal cost in the United States has been estimated at \$500-630 billion per year, and one third of U.S. population suffers of chronic pain (Reuben et al., 2015). Although the understanding of pain mechanisms significantly increased over the last decades, relatively few progress has been made in the development of novel analgesics. Thus, systemic administration of opiate analgesics, such as morphine and fentanyl, still remains the most effective means of alleviating severe pain across a wide range of conditions. Unfortunately, opiate treatments are associated with several side effects including respiratory depression, constipation, itching and, upon chronic administration, analgesic tolerance and addiction. Moreover, chronic stimulation of mu opioid receptor (MOR) has also been shown to induce the development of pain hypersensitivity called opioid induced hyperalgesia (OIH) that participates to the development of tolerance (Simonnet and Rivat, 2003). This phenomenon has been proposed to rely on a homeostatic equilibrium between opioid anti-nociceptive system and anti-opioid pro-nociceptive systems. In this model, sustained MOR activation also triggers activation of anti-opioid systems that in turns produce hyperalgesia thus diminishing the net analgesic effect of the opioid agonist (Ayachi and Simonin, 2014; Simonnet and Rivat, 2003).

Several systems have been shown to display anti-opioid properties including NMDA, cholecystokinin and neuropeptide FF systems (Roedel et al., 2016). Intracerebroventricular (icv.) administration of NPFF can produce a transient hyperalgesia in rats (Oberling et al., 1993; Yang et al., 1985) while opioid administration triggers the release of NPFF-immunoreactive like material from rat spinal cord both *in vitro* and *in vivo* (Devillers et al., 1995; Stinus et al., 1995). Moreover, the administration of antibody against NPFF partly opposes tolerance to analgesic effect of opioids (Lake et al., 1991) and small antagonists of

NPFF receptors can efficiently prevent the development of OIH and analgesic tolerance in rodents (Elhabazi et al., 2017; Elhabazi et al., 2012; Simonin et al., 2006). Neuropeptide FF belongs of the family of RF-amide peptides, which share a conserved Arg-Ph-NH₂ sequence at their C-terminus (Quillet et al., 2016). In mammals, they are encoded by five different genes and target six different receptors: NPFF1R (alias GnIH receptor, GPR147), NPFF2R (alias GPR74), GPR10 (alias PrRP receptor), GPR54 (alias Kiss1 receptor) and GPR103a and b (alias QRFPRa and b). In humans, there is only one GPR103 receptor subtype, which display similar sequence homology with rodents GPR103a and b. Recent results suggest that, in addition to NPFF, several other neuropeptides from the RF-amide family and their receptors might be involved in the control of nociception and in the modulation of opioid-induced analgesia (Elhabazi et al., 2013; Hinuma et al., 2000; Laurent et al., 2005; Liu et al., 2001). However, the lack of molecular tools, such as selective antagonists and genetic tools, still severely limits the study of the involvement of these receptors and of their endogenous ligands in these phenomena.

In this study, we have generated constitutive knockout mice for the six genes encoding RF-amide receptors and studied their phenotype in a model of acute fentanyl-induced hyperalgesia. We observed that hyperalgesia induced by this strong opiate was significantly attenuated in NPFF1R, NPFF2R and GPR103a KO mice. Further characterization of GPR103a KO animals revealed that they display less OIH and less analgesic tolerance following chronic morphine administration. We then identified RF1156, a compound showing good affinity and potent antagonist activity at recombinant human GRP103 receptor. In mice, RF1156 blocked central hyperalgesia and increase in arterial blood pressure and heart rate evoked by GPR103 endogenous ligand 26RFa. Moreover it fully prevented the development of OIH and of analgesic tolerance upon acute and chronic opiate administration. We further showed that hyperalgesia induced by carrageenan is attenuated in GPR103a KO mice and is

fully prevented in wild type mice by pharmacological blockade of this receptor. We then showed that GPR103a and 26RFa transcripts are expressed in the dorsal horn of the spinal cord and in the DRG and that in both structures GPR103a mRNA strongly colocalized with DOR. Moreover, we showed that 26RFa has a modulatory effect on post-synaptic currents both in spinal cord dorsal horn lamina II and in hypothalamic PVN neurons. Finally, RT-qPCR analysis of spinal cord and DRG from mice chronically treated with morphine revealed that several transcripts of RF-amide and opioids receptors and peptides are up- or down-regulated and that DOR up-regulation in spinal cord is blocked by RF1156. Altogether, our findings indicate that GPR103-26RFa is a new system involved in OIH and inflammatory pain modulation, and that antagonists targeting GPR103 represent novel potential therapeutic agents for pain treatment.

Material and methods

Animals

Experiments were done on adult male mice (25-30g) from Janvier Labs (France) or on KO and WT littermates generated by the Mouse Clinical Institute. Mice were housed by five per cage under a 12h/12h light/dark cycle, constant temperature (21 ± 1 °C) and ad libitum food and water. All animal care and experimental procedures were done in accordance with the European guidelines for the care of laboratory animals (European Communities Directive 86/609/ ECC) and were approved by the local ethical committees. Blood pressure and heart rate experiments, were carried out on male Sprague-Dawley rats weighing 250 to 300g. Animals were purchased from the University of Alberta Biological Animal Center. They were housed in a 12hr light/12hr dark cycle (lights on at 0800 h) at 21°C with free access to food and water. All protocols used in these experiments were approved by the Health Sciences Animal Policy and Welfare Committee of the University of Alberta.

Drugs

Morphine hydrochloride was obtained from Francopia (Paris, France). Fentanyl citrate was purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France). 26RFa and other peptides were from GeneCust (Dudelange, Luxembourg). Trifluoroacetate of n-adamantanecarbonyl-Arg-Phe-NH₂ (RF9) was prepared as previously described (Simonin et al., 2006). Radiolabeled compounds were from Hartmann analytic (Germany). GPR013 ligands were dissolved in physiological saline (0.9%) and administered in a volume of 10 mL/kg.

Generation of RF-amide receptor knock-out (KO) mice

KO mice for the different RF-amide receptors were engineered at Mouse Clinical Institute at the University of Strasbourg by homologous recombination. More specifically, GPR103a KO mice were obtained by using homologous recombination between a targeted vector and mouse embryonic stem cells. The targeting vector contained GPR103a exon 4 flanked by LoxP sequences, and a Neomycin resistance cassette flanked by FRT sequences. Electroporation was used to introduce this targeting vector in embryonic stem cells. Then cells were selected for their resistance to Neomycin. PCR and Southern blot experiments were used to select clones where homologous recombination took place. Then a positive clone was implanted in Balb/cN mouse blastocyst and then in a pseudo-pregnant mouse. Chimeric mice thus obtained were crossed with C57Bl/6N mice expressing Flip Recombinase constitutively, which will delete fragment between FRT sequences. It produced animals with floxed exon 4 GPR103a and deleted Neomycin resistance cassette. These mice were then crossed with C57Bl/6N mice expressing Cre recombinase constitutively (CMV- Cre mice), which will delete fragment between LoxP sequences giving GPR103a exon 4 knockout mice.

Genotyping protocol:

Ear fragments from WT and KO mice were incubated with proteinase K in a reaction medium containing 200 μ L of lysis buffer (1M Tris-HCl pH8.5 20mL, EDTA 0.5M 2mL, SDS10% 4mL; NaCl 5M 8mL; H₂O 166mL) and 4 μ L proteinase K (20mg/ml Fermentas), overnight at 55°C in rotation in an oven. Then, PCR reactions were performed using primers specific for wild-type (Lf: AGTGTATGGCATTATCAACAGTCAGCG; Lr: CTCCACATCTGTCACCGACTTCAAAC) and KO (Lf: GCTACCAGTTGCCTTTTAAATGCCTCT; Er: GGCCAGCAAAGTGACAGGGAGAA) in a reaction mixture containing: reaction Buffer (5 μ L), NTP (4 $\times$ 10mM, 0.5 μ L), MgCl₂ (50mM, 1.75 μ L), Go Taq polymerase Promega (0.125 μ L), H₂O (15.875 μ L), 0.75 μ L of each primer (10mM), Genomic DNA (0.25 μ L). PCR reaction conditions were as follows: 28

cycles: 1 x 94 °C for 3 min; 28 x (94 °C for 30 s.; 68 °C for 30 s.; 72 °C for 1 min); 1 x 4 °C, ∞. The size of the GPR103a KO and WT fragments were 334 bp and 269 bp, respectively. Amplified DNA fragments were analyzed on an agarose gel (1.5%) after staining with Ethidium Bromide (0.5 µg / mL) and UV visualization.

Nociceptive threshold

Assessment of basal nociceptive threshold, opioid induced hyperalgesia, and analgesic tolerance was performed as described in (Elhabazi et al., 2014). Briefly, mice were habituated to the experimenter during one week, then basal nociceptive threshold were measured daily using Tail Immersion Test (TIT) and Tail Pressure Test (TPT). To this end mice were maintained into a restrainer and their tail was respectively immersed in water bath (48±0.5 °C) or place on analgesimeter plate (LE 7306 Panlab, Barcelona, Spain; tip of diameter of the stylus: 1 mm) that will apply increasing pressure on the tail. The latency for tail withdrawal was measure in seconds for TIT and in grams for TPT. In absence of any nociceptive reaction a cut-off value was set at 25 sec for TIT and of 600g for TPT to avoid tissue damage.

Fentanyl-induced hyperalgesia

Nociceptive threshold were measured daily with TIT or TPT. After assessment of basal nociceptive threshold, mice received sc. injection of RF9 or RF1156 (5mg/kg,) or saline, followed 20 min after by four fentanyl injection separated by 15 min (4 x 60µg/kg, sc.). Then analgesia of fentanyl was measured every 60min until 240 min after its injection. The following days nociceptive threshold were measured daily showing fentanyl induced hyperalgesia. The protocol of fentanyl-induced hyperalgesia in rats was similar than in mice. Animals received RF9 or RF1156 (0.5 mg/kg, sc.) then 320 µg/kg (sc.) of fentanyl (4 x

80µg/kg). Nociceptive threshold were measured using Randall-Selitto test every 30 min until 240 min.

Morphine-induced hyperalgesia

Basal nociceptive threshold was measured daily on D-3 to D0 with TIT and TPT. From D+1 to D+8 the assessment of nociceptive threshold was followed by saline or RF1156 injection (5mg/kg, sc.) and 20 min later by morphine injection (10mg/kg, sc.). On day 0 and 8, mice received saline or RF1156 (5mg/kg, sc.) injection then, 20 min after, morphine analgesia (5mg/kg, sc.) was assessed every 30 min until nociceptive threshold returns to baseline.

Icv. injection

Icv. injections were done as described (Laurent et al., 2005). Briefly mice were anesthetized with isoflurane and injected with 26Rfa (3 nmol), RFRP3 (5 nmol), NPFF (10 nmol), morphine (1.5 nmol), RF9 (10 nmol) or RF1156 (10 nmol) alone or in combination, diluted in 0.9% physiological saline in a total volume of 5µL. Proper localization of the injection site was previously determined using methylene blue dye injection. After icv. injection nociceptive threshold was measured using TIT each 15 min during 75 min.

Intrathecal injection

Saline or 26Rfa or RF1156 were injected intrathecally alone or in combination (10 µL per mouse) under gaseous anesthesia (isoflurane 1.5-2%). Briefly, for lumbar intrathecal administration, a 27-gauge needle connected to a 50 µL Hamilton syringe was inserted between the L5 and L6 vertebrae, into sub-arachnoidal space. Placement of the needle was verified by the elicitation of tail flick movement. Time course study was done using TIT.

Inflammatory pain model

Nociceptive threshold was assessed before and after carrageenan injection using the up-and-down method (Chaplan et al., 1994) with Von Frey filament, or using TIT like previously described. To induce inflammatory pain, mice were injected with 20 μ L of 2% carrageenan solution (Sigma dissolved in saline) in the plantar surface of the right hind paw or of the tail.

Blood pressure and heart rate measurements

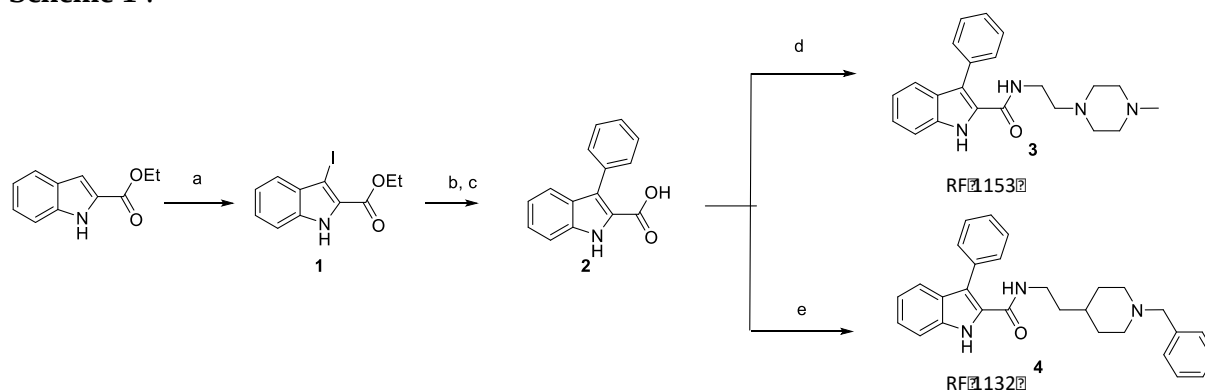
Experiments were carried out on male Sprague-Dawley rats weighing 250 to 300g. Animals were purchased from the University of Alberta Biological Animal Center. They were housed in a 12hr light/12hr dark cycle (lights on at 0800 h) at 21°C with free access to food and water. All protocols used in these experiments were approved by the Health Sciences Animal Policy and Welfare Committee of the University of Alberta.

Rats (n=5) were anesthetized with sodium pentobarbitol (50 mg/kg i.p.; Somnotol, MTC Pharmaceuticals Hamilton, Canada) and also received 0.05mg atropine sulfate sc. and 500 μ L/kg Ethacilin i.m. In all animals the descending aorta was cannulated for measurement of arterial blood pressure as previously described (Jhamandas and MacTavish, 2003). In the same surgical session, an in-dwelling cannula into the lateral cerebral ventricle was inserted by drilling a small hole through the skull at 1.8 mm caudal and 1.4 mm lateral from bregma. The guide cannula was set to a depth of 3.8-4.2 mm from the top of the skull and accurate placement into the ventricle was verified by observing the outflow of the cerebrospinal fluid by withdrawing on a microsyringe attached to the cannula. A second small hole was drilled 4 - 5 mm caudal from the guide cannula for insertion of an anchor screw. A small amount of dental cement was applied to the screw and the guide cannula in order to hold it in place and allowed to harden before closure of the wound and recovery from anesthesia. Five to seven days after surgery, the arterial line was flushed with saline and connected to a pressure

transducer for continuous recording of arterial blood pressure. A small internal cannula was inserted into the guide cannula and connected to a 25 μ l Hamilton syringe. NPFF peptide (Bachem, Torrance, CA) was made into a stock of 1mg/ml and frozen in 50 μ l aliquots until use. RF9 was freshly prepared from a stock solution of 1mg/ml

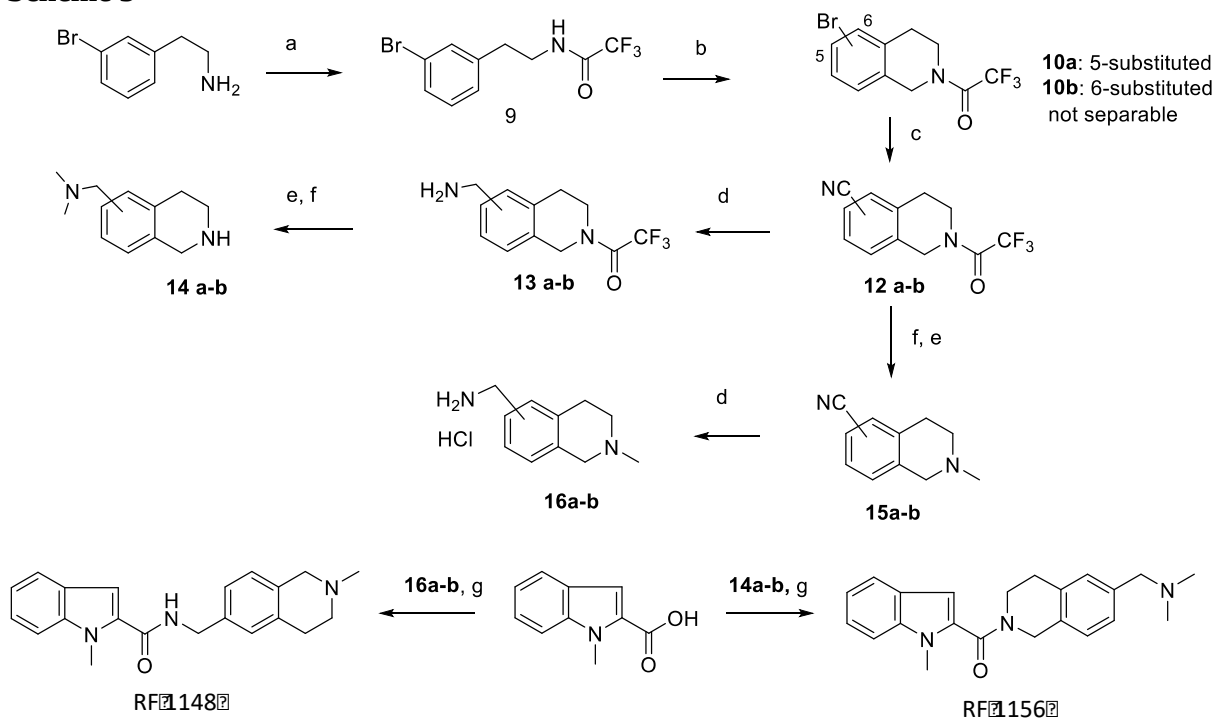
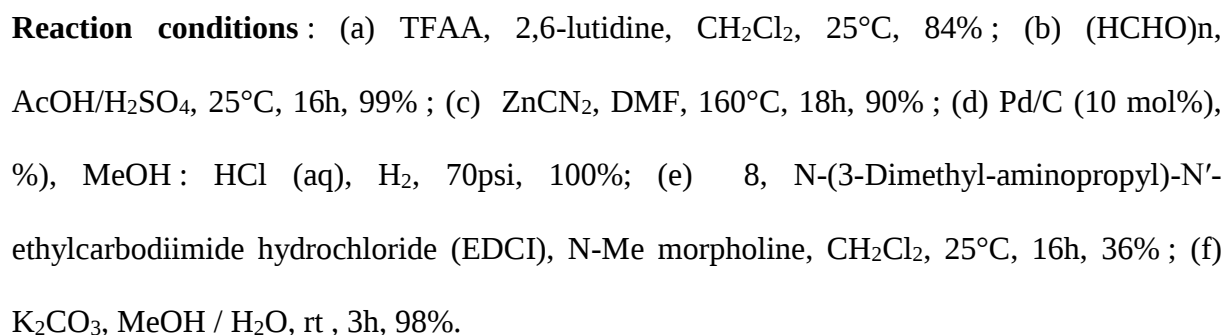
GPR103 compounds structure and synthesis

Scheme 1 :



Reaction conditions : (a) I_2 , KOH, DMF, H_2O , 3h, 91%; (b) $PhB(OH)_2$ (1.1 equiv.), $Pd(PPh_3)_4$ (10mol %), K_2CO_3 , Toluene, EtOH, H_2O , 105°C, 48h, 73%; (c) LiOH, THF : H_2O , 50°C, 16h, 85%; (d) 2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethan-1-amine, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI), N-Me morpholine, CH_2Cl_2 , 25°C, 16h, 27%; (e) 2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethan-1-amine, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, (EDCI), N-Me morpholine, CH_2Cl_2 , 25°C, 16h, 22%.

Scheme 2 :



Reaction conditions : (a) TFAA, 2,6-lutidine, CH₂Cl₂, 25°C, 100% ; (b) (HCHO)_n, AcOH/H₂SO₄, 25°C, 16h, 95% ; (c) ZnCN₂, DMF, 160°C, 18h, 61% ; (d) Pd/C (10 mol%), MeOH : HCl (aq), H₂, 70psi, 100%; (e) CH₂O , NaBH(OAc)₃, THF : MeOH 5 :1, 76-87% (f) K₂CO₃, MeOH : H₂O, rt , 3h, 98% ; (g) 14a-b, or 16a-b, N-(3-Dimethyl-aminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI), N-Me morpholine, CH₂Cl₂, 25°C, 16h, separation of regioisomere, 8-36%.

Receptor cDNA constructs, cell expression and membrane preparations

Human NPFF1R, NPFF2R and GPR54 cDNAs were subcloned into the pCDNA3.1 expression vector (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and transfected into CHO cells before selection for stable expression, as reported (Elhabazi et al., 2013). CHO cells expressing human GPR10 and GPR54 were a gift from M. Parmentier (IRIBHM, Brussels, Belgium).

Membranes from CHO cells expressing RF-amide receptors were prepared as described (Elhabazi et al., 2013) and stored at –80°C as aliquots (1 mg prot./mL) until use.

Radioligand binding assays

Binding assay conditions were essentially as described in (Elhabazi et al., 2013). Briefly, NPFF1R- or NPFF2R-containing membranes were incubated with 0.015 nM [¹²⁵I]-1DMe-NFF. Non-specific [¹²⁵I]-1DMe-NFF binding levels were determined in the presence of 1 μM RFRP-3 (NPFF1R) or 1 μM NPFF (NPFF2R). Membranes of GPR10-expressing CHO cells were incubated with 0.3 nM [³H]-PrRP-20, in the absence or presence of 1 μM PrRP-20 to define total and non specific binding levels, respectively. GPR54-containing membranes were incubated with 0.02 nM [¹²⁵I]-Kp-10 using 1 μM Kp-10 to determine non specific radioligand binding. GPR103 membranes were incubated with 0.03 nM [¹²⁵I]-43RFa, using 1 μM 26RFa for non specific binding measurement. Competition-type experiments

were performed at 25°C, under binding equilibrium conditions (30 min, 0.5 mL final volume for NPFF1R and NPFF2R; 1 h, 0.25 mL final volume for the three other receptor subtypes), in the presence of increasing concentrations of unlabeled peptides or compounds to be tested for their binding affinity. Membranes from HEH293 cells transiently expressing hMOR, hDOR, hKOR and hNOP receptors were prepared as described (Becker et al., 1999). hMOR, hDOR, hKOR and hNOP membranes were diluted in 50 mM Tris HCl pH 7.4, 0.1% BSA and incubated with [³H]diprenorphine (0.2 nM for hMOR and hDOR, and 0.4 nM for hKOR; PerkinElmer, Boston, MA, USA) or 0.1 nM [Leucyl-³H]nociceptin (for hORL1; PerkinElmer, Boston, MA, USA) and variable concentrations of RF1156 in a total volume of 0.2 ml for 1 hour at 25°C. Non-specific binding was determined in presence of 10 µM naloxone (hMOR, hDOR, hKOR; Sigma, France) or 10 µM nociceptin/orphanin FQ (NOP; Sigma, France)

Membrane-bound radioactivity was separated from free radioligand by rapid filtration through a 96-well GF/B unifilter apparatus (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Courtaboeuf, France) and quantified using a TopCount scintillation counter (Perkin Elmer).

Calcium mobilization experiments

Human GPR103-expressing CHO cells were loaded with 2.5 µM Fluo-4 AM in the presence of 2.5 mM probenecid, as described (Elhabazi et al., 2013). Compounds were serially diluted in assay buffer (in mM: 10 HEPES, 0.4 NaH₂PO₄, 137.5 NaCl, 1.25 MgCl₂, 1.25 CaCl₂, 6 KCl, 10 glucose and 1 mg/mL BSA, pH 7.4) and antagonists were allowed to pre-incubate with cells for 10 min before agonist challenge. Agonist-evoked increases in intracellular calcium were recorded over time (5 sec intervals over 220 sec) at 37 °C through fluorescence emission at 520 nm (excitation at 485 nm). Peak response amplitudes were normalized to basal and maximal (cells permeabilized with 20 µM digitonin) fluorescence levels.

In situ hybridization

Adult mice were dissected and lumbar spinal cord and DRG were removed and immediately embedded in OCT and frozen in dry ice. Tissues were cryosectioned at 14µm and collected on Superfrost Plus glass slides (Fisher, Pittsburg, PA, USA). Commercially available RNAscope Multiplex fluorescent v2 kits and probes were purchased directly from Advanced Cell Diagnostics, Hayward, CA, USA. ISH probes were against mouse GPR103a exon 4 (NM_198192.2; C1), mouse MOR (Mm-Oprm1, same as CatNo. 315841 but C2), mouse 26RFa (NM_183424.3; C3). Different fluorophores were assigned to the C1, C2, C3 channels depending on the TSA® plus fluorophore selected diluted at 1:1500 (TSA® Plus fluorophores from PerkinElmer: C1: TSA Plus Cyanine 3, C2: TSA Plus Cyanine 5, C3: TSA Plus Fluorescein). In situ hybridization was performed according to the manufacturer's recommendation but with slight optimization and has been done without any stopping point. Briefly, a post-fixation step (freshly made pre-chilled 4% paraformaldehyde at 4°C during 1h) was followed by 3 wash with PBS (1x, 3 min each, at room temperature) and dehydration with ethanol bath (50%-70%-100%-100%, 5 min each, at room temperature). After pretreating slides with Protease Pretreat 4 (Advanced Cell Diagnostics, Hayward, CA, USA) at room temperature for 40 min for spinal cord samples and 20 min for DRG samples, hybridization was performed at 40°C for 2 h in a HybEZ oven (Advanced Cell Diagnostics, Hayward, CA, USA). After wash and amplification steps, Prolong Gold antifade reagent (without DAPI, Molecular Probes) was used to mount coverslips. The positive and negative probes used were purchased from Advanced Cell Diagnostics. As positive control probe a mix consisting of probes against three different housekeeping genes (Polr2a at C1, Ppib at C2, and Ubc at C3) was used, and the negative control probes were against a bacterial gene (dapB for C1, C2 and C3). Positives and negative probes were used as references for the signal intensity

and background level in each channel. Images were acquired using a confocal laser scanning microscope (Leica DMI 6000, objective Leica HCX PLAPO CS 40/1.30 OIL, confocal head Leica SP8) and analysed with the Fiji/ImageJ software.

Electrophysiology experiments

Preparation of spinal cord slices

All experiments were performed with 6-10 weeks-old male mice. Mice were deeply anesthetised with a mixture of ketamine (75 mg/kg, intraperitoneal) and xylazin (5 mg/kg), and killed by decapitation. The spinal cord was rapidly removed by laminectomy, and immediately immersed in cold (0–4 °C) sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing: 248 mM sucrose, 11 mM glucose, 26 mM NaHCO₃, 2 mM KCl, 1.25 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 1.3 mM MgSO₄, and 2.5 mM kynurenic acid (bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂). The meninges were removed from the spinal tissue under a stereomicroscope, with fine forceps. A segment of spinal cord containing the lumbar enlargement and measuring ~1 cm was then isolated with a razor blade. This segment was embedded in 5% agarose, and transverse slices (thickness, 400 µm) were cut in a lateral to medial direction with a vibratome (VT1200S; Leica, Nussloch, Germany). Only the slices corresponding to the lumbar region were kept and used for electrophysiological experiments. Slices were stored at room temperature in a chamber filled with ACSF containing: 126 mM NaCl, 26 mM NaHCO₃, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, and 10 mM glucose (bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂; pH 7.3; 310 mOsm measured).

Electrophysiological recordings of spinal cord neurons

Slices were transferred to a recording chamber maintained at 34°C and continuously superfused with oxygenated ACSF. Miniature GABAergic inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) were pharmacologically isolated with 0.5 µM tetrodotoxin (Latoxan, Valence,

France), 1 μ M strychnine (Sigma, Lyon, France), 10 μ M CNQX (Tocris, Lille, France). Miniature glutamatergic excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) were pharmacologically isolated with 0.5 μ M tetrodotoxin (Latoxan, Valence, France), 1 μ M strychnine (Sigma, Lyon, France), and 10 μ M bicuculline (Sigma, France). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) with a P-1000 puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). They were filled with a solution containing 140 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM MgATP, and 2 mM MgCl₂ (pH 7.3, adjusted with KOH; osmolarity, 310 mOsm, adjusted with sucrose) and had final tip resistances of 3.5–4.5 M Ω . Voltage-clamp recordings were performed in the whole-cell configuration with an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Union City, CA, USA) at a holding potential fixed at -60 mV. Recordings were acquired with WinEDR 3.5.2 (copyright J. Dempster, University of Strathclyde, UK) with a DAQ Card BNC2110 interface (National Instruments Corp., Newbury, UK). Current traces were digitized (20 kHz) and stored on the hard disk of a personal computer. Synaptic currents were analyzed with Mini Analysis (version 6.0.7; Synaptosoft, USA).

Electrophysiological recordings of PVN neurons

Electrophysiological experiments with PVN neurons were performed and analyzed as described (Jhamandas et al., 2007).

RTqPCR

For RNA variation study by RTqPCR, animals were treated daily during 10 days with morphine (10 mg/kg, s.c.) preceded by physiological saline or RF1156 injection (5 mg/kg, s.c.; 20min before morphine injection). 10 days after treatment, morphine-induced hyperalgesia was maximal and the animals were euthanized and lumbar spinal cord and DRGs were removed and placed in a suitable volume of RNAlater in accordance with the supplier's

instructions. The total RNAs were then extracted from the biological samples with an RNeasy lipid kit (Qiagen) according to the supplier's instructions. Briefly, the tissues were lysed with a Potter in 1 ml (0.5 ml) or 0.5 ml (DRG) of lysis buffer at room temperature. The RNAs were extracted by Qiazol according to the procedure described in the kit and eluted in 30 μ L of RNase free water.

Quantitative real-time RT-PCR

A reverse transcriptase step was performed with the Maxima First Strand Synthesis cDNA kit (Thermo Scientific, Invitrogen) following the manufacturer's instructions. To normalize differences in RNA concentration of the different samples, 100 ng of RNA template were used in each reaction. Briefly, the reaction mixture contained 2 μ L of Mix1: 1 μ L of 10 $\times$ dsDNase Buffer and 1 μ L dsDNase, 100 ng of RNA, supplemented with RNase free water up to a total volume of 10 μ L; incubation at 37 ° C for 2 min; addition of 10 μ L Mix2: 4 μ L Reaction mixture 5x, 2 μ L Maxima enzyme mixture, 4 μ L RNase free water; incubation at 25 ° C for 10 minutes, 50 ° C for 15 minutes, 85 ° C for 5 minutes; total final volume 20 μ L. The cDNA aliquots are stored at -20 ° C. The cDNAs thus produced were then quantitated by RTqPCR with the StepOnePlus apparatus (Applied Biosystems) using the Kapa SYBR FastqPCR Master Mix (Kapa Biosystems). The thermal cycle parameters recommended by the manufacturer were used: 95 ° C. for 3 min then 40 cycles [95 ° C. for 20 seconds; 60 ° C for 30 seconds]. The composition of the mixture was: 1 μ L cDNA, 5 μ L Kappa Master mix, 0.2 μ L Reverse primer (10 μ M) and 0.2 μ L Forward primer (10 μ M), 3.6 μ L d water without RNase, for a final volume of 10 μ L. The quality of the RNAs was analyzed by spectrophotometry using Nanodrop (Thermo Scientific). The RNA concentrations as well as the absorbance ratios A260 / A280 and A260 / A230 were measured. The samples were also analyzed by electrophoresis using the Bioanalyzer (2100 Agilent Technologies). This device indicates the 28S / 18S ribosomal RNA (rRNA) ratio and RNA integrity (RIN). A high

quality RNA should have an A260 / A280 ratio of about 2, an A260 / A230 > 2 ratio, a 28S / 18S rRNA ratio > 1.5 and an RIN > 7. The expression of the genes of interest was normalized by β -actin. The data were analyzed using a cycle threshold comparison method (Ct) for the relative quantification ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). A double-stranded DNA fusion curve was performed at the end of PCR [95 ° C, 20 sec; 65 ° C, 1 minute; up to 95 ° C in increments of 0.3 ° C every 15 seconds] to verify that there was amplification of a single fragment. The primers used for qPCR were purchased from Sigma, their respective sequences are shown in Table 1.

Data and statistical analyses

For *in vitro* binding and functional experiments, two to four independent experiments were performed in duplicates and data were analyzed using Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

For *in vitro* experiments, all nociceptive thresholds are expressed as mean values $\pm$ SEM. Hyperalgesia were quantified as the area-under-curve (AUC) calculated by the trapezoidal method (Celerier et al., 2000). Analgesia was also quantified as AUC, or as “analgesia maximal effect” calculated by averaging the two maximal values obtain at two successive time point. Unpaired Student’s t-test was used to compare WT and KO inflammatory pain.

For electrophysiological recordings experiments, for each cell, the distributions obtained before and after the application of the substance were compared by use of a Kolmogorov–Smirnov test with a significance level set at 0.01. 26RFa was considered to have an effect when: (i) the inter-event interval distributions before and after application of the substance were significantly different; (ii) the effect occurred during application; and (iii) the observed change in frequency exceeded 20% of the recorded basal frequency of excitatory postsynaptic currents or inhibitory postsynaptic currents

Results

Fentanyl-induced hyperalgesia is significantly altered in NPFFR1, NPFFR2 and GPR103a KO mice.

In order to determine which RF-amide receptor is involved in the development of OIH, we studied the development of hyperalgesia induced by a single dose of fentanyl (Elhabazi et al., 2012) in each of the six RF-amide receptors KO mice. Compared to their WT littermates, hyperalgesia induced by fentanyl was significantly attenuated in NPFFR1, NPFFR2 and GPR103a KO mice while it was unchanged in GPR10, GPR54 and GPR103b (Fig.1). These results confirm the involvement of NPFF receptors in this phenomenon and further suggest that GPR103a and its ligand 26RFa could represent a novel receptor system that modulates opioid-induced hyperalgesia. We therefore decided to focus on the GPR103a-26RFa system in the rest of our study.

Global phenotyping of GPR103a KO mouse line

In a first step, we studied the global phenotype of these animals with a full range of assays. GPR103a mutant mice had good general health, normal physical appearance, and normal basic neurological reflexes. They displayed no major behavioural alteration and no modification in motor coordination or muscle strength (SI Fig. 1). Moreover, we observed no skeleton abnormalities in KO mice and blood analysis revealed no difference between WT and KO mice (SI Fig. 2). Conversely, we observed that GPR103a KO mice ate less, displayed a slightly lower body weight and showed a better tolerance to glucose than their WT counterpart (see SI Fig. 3). This phenotype was absent in GPR103b KO mice (not shown). Altogether, these data are consistent with the hyperphagic effect that has been observed upon administration of the GPR103 endogenous ligand 26RFa in rodents as well as the role of this

system in insulin secretion (do Rego et al., 2006; Takayasu et al., 2006). They further point to GPR103a, and not GPR103b, as the main target of 26RFa for these effects in mice.

Morphine-induced hyperalgesia and analgesic tolerance, but not opioid withdrawal, are attenuated in GPR103a KO mice.

In the next series of experiments, we sought to investigate consequences of chronic morphine administration in WT and GPR103a KO mice. We first measured the basal nociceptive threshold of GPR103a KO animals using different nociceptive modalities. As shown in Figure 2, both thermal (Fig 2A) and mechanical (Fig 2B) nociceptive threshold of GPR103a KO mice was significantly lower than in WT mice ($p < 0.001$ by unpaired T-test). In the next experiments we therefore represented nociceptive threshold as percentage of nociceptive baseline in order to facilitate comparison between genotypes. We studied in the same animals the development of morphine-induced hyperalgesia and analgesic tolerance following daily morphine administration during 8 days. To do this, nociceptive threshold were measured every day before a daily morphine injection (10 mg/kg, sc.) using both thermal and mechanical stimulation, thus allowing visualizing the development of OIH (Figure 3). Tolerance was observed in the same experiment by performing a time course of morphine analgesic effect on the first (D0) and last days (D8) of treatment (Figure 4). As expected, in WT animals we observed a progressive decrease of the nociceptive threshold in both thermal (Fig 3A) and mechanical (Fig 3B) modalities indicating that pain hypersensitivity induced by chronic morphine administration did develop in these animals. This effect was strongly attenuated in GPR103 KO animals (for TIT $F(3, 32) = 23.734$; $p < 0.001$, one way ANOVA followed by Fisher's PLSD test $p < 0.001$. For TPT : $F(3, 32) = 33.062$; $p < 0.001$, one way ANOVA followed by Fisher's PLSD test $p < 0.001$.).

On day 0, morphine antinociception was similar in WT and KO animals when measured in the tail pressure test (Fig 4B, $F(3, 32) = 82.712$; $p < 0.001$, one way ANOVA followed by Fisher's PLSD test $p < 0.001$). With the thermal modality (Fig 4A), WT and KO mice reach the cutoff value at 30 and 60 min (Fig. 2), but KO lower basal nociceptive results in an apparent higher antinociceptive effect of morphine in these animals. It was therefore not possible to accurately compare thermal morphine antinociception between WT and KO animals on day 0. On day 8, following morphine administration in WT animals the maximum effect at 30 min was at the same level than saline treated animals in both nociceptive modalities (Fig 4A and B) indicating that analgesic tolerance fully developed in these animals (for TIT : $F(3, 32) = 39.797$; $p < 0.001$, one way ANOVA followed by Fisher's PLSD test $p < 0.001$; For TPT : $F(3, 32) = 11.971$; $p < 0.001$, one way ANOVA followed by Fisher's PLSD test $p < 0.001$). Conversely, in KO animals, morphine maximum effect was still significantly different from controls (ANOVA followed by Fisher's PLSD test $p < 0.001$) showing that the development of tolerance was attenuated in mice lacking GPR103a.

Since pharmacological blockade of neuropeptide FF receptors have been shown to reduce opiates withdrawal syndrome (Elhabazi et al., 2012; Simonin et al., 2006), we decided to evaluate this question in GPR103a KO mice (SI Fig. 4). We observed no changes in the severity of the behavioural signs of withdrawal between KO and WT animals following chronic administration of morphine, suggesting that anti-opioid effect of GPR103a is specific to nociceptive pathways.

Altogether, our data show that the genetic deletion of GPR103a decreases OIH induced by acute fentanyl and chronic morphine administrations as well as morphine-induced analgesic tolerance. They further suggest that GPR103a and its endogenous ligand 26RFa might represent a novel anti-opioid pronociceptive system capable of counteracting the analgesic effect of opiates by inducing a decrease of the nociceptive threshold of the animals.

26Fa induces hyperalgesia that is blocked in GPR103a KO mice

In order to investigate further the hypothesis that GPR103a-26RFa is a pro-nociceptive system, we evaluated the consequence of 26RFa central administration on basal nociceptive threshold. As expected, intracerebroventricular (icv.) administration of 3 nmoles of 26RFa (Elhabazi et al., 2013) induced a significant decrease of basal nociceptive threshold that was completely absent in GPR103a KO mice (Figure 5) highlighting the specific role of GPR103a in 26RFa pro-nociceptive effect.

In vitro and in vivo characterization of RF1156 a high affinity selective GPR103 antagonist

In order to confirm the results we obtained in GPR103a KO animals and further explore the idea that pharmacological blockade of this receptor may represent an interesting strategy to improve morphine analgesia upon chronic administration, we sought to identify a small, selective and potent antagonist of this receptor. We identified from a patent (WO 2010/126164 A1), a series of compounds that could present the expected properties. In order to find a good candidate we tested several compounds from this series (see Material and Methods for structure and synthesis schemes) in competition experiments with membranes from cells expressing the human GPR103 (hGPR103) receptor and radiolabeled 43RFa (the elongated form of 26RFa). All the compounds that were tested displayed significant affinity for GPR103 (Table 2) with the best one, RF1156, showing an affinity around 10 nM. We then investigated whether these compounds showed agonist or antagonist properties in an intracellular calcium mobilization assay with CHO cells expressing hGPR103. When tested alone, these compounds did not induce any intracellular calcium release, indicating that they do not display any agonist activity (not shown). As expected, the endogenous agonist of

GPR103 26RFa potently stimulated intracellular calcium release (Figure 6A). Moreover, the dose response curve of 26RFa was shifted to the right by 1 and 10 μ M of the different compounds indicating that they all displayed antagonist properties (Figure 6A and SI Fig. 5). In agreement with its better K_i value, RF1156 appeared to be the most potent antagonist in this assay with a pA_2 value of 7.1 (Fig. 6B). We further assess the selectivity of RF1156 toward the other members of the family of RF-amide receptors (NPFFR1, NPFFR2, GPR10 and GPR54) as well as opioid (MOR, DOR and KOR) and OFQ-nociceptin (NOP) receptors. As shown in Table 3, RF1156 displayed very low affinity for all these receptors indicating a high selectivity toward GPR103.

We next investigated whether RF1156 can antagonize 26RFa effects *in vivo*. Because icv. administration of 26RFa in mice has been shown to cause a decrease of basal nociceptive threshold (Elhabazi et al., 2013)(Fig. 5), we first evaluated whether RF1156 could prevent this effect. As expected, icv. administration in mice of 3 nmol of 26RFa induced a significant decrease of basal nociceptive threshold compared to saline controls (Figure 7A). Co-administration of 3 nM of RF1156 with 26RFa completely prevented this effect ($F(2, 12) = 4.893$, one way ANOVA followed by Fisher's PLSD test $p < 0.05$). These data confirm our previous observations with GPR103a KO animals and demonstrate that RF1156 is a potent antagonist of GPR103 in mice. We further investigated the effect of intrathecal injection (ith.) of 26RFa (Figure 7B). As expected, ith. injection of 26RFa induced hyperalgesia that is blocked by coadministration of RF1156 ($F(3, 31) = 4.025$; one way ANOVA followed by Fisher's PLSD test $p < 0.05$). Altogether, these data indicate that GPR103-26RFa system displays pronociceptive properties both at spinal and supraspinal levels.

In order to further confirm the capability of RF1156 to specifically block the action of GPR103 endogenous ligand 26RFa *in vivo*, we studied the consequences of RF1156 administration on the increase of arterial blood pressure induced by 26 RFa (Takayasu et al.,

2006). When administered in rats, 26RFa (10 nmol, icv.) produced an elevation in mean arterial blood pressure (MAP) that occurred within 3 min of onset of icv. infusion and was sustained for approximately 33 min before returning to normal levels (Figure 8A). The increase in MAP was also accompanied by a significant increase in heart rate over saline infused rats (Figure 8C). RF1156 (10 nmol) infused alone did not result in a significant alteration of either MAP or heart rate. Conversely, MAP and heart rate increases evoked by 26RFa were significantly blocked by immediate pre-administration of icv. RF1156. Under the same conditions, NPFF (10 nmol) also increased MAP and heart rate that was not blocked by RF1156. Altogether, our results clearly show that RF1156 can selectively antagonize the action of 26RFa on its receptor GPR103 both *in vitro* and *in vivo*. They further show that GPR103 is the target of 26RFa modulatory effect on MAP and heart rate.

RF1156 prevents the development of OIH in rodents

We next examined in rats and mice whether RF1156 could prevent the development of fentanyl-induced hyperalgesia. As shown in Figure 9A, administration of a single dose of fentanyl in rats (4x40µg, sc.) induced a strong analgesic effect that was followed by significant pain hypersensitivity in the two following days. As expected, prior administration of RF1156 had a limited effect on fentanyl analgesia but completely prevented the development of hyperalgesia (AUC F: 7464±597; RF1156+F: 2779±969; RF9+F: 2152±643; $F(2, 27) = 14.79$; $p < 0.001$, one way ANOVA followed by Bonferroni's test as compared to the fentanyl group $p < 0.001$). Similar results were obtained in mice (Figure 9B, $F(4, 41) = 4.544$; $p < 0.01$ ($P=0.0039$), one way ANOVA followed by Fisher's PLSD test $p < 0.001$). We then studied the consequences of GPR103 pharmacological blockade on hyperalgesia and analgesic tolerance in mice. As shown in Figure 10, RF1156 strongly reduced morphine-induced hyperalgesia to thermal (Figure 10A) and mechanical stimuli (Figure 10B). We can

notice that RF1156 injection slightly prolonged morphine analgesia in naïve mice (Figure 10C) and significantly reduced analgesic tolerance induced by chronic morphine administration (Figure 10D). Altogether these data confirm our previous observation in GPR103a KO mice and further highlight the potential of GPR103 antagonists for improving the adverse effects of chronic opiate administration.

GPR103 is involved in the development of hyperalgesia induced by carrageenan

We next wanted to investigate whether hyperalgesia induced by opiates and by inflammatory agents could display overlapping mechanisms. To this purpose we evaluated whether GPR103a is also involved in hyperalgesia induced by injection of carrageenan. We first examined the phenotype of GPR103a KO mice in a model of hyperalgesia induced by carrageenan injection into the hind paw of the mice. Figure 11 shows that, in WT mice, carrageenan induced strong tactile allodynia and thermal hyperalgesia that persist over three days. These effects were significantly attenuated in GPR103a KO animals, suggesting that GPR103a contribute to the development of pain hypersensitivity in inflammatory pain conditions. We further showed that in WT mice acute pharmacological blockade of GPR103 with RF1156 (5 mg/kg, sc.) 20 min prior the carrageenan injection completely blocked thermal hyperalgesia induced by carrageenan in WT mice (Figure 12). Altogether, these data indicate that GPR103a is an important player whose activation contributes to the development of inflammatory pain.

