



Université de Sherbrooke

**Distribution de l'ARNm des récepteurs opioïdes delta et mu dans les afférences primaires**

Par  
Claudie Beaulieu  
Programme de Physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc)  
en Physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
[Juillet, 2023]

Membres du jury d'évaluation

Louis Gendron PhD  
Philippe Sarret PhD  
Jean-Philippe Brosseau PhD

Programme de Physiologie; Directeur de recherche  
Programme de Physiologie; Évaluateur interne  
Département de biochimie et génomique fonctionnelle

© Claudie Beaulieu, 2023

## RÉSUMÉ

### Distribution de l'ARNm des récepteurs opioïdes delta et mu dans les afférences primaires

Par  
Claudie Beaulieu  
Programme de physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les opioïdes, comme la morphine, sont des analgésiques fréquemment utilisés pour traiter les douleurs modérées à sévères. Ceux utilisés en clinique agissent en activant le récepteur opioïde mu (MOP) ce qui entraîne de l'analgésie, mais aussi plusieurs effets indésirables comme de la dépression respiratoire, de la constipation, de la tolérance et de la dépendance. Il existe deux autres récepteurs opioïdes : le delta (DOP) et le kappa (KOP). Le laboratoire s'intéresse au potentiel rôle du DOP dans la nociception, puisque son activation procure de l'analgésie dans plusieurs modèles de douleur. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la distribution du DOP et du MOP dans les afférences primaires soit les ganglions de la racine dorsale (DRG) et les ganglions trijumeaux (TG) de rats, souris, singes et humains. Ces neurones sont la première étape dans la transmission de stimuli potentiellement douloureux, en transmettant ces signaux de la périphérie à la corne dorsale de la moelle épinière. Pour ce faire, le DOP et le MOP seront identifiés à l'aide de leur ARNm grâce à l'hybridation *in situ* couplée à la technologie RNAscope. L'identité des neurones sur lesquels sont exprimés les récepteurs sera déterminée à l'aide d'anticorps (NF200, IB4) et de sondes de RNAscope (P2RX3, TAC1) qui ciblent les neurones myélinisés ( $A\alpha$ ,  $A\beta$  et  $A\delta$ ), les neurones C non peptidergiques et peptidergiques. Nous avons découvert que dans toutes les espèces, le DOP et le MOP sont présents dans tous les types de neurones. L'ARNm du DOP est principalement exprimé dans les neurones myélinisés chez le rat (DRG et TG) et les TG de souris, alors qu'il est plus au niveau des fibres C non peptidergiques chez le singe et les DRG de souris. L'ARNm du MOP était plutôt trouvé dans les fibres C peptidergiques chez le singe et le rat, alors que chez la souris, il était dans les fibres C non peptidergiques (DRG et TG) et myélinisées (TG et TG de rat). Pour toutes les espèces et types d'afférences primaires, la coexpression entre le DOP et le MOP était principalement retrouvée dans les fibres myélinisées. De ce fait, nous concluons que même si des différences sont présentes entre les espèces, le DOP et le MOP sont impliqués dans la régulation de la nociception.

Mots clés : Douleur, afférence primaire, opioïdes, distribution

# TABLE DES MATIÈRES

<b>Résumé</b> .....	<b>ii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>iii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>x</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>xi</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 La douleur</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Classification de la douleur.....	1
1.1.2 Impact de la douleur.....	2
1.1.3 La migraine.....	2
1.1.4 La nociception.....	3
1.1.4.1 Les voies ascendantes de la douleur.....	3
1.1.4.2 La voie trigéminal.....	5
1.1.4.3 Les voies descendantes de la douleur.....	5
<b>1.2 Les afférences primaires</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 Les fibres A $\alpha$ .....	7
1.2.1.1 Les fibres Ia.....	8
1.2.1.2 Les fibres Ib.....	8
1.2.2 Les fibres A $\beta$ .....	8
1.2.2.1 Les fibres A $\beta$ SA1-LTMRs.....	9
1.2.2.2 Les fibres A $\beta$ SA2-LTMRs.....	10
1.2.2.3 Les fibres A $\beta$ RA1-LTMRs.....	10
1.2.2.4 Les fibres A $\beta$ RA2-LTMRs.....	11
1.2.2.5 Les fibres A $\beta$ HTMRs.....	11
1.2.3 Les fibres A $\delta$ .....	11
1.2.3.1 Les fibres A $\delta$ LTMRs.....	12
1.2.3.2 Les fibres A $\delta$ type 1.....	12
1.2.3.3 Les fibres A $\delta$ type 2.....	13
1.2.4 Les fibres C.....	13
1.2.4.1 Les fibres C LTMRs.....	14
1.2.4.2 Les fibres C peptidergiques.....	14
1.2.4.3 Les fibres C non peptidergiques.....	15

1.2.5 Les nocicepteurs silencieux.....	15
<b>1.3 Types de classification des afférences primaires .....</b>	<b>15</b>
1.3.1 Grosseur du corps cellulaire .....	15
1.3.2 Vitesse de conduction.....	16
1.3.3 Niveau de myélinisation.....	17
1.3.4 Marqueurs .....	18
1.3.5 Expression en ARNm .....	19
1.3.5.1 L'expression génique .....	19
1.3.5.2 Utilisation de l'expression en ARNm pour la classification des afférences primaires.....	21
<b>1.4 Traitement de la douleur .....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Les récepteurs opioïdes.....</b>	<b>22</b>
1.5.1 Le récepteur opioïde mu.....	23
1.5.2 Le récepteur opioïde kappa.....	23
1.5.3 Le récepteur opioïde delta .....	24
1.5.4 Interaction entre le DOP et le MOP.....	25
<b>1.6 Distribution du récepteur opioïde delta.....</b>	<b>26</b>
1.6.1 Distribution dans le cerveau.....	26
1.6.2 Distribution dans la moelle épinière .....	26
1.6.3 Distribution dans les afférences primaires.....	28
1.6.3.1 Les ganglions de la racine dorsale.....	28
1.6.3.2 Les ganglions trijumeaux.....	32
<b>1.7 But, hypothèses et objectifs de recherche .....</b>	<b>32</b>
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Animaux .....</b>	<b>34</b>
2.1.1 Singes .....	34
2.1.2 Humains.....	34
2.1.3 Rats.....	34
2.1.4 Souris .....	35
<b>2.2 Collecte de tissus.....</b>	<b>35</b>
2.2.1 Singes .....	35
2.2.2 Humains.....	35
2.2.3 Rongeurs .....	36
<b>2.3 Hybridation <i>in situ</i> : RNAscope™ .....</b>	<b>36</b>
2.3.1 Introduction sur la technique RNAscope .....	37