GPR103a distribution in pain pathways

Distribution of both 26RFa and GPR103a mRNA have been previously described using in situ hybridization (ISH) in mouse and rat brain, where they appear to be expressed in some regions involved in the control of nociception including arcuate nucleus, dorsal raphe,

and locus coeruleus (Ayachi and Simonin, 2014). However, the presence of both transcripts in the spinal cord and DRG has been poorly studied. We thus decided to investigate 26RFa and GPR103a mRNA expression in these regions and co-localization with mu and/or delta-opioid receptors (MOR and DOR, respectively) transcripts using multiplexed FISH (positive and negative controls for FISH experiments are shown in SI Fig. 6). As shown in Figure 13A, we observed the presence of GPR103a and 26RFa transcripts in superficial layers of the spinal cord dorsal horn. As expected the specific signal for GPR103a mRNA was absent in KO animals (Fig. 13B). Only a few cells co-expressed MOR and GPR103a in spinal cord while no overlap was observed with 26RFa transcript (Fig. 13A). Conversely, we observed a strong co-localization between DOR and GPR103a transcripts (Fig. 13C). In DRG, we observed expression of both 26RFa and GPR103a transcripts (Fig 14). Again, GPR103a mRNA sparsely co-localized with MOR (Fig. 14A) but strongly with DOR (Fig14B) transcripts. In agreement with previously described DOR distribution (Scherrer et al. 2009; Bardoni et al. 2014), GPR103a-DOR transcripts are co-expressed mainly in medium/large sized neurons suggesting a relationship with A β fibers. GPR103a mRNA seems to be also expressed, although to a lower extent, by small sized neurons related with nociceptive fibers. Altogether, our data provide clear evidence that transcripts for GPR103a and its endogenous ligand 26 RFa are expressed in the first relays of nociceptive pathways.

GPR103 facilitates glutamatergic synaptic transmission in the spinal cord dorsal horn

In order to show that GPR103a is functionally associated with modulation of nociception, we performed electrophysiological recordings in the spinal cord dorsal horn. We recorded inner lamina II neurons from adult mice to examine the effect of 26RFa on GABAergic and glutamatergic synaptic transmission. 26RFa had no effect on GABAergic miniature inhibitory synaptic currents (n=8, data not shown), but significantly facilitated

glutamatergic miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) in 15 % of the recorded neurons (Fig. 15A and 15B; $n=4/27$). In these neurons, mEPSCs frequency was increased by $127\pm 32\%$ and mEPSCs amplitude was increased by $49\pm 11\%$ (Figure 15B). This indicates both a pre and postsynaptic effect of 26RFa on glutamatergic synaptic transmission in a small subset of inner lamina II neurons. This effect was reversibly blocked by RF1156 (SI Fig. 7). These data show that, in the spinal cord, GPR103 - 26RFa system is a functional system that modulates glutamatergic synaptic transmission, further supporting its modulatory role on nociception. To determine if this modulatory effect of postsynaptic current was exclusive to the spinal cord or if 26RFa also modulates postsynaptic currents supraspinally, we decided to examine 26RFa effect on paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) neurons, a region considered as one of the most important autonomic control centers in the brain, with neurons playing essential roles in controlling cardiovascular function, stress, metabolism, growth, reproduction, immune and pain (Martinez-Lorenzana et al., 2008). As shown in Figure 15C, 26RFa decreased frequency of mIPSCs, and had no effect on mIPSCs amplitude (data not shown) suggesting a presynaptic effect on inhibitory synaptic transmission. This effect was blocked by RF1156 (Fig 15D). Altogether, our data indicate that GPR103 - 26RFa system has a modulatory effect on post synaptic current both in spinal and supraspinal neurons.

Morphine chronic treatment in mice induces upregulation of DOR transcript in a GPR103 dependant manner.

We next examined adaptive transcriptional changes associated with the development of pain hypersensitivity observed upon chronic morphine administration. We particularly focus on transcripts of the different RF-amide receptors (NPFF1R, NPFF2R, GRP10, GPR54, GPR103a and GPR103b) and their ligands (RFRP, NPFF, PrRP, Kisspeptin and QRFP) as

well as opioid receptors (MOR, DOR, KOR) and their endogenous ligands (POMC, Penk and Pdyn). RT-qPCR experiments were performed on lumbar spinal cord and DRG mRNA samples obtained from animals that were daily administered with morphine (10 mg/kg, s.c) and co-administered with saline or RF1156 (5 mg/kg, sc.). Tissue samples were dissected out after 10 days of morphine administration when hyperalgesia was maximal. As shown in Figure 16, morphine treatment led to a significant downregulation of POMC and GPR10 mRNA in the spinal cord (Fig. 16A) and a significant upregulation of kisspeptin and DOR transcripts in DRG (Fig. 16B). Except DOR upregulation, these changes were not blocked by co-administration of RF1156. In animals that were co-administered with morphine and RF1156 we further observed an upregulation of GPR103a and pENK mRNA in DRG that was not observed in morphine treated animals. These data indicate that the development of pain hypersensitivity following chronic morphine is associated with transcriptional modulation of several components of the opioid and RF-amide systems and further suggest that DOR upregulation is associated with GPR103 activation.

Discussion

In this study, we report that genetic and selective pharmacological blockade of GPR103 attenuates the development of hyperalgesia induced by opiates (OIH) and by carrageenan as well as analgesic tolerance induced by chronic morphine administration. Moreover, we show that GPR103a but not GPR103b KO animals eat less and display improved glucose tolerance suggesting that this receptor subtype is probably the target of previously described effect of 26 RFa on feeding and metabolism (Granata et al., 2014; Moriya et al., 2006; Takayasu et al., 2006). We show that transcripts of GPR103a and 26 RFa are expressed both in DRG and spinal cord dorsal horn and that 26 RFa can facilitate glutamatergic synaptic transmission in the spinal cord dorsal horn in both a pre- and post-

synaptic manner. These data, together with in vivo data clearly point to GPR103a - 26 RFa system as a novel pro-nociceptive receptor system involved in neuroadaptive changes associated with chronic opiate administration and inflammatory conditions. Finally, we show that in the spinal cord and DRG GPR103a is mainly expressed in DOR expressing neurons and that chronic morphine administration leads to upregulation or downregulation of several transcripts of opioid and RF-amide systems including DOR transcript which upregulation is blocked by co-administration of GPR103 antagonist. These data support the idea of a functional interaction between DOR and GPR103.

We show in this study that 26 RFa induces hyperalgesia in mice. These data contrast with previous results reporting an analgesic effect of 26RFa following icv. or ith. administration in rats (Yamamoto et al., 2009; Yamamoto et al., 2008). However, these effects were observed only in animals with inflammatory or neuropathic pain and the selectivity of 26RFa action on GPR103 was not investigated in these studies. Numerous neuropeptide receptors have been involved in the modulation of nociception and some of them have been shown to display promiscuous binding for different endogenous peptides. For example, MrgC11, a member of the family of Mrg receptors that are enriched in DRG neurons, have been shown activated by several different endogenous peptides including γ 1-MSH, γ 2-MSH, Bam22P and neuropeptide FF (Han et al., 2002), which are endogenous ligands of other GPCRs. In their studies, Yamamoto and colleagues used doses of 26 RFa that were 3 to 4-times higher than in this study, which might therefore impede peptide selectivity, possibly leading to analgesia. We show here that in naive animals low doses of 26RFa induce a decrease in nociceptive threshold following icv. or it. administration and that these effects are blocked by our newly characterized highly selective GPR103 antagonist and/or are absent in GPR103a deficient animals. Moreover, we show that hyperalgesia induced by opiates and inflammation are attenuated in GPR103a animals and completely blocked by RF1156. We

thus provide compelling evidence that GPR103-26RFa system is a novel pronociceptive system involved in the development of hyperalgesia induced by opiates and inflammation.

In spinal cord and DRG, we have observed a strong co-localization of GPR103a with DOR (see Figure 13 and Figure 14). In DRG, GPR103a/DOR signals were particularly present in medium/large cells. Although the nature of neuronal cell types expressing DOR in DRG remains controversial (Abdallah and Gendron, 2017; Vicente-Sanchez et al., 2016), our data are in agreement with recent reports (Bardoni et al., 2014; Scherrer et al., 2009) showing the detailed distribution of DOR transcript in this structure. This co-localization further suggests that GPR103/DOR might functionally interact to modulate nociception. In line with this, we have shown that DOR transcript is upregulated in DRG from mice chronically treated with morphine and that this upregulation is fully blocked by co-administration of our newly characterized selective GPR103 antagonist. Moreover, DOR involvement in adverse effects associated with chronic morphine administration have largely been described (Ananthan, 2006; Gunther et al., 2017). Although conflicting results have been obtained with two different DOR knockout mouse lines (Scherrer et al., 2009; Zhu et al., 1999), morphine analgesic tolerance is blocked by the selective DOR antagonist naltrindole in naive animals (Abdelhamid et al., 1991) or in animals with inflammatory pain (Beaudry et al., 2015), and mixed molecules with MOR agonist and DOR antagonist activities have been shown to induce analgesia without development of tolerance (Mosberg et al., 2014). Altogether, our data and data from the literature suggest that the anti-hyperalgesic effect of GPR103 antagonist in animals chronically treated with morphine could be mediated by a GPR103a-DOR functional interaction. In the future, further investigations will be needed to fully explore the role of this interaction in the modulation of nociception in different chronic pain models as well as its possible relevance at the supraspinal level. Indeed, like DOR, GPR103a is also expressed in several brain regions involved in pain modulation (Quillet et al., 2016)

suggesting that GPR103-DOR functional interaction might also be relevant for the modulation of pain in different supraspinal regions.

In this study we show that genetic and pharmacological blockade of GPR103 limit the development of both mechanical and thermal hyperalgesia following opiates or caragenaan administration. These results suggest that GPR103a is involved in common processes between these two nociceptive modalities, or in downstream level of nociceptive signal integration. A growing body of evidence indicates that most DRG neurons are modalities specific (Abrahamsen et al., 2008; Cavanaugh et al., 2009; Emery et al., 2016). We show here that in DRG GPR103a transcript is mainly expressed by medium/large neurons and co-localized with DOR, which have been described as conducting principally mechanical stimulation (Scherrer et al., 2009). These data strongly suggest that in primary nociceptors GPR103a could be specifically involved in the modulation of mechanical pain. Modulation of thermal nociceptive input by GPR103 would therefore occur at the central level. In agreement with this hypothesis we have shown that GPR103a and 26RFa mRNAs are expressed in neurons from the spinal cord dorsal horn suggesting that modulation of thermal pain could occur at this level. Finally, the fact that icv. administration of 26RFa also leads to the decrease of thermal nociceptive threshold that is blocked in GPR103a KO mice and by GPR103 selective agonist suggest that modulation of thermal pain by 26RFa-GPR103a system also occurs at the supraspinal level.

In conclusion, by using both genetic and pharmacological blockade, we identified a novel pro-nociceptive anti-opioid system, GPR103a and its endogenous ligand 26RFa, that modulate opioid-induced hyperalgesia and analgesic tolerance as well inflammatory pain hypersensitivity. This study points to GPR103 antagonists as potential useful therapeutic agents that might be beneficial for pain treatment in association with opiates to limit their adverse effects (OIH and tolerance) or alone to limit hyperalgesia induced by inflammation.

Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Dr M. Parmentier (IRIBHM, Brussels, Belgium) for the gift of CHO cells expressing human GPR10 and GPR103. This work also benefited from the efficient support of the Integrative Biological Chemistry Platform (UMS 3286 CNRS, Illkirch, France). We thank the staff from the neurobiology and behavior service at Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France) for technical assistance and advices.

This work was supported by the CNRS, Université de Strasbourg, Alsace BioValley and by grants from SATT Conectus, Agence National de la Recherche (ANR 08 EBIO 014.02, ANR-13-BSV1-0001), Conseil Régional d'Alsace (Pharmadol), Communauté Urbaine de Strasbourg (Pharmadol), ICFRC (Pharmadol), OSEO (Pharmadol), Direction Générale des Entreprises (Pharmadol). This work has been published within the LABEX ANR-10-LABX-0034_Medalis and received financial support from the French government managed by "Agence National de la Recherche" under "Programme d'investissement d'avenir".

References

- Abdallah, K., Gendron, L., 2017. The Delta Opioid Receptor in Pain Control. *Handb Exp Pharmacol*.
- Abdelhamid, E. E., Sultana, M., Portoghese, P. S., Takemori, A. E., 1991. Selective blockage of delta opioid receptors prevents the development of morphine tolerance and dependence in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 258, 299-303.

- Abrahamsen, B., Zhao, J., Asante, C. O., Cendan, C. M., Marsh, S., Martinez-Barbera, J. P., Nassar, M. A., Dickenson, A. H., Wood, J. N., 2008. The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain. *Science* 321, 702-705.
- Ananthan, S., 2006. Opioid ligands with mixed mu/delta opioid receptor interactions: an emerging approach to novel analgesics. *AAPS J* 8, E118-125.
- Ayachi, S., Simonin, F., 2014. Involvement of Mammalian RF-Amide Peptides and Their Receptors in the Modulation of Nociception in Rodents. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5, 158.
- Bardoni, R., Tawfik, V. L., Wang, D., Francois, A., Solorzano, C., Shuster, S. A., Choudhury, P., Betelli, C., Cassidy, C., Smith, K., de Nooij, J. C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B. L., Woodbury, C. J., Basbaum, A. I., MacDermott, A. B., Scherrer, G., 2014. Delta opioid receptors presynaptically regulate cutaneous mechanosensory neuron input to the spinal cord dorsal horn. *Neuron* 81, 1312-1327.
- Beaudry, H., Gendron, L., Moron, J. A., 2015. Implication of delta opioid receptor subtype 2 but not delta opioid receptor subtype 1 in the development of morphine analgesic tolerance in a rat model of chronic inflammatory pain. *Eur J Neurosci* 41, 901--907.
- Becker, J. A., Wallace, A., Garzon, A., Ingallinella, P., Bianchi, E., Cortese, R., Simonin, F., Kieffer, B. L., Pessi, A., 1999. Ligands for kappa-Opioid and ORL1 Receptors Identified from a Conformationally Constrained Peptide Combinatorial Library. *J. Biol. Chem.* 274, 27513-27522.
- Cavanaugh, D. J., Lee, H., Lo, L., Shields, S. D., Zylka, M. J., Basbaum, A. I., Anderson, D. J., 2009. Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9075-9080.

- Celerier, E., Rivat, C., Jun, Y., Laulin, J. P., Larcher, A., Reynier, P., Simonnet, G., 2000. Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: preventive effect of ketamine. *Anesthesiology* 92, 465-472.
- Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M., Yaksh, T. L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53, 55-63.
- Devillers, J. P., Boisserie, F., Laulin, J. P., Larcher, A., Simonnet, G., 1995. Simultaneous activation of spinal antinociceptive system (neuropeptide FF) and pain facilitatory circuitry by stimulation of opioid receptors in rats. *Brain Res* 700, 173-181.
- do Rego, J. C., Leprince, J., Chartrel, N., Vaudry, H., Costentin, J., 2006. Behavioral effects of 26RFamide and related peptides. *Peptides* 27, 2715-2721.
- Elhabazi, K., Ayachi, S., Ilien, B., Simonin, F., 2014. Assessment of morphine-induced hyperalgesia and analgesic tolerance in mice using thermal and mechanical nociceptive modalities. *J Vis Exp*, e51264.
- Elhabazi, K., Humbert, J. P., Bertin, I., Quillet, R., Utard, V., Schneider, S., Schmitt, M., Bourguignon, J. J., Laboureyras, E., Ben Boujema, M., Simonnet, G., Ancel, C., Simonneaux, V., Beltramo, M., Bucher, B., Sorg, T., Meziane, H., Schneider, E., Petit-Demouliere, B., Ilien, B., Bihel, F., Simonin, F., 2017. RF313, an orally bioavailable neuropeptide FF receptor antagonist, opposes effects of RF-amide-related peptide-3 and opioid-induced hyperalgesia in rodents. *Neuropharmacology* 118, 188-198.
- Elhabazi, K., Humbert, J. P., Bertin, I., Schmitt, M., Bihel, F., Bourguignon, J. J., Bucher, B., Becker, J. A., Sorg, T., Meziane, H., Petit-Demouliere, B., Ilien, B., Simonin, F., 2013. Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPFF receptors. *Neuropharmacology* 75C, 164-171.

- Elhabazi, K., Trigo, J. M., Mollereau, C., Mouledous, L., Zajac, J. M., Bihel, F., Schmitt, M., Bourguignon, J. J., Meziane, H., Petit-demouliere, B., Bockel, F., Maldonado, R., Simonin, F., 2012. Involvement of neuropeptide FF receptors in neuroadaptive responses to acute and chronic opiate treatments. *Br J Pharmacol* 165, 424-435.
- Emery, E. C., Luiz, A. P., Wood, J. N., 2016. Nav1.7 and other voltage-gated sodium channels as drug targets for pain relief. *Expert Opin Ther Targets* 20, 975-983.
- Granata, R., Settanni, F., Trovato, L., Gallo, D., Gesmundo, I., Nano, R., Gallo, M. P., Bergandi, L., Volante, M., Alloatti, G., Piemonti, L., Leprince, J., Papotti, M., Vaudry, H., Ong, H., Ghigo, E., 2014. RFamide peptides 43RFa and 26RFa both promote survival of pancreatic beta-cells and human pancreatic islets but exert opposite effects on insulin secretion. *Diabetes* 63, 2380-2393.
- Gunther, T., Dasgupta, P., Mann, A., Miess, E., Kliwer, A., Fritzwanker, S., Steinborn, R., Schulz, S., 2017. Targeting multiple opioid receptors - improved analgesics with reduced side effects? *Br J Pharmacol*.
- Han, S. K., Dong, X., Hwang, J. I., Zylka, M. J., Anderson, D. J., Simon, M. I., 2002. Orphan G protein-coupled receptors MrgA1 and MrgC11 are distinctively activated by RF-amide-related peptides through the Galpha q/11 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14740-14745.
- Hinuma, S., Shintani, Y., Fukusumi, S., Iijima, N., Matsumoto, Y., Hosoya, M., Fujii, R., Watanabe, T., Kikuchi, K., Terao, Y., Yano, T., Yamamoto, T., Kawamata, Y., Habata, Y., Asada, M., Kitada, C., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., Tanaka, M., Ibata, Y., Fujino, M., 2000. New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol* 2, 703-708.

- Jhamandas, J. H., MacTavish, D., 2003. Central administration of neuropeptide FF causes activation of oxytocin paraventricular hypothalamic neurones that project to the brainstem. *J Neuroendocrinol* 15, 24-32.
- Jhamandas, J. H., Simonin, F., Bourguignon, J. J., Harris, K. H., 2007. Neuropeptide FF and neuropeptide VF inhibit GABAergic neurotransmission in parvocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R1872-1880.
- Lake, J. R., Hammond, M. V., Shaddox, R. C., Hunsicker, L. M., Yang, H. Y., Malin, D. H., 1991. IgG from neuropeptide FF antiserum reverses morphine tolerance in the rat. *Neurosci Lett* 132, 29-32.
- Laurent, P., Becker, J. A., Valverde, O., Ledent, C., de Kerchove d'Exaerde, A., Schiffmann, S. N., Maldonado, R., Vassart, G., Parmentier, M., 2005. The prolactin-releasing peptide antagonizes the opioid system through its receptor GPR10. *Nat Neurosci* 8, 1735-1741.
- Liu, Q., Guan, X. M., Martin, W. J., McDonald, T. P., Clements, M. K., Jiang, Q., Zeng, Z., Jacobson, M., Williams, D. L., Jr., Yu, H., Bomford, D., Figueroa, D., Mallee, J., Wang, R., Evans, J., Gould, R., Austin, C. P., 2001. Identification and characterization of novel mammalian neuropeptide ff- like peptides that attenuate morphine-induced antinociception. *J Biol Chem* 276, 36961-36969.
- Martinez-Lorenzana, G., Espinosa-Lopez, L., Carranza, M., Aramburo, C., Paz-Tres, C., Rojas-Piloni, G., Condes-Lara, M., 2008. PVN electrical stimulation prolongs withdrawal latencies and releases oxytocin in cerebrospinal fluid, plasma, and spinal cord tissue in intact and neuropathic rats. *Pain* 140, 265-273.
- Moriya, R., Sano, H., Umeda, T., Ito, M., Takahashi, Y., Matsuda, M., Ishihara, A., Kanatani, A., Iwaasa, H., 2006. RFamide peptide QRFP43 causes obesity with hyperphagia and reduced thermogenesis in mice. *Endocrinology* 147, 2916-2922.

- Mosberg, H. I., Yeomans, L., Anand, J. P., Porter, V., Sobczyk-Kojiro, K., Traynor, J. R., Jutkiewicz, E. M., 2014. Development of a bioavailable mu opioid receptor (MOPr) agonist, delta opioid receptor (DOPr) antagonist peptide that evokes antinociception without development of acute tolerance. *J Med Chem* 57, 3148-3153.
- Oberling, P., Stinus, L., Le Moal, M., Simonnet, G., 1993. Biphasic effect on nociception and antinociceptive activity of the neuropeptide FF (FLFQPQRFamide) in the rat. *Peptides* 14, 919-924.
- Quillet, R., Ayachi, S., Bihel, F., Elhabazi, K., Ilien, B., Simonin, F., 2016. RF-amide neuropeptides and their receptors in Mammals: Pharmacological properties, drug development and main physiological functions. *Pharmacol Ther* 160, 84-132.
- Reuben, D. B., Alvanzo, A. A., Ashikaga, T., Bogat, G. A., Callahan, C. M., Ruffing, V., Steffens, D. C., 2015. National Institutes of Health Pathways to Prevention Workshop: the role of opioids in the treatment of chronic pain. *Ann Intern Med* 162, 295-300.
- Roeckel, L. A., Le Coz, G. M., Gaveriaux-Ruff, C., Simonin, F., 2016. Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. *Neuroscience*.
- Scherrer, G., Imamachi, N., Cao, Y. Q., Contet, C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B. L., Basbaum, A. I., 2009. Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* 137, 1148-1159.
- Simonin, F., Schmitt, M., Laulin, J.-P., Laboureyras, E., Jhamandas, J. H., MacTavish, D., Matifas, A., Mollereau, C., Laurent, P., Parmentier, M., Kieffer, B. L., Bourguignon, J.-J., Simonnet, G., 2006. RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 466-471.
- Simonnet, G., Rivat, C., 2003. Opioid-induced hyperalgesia: abnormal or normal pain? *Neuroreport* 14, 1-7.

- Stinus, L., Allard, M., Gold, L., Simonnet, G., 1995. Changes in CNS neuropeptide FF-like material, pain sensitivity, and opiate dependence following chronic morphine treatment. *Peptides* 16, 1235-1241.
- Takayasu, S., Sakurai, T., Iwasaki, S., Teranishi, H., Yamanaka, A., Williams, S. C., Iguchi, H., Kawasaki, Y. I., Ikeda, Y., Sakakibara, I., Ohno, K., Ioka, R. X., Murakami, S., Dohmae, N., Xie, J., Suda, T., Motoike, T., Ohuchi, T., Yanagisawa, M., Sakai, J., 2006. A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7438-7443.
- Vicente-Sanchez, A., Segura, L., Pradhan, A. A., 2016. The delta opioid receptor tool box. *Neuroscience* 338, 145-159.
- Yamamoto, T., Miyazaki, R., Yamada, T., 2009. Intracerebroventricular administration of 26Rfa produces an analgesic effect in the rat formalin test. *Peptides* 30, 1683-1688.
- Yamamoto, T., Wada, T., Miyazaki, R., 2008. Analgesic effects of intrathecally administered 26Rfa, an intrinsic agonist for GPR103, on formalin test and carrageenan test in rats. *Neuroscience* 157, 214-222.
- Yang, H. Y., Fratta, W., Majane, E. A., Costa, E., 1985. Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7757-7761.
- Zhu, Y., King, M. A., Schuller, A. G., Nitsche, J. F., Reidl, M., Elde, R. P., Unterwald, E., Pasternak, G. W., Pintar, J. E., 1999. Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. *Neuron* 24, 243-252.

Figure legends

Figure 1. Fentanyl induced hyperalgesia in RF-amide receptors KO mice. Each line of RF-amide receptor KO mice and their WT counterpart received one fentanyl injection (240µg/kg, sc.). The following days nociceptive threshold was measured using TIT, and hyperalgesia was express as AUC. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, n = 8-10. *p < 0.05 by Fisher's test as compared with the WT group.

Figure 2. Thermal and mechanical nociceptive thresholds of WT and GPR103a KO mice. Basal nociceptive threshold of WT (○) and KO (●) GPR103a mice was assessed using TIT (A) and TPT (B). The insert shows raw data. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, n = 15-21. ***p < 0.001 by Unpaired T-test as compared with the WT group.

Figure 3. Thermal and mechanical nociceptive thresholds of WT and GPR103a KO mice upon chronic daily morphine administration. Thermal and mechanical nociceptive thresholds of the animals were measured everyday (D+1 to D+8) before morphine (10mg/kg, sc.) or saline administration by using TIT (A) or TPT (B). D0 represent basal nociceptive threshold. The insert shows hyperalgesia expressed in AUC. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, n = 7-12. ***p < 0.001 by Fisher's test.

Figure 4. Time course of morphine analgesic effect in WT and GPR103a KO mice upon chronic morphine treatment. Morphine analgesia (5mg/kg, sc.) was followed over time using TIT (A) or TPT (B) every 30min until return to the basal threshold. Tolerance was revealed by comparing the analgesia obtained in naïve mice (D0) and after chronic morphine treatment (D+8; 10mg/kg, sc.). The insert shows analgesia expressed in maximal effect obtained. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, n = 7-12.***p < 0.001 by Fisher's test.

Figure 5. Effect of icv. injection of 26RFa on nociceptive threshold of WT and GPR103a KO mice. The effect of icv. injection of saline (S) or 26RFa (3nmol) on nociceptive threshold was assessed every 15 min using TIT. The insert shows hyperalgesia expressed in AUC. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, n = 4-9. *p < 0.05; ***p < 0.001 by Fisher's test as compared with the WT group.

Figure 6. Antagonist activity of RF1156 on intracellular calcium mobilization assay induced by 26RFa in GPR103 expressing cells. Dose response curves of 26RFa were performed in absence or presence of different concentrations of RF1156 (A) and from these experiments a pA₂ value was determined (B). Peak response amplitudes were normalized to basal and maximal (digitonin-permeabilized cells) fluorescence levels. Data points are from a representative experiment performed in triplicate. EC₅₀ value $\pm$ S.E.M for 26RFa was 0.75 $\pm$ 0.025 nM (from two experiments performed in triplicate).

Figure 7. 26RFa-induced hyperalgesia is blocked by RF1156 in mice. (A) icv. (B) ith. injection. The effect of RF1156 (3 nmol) icv. (A) or ith. (B) injections on 26RFa (3 nmol) hyperalgesia was assessed every 15 min. using TIT. The insert shows hyperalgesia expressed in AUC. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, n = 6-10. *p < 0.05; **p < 0.01 by Fisher's test.

Figure 8. RF1156 selectively blocks blood pressure effects of 26RFa. Mean arterial (A) or blood pressure (B) and heart rate (C) were followed after icv. injection of 26RFa (10 nmol) or NPFF (10 nmol) in absence or presence of RF1156 (10 nmol). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, n = 6. *p < 0.05 by Fisher's test as compared with the saline group.

Figure 9. RF1156 prevents the development of fentanyl-induced hyperalgesia in rats and mice. Effect of RF1156 on fentanyl induced analgesia and hyperalgesia on rats (A) using Randall-Selitto test and mice (B) using TIT. The insert shows hyperalgesia expressed in AUC. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, n=8 rats, n=8-10 mice. (A) ***p < 0.001 by Bonferroni's test as compared to the fentanyl group. (B) *p < 0.05, **p < 0.01; ***p < 0.001 by Fisher's test as compared with the saline or fentanyl group.

Figure 10. RF1156 effect on morphine-induced hyperalgesia and analgesic tolerance in mice. Hyperalgesia induced by chronic morphine administration (10mg/kg, sc. per day) was assessed using TIT (A) and TPT (B). Mice received saline or RF156 (5mg/kg, sc.) 20 min before morphine injection. The insert shows hyperalgesia expressed in AUC. (C, D) Analgesia induced by morphine (5mg/kg, sc.) was revealed using TPT. The insert shows analgesia maximal effect. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, n = 8-10. *p < 0.05; ***p < 0.001 by Fisher's test as compared with the saline group.

Figure 11. Carrageenan-induced persistent inflammatory pain observed in WT is reduced in GPR103a KO mice. Carrageenan-induced tactile allodynia (A) and thermal hyperalgesia (B) measured with Von Frey filament or Plantar Test. The insert shows hyperalgesia expressed in AUC. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, n = 8-9. *p < 0.05 by Unpaired T-test as compared with the WT group.

Figure 12. Pharmacological blockade of GPR103 by RF1156 in mice prevents carrageenan-induced thermal hyperalgesia. Hyperalgesia induced by carrageenan injection in the tail was assessed using TIT. Mice received saline (S) or RF1156 injection (5mg/kg s.c) 20 min before carrageenan injection in the tail. The insert shows hyperalgesia expressed in

AUC. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, n = 10-20. *p < 0.05 by Unpaired T-test as compared with the saline group.

Figure 13. Fluorescent In situ Hybridization in WT (A) and KO (B) in spinal cord. FISH of GPR103a (red), 26RFa (green), MOR (blue) and DOR (blue) receptors in superficial layers of spinal cord dorsal horn of WT (A, C) and KO (B) mice. Nuclei are visualized using DAPI staining (grey). High magnification images show targets expressions in different region of spinal cord dorsal horn. GPR103a-DOR strong colocalization is visualized (C).

Figure 14. Fluorescent ISH of GPR103a, 26RFa, MOR (A) and DOR (B) receptors in DRG of WT mice. Expression of GPR103a (red), 26RFa (green), MOR (blue) and DOR (blue) receptors using FISH. Nuclei are visualized using DAPI staining (grey). High magnification images show targets expressions in different region of DRG. GPR103a-DOR colocalization is visualized (B).

Figure 15. Effect 26RFa on spinal cord (A, B) and PVN (C, D) neurons

(A, B) Facilitation of glutamatergic mEPSCs by 26RFa in spinal cord. In a neuron recorded from inner lamina II, 26RFa (5 μ M,) reversibly increased the apparent frequency of glutamatergic mEPSCs (A). 26RFa shifted the distribution of inter-event intervals to the left, and the distribution of amplitudes to the right, indicating an increase in mEPSC frequency and amplitude (B). All data are from the same neuron. HP, -60 mV. (C,D) 26RFa decreases frequency of mIPSCs. Cumulative probability analysis of mIPSCs showing the distribution of the inter-event interval of mIPSCs during control conditions (squares), in the presence of 26RFa (triangles) and upon washout (circles) (C). The right part represent average frequency of mIPSCs under control conditions, in the presence of 26RFa and upon washout (n=9; *P<0.05, significant difference). RF1156 abolishes 26RFa-mediated decrease of mIPSC

frequency (D). Cumulative probability analysis of mIPSCs showing the distribution of the inter-event interval of mIPSCs during RF1156 alone (squares), in the presence of 26RFa plus RF1156 (triangles). The right part represent average frequency of mIPSCs under the same two conditions (n=10).

Figure 16. Expression of transcripts for RF-amide and opioid receptors and peptides in spinal cord and DRG of saline and morphine treated mice. Expression of transcripts for RF-amide and opioid receptors and peptides was measured in spinal cord (A) and DRG (B) as described in Material and Methods. Results are presented as fold change. Values are means $\pm$ S.E.M, n = 6-7. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ Fisher's test as compared to saline treated animals.

Table 1. List of primers used.

	Sequence (5'-3')
Actine	GACGGCCAGGTCATCACTAT
	CCACCGATCCACACAGAGTA
MOR	GAGCCACAGCCTGTGCCCT
	CGTGCTAGTGGCTAAGGCATC
DOR	GCTCGTCATGTTTGGCATC
	AAGTACTTGGCGCTCTGGAA
KOR	CCTGGCATCATCTGTTGGTA
	GGAAACTGCAAGGAGCATTC
PENK	AGCCAGGACTGCGCTAAAT
	AGGCAGCTGTCCTTCACATT
Pdyn	ATGATGAGACGCCATCCTTC
	TTAATGAGGGCTGTGGGAAC
POMC	ATGCCGAGATTCTGCTACAGT
	TCCAGCGAGAGGTCGAGTTT
NPFFR1	CCACAACCCTCGTGGACAAC
	CCTGTACCAAGCCGCTCAT
NPFFR2	GCTTCCGTCTTCACCTTGGTT
	ATCACAATCGTGACAAAGGCT
103a	CCCGAAGGGCTTTCACAATCT
	CCCCTCTTCCAAACAGCAG
103b	TGATGGTGACAGTCGTGGTT
	AGCAAAAATCATCTTGATTGTGA
GPR54	CTGGTCGGAACTCATTGGT
	GTAAGAGGAGTGCGGTGAAGG
GPR10	AGGGGTTGATCGTGATGCTG
	TTGCCAATGAGGAAGTTGGTC
NPFF	TGGACACACCTAGAAGGAGCC
	CCTGCGGATTTAGCTGTTCC
NPVF	TCACAGCAAAGAAGGTGACG
	CAGGGGCTGGACTCATCTTA
Kiss	TCCTCTGTGTCGCCACCTATG
	CTTTTCCCAGGCATTAACGAGT
QRFP	TCTGCCGTCCTTACCATCTCA
	TCTCAGGACTGTCCCAAAGGAG

Table 2. Ki values of putative GPR103 ligands for human GPR103

Compound	Ki (nM) $\pm$ S.E.M.
----------	----------------------

RF1156	11 ± 2
RF 1153	404 ± 5
RF1132	624 ± 50
RF1148	123 ± 20
RF 1150	185 ± 17

Values are means of at least 3 independent experiments performed in duplicate.

Table 3. Ki values of RF1156 for RF-amide, opioid and OFQ receptors

Receptor	Ki values $\pm$ S.E.M. of RF1156 (μ M)
GPR103	0.011 ± 0.002
GPR10	> 25
GPR54	> 25
NPFFR1	14 ± 2
NPFFR2	> 25
MOR	> 25
DOR	> 25
KOR	> 25
NOP	> 25

Values are means of at least 3 independent experiments performed in duplicate.

Figure 1

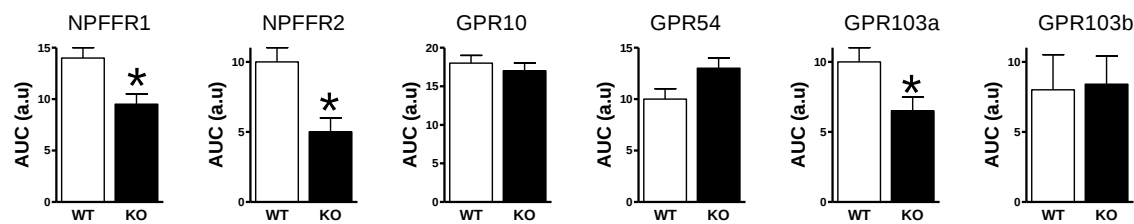


Figure 2

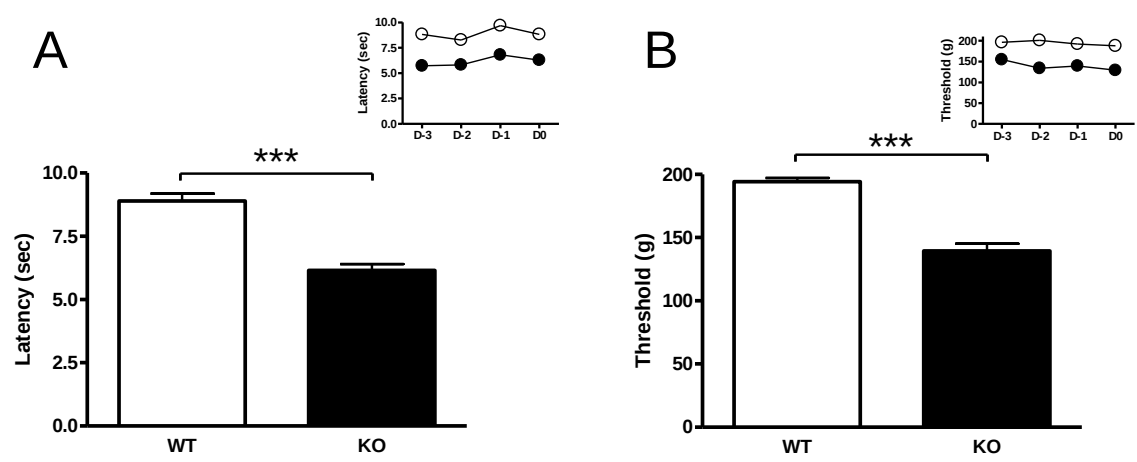


Figure 3

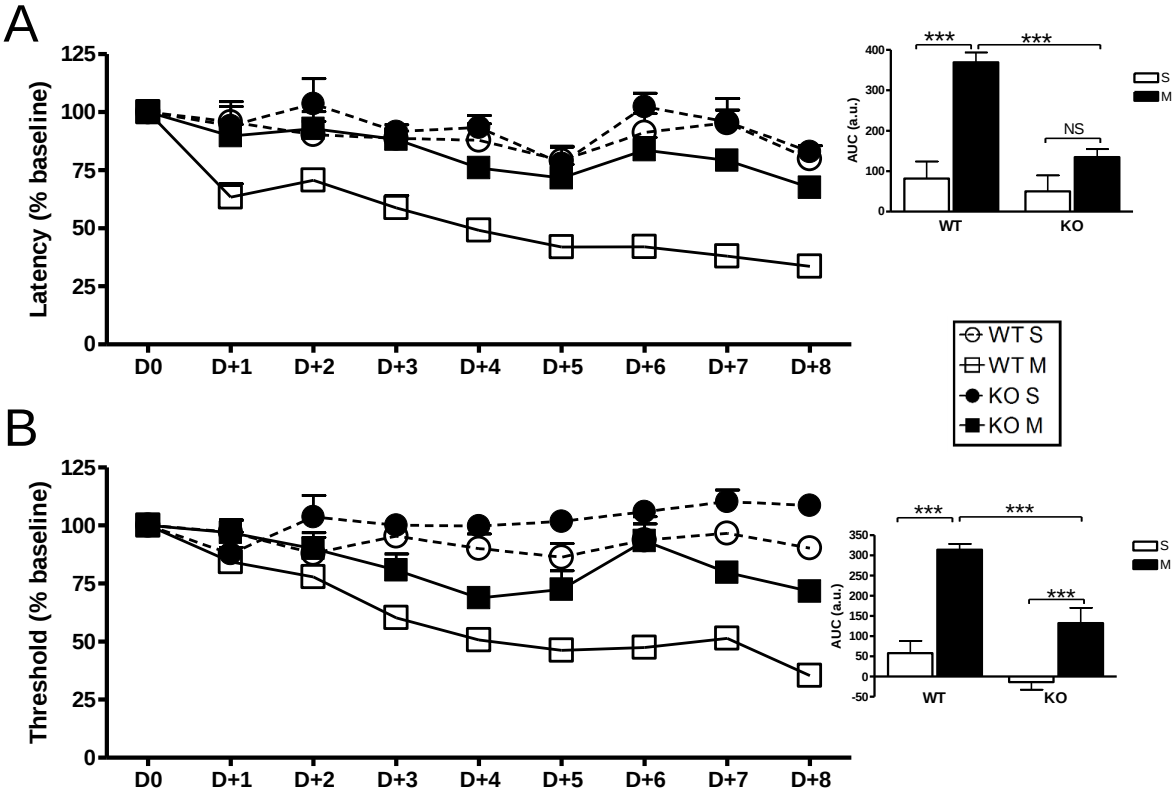


Figure 4

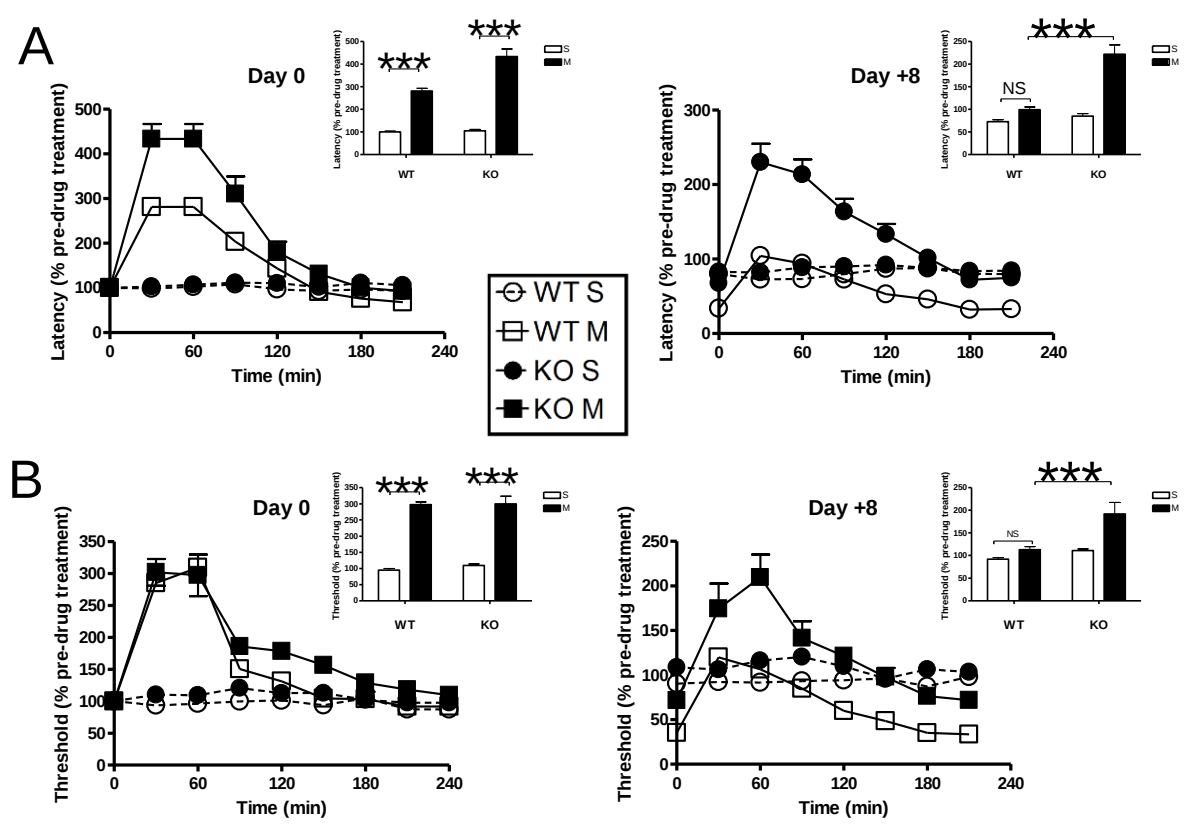


Figure 5

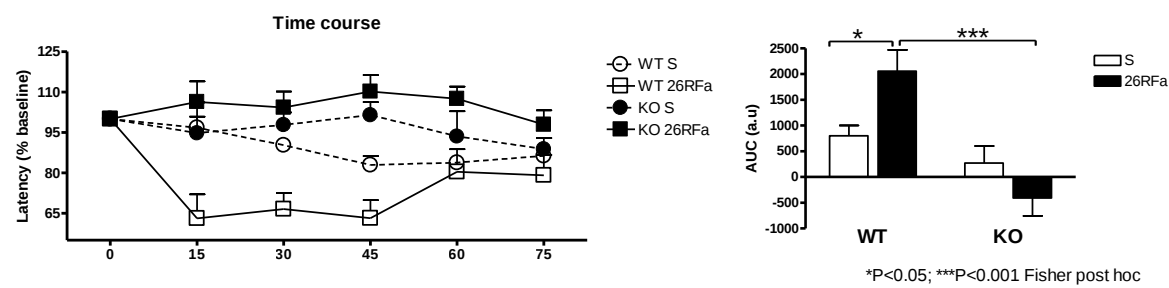


Figure 6

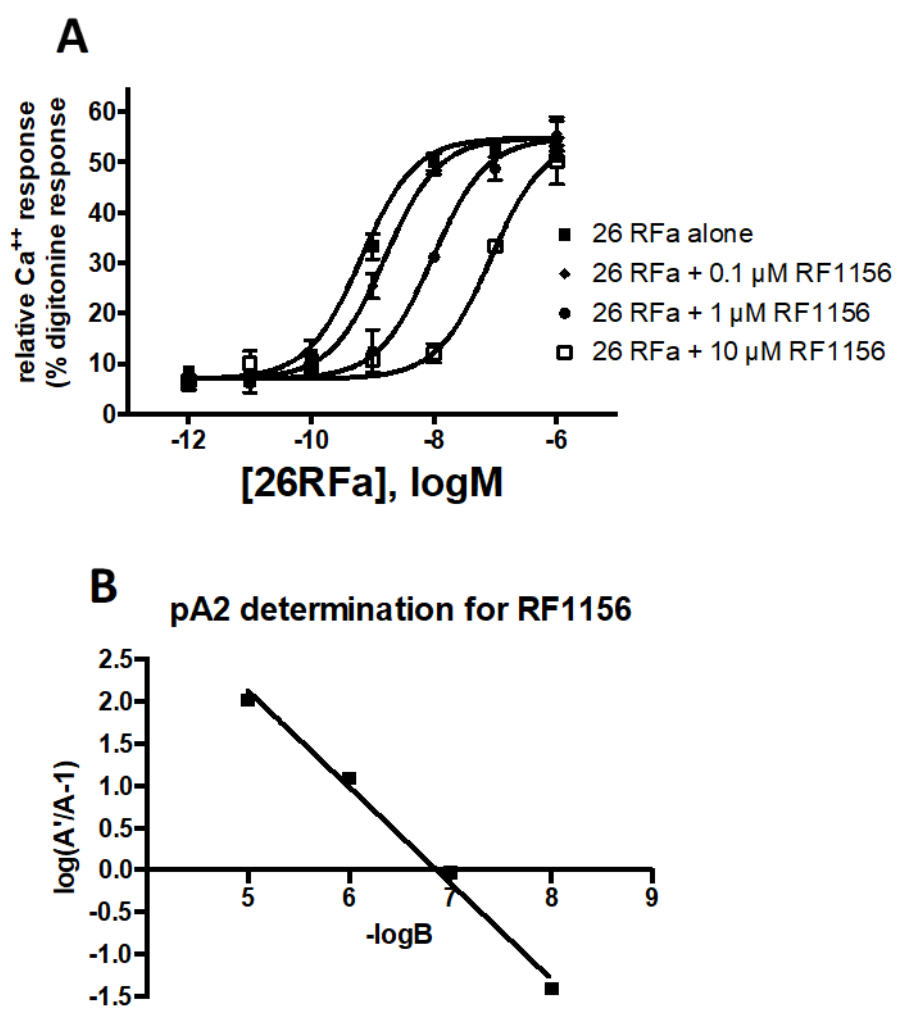


Figure 7

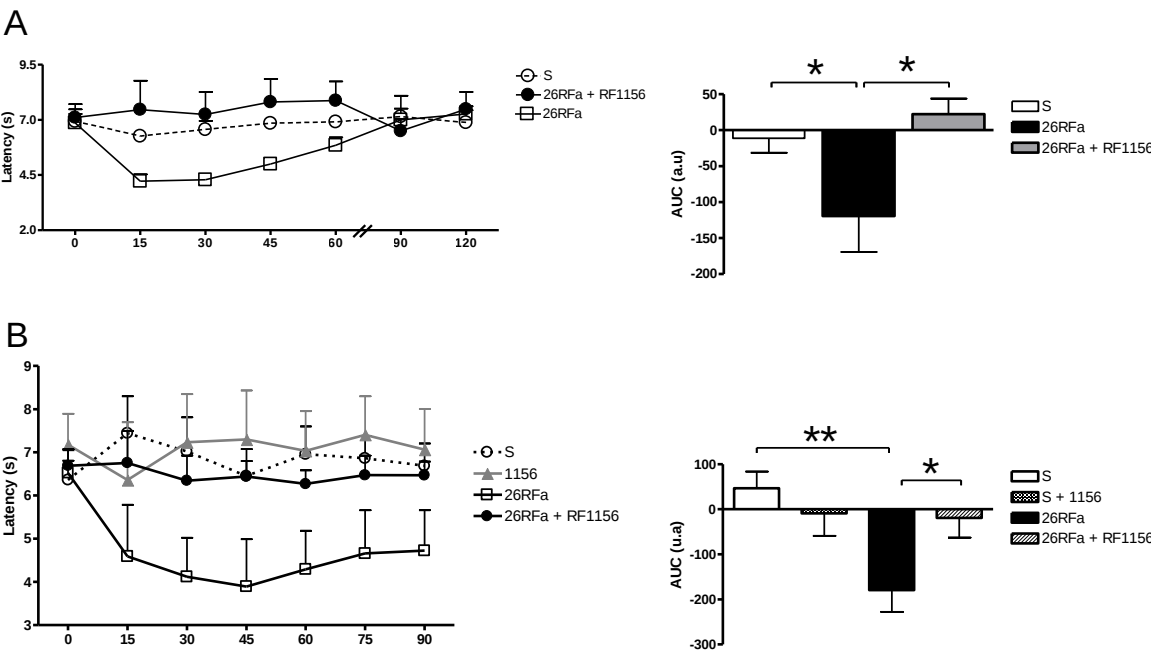
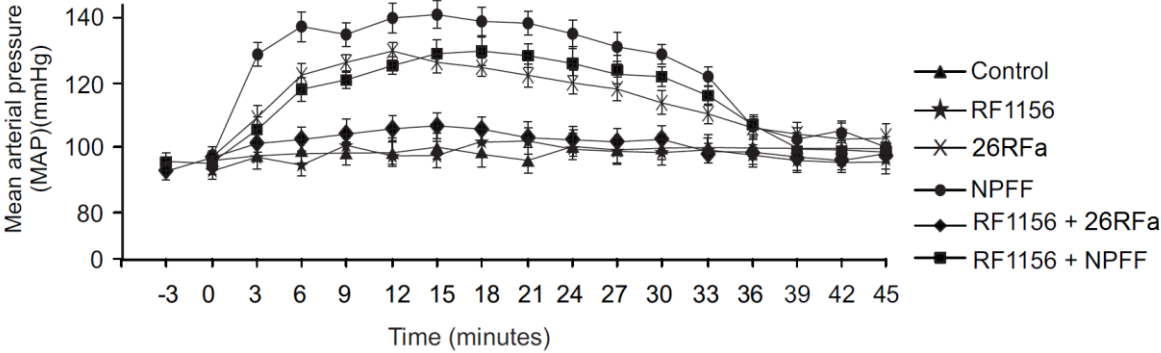
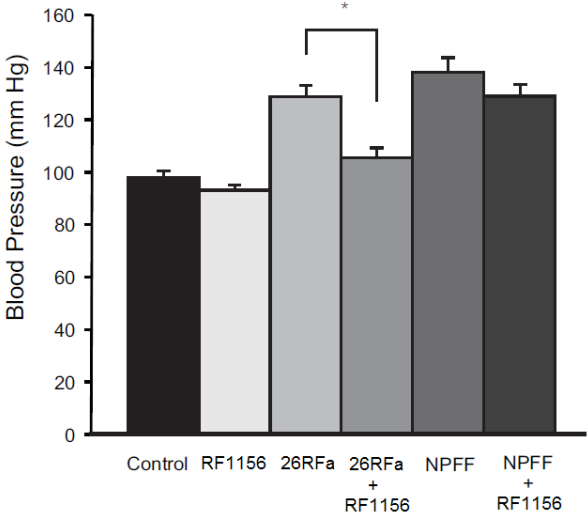


Figure 8

A



B



C

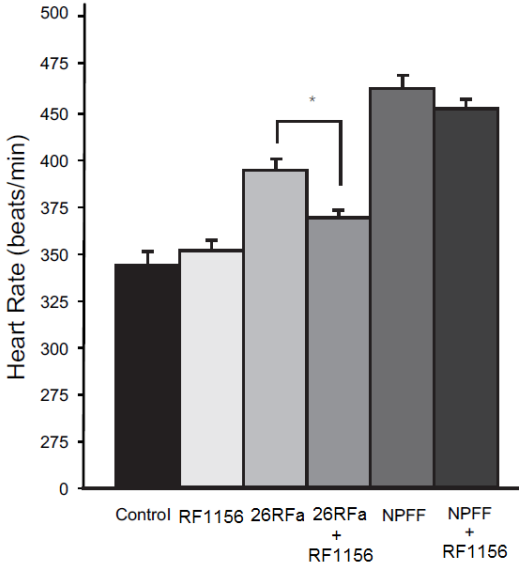


Figure 9

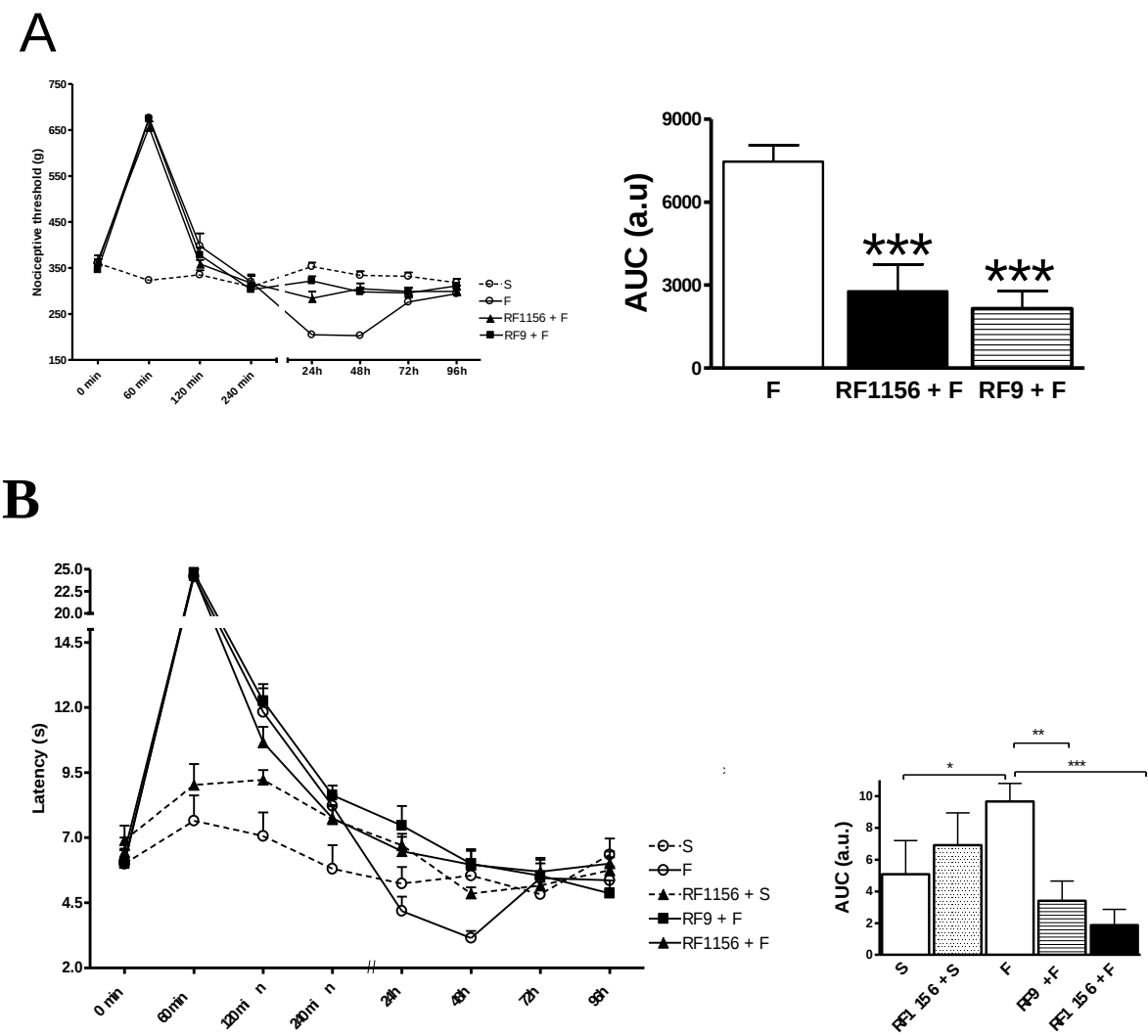


Figure 10

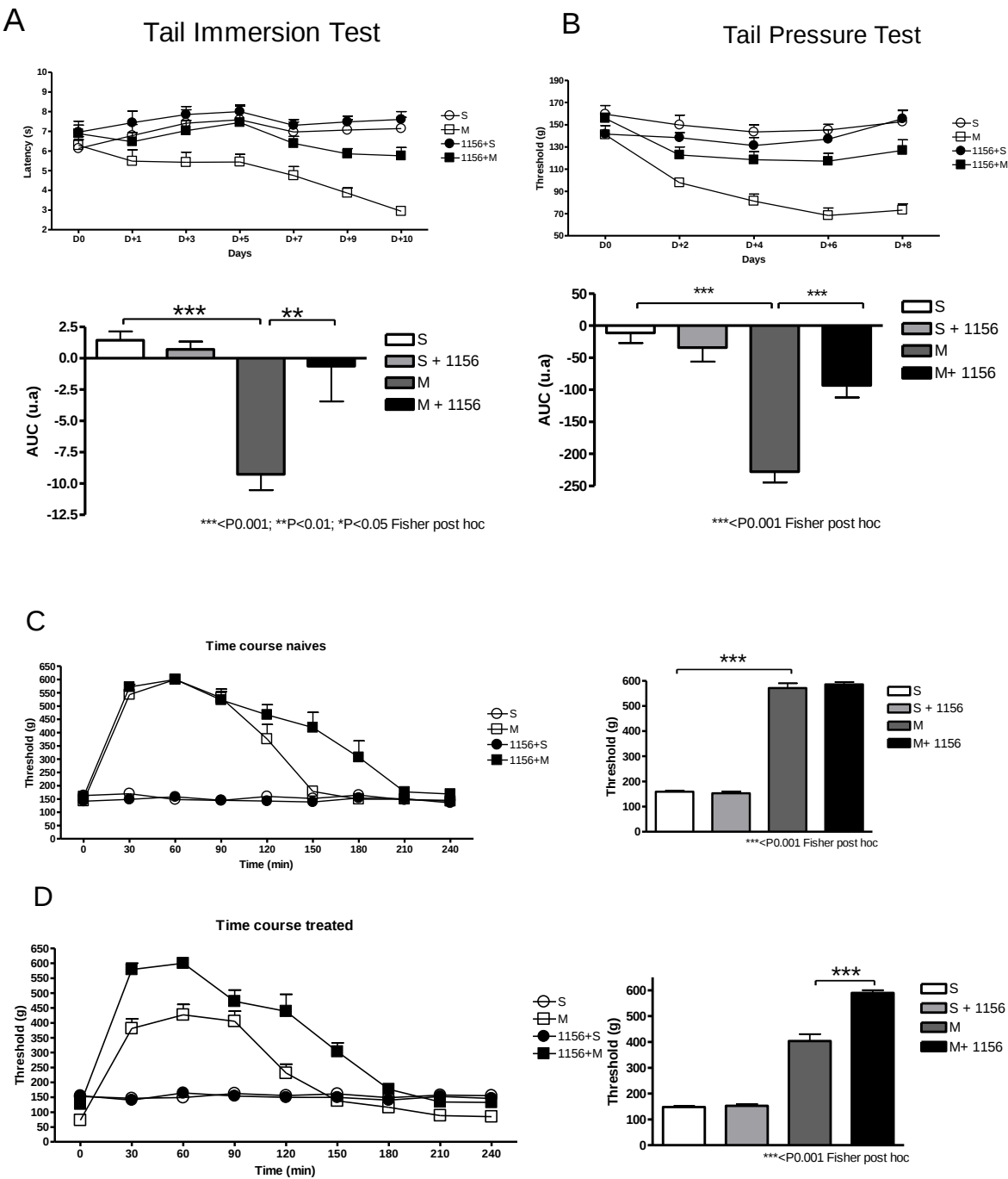


Figure 11

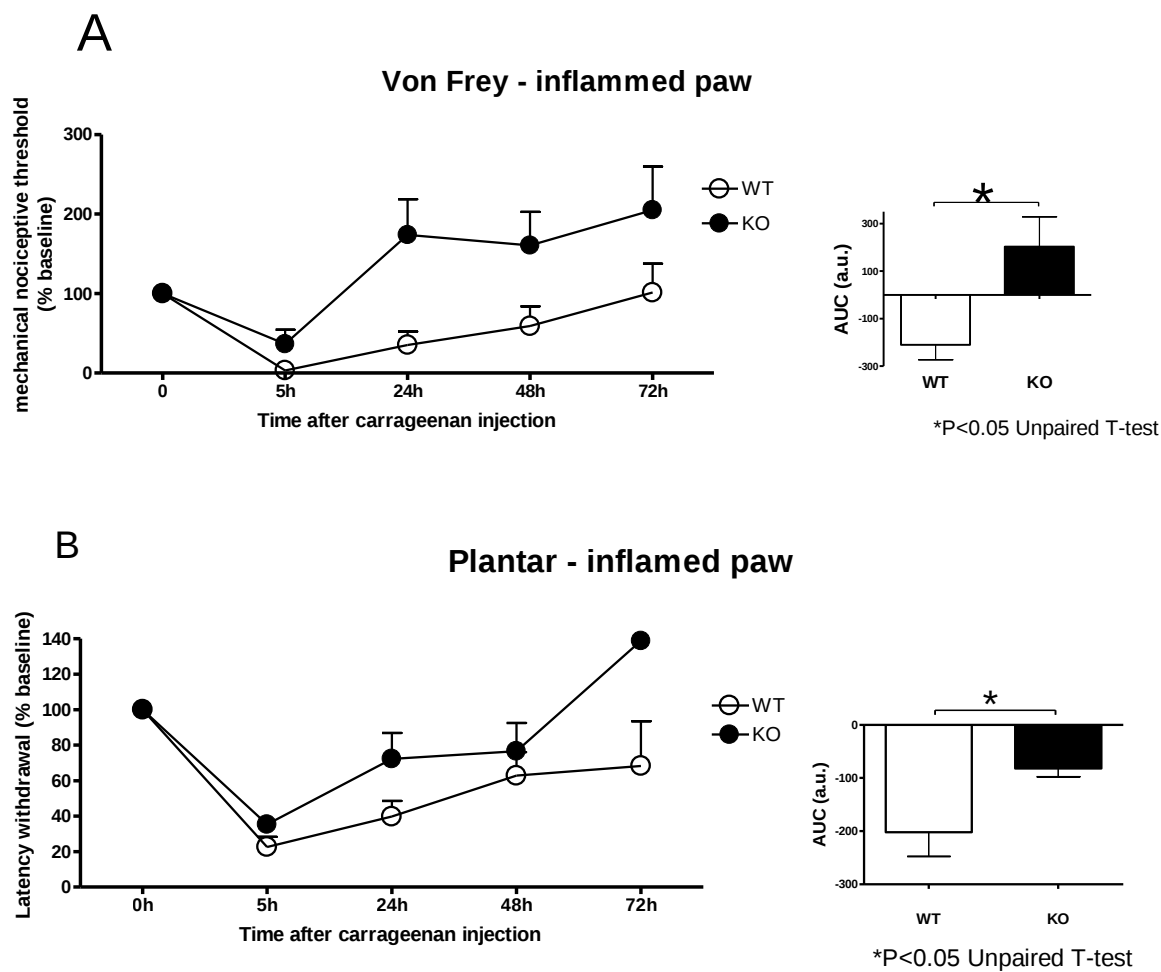


Figure 12

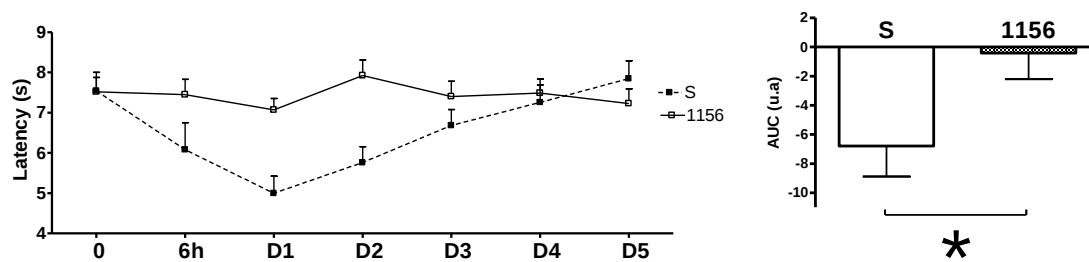
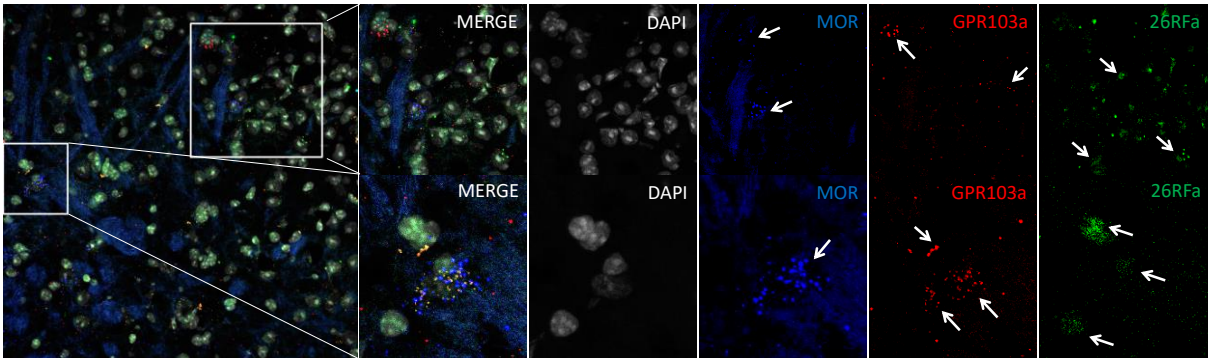
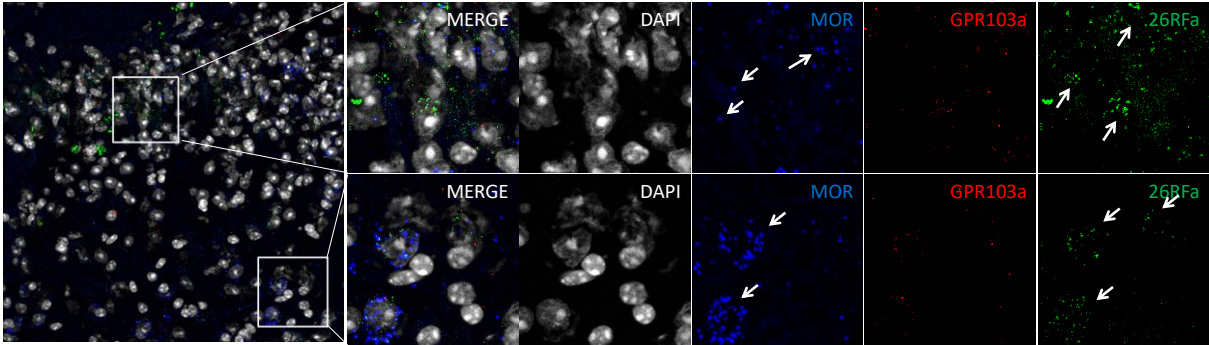


Figure 13

A WT



B KO



C WT DOR

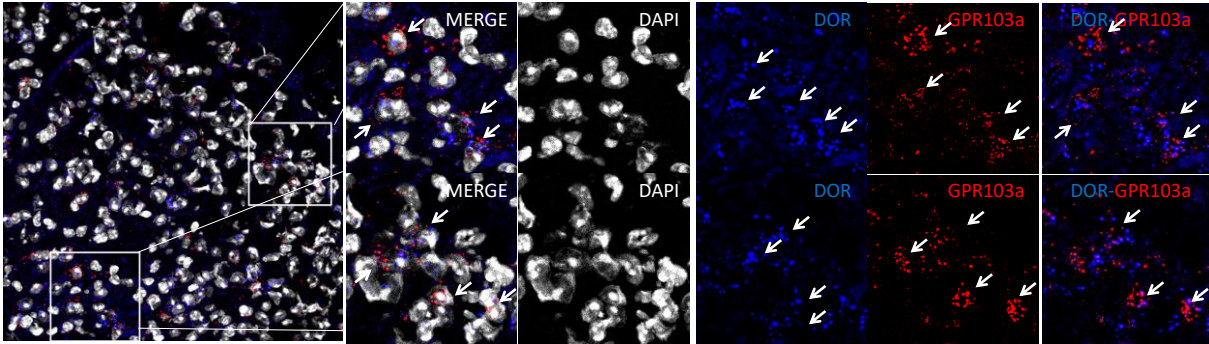
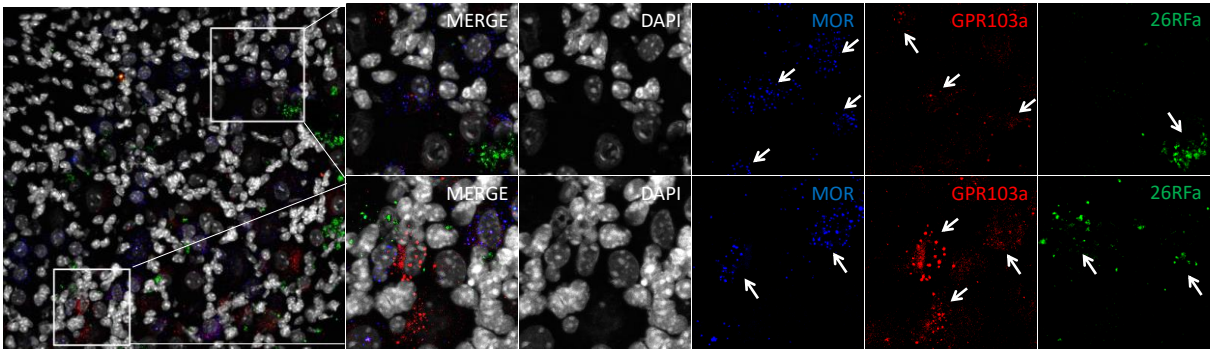


Figure 14

A



B

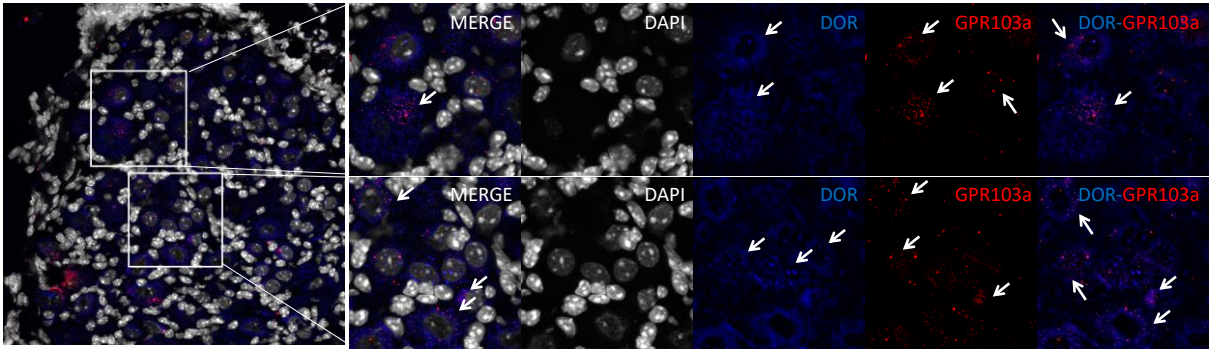


Figure 15

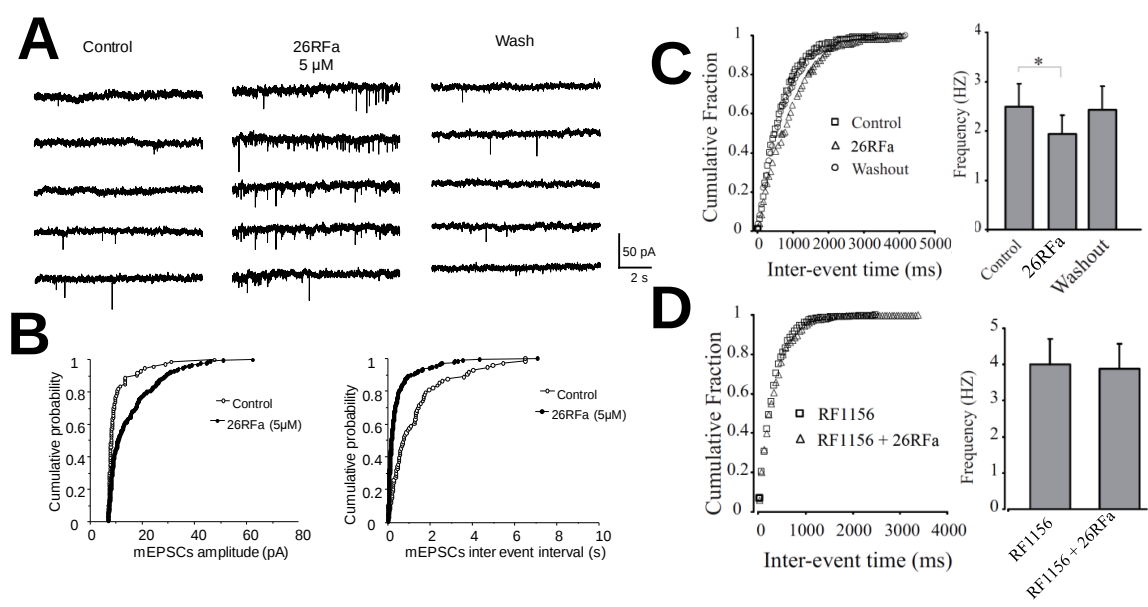
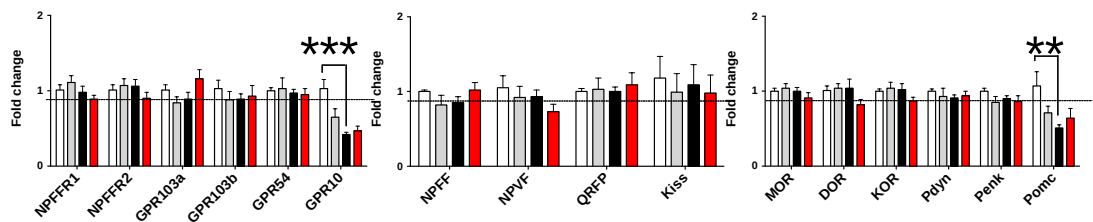
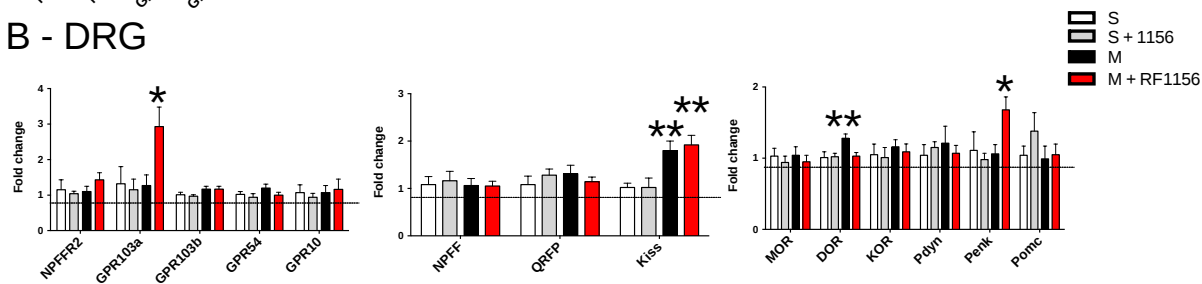


Figure 16

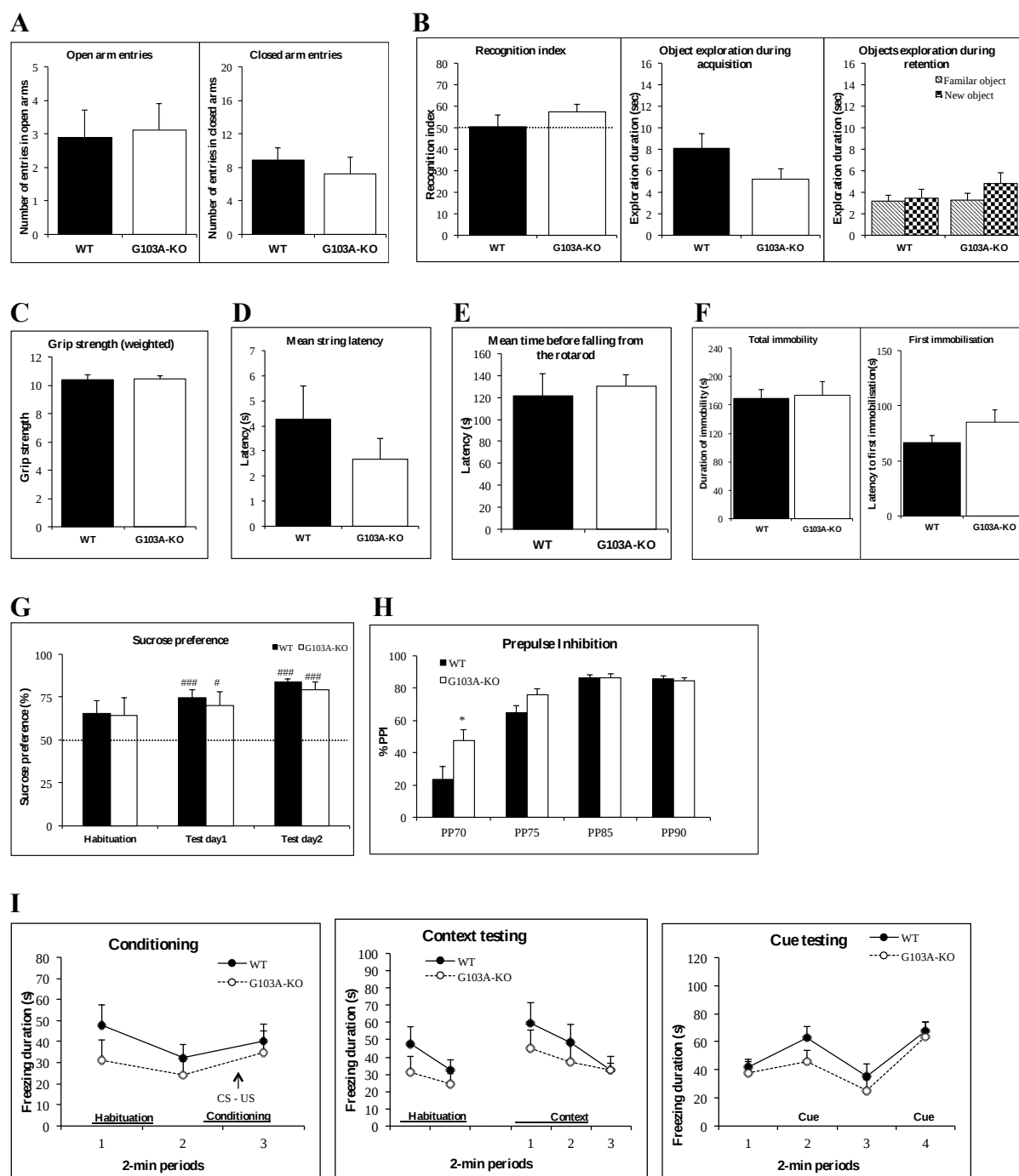
A - SC



B - DRG

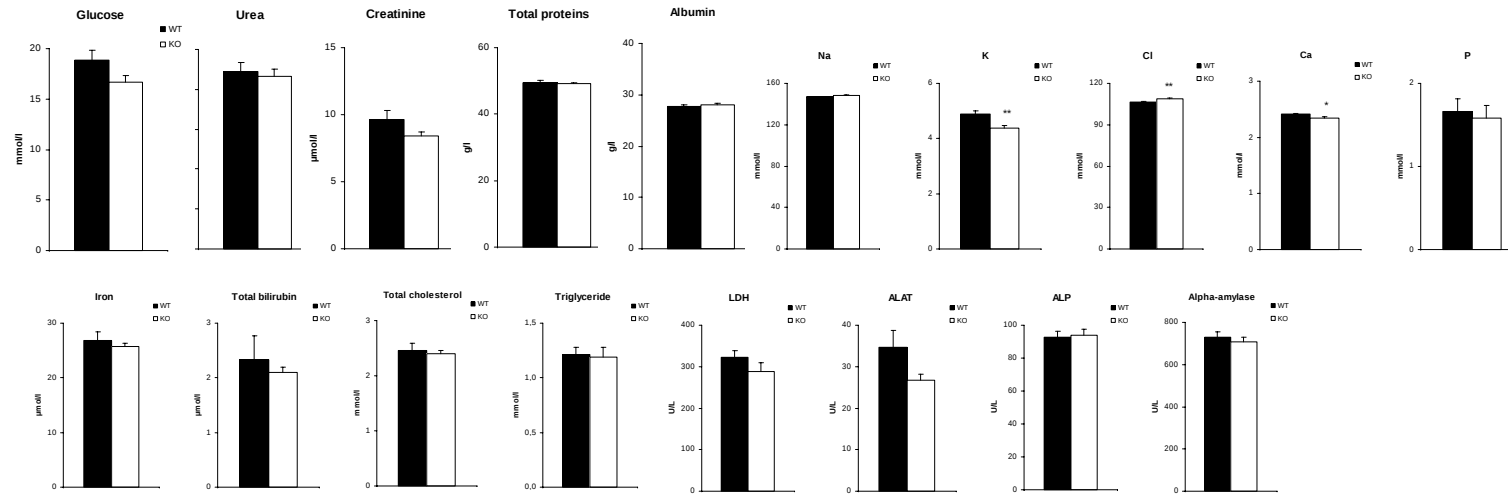


Supplementary Figures

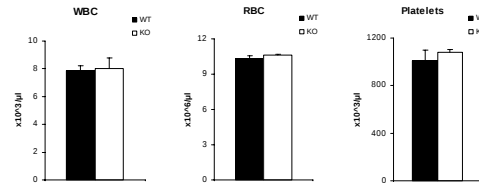


SI Figure 1. General behavioral phenotyping of GPR103a-KO mice. No difference between WT and GPR103a KO mice was observed for all the parameters that were evaluated.

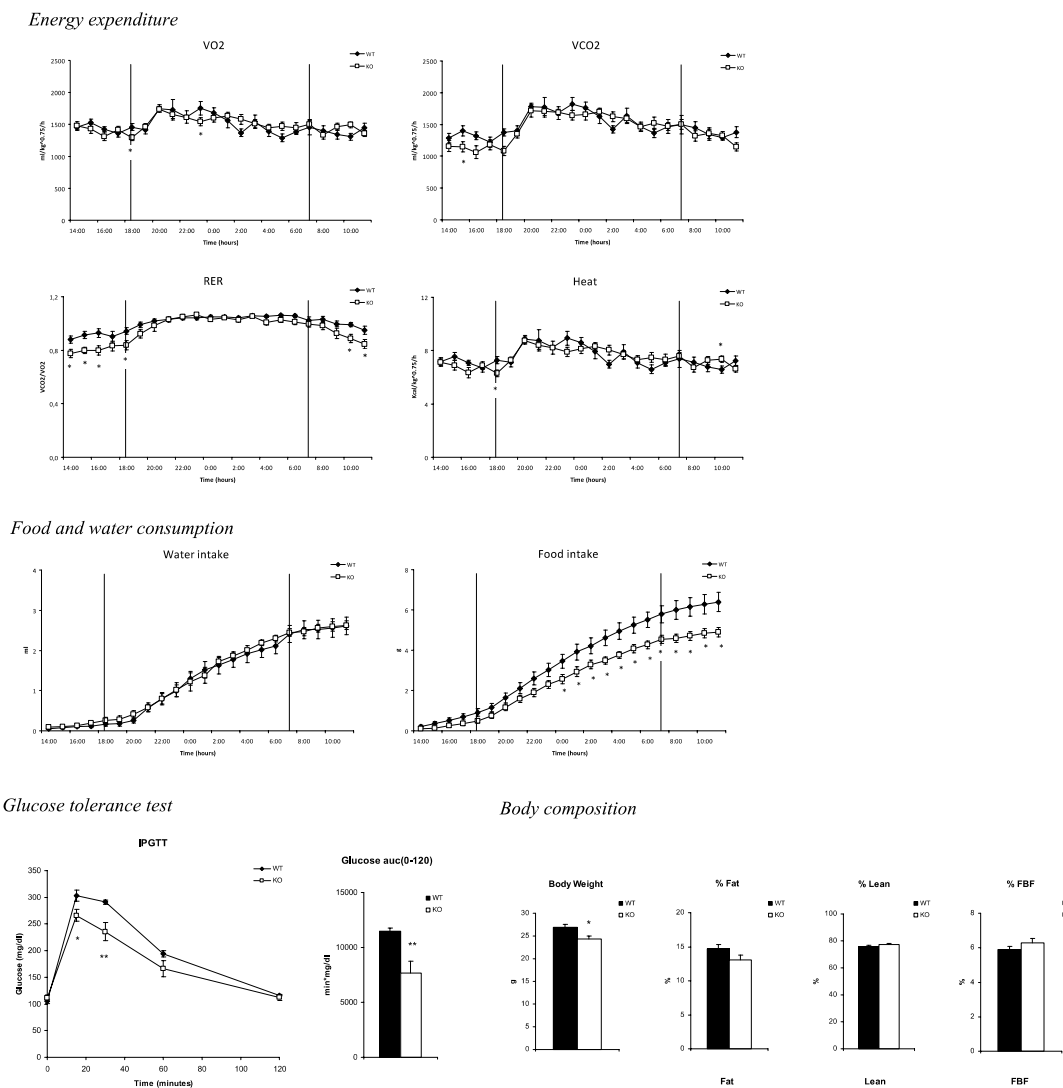
Blood chemistry



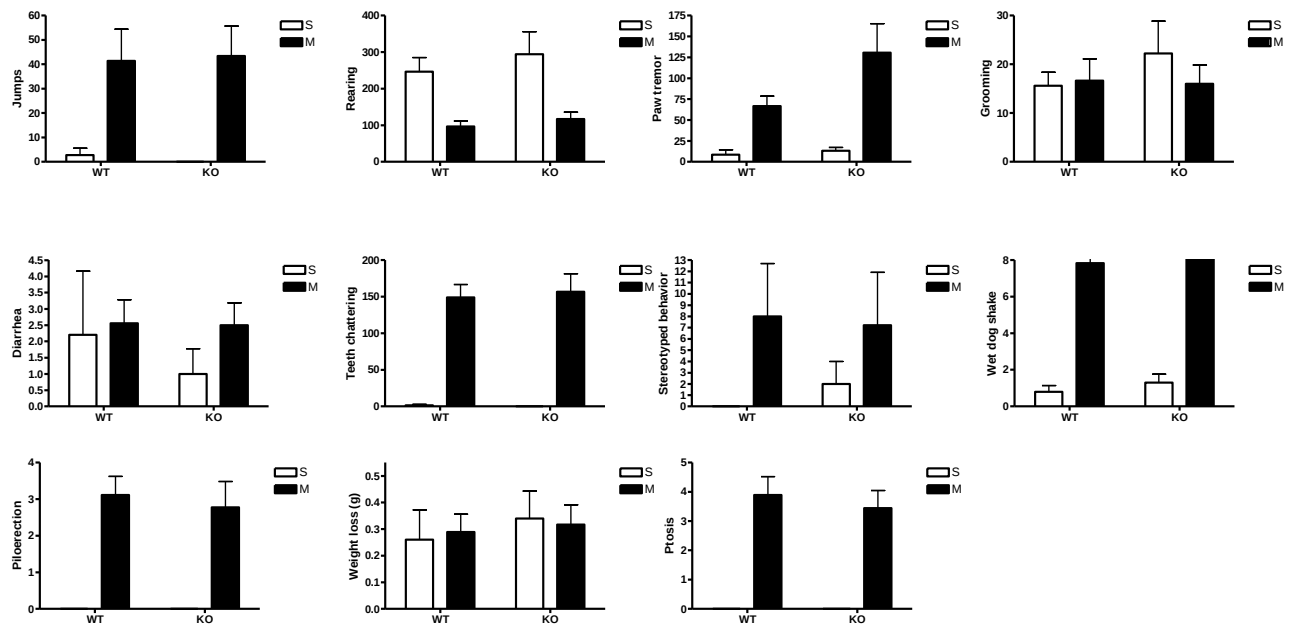
Blood hematology



SI Figure 2. Blood chemistry and hematology in WT and GPR103 KO mice. No difference between WT and GPR103a KO mice was observed for all the parameters that were evaluated.

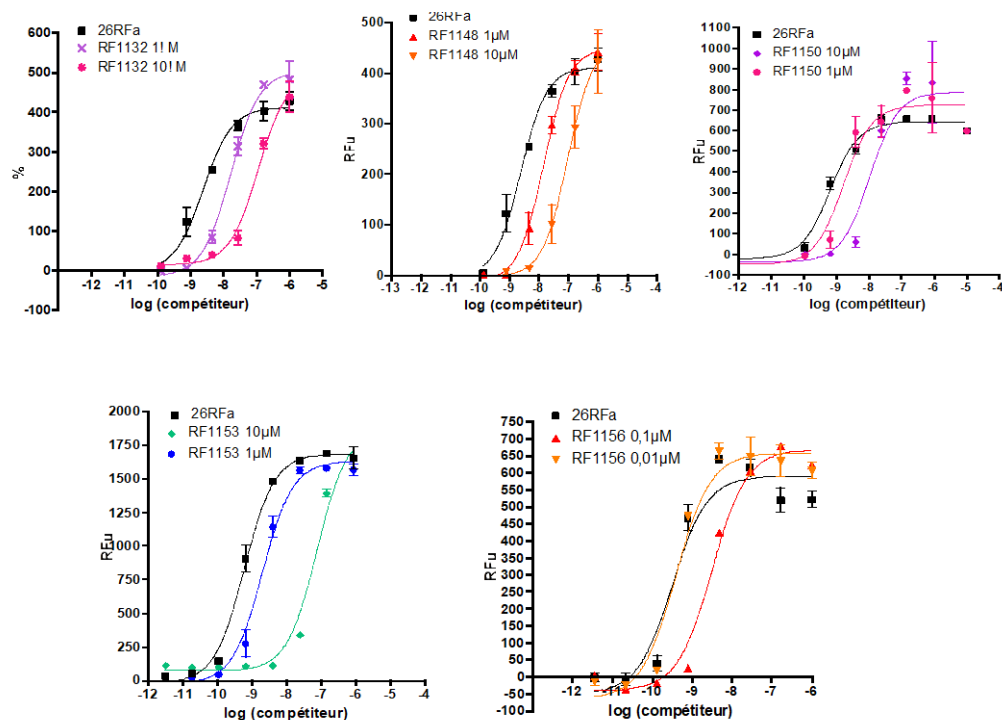


SI Figure 3. Metabolic phenotyping of WT and GPR103 KO mice. GPR103a KO mice ate less and displayed improved glucose tolerance than WT mice.