2.3.2 Tissus de singes .....	38
2.3.3 Tissus humains .....	39
2.3.4 Tissus de rats .....	40
2.3.5 Tissus de souris .....	40
<b>2.4 Immunofluorescence.....</b>	<b>41</b>
<b>2.5 Quantification.....</b>	<b>42</b>
2.5.1 Singes et rongeurs .....	42
2.5.2 Humains.....	42
<b>2.5 Analyses statistiques .....</b>	<b>43</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Ganglions de la racine dorsale.....</b>	<b>44</b>
3.1.1 DRG de singes .....	44
3.1.1.1 Présence d'autofluorescence dans les DRG de singes.....	44
3.1.1.2 Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les DRG de singes.....	45
3.1.1.3 Coexpression entre les différents marqueurs neuronaux utilisés chez le singe.....	49
3.1.2 DRG humains.....	50
3.1.2.1 Présence d'autofluorescence dans les DRG humains.....	50
3.1.2.2 Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les DRG humains.....	51
3.1.3 Comparaison interspèce de la distribution du DOP et du MOP dans les DRG.....	53
<b>3.2 Ganglions trijumeaux.....</b>	<b>57</b>
3.2.1 TG de rats.....	57
3.2.1.1 Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les TG de rats.....	57
3.2.1.2 Différences dans la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP entre les types d'afférences primaires chez le rat.....	60
3.2.2 TG de souris.....	60
3.2.2.1 Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les TG de souris .....	60
3.2.2.2 Différences dans la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP entre les types d'afférences primaires chez la souris .....	64
3.2.2.3 Différences dans la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP entre les différents marqueurs des fibres C non peptidergiques .....	65
3.2.3 Comparaison de la distribution du DOP et du MOP dans les TG interspèce .....	69
<b>Discussion.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1 Distribution du DOP et du MOP dans les DRG de primates.....</b>	<b>72</b>
<b>4.2 Coexpression entre les marqueurs neuronaux.....</b>	<b>76</b>
<b>4.3 Distribution du DOP et du MOP dans les TG de rongeurs .....</b>	<b>79</b>

<b>4.4 Différences dans la distribution du DOP et du MOP entre les types d'afférences primaires .....</b>	<b>83</b>
<b>4.5 Différences dans la distribution du DOP et du MOP entre les espèces.....</b>	<b>85</b>
<b>4.6 Potentiel analgésique du DOP et du MOP selon leur distribution .....</b>	<b>89</b>
<b>4.7 Impact du sexe et de l'âge dans la distribution du DOP et du MOP .....</b>	<b>91</b>
4.7.1 Impact du sexe .....	91
4.7.2 Impact de l'âge .....	92
4.7.3 Explication des modèles utilisés.....	93
4.7.3.1 Humains .....	93
4.7.3.2 Singes .....	93
4.7.3.3 Rats .....	94
4.7.3.4 Souris.....	94
<b>4.8 Forces et limitations de l'étude .....</b>	<b>94</b>
<b>Perspectives.....</b>	<b>97</b>
<b>5.1 Utilisation de marqueurs spécifiques à l'humain.....</b>	<b>97</b>
<b>5.2 Étude de la distribution du DOP et du MOP dans les TG de primates.....</b>	<b>98</b>
<b>5.3 Étude d'une souris humanisée.....</b>	<b>98</b>
<b>5.4 Localisation du DOP au niveau de synaptosomes .....</b>	<b>99</b>
<b>5.5 Électrophysiologie.....</b>	<b>100</b>
<b>Conclusions .....</b>	<b>102</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>104</b>
<b>Autres Résultats.....</b>	<b>106</b>
<b>8.1 Localisation du DOP au niveau de synaptosomes .....</b>	<b>106</b>
<b>8.2 Électrophysiologie extracellulaire .....</b>	<b>106</b>
<b>8.3 Rôle de la Cdk5 dans l'adressage du récepteur opioïde delta.....</b>	<b>108</b>
8.3.1 Mise en contexte du projet.....	108
8.3.2 Méthodologie employée.....	109
8.3.2.1 Production des constructions d'ADN .....	109
8.3.2.2 Production protéique.....	110
8.3.2.3 Essais de GST-pulldown.....	111
8.3.3 Résultats préliminaires obtenus.....	111
8.3.3.1 Cdk5 interagit avec l'ICL3 du DOP.....	111
8.3.3.1 La liaison de Cdk5 au DOP semble augmenter lors de l'utilisation du troisième peptide mimétique.....	112

**Liste des références .....116**

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schématisation des voies ascendantes de la douleur.....	4
Figure 2 : Présence d'autofluorescence dans les DRG de singes .....	45
Figure 3 : Marquage des sondes contrôles de RNAscope dans des DRG de singes.....	46
Figure 4 : Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les DRG de singes .....	48
Figure 5 : Coexpression entre les marqueurs neuronaux utilisés dans les DRG de singes ..	50
Figure 6: Présence d'autofluorescence dans les DRG d'humain.....	51
Figure 7: Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les DRG humains .....	52
Figure 8: Différences significatives dans la distribution du DOP entre différentes espèces	55
Figure 9: Différences significatives dans la distribution du MOP entre différentes espèces	56
Figure 10: Différences dans la distribution de la coexpression entre le DOP et le MOP entre différentes espèces.....	57
Figure 11: Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans des TG de rats .....	59
Figure 12 : Différence notoire entre la distribution des récepteurs opioïdes dans les ganglions de la racine dorsale vs les ganglions trijumeaux de rats.....	60
Figure 13 : Marquage des sondes contrôles de RNAscope dans des TG de souris .....	61
Figure 14: Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans des TG de souris.....	63
Figure 15: Différences notoires entre la distribution des récepteurs opioïdes dans les ganglions de la racine dorsale vs les ganglions trijumeaux de souris .....	65
Figure 16: Différences dans la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP entre les différents marqueurs des fibres C non peptidergiques dans les ganglions trijumeaux de souris .	67
Figure 17: Distribution des marqueurs des fibres C non peptidergiques dans les ganglions trijumeaux de souris .....	69
Figure 18: Différence dans la distribution des récepteurs opioïdes dans les ganglions trijumeaux entre les différents rongeurs .....	70
Figure 19: Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans cette étude.....	72
Figure 20: Schématisation des différences obtenues dans la distribution des récepteurs opioïdes entre les types d'afférences primaires.....	83