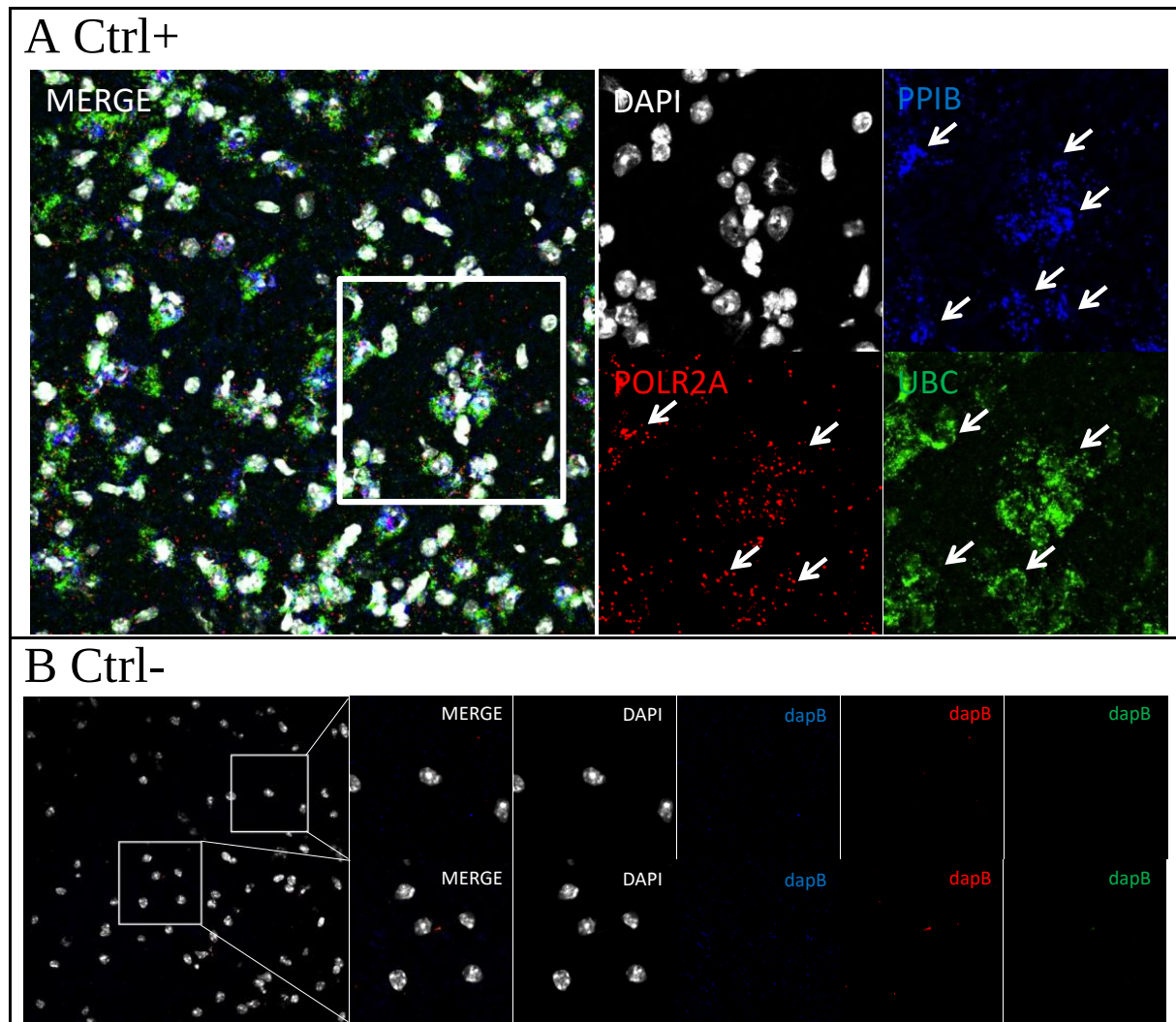


SI Figure 4. Morphine withdrawal in WT and KO GPR103a mice.

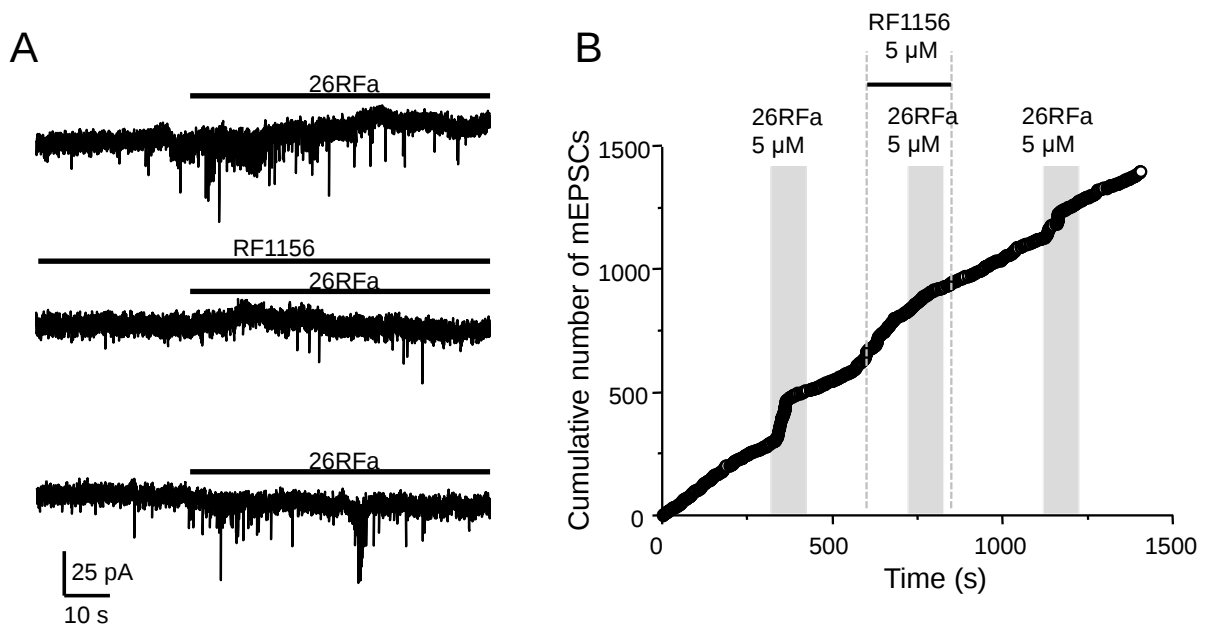
No difference between WT and GPR103a KO mice was observed for all signs of withdrawal that were evaluated



SI Figure 5. Antagonist activity of GPR103 compounds in intracellular calcium mobilization assay. The dose response curve of 26 RfA was shifted to the right by 1 and 10 μ M of each GPR103 ligand except RF1156 for which the shift was already significant at 0.1 μ M.



SI Figure 6 - ISH in spinal cord. (A) positive controls (B) negative controls. Positive controls: PolR2A, RNA Polymerase II Subunit A; Ubiquitin C; PPIB, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B. Negative controls: dapB, dihydrodipicolinate reductase (DHPR) from bacterial origin

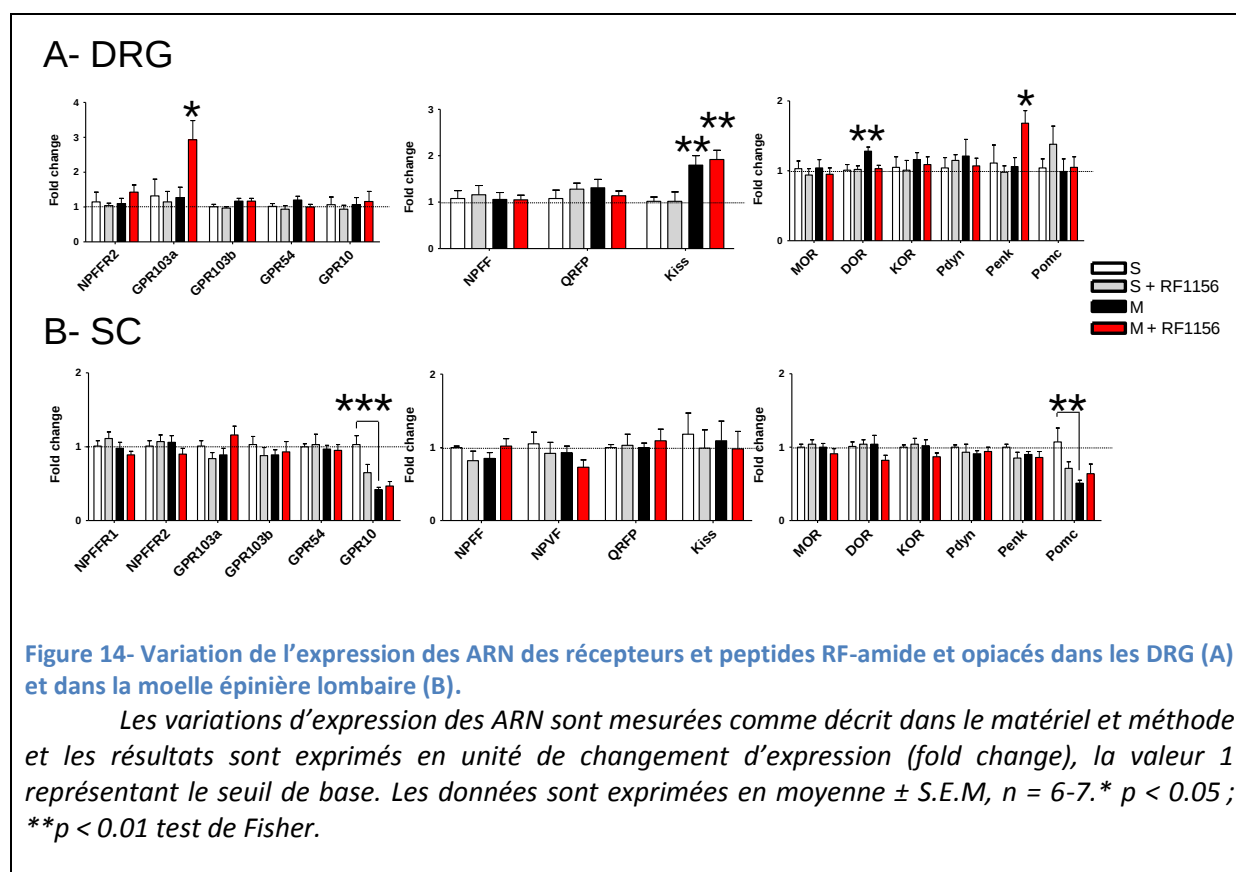


SI Figure 7. The facilitation of glutamatergic mEPSCs by 26RFa is reversibly blocked by RF1156. A. In a neuron recorded from inner lamina II, 26RFa (5 μ M) reversibly increased the apparent frequency of glutamatergic mEPSCs (top), when 26RFa is applied in presence of RF1156 (5 μ M) no effect was observed (middle), the effect of 26RFa was partially recovered after washout of RF1156 (bottom). B. cumulative frequency histograms of mEPSCs from the same neuron as in A.

G. Changements adaptatifs induits par le traitement chronique à la morphine

N'ayant pu être développé dans l'article précédent, des éléments de discussion concernant les changements adaptatifs induits par le traitement chronique à la morphine seront discutés ci-dessous.

Pour identifier les changements adaptatifs mis en place en réponse à un traitement chronique opiacé représentatifs de l'allostasie, nous avons étudié les effets qu'ont ces traitements sur le transcriptome. Nous avons ainsi étudié par RTqPCR, la variation d'ARN de différents gènes dans des tissus cibles (moelle épinière lombaire, et DRG) en réponse à un traitement quotidien à la morphine (10mg/kg; s.c.) et ce, chez des animaux traités ou non au RF1156 (20 min avant morphine, 5mg/kg; s.c.). Les tissus ont été prélevés lorsque l'hyperalgésie induite par la morphine était maximale (après 10 jours de traitement). Les résultats sont présentés dans la Figure 14.



1. Récepteurs et peptides RF-amide

Comme montré dans la Figure 14, nous n'avons pas observé de changement dans le taux d'expression de l'ARN des récepteurs NPFFR1, NPFFR2, GPR103b, et GPR54 suite à un traitement chronique à la morphine. On peut également noter que ni la présence de NPFFR1 ni de son ligand endogène le NPVF n'ont pu être mises en évidence dans les DRG. Ces données tendent à être en accord avec la littérature puisque la présence de NPFFR1 et de

son ligand a été décrite dans la moelle épinière, et que NPFFR1 ne semble qu'exprimé à 3% de son expression maximale dans les DRG (Bonini et al., 2000; Ayachi and Simonin, 2014).

Comme soulevé dans l'étude de GPR10 sur la douleur (Laurent et al., 2005), ce récepteur et son ligand endogène PrRP jouent un rôle important comme système anti-opioïde. Les résultats Figure 14 montrent que le traitement chronique à la morphine induit une diminution de l'expression de l'ARN de GPR10 dans la moelle épinière mais pas dans les DRG, appuyant l'implication de ce récepteur au niveau spinal dans le nouvel équilibre qui se met en place suite à un traitement opiacé chronique (S : 1.027 ± 0.117 , S +1156 : 1.027 ± 0.117 , M : 0.417 ± 0.025 , M+RF1156 : 0.474 ± 0.059 , $F(3,21)=10.306$ ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher $p < 0.001$). Le traitement au RF1156 n'est pas capable de compenser les changements provoqués par la morphine sur l'expression de l'ARN de GPR10. Les résultats suggèrent que ce n'est pas via une interaction avec le système GPR10 que le RF1156 est capable de bloquer l'HIM et suggèrent que GPR10 est un acteur anti-opioïde dont l'action se met en place parallèlement à celle du système GPR103-26Rfa. Etudier une éventuelle régulation de l'expression de PrRP aurait pu apporter de plus amples informations mais des problèmes techniques ne nous ont pas permis sa réalisation.

La Figure 14 montre également une augmentation de l'expression de l'ARN de GPR103a dans les DRG, et ce uniquement lorsque les animaux sont traités simultanément avec du RF1156 et de la morphine (S : 1.320 ± 0.484 , S+1156 : 1.152 ± 0.298 , M : 1.273 ± 0.299 , M+RF1156 : 2.926 ± 0.552 , $F(3,21)=3.967$, ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher $p < 0.05$). N'étant retrouvés ni chez les groupes traités au RF1156 seul ni chez ceux traités à la morphine seule, ces changements semblent nécessiter de façon concomitante à la fois une stimulation de MOR et un blocage de GPR103. De façon inattendue, ces résultats ne sont pas retrouvés au niveau de GPR103b, pourtant le RF1156 est capable de bloquer de façon similaire GPR103a et GPR103b. Ainsi, comme le montrait l'étude préliminaire sur l'hyperalgésie induite par le fentanyl (Figure 7) il semble que ce soit le récepteur GPR103a et non GPR103b qui soit impliqué dans l'HIO. Cette augmentation de l'expression de GPR103a n'est pas retrouvée dans la moelle épinière et suggère donc un rôle spécifique des nocicepteurs primaires dans le blocage de l'HIM par le RF1156. Deux modèles de mécanismes pourraient expliquer cette augmentation de GPR103a. Une première hypothèse serait que l'augmentation de GPR103a serait une cause du blocage de l'hyperalgésie. Autrement dit, le traitement au RF1156 bloquerait GPR103a ce qui provoquerait un déséquilibre que l'organisme tente de compenser en augmentation l'expression de GPR103a. C'est alors précisément cette augmentation de GPR103a qui provoquerait le blocage de l'HIM. Toutefois cette hypothèse n'est pas en cohérence avec le fait que les KO GPR103a développent moins d'HIO, ni que le 26Rfa a un effet pro-nociceptif en i.th. et qu'il facilite les mEPSCs glutamatergiques qui supposeraient une potentialisation de l'information nociceptive. Un deuxième modèle d'action apparaît alors, dans lequel la stimulation chronique du système opioïde induit une activation du système anti-opioïde qui va induire l'hyperalgésie. Toutefois cette activation du système anti-opioïde ne se produit pas au

niveau de la transcription puisque les animaux traités uniquement à la morphine ne présentent pas d'augmentation de GPR103a. En revanche, lorsqu'on stimule à la fois le système opioïde, et qu'on empêche l'organisme d'activer le système anti-opioïde avec le traitement au RF1156, l'organisme réagit en augmentant le système anti-opioïde à un autre niveau en augmentant ainsi l'expression de l'ARN de GPR103a. Dans ce modèle, l'augmentation de GPR103a est une conséquence du blocage de l'hyperalgésie.

Concernant les peptides RF-amide NPFF, NPVF et QRFP, aussi bien dans les DRG que dans la moelle épinière, l'expression de leurs ARN semble stable. Mis en corrélation avec la démonstration qu'un traitement opiacé provoque une augmentation du NPFF (Devillers et al., 1995), ces résultats suggèrent que c'est une libération de NPFF déjà présent ou une augmentation de la traduction qui est responsable de ce phénomène et non une augmentation de la transcription. La Figure 14 montre une augmentation de Kisspeptine dans les DRG chez les animaux traités avec la morphine, et ce en présence ou non de RF1156 ($S : 1.020 \pm 0.093$, $S+1156 : 1.020 \pm 0.093$, $M : 1.797 \pm 0.203$, $M+RF1156 : 1.920 \pm 0.202$, $F(3,21)=7.099$ ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher $p < 0.01$). L'implication de Kisspeptine et de son récepteur GPR54 comme système anti-opioïde a été décrite (Elhabazi et al., 2013) et ces résultats montrent via une augmentation de la transcription de ce peptide que le système GPR54-kisspeptine est recruté suite à une stimulation du système opioïde. En revanche cette augmentation ne semble avoir lieu que dans les DRG et suggère que ce système est d'abord impliqué dans le système nerveux périphérique. On remarque également que le taux d'expression de Kisspeptine n'est pas perturbé par le traitement au RF1156 qui est capable de bloquer l'HIM. Ces données suggèrent que le blocage de GPR103 par le RF1156 est suffisant pour bloquer le développement de l'HIM et ce même si d'autres systèmes anti-opioïdes sont mis en place. Il semblerait donc que le système GPR103a-26RFa soit activé en parallèle à celui GPR54-kisspeptine mais que l'effet du premier surpasse l'effet du deuxième, expliquant ainsi que le RF1156 puisse bloquer l'HIM. Une autre hypothèse serait que les deux systèmes soient liés et que l'action de GPR103a-26RFa se fasse en aval de GPR54-kisspeptine ce qui expliquerait également que le traitement au RF1156 bloque l'HIM malgré l'augmentation de Kisspeptine.

2. Récepteurs et peptides opiacés

Le traitement morphine chronique provoque une diminution du niveau d'expression de l'ARN de POMC dans la moelle épinière ($S : 1.072 \pm 0.188$, $S+1156 : 0.710 \pm 0.089$, $M : 0.513 \pm 0.040$, $M+RF1156 : 0.646 \pm 0.130$, $F(3,21)=3.521$ ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher $p < 0.01$). POMC étant le précurseur des β -endorphines, les ligands endogènes de MOR, il semblerait que le traitement à la morphine et ainsi la présence d'une activation de MOR, induise un rétrocontrôle sur l'expression du ligand endogène de MOR. Le traitement au RF1156 ne bloque pas cette diminution et suggère ainsi que le blocage de l'HIM ne fait pas intervenir un changement d'expression de POMC.

Les pro-enkephaline (Penk) sont les précurseurs des enképhalines, les peptides endogènes de DOR. Les résultats montrent que l'expression de l'ARN de Penk est stable dans la moelle épinière quelque soit le groupe. On observe également dans les DRG que suite à un traitement chronique la morphine ou à l'administration de saline + RF1156, l'expression de l'ARN de Penk reste stable. Étonnamment, les résultats montrent que dans les DRG, le traitement morphine + RF1156 provoque une up-régulation de l'ARN de Penk ($S : 1.108 \pm 0.262$, $S+1156 : 0.985 \pm 0.092$, $M : 1.060 \pm 0.131$, $M+RF1156 : 1.681 \pm 0.185$, $F(3.21)=3.370$ ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher test $p < 0.01$). Ces données montrent que, pris séparément, ni la stimulation de MOR seule ni le blocage de GPR103 seul n'engendrent de changements sur l'expression de Penk, alors qu'ensemble ils engendrent une augmentation de la transcription de Penk. Ces données viennent appuyer l'implication de GPR103 dans la modulation du système opioïde et suggèrent une implication avec le système DOR-Penk et ce, spécifiquement dans les DRG.

En effet, nos résultats montrent également que le traitement chronique à la morphine engendre une augmentation de l'ARN de DOR dans les DRG ($S : 1.015 \pm 0.077$, $S+1156 : 1.023 \pm 0.051$, $M : 1.278 \pm 0.056$, $M+RF1156 : 1.034 \pm 0.049$, $F(3.21)=4.539$ ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher $p < 0.01$). Ces changements ne sont pas observés dans la moelle épinière. On observe également que l'augmentation de DOR dans les DRG est inhibée par le traitement au RF1156. Comme l'ont montrés nos résultats précédents, le traitement au RF1156 bloque l'HIM et la tolérance analgésique, ces données laissent supposer un lien entre la modulation de l'expression de DOR, le blocage de GPR103 et la diminution du développement de la tolérance à la morphine.

De plus en plus d'arguments pointent l'implication de DOR dans les changements adaptatifs qu'engendre un traitement chronique à la morphine. Ainsi, il a été montré qu'un traitement chronique à la morphine induit une augmentation des récepteurs DOR, et ce, aussi bien dans des centres supraspinaux (augmentation de DOR fonctionnel dans les neurones du noyau central de l'amygdale Chieng and Christie 2009), qu'au niveau de la moelle épinière (augmentation de DOR à la membrane au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, Cahill et al. 2001), que dans les DRG (augmentation de DOR à la membrane, Gendron et al. 2006). Cette augmentation de DOR suite au traitement à la morphine semble nécessiter l'action de MOR puisqu'elle s'est révélée absente chez les KO MOR (Morinville et al., 2003).

Il a également été montré qu'un blocage de DOR à l'aide d'un antagoniste est capable de réduire le développement de la tolérance et la dépendance à la morphine aussi bien dans des modèles aigus que chronique d'administration de morphine, et ce, sans affecter l'analgésie de la morphine (Abdelhamid et al., 1991; Hepburn et al., 1997). Appuyant encore le rôle de DOR dans la tolérance et la dépendance à la morphine, il a été montré que l'administration d'un oligonucléotide antisens de DOR est capable de bloquer ces phénomènes (Kest et al., 1996; Sanchez-Blazquez et al., 1997; Suzuki et al., 1997). De

plus, l'étude des animaux KO DOR a montré que le développement de la tolérance analgésique à la morphine est bloquée chez ces animaux (Zhu et al., 1999), néanmoins il faut noter que ce phénotype n'est pas retrouvé chez une autre lignée de KO DOR (Scherrer et al., 2009).

Dans l'ensemble, ces observations montrent clairement que DOR joue un rôle majeur dans le développement de la tolérance à la morphine et sont en accord avec notre observation d'une augmentation de l'ARN de DOR dans les DRG suite à un traitement chronique à la morphine. Etant donné que le traitement au RF1156 bloque cette augmentation de l'expression de DOR, si on envisage que le résultat d'un blocage du récepteur induirait les mêmes conséquences que celui d'une diminution de l'expression du récepteur, on pourrait envisager que ce soit par l'intermédiaire d'une diminution de l'activité de DOR que le traitement au RF1156 induise une diminution de la tolérance.

Nos résultats montrent ainsi que l'action de GPR103 est nécessaire à l'augmentation de DOR que provoque un traitement chronique à la morphine, et montrent qu'en bloquant GPR103 on peut réguler l'expression de DOR et bloquer l'HIM. GPR103 semble être un acteur clé dans la régulation du système opioïde en faisant à la fois intervenir le récepteur MOR et DOR et dont le blocage améliore considérablement les traitements opiacés.

Ainsi, il semble que l'augmentation de DOR soit corrélée à l'hyperalgésie, et qu'empêcher son up régulation avec le traitement RF1156 bloque l'hyperalgésie. Ceci sous entendrait que DOR participerait à l'hyperalgésie et la tolérance. Plusieurs éléments viennent prouver que DOR est un acteur provoquant la tolérance (Abdelhamid et al., 1991; Fundytus et al., 1995; Billa et al., 2010; Beaudry et al., 2015) et de nombreuses preuves que DOR induit un effet analgésiant sont également présentes (pour revue voir Supplementary data (Gaveriaux-Ruff et al., 2011)). La pluralité du mode d'action de DOR est discutée dans (Gendron et al., 2015, 2016; Abdallah and Gendron, 2017) et nécessite d'être approfondie.

Ceci nous amène à envisager deux modes d'action distincts. Dans la première hypothèse, DOR provoquerait des effets pro-nociceptifs, et son augmentation induirait l'HIM. GPR103a travaillerait en synergie avec DOR ce qui expliquerait que le blocage de GPR103a par le RF1156 en provoquant une diminution de DOR, provoquerait une diminution de l'HIM.

Une deuxième hypothèse de mode d'action se base sur l'action anti-nociceptive de DOR. Cette hypothèse postulerait que suite à une expérience douloureuse (ici développement de l'HIM) le corps tente de retrouver l'équilibre, il met en place des changements adaptatifs qui augmentent la synthèse de DOR. L'augmentation de DOR a été décrite comme étant corrélée à l'augmentation des capacités analgésiantes de ses agonistes (Shiowski et al., 2017). Donc DOR engendre un effet anti-nociceptif qui vient contrer l'expérience douloureuse et rétablir l'équilibre. Le fait que les animaux traités avec de la morphine et du RF1156 ne développent pas d'hyperalgésie et n'ont pas d'augmentation de

DOR s'expliquerait par l'implication de GPR103 en amont de DOR dans la machinerie qui se met en place. Autrement dit, l'activation de GPR103 générerait un signal pro-nociceptif que l'organisme gèrerait en augmentant le système anti-nociceptif, mais puisque le traitement au RF1156 bloque la genèse de ce signal, l'organisme n'a pas besoin de compenser en activant un système anti-nociceptif c.-à-d. d'augmenter DOR.

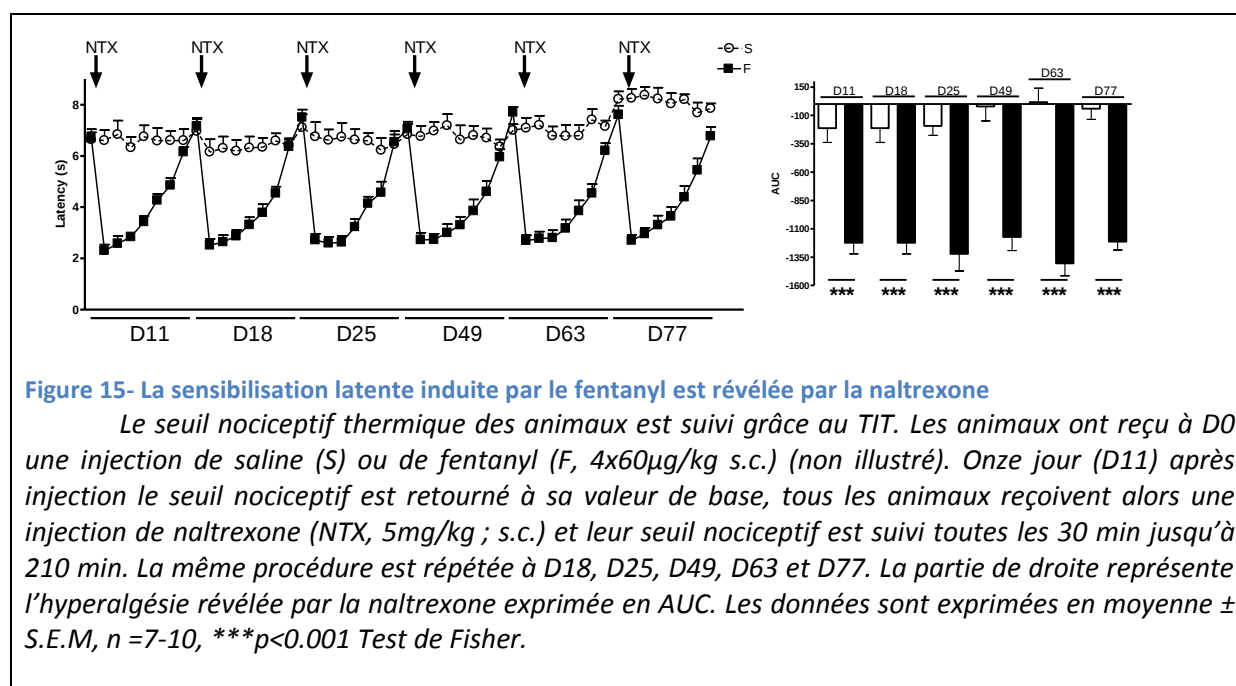
Le récepteur DOR est également fortement impliqué dans la douleur inflammatoire. Ainsi, une up régulation de DOR dans la moelle épinière a été décrite suite à une douleur inflammatoire provoquée par une injection d'adjuvant complet de Freund (CFA, Cahill et al., 2003; Morinville et al., 2004b; Pradhan et al., 2013). Cette augmentation de DOR est bloquée chez les KO MOR (Morinville et al., 2004b). L'augmentation de DOR suite à une injection de CFA se manifeste également au niveau de l'ARN et au niveau de la protéine et a été respectivement révélée par hybridation *in situ* et western blot dans la moelle épinière (Cahill et al., 2003). Comme le traitement au RF1156 diminue la douleur inflammatoire, une implication du blocage de GPR103 sur l'expression de DOR peut-être également envisagée dans ces conditions de douleur chronique.

Une augmentation de l'ARN de DOR semblable à celle que nous avons observé a déjà été décrite dans la littérature. Ainsi, en cohérence avec notre résultat, Morinville *et al.* n'ont décrit aucun changement de l'expression de l'ARN de DOR suite à un traitement à la morphine dans la moelle épinière (Morinville et al., 2004a). Ces données sont en cohérence avec les nôtres puisque c'est dans les DRG que nous avons notés cette augmentation, alors que dans la moelle épinière aucun changement n'a été mis en évidence. En revanche, aucune différence concernant l'ARN de DOR n'a été observée dans les DRG suite à un traitement à la morphine de 24 ou 48h (Gendron et al., 2006). Cette disparité pourrait s'expliquer par la durée du traitement à la morphine puisque dans notre cas les animaux ont été traités 10 jours, ce qui laisse le temps au changement de profil d'expression de se faire.

Dans l'ensemble, toutes ces données suggèrent une forte implication de DOR dans la tolérance à la morphine et dans la douleur inflammatoire tout en montrant que GPR103 est impliqué dans ces phénomènes. Un mécanisme provoquant une collaboration entre GPR103 et DOR semble exister mais de plus amples investigations seront nécessaires pour l'identifier. En prenant en compte les nombreuses implications de DOR dans des processus aussi variés que l'addiction, l'épilepsie, le contrôle moteur et bien sûr son implication dans la douleur (pour revue voir Chu Sin Chung and Kieffer, 2013), ainsi que nos données d'ISH qui prouvent sa colocalisation avec GPR103a et nos données dans lesquelles le RF1156 bloque l'up-régulation de DOR, l'éventualité d'un effet bénéfique du traitement au RF1156 dans tous ces processus apparait, et décrit GPR103 comme une cible thérapeutique prometteuse.

H. Implication de GPR103a dans la sensibilisation latente à la douleur

Comme vue précédemment, l'hyperalgésie induite par le fentanyl disparaît 4 à 5 jours après injection et les animaux retournent à leur seuil nociceptif de base (Figure 6). Cependant, lorsque ces animaux sont retournés à leur seuil nociceptif de base, on observe qu'une injection de naltrexone est capable de rétablir cette hyperalgésie, et ce, même 77 jours après injection (Figure 15). L'injection de naltrexone chez des animaux naïfs n'induisait aucun effet (données non montrées). Ces données révèlent que, même après le retour au seuil nociceptif de base, les animaux restent dans un état hypersensible, où un facteur externe peut à nouveau déclencher l'hyperalgésie. Ce phénomène est de plus en plus décrit et communément défini comme la sensibilisation latente à la douleur (Taylor and Corder, 2014; Marvizon et al., 2015). Ces expériences ont été réalisées par M. Jérôme Zens lors de son stage de Master 2 encadré par le Dr. K Elhabazi et moi-même.



1. Résultats

Puisque les résultats précédents ont montré que les KO GPR103a n'expriment pas ou très peu d'hyperalgésie, et que le blocage de GPR103 avant le traitement opiacé empêche le développement de l'hyperalgésie, GPR103a semble être responsable de la mise en place de l'HIO. Nous avons alors décidé d'étudier si le rôle de GPR103 se limite exclusivement à la mise en place de l'HIO ou s'il est également impliqué dans son maintien et donc dans ce phénomène de sensibilisation latente à la douleur. Pour ce faire, nous avons décidé d'étudier l'effet du RF1156 sur la sensibilisation latente.

Comme montré dans la Figure 16, l'injection de naltrexone provoque une hyperalgésie chez les souris préalablement traitées au fentanyl. En revanche, chez les souris où l'injection de fentanyl avait été précédée par une injection de RF1156 (5mg/kg, 20 min avant injection de fentanyl, s.c.), la naltrexone ne provoque plus d'hyperalgésie ni 11 jours après l'injection de fentanyl (D11) ni 18 jours après (D18) (D11 AUC F: $-1023,5 \pm 93$; S: $4,9 \pm 105,1$; $F(4,37) = 27,4$; $p < 0,001$; pour D18 AUC F: $-1222,2 \pm 97,6$; S: $-212,8 \pm 125,3$; $F(4,37) = 32,4$; ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher $p < 0,001$). Ces données démontrent que GPR103 est impliqué dans les changements adaptatifs qui induisent une sensibilisation latente à la douleur, et que le prétraitement au RF1156 empêche non seulement le développement de l'hyperalgésie induite par le fentanyl mais également la mise en place des changements adaptatifs qui seront responsable de ce terrain hypersensible.

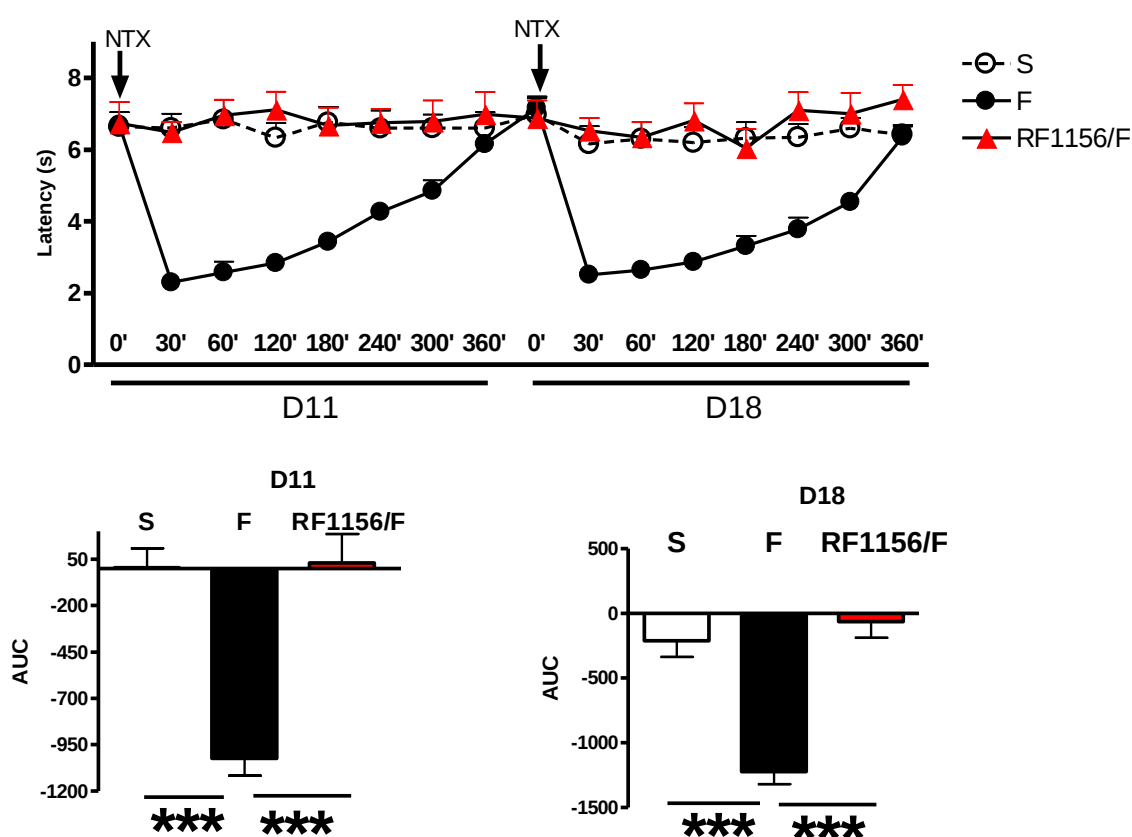
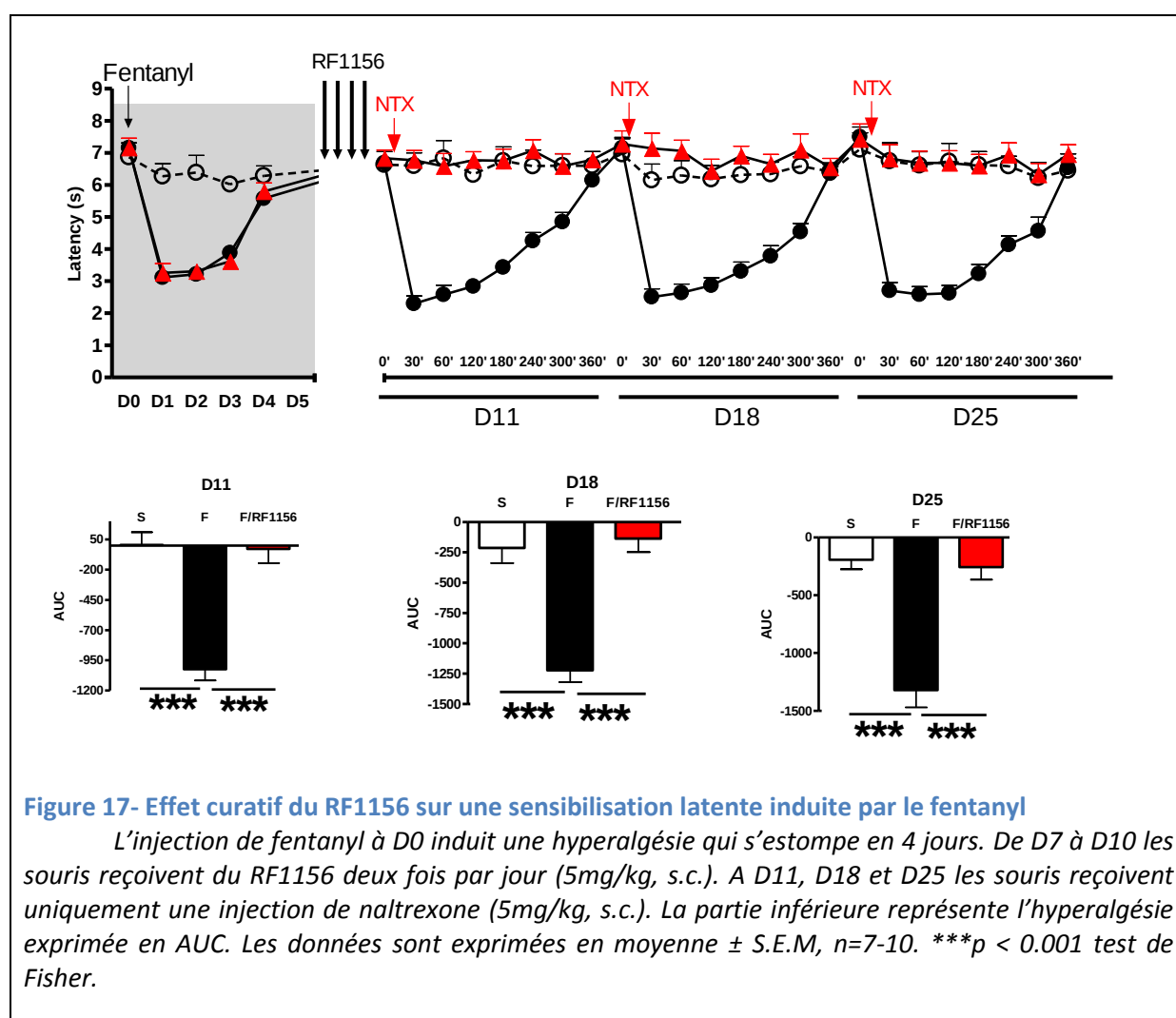


Figure 16-Le prétraitement au RF1156 empêche le développement de la sensibilisation latente induite par le fentanyl

A D0 les animaux ont reçu une injection de fentanyl précédée ou non par une injection de RF1156 (non représentées). Onze (D11) et 18 jours (D18) après l'injection de fentanyl, les animaux reçoivent une injection de naltrexone (NTX, 5mg/kg, s.c.). L'hyperalgésie révélée est suivie grâce au TIT. La partie inférieure représente l'hyperalgésie exprimée en AUC. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ S.E.M, $n=7-10$. *** $p < 0.001$ test de Fisher.

Pour étudier si GPR103 est également impliqué dans le maintien et non uniquement dans le développement de la sensibilisation à la douleur, nous avons décidé d'étudier l'effet du RF1156 sur une sensibilisation latente déjà établie. Pour cela, lorsque les souris injectées uniquement avec du fentanyl sont retournées à leur seuil nociceptif basal, nous avons testé l'effet d'injection de RF1156 sur le rétablissement par la naltrexone de l'hyperalgésie. Comme le montre la Figure 17, toutes les souris injectées avec du fentanyl sont hyperalgésiques pendant quatre jours et, aux jours 11, 18 et 25, l'injection de naltrexone rétablit l'hyperalgésie. En revanche, les souris traitées avec du RF1156 deux fois par jour pendant quatre jours (de D7 à D10) ne sont plus hyperalgésiques suite à une injection de naltrexone, et ce même au jour 25. Ces données démontrent que le blocage de GPR103 par le RF1156 permet d'annuler la sensibilisation latente à la douleur de manière durable puisque même au jour 25 la naltrexone ne révèle plus l'hyperalgésie.



Dans l'ensemble, ces données montrent que le RF1156 est capable de prévenir et d'inverser complètement la sensibilisation latente induite par l'injection de fentanyl. Ces données démontrent que GPR103 est impliqué à la fois dans le mécanisme cellulaire qui

conduit à l'établissement d'une sensibilisation latente mais aussi dans les processus de maintien de cette hyperalgésie et pourrait donc être une cible prometteuse pour réinitialiser l'équilibre allostatique provoqué par le traitement aux opiacés.

2. Discussion

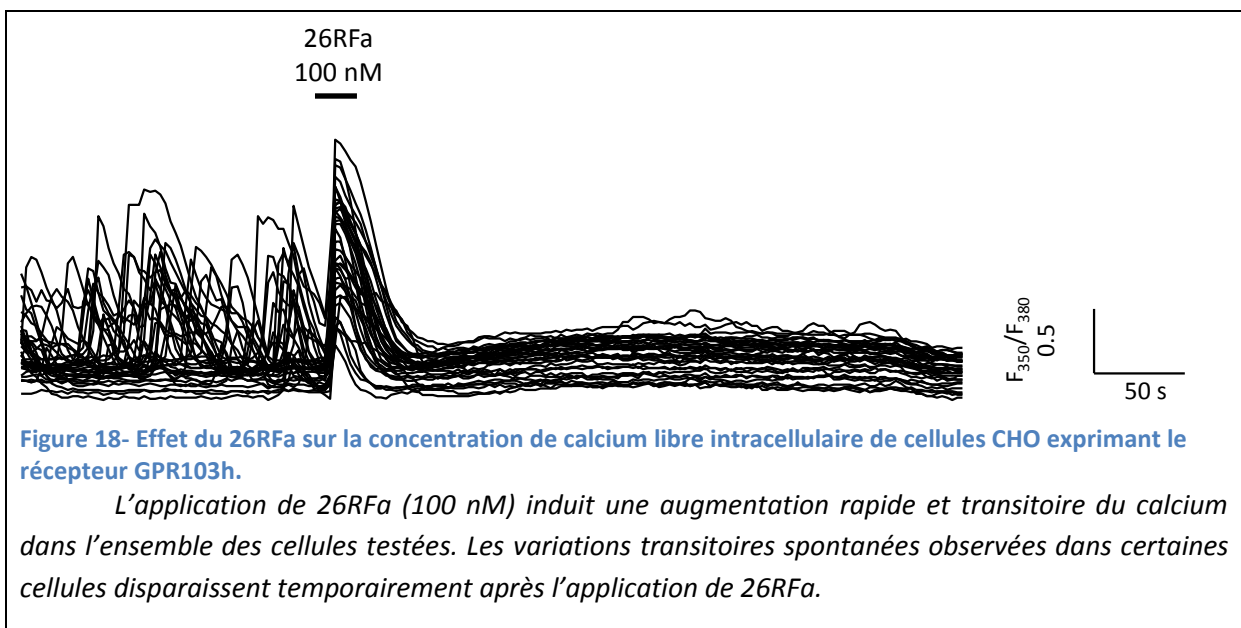
Ainsi, nos données désignent le système GPR103-26RFa en tant que nouveau système neuromodulateur qui joue un rôle clé dans la sensibilisation latente et dont le blocage induit un effet aussi bien préventif que curatif sur la sensibilisation latente à la douleur. Plusieurs mécanismes tels que des changements compensatoires du tonus opioïde, l'implication de la potentialisation à long terme, ou encore la modulation de l'activité constitutive de MOR sont suspectés d'être responsables de cette sensibilisation latente à la douleur (pour revue voir Taylor and Corder, 2014). GPR103 pourrait ainsi moduler au moins l'un de ces phénomènes et ainsi empêcher la sensibilisation latente à la douleur.