Figure 21: Schématisation des différences obtenues dans la distribution des récepteurs opioïdes dans les DRG de différentes espèces.....	88
Figure 22 : Modèle de souris humanisée où le DOP est uniquement exprimé dans les afférences primaires .....	99
Figure 23 : Visualisation du FLAG-DOP au niveau de synaptosomes de souris cKI-FLAG-DOP .....	100
Figure 24 : Immunoprécipitation de FLAG-DOP dans des cerveaux de souris FLAG-DOP .....	106
Figure 25 : Réponse des fibres C lors que stimulations nociceptives et non nociceptives à l'aide de filament de von Frey .....	107
Figure 26: Cdk5 se lie sur la troisième boucle intracellulaire du DOP.....	112
Figure 27: La liaison de Cdk5 au DOP semble augmenter lors de l'utilisation du troisième peptide mimétique .....	113
Figure 28: Cdk5 se lie entièrement à l'ICL3 du récepteur opioïde delta lors de l'utilisation du premier peptide mimétique .....	114

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Classification des grands types de neurones des afférences primaires en fonction de leurs rôles et de leurs caractéristiques.....	7
Tableau 2 : Informations sur les donneurs humains .....	34
Tableau 3 : Sondes de RNAscope utilisées .....	37
Tableau 4: Récapitulatif des résultats des études portant sur la distribution des récepteurs opioïdes dans les ganglions de la racine dorsale chez les primates .....	75
Tableau 5: Récapitulatif des résultats des études portant sur la distribution des récepteurs opioïdes dans les ganglions trijumeaux chez les rongeurs .....	81
Tableau 6: Structure des peptides mimétiques de la troisième boucle intracellulaire du récepteur opioïde delta.....	111
Tableau 7: Structure des différentes constructions de la troisième boucle intracellulaire du récepteur opioïde delta.....	115

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAV	<i>Adeno-associated virus</i>
AC	Adénylate cyclase
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AMP	Adénosine monophosphate
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASIC1	<i>Acid-sensing ion channel 1</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BRET	<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>
CALCA	Gène codant pour CGRP
Cdk5	<i>Cyclin-dependent kinase 5</i>
CFA	Adjuvant complet de Freund
CGRP	<i>Calcitonin-gene related peptide</i>
CIDN	Contrôle inhibiteur diffus nociceptif
cKI	<i>Conditional Knockin</i>
COPI	<i>Coatomer protein complex I</i>
CPNE6	<i>Copine 6</i>
CSD	<i>Cortical spreading depression</i>
CTOP	<i>H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub></i>
DADLE	<i>[D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>]-enkephalin</i>
DAMGO	<i>[D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol]-enkephalin</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DOP	Récepteur opioïde delta
DRG	Ganglion de la racine dorsale
ER	Récepteur à l'oestrogène
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GTP <sub>γ</sub> S	<i>Guanosine 5'-O-[gamma-thio]phosphate</i>
GTO	Organes tendineux de Golgi
AHP	Posthyperpolarisation

HTMRs	<i>High threshold mechanoreceptors</i>
IB4	Isolectine B4
ICL	Boucle intracellulaire
i.v.	Intraveineuse
KCNS1	<i>Potassium voltage-gated channel modifier subfamily S member 1</i>
KI	<i>Knock-in</i>
KO	Knock-out
KOP	Récepteur opioïde kappa
LPAR3	<i>Lysophosphatidic acid receptor 3</i>
LTMRs	<i>Low threshold mechanoreceptors</i>
MOP	Récepteur opioïde mu
Mrgpr	<i>Mas-related G-protein-coupled receptors</i>
NF200	Neurofilament 200
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NTC	Noyau trijumeau caudalis
NTRK3	<i>Neurotrophic receptor tyrosine kinase 3</i>
OCT	<i>Optimal cutting temperature compound</i>
OPRD1	<i>Opioid receptor delta 1</i>
OPRM1	<i>Opioid receptor mu 1</i>
PAG	Substance grise périaqueducatale
PAX2	<i>Paired box 2</i>
PFA	Paraformaldéhyde
PKC $\gamma$	<i>Protein kinase C gamma</i>
PPT-A	Préprotachykinine-A
P2RX3	Récepteur purinergique 3 de la famille P2X
PVALB	Parvalbumine
RAMP1	<i>Receptor activity modifying protein 1</i>
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
Ret	<i>Rearranged during transfection</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
RTP4	<i>Receptor-transporting protein 4</i>

Runx3	<i>Runt-related transcription factor 3</i>
RVM	Noyau ventro-médian
SCN10A	<i>Sodium voltage-gated channel alpha subunit 10</i>
SG	Substance gélatineuse
SNC80	(+)-4-[(alpha R)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl)]-N,N-diethylbenzamide
SP	Substance P
TAC1	<i>Tachykinin precursor 1</i>
TG	Ganglion trijumeau
TH	Tyrosine hydroxylase
TLX3	<i>T-cell leukemia homeobox protein 3</i>
Trk	Récepteur kinase de la tropomyosine
TRPA1	<i>Transient receptor potential ankyrin 1</i>
TRPM8	<i>Transient receptor potential melastatin 8</i>
TRPV	<i>Transient receptor potential vanilloid</i>
VGAT	<i>Vesicular GABA Transporter</i>
VGlut3	<i>Vesicular glutamate transporter type 3</i>
vIPAG	Substance grise périaqueducatale ventrolatérale
WDR	<i>Wide dynamic range</i>