Concernant l'effet de GPR103 sur le maintien de la sensibilisation latente, l'effet curatif du RF1156 montre que le blocage de GPR103 est capable de supprimer une sensibilisation latente déjà établie. En supposant que, suite à une expérience douloureuse ou un traitement opioïde, comme décrit dans Cahill et al., 2016, une perturbation de l'équilibre homéostatique se mette en place et conduise à un nouvel équilibre appelé allostasie, il semble que le blocage de GPR103 réinitialise tous ces changements adaptatifs et rétablisse un équilibre similaire à l'état initial naïf puisque la naltrexone n'est plus capable de rétablir d'hyperalgésie, et ce, même 25 jours après injection de RF1156. Le traitement au RF1156 peut donc conduire à une réinitialisation de l'équilibre nociceptif. Le récepteur GPR103 serait donc une cible prometteuse pour effacer tous les changements qui induisent une douleur chronique. Étant donné la diversité des systèmes qui ont été décrits comme impliqués dans le maintien de la sensibilisation latente (NMDA, endocannabinoïdes, alpha-2 adrénergique, neuropeptide Y... pour revue voir Taylor & Corder 2014), le système GPR103-26RFa pourrait probablement collaborer avec d'autres systèmes pour moduler la sortie de nociception finale.

Dans l'ensemble nos résultats désignent ainsi le système GPR103-26RFa comme un nouveau système neuromodulateur jouant un rôle clé dans la sensibilisation latente à la douleur et démontrent que son blocage a des effets aussi bien préventifs que curatifs sur la sensibilisation latente.

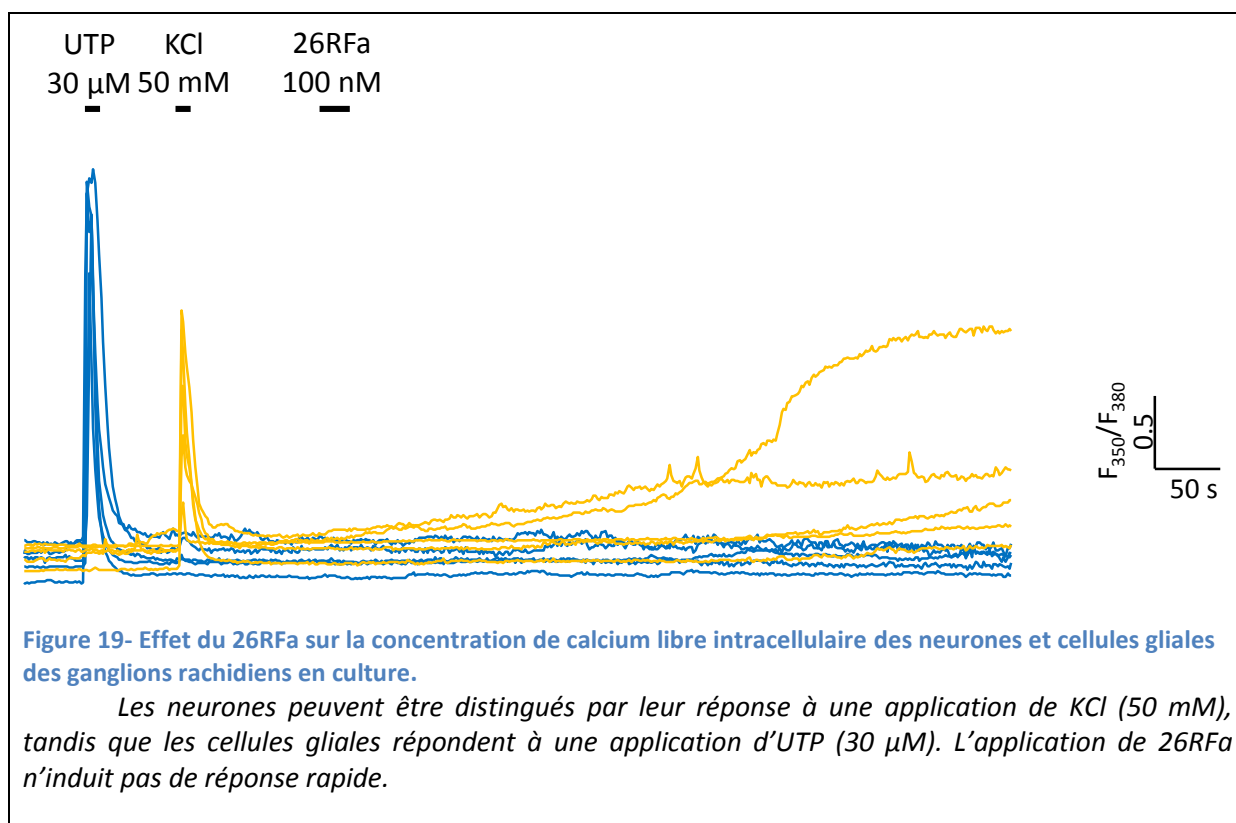
I. Etude des mécanismes cellulaires provoqués par le 26RFa dans les cultures de DRG : modulation du niveau de calcium

Pour déchiffrer le mécanisme d'action du système GPR103a-26RFa, nous avons voulu étudier l'effet de sa stimulation dans les cellules de DRG. Ayant été décrit comme couplé à la protéine Gq, nous avons décidé d'aborder ce questionnement via une approche d'imagerie calcique qui permet de visualiser les variations du calcium libre intracellulaire. Pour vérifier si l'imagerie du calcium pouvait être utilisée pour étudier les effets du 26RFa, nous avons tout d'abord déterminé si l'activation des récepteurs humains GPR103 induisait une augmentation du calcium libre intracellulaire mesurable à l'aide de la sonde FURA2-AM. Pour cela, l'effet du 26RFa sur la concentration de calcium libre intracellulaire sur culture cellulaire surexprimant le récepteur humain GPR103 a été mesurée et illustrée Figure 18. Dans ces expériences, 100% des cellules CHO ont répondu à une application locale rapide de 26RFa (100 nM) par une augmentation transitoire du ratio F_{350}/F_{380} (Figure 18, n = 150, 4 boîtes).



Nous avons ensuite recherché l'effet d'applications locales rapides de 26RFa sur des cultures de ganglions rachidiens de souris. Dans ces cultures, il est possible de distinguer fonctionnellement les neurones des cellules gliales, les premiers répondant à une application de KCl (50 mM), les seconds répondant à une application d'UTP (30 μ M) (Figure 19). Dans l'ensemble de nos expériences (>1000 neurones, >300 cellules gliales, 12 expériences) il n'a pas été possible d'enregistrer une réponse rapide durant la minute consécutive au début de l'application de 26RFa (10 nM, 100 nM, 1 M, Figure 19). Néanmoins, dans certains neurones, des augmentations de calcium pouvaient être observées plusieurs minutes après

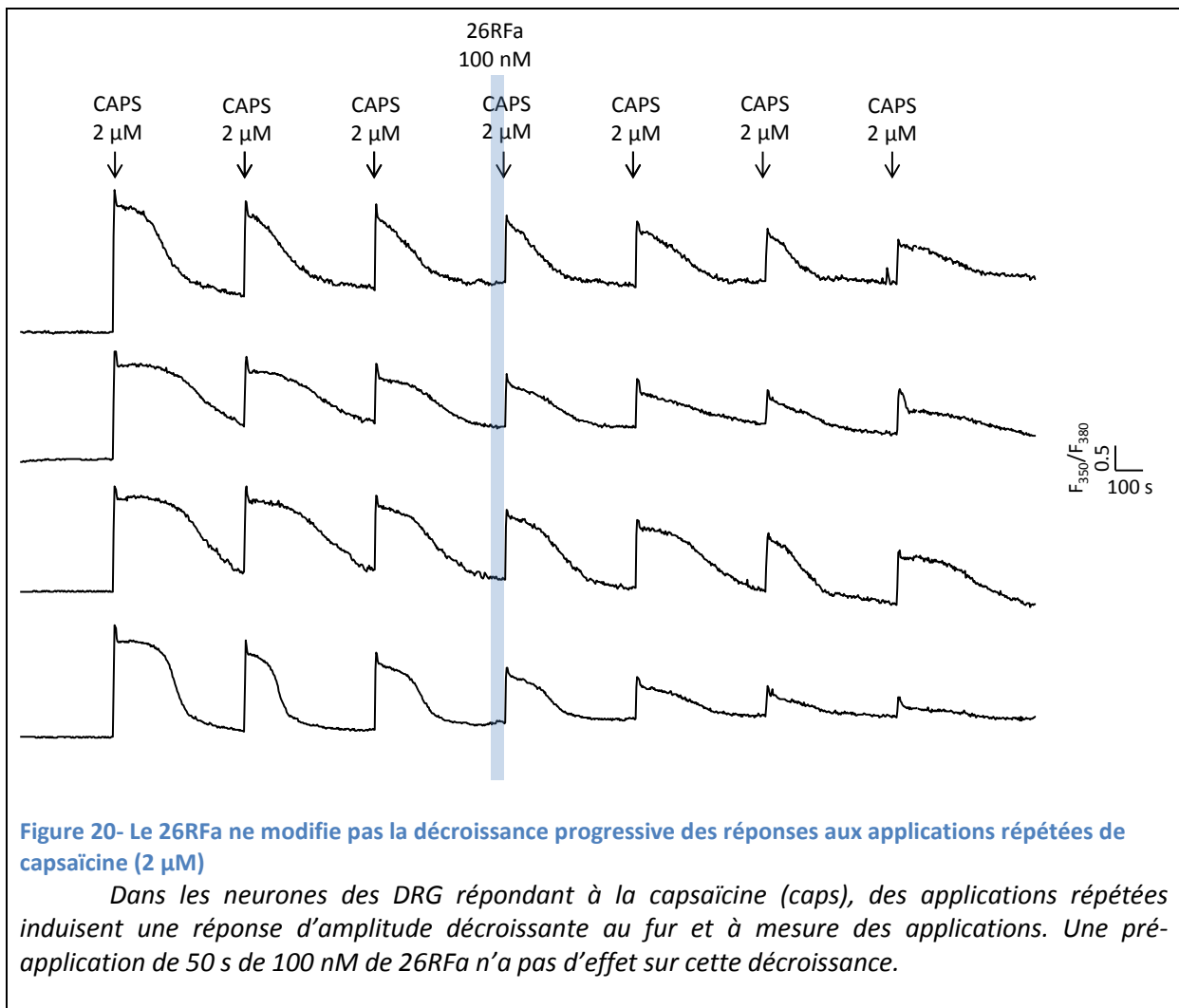
l'application, sans qu'il soit possible de corrélérer cette augmentation à l'application (Figure 19). L'adjonction de 26RFa ne provoquait pas d'effet reproductible et ayant une corrélation temporelle cohérente entre le moment de son ajout dans le bain et les effets observés sur les cellules. Nous en avons déduit que le 26RFa n'avait pas d'effet propre sur les cultures de DRG de souris naïves.



Les résultats obtenus à partir de cellules de DRG dissociés d'animaux naïfs n'ayant rien donné, et ayant démontré le rôle de GPR103a dans la douleur inflammatoire (voir article GPR103a), l'hypothèse que ce terrain inflammatoire pouvait potentialiser l'effet du 26RFa nous a mené à étudier en imagerie calcique l'effet du 26RFa sur des cellules de DRG provenant d'animaux chez qui une inflammation a été préalablement induite par injection intraplantaire de carraghénine. A nouveau, nous n'avons détecté aucune réponse reproductible et ayant une cohérence temporelle satisfaisante avec l'ajout de 26RFa (résultats non présentés).

Enfin, pour déterminer si le 26RFa pouvait agir sur les neurones nociceptifs des DRG sans directement changer la concentration de calcium libre intracellulaire et connaissant les effets de GPR103a dans la modalité thermique nociceptive, nous avons voulu étudier si les effets observés *in vivo* chez la souris, n'étaient pas dus à une modulation de l'activité du récepteur thermique au chaud TRPV1 plutôt qu'à un effet direct du 26RFa. Pour cela nous avons étudié l'effet du 26RFa sur la désensibilisation de TRPV1. Nous avons stimulé TRPV1 en ajoutant de la capsaïcine de façon répétée, et avons suivi la décroissance dans la réponse

calcique que cet ajout répété engendre. Puis nous avons ajouté du 26Rfa, et avons cherché si des applications de 26Rfa modifiaient la réponse à la capsaïcine en perturbant la décroissance de la réponse calcique de TRPV1. Comme présenté dans la Figure 20, dans l'ensemble des neurones testés (n=12), une pré-application de 26Rfa (100 nM), n'a pas modifié la décroissance progressive de l'amplitude des réponses à des applications répétées de capsaïcine (2 μ M). Le 26Rfa n'engendre donc pas de changement décelable en imagerie calcique dans les cellules des DRG.



Nous nous sommes alors demandé si la mise en culture des DRG ne supprimait pas l'expression de GPR103, ce qui expliquerait la différence entre l'effet hyperalgésiant que provoque le 26Rfa en i.th. et l'absence d'effet en imagerie calcique. Nous avons alors vérifié la présence ou l'absence de l'ARN de GPR103a, sur culture de cellules de DRG par RTqPCR. Comme montré dans la Figure 21, on observe que GPR103a et b sont toujours exprimés, et que la mise en culture des cellules ne semble pas induire de changement radical sur l'expression des messagers étudiés.

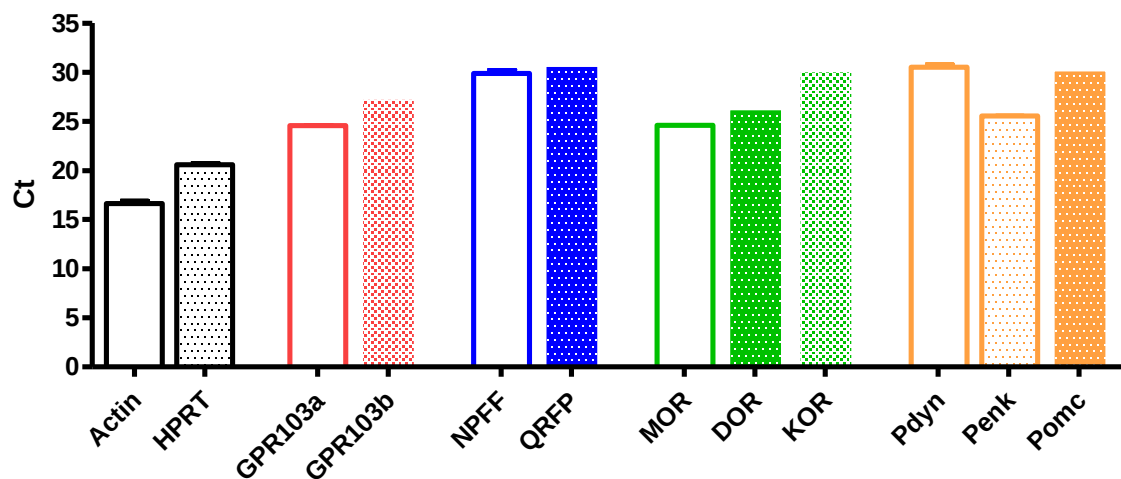


Figure 21- RTqPCR sur culture cellulaire de DRG de 24h

Le lendemain de la mise en culture des DRG, une RTqPCR est réalisée pour vérifier la présence de GPR103a, GPR103b, NPFF, QRFP, MOR, DOR, KOR, Pdyn, Penk, et POMC. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SD de Ct.

L'ensemble de ces données laissent en suspens la nature du couplage de GPR103 dans les cellules de DRG. GPR103 a été décrit comme couplé à Gq mais également à Gi dans des cellules CHO et HEK transfectées (Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003) et l'ajout de 26Rfa a été décrit comme provoquant une augmentation d'AMPc dans des cellules pituitaires de rat (Chartrel et al., 2003). Le couplage semble donc fortement variable selon le type cellulaire étudié et la nature de ce couplage dans les cellules de DRG se pose légitimement. Des études supplémentaires devront donc être faites pour investiguer le couplage de GPR103 dans les cellules de DRG et seront d'un grand recours pour comprendre les mécanismes dont ce système est responsable.

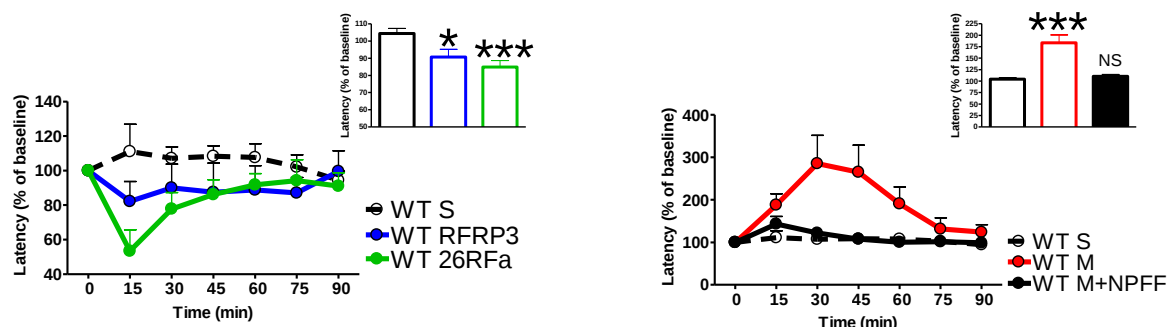
J. Interaction fonctionnelle entre GPR103a et NPFFR1

Comme décrit dans (Elhabazi et al., 2013), l'hyperalgésie induite par le 26Rfa est bloquée par le RF9 un antagoniste de NPFFR1 et NPFFR2. Or, cette hyperalgésie est également bloquée chez les KO GPR103a, ainsi que par le RF1156 (voir article GPR103a). Ces éléments prouvent que l'action pronociceptive du 26Rfa passe spécifiquement par l'activation de GPR103a, mais l'ensemble de ces données indiquent tout de même l'existence d'une interaction fonctionnelle entre les récepteurs NPFFR1/2 et GPR103a.

Pour étudier plus précisément cette hypothèse, nous avons étudié l'effet du 26Rfa chez les animaux KO NPFFR1. Comme montré dans la Figure 22, l'injection de 26Rfa ou de RFRP3 induit une hyperalgésie chez les animaux WT (S :104.381±3.012, 26Rfa :84.909±3.791, RFRP3 :90.745±4.416, $F(2,165)=6.415$ ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher $p < 0,01$). En revanche, cette hyperalgésie est absente chez les animaux KO NPFFR1. La présence de NPFFR1 est donc indispensable à l'action pro-nociceptive du 26Rfa. Comme énoncé précédemment, l'hyperalgésie induite par le 26Rfa est médiée par GPR103a, ces données confirment donc l'hypothèse d'une interaction fonctionnelle entre GPR103a et NPFFR1, en précisant qu'elle semble se produire spécifiquement entre GPR103a et NPFFR1 et non NPFFR2. Pour appuyer davantage cette suggestion il aurait été pertinent de tester si l'hyperalgésie induite par le 26Rfa est toujours présente chez les animaux KO NPFFR2, mais ceci nécessitera de plus amples recherches. Ainsi nos données prouvent que l'action du 26Rfa nécessite à la fois des récepteurs GPR103a et NPFFR1 fonctionnels.

Pour déterminer si cette interaction est spécifique à NPFFR1 et GPR103a ou si elle est généralisable à d'autres récepteurs à peptide RF-amide, nous avons étudié l'effet du NPFF, le ligand endogène de NPFFR2, chez les KO NPFFR1. Comme montré dans la Figure 22, chez les WT, l'injection de NPFF simultanée à celle de morphine provoque une diminution de l'analgésie morphinique, conférant une propriété anti-opioïde au NPFF (WT S :104.381±3.012, WT M :183.462±17.296, WT M+NPFF :110.477±4.073, $F(2,165)=20.802$, ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher $p < 0,001$). En revanche, on remarque que l'effet anti-analgésiant du NPFF est absent chez les KO NPFFR1 (KO S :119.614±3.150, KO M :164.877±8.481, WT M+NPFF :166.023±7.307). Bien qu'étant le peptide endogène de NPFFR2, le NPFF est capable de se fixer et d'activer NPFFR1. Ceci démontre que l'action anti-opioïde du NPFF semble médiée par NPFFR1, ou qu'elle implique une interaction entre NPFFR1 et NPFFR2. Pour trancher entre ces deux hypothèses, l'utilisation d'un antagoniste sélectif pour NPFFR1 ou NPFFR2 serait pertinente mais à notre connaissance aucun composé de ce genre n'a encore été développé. L'effet anti-analgésiant du NPFF pourrait alors être testé chez les KO NPFFR2 et donnerait un aperçu de ce mécanisme d'action.

A- WT



B- KO

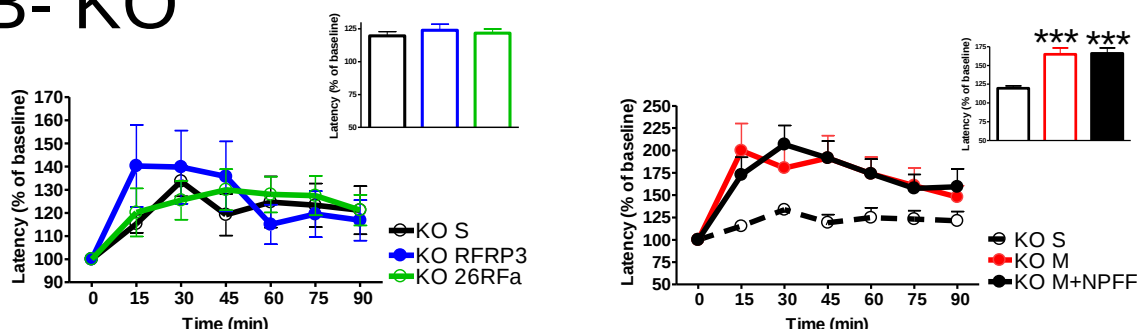
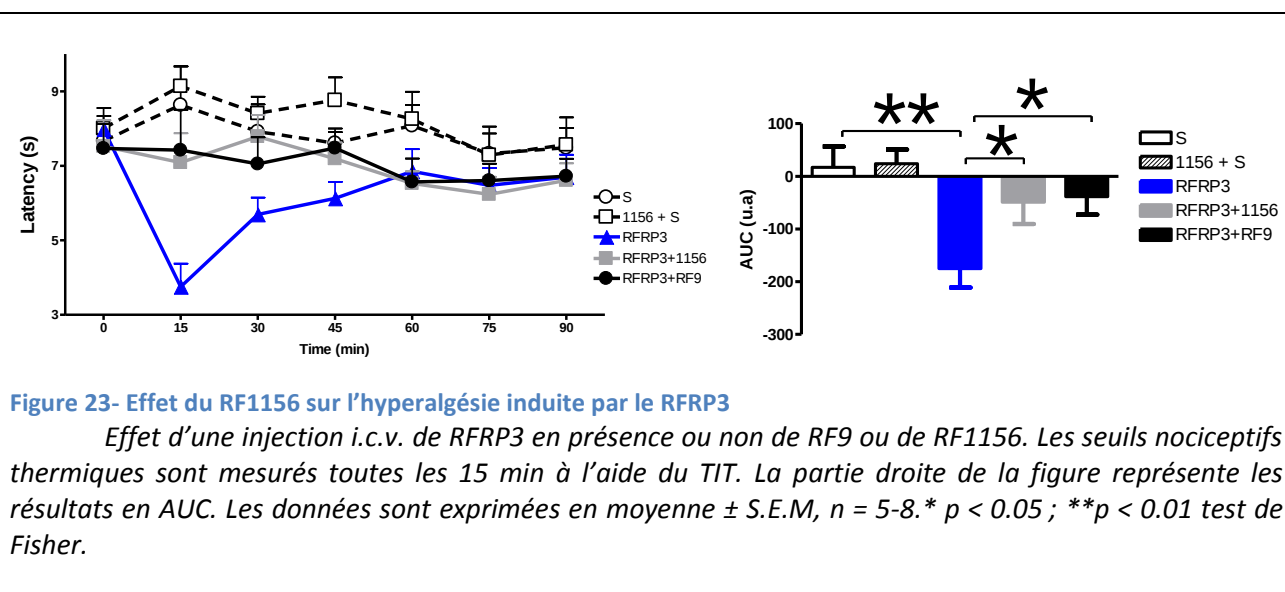


Figure 22- Effet du 26RfA, du RFRP3, et du NPFF chez les WT et KO NPFFR1

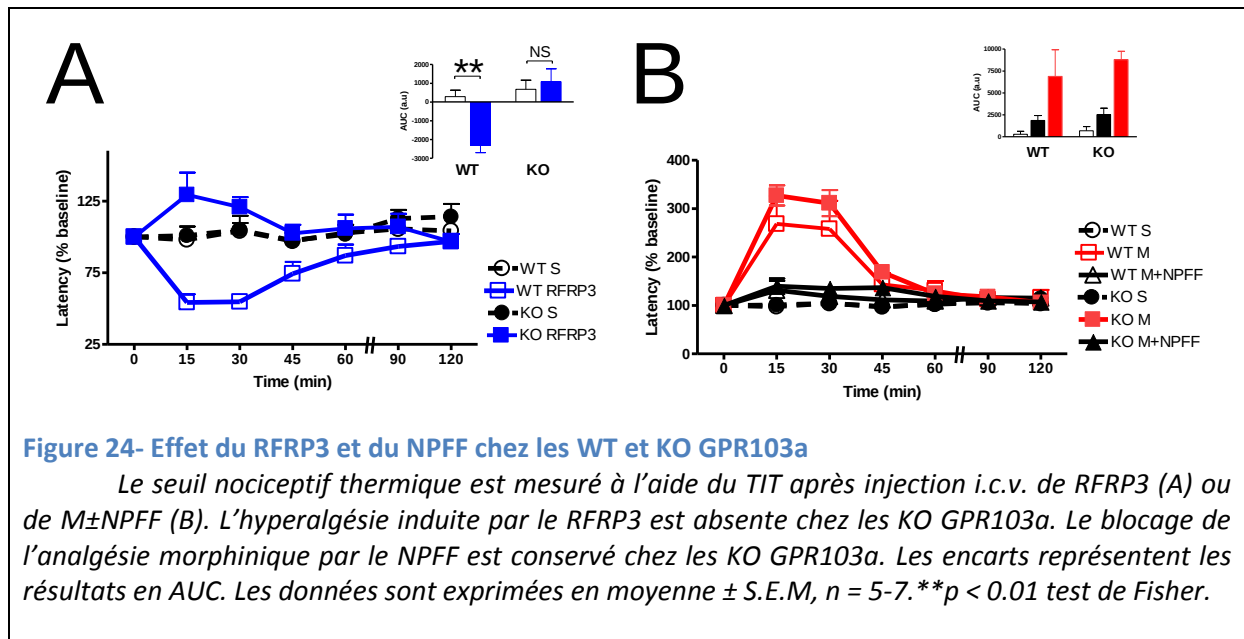
L'effet d'une injection i.c.v. de RFRP3, de 26RfA et de morphine $\pm$ NPFF sur le seuil nociceptif thermique a été suivi chez des animaux WT (A) et KO NPFFR1 (B) à l'aide du TIT. Les encarts représentent l'analgésie ou l'hyperalgésie. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ S.E.M, $n = 7-11$. *** $p < 0.001$ test de Fisher.

Ayant démontré que l'action du ligand de GPR103 (26RfA) nécessite à la fois le récepteur GPR103a et NPFFR1, nous avons voulu voir si de façon réciproque, le RFRP3, ligand endogène de NPFFR1, aurait besoin du récepteur GPR103a pour induire son action pronociceptive. Pour étudier plus précisément cette hypothèse, nous avons étudié l'effet du RF1156 (antagoniste sélectif de GPR103) sur l'hyperalgésie induite par le RFRP3. Comme montré dans la Figure 23, l'injection i.c.v. de RFRP3 induit une forte hyperalgésie 15 min après injection qui se dissipe environ 60 min après injection (AUC S:17.284 $\pm$ 39.434, RFRP3 :-175.066 $\pm$ 35.949). Cette hyperalgésie est bloquée lorsqu'on administre du RF9 simultanément au RFRP3 (AUC RFRP3+RF9 : -38.517 $\pm$ 33.827). Ceci prouve que le blocage du récepteur NPFFR1 par le RF9 empêche le RFRP3 d'induire son effet pro-nociceptif. De façon inattendue, la co-administration de RF1156 et de RFRP3 bloque également l'hyperalgésie du RFRP3 (AUC RFRP3+RF1156 :-48.813 $\pm$ 41.632). En sachant que le RF1156 est un antagoniste sélectif de GPR103 et qu'il ne se lie pas au récepteur NPFFR1, nos résultats démontrent que l'hyperalgésie induite par le RFRP3 nécessite que le récepteur GPR103 ne soit pas bloqué. Ces résultats prouvent que de la même façon que le 26RfA a besoin de NPFFR1 pour induire une hyperalgésie, le RFRP3 nécessite la présence de GPR103 pour être hyperalgésiant. Ces

résultats viennent appuyer l'hypothèse d'une interaction fonctionnelle entre ces deux récepteurs en précisant que cette dépendance est réciproque.



Le RF1156 étant un antagoniste des récepteurs GPR103, pour distinguer si cette interaction fonctionnelle a lieu entre NPFFR1 et GPR103a ou 103b nous avons testé l'effet de l'injection de RFRP3 chez des animaux KO GPR103a. Comme illustré dans la Figure 24A, l'hyperalgésie thermique provoquée par une injection i.c.v. de RFRP3 chez les WT est absente chez les KO GPR103a (AUC WT S : 281.429 ± 345.412 , WT RFRP3 : -2292.511 ± 401.682 , KO S : 680.531 ± 478.599 , KO RFRP3 : 1082.170 ± 681.457 , $F(1,20)=8.057$, ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher $p < 0,05$). Cette donnée confirme l'hypothèse qu'une interaction fonctionnelle entre GPR103 et NPFFR1 existe et que c'est avec GPR103a et non GPR103b que celle-ci a lieu et prouve que pour induire l'effet du RFRP3 les deux récepteurs doivent être présents et fonctionnels. Pour déterminer si cet effet est spécifique entre ces deux récepteurs ou si ce fonctionnement peut être généralisable, nous avons étudié l'effet de l'injection de morphine en présence ou non de NPFF, le ligand endogène de NPFFR2 (Figure 24B). Le suivi cinétique du seuil nociceptif thermique met en évidence l'analgésie induite par la morphine, ainsi que l'effet anti-opioïde du NPFF qui réduit l'analgésie morphinique (WT S : 281.429 ± 345.412 , WT M : 6858.597 ± 3051.416 , WT M+NPFF : 1866.470 ± 555.206 , $F(2,13)=5.632$, ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher $p < 0,05$). On observe que cette action anti-analgésiante du NPFF est conservée chez les KO GPR103a (AUC KO S : 680.531 ± 478.599 , KO M : 8781.876 ± 956.443 , KO M+NPFF : 2510.770 ± 743.606 , $F(2,15)=28.314$ ANOVA à sens unique suivi du test PLSD de Fisher $p < 0,001$). L'interaction fonctionnelle observée précédemment semble donc se produire spécifiquement entre le récepteur GPR103a et NPFFR1 et non NPFFR2.



L'ensemble de nos résultats montrent que NPFFR1 et GPR103a semblent fonctionner ensemble, et que le blocage de l'un via délétion génétique ou via un antagoniste, provoque le blocage de l'autre. D'autre part, l'effet anti-analgésiant du NPFF ne semble pas nécessiter la présence de GPR103a, c.-à-d. que le système NPFF-NPFFR2 n'est pas perturbé par la délétion de GPR103a ce qui indique que cette dépendance d'action est spécifique entre GPR103a et NPFFR1. En revanche nos données ont montré que l'action anti-analgésique du NPFF implique soit une interaction fonctionnelle entre NPFFR1 et NPFFR2 soit passe par l'activation de NPFFR1.

Dans l'ensemble ces résultats sont en cohérence avec la démonstration que l'effet anti-analgésique ou hyperalgésiant des peptides RF-amide passe par une action des récepteurs NPFFR1/2 (Elhabazi et al., 2013) tout en démontrant que ce système RF-amide fonctionne en intégrant de subtiles dépendances non pas uniquement entre GPR10, 54, GPR103a/b d'un côté et NPFFR1/2 de l'autre mais que cette dépendance peut-être réciproque notamment concernant l'action même de NPFFR1 qui nécessite GPR103a.

V. Discussion

Après avoir étudié le rôle des récepteurs NPFFR1 et NPFFR2 dans l'hyperalgésie induite par la morphine et le sevrage opiacé, ce travail s'est focalisé sur l'implication du récepteur GPR103a, et a permis d'ériger le système GPR103-26RFa comme un nouveau système neuromodulateur impliqué dans les changements adaptatifs associés à l'administration chronique d'opiacé et à la douleur inflammatoire.

De façon plus précise, ces travaux ont ainsi permis de déblayer la part d'action respective des récepteurs NPFFR1, NPFFR2 et GPR103a. Nos résultats montrent ainsi que les récepteurs NPFFR1 et GPR103a sont impliqués dans l'établissement du seuil nociceptif basal, que NPFFR1, NPFFR2 et GPR103a sont impliqués dans l'hyperalgésie induite par une stimulation aigue du système opioïde, mais que seulement NPFFR2 et GPR103a sont impliqués dans les changements provoqués par une stimulation chronique du système opioïde qui engendre une hyperalgésie. Nos résultats ont également mis en évidence que les trois récepteurs sont impliqués dans le développement de la tolérance analgésique à la morphine. Les données concernant le sevrage opiacé ont également permis de déterminer la part respective d'action de ces récepteurs RF-amide dans ce phénomène et d'identifier le récepteur NPFFR1 comme modulateur de la dépendance physique aux opiacés.

Dans cette étude, nous avons également identifié le système GPR103a -26RFa comme un nouveau système pronociceptif impliqué dans l'hyperalgésie induite par les opiacés et la douleur inflammatoire. Plus spécifiquement, nous avons développé un antagoniste sélectif de GPR103a, le RF1156 et montré que le blocage génétique et pharmacologique de ce récepteur prévient l'hyperalgésie induite par l'administration exogène de son ligand le 26RFa, ainsi que l'hyperalgésie induite par le fentanyl, la morphine ou la carraghénine. Nous avons en outre montré par hybridation *in situ* que les transcrits de GPR103a et du 26RFa sont exprimés dans la corne dorsale de la moelle épinière et dans les DRG. Ce travail a de plus démontré que le 26RFa a un effet modulateur sur les courants post-synaptiques à la fois dans la moelle épinière et dans les neurones hypothalamiques du PVN fournissant ainsi un début du mécanisme d'action de ce système. Enfin, l'analyse par RT-qPCR de la moelle épinière et des DRG a révélé que plusieurs produits de transcription des récepteurs et des peptides RF-amide et opioïdes sont régulés à la hausse ou à la baisse chez les souris traitées chroniquement avec de la morphine. Nous avons également mis en évidence que l'augmentation de DOR dans la moelle épinière provoquée par le traitement chronique est bloquée par le RF1156. Ce résultat est cohérent avec la forte colocalisation de GPR103a et DOR que nous avons observé dans la moelle épinière et dans les DRG et suggère que l'action pronociceptive de GPR103a pourrait être fonctionnellement liée à DOR. Ceci pourrait impliquer une interaction fonctionnelle entre GPR103a et DOR dans laquelle l'activation de l'un pourrait interférer dans la signalisation cellulaire de l'autre.

Dans l'ensemble, nos résultats pointent GPR103-26RFa comme un nouveau système neuromodulateur impliqué dans l'HIO et la douleur inflammatoire, et suggèrent que les antagonistes de GPR103 seraient de nouveaux agents thérapeutiques pour le traitement de

la douleur. Ces données viennent également appuyer l'hypothèse de la balance homéostatique développée en introduction en montrant que le récepteur GPR103 est un acteur important de la mise en place et du maintien de l'allostasie.

De façon plus précise, les résultats obtenus via l'approche *in vivo* ont montré que GPR103a est impliqué dans la modulation de la nociception thermique et mécanique, alors que sa distribution étudiée par ISH suggère qu'il serait exprimé par les fibres de moyen à gros diamètre de type A β habituellement considérées comme véhiculant l'information non nociceptive. Ceci impliquerait que cette modulation du seuil nociceptif soit la conséquence de l'action de GPR103a au niveau spinal et non de celui exprimé par les DRG. Soutenant cette hypothèse nous avons montré que l'activation de GPR103 induisait une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des mEPSCs dans la corne dorsale de la moelle épinière, ce qui potentialiserait l'information nociceptive et pourrait expliquer l'hyperalgésie. Une autre hypothèse se baserait sur le fait que les fibres A β ont été décrites comme étant impliquées dans les phénomènes de douleur chronique. Bien que les fibres A β soient le plus communément décrites comme non nociceptive, cette dichotomie entre informations nociceptives et non nociceptives est de plus en plus discutée (pour revue voir Devor, 2009). Des données suggèrent ainsi l'existence de nocicepteurs de type A β (Djouhri and Lawson, 2004; Devor, 2009). Il a été décrit que les fibres A β font l'objet d'un changement dans leurs caractéristiques électriques et dans le profil de neurotransmetteur qu'elles expriment (Devor, 2009). Ce changement phénotypique les rend alors capable de véhiculer un signal nociceptif et a été décrit comme impliqué dans le déclenchement et le maintien de la sensibilisation centrale à la douleur. Ces données sont en cohérence avec l'implication de GPR103 que nous avons décrite dans la sensibilisation latente à la douleur et sont des éléments qui permettent d'étayer le mécanisme d'action de GPR103a qui s'additionnent à ceux décrits au niveau central sur la modulation de l'activité électrique neuronale.

L'ensemble de nos données ont ainsi démontré que les récepteurs à peptides RF-amide sont des acteurs clés de la neuromodulation dont l'action intervient dans de nombreuses fonctions physiologiques et états pathologiques. Le système anti-opioïde semble ainsi constitué de différents acteurs capables de générer des changements adaptatifs pour compenser la forte stimulation du système opioïde et ramener l'organisme vers l'équilibre homéostatique. L'activité de ces différents acteurs semble également se recouper puisqu'un même phénomène étudié fait intervenir plusieurs acteurs. Nous avons aussi observé qu'en parallèle de l'implication du système GPR103a-26RFa sur lequel nous nous sommes focalisés, une stimulation du système GPR10-PrRP était également mise en place suite au traitement chronique à la morphine. Venant s'ajouter à l'aspect que plusieurs récepteurs à peptide RF-amide travaillent ensemble sur un même phénomène, l'étude de l'interaction fonctionnelle entre GPR103a et NPFFR1 a démontré que ces récepteurs semblent également interagir entre eux. Nos données suggèrent également une interaction fonctionnelle entre NPFFR1 et NPFFR2 et ce phénomène d'interaction fonctionnelle entre les récepteurs à peptide RF-amide avait déjà été suggéré par l'étude des animaux KO GPR10

chez qui l'effet anti-analgésiant du NPFF était bloqué (Laurent et al., 2005). Des travaux précédents de l'équipe ont également montré que le blocage des récepteurs NPFFR1/NPFFR2 par l'administration de RF9 était capable de bloquer l'hyperalgésie du 26RFa, de PrRP et de Kisspeptine et suggérait ainsi que les interactions entre les différents récepteurs à peptide RF-amide soient plus vastes que celles connues jusque-là (Elhabazi et al., 2013).

L'ensemble de ces données esquissent une description d'un système anti-opioïde constitué de plusieurs acteurs dont le recoupement des mécanismes pourrait expliquer leurs actions parfois semblables et dont l'interaction entre acteurs vient ajouter un niveau de modulation supplémentaire.

Comme dans tout travail de recherche, nos conclusions sont parfois confrontées à certaines limites. Ainsi il faut garder à l'esprit que chez les KO NPFFR1, plus aucun des peptides RF-amide testés n'a été fonctionnel. En effet ni le 26RFa ni le RFRP3 ni le NPFF n'ont été en mesure d'induire leurs effets chez les KO NPFFR1. Ces données tendent à ériger le récepteur NPFFR1 comme un acteur clé de l'action pronociceptive/anti-analgésique des peptides RF-amides. Néanmoins, cette hypothèse devra être étayée par d'autres études pour éventuellement s'affranchir d'un mécanisme compensatoire induit par la délétion constitutive de NPFFR1 chez les animaux KO.

En outre, une partie de nos résultats sur la modulation de la nociception par la morphine a été démontré en utilisant la modalité thermique via le test d'immersion de la queue. Il est ainsi pertinent de noter qu'à faible dose la morphine a été décrite comme induisant une hyperthermie résultant en une vasoconstriction de la queue qui elle-même induit une augmentation du temps de réaction de l'animal face à un stimulus thermique (El Bitar et al., 2016). Cet effet pourrait être alors interprété comme un effet analgésiant. Il est ainsi indéniable que l'une des limites de l'utilisation du test d'immersion de la queue serait une surestimation de l'analgésie morphinique. Néanmoins nous avons tenu à suivre l'analgésie morphinique également par l'intermédiaire d'une modalité nociceptive mécanique grâce au test de pression de la queue. Les conclusions ainsi déduites sont étayées par l'accumulation d'arguments. De plus, l'effet de la morphine sur la thermorégulation s'estompe au bout d'environ 180 min (Cox et al., 1976), alors que le protocole de suivi de l'hyperalgésie induite par la morphine mesure le seuil nociceptif des animaux le lendemain de l'injection de morphine, on conçoit dès lors que nos conditions expérimentales permettent de s'affranchir en moins en partie de ce phénomène.

Ce travail a ainsi permis de comprendre plus amplement le rôle respectif des récepteurs à peptide RF-amide NPFFR1, NPFFR2 et GPR103a tout en démontrant pour la première fois les propriétés anti-opioïde du système GPR103-26RFa. La caractérisation du RF1156, premier antagoniste sélectif de GPR103, a permis de démontrer que les antagonistes de ce système sont réellement capables de bloquer l'hyperalgésie induite par les opiacés ou la douleur inflammatoire, mais aussi la sensibilisation latente à la douleur. La découverte de

la colocalisation entre GPR103a et DOR ainsi que le blocage de l'up-régulation de DOR par le RF1156 lors du traitement chronique à la morphine suggèrent une interaction fonctionnelle entre ces deux récepteurs. Ainsi, du niveau cellulaire directement via une perturbation de la signalisation cellulaire, ou à une échelle plus intégrée à travers la modulation positive ou négative de l'information neuronale, les mécanismes de la modulation du système opioïde restent encore largement à caractériser, et leurs connaissances pourront fournir de nouvelles approches thérapeutiques prometteuses.