# INTRODUCTION

## 1.1 La douleur

### 1.1.1 Classification de la douleur

Selon *l'International Association for the Study of Pain*, « la douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à, ou ressemblant à celle associée à, une lésion réelle ou potentielle » (IASP, 2020). La douleur peut être classifiée selon deux grandes catégories : la douleur aiguë ou la douleur chronique. La douleur aiguë est utilisée comme un système d'alarme par l'organisme pour sa protection. Elle est donc vive, immédiate, de courte durée et a une cause connue (Hylands-White et al., 2016). Par exemple, si quelqu'un place sa main par mégarde sur une source de chaleur intense, un réflexe de retrait de la main sera engendré par l'organisme pour empêcher une brûlure grave et la douleur à la main entrainera une limitation de l'utilisation de celle-ci pour que la guérison se produise rapidement (dans le cas d'une brûlure). De l'autre côté, la douleur chronique est considérée comme pathologique. En effet, c'est un type de douleur qui persiste dans le temps (plus de trois mois), n'apporte aucun bénéfice à l'organisme en comparaison à la douleur aiguë et est accompagnée de comorbidités comme la dépression et l'anxiété (Hylands-White et al., 2016; Kimmey et al., 2022). Lors du développement de la douleur chronique, des mécanismes de sensibilisation périphérique et centrale se produisent, ce qui est caractérisé par une diminution des seuils d'activation des neurones sensoriels en périphérie et de ceux de deuxième ordre au niveau de la moelle épinière, une perte des contrôles inhibiteurs au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière ainsi que le développement de changements plastiques dans les synapses de la corne dorsale (Sharif-Naeini et Basbaum, 2011; Pak et al., 2018). Ce type de douleur est beaucoup associé à l'allodynie, phénomène par lequel un stimulus non douloureux devient douloureux (ex. mettre des vêtements à la suite d'un coup de soleil), et à l'hyperalgésie, où un stimulus douloureux le devient plus qu'auparavant (Basbaum et al., 2009). La douleur chronique peut être classifiée en trois grands groupes : nociceptive (activation des nocicepteurs suite à des dommages aux structures non neuronales, comme l'arthrose), neuropathique (dommages affectant le système nerveux somatosensoriel, soit le système impliqué dans le codage sensoriel : le touché, notre position dans l'espace et

la perception de nos organes internes (Kandel et al., 2013), comme les douleurs diabétiques) et nociplastique ou centralisée (traitement altéré des signaux douloureux, comme la fibromyalgie). Il est à noter que les patients ont souvent un phénotype mixte (Kose et al., 2022).

### ***1.1.2 Impact de la douleur***

De nombreuses personnes dans le monde sont touchées par la douleur chaque année. Au Canada, c'est une personne sur cinq, soit 20% de la population, qui est affectée par la douleur chronique. Lorsque celle-ci persiste dans le temps, tous les aspects de la vie seront affectés et les comorbidités associées à la douleur apparaissent. En général, les personnes âgées, les femmes, les anciens combattants, les personnes touchées par les inégalités sociales et la discrimination sont plus affectés (Gouvernement du Canada, 2021). Évidemment, cela entraîne des coûts importants qui totalisent entre 560 et 635 milliards de dollars par année aux États-Unis, ce qui est plus élevé que ceux associés aux maladies cardiovasculaires, au diabète et au cancer (Gaskin et Richard, 2012). Pour ce qui est du Canada, l'impact économique de la douleur chronique se chiffre entre 50 et 60 milliards de dollars par année en coûts directs (traitements, hospitalisations) et indirects (perte de productivité) (Wilson et al., 2015).

### ***1.1.3 La migraine***

La migraine est caractérisée par des crises de céphalée unilatérale (d'un seul côté de la tête) qui peuvent se répandre et devenir bilatérale (des deux côtés de la tête) ce qui arrive dans 40% des cas, pulsative, d'intensité modérée à sévère, avec une sensibilité au mouvement, aux bruits et à la lumière (Silberstein, 2004). Comparativement à une simple céphalée, la migraine peut se produire sur plusieurs jours et se compose de quatre grandes phases : la phase prémonitoire, l'aura, la céphalée et la phase de postdrome. La phase prémonitoire peut commencer jusqu'à 72h avant la phase de céphalée (Goadsby et al., 2017). Les personnes ressentent différents changements comme de l'irritabilité, de la fatigue et des torticolis. La phase d'aura est seulement présente chez le tiers des migraineux et commence souvent par une tache brillante présente au milieu du champ visuel de la personne. Le mécanisme proposé pour la formation d'aura est la propagation d'une dépression corticale (CSD) (Goadsby et

al., 2017; Dripps et al., 2020). Par la suite, une céphalée comme celle décrite ci-haut se produit. Une des causes de la migraine serait la libération de neuropeptides comme le CGRP (*Calcitonin-gene related peptide*) au niveau de la dure-mère et des méninges ce qui cause la vasodilatation des vaisseaux sanguins et engendrerait une sensibilisation trigéminale (Bertels et al., 2022). La céphalée est suivie de la période postdrome qui est caractérisée par de la fatigue, des difficultés à se concentrer et des torticolis (Goadsby et al., 2017).

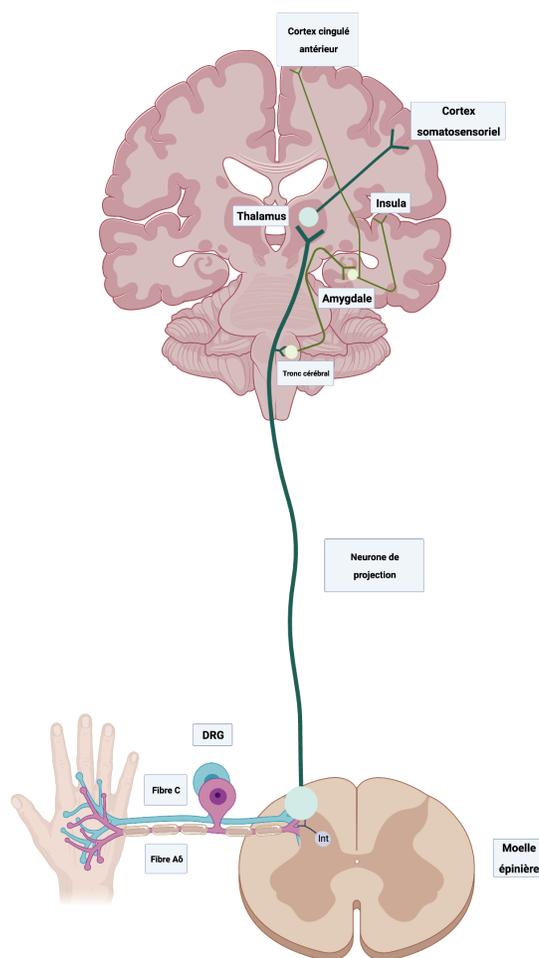
#### ***1.1.4 La nociception***

La nociception représente un système neurophysiologique qui permet la détection de stimulations intenses qui sont susceptibles de menacer l'intégrité de l'organisme (Sherrington, 1906). Ces stimulations de nature chimique, thermique ou mécanique sont détectées par des nocicepteurs qui ont des terminaisons nerveuses libres et qui transmettent les signaux au niveau de la voie ascendante de la douleur (Julius et Basbaum, 2001; Basbaum et al., 2009; Abraira et Ginty, 2013). Seulement les stimulations d'une intensité élevée activent ces nocicepteurs ce qui fait que les stimulations de légère intensité comme une caresse sur la main ne les activeront pas (Julius et Basbaum, 2001).

##### *1.1.4.1 Les voies ascendantes de la douleur*

Les voies ascendantes de la douleur sont activées lorsqu'un stimulus active un nocicepteur localisé dans les tissus périphériques, les muscles et les organes (Almeida et al., 2004). La stimulation de ces nocicepteurs produit des potentiels membranaires, qui si assez élevés généreront un potentiel d'action. C'est ce qu'on appelle la transduction. Ce potentiel d'action voyage ensuite au niveau des fibres des afférences primaires (le neurone de premier ordre) jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière (Quirion et al., 2020; Khalid et Tubbs, 2017; Mense, 1983; Millan, 1999). À cet endroit, des neurotransmetteurs activateurs (glutamate, substance P) sont relâchés ce qui permet d'activer un neurone de projection (neurone de deuxième ordre) et caractérise l'étape de la transmission (Almeida et al., 2004). Un neurone de troisième ordre est ensuite activé au niveau du thalamus et du tronc cérébral pour suivre les voies ascendantes spinothalamique latérale et spinothalamique médiane (Basbaum et al., 2009; Almeida et al., 2004). Une fois que le signal atteint le cortex, il peut être perçu par

différents centres : les cortex somatosensoriels primaire et secondaire responsables de la composante sensori-discriminative et le cortex cingulé antérieur et l'insula pour la composante motivo-affective de la douleur (Basbaum et al., 2009; Apkarian et al., 2005). C'est seulement lors de cette étape de perception qu'il est possible de parler de douleur. Une quatrième étape facultative, la modulation, peut aussi se produire au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. En effet, des interneurons activateurs ou inhibiteurs peuvent y être activés ce qui augmente ou diminue l'activation du neurone de projection et donc module la perception de la douleur (Almeida et al., 2004).



**Figure 1: Schématisation des voies ascendantes de la douleur**

L'information de haute intensité voyage de la périphérie jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière ou un neurone de projection est activé. Ce neurone permet l'activation d'un neurone de troisième ordre au niveau du thalamus et du tronc cérébral pour permettre la perception de la douleur. Adapté de Basbaum et al., 2009 et de Schaffler et al., 2019. Figure créée à l'aide de Biorender.

#### *1.1.4.2 La voie trigéminal*

Pour ce qui est de la douleur au niveau du visage, une autre voie est empruntée, soit la voie trigéminal. Au niveau du visage, la distribution des neurones sensoriels est faite de façon différente. En effet, trois projections neuronales contenant les nocicepteurs sont présentes et se rejoignent au niveau des ganglions trijumeaux où une organisation très conservée est présente. Le nerf ophtalmique (V1) innerve dans la région au-dessus des yeux, alors que le nerf maxillaire (V2) innerve dans la zone du nez jusqu'à la lèvre supérieure et que le nerf mandibulaire (V3) innerve autour de la mâchoire (Bičanić et al., 2019; Terrier et al., 2022; Goadsby et al., 2017). Lorsqu'un stimulus de haute intensité active les nocicepteurs présents sur ces nerfs, l'information voyage jusqu'au ganglion trijumeau, puis se rend au niveau du noyau trijumeau caudalis (NTC) localisé dans la médulla du tronc cérébral. De là, l'information est relayée par un deuxième neurone jusqu'au thalamus où le reste des voies ascendantes de la douleur expliquée ci-haut entre en branle (Bičanić et al., 2019). Cette voie est entre autres impliquée dans le syndrome de la bouche brûlante et de la migraine (Terrier et al., 2022; Teruel et Romero-Reyes, 2022; Goadsby et al., 2017).

#### *1.1.4.3 Les voies descendantes de la douleur*

Les voies descendantes de la douleur permettent de moduler la douleur ressentie, et ce au niveau spinal, du tronc cérébral et des centres supérieurs. C'est au niveau spinal que la théorie du portillon produit son effet. Effectivement, cette théorie énonce que, lorsqu'une douleur se produit, il y a l'activation des fibres A $\delta$  et C qui inhibent les interneurons inhibiteurs de la substance gélatineuse (SG) de la moelle épinière (impliquées dans la nociception, le portillon est ouvert ce qui augmente la perception douloureuse) (Melzack et Wall, 1965). En effectuant un stimulus mécanique sur le site douloureux (frotter la zone), les fibres A $\beta$  sont activées et permettent l'activation des interneurons inhibiteurs de la SG (fermeture du portillon) ce qui module la relâche des neurotransmetteurs excitateurs par les fibres A $\delta$  et C et, de ce fait, diminue la perception douloureuse (Melzack et Wall, 1965; DeLeo, 2006).

Au niveau du tronc cérébral, plusieurs de ces régions sont impliquées dans le contrôle inhibiteur diffus nociceptif (CIDN) qui est décrit comme la douleur qui inhibe la douleur (Sean et al., 2021). Lorsqu'un stimulus nociceptif est appliqué à distance d'un autre stimulus

nociceptif, les CIDN sont activés (Le Bars et al., 1979). La relâche de substances inhibitrices ou une inhibition des neurones activateurs spinaux est effectuée, ce qui diminue l'activation des voies ascendantes et donc la perception douloureuse (Le Bars et al., 1992). Par exemple, appliquer une thermode assez chaude pour activer les nocicepteurs sur la jambe gauche de quelqu'un alors que sa main droite est plongée dans l'eau glaciale provoquera la diminution de l'intensité de douleur ressentie pour l'un des deux sites. Puisque les récepteurs aux opioïdes sont tous présents au niveau des voies ascendantes et descendantes de la douleur, leur activation pourrait moduler la perception de la douleur et donc en fait des cibles intéressantes (Al-Hasani et al., 2011).