VI. Annexes

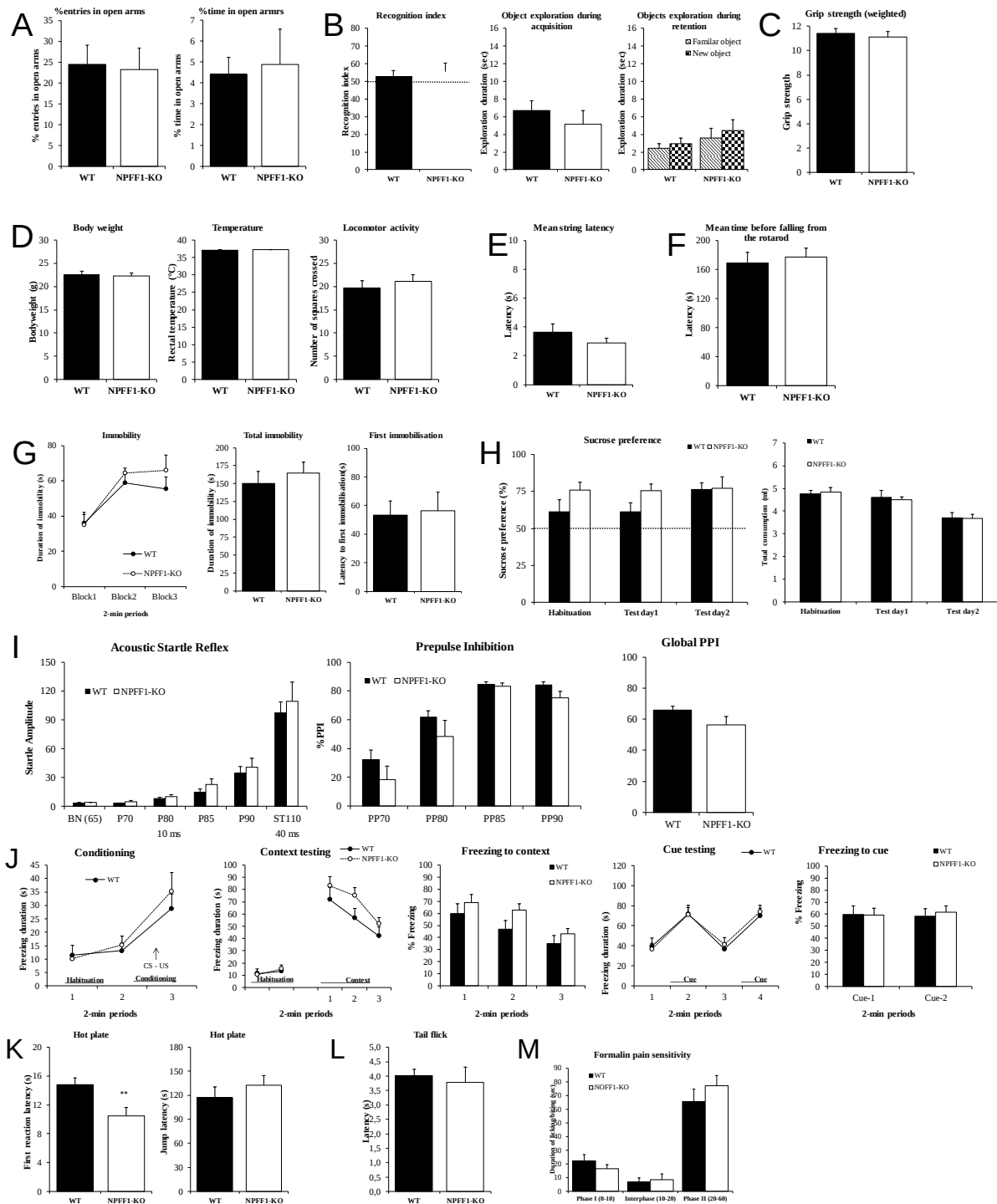


Figure 25 –Phénotype global des souris KO NPFFR1

A: elevated plus maze, B: Object recognition C: Grip test D: Modified Shirpa E: String test F: Rotarod G: Tail suspension H: Sucrose preference I: Acoustic startle reflex and prepulse inhibition (PPI) J: Fear Conditioning K: Hot plate L: Tail flick M: Formalin

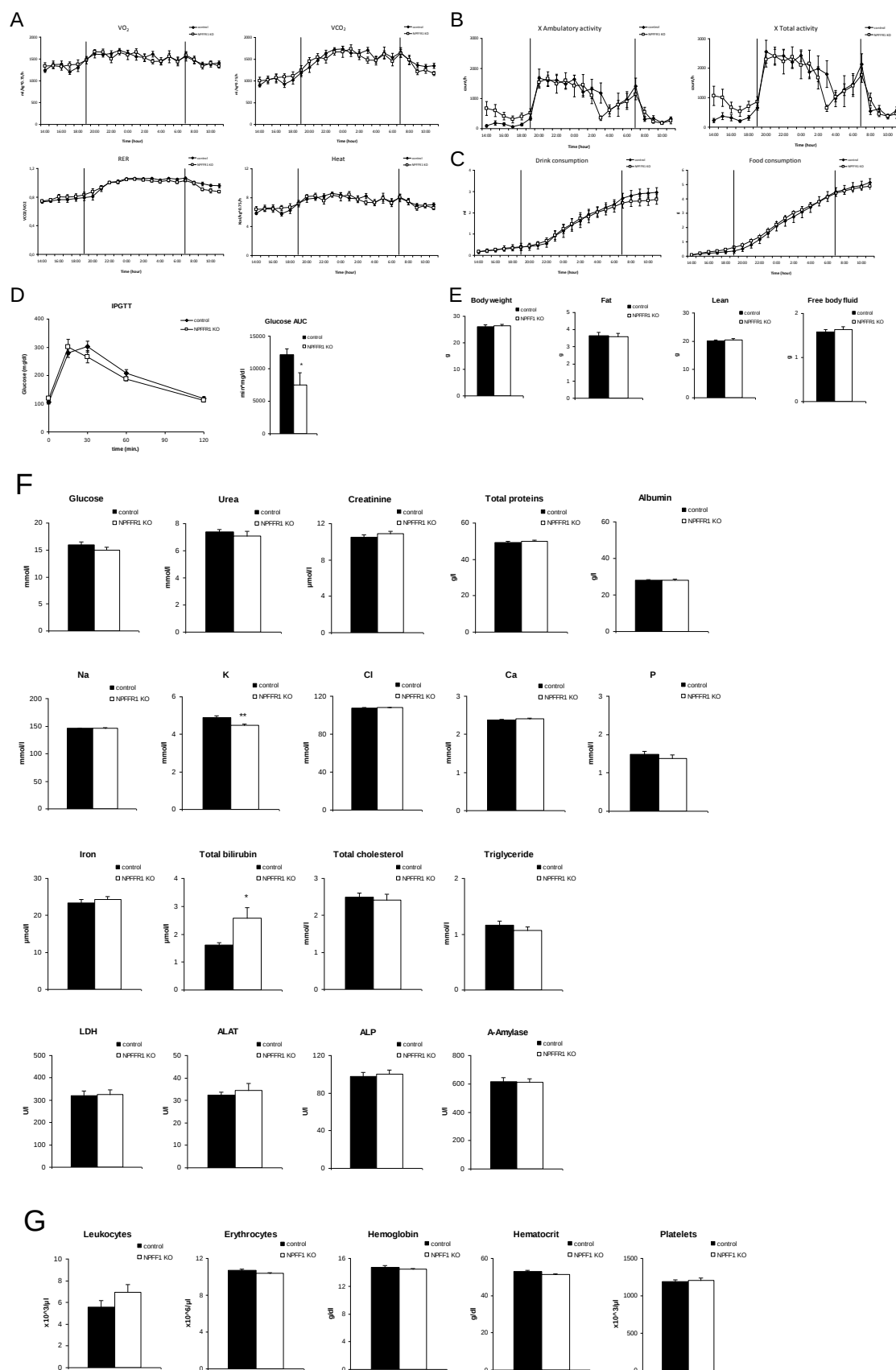


Figure 26- Analyse du métabolisme des souris NPFFR1

A: Energy Expenditure **B:** Activity **C:** Food and water consumption **D:** Glucose tolerance test **E:** Body composition **F:** Blood chemistry **G:** Blood hematology

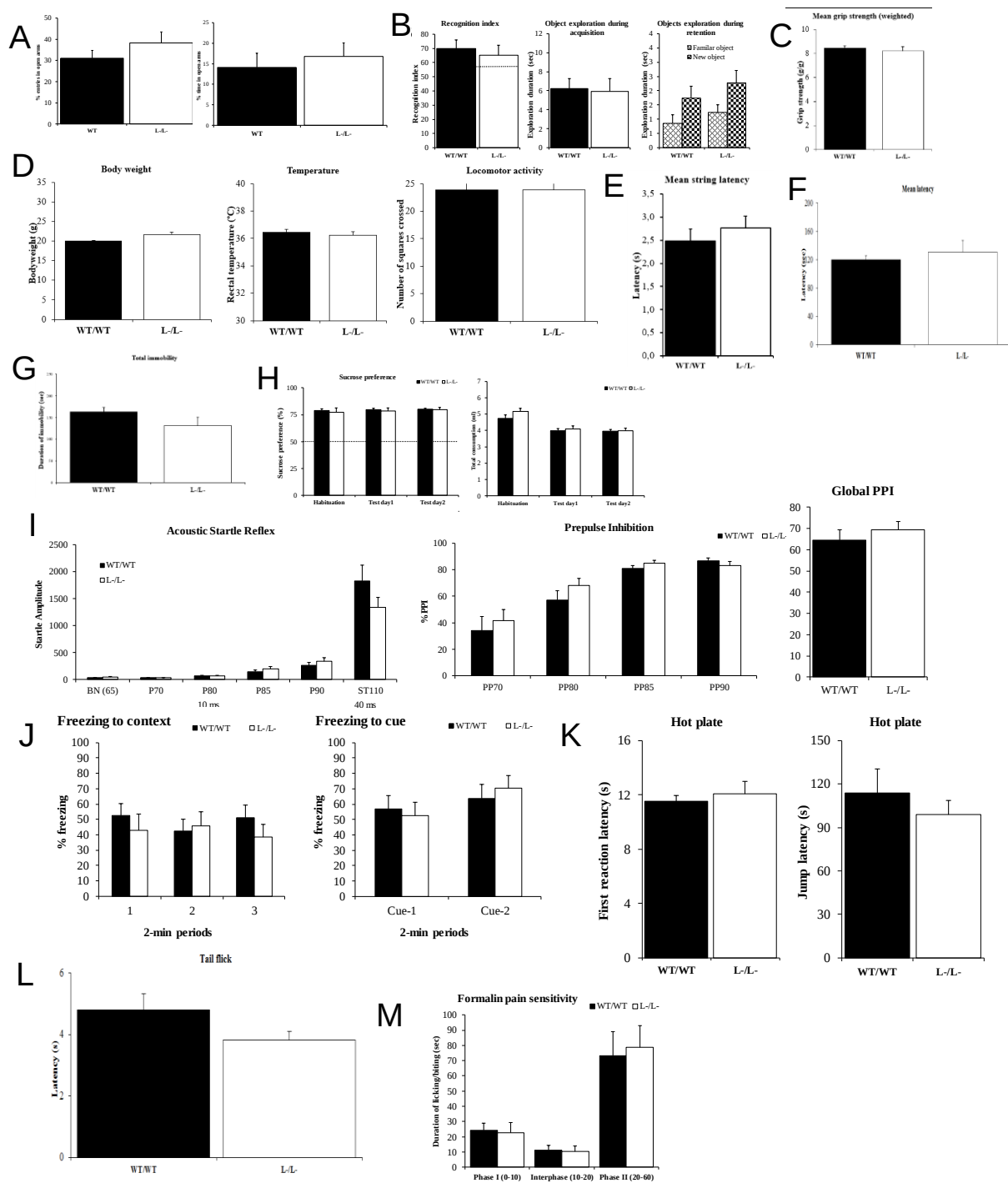


Figure 27 –Phénotypage global des souris KO NPFFR2

A: elevated plus maze, B: Object recognition C: Grip test D: Modified Shirpa E: String test F: Rotarod G: Tail suspension H: Sucrose preference I: Acoustic startle reflex and prepulse inhibition (PPI) J: Fear Conditioning K: Hot plate L: Tail flick M: Formalin

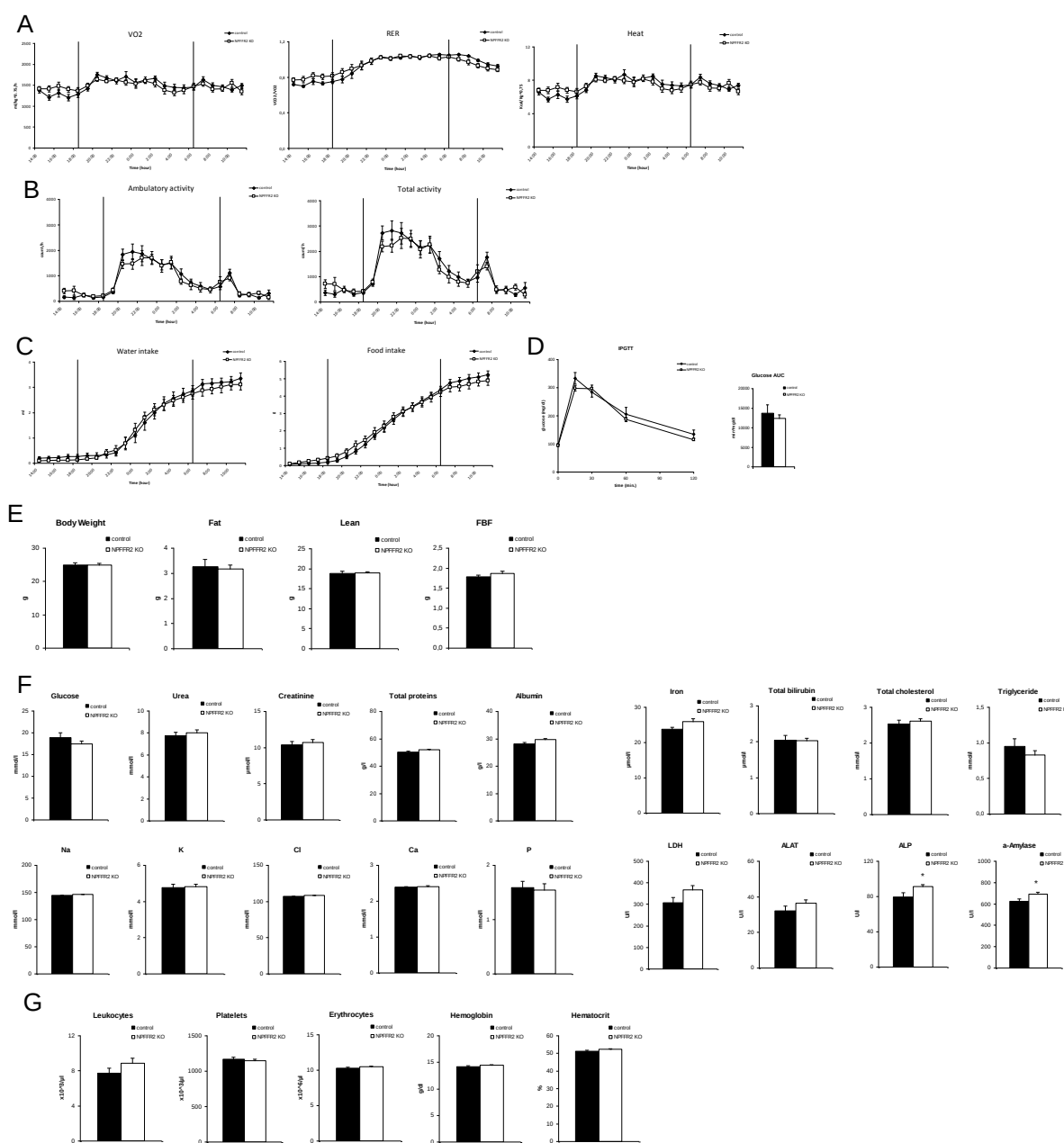


Figure 28- Analyse du métabolisme des souris NPFR2

A: Energy Expenditure B: Activity C: Food and water consumption D: Glucose tolerance test E: Body composition F: Blood chemistry G: Blood hematology

Neuropeptide FF increases M2 activation and self-renewal of adipose tissue macrophages

Syed F. Hassnain Waqas,¹ Anh Cuong Hoang,¹ Ya-Tin Lin,² Grace Ampem,¹ Hind Azegrouz,³ Lajos Balogh,⁴ Julianna Thuróczy,⁵ Jin-Chung Chen,² Ivan C. Gerling,⁶ Sorim Nam,⁷ Jong-Seok Lim,⁷ Juncal Martinez-Ibañez,⁸ José T. Real,⁸ Stephan Paschke,⁹ Raphaëlle Quillet,¹⁰ Safia Ayachi,¹⁰ Frédéric Simonin,¹⁰ E. Marion Schneider,¹¹ Jacqueline A. Brinkman,^{12,13} Dudley W. Lamming,^{12,13} Christine M. Seroogy,¹² and Tamás Röszer¹

¹Institute of Comparative Molecular Endocrinology, University of Ulm, Ulm, Germany. ²Department of Physiology and Pharmacology and Graduate Institute of Biomedical Sciences, Chang Gung University; Neuroscience Research Center, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan, Taiwan. ³Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA. ⁴National Research Institute for Radiobiology and Radiohygiene, Budapest, Hungary. ⁵University of Veterinary Medicine, Budapest, Hungary. ⁶Department of Medicine, University of Tennessee, Memphis, Tennessee, USA. ⁷Department of Biological Science, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea. ⁸Department of Medicine, Hospital Clínico Universitario de València, Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Valencia, Spain. ⁹Department of General and Visceral Surgery, University Hospital Ulm, Ulm, Germany. ¹⁰Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR 7242, Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), Université de Strasbourg, Illkirch, France. ¹¹Division of Experimental Anesthesiology, University Hospital Ulm, Ulm, Germany. ¹²University of Wisconsin, School of Medicine and Public Health, Madison, Wisconsin, USA. ¹³William S. Middleton Memorial Veterans Hospital, Madison, Wisconsin, USA.

The quantity and activation state of adipose tissue macrophages (ATMs) impact the development of obesity-induced metabolic diseases. Appetite-controlling hormones play key roles in obesity; however, our understanding of their effects on ATMs is limited. Here, we have shown that human and mouse ATMs express NPFFR2, a receptor for the appetite-reducing neuropeptide FF (NPFF), and that NPFFR2 expression is upregulated by IL-4, an M2-polarizing cytokine. Plasma levels of NPFF decreased in obese patients and high-fat diet-fed mice and increased following caloric restriction. NPFF promoted M2 activation and increased the proliferation of murine and human ATMs. Both M2 activation and increased ATM proliferation were abolished in NPFFR2-deficient ATMs. Mechanistically, the effects of NPFF involved the suppression of E3 ubiquitin ligase RNF128 expression, resulting in enhanced stability of phosphorylated STAT6 and increased transcription of the M2 macrophage-associated genes IL-4 receptor α (*Il4ra*), arginase 1 (*Arg1*), IL-10 (*Il10*), and alkylglycerol monooxygenase (*Agmo*). NPFF induced ATM proliferation concomitantly with the increase in N-Myc downstream-regulated gene 2 (*Ndrg2*) expression and suppressed the transcription of *Ifi202* cell-cycle inhibitor family members and MAF bZIP transcription factor B (*Mafb*), a negative regulator of macrophage proliferation. NPFF thus plays an important role in supporting healthy adipose tissue via the maintenance of metabolically beneficial ATMs.

Introduction

Adipose tissue macrophages (ATMs) are immune cells of adipose tissue (AT) stroma with key roles in AT development and metabolism (1). ATMs accumulate in AT in obesity and undergo so-called classical M1 polarization to a metabolically harmful proinflammatory phenotype, which drives obesity-associated metabolic diseases (2). M1-activated ATMs produce inflammatory cytokines, NO, and ROS that induce AT inflammation, leading to insulin resistance (IR) and contributing to comorbidities of obesity (2). Given the near-pandemic incidence of obesity and associated metabolic diseases, there is a clear need for a better understanding of how the quantity and activation of ATMs are controlled (1).

M1-activated ATMs are replenished from circulating monocytes that infiltrate obese AT (3). ATMs also proliferate locally in obese AT, increasing the quantity of M1-activated ATMs and exacerbating AT inflammation (4). ATMs can also adopt an alternative

or M2 activation state, which supports the resolution of inflammation and is hence metabolically beneficial; the prevalent ATM activation state in lean AT is M2 (2). Th2 cytokines, lipid metabolites, neurotransmitters, and hormones can shift ATMs into an M2-activated state (5); however, how these signals function to control the replenishment of metabolically beneficial ATMs is unknown.

Neuropeptide FF (FLFQPRFamide, abbreviated herein as NPFF) is a member of the evolutionarily conserved RF-amide neuropeptide family (6). NPFF has been principally studied in mammals as a pain modulator and in the adaptive responses to opiate treatment, but it can also reduce food intake in rodents by acting at hypothalamic nuclei (6, 7). Appetite control is key in obesity development, and in vitro studies have shown that NPFF inhibits both human and murine adipocyte development (8, 9). Peripheral tissues have negligible NPFF receptor expression, with the exception of AT, in which NPFF receptor 2 (NPFFR2, also known as GPR74, HG31, and NPFF2) is expressed (10, 11). Genetic variance of *NPFFR2* is closely associated with obesity status (12). Human plasma contains NPFF (13), and it is postulated that NPFF may be released from nerve endings in AT (11). However, the in vivo role of NPFF in AT function is unknown.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Submitted: August 31, 2016; **Accepted:** April 6, 2017.

Reference information: *J Clin Invest*. <https://doi.org/10.1172/JCI90152>.

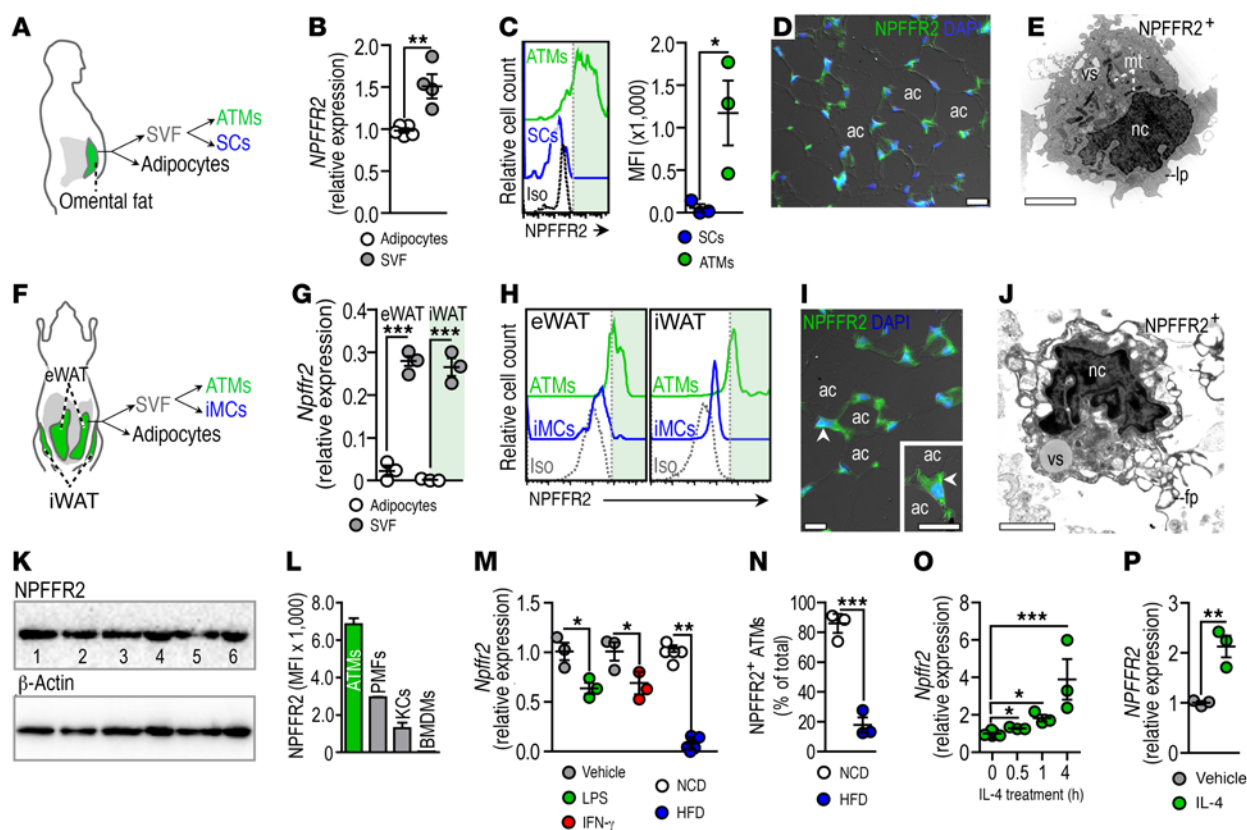


Figure 1. Human and mouse ATMs express NPFFR2, which increases after IL-4 exposure. (A) Diagram of human cell types of the omental fat depot analyzed in this study. ATMs, CD68⁺CD14⁺ ATMs; SCs, CD68⁺CD14⁺ stromal cells. (B) NPFFR2 transcription in SVF and adipocytes of human omental fat ($n = 4$). (C) FACS analysis of NPFFR2 expression in human ATMs and SCs. (D) NPFFR2 immunostaining in human omental fat. Scale bar: 25 μ m. (E) TEM image of an NPFFR2⁺ human ATM. Scale bar: 0.5 μ m. (F) Diagram of the analyzed mouse fat depots. (G) Relative transcription of *Npffr2* in SVF of lean mice; each data point shows pools of cells from 3 mice. (H) FACS analysis of NPFFR2 expression in mouse ATMs and IMCs. (I) Immunostaining of NPFFR2 in mouse eWAT. Arrowheads indicate the cell border. Scale bars for both images: 25 μ m. (J) TEM image of an NPFFR2⁺ mouse ATM. Scale bar: 0.5 μ m. (K) Western blot of NPFFR2 in mouse ATMs. Lanes 1–3: ATMs from eWAT; lanes 4–6: ATMs from iWAT. (L) FACS analysis of NPFFR2 expression in mouse macrophages. PMFs, peritoneal macrophages; KCs, Kupffer cells; BMDMs, nonstimulated bone marrow-derived macrophages ($n = 3$). (M) *Npffr2* transcription in mouse ATMs after 100 ng/ml LPS or 2.5 ng/ml IFN- γ treatment for 4 hours in vitro or after 3 months on a NCD or HFD ($n = 3$ and 5, respectively). (N) NPFFR2⁺ ATMs in NCD- or HFD-fed mice. Each data points represent pooled ATMs from 2 mice. The experiment was conducted 2 times. (O and P) *Npffr2* and NPFFR2 transcription after 10 ng/ml IL-4 treatment of mouse (O) and human (P) ATMs ($n = 3$). Human ATMs were treated for 4 hours. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$, by unpaired, 2-tailed Student's t test (B, C, G, M, N, and P) and 1-way ANOVA with Dunnett's post-hoc test (O). ac, adipocyte; fp, filopodia; IMCs, immature myeloid cells; iso, isotype; lp, lamellipodia; MFI, mean fluorescence intensity; mt, mitochondria; nc, nucleus; vs, vesicle.

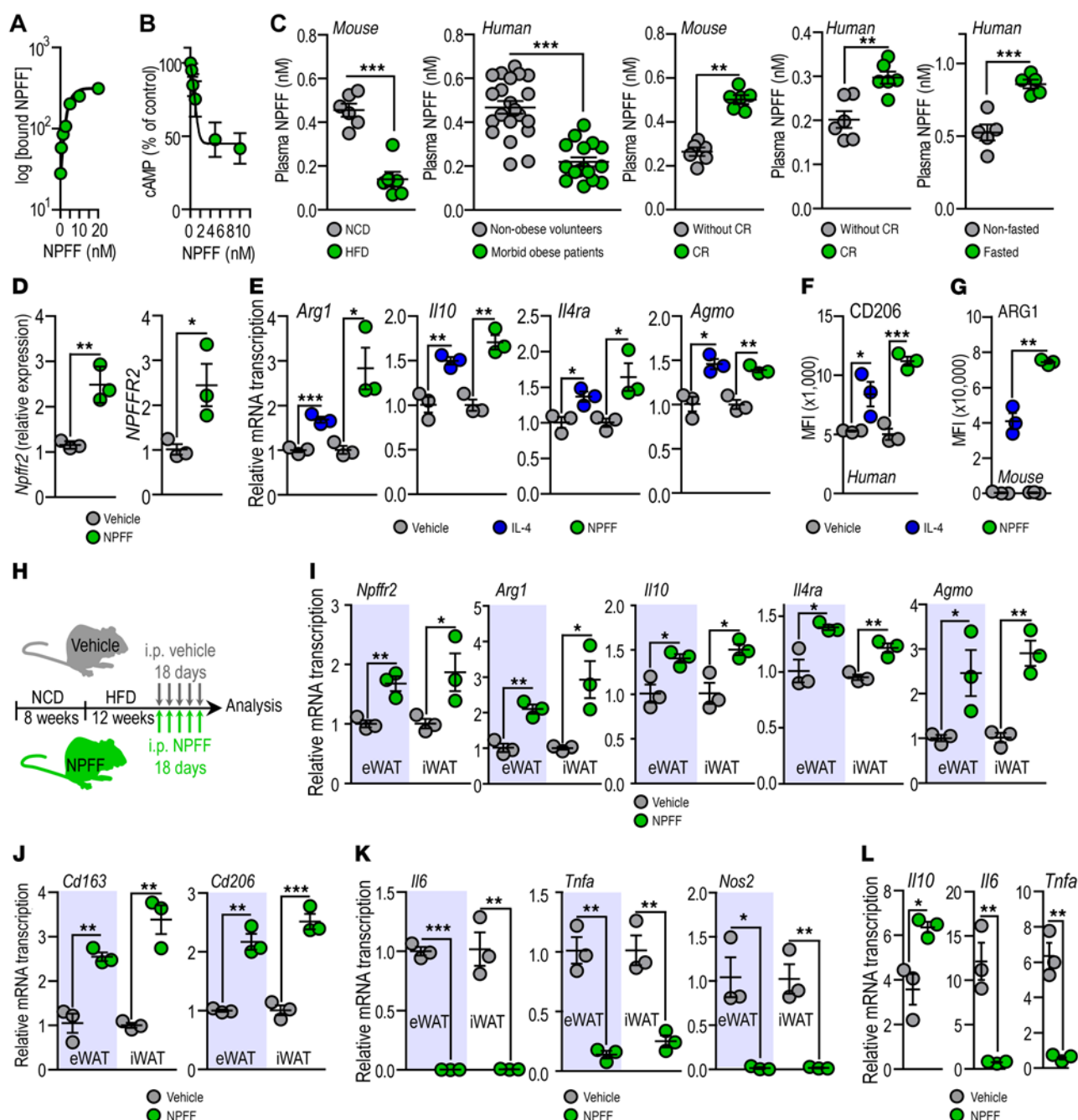
The mechanisms governing macrophage proliferation and M1/M2 polarization are key to defining the metabolic effects of ATMs (2). We show here that NPFF has metabolically beneficial effects on ATMs by increasing M2-macrophage activation and proliferation. Thus, NPFF appears to play an important role in the maintenance of healthy AT.

Results

NPFF receptor expression is restricted to ATMs in AT, and its expression is upregulated by IL-4. NPFFR2 is the principal receptor for NPFF in mammalian cells, and its gene expression has been demonstrated in AT (10). To study the cell-autonomous function of NPFFR2 in AT, we first examined its expression in human omental fat (Figure 1A). We found that NPFFR2 mRNA transcription and NPFFR2 protein expression were restricted to ATMs in the stromal vascular fraction (SVF) (Figure 1, B–E; details of ATM isolation are provided in Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/JCI90152DS1>). Like human AT, we

observed that *Npffr2* mRNA and NPFFR2 protein were expressed only by ATMs in mouse epididymal white adipose tissue (eWAT) and inguinal WAT (iWAT) (Figure 1, F–J). The expression of NPFFR2 was equivalent in ATMs of eWAT and iWAT (Figure 1K). Because eWAT from lean mice contained more ATMs than did iWAT (Supplemental Figure 1, B and C), we used ATMs isolated from eWAT for in vitro assays throughout the study. Other potential receptors of NPFF, such as *Npffr1* and acid-sensing ion channel 1 (*Asic1a*), were not expressed by ATMs (Supplemental Figure 2, A and B).

We next compared NPFFR2 expression levels between ATMs and other macrophage types in mice. Peritoneal macrophages, Kupffer cells, and bone marrow-derived macrophages had minor or negligible NPFFR2 protein and *Npffr2* mRNA expression levels relative to levels detected in ATMs (Figure 1L and Supplemental Figure 2, C and D), whereas the murine macrophage line J774A.1 had more detectable expression of *Npffr2* (Supplemental Figure 2E). Moreover, NPFFR2 transcription was undetectable in human peripheral blood monocytes and in nonadherent, monocytic THP1



cells (Supplemental Figure 2F). Overall, these results suggest that ATMs are potential targets of NPFF.

The metabolic effects of ATMs are determined by their activation state (2). M1 activation of ATMs contributes to AT inflam-

mation, which can exacerbate IR in obese AT. M1 activation can be triggered in vitro by treatment with various agents such as LPS, IFN- γ , or palmitic acid (5). IL-4 induces M2 activation, which is considered metabolically beneficial in AT, since it triggers a

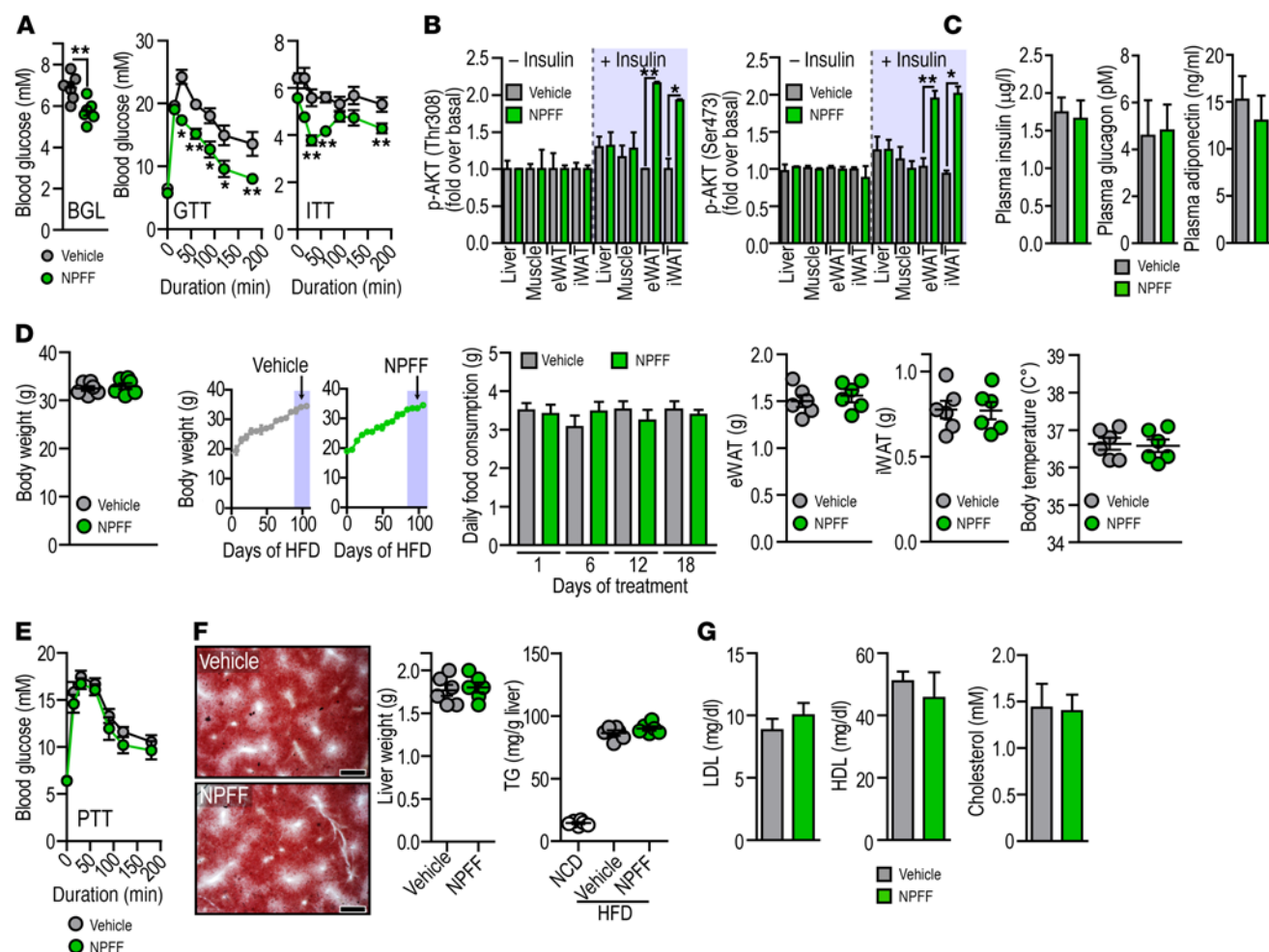


Figure 3. Metabolic phenotyping of HFD-fed mice after NPFF treatment. (A) HFD-fed mice were treated with vehicle or NPFF daily, as shown in Figure 2H. Basal blood glucose level (BGL) after a 4-hour fast, glucose tolerance test (GTT), and insulin sensitivity test (ITT) ($n = 6$). (B) Insulin-induced AKT phosphorylation in liver, quadriceps muscle, eWAT, and iWAT. Total AKT and p-AKT (Ser308 and Thr473) levels were measured by ELISA ($n = 6$). (C) Plasma insulin, glucagon, and adiponectin levels ($n = 6$). (D) Body weight, weight gain, food consumption, eWAT and iWAT weight, and body temperature (measured at 9:00 am) ($n = 6$). (E) PTT ($n = 6$). (F) Oil red O staining of liver sections. Scale bars: 100 μ m. Liver weights and liver triglycerol (TG) content. As a comparison, NCD liver TG content is also shown ($n = 6$). (G) Plasma lipid profile ($n = 6$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, by unpaired, 2-tailed Student's t test and 2-way ANOVA (A) and 1-way ANOVA with Dunnett's post-hoc test (B).

pro-resolving ATM phenotype that can impede AT inflammation and IR (2). Thus, to question whether *Npffr2* transcription was dependent on the ATM activation state, we treated murine ATMs with LPS or IFN- γ and found that *Npffr2* transcription was diminished in response to either treatment (Figure 1M). Obese AT is rich in M1-activated ATMs (2). To test whether obesity-induced ATM activation modulated *Npffr2* transcription, we rendered C57BL/6 mice obese by placing them on a high-fat diet (HFD) for 12 weeks (body and AT weights are shown in Supplemental Figure 3A). When compared with normal diet-fed mice, the total ATM population from HFD-fed mice had diminished *Npffr2* transcription (Figure 1M) and reduced NPFFR2 protein levels (Supplemental Figure 2G), which was reflected by the reduced number of NPFFR2⁺ ATMs (Figure 1N). Murine ATMs treated in vitro with IL-4 increased their expression of *Npffr2* (Figure 1O), which was proportional to the duration of IL-4 exposure. Human ATMs also had upregulated NPFFR2 transcription following IL-4 treatment (Figure 1P), and IL-13 had a similar effect (Supplemental Figure 2H).

Plasma levels of NPFF in mice and humans are sufficient for M2 activation of ATMs. Since *Npffr2* expression was upregulated by IL-4, we questioned whether NPFF impacted the IL-4-induced transcriptional changes in ATMs. Data on NPFF bioavailability and receptor binding are scarce. Thus, we first determined the effective dose of NPFF that could activate NPFFR2 signaling in ATMs. NPFF bound to murine ATMs with a K_D of $0.37 \text{ nM} \pm 0.01 \text{ nM}$ (Figure 2A and Supplemental Figure 3B). NPFFR2 belongs to the family of G_i protein-linked neuropeptide receptors (14), and, accordingly, NPFF treatment strongly reduced cAMP levels in ATMs, with a half-maximal effective concentration (EC_{50}) of $0.40 \pm 0.01 \text{ nM}$ (Figure 2B and Supplemental Figure 3C).

To estimate the NPFF concentration to which ATMs can be exposed in vivo, we determined its concentration in mouse and human plasma (details of the mass spectrometric analysis and ELISA for plasma NPFF levels can be found in Supplemental Figure 4, A–D). The plasma levels of NPFF were $0.53 \text{ nM} \pm 0.02 \text{ nM}$ in lean 8-week-old male C57BL/6 mice and $0.48 \text{ nM} \pm 0.03 \text{ nM}$

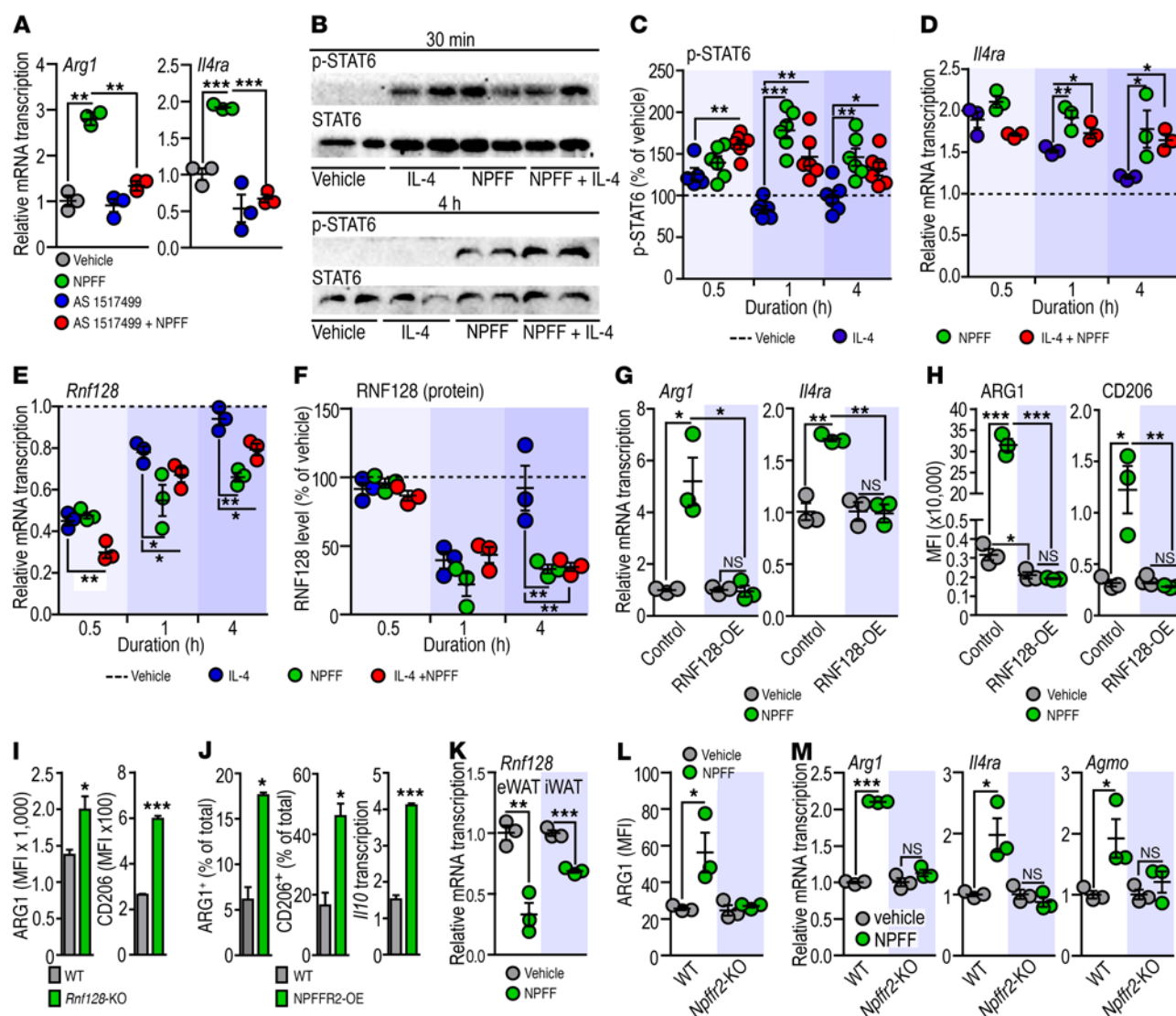


Figure 4. NPFF inhibits p-STAT6 decay and triggers M2 activation of ATMs. (A) Effect of the STAT6 inhibitor AS1517499 (200 nM) on NPFF-induced *Arg1* and *Il4ra* transcription. ATMs were treated with 0.5 nM NPFF for 1 hour. (B) Western blot of p-STAT6/STAT6 in ATMs treated with 100 ng/ml IL-4 or 0.5 nM NPFF. Each lane corresponds to pooled ATMs from 3 to 5 mice. Results are representative of 3 independent experiments. (C) p-STAT6 levels following 10 ng/ml IL-4 and 0.5 nM NPFF treatment, as measured by in-cell ELISA. (D) Effect of 10 ng/ml IL-4 and 0.5 nM NPFF on the transcription of *Il4ra* in ATMs. (E) Effect of 10 ng/ml IL-4 and 0.5 nM NPFF on the transcription of *Rnf128* in ATMs. (F) RNF128 levels in lysates of ATMs treated with 10 ng/ml IL-4, 0.5 nM NPFF, or their combination. In C–F, the dotted lines represent the levels with vehicle treatment. (G and H) Relative transcription and MFI of M2 markers in control and RNF128-overexpressing (RNF128-OE) J774A.1 macrophages after a 4-hour treatment with vehicle or 0.5 nM NPFF. (I) MFI of M2 markers in ATMs from WT and *Rnf128*-KO mice. Data points represent pooled ATMs from 2 mice. The experiment was conducted 2 times. (J) Percentage of M2 ATMs and relative transcription of *Il10* in ATMs from WT and NPFFR2-overexpressing (NPFFR2-OE) mice ($n = 6$). (K) Relative transcription of *Rnf128* in ATMs from vehicle-treated and NPFF-treated HFD-fed mice (treatment scheme as in Figure 2H). Data points represent pooled ATMs from 2 mice. The experiment was conducted 2 times. In A and C–F, the data points represent pooled ATMs from 3 mice. The experiment was conducted 3 times. (L and M) Arginase 1 expression (L) and transcriptional changes (M) in WT and *Npffr2*-KO ATMs evoked by 0.5 nM NPFF within 1 hour. ATMs harvested from 6 mice and treated in triplicate. The experiment was conducted 6 times. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ by 1-way ANOVA with Dunnett's post-hoc test (A and C–H) and unpaired, 2-tailed Student's t test (I–M).

in nonobese volunteers (Figure 2C). These values fit well with the EC_{50} of NPFFR2 in ATMs. We found no correlation between age and sex and human plasma NPFF levels (Supplemental Figure 4E). By contrast, in HFD-fed mice and morbidly obese patients, the plasma concentrations of NPFF were below the EC_{50} for NPFFR2 (Figure 2C; see the Supplemental Information for a summary of the patients' metabolic parameters). This reduction in plasma NPFF levels was reversed by caloric restriction (CR) in both HFD-

fed mice and morbidly obese patients (Figure 2C). We found that intermittent fasting also increased plasma NPFF levels in lean volunteers (Figure 2C). Indeed, plasma glucose levels negatively correlated with plasma NPFF levels in both mice and humans (Supplemental Figure 4F).