## **1.2 Les afférences primaires**

Les afférences primaires correspondent au neurone de premier ordre activé dans les voies ascendantes de la douleur qui contiennent les nocicepteurs. Ce sont des neurones pseudo-unipolaires qui permettent la transmission des signaux de la périphérie vers le système nerveux central grâce à leur axone divisé en deux projections. Effectivement, une première projection innerve la périphérie soit la peau, les articulations, les muscles et même les viscères et une deuxième centrale qui projette vers la corne dorsale de la moelle épinière (Quirion et al., 2020; Khalid et Tubbs, 2017; Basbaum et Julius, 2006; Almeida et al., 2004). Ces deux projections se rejoignent au niveau des ganglions de la racine dorsale (DRG) pour l'innervation de la périphérie et des ganglions trijumeaux (TG) pour l'innervation du visage qui contiennent les corps cellulaires de ces neurones (Quirion et al., 2020; Dubin et Patapoutian, 2010; Basbaum et al., 2009). Les afférences primaires sont aussi la porte d'entrée des différentes composantes du système somatosensoriel. En effet, la proprioception, l'extéroception et l'intéroception (perception des stimuli internes comme l'envie d'uriner (Marshall et al., 2020; Abraira et Ginty, 2013) sont tous perçus grâce à ces neurones (Abraira et Ginty, 2013). Il existe quatre grands types de neurones dans les afférences primaires qui ont tous des rôles et des caractéristiques différents.

**Tableau 1: Classification des grands types de neurones des afférences primaires en fonction de leurs rôles et de leurs caractéristiques**

Afférences primaires	Diamètre de l'axone <sup>1</sup>	Niveau de myélinisation	Vitesse de conduction	Projection	Rôle principal	Marqueurs spécifiques
A $\alpha$	Large 12-20 $\mu\text{m}$	Grand	Grande 120 m/s	Laminae V, VII et IX	Prioprioception	Rongeur : NF200, TrkC, Runx3 Humain : Spp1, PVALB
A $\beta$	Large 6-12 $\mu\text{m}$	Grand	Grande 16-100 m/s	Laminae III-IV	Extéroception	Rongeur : NF200 Humain : KCNS1, piezo 2, NTRK3
A $\delta$	Moyen 1-6 $\mu\text{m}$	Léger	Moyenne 5-30 m/s	Laminae I et V	Nociception	Rongeur : NF200 Humain* : SCN10A, P2RX3, TAC1, CALCA, TRPV1
C	Petit 0,2-1,5 $\mu\text{m}$	Aucun	Lente 0,2-2,5 m/s	Laminae I et II	Nociception	Rongeur : Peptidergique : SP, CGRP, TrkA Non peptidergique : IB4, P2RX3, Humain* : SCN10A, P2RX3, TAC1, CALCA, TRPV1

1. (Kandel et al., 2013)

\* Les études parlent de nocicepteurs et ne font pas la différence entre les deux types de fibres

### ***1.2.1 Les fibres A $\alpha$***

Les fibres A $\alpha$  sont des neurones de type proprioceptif, c'est-à-dire qui nous permettent de détecter où notre corps se situe dans l'espace (Julius et Basbaum, 2001). Par exemple, si nous fermons nos yeux, nous sommes tout de même capables d'amener un doigt de son emplacement de repos jusqu'au bout de notre nez sans problème, et ce grâce à ces neurones. Les sous-types de neurones A $\alpha$  ont comme caractéristiques communes d'avoir un large diamètre en plus d'être recouverts d'une épaisse couche de myéline ce qui leur procure une

très grande vitesse de conduction (Kandel et al., 2013). La portion centrale de l'axone des fibres A $\alpha$  projette au niveau des laminae V, VII et même IX. Ces neurones se rendent donc aux faisceaux spino-cérébelleux ventral et dorsal (Frigon et al., 2022). De plus, ils font des connexions monosynaptiques avec les motoneurones  $\alpha$  de la corne ventrale de la moelle épinière ce qui permet de créer les réflexes spinaux (Frigon et al., 2022).

#### *1.2.1.1 Les fibres Ia*

La portion périphérique des fibres Ia innerve les fuseaux musculaires localisés dans les muscles. Ces fuseaux musculaires sont faits de fibres intrafusales encapsulées où l'afférence Ia s'attache. Des motoneurones  $\gamma$  sont aussi présents pour contrôler la contraction des fibres intrafusales (Sonner et al., 2017). Les afférences Ia permettent donc de transmettre l'information à propos des changements de l'étirement des muscles aidé des afférences II (afférences secondaires aussi localisées aux fuseaux musculaires) qui transmettent les informations sur la longueur musculaire (Pasluta et al., 2018). Leur rôle principal est donc de donner la vitesse et la position des membres (Frigon et al., 2022).

#### *1.2.1.2 Les fibres Ib*

Les afférences Ib innervent les organes tendineux de Golgi (GTO), des corpuscules encapsulés présents au niveau des jonctions myotendineuses qui contiennent plusieurs fibres de collagène (Sonner et al., 2017). Ces afférences permettent de donner de l'information sur la tension musculaire présente, car lors de la contraction d'un muscle, les GTO et ses fibres de collagènes sont étirés ce qui comprime les fibres Ib (Frigon et al., 2022; Pasluosta et al., 2018; Sonner et al., 2017). Ces récepteurs ont de haut seuil d'activation et s'adaptent lentement ce qui explique leur activation seulement lorsqu'il y a un mouvement. Leur rôle principal est de donner la force contractile musculaire (Frigon et al., 2022).

#### *1.2.2 Les fibres A $\beta$*

Les fibres A $\beta$  sont principalement des neurones impliqués dans l'extéroception, soit le toucher léger (Julius et Basbaum, 2001). Ce sont donc des mécanorécepteurs activés par des signaux de faible intensité, donc non nociceptifs (LTMR) (Almeida et al., 2004). Par contre,

il existe un sous-type dans ces fibres qui est activé par des stimuli de haute intensité donc nociceptifs (HTMR). Ces fibres ont aussi un large diamètre et sont fortement myélinisées ce qui cause leur grande vitesse de conduction (Abraira et Ginty, 2013). La projection centrale de l'axone de ces neurones projette dans les laminae intermédiaires de la moelle épinière (laminae III-IV) (Basbaum et al., 2009). Il existe quatre grandes catégories de fibres A $\beta$  LTMRs qui se différencient en fonction de leur vitesse d'adaptation à un stimulus et de leur localisation : celle à adaptation rapide (RA), celle à adaptation lente (SA), les récepteurs de type 1 et de type 2 (les fibres RA1, RA2, SA1 et SA2). Les récepteurs à adaptation rapide sont activés au moment d'un contact, puis cessent de décharger jusqu'à ce qu'un changement de pression survienne (Johansson et Flanagan, 2009; Abraira et Ginty, 2013). Pour ce qui est de ceux à adaptation lente, ils restent activés tout au long de la stimulation mécanique (Johansson et Flanagan, 2009; Abraira et Ginty, 2013). Les récepteurs de type 1 sont localisés à la surface de la peau, principalement au bout des doigts, ce qui leur confère des champs récepteurs de plus petite taille et qui explique leur capacité à distinguer les détails d'un objet alors que les récepteurs de type 2 sont présents plus profondément dans le derme, leurs champs récepteurs sont donc beaucoup plus grands ce qui cause des signaux plus diffus (Johansson et Flanagan, 2009).

#### *1.2.2.1 Les fibres A $\beta$ SA1-LTMRs*

Les fibres A $\beta$  SA1-LTMRs sont des fibres à adaptation lente de type 1 (leurs terminaisons sont présentes en surface et déchargent constamment) et projettent dans les disques de Merkel. Ce type de fibres est très important pour la transmission d'images spatiales grâce aux stimuli tactiles. En effet, ils répondent fortement au moment du contact avec le coin, les bords et les courbes d'un objet en plus d'avoir une grande résolution spatiale (Abraira et Ginty, 2013; Zimmerman et al., 2014; Frigon et al., 2022). Ces fibres répondent de façon graduelle au changement de pression mise sur la peau ce qui leur permet de distinguer le relief des choses (Sobinov et Bensmaia, 2021). Les disques de Merkel sont notamment présents en grande quantité (dense) sur les doigts et les lèvres (Abraira et Ginty, 2013).

#### *1.2.2.2 Les fibres A $\beta$ SA2-LTMRs*

Les fibres A $\beta$  SA2-LTMRs sont aussi des fibres à adaptation lente, mais de type 2 (leurs terminaisons sont localisées en profondeur et elles déchargent en tout temps lorsqu'activées). Ces fibres sont associées aux terminaisons de Ruffini, de petites terminaisons nerveuses encapsulées, et sont impliquées dans la perception de l'indentation de la peau, quoique beaucoup moins que les disques de Merkel (Abreira et Ginty, 2013). Elles sont plus sensibles à l'étirement de la peau (lorsqu'un objet bouge et étire la peau) et aux changements de forme de la main et des doigts (Abreira et Ginty, 2013; Sobinov et Bensmaia, 2021; Frigon et al., 2022). Cette propriété leur confère donc un rôle dans la proprioception et les informations y correspondant sont intégrées avec celles provenant des fuseaux musculaires et des afférences au niveau des jointures. Les terminaisons de Ruffini font aussi partie des récepteurs articulaires, ce qui permet de mieux expliquer leur rôle de propriocepteur (Frigon et al., 2022).

#### *1.2.2.3 Les fibres A $\beta$ RA1-LTMRs*

Les fibres A $\beta$  RA1-LTMRs sont des fibres à adaptation rapide de type 1 (leurs terminaisons sont localisées en surface et elles déchargent lorsqu'un changement de pression se produit). L'axone de ces fibres se termine dans les corpuscules de Meissner qui sont sensibles aux mouvements de la peau et des poils en plus de répondre aux vibrations de basses fréquences ce qui leur permet de détecter le glissement d'un objet (Zimmerman et al., 2014; Abreira et Ginty, 2013). Ces corpuscules sont retrouvés en majorité au niveau de la peau sans poil de la main et sur la plante des pieds (Frigon et al., 2022). Les corpuscules de Meissner sont composés de cellules lamellaires disposées horizontalement entourées de fibres de collagène qui sont innervées par au moins trois fibres A $\beta$  RA1-LTMRs (Cauna et Ross, 1960). Cet arrangement est très important pour leur rôle, car une force appliquée permet de déformer les fibres de collagène ce qui déclenche immédiatement un potentiel d'action. Lorsque le stimulus cesse, les corpuscules reprennent leur forme initiale ce qui déclenche un deuxième potentiel d'action et qui explique la réponse aux changements de pression de ces fibres (Zimmerman et al., 2014; Abreira et Ginty, 2013).

#### *1.2.2.4 Les fibres A $\beta$ RA2-LTMRs*

Les fibres A $\beta$  RA2-LTMRs sont des fibres à adaptation rapide de type 2 (leurs terminaisons sont localisées plus profondément dans le derme et elles déchargent aussi lorsqu'un changement de pression survient. Chacune de ces fibres est associée à un corpuscule de Pacini qui sont présents en forte densité au niveau des doigts et près des jointures (Zimmerman et al., 2014). Ces corpuscules sont extrêmement sensibles et permettent de détecter des vibrations de hautes fréquences et ce, à un seuil d'activation bas (Bell et al., 1994). Ils rendent donc possible de percevoir les vibrations lorsque nous manipulons un objet ce qui nous permet de les guider sans les regarder (Abraira et Ginty, 2013). Ces corpuscules sont aussi des récepteurs articulaires ce qui explique la portion proprioception de ces récepteurs (Frigon et al., 2022).