NPFF is released from the hypothalamus and from peripheral nerves within the adrenal gland (13). In addition, we identified the pancreas as a site of *Npff* expression (Supplemental Fig-

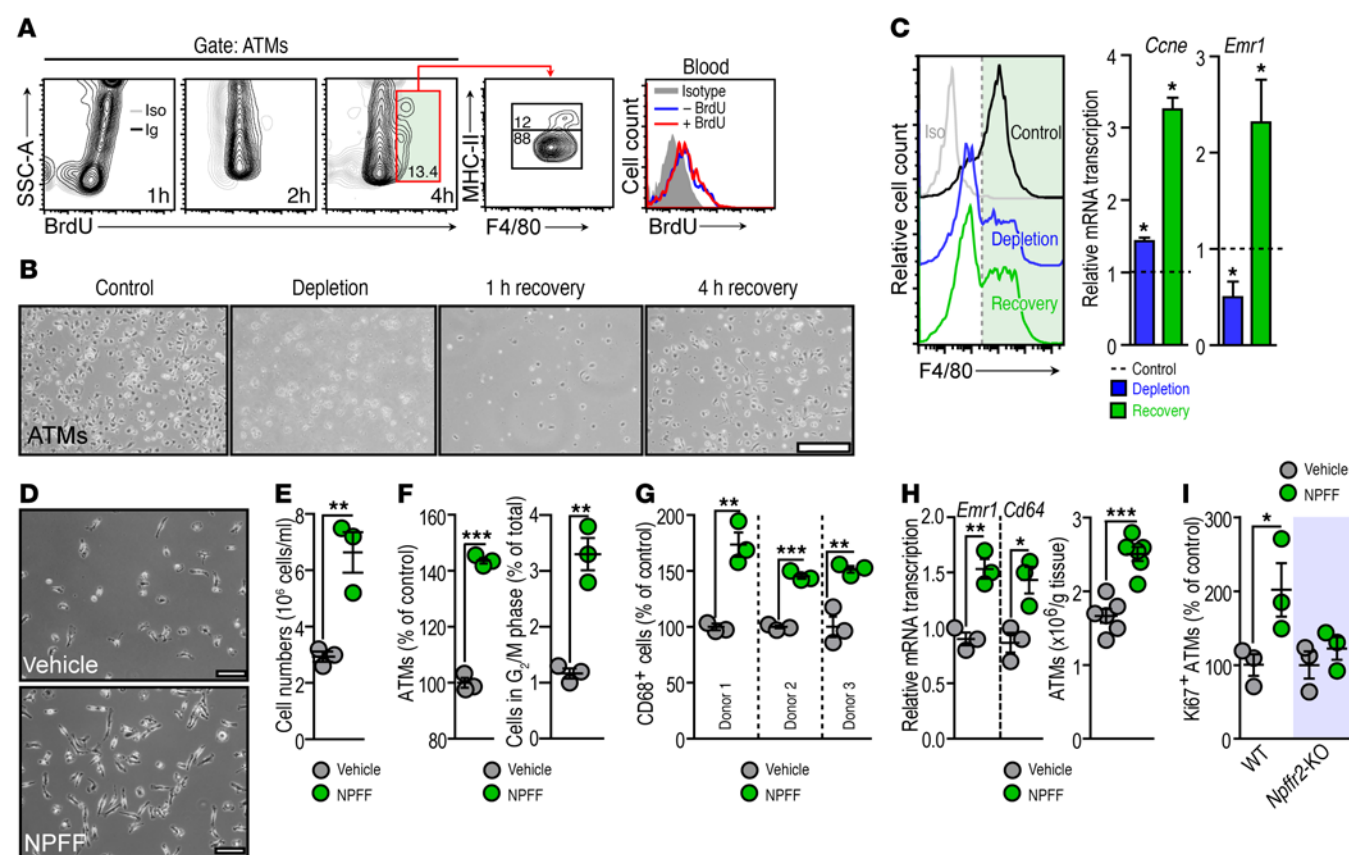


Figure 5. NPFF increases the proliferation of ATMs. (A) Mice were injected with BrdU, and ATMs were isolated after BrdU administration as shown. FACS analysis of BrdU⁺ ATMs from eWAT. BrdU incorporation was also assessed in blood cells after 4 hours. SSC-A, side scatter area. (B) SVF cells pooled from eWAT from 6 lean mice were cultured in vitro (Control). SVF cells were incubated with clodronate liposomes for 1 hour (Depletion). Apoptotic cells were removed by washing, and surviving cells were allowed to recover in fresh medium for 1 hour and 4 hours. Scale bar: 100 μ m. (C) FACS analysis of cells from the experiment shown in B (left). Relative transcription of *Ccne* and *Emr1* in SVF cells treated with clodronate liposomes (blue bars) and allowed to recover for 2 hours (green bars) (right). Dashed lines indicate gene transcription level in control cells. (D) Overview of ATM cultures treated with vehicle or 0.5 nM NPFF (18 hours). Scale bars: 50 μ m. (E) Number of ATMs after treatment with vehicle or 0.5 nM NPFF for 18 hours. (F) Proliferation of mouse ATMs cultured in vitro and treated for 18 hours with 0.5 nM NPFF. ATMs were pooled from 3 to 5 mice and treated in triplicate in D–F. (G) Proliferation of human ATMs in response to treatment with 0.5 nM NPFF for 18 hours. ATMs were isolated and cultured in triplicate from each donor. (H) HFD-fed mice were treated with vehicle or NPFF as shown in Figure 2H. Relative transcription of the macrophage markers *Emr1* and *Cd64* (also known as *Fcgr1a*) was measured in SVF. Each data point represents pooled ATMs from eWAT of 2 mice. The experiment was conducted 2 times. Quantity of ATMs in eWAT after treatment with vehicle or NPFF ($n = 6$). The values for iWAT are shown in Supplemental Figure 16G. (I) Proliferation of in vitro cultured WT and *Npffr2*-KO ATMs treated with 0.5 nM NPFF for 4 hours. ATMs were pooled from 6 mice and treated in triplicate. The experiment was conducted 6 times. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$, by unpaired, 2-tailed Student's t test.

ure 5). In both mice and humans, the majority of the pancreatic polypeptide- and somatostatin-containing endocrine cells of the islets contained NPFF-immunoreactive material (Supplemental Figure 6). Of note, pancreatic transcription of *Npff* was reduced in HFD-fed mice, whereas hypothalamic *Npff* levels remained unchanged (Supplemental Figure 6I).

We treated ATMs with 0.5 nM NPFF, a concentration that was within the plasma level range in lean mice and humans and an effective dose for reducing intracellular cAMP levels (Figure 2, A–C). This concentration of NPFF increased the transcription of *Npffr2* and *NPFFR2* in mouse and human ATMs, respectively (Figure 2D), and mimicked the effect of IL-4 (Figure 2, E–G, and Supplemental Figure 7A).

In mouse ATMs, both NPFF (0.5 nM) and IL-4 (10 ng/ml) increased the transcription of arginase 1 (*Arg1*), IL-10 (*Il10*), and IL-4 receptor α (*Il4ra*), all of which are effectors of M2 macrophages

(Figure 2E). These transcriptional changes were concomitant with reduced transcription of the M1 markers IL-6 (*Il6*) and TNF- α (*Tnf α*) (Supplemental Figure 7A). IL-4 and NPFF also upregulated *Agmo* (Figure 2E), which encodes alkylglycerol monooxygenase (AGMO, EC 1.14.16.5). AGMO has antiinflammatory potential (15, 16), and *Agmo* transcription was reduced in response to LPS and IFN- γ (Supplemental Figure 7B). In human ATMs, NPFF treatment increased the expression of CD206 (also known as MRC-1) (Figure 2F), which is associated with M2-like, pro-resolving activation of human macrophages (17, 18) (Supplemental Figure 7C). Moreover, in human ATMs, NPFF increased the transcription of *IL4RA* and *AGMO*, the human homologs of *Il4ra* and *Agmo* (Supplemental Figure 7C). Prolonged exposure to NPFF (24 h) led to an increase in arginase 1 expression in mouse ATMs, which was more robust than that provoked by IL-4 (Figure 2G). Peritoneal macrophages and Kupffer cells, which have moderate or negligible NPFFR2 expression when

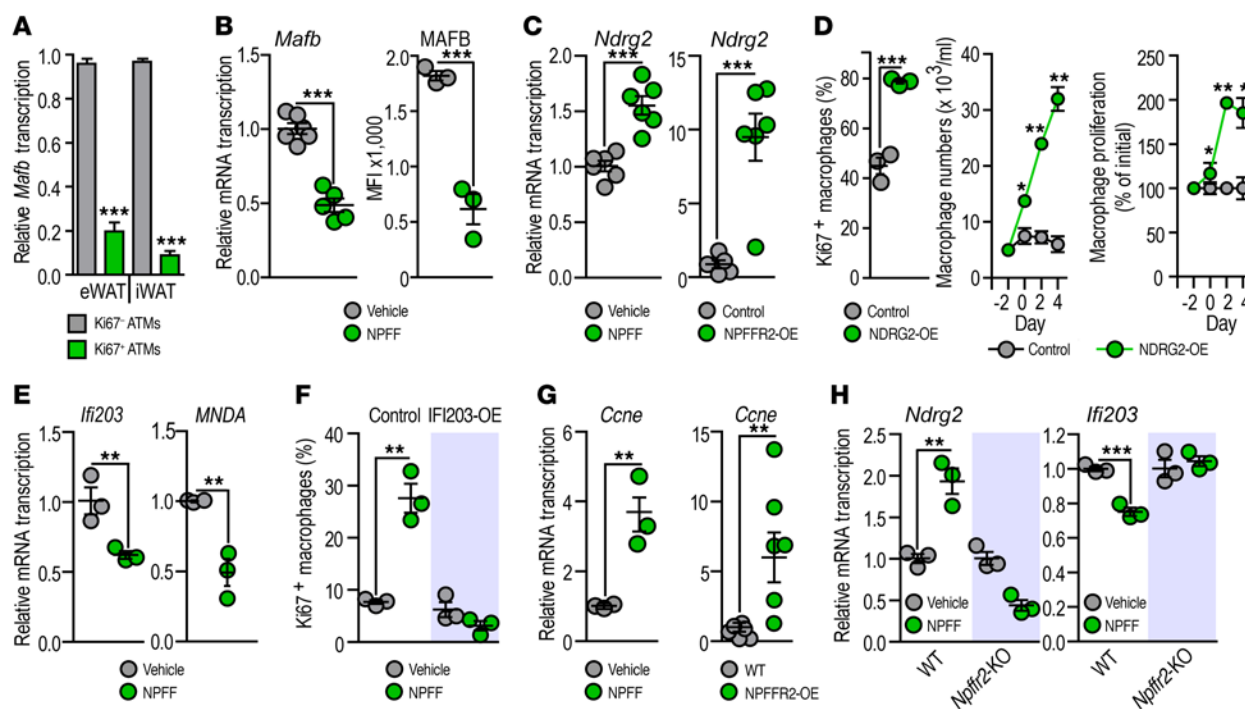


Figure 6. NPFF suppresses the cell cycle inhibiting gene transcription in ATMs. (A) Relative transcription of *Mafb* in Ki67⁻ and Ki67⁺ ATMs ($n = 3$). (B) Relative transcription of *Mafb* and MFI of MAFB protein in mouse ATMs treated with vehicle or 0.5 nM NPFF for 4 hours ($n = 5$ and 3, respectively). (C) Relative transcription of *Ndr2* in ATMs treated with 0.5 nM NPFF for 0.5 hours ($n = 5$) and in freshly isolated ATMs from WT or NPFFR2-overexpressing (NPFFR2-OE) mice ($n = 6$). (D) Cell numbers and proliferation of control and NDRG2-overexpressing (NDRG2-OE) U937 macrophages ($n = 3$). Quantity of Ki67⁺ cells in control and NDRG2-overexpressing U937 macrophage cultures after 4 days of culture ($n = 3$). (E) Relative transcription of *Ifi203* in mouse ATMs in response to treatment for 0.5 hours with 0.5 nM NPFF. Relative transcription of *MNDA* in human ATMs in response to a 4-hour treatment with 0.5 nM NPFF ($n = 3$). (F) Effect of a 4-hour treatment with 0.5 nM NPFF on the proliferation of control and IFI203-overexpressing (IFI203-OE) J774A.1 macrophages ($n = 3$). (G) Relative transcription of *Ccne* in ATMs treated with 0.5 nM NPFF for 4 hours and in WT and NPFFR2-overexpressing ATMs ($n = 3$ and 7, respectively). (H) Effect of 0.5 nM NPFF on *Ndr2* and *Ifi203* transcription in WT and *Npffr2*-KO ATMs. ATMs were pooled from 3 mice and treated in triplicate. The experiment was conducted 3 times. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$, by unpaired, 2-tailed Student's *t* test.

compared with ATMs (Figure 1L and Supplemental Figure 2C), failed to upregulate *Arg1*, *Il4ra*, or *Agmo* or reduce *Tnfa* following 0.5 nM NPFF treatment in vitro (Supplemental Figure 7D). To evaluate whether the plasma levels of NPFF found in obesity could effect changes in ATMs, we treated mouse ATMs with 0.2 nM NPFF; however, this concentration failed to induce M2 activation (Supplemental Figure 7E), corroborating the notion that plasma levels of NPFF in obesity are insufficient to affect ATM activation.

NPFF causes M2 activation of ATMs in vivo. Our finding that diet-induced obesity reduced NPFF plasma levels and diminished the prevalence of *Npffr2*-expressing ATMs suggested that the M2-activating effect of NPFF is lost in this setting. This prompted us to explore whether NPFF replacement could induce M2 activation and yield metabolic benefits in diet-induced obesity. Accordingly, HFD-fed mice were treated with 4 nmol/kg/day NPFF for 18 days (Figure 2H), which increased plasma levels of NPFF to $0.494 \text{ nM} \pm 0.074 \text{ nM}$ versus $0.109 \text{ nM} \pm 0.019 \text{ nM}$ in vehicle-treated mice at the end of the study (Supplemental Figure 8A) and was within the range observed in lean mice (Figure 1C). We analyzed ATMs in both eWAT and iWAT, since AT depots can have a specific impact on metabolism and some hormones or drugs can have adipose depot-specific effects (1, 2). The inflammatory state was comparable between the 2 adipose depots after HFD feeding (Supplemental Figure 7F and Supplemental Figure 8, B–D). The level of transcrip-

tion of *Npffr2*, *Arg1*, *Il10*, *Il4ra*, *Agmo*, *Cd163*, and *Cd206* was higher in ATMs of both depots from NPFF-treated mice than in ATMs from vehicle-treated mice, with a concomitant reduction of *Il6*, *Tnfa*, and *Nos2* transcription (Figure 2, I–K, and Supplemental Figure 8, B–D). These transcriptional changes are characteristic of diminished AT inflammation and have been shown to be protective against the development of IR (19, 20). Obese AT accumulates CD11c⁺ ATMs, which are associated with the dominance of M1-ATM activation (20). We found that NPFF treatment reduced *Cd11c* (also known as *Itgax*) transcription and the amount of CD11c⁺ ATMs in eWAT and iWAT (Supplemental Figure 7F). Indeed, glucose tolerance as well as AT insulin sensitivity were increased after NPFF treatment (Figure 3, A and B), whereas plasma insulin, glucagon, and adiponectin levels (Figure 3C), as well as body weight, food intake, AT weight, and body temperature (Figure 3D) were unaffected by NPFF treatment. Moreover, gluconeogenesis measured by a pyruvate tolerance test (PTT) (Figure 3E), the degree of change in fatty liver (Figure 3F), and the plasma lipid profile (Figure 3G) were unaffected by NPFF. NPFF treatment reduced AT inflammation (Supplemental Figure 7G), however, liver and muscle inflammatory states were unchanged, and NPFF had negligible effects on the transcription of *Il6*, *Tnfa*, *Nos2*, and *Arg1* in Kupffer cells and skeletal muscle (Supplemental Figure 7H), which is in striking contrast to its effect on ATMs in vivo (Figure 2, I–K). These findings suggest that

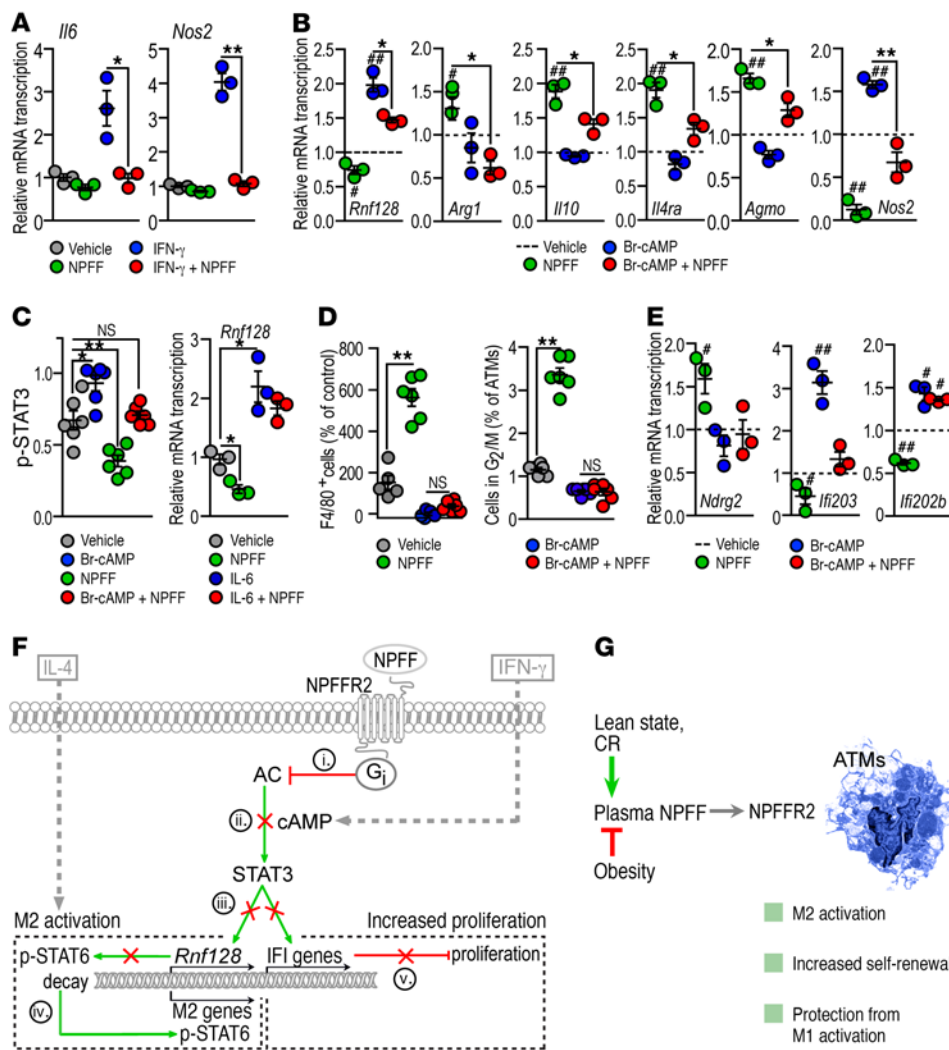


Figure 7. NPFF/NPFFR2 inhibits IFN signaling. (A) Effect of a 4-hour treatment with 0.5 nM NPFF, 2.5 ng/ml IFN- γ , or their combination on *Il6* and *Nos2* transcription in mouse ATMs. (B) Effect of 500 μ M Br-cAMP on the transcriptional changes in mouse ATMs evoked within 0.5 hours by treatment with 0.5 nM NPFF. (C) STAT3 phosphorylation within 20 minutes in mouse ATMs following treatment with 0.5 nM NPFF and 500 μ M Br-cAMP (left). Effect of a 1-hour treatment with 0.5 nM NPFF and 100 ng/ml IL-6 on *Rnf128* transcription in mouse ATMs. The effect of NPFF was also tested following a 20-minute preincubation with IL-6 (right). (D) Proliferation of ATMs treated for 18 hours with 0.5 nM NPFF, 500 μ M Br-cAMP, or their combination. (E) Effect of 500 μ M Br-cAMP and 0.5 nM NPFF on *Ndr2* and *Ifi203* transcription in ATMs and *Ifi202b* transcription in J774A.1 macrophages. In A–E, each data point represents pooled ATMs from 3 to 5 mice. In E, triplicates of J774A.1 cultures were used. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ for the indicated comparisons and * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus vehicle control; 1-way ANOVA with Dunnett's post-hoc test. (F) NPFF action in macrophages (simplified scheme): (i) NPFF/NPFFR2 blocks adenylate cyclase (AC); (ii) NPFF reduces cAMP levels; (iii) STAT3 signaling is inhibited; (iv) Reduced *Rnf128* transcription delays p-STAT6 decay; and (v) Inhibition of IFN-inducible (IFI) genes. (G) Role of NPFF/NPFFR2 signaling in ATMs. Morbid obesity reduces plasma NPFF to levels below the effective dose of NPFF in ATMs.

ATMs are the major targets of NPFF. To further confirm the direct antiinflammatory effect of NPFF on ATMs, we treated them in vitro with palmitic acid to mimic M1 activation caused by lipid overload. We observed that NPFF exposure increased *Il10* transcription and abolished *Il6* and *Tnfa* transcription in palmitic acid-treated ATMs (Figure 2L). NPFF treatment also inhibited nuclear translocation of NF- κ B in an IL-10-dependent manner (Supplemental Figure 9).

NPFF inhibits phosphorylated STAT6 decay in ATMs. It is known that IL-4 exerts its effects on macrophage activation via STAT6 sig-

naling (21). We found that the effect of NPFF on macrophage activation was also dependent on STAT6, as shown by the reduction of *Arg1* and *Il4ra* expression in NPFF-treated ATMs cotreated with the STAT6 inhibitor AS1517499 (Figure 4A; further details on the inhibitory effect of AS1517499 on STAT6 signaling are provided in Supplemental Figure 10A). Accordingly, ATMs cotreated with AS1517499 lost their capacity to phosphorylate STAT6 following NPFF treatment (Supplemental Figure 10B). The level of phosphorylated STAT6 (p-STAT6) was sustained by NPFF for a longer period than was observed with IL-4 (Figure 4, B and C), and, as a consequence, transcription of the STAT6 target *Il4ra* remained elevated for an extended period (Figure 4D). This result is consistent with the finding that arginase 1 expression was higher in NPFF-treated ATMs after 24 hours than in IL-4-treated ATMs (Figure 2G).

These findings led us to investigate whether NPFF inhibited the inactivation of STAT6 signaling. While little is known about the mechanisms that inactivate IL-4/STAT6 signaling in macrophages, proteasomal degradation of p-STAT6 is thought to be an important switch-off mechanism (22). It has been recently demonstrated that the E3 ubiquitin-protein ligase RNF128 (EC 6.3.2.), also known as GRAIL, is responsible for p-STAT6 ubiquitination and proteasomal degradation in Th2 cells (23, 24). The effect of NPFF on transcription of the STAT6 target *Il4ra* was similar to that of RNF128 deficiency in Th2 cells, which increases the transcription of *Il4ra* (24). This prompted us to postulate that the reduced level of RNF128 was responsible for the effect of NPFF in ATMs. Therefore, we measured

Rnf128 transcription after IL-4 and NPFF treatment in ATMs. IL-4 treatment reduced *Rnf128* transcription within 30 minutes, but this effect was lost at longer (1- or 4-h) treatment durations (Figure 4E). Protein expression of RNF128 was strongly decreased by IL-4 within 1 hour; however, the initial level of RNF128 was restored in ATMs treated for 10 hours with IL-4 (Figure 4F). By contrast, in NPFF-treated ATMs, restoration of *Rnf128* mRNA and RNF128 protein levels did not occur if the ATMs were treated with NPFF (Figure 4, E and F).

The above findings suggest that reduced RNF128 is responsible for the maintained STAT6 phosphorylation observed in NPFF-treated ATMs. Supporting this possibility, NPFF failed to maintain STAT6 phosphorylation in J774A.1 macrophages overexpressing RNF128 (Supplemental Figure 10C) and did not induce M2 activation (Figure 4, G and H). In turn, ATMs from RNF128-deficient mice showed increased p-STAT6 levels (Supplemental Figure 11A) and expression of arginase 1 and CD206, both of which are hallmarks of M2 activation (Figure 4I and Supplemental Figure 11B; details on the generation and phenotype of RNF128-deficient mice are provided in Supplemental Figure 11, C–E). Similar to RNF128 deficiency, ATMs overexpressing NPFFR2 had increased expression of arginase 1 and CD206 and transcription of *Il10* (Figure 4J, and Supplemental Figure 12A; details on the generation and phenotype of NPFFR2-overexpressing mice are provided in Supplemental Figure 12, B–E). When HFD-fed mice were treated with NPFF (Figure 2H), the transcription of *Rnf128* was reduced in ATMs (Figure 4K). Human ATMs also had reduced *RNF128* transcription following treatment with 0.5 nM NPFF in vitro (Supplemental Figure 7C).

The M2-activating effects of NPFF were mediated by NPFFR2, since ablation of NPFFR2 abolished NPFF-induced p-STAT6 (Supplemental Figure 10D) and NPFF-induced transcriptional changes (Figure 4, L and M, and Supplemental Figure 8E; details on the generation and phenotype of NPFFR2-deficient mice are provided in Supplemental Figure 13, A–F). Similarly, pharmacological inhibition of NPFFR2 abolished NPFF-induced transcriptional changes (Supplemental Figure 14, A and B).

NPFF increases ATM self-renewal. It has been reported that ATMs can proliferate (4), and recent studies suggest that IL-4 promotes tissue-resident macrophage proliferation (25, 26). Nevertheless, increased ATM proliferation contributes to the accumulation of M1-ATMs in obese AT (1, 4); however, signals controlling self-renewal of ATMs are poorly understood (1). Whether local proliferation is relevant for ATM replenishment in lean AT is also unknown. Nonetheless, this possibility was supported by our findings that Ki67⁺ ATMs were present in both eWAT and iWAT (Supplemental Figure 15), and BrdU was incorporated into ATMs (Figure 5A). The time window for BrdU incorporation into ATMs matched the ATM proliferation rate reported for obese AT in mice (27). BrdU was not incorporated into blood monocytes (Figure 5A). Altogether, these findings suggest that a proliferating ATM population exists in lean AT, which replenishes ATMs. To study this possibility in more detail, isolated ATMs were maintained in vitro and challenged with clodronate liposomes. Under this condition, blood monocytes cannot be recruited, and new ATMs should be generated from a bone marrow-independent stem cell pool. Shortly after removal of the clodronate liposomes, we found that newly formed ATMs were present in the culture (Figure 5B), as demonstrated by the increased number of F4/80⁺ cells and increased *Emr1* (encoding F4/80 antigen) transcription (Figure 5C). ATM recovery was associated with increased cyclin E (*Ccne*) transcription (Figure 5C). We observed that replenishment of ATMs was also increased in vitro by NPFF treatment (Figure 5, D and E).

To corroborate the finding that NPFF increases ATM self-renewal, we treated mouse and human ATMs in vitro with 0.5 nM NPFF. The number and proliferation of both mouse and

human ATMs were increased by NPFF treatment (Figure 5, F and G). Similarly, the number of ATMs was increased following NPFF treatment of mice (Figure 5H, Supplemental Figure 14C, and Supplemental Figure 16G). ATMs lacking NPFFR2 expression failed to upregulate proliferation in response to NPFF (Figure 5I), and pharmacological inhibition of NPFFR2 abolished the effect of NPFF on macrophage proliferation (Supplemental Figure 14C and Supplemental Figure 16, A–F). Accordingly, NPFFR2-overexpressing mice had increased ATM numbers and proliferation (Supplemental Figure 12F), while NPFFR2-deficient mice had reduced ATM numbers and proliferation (Supplemental Figure 13, G and H), without an effect on peripheral blood hematology (Supplemental Figure 12G and Supplemental Figure 13I).

Proliferating ATMs in both eWAT and iWAT had lower expression levels of the transcription factor MAF bZIP transcription factor B (*Mafb*) than did quiescent ATMs (Figure 6A). Reduced *Mafb* transcription allows macrophage proliferation (25, 28, 29), and we have previously demonstrated the impact of low *Mafb* transcription levels on the proliferation of macrophage precursors (28). When mouse ATMs were treated with NPFF, mRNA and protein expression levels of *Mafb* were decreased (Figure 6B).

NPFF treatment or NPFFR2 overexpression increased the transcription of N-Myc downstream-regulated gene 2 (*Ndr2*) in ATMs (Figure 6C). NDRG2 can increase cell proliferation in specific cell types (30); however, its impact on macrophage proliferation is not known. Overexpression of NDRG2 in U937 macrophages (Supplemental Figure 13J) led to increased proliferation, mimicking the effect of NPFF (Figure 6D). Furthermore, NPFF treatment decreased the transcription of IFN-inducible 200 (IFI200) family members, which inhibit proliferation and suppress growth in various cell types including macrophage progenitors (31). *Ifi203* was the relevant IFI200 family member expressed in C57BL/6-derived ATMs, whereas *Ifi202b*, *Ifi204*, and *Ifi205* were expressed in BALB/c-derived J774A.1 macrophages (Figure 6E and Supplemental Figure 17A), in agreement with a previous study on strain-specific expression of *Ifi200* genes (32). We found that overexpression of IFI203 (Supplemental Figure 13K) abrogated the effect of NPFF on macrophage proliferation (Figure 6F). Moreover, in human ATMs, myeloid cell nuclear differentiation antigen (*MNDA*), a homolog of the murine IFI200 family, was suppressed by NPFF (Figure 6E).

NPFF-treated ATMs and ATMs overexpressing NPFFR2 had increased *Ccne* transcription, further confirming the notion that NPFF/NPFFR2 signaling increases ATM proliferation (Figure 6G). The absence of NPFFR2 abolished the effect of NPFF on *Ndr2* and *Ifi203* transcription in ATMs (Figure 6H). Pharmacological inhibition of NPFFR2 had a similar effect (Supplemental Figure 16F).

NPFF inhibits IFN- γ signaling, which is key for ATM activation and proliferation. IFN- γ treatment reduced *Npffr2* transcription in ATMs (Figure 1M), and, in turn, NPFF treatment abolished the effect of IFN- γ on the transcription of *Il6* and *Nos2* (Figure 7A). We found that NPFF also inhibited IFN-inducible gene transcription in J774A.1 macrophages (Supplemental Figure 17, B and C). The NPFF-regulated genes ring finger protein 128 (*Rnf128*), *Ndr2*, and *Ifi200* family members are IFN-responsive genes, and IFN- γ had an effect opposite that of NPFF on their transcription (Supplemental Figure 17C).

NPFF triggers a strong reduction of intracellular cAMP, contrasting with the effect of IFN- γ , which increases cAMP levels (33–35). Thus, we hypothesized that the antagonistic effects of IFN- γ and NPFF on cAMP synthesis were key for NPFF-induced M2 activation and proliferation of ATMs. As with IFN- γ , the cAMP analog Br-cAMP provoked a pronounced increase in *Rnfl28* transcription and thus had an effect opposite that of NPFF (Figure 7B). Br-cAMP abolished the inhibitory effect of NPFF on the transcription of *Rnfl28* and impeded M2 activation provoked by NPFF (Figure 7B). A recent study has shown that cAMP is involved in STAT3 signaling (35), and a STAT3 response element is present in the *Rnfl28* promoter (Supplemental Figure 17D). We found that Br-cAMP increased STAT3 phosphorylation in ATMs, and this effect was antagonized by NPFF (Figure 7C). When STAT3 was phosphorylated by IL-6 before treatment, NPFF failed to reduce *Rnfl28* transcription (Figure 7C).

Like M2-activation, increased ATM proliferation was dependent on the reduction of intracellular cAMP levels (Figure 7D). Br-cAMP abolished the effect of NPFF on the proliferation of ATMs (Figure 7D). Further, Br-cAMP abolished the inhibitory effect of NPFF on the transcription of IFI200 family members and abrogated the NPFF-induced upregulation of *Ndr2* transcription (Figure 7E).

Discussion

This study shows that NPFF is a potent regulator of ATM quantity and quality. We demonstrate here that NPFF/NPFFR2 signaling in macrophages augments STAT6 signaling, which mimics M2 activation and enhances macrophage self-renewal. NPFF/NPFFR2 signaling is thus a common hub for the control of macrophage activation and proliferation.

It has been known for more than 20 years that human plasma contains levels of NPFF one order of magnitude higher than the levels found in cerebrospinal fluid, and, consequently, it has been hypothesized that NPFF is distributed in the bloodstream and acts as a hormone (13, 36). This possibility, however, has not been systematically investigated. Moreover, the known effects of NPFF on metabolism, such as appetite control and thermogenesis, were traditionally associated with its neurotransmitter function in the nervous system (7). We show for the first time to our knowledge that the peripheral effects of NPFF are relevant.

Discrepancies exist between the reported plasma and cerebrospinal fluid levels of NPFF in humans and experimentally used concentrations of NPFF (8, 9, 13, 36–38), making it challenging to distinguish physiological and pharmacological effects of NPFF and to define signaling pathways activated by this neuropeptide. For instance, the inhibitory effect of micromolar amounts of NPFF on NO synthesis in macrophages has been interpreted as an antiinflammatory potential of NPFF (38). However, the NPFF concentration used was orders of magnitude higher than its physiological level, making it conceivable that toxic or nonspecific effects of high-dose NPFF occurred. Our findings show that mouse and human plasma NPFF levels match the EC₅₀ for NPFFR2 determined in our study and by others (39) and that this concentration is effective for inducing ATM proliferation and M2 activation, with concomitant protection from M1 activation. Thus, it is conceivable that plasma NPFF has the potential to control the content and activation state of ATMs.

We show that plasma NPFF levels are reduced in human and murine obesity, together with decreased numbers of *Npffr2*-expressing ATMs in obese AT in mice. Thus, obesity can lead to the loss of the effect of NPFF on ATMs, which is consistent with the current paradigm for the relationship between obesity and dysregulated ATM proliferation and activation (1). NPFF is known as an anorexigenic factor in rodents that acts at hypothalamic nuclei (6, 7). The balance between anorexigenic and orexigenic signals in the hypothalamic center of appetite control is key in obesity development (40). A reduction in plasma NPFF levels may reflect impaired NPFF release from the hypothalamic nuclei in obesity. In addition, diminished *Npff* transcription in the endocrine pancreas can also account for the reduced plasma NPFF pool in obesity.

As shown here, NPFF shifts macrophages to an M2 activation state. IL-4 increases NPFFR2 expression, clearly demonstrating the role of NPFF signaling in M2 macrophages. In HFD-fed mice, NPFF treatment increased *Npffr2* transcription in ATMs and triggered M2 activation of ATMs, and this effect was associated with improved glucose tolerance. Since ATMs are prominent NPFFR2-expressing macrophages, there is the potential for NPFF to reduce AT inflammation. NPFFR2 expression was also detectable at lower levels in other macrophage types, such as Kupffer cells, and NPFF exerted a mild antiinflammatory effect on Kupffer cells. This, however, would augment the beneficial effect of NPFF and not challenge the role of NPFF in M2 activation of ATMs.

The mechanistic basis of NPFF action in macrophages involves diminished cAMP synthesis, which suppresses the transcription of genes involved in the IFN response (Figure 7F). NPFF suppresses the expression of the IFN-responsive gene *Rnfl28*. Reduced *Rnfl28* transcription delays p-STAT6 decay in NPFF-treated macrophages, leading to the transcription of M2 activation genes such as *Arg1*, *Il10*, *Il4ra*, and *Agmo*. Furthermore, NPFF increases the transcription of *Ndr2*, a known inhibitor of STAT3 signaling (41). In addition to the augmented IL-4 signaling, NPFF also increases *Il10* transcription. It is well established that IL-10 suppresses the expression of proinflammatory cytokines as well as antigen-presenting and costimulatory molecules in macrophages (42).

NPFF also suppresses the transcription of members of the IFI200 family. The IFI200 family includes proteins that accumulate in the nucleus during the IFN response and interact with various transcription factors (32, 43). They control the cell cycle in a wide range of cell types including macrophage progenitors (44, 45). IFNs cause growth arrest, and IFI200 family members are involved in this effect (32, 44). While it is known that the *Ifi200* gene family inhibits immune cell proliferation and affects inflammation (32, 44), little is known about how IFI200 expression is controlled. Our study raises the possibility that NPFF exerts hormonal control of IFI200 transcription. This has relevance in various disease conditions such as autoimmunity, in which macrophages, IFN response, and IFI200 family members play key roles (32).

NPFF exerts its effects through NPFFR2 both in vitro and in vivo. We show that NPFF/NPFFR2 signaling is a common hub for M2 activation and increased macrophage proliferation (Figure 7F), thus enriching AT with M2-activated ATMs and impeding AT inflammation (Figure 7G). The impact of macrophage self-renewal has been recently recognized (4, 25, 27); however, the underlying mechanisms that are decisive for ATM proliferation

remain enigmatic. Our findings identify an endogenous hormonal signal mechanism that impacts on ATM self-renewal.

In conclusion, this study shows that NPFF controls ATM self-renewal and M2 activation. NPFF has the unique ability to increase ATM numbers and maintain the newly formed ATMs in an M2-activated state. NPFF can also protect against AT inflammation, the main predisposing factor for IR. Thus, NPFF may have utility as a tool in the future treatment of obesity-associated dysregulation of ATM activation and proliferation.

Methods

Animals. We used C57BL/6 male mice (Charles River Laboratories), NPFFR2-deficient mice, NPFFR2-overexpressing mice, and RNF128-deficient mice on a C57BL/6 background. All mice were 8 weeks of age at the beginning of the experiments. The generation of transgenic mouse lines is described in the Supplemental Methods. Male mice were rendered obese on a 12-week-long HFD consisting of 45% of calories from fat (RD formula; SSNIFF). The control group was fed a normal chow diet (NCD) for the same period. For CR experiments, the test group received a low-calorie diet (SSNIFF) for 2 weeks. For NPFF replacement, HFD-fed mice were injected daily with 4 nmol/kg NPFF (Phoenix Pharmaceuticals Inc.) for 18 days. Each experimental group was established from 6 control and 6 treated mice.

Human samples. Plasma and fat samples were obtained between June 2015 and January 2016 at the Hospital Clínico Universitario de València. The metabolic parameters for patients and volunteers are summarized in Supplemental Table 3. Plasma samples were obtained from healthy volunteers ($n = 32$), morbidly obese patients ($n = 18$), and patients with type 1 diabetes mellitus ($n = 6$). Patient selection was based on the NIH's recommendation of a BMI above 40 kg/m². The nonobese volunteers had a BMI of 20 to 25 kg/m². To test the effect of intermittent fasting, we recruited 10 nonobese volunteers, 5 of whom followed a regime of daily 16-hour fasting for 28 days, while the other 5 volunteers did not fast. Blood samples were collected in EDTA-coated hemotubes and centrifuged, and the plasma samples were stored at -80°C until further analysis. Blood glucose, insulin, and NPFF levels were assayed using commercial ELISA kits from Sigma-Aldrich and Cloud-Clone Corporation. AT samples were collected from the omental fat depot of morbidly obese patients ($n = 16$) during routine bariatric surgical intervention at the Hospital Clínico Universitario de València between June 2015 and January 2016. Eight patients followed a CR diet for 1 month before blood sampling and surgery. These patients were allowed to drink a specially formulated balanced energy drink (Vegenat SA) and other calorie-free drinks such as water, tea, coffee, and nonfat broth. Omental fat from 3 nondiabetic obese donors without CR was used for isolation and in vitro culturing of ATMs. Pancreas samples were collected from deceased organ donors (Network of Pancreatic Organ Donors, University of Florida, Gainesville, Florida, USA), fixed in paraformaldehyde (PFA), and processed for histological and gene expression analysis. Samples from 2 nondiabetic donors were used for histology. Gene expression analysis was performed for 18 control donors with no autoantibodies and no diabetes and 20 donors with type 1 diabetes mellitus (for details, see the Supplemental Information). One patient underwent radical pancreas resection, and plasma samples were collected prior to and after surgery.

Assessment of plasma NPFF levels. Plasma NPFF levels in human and murine plasma were assayed using commercial ELISA kits

(Cloud-Clone Corp.). Details of the mass spectrometric data on plasma NPFF levels and quality control for the ELISA are provided in Supplemental Figure 3.

Isolation and in vitro culture of ATMs. ATMs were isolated from eWAT and iWAT depots from mice and omental fat from human donors using collagenase digestion as described previously (3). ATMs were suspended in selection medium consisting of 2 mM EDTA and 0.5% BSA in PBS, pH 7.4, and used for flow cytometry, transmission electron microscopy (TEM), preparative cell sorting, and RNA extraction, or were cultured in vitro (Supplemental Figure 1). For in vitro culturing, CD11b⁺F4/80⁺ mouse ATMs or CD14⁺CD68⁺ human ATMs were retrieved with preparative cell sorting as described below. ATMs were allowed to adhere to 6-well plates in RPMI 1640 medium with 10% FCS and were treated with NPFF (Tocris Bioscience; Phoenix Pharmaceuticals Inc.), RF9 (14), 100 ng/ml LPS from *E. coli*, 10 ng/ml mouse or human IL-4, 20 ng/ml human IL-13, 5 μg/ml pI:PC, 2.5 ng/ml IFN-γ, 500 μM Br-cAMP (all from Sigma-Aldrich), and 100 ng/ml IL-6 (ImmunoTools) or 200 nM AS 1517499 (Axon Chemicals). NPFF purity was controlled by HPLC.

FACS analysis and preparative cell sorting. Cell density was adjusted to 10⁶ cells/ml, and analysis was performed on a BD LSR II Cell Cytometer (BD Bioscience). The antibodies used are listed in Supplemental Table 1. After a 2-hour incubation, the cells were washed in selection buffer and used for analysis. For preparative cell sorting of CD11b⁺, F4/80⁺; CD14⁺, CD68⁺; NPFFR2⁺; and Ki67⁺ or Ki67⁻ ATMs, we used the Aria Cell Sorter. CD11b, F4/80, CD14, CD68, and NPFFR2 staining was performed on live cells. The sorted cells were collected for Western blotting, RNA extraction, or for further TEM analysis. Ki67 staining was carried out on cells fixed with 2% PFA and permeabilized with 0.05% Triton X-100 to ensure recognition of the nuclear antigen Ki67 by the antibody. In this case, CD11b and F4/80 staining was performed on fixed cells. Sorted Ki67⁻ and Ki67⁺ ATMs were used for RNA extraction. For cell-cycle analysis, the in vitro cultured ATMs were fixed with 2% PFA. Cells were washed with selection buffer and treated with RNAase, and the DNA was stained with propidium iodide (Sigma-Aldrich).

RNA extraction and quantitative PCR. Total RNA was isolated from tissues, adipocytes, and macrophages with TRI Reagent (Sigma-Aldrich). RNA integrity was controlled by denaturing agarose gel electrophoresis. Only nondegraded RNA samples were used for cDNA synthesis, as described previously (46). Sorting of ATMs for Ki67 antigen required prior fixation with PFA, therefore, the RNeasy FFPE Kit (QIAGEN) was used to extract RNA from Ki67⁻ and Ki67⁺ ATMs. The ViiA 7 (Thermo Fisher Scientific) quantitative PCR platform was used for analysis, and gene expression values were expressed as relative mRNA levels according to dCt and ddCt methods, using *Actb* and *Ppia* (also known as *Cypa*) as reference genes for murine samples and *ACTB* and *PPIA* as reference genes for human samples. The primer sequences are provided in Supplemental Table 2.

Supplemental methods. The assessment of glucose homeostasis in mice, TEM of ATMs, analysis of NPFF distribution in pancreas, isolation of resident macrophages, cell culturing of J774A.1 macrophages, Western blot analysis, cell-based ELISA, generation of transgenic mice and macrophages, NPFFR2-binding assay, intracellular cAMP measurement, and Affymetrix gene expression analysis are described in the Supplemental Methods. See complete unedited blots in the supplemental material.

Statistics. All data represent the mean $\pm$ SEM. For statistical analysis, an unpaired, 2-tailed Student's *t* test, 1-way ANOVA with Dunnett's post-hoc test for multiple comparisons, or 2-way ANOVA was applied as appropriate. A *P* value of less than 0.05 was considered significant. GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) and MATLAB (MathWorks) statistical software programs were used.

Study approval. All animal experiments were carried out in accordance with local laws and were approved by local authorities (State of Baden Württemberg, 1206; Chang Gung University, CGU13-014; the IACUC of the University of Wisconsin; National Research Institute for Radiobiology and Radiohygiene Budapest; the University of Strasbourg, PEI/001/2073-6/2014; and the IACUC of the William S. Middleton Memorial Veterans Hospital, 02963.02). Human studies were approved by the local ethics commissions (University of Ulm, 121/16 22050 and 112/2003; University of Tennessee Health Science Center Institutional Review Board, 10-00848-XM; and the University of Valencia, PI 12/01978). None of the patients had clinical symptoms of systemic inflammation, and all provided written informed consent prior to their participation in the study. The patients were identified by numbers.

Author contributions

JCC, JSL, LB, JT, FS, JTR, EMS, DWL, and CMS provided methodology and designed experiments. SFHW, ACH, YTL, GA, HA, LB, JT, ICG, SN, JMI, SP, RQ, SA, and JAB performed experiments and analyzed data. TR conceived the project, designed experiments, and wrote the manuscript.

Acknowledgments

This study was supported by the European Commission Horizon 2020 Research and Innovation Program; a Marie-Curie-Sklodowska Individual Fellowship (655598, to TR); the

German Research Fund (DFG, RO 4856/1-1, to TR); the German Academic Exchange Service DAAD (to SFHW); the Institute of Comparative Molecular Endocrinology (University of Ulm); the NIH (UC4 DK104155, to ICG); and the Juvenile Diabetes Research Foundation (47-2013-520, to ICG). FS, RQ, and SA were supported by the CNRS, Université de Strasbourg and the Laboratoire d'Excellence (LABEX) ANR-10-LABX-0034_Medalis. The laboratory of DWL is supported in part by the NIH (AG050135) and a Glenn Foundation Award for Research in the Biological Mechanisms of Aging. The study with *Rnf128*-KO and control mice was supported using facilities and resources from the William S. Middleton Memorial Veterans Hospital, and this work does not represent the views of the Department of Veterans Affairs or the United States Government. This work was funded in part by the National Cancer Institute (NCI), NIH, Comprehensive Cancer Center Support (CI P30 CA014520-UW, to CMS). The authors thank Susanne Schmidt, Svetlana Wostrezow, and Andriy Rebryk (University of Ulm, Germany) and Zita Pöstényi (NIRH, Budapest, Hungary) for their technical help; Jelena Pistolic and Vladimir Benes (Genomics Core Facility, European Molecular Biology Laboratory [EMBL], Heidelberg, Germany) for assistance with Affymetrix data processing; Marie-France Champy (INSERM, Illkirch, France) for help with metabolic studies; and Kenneth McCreath for critical reading of the manuscript. This study is dedicated to the memory of Prof. Dr. Pál Ker-tai (1927–2016); “*Their leaves will not wither, nor their fruit fail.*”

Address correspondence to: Tamás Röszer, Institute of Comparative Molecular Endocrinology, Center of Biomedical Research, University of Ulm, Science Park I, 89081 Helmholtzstrasse 8.1, Ulm, Germany. Phone: 49.731.50.32630; Email: tamas.roeszer@uni-ulm.de.

- Boutens L, Stienstra R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia*. 2016;59(5):879–894.
- Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1-2):20–44.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796–1808.
- Amano SU, et al. Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab*. 2014;19(1):162–171.
- Röszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:816460.
- Quillet R, Ayachi S, Bihel F, Elhabazi K, Ilien B, Simonin F. RF-amide neuropeptides and their receptors in Mammals: Pharmacological properties, drug development and main physiological functions. *Pharmacol Ther*. 2016;160:84–132.
- Murase T, Arima H, Kondo K, Oiso Y. Neuropeptide FF reduces food intake in rats. *Peptides*. 1996;17(2):353–354.
- Lefrere I, et al. Neuropeptide AF and FF modulation of adipocyte metabolism. Primary insights from functional genomics and effects on beta-adrenergic responsiveness. *J Biol Chem*. 2002;277(42):39169–39178.
- Herrera-Herrera ML, Salazar-Olivo LA. RFamide neuropeptides inhibit murine and human adipose differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377(1):29–34.
- Bonini JA, et al. Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF. *J Biol Chem*. 2000;275(50):39324–39331.
- van Harmelen V, et al. Effects of pain controlling neuropeptides on human fat cell lipolysis. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34(8):1333–1340.
- Hunt SC, et al. Polymorphisms in the NPY2R gene show significant associations with BMI that are additive to FTO, MC4R, and NPFFR2 gene effects. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(11):2241–2247.
- Sundblom DM, Panula P, Fyhrquist F. Neuropeptide FF-like immunoreactivity in human plasma. *Peptides*. 1995;16(2):347–350.
- Simonin F, et al. RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(2):466–471.
- Watschinger K, et al. Tetrahydrobiopterin and alkylglycerol monooxygenase substantially alter the murine macrophage lipidome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(8):2431–2436.
- Tokuoka SM, Kita Y, Shindou H, Shimizu T. Alkylglycerol monooxygenase as a potential modulator for PAF synthesis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;436(2):306–312.
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol*. 2006;177(10):7303–7311.
- Su S, et al. miR-142-5p and miR-130a-3p are regulated by IL-4 and IL-13 and control proinflammatory macrophage program. *Nat Commun*. 2015;6:8523.
- Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol*. 2010;185(11):6413–6419.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175–184.
- Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):750–761.
- Hanson EM, Dickensheets H, Qu CK, Donnelly RP, Keegan AD. Regulation of the dephosphorylation of Stat6. Participation of Tyr-713 in the interleukin-4 receptor alpha, the tyrosine phos-

- phatase SHP-1, and the proteasome. *J Biol Chem.* 2003;278(6):3903–3911.
23. Rusinova I, et al. Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D1040–D1046.
 24. Sahoo A, Alekseev A, Obertas L, Nurieva R. Grail controls Th2 cell development by targeting STAT6 for degradation. *Nat Commun.* 2014;5:4732.
 25. Soucie EL, et al. Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells. *Science.* 2016;351(6274):aad5510.
 26. Jenkins SJ, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science.* 2011;332(6035):1284–1288.
 27. Zheng C, et al. CD11b regulates obesity-induced insulin resistance via limiting alternative activation and proliferation of adipose tissue macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(52):E7239–E7248.
 28. Menéndez-Gutiérrez MP, et al. Retinoid X receptors orchestrate osteoclast differentiation and postnatal bone remodeling. *J Clin Invest.* 2015;125(2):809–823.
 29. Aziz A, Soucie E, Sarrazin S, Sieweke MH. MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. *Science.* 2009;326(5954):867–871.
 30. Anderson KJ, Russell AP, Foletta VC. NDRG2 promotes myoblast proliferation and caspase 3/7 activities during differentiation, and attenuates hydrogen peroxide - But not palmitate-induced toxicity. *FEBS Open Bio.* 2015;5:668–681.
 31. Luan Y, Lengyel P, Liu CJ. p204, a p200 family protein, as a multifunctional regulator of cell proliferation and differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(5-6):357–369.
 32. Choubey D, Panchanathan R. Interferon-inducible Ifi200-family genes in systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett.* 2008;119(1-2):32–41.
 33. Liu L, Wang Y, Fan Y, Li CL, Chang ZL. IFN-gamma activates cAMP/PKA/CREB signaling pathway in murine peritoneal macrophages. *J Interferon Cytokine Res.* 2004;24(6):334–342.
 34. Sato S, Yanagawa Y, Hiraide S, Iizuka K. Cyclic AMP signaling enhances lipopolysaccharide sensitivity and interleukin-33 production in RAW264.7 macrophages. *Microbiol Immunol.* 2016;60(6):382–389.
 35. Tanabe K, Kozawa O, Iida H. cAMP/PKA enhances interleukin-1 β -induced interleukin-6 synthesis through STAT3 in glial cells. *Cell Signal.* 2016;28(1):19–24.
 36. Sundblom DM, Kalso E, Tigerstedt I, Wahlbeck K, Panula P, Fyhrquist F. Neuropeptide FF-like immunoreactivity in human cerebrospinal fluid of chronic pain patients and healthy controls. *Peptides.* 1997;18(7):923–927.
 37. Burlet-Schiltz O, et al. Identification of neuropeptide FF-related peptides in human cerebrospinal fluid by mass spectrometry. *FEBS Lett.* 2002;532(3):313–318.
 38. Sun YL, et al. The anti-inflammatory potential of neuropeptide FF in vitro and in vivo. *Peptides.* 2013;47:124–132.
 39. Jhamandas JH, Goncharuk V. Role of neuropeptide FF in central cardiovascular and neuroendocrine regulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:8.
 40. Sohn JW. Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Rep.* 2015;48(4):229–233.
 41. Lee EB, Kim A, Kang K, Kim H, Lim JS. NDRG2-mediated Modulation of SOCS3 and STAT3 Activity Inhibits IL-10 Production. *Immune Netw.* 2010;10(6):219–229.
 42. Driessler F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol.* 2004;135(1):64–73.
 43. Zhang K, et al. Mndal, a new interferon-inducible family member, is highly polymorphic, suppresses cell growth, and may modify plasmacytoma susceptibility. *Blood.* 2009;114(14):2952–2960.
 44. Dauffy J, Mouchiroud G, Bourette RP. The interferon-inducible gene, Ifi204, is transcriptionally activated in response to M-CSF, and its expression favors macrophage differentiation in myeloid progenitor cells. *J Leukoc Biol.* 2006;79(1):173–183.
 45. Bourette RP, Mouchiroud G. The biological role of interferon-inducible P204 protein in the development of the mononuclear phagocyte system. *Front Biosci.* 2008;13:879–886.
 46. Röszer T, et al. Autoimmune kidney disease and impaired engulfment of apoptotic cells in mice with macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma or retinoid X receptor alpha deficiency. *J Immunol.* 2011;186(1):621–631.

VII. Références bibliographiques (hors articles publiés)

- Abdallah K, Gendron L (2017) The Delta Opioid Receptor in Pain Control. In: Handbook of experimental pharmacology, pp 251–263
- Abdelhamid EE, Sultana M, Portoghesi PS, Takemori AE (1991) Selective blockage of delta opioid receptors prevents the development of morphine tolerance and dependence in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 258:299–303
- Aicher S a, Punnoose a, Goldberg a (2000) mu-Opioid receptors often colocalize with the substance P receptor (NK1) in the trigeminal dorsal horn. *J Neurosci* 20:4345–4354
- Allard M, Labrousse S, Nosjean A, Laguzzi R (1995) Mechanisms underlying the cardiovascular responses to peripheral administration of NPFF in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 274:577–583
- Allouche S, Noble F, Marie N (2014) Opioid receptor desensitization: Mechanisms and its link to tolerance. *Front Pharmacol* 5.
- Angst MS, Clark JD (2006) Opioid-induced Hyperalgesia. *Anesthesiology* 104:570–587
- Arai AC, Orwig N (2008) Factors that regulate KiSS1 gene expression in the hippocampus. *Brain Res* 1243:10–18
- Arout CA, Caldwell M, Rossi G, Kest B (2015) Spinal and supraspinal N-methyl-d-aspartate and melanocortin-1 receptors contribute to a qualitative sex difference in morphine-induced hyperalgesia. *Physiol Behav* 147:364–372
- Ayachi S, Simonin F (2014) Involvement of Mammalian RF-Amide Peptides and Their Receptors in the Modulation of Nociception in Rodents. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:158
- Baribault H, Danao J, Gupte J, Yang L, Sun B, Richards W, Tian H (2006) The G-protein-coupled receptor GPR103 regulates bone formation. *Mol Cell Biol* 26:709–717
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267–284
- Beaudry H, Gendron L, Morón JA (2015) Implication of delta opioid receptor subtype 2 but not delta opioid receptor subtype 1 in the development of morphine analgesic tolerance in a rat model of chronic inflammatory pain. *Eur J Neurosci* 41:901--7
- Besse D, Lombard MC, Zajac JM, Roques BP, Besson JM (1990) Pre-and postsynaptic distribution of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res* 521:15–22.
- Billa SK, Xia Y, Morón JA (2010) Disruption of morphine-conditioned place preference by a δ 2-opioid receptor antagonist: Study of μ -opioid and δ -opioid receptor expression at the synapse. *Eur J Neurosci* 32:625–631.
- Bilsky EJ, Giuvelis D, Osborn MD, Dersch CM, Xu H, Rothman RB (2010) In vitro and in vivo assessment of mu opioid receptor constitutive activity. *Methods Enzymol* 484:413–443
- Bodnar RJ (2017) Endogenous Opiates and Behavior: 2015. *Peptides* 88:126–188 Available at:
- Bonini JA et al. (2000) Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF. *J Biol Chem* 275:39324–39331
- Bruchas MR, Land BB, Chavkin C (2010) The dynorphin/kappa opioid system as a modulator of stress-induced and pro-addictive behaviors. *Brain Res* 1314:44–55

- Cahill CM, Morinville A, Hoffert C, O'Donnell D, Beaudet A (2003) Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. *Pain* 101:199–208
- Cahill CM, Morinville A, Lee MC, Vincent JP, Collier B, Beaudet A (2001) Prolonged morphine treatment targets delta opioid receptors to neuronal plasma membranes and enhances delta-mediated antinociception. *J Neurosci* 21:7598–7607.
- Cahill CM, Walwyn W, Taylor AMW, Pradhan AAA, Evans CJ (2016) Allostatic Mechanisms of Opioid Tolerance Beyond Desensitization and Downregulation. *Trends Pharmacol Sci* 37:963–976.
- Célèrier E, Laulin JP, Corcuff JB, Le Moal M, Simonnet G (2001) Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: a sensitization process. *J Neurosci* 21:4074–4080
- Célèrier E, Rivat C, Jun Y, Laulin JP, Larcher A, Reynier P, Simonnet G (2000) Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: preventive effect of ketamine. *Anesthesiology* 92:465–472
- Chang HM, Berde CB, Holz GG, Steward GF, Kream RM (1989) Sufentanil, morphine, met-enkephalin, and kappa-agonist (U-50,488H) inhibit substance P release from primary sensory neurons: a model for presynaptic spinal opioid actions. *Anesthesiology* 70:672–677 A
- Charles A, Pradhan AA (2016) Delta-opioid receptors as targets for migraine therapy. *Curr Opin Neurol* 29:314–319
- Chartrel N, Alonzeau J, Alexandre D, Jeandel L, Alvear-Perez R, Leprince J, Boutin J, Vaudry H, Anouar Y, Llorens-Cortes C (2011) The RFamide neuropeptide 26RFa and its role in the control of neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol* 32:387–397
- Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, Leprince J, Decker A, Clerens S, Do-Régo J-C, Vandesande F, Llorens-Cortes C, Costentin J, Beauvillain J-C, Vaudry H (2003) Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15247–15252
- Chieng B, Christie MJ (2009) Chronic morphine treatment induces functional delta-opioid receptors in amygdala neurons that project to periaqueductal grey. *Neuropharmacology* 57:430–437
- Chu LF, Angst MS, Clark D (2008) Opioid-induced Hyperalgesia in Humans Molecular Mechanisms and Clinical Considerations. *Clin J Pain* 24:479–496.
- Chu Sin Chung P, Kieffer BL (2013) Delta opioid receptors in brain function and diseases. *Pharmacol Ther* 140:112–120
- Chung S, Pohl S, Zeng J, Civelli O, Reinscheid RK (2006) Endogenous Orphanin FQ / Nociceptin Is Involved in the Development of Morphine Tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 318:262–267.
- Connor M, Traynor J (2010) Constitutively active μ -opioid receptors. *Methods Enzymol* 484:445–469
- Corder G, Doolen S, Donahue RR, Winter MK, Jutras BL, He Y, Hu X, Wieskopf JS, Mogil JS, Storm DR, Wang ZJ, McCarson KE, Taylor BK (2013) Constitutive μ -opioid receptor activity leads to long-term endogenous analgesia and dependence. *Science* (80-) 314:1394–1399
- Cox B, Ary M, Chesarek W, Lomax P (1976) Morphine hyperthermia in the rat: an action on the central thermostats. *Eur J Pharmacol* 36:33–39
- Craft RM, Mogil JS, Aloisi AM (2004) Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal

- hormones. *Eur J Pain* 8:397–411
- D’Mello R, Dickenson a H (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* 101:8–16
- Dang VC (2004) Chronic Morphine Treatment Reduces Recovery from Opioid Desensitization. *J Neurosci* 24:7699–7706
- Dang VC, Chieng B, Azriel Y, Christie MJ (2011) Cellular Morphine Tolerance Produced by Arrestin-2-Dependent Impairment of μ -Opioid Receptor Resensitization. *J Neurosci* 31:7122–7130
- Dang VC, Williams JT (2005) Morphine-Induced Mu-Opioid Receptor Desensitization. *Mol Pharmacol* 68:1127–1132.
- Devillers JP, Labrousse SA, Castes E, Simonnet G (1995) Release of neuropeptide FF, an anti-opioid peptide, in rat spinal cord slices is voltage- and Ca^{2+} -sensitive: possible involvement of P-type Ca^{2+} channels. *J Neurochem* 64:1567–1575
- Devlin MG, Smith NJ, Ryan OM, Guida E, Sexton PM, Christopoulos A (2004) Regulation of serotonin 5-HT 2C receptors by chronic ligand exposure. *Eur J Pharmacol* 498:59–69.
- Devor M (2009) Ectopic discharge in Abeta afferents as a source of neuropathic pain. *Exp brain Res* 196:115–128
- Divin MF, Bradbury FA, Carroll FI, Traynor JR (2009) Neutral antagonist activity of naltrexone and 6 β -naltrexol in naïve and opioid-dependent C6 cells expressing a μ -opioid receptor. *Br J Pharmacol* 156:1044–1053.
- Djoughri L, Lawson SN (2004) A β -fiber nociceptive primary afferent neurons: A review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Rev* 46:131–145.
- do Rego J-C, Leprince J, Chartrel N, Vaudry H, Costentin J (2006) Behavioral effects of 26RFamide and related peptides. *Peptides* 27:2715–2721
- Dubin AE, Patapoutian A (2010) Nociceptors: The sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 120:3760–3772.
- Duggan AW, North RA (1983) Electrophysiology of opioids. *Pharmacol Rev* 35:219–281
- El Bitar N, Pollin B, Karroum EG, Pinedé I, Le Bars D (2016) Entanglement between Thermoregulation and Nociception in the rat: The case of Morphine. *J Neurophysiol*:jn.00482.2016.
- Elhabazi K, Ayachi S, Ilien B, Simonin F (2014) Assessment of Morphine-induced Hyperalgesia and Analgesic Tolerance in Mice Using Thermal and Mechanical Nociceptive Modalities. *J Vis Exp*
- Elhabazi K, Humbert J-P, Bertin I, Schmitt M, Bihel F, Bourguignon J-J, Bucher B, Becker JAJ, Sorg T, Meziane H, Petit-Demoulière B, Ilien B, Simonin F (2013) Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPFF receptors. *Neuropharmacology* 75:164–171
- Elhabazi K, Trigo JM, Mollereau C, Moulédous L, Zajac J-M, Bihel F, Schmitt M, Bourguignon JJ, Meziane H, Petit-demoulière B, Bockel F, Maldonado R, Simonin F (2012) Involvement of neuropeptide FF receptors in neuroadaptive responses to acute and chronic opiate treatments. *Br J Pharmacol* 165:424–435
- Emery EC, Luiz AP, Sikandar S, Magnusdottir R, Dong X, Wood JN (2016) In vivo characterization of

- distinct modality-specific subsets of somatosensory neurons using GCaMP. *Sci Adv* 2:e1600990–e1600990
- Erbs E, Faget L, Scherrer G, Matifas A, Filliol D, Vonesch J-L, Koch M, Kessler P, Hentsch D, Birling M-C, Koutsourakis M, Vasseur L, Veinante P, Kieffer BL, Massotte D (2014) A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Struct Funct* 220:677–702
- Fang Q, Jiang T, Li N, Han Z, Wang R (2011) Central administration of neuropeptide FF and related peptides attenuate systemic morphine analgesia in mice. *Protein Pept Lett* 18:403–409.
- Fang Q, Liu Q, Li N, Jiang T, Li N, Li Y, Yan X, Wang R (2009) Cardiovascular effects of intravenous administered 26RFFa, a novel RFamide peptide ligand for GPR103, in anaesthetised rats. *Eur J Pharmacol* 621:61–66
- Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S (2006) Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides* 27:1073–1086
- Fukusumi S, Yoshida H, Fujii R, Maruyama M, Komatsu H, Habata Y, Shintani Y, Hinuma S, Fujino M (2003) A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *J Biol Chem* 278:46387–46395
- Fundytus ME, Schiller PW, Shapiro M, Weltrowska G, Coderre TJ (1995) Attenuation of morphine tolerance and dependence with the highly selective delta-opioid receptor antagonist TIPP[psi]. *Eur J Pharmacol* 286:105–108
- Gaveriaux-Ruff C, Nozaki C, Nadal X, Hever XC, Weibel R, Matifas A, Reiss D, Filliol D, Nassar MA, Wood JN, Maldonado R, Kieffer BL (2011) Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia. *Pain* 152:1238–1248
- Gendron L, Cahill CM, Zastrow M, Von, Schiller PW, Pineyro G (2016) Molecular Pharmacology of δ -Opioid Receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 324876:631–700.
- Gendron L, Lucido AL, Mennicken F, O'Donnell D, Vincent J-P, Stroh T, Beaudet A (2006) Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic delta-opioid receptors in rat dorsal root ganglia. *J Neurosci* 26:953–962
- Gendron L, Mittal N, Beaudry H, Walwyn W (2015) Recent advances on the δ opioid receptor: From trafficking to function. *Br J Pharmacol* 172:403–419.
- Glaum SR, Miller RJ, Hammond DL (1994) Inhibitory actions of delta 1-, delta 2-, and mu-opioid receptor agonists on excitatory transmission in lamina II neurons of adult rat spinal cord. *J Neurosci* 14:4965–4971
- Gouardères C, Faura CC, Zajac J-M (2004) Rodent strain differences in the NPFF1 and NPFF2 receptor distribution and density in the central nervous system. *Brain Res* 1014:61–70
- Gouardères C, Jhamandas K, Sutak M, Zajac JM (1996) Role of opioid receptors in the spinal antinociceptive effects of neuropeptide FF analogues. *Br J Pharmacol* 117:493–501
- Heinke B, Gingl E, Sandkuhler J (2011) Multiple targets of mu-opioid receptor-mediated presynaptic inhibition at primary afferent A δ - and C-fibers. *J Neurosci* 31:1313–1322
- Hepburn MJ, Little PJ, Gingras J, Kuhn CM (1997) Differential effects of naltrindole on morphine-

- induced tolerance and physical dependence in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 281:1350–1356.
- Hori Y, Endo K, Takahashi T (1992) Presynaptic inhibitory action of enkephalin on excitatory transmission in superficial dorsal horn of rat spinal cord. *J Physiol* 450:673–685
- Ingram SL, Macey TA, Fossum EN, Morgan MM (2008) Tolerance to Repeated Morphine Administration Is Associated with Increased Potency of Opioid Agonists. *Neuropsychopharmacology* 33:2494–2504
- Jeftinija S (1988) Enkephalins modulate excitatory synaptic transmission in the superficial dorsal horn by acting at m-opioid receptor sites. *Brain Res* 460:260–268.
- Jessell TM, Iversen LL (1977) Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus. *Nature* 269:549–551
- Jhamandas KH, Sutak M, Henderson G (1998) Antinociceptive and morphine modulatory actions of spinal orphanin FQ. *Can J Physiol Pharmacol* 76:314–324
- Jiang Y, Luo L, Gustafson EL, Yadav D, Laverty M, Murgolo N, Vassileva G, Zeng M, Laz TM, Behan J, Qiu P, Wang L, Wang S, Bayne M, Greene J, Monsma F, Zhang FL (2003) Identification and characterization of a novel RF-amide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155. *J Biol Chem* 278:27652–27657
- Kenakin T (2004) Principles: Receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 25:186–192.
- Kest B, Lee CE, McLemore GL, Inturrisi CE (1996) An antisense oligodeoxynucleotide to the delta opioid receptor (DOR-1) inhibits morphine tolerance and acute dependence in mice. *Brain Res Bull* 39:185–188.
- Kieffer BL, Evans CJ (2009) Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1:205–212
- Kirby HR, Maguire JJ, Colledge WH, Davenport AP (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVII. Kisspeptin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev* 62:565–578
- Kissin I (2010) The development of new analgesics over the past 50 years: a lack of real breakthrough drugs. *Anesth Analg* 110:780–789
- Klein T, Magerl W, Nickel U, Hopf HC, Sandkühler J, Treede RD (2007) Effects of the NMDA-receptor antagonist ketamine on perceptual correlates of long-term potentiation within the nociceptive system. *Neuropharmacology* 52:655–661.
- Kohno T, Kumamoto E, Higashi H, Shimoji K, Yoshimura M (1999) Actions of opioids on excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord. *J Physiol* 518 (Pt 3):803–813
- Larcher A, Laulin JP, Celerier E, Le Moal M, Simonnet G (1998) Acute tolerance associated with a single opiate administration: Involvement of N-methyl-D-aspartate-dependent pain facilitatory systems. *Neuroscience* 84:583–589.
- Laurent P, Becker J a J, Valverde O, Ledent C, De Kerchove d’Exaerde A, Schiffmann SN, Maldonado R, Vassart G, Parmentier M (2005) The prolactin-releasing peptide antagonizes the opioid system through its receptor GPR10. *Nat Neurosci* 8:1735–1741
- Lee JH, Welch DR (1997) Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed

- chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int J cancer* 71:1035–1044
- Li X, Angst MS, Clark JD (2001) A murine model of opioid-induced hyperalgesia. *Brain Res Mol Brain Res* 86:56–62
- Lin SH (2008) Prolactin-releasing peptide. *Results Probl Cell Differ* 46:57–88
- Liu J-G, Prather PL (2002) Chronic agonist treatment converts antagonists into inverse agonists at delta-opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 302:1070–1079
- Liu JG, Prather PL (2001) Chronic exposure to mu-opioid agonists produces constitutive activation of mu-opioid receptors in direct proportion to the efficacy of the agonist used for pretreatment. *Mol Pharmacol* 60:53–62
- Liu Q, Guan XM, Martin WJ, McDonald TP, Clements MK, Jiang Q, Zeng Z, Jacobson M, Williams DL, Yu H, Bomford D, Figueroa D, Mallee J, Wang R, Evans J, Gould R, Austin CP (2001) Identification and characterization of novel mammalian neuropeptide FF-like peptides that attenuate morphine-induced antinociception. *J Biol Chem* 276:36961–36969
- Makri A, Pissimissis N, Lembessis P, Polychronakos C, Koutsilieris M (2008) The kisspeptin (KiSS-1)/GPR54 system in cancer biology. *Cancer Treat Rev* 34:682–692
- Mansour A, Fox C a, Burke S, Akil H, Watson SJ (1995) Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *J Chem Neuroanat* 8:283–305
- Marker CL, Lujan R, Loh HH, Wickman K (2005) Spinal G-Protein-Gated Potassium Channels Contribute in a Dose-Dependent Manner to the Analgesic Effect of {micro}- and {delta}- But Not {kappa}-Opioids. *J Neurosci* 25:3551–3559
- 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.
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dollé P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383:819–823
- McNally GP (1999) Pain facilitatory circuits in the mammalian central nervous system: their behavioral significance and role in morphine analgesic tolerance. *Neurosci Biobehav Rev* 23:1059–1078
- Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP (2007) Kisspeptins are novel potent vasoconstrictors in humans, with a discrete localization of their receptor, G protein-coupled receptor 54, to atherosclerosis-prone vessels. *Endocrinology* 148:140–147.
- Melzack R, Casey KL (1968) Sensory, motivational, and central control determinants of pain.
- Mertens P, Blond S, David R, Rigoard P (2014) Anatomy, physiology and neurobiology of the nociception: A focus on low back pain (part A). *Neurochirurgie* 61:1–13
- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B (1995) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377:532–535.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355–474.

- Mogil JS, Bailey AL (2010) Sex and gender differences in pain and analgesia. In: Progress in brain research, pp 140–157
- Mogil JS, Pasternak GW (2001) The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family. *Pharmacol Rev* 53:381–415.
- Mollereau C, Mouledous L (2000) Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides* 21:907–917.
- Mollereau C, Roumy M, Zajac J-M (2005) Opioid-modulating peptides: mechanisms of action. *Curr Top Med Chem* 5:341–355
- Mollereau C, Simons MJ, Soularue P, Liners F, Vassart G, Meunier JC, Parmentier M (1996) Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sci* 93:8666–8670
- Morinville A, Cahill CM, Aibak H, Rymar V V, Pradhan A, Hoffert C, Mennicken F, Stroh T, Sadikot AF, O'Donnell D, Clarke PBS, Collier B, Henry JL, Vincent J-P, Beaudet A (2004a) Morphine-Induced Changes in Opioid Receptor Trafficking Are Linked to Somatosensory Processing in the Rat Spinal Cord. *J Neurosci* 24:5549–5559
- Morinville A, Cahill CM, Esdaile MJ, Aibak H, Collier B, Kieffer BL, Beaudet A (2003) Regulation of delta-opioid receptor trafficking via mu-opioid receptor stimulation: evidence from mu-opioid receptor knock-out mice. *J Neurosci* 23:4888–4898
- Morinville A, Cahill CM, Kieffer B, Collier B, Beaudet A (2004b) Mu-opioid receptor knockout prevents changes in delta-opioid receptor trafficking induced by chronic inflammatory pain. *Pain* 109:266–273
- Moriya R, Sano H, Umeda T, Ito M, Takahashi Y, Matsuda M, Ishihara A, Kanatani A, Iwaasa H (2006) RFamide peptide QRFP43 causes obesity with hyperphagia and reduced thermogenesis in mice. *Endocrinology* 147:2916–2922.
- Moulédous L, Mollereau C, Zajac J-M (2010) Opioid-modulating properties of the neuropeptide FF system. *Biofactors* 36:423–429
- Navani DM, Sirohi S, Madia PA, Yoburn BC (2011a) The role of opioid antagonist efficacy and constitutive opioid receptor activity in the opioid withdrawal syndrome in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 99:671–675.
- Navani DM, Sirohi S, Madia PA, Yoburn BC (2011b) The role of opioid antagonist efficacy and constitutive opioid receptor activity in the opioid withdrawal syndrome in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 99:671–675
- Neal CR, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker H-P, Civelli O, Akil H, Watson SJ (1999) Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system: Comparison of ORL1 receptor mRNA expression with 125I-[14Tyr]-orphanin FQ binding. *J Comp Neurol* 412:563–605
- Oberling P, Stinus L, Le Moal M, Simonnet G (1993) Biphasic effect on nociception and antinociceptive activity of the neuropeptide FF (FLFQPQRFamide) in the rat. *Peptides* 14:919–924.
- Ohnesorge H, Feng Z, Zitta K, Steinfath M, Albrecht M, Bein B (2013) Influence of clonidine and ketamine on m-RNA expression in a model of opioid-induced hyperalgesia in mice. *PLoS One* 8:e79567

- Ohtaki T et al. (2001) Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411:613–617
- Ossipov MH, Lai J, Vanderah TW, Porreca F (2003) Induction of pain facilitation by sustained opioid exposure: relationship to opioid antinociceptive tolerance. *Life Sci* 73:783–800
- Pan H-L, Wu Z-Z, Zhou H-Y, Chen S-R, Zhang H-M, Li D-P (2008) Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 117:141–161
- Papaleo F, Contarino A (2006) Gender- and morphine dose-linked expression of spontaneous somatic opiate withdrawal in mice. *Behav Brain Res* 170:110–118
- Pert, C. B., & Snyder, S. H. (1973). Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science (New York, N.Y.)*, 179(4077), 1011–4.
- Pradhan AA, Smith ML, Kieffer BL, Evans CJ (2012) Ligand-directed signalling within the opioid receptor family. *Br J Pharmacol* 167:960–969.
- Pradhan A, Smith M, McGuire B, Evans C, Walwyn W (2013) Chronic inflammatory injury results in increased coupling of delta opioid receptors to voltage-gated Ca²⁺ channels. *Mol Pain* 9:8
- Quillinan N, Lau EK, Virk M, von Zastrow M, Williams JT (2011a) Recovery from μ -Opioid Receptor Desensitization after Chronic Treatment with Morphine and Methadone. *J Neurosci* 31:4434–4443
- Quillinan N, Lau EK, Virk M, von Zastrow M, Williams JT (2011b) Recovery from μ -Opioid Receptor Desensitization after Chronic Treatment with Morphine and Methadone. *J Neurosci* 31:4434–4443.
- Raehal KM (2005) In Vivo Characterization of μ -Naltrexol, an Opioid Ligand with Less Inverse Agonist Activity Compared with Naltrexone and Naloxone in Opioid-Dependent Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 313:1150–1162
- Reinscheid RK, Nothacker H, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Jr FJM, Civelli O (1995) Orphanin FQ : A Opioid-like G Protein-Co. *Science* (80-) 270:792–794.
- Reuben DB, Alvanzo AAH, Ashikaga T, Bogat GA, Callahan CM, Ruffing V, Steffens DC (2015) National Institutes of Health Pathways to Prevention Workshop: The role of opioids in the treatment of chronic pain. *Ann Intern Med* 162:295–300.
- Roeckel L-A, Le Coz G-M, Gavériaux-Ruff C, Simonin F (2016) Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. *Neuroscience* 338:160–182.
- Rosen S, Ham B, Mogil JS (2017) Sex differences in neuroimmunity and pain. *J Neurosci Res* 95:500–508.
- Roth BL, Disimone J, Majane EA, Yang HYT (1987) Elevation of arterial pressure in rats by two new vertebrate peptides FLF QPQRF-NH₂ and AGE GLSPFWSLAAPQRF-NH₂ which are immunoreactive to FMRF-NH₂ antiserum. *Neuropeptides* 10:37–42.
- Rothman RB (1992) A review of the role of anti-opioid peptides in morphine tolerance and dependence. *Synapse* 12:129–138
- Roumy M, Zajac JM (1998) Neuropeptide FF, pain and analgesia. *Eur J Pharmacol* 345:1–11.
- Rousseau K, Dufour S, Vaudry H (2015) Editorial: A Comparative Survey of the RF-Amide Peptide

Superfamily. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6:120

- Sadée W, Wang D, Bilsky EJ (2005) Basal opioid receptor activity, neutral antagonists, and therapeutic opportunities. *Life Sci* 76:1427–1437.
- Samson WK, Resch ZT, Murphy TC (2000) A novel action of the newly described prolactin-releasing peptides: Cardiovascular regulation. *Brain Res* 858:19–25.
- Sanchez-Blazquez P, Garcia-Espana A, Garzon J (1997) Antisense oligodeoxynucleotides to opioid mu and delta receptors reduced morphine dependence in mice: role of delta-2 opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 280:1423–1431.
- Scherrer GG, Imamachi N, Cao Y, Contet C, Kieffer BL, Basbaum AI, Mennicken F, O'Donnell D (2009) Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* 137:1148–1159
- Schneider SP, Eckert III WA, Light AR (1998) Opioid-activated postsynaptic, inward rectifying potassium currents in whole cell recordings in substantia gelatinosa neurons. *J Neurophysiol* 80:2954–2962.
- Shirasaki F, Takata M, Hatta N (2001) Loss of Expression of the Metastasis Suppressor Gene KiSS1 during Melanoma Progression and Its Association with LOH of Advances in Brief Loss of Expression of the Metastasis Suppressor Gene KiSS1 during Melanoma. :7422–7425.
- Shiowski DJ, Tipton A, Giraldo MD, Schmidt BF, Gold MS, Pradhan AA, Puthenveedu MA (2017) A PTEN-Regulated Checkpoint Controls Surface Delivery of delta Opioid Receptors. *J Neurosci* 37:3741–3752.
- Simon, E. J. (1973). In search of the opiate receptor. *The American Journal of the Medical Sciences*, 266(3), 160–8.
- Simonnet G, Rivat C (2003) Opioid-induced hyperalgesia: abnormal or normal pain? *Neuroreport* 14:1–7
- Sirohi S, Dighe S V, Madia P a, Yoburn BC (2009a) The relative potency of inverse opioid agonists and a neutral opioid antagonist in precipitated withdrawal and antagonism of analgesia and toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 330:513–519.
- Sirohi S, Dighe S V, Madia P a, Yoburn BC (2009b) The relative potency of inverse opioid agonists and a neutral opioid antagonist in precipitated withdrawal and antagonism of analgesia and toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 330:513–519
- Spike RC, Puskár Z, Sakamoto H, Stewart W, Watt C, Todd AJ (2002) MOR-1-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord: Evidence for nonsynaptic innervation by substance P-containing primary afferents and for selective activation by noxious thermal stimuli. *Eur J Neurosci* 15:1306–1316.
- Suarez-Roca H, Maixner W (1992) Morphine produces a multiphasic effect on the release of substance P from rat trigeminal nucleus slices by activating different opioid receptor subtypes. *Brain Res* 579:195–203.
- Suzuki T, Ikeda H, Tsuji M, Misawa M, Narita M, Tseng LF (1997) Antisense oligodeoxynucleotide to delta opioid receptors attenuates morphine dependence in mice. *Life Sci* 61:PL 165-70
- Tang J, Yang HY, Costa E (1984) Inhibition of spontaneous and opiate-modified nociception by an endogenous neuropeptide with Phe-Met-Arg-Phe-NH₂-like immunoreactivity. *Proc Natl Acad*

- Taylor BK, Corder G (2014) Endogenous Analgesia, Dependence, and Latent Pain Sensitization. In: Current topics in behavioral neurosciences, pp 283–325
- Terenius, L. (1973). Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 32(3), 317–20.
- Terman GW, Eastman CL, Chavkin C (2001) Mu opiates inhibit long-term potentiation induction in the spinal cord slice. *J Neurophysiol* 85:485–494.
- Tian J, Han J (2000) Functional studies using antibodies against orphanin FQ / nociceptin. 21:1047–1050.
- Toll L, Bruchas MR, Cox BM, Zaveri NT, Services U, Therapeutics A, View M (2016) Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Structure , Signaling , Ligands , Functions , and Interactions with Opioid Systems. *Pharmacol Rev* 68:419–457.
- Tracey I, Dickenson A (2012) SnapShot: Pain Perception. *Cell* 148:1308–1308.e2
- Trang T, Al-Hasani R, Salvemini D, Salter MW, Gutstein H, Cahill CM (2015) Pain and Poppies: The Good, the Bad, and the Ugly of Opioid Analgesics. *J Neurosci* 35:13879–13888
- Tsutsui K, Bentley GE, Bedecarrats G, Osugi T, Ubuka T, Kriegsfeld LJ (2010) Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 31:284–295
- Ueda H, Yamaguchi T, Tokuyama S, Inoue M, Nishi M, Takeshima H (1997) Partial loss of tolerance liability to morphine analgesia in mice lacking the nociceptin receptor gene. *Neurosci Lett* 237:136–138
- Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL (2004) Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* 73:953–990
- Walker EA, Sterious SN (2005a) Opioid antagonists differ according to negative intrinsic efficacy in a mouse model of acute dependence. *Br J Pharmacol* 145:975–983.
- Walker EA, Sterious SN (2005b) Opioid antagonists differ according to negative intrinsic efficacy in a mouse model of acute dependence. *Br J Pharmacol* 145:975–983
- Wang D, Raehal KM, Bilsky EJ, Sadée W (2001) Inverse agonists and neutral antagonists at μ opioid receptor (MOR): Possible role of basal receptor signaling in narcotic dependence. *J Neurochem* 77:1590–1600.
- Wang D, Sun X, Sadee W (2007) Different Effects of Opioid Antagonists on μ -, δ -, and κ -Opioid Receptors with and without Agonist Pretreatment. *J Pharmacol Exp Ther* 321:544–552
- Wiesenfeld-Hallin Z, Xu X-J, Hökfelt T (2002) The role of spinal cholecystokinin in chronic pain states. *Pharmacol Toxicol* 91:398–403
- Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ (1996) The role of cholecystokinin in nociception, neuropathic pain and opiate tolerance. *Regul Pept* 65:23–28.
- Willcockson WS, Chung JM, Hori Y, Lee KH, Willis WD (1984) Effects of iontophoretically released peptides on primate spinothalamic tract cells. *J Neurosci* 4:741–750
- Williams JT, Ingram SL, Henderson G, Chavkin C, von Zastrow M, Schulz S, Koch T, Evans CJ, Christie MJ (2013) Regulation of μ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization,

- and tolerance. *Pharmacol Rev* 65:223–254
- Woolf CJ (2010) Overcoming obstacles to developing new analgesics. *Nat Med* 16:1241–1247
- Xu XJ, Hao JX, Wiesenfeld-Hallin Z (1996) Nociceptin or antinociceptin: potent spinal antinociceptive effect of orphanin FQ/nociceptin in the rat. *Neuroreport* 7:2092–2094
- Yaksh TL, Al-Rodhan NR, Jensen TS (1988) Sites of action of opiates in production of analgesia. *Prog Brain Res* 77:371–394
- Yang H-YT, Iadarola MJ (2006) Modulatory roles of the NPFF system in pain mechanisms at the spinal level. *Peptides* 27:943–952
- Yang HY, Fratta W, Majane EA, Costa E (1985) Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:7757–7761.
- Zhang SQ, Inoué S, Kimura M (2001) Sleep-promoting activity of prolactin-releasing peptide (PrRP) in the rat. *Neuroreport* 12:3173–3176
- Zhang SQ, Kimura M, Inoué S (2000) Effects of prolactin-releasing peptide (PrRP) on sleep regulation in rats. *Psychiatry Clin Neurosci* 54:262–264.
- Zhao YL, Chen SR, Chen H, Pan HL (2012) Chronic opioid potentiates presynaptic but impairs postsynaptic N-methyl-D-aspartic acid receptor activity in spinal cords: Implications for opioid hyperalgesia and tolerance. *J Biol Chem* 287:25073–25085.
- Zhou H-Y, Chen S-R, Chen H, Pan H-L (2010) Opioid-induced long-term potentiation in the spinal cord is a presynaptic event. *J Neurosci* 30:4460–4466
- Zhu LL, Onaka T (2003) Facilitative role of prolactin-releasing peptide neurons in oxytocin cell activation after conditioned-fear stimuli. *Neuroscience* 118:1045–1053.
- Zhu Y, King MA, Schuller AGP, Nitsche JF, Reidl M, Elde RP, Unterwald E, Pasternak GW, Pintar JE (1999) Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in δ opioid receptor knockout mice. *Neuron* 24:243–252.

Implication des récepteurs à peptides RF-amide dans la modulation de la douleur et de l'hyperalgésie induite par les opiacés

Résumé

La douleur est un problème de santé publique majeur qui réduit la qualité de vie des patients et engendre un coût élevé pour la société. Malgré les efforts fournis pour développer de nouveaux analgésiques, les opiacés restent le moyen le plus efficace pour réduire la douleur moyenne à intense. Cependant, leur utilisation prolongée est responsable du développement d'une tolérance à leurs effets analgésiques et d'une hypersensibilité à la douleur (hyperalgésie). Il a été proposé que ces phénomènes pourraient résulter de l'activation d'un système anti-opioïde tel que celui des récepteurs RF-amide, mais leurs mécanismes d'action sont encore mal compris. L'objectif de ce projet a ainsi été d'étudier l'implication des récepteurs RF-amide NPFFR1, NPFFR2 et GPR103a dans le développement de l'hyperalgésie induite par les opiacés. Allant du niveau cellulaire, en s'intéressant à l'expression des ARNm, à la modulation de l'activité neuronale induite par le 26RFa, jusqu'à un niveau plus intégré via une approche *in vivo* et l'étude des seuils nociceptifs et de la douleur chez la souris ; ce travail a permis d'avoir une vision globale des effets du système RF-amide et principalement de GPR103a. En abordant la question des effets secondaires associés aux traitements chroniques opiacés, ce projet pourrait conduire à l'élaboration de stratégies de traitement de la douleur prometteuses.

Mots-clés: douleur, nociception, hyperalgésie induite par les opiacés, récepteurs RF-amide, GPR103, 26RFa

Résumé en anglais

Pain is a major health problem that reduces quality of life and imparts high social and economic costs. Despite efforts to develop new analgesics, opiates remain the most effective way to reduce severe pain. However, their prolonged use is associated with the development of analgesic tolerance and hypersensitivity to pain (hyperalgesia). It has been proposed that these phenomena would result from the activation of anti-opioid system like RF-amide receptors system, but their mechanism of action is still poorly understood. The objective of this project was to study the involvement of NPFFR1, NPFFR2 and GPR103a receptors in the development of opioid-induced hyperalgesia. This work gave an overall view of the effects of the RF-amide system and mainly of GPR103a, ranging from the cellular level, to the expression of mRNAs, to the modulation of the 26RFa-induced neuronal activity, up to an integrated level via an *in vivo* approach and the study of nociceptive thresholds and pain in mice. By addressing the issue of side effects associated with opioid chronic treatments, this project may lead to the development of promising strategies for pain treatment.

Keywords: pain, nociception, opioid-induced hyperalgesia, RF-amide receptor, GPR103, 26RFa