#### *1.2.2.5 Les fibres A $\beta$ HTMRs*

Les fibres A $\beta$  HTMRs ont été découvertes chez le chat lorsque des neurones ayant des vitesses de conduction comparables à celles des fibres A $\beta$  émettaient des potentiels d'action avec forte intensité lors de stimulations nociceptives (pincement/compression de forte intensité) comparativement à des stimuli non nociceptifs (Burgess et Perl, 1967; Djouhri et Lawson, 2004). Chez le chat, environ 8% des neurones de type A sont des A $\beta$  HTMRs, ce qui est augmenté à 18% et 50% chez le singe et le rat respectivement (Burgess et Perl, 1967; Treede et al., 1998; Lynn et Carpenter, 1981). Ces neurones ont aussi été enregistrés par électrophysiologie intracellulaire dans des DRG de chat, rat et cochon d'Inde (Djouhri et Lawson, 2004). Malheureusement, ces fibres sont sous-étudiées ce qui est potentiellement dû à leur forte ressemblance aux fibres A $\delta$  HTMRs. Étudier davantage ces fibres permettrait de mieux comprendre la contribution respective des fibres A $\beta$  LTMRs et HTMRs lors d'hyperalgésie ou d'allodynie suite à une blessure (Djouhri et Lawson, 2004).

### ***1.2.3 Les fibres A $\delta$***

Les fibres A $\delta$  sont principalement connues pour leur rôle dans la nociception, même si un sous-type de ces fibres est impliqué dans la mécanosensation. Ces fibres ont un diamètre de moyen calibre qui est légèrement myélinisé (Julius et Basbaum, 2001; Le Pichon et Chesler,

2014). Puisque leurs axones sont myélinisés, leur vitesse de conduction permet de ressentir ce qu'on appelle la « première » douleur, soit celle rapide et spécifique après que nous nous soyons cogné un orteil sur le coin d'un lit par exemple (Julius et Basbaum, 2001; Almeida et al., 2004). L'axone de ces neurones se termine au niveau des laminae superficielles (lamina I) et profondes de la moelle épinière (lamina V) (Basbaum et al., 2009). Les axones se terminant dans la lamina V appartiennent à des neurones spéciaux pouvant répondre à des stimuli non nociceptifs et nociceptifs que l'on appelle les neurones *wide dynamic range* (WDR) (Basbaum et al., 2009). Le type de stimuli détecté permet de différencier les catégories de fibres A $\delta$ .

#### *1.2.3.1 Les fibres A $\delta$ LTMRs*

Les fibres A $\delta$  LTMRs sont des mécanorécepteurs associés à des follicules pileux, soit ceux de type poinçon, auchene et zigzag (Li et al., 2011). Leur rôle principal est donc de détecter le mouvement des poils. Ce sont les mécanorécepteurs les plus sensibles que nous pouvons retrouver sur la peau puisqu'ils ont les seuils mécaniques les plus bas en plus d'avoir la sensibilité dynamique la plus haute (Brown et Iggo, 1967b; Abaira et Ginty, 2013). Pour terminer, ces récepteurs sont impliqués dans le refroidissement rapide (Brown et Iggo, 1967b; Li et al., 2011; Djouhri et al., 2004).

#### *1.2.3.2 Les fibres A $\delta$ type I*

Les fibres A $\delta$  de type I sont des mécanorécepteurs activés à de hauts seuils de stimulation. Ils peuvent répondre à des stimuli potentiellement dangereux pour l'organisme de type mécanique, chimique et thermique à de hautes températures (environ 53°C) (Julius et Basbaum, 2001; Djouhri et Lawson, 2004). Si le stimulus de haute intensité se poursuit dans le temps, ces nocicepteurs se sensibiliseront et donc répondront à des stimuli thermiques et mécaniques de plus basse intensité (Basbaum et al., 2009; Millan et al., 1999). Dû au haut seuil d'activation thermique de ces neurones, leur rôle principal est donc de capter les stimuli mécaniques de haute intensité (Almeida et al., 2004).

### 1.2.3.3 Les fibres A $\delta$ type 2

Contrairement aux fibres A $\delta$  de type I, les fibres A $\delta$  de type II, ont un très haut seuil d'activation mécanique et un seuil d'activation thermique plus bas (environ 43°C) (Julius et Basbaum, 2001; Basbaum et al., 2009). Ces fibres possèdent aussi des récepteurs pour les températures très froides (-15°C) (Almeida et al., 2004). Comme pour les types I, ces fibres peuvent être sensibilisées à cause de stimuli mécaniques trop intenses et répondre à des seuils habituellement non nociceptifs (Almeida et al., 2004). Dû à leur seuil d'activation thermique plus bas, le rôle principal de ces fibres est donc de transmettre les stimuli thermiques de haute intensité (Millan et al., 1999).

### 1.2.4 Les fibres C

Les fibres C ont aussi comme rôle principal la nociception, même si elles possèdent un sous-groupe impliqué dans le toucher affectif. Ces fibres sont le type le plus abondant et sont de petit diamètre et non myélinisées, ce qui leur confère une vitesse de conduction assez lente (Basbaum et al., 2009; Le Pichon et Chesler 2014). De ce fait, elles sont associées à la seconde douleur, celle qui pulse et qui est diffuse après la douleur vive qui suit le coup d'un orteil sur le bord d'un lit (Julius et Basbaum, 2001). Effectivement, leurs potentiels d'action sont prolongés dans le temps ce qui produit une sommation temporelle et provoque une douleur sourde (Almeida et al., 2004). La portion centrale de l'axone de ces neurones se rend dans les laminae superficielles de la moelle épinière (laminae I et II interne) (Basbaum et al., 2009). Les fibres C sont dites polymodales, car elles peuvent être activées et transmettre des stimuli de type mécanique, chimique et thermique (Almeida et al., 2004; Julius et Basbaum, 2001; Basbaum et al., 2009). Chez les rongeurs, les fibres C sont divisées entre les fibres C peptidergiques et non peptidergiques, ce qui n'est possible chez les humains (Tavares-Ferreira et al., 2022; Shiers et al., 2021). En effet, chez l'humain les neuropeptides classiquement retrouvés au niveau des fibres C chez les rongeurs sont exprimés dans presque tous les groupes de neurones des DRG humains et un fort niveau de coexpression est présent entre P2RX3 (récepteur purinergique 3 de la famille P2X, un marqueur des fibres C non peptidergiques chez les rongeurs) et CALCA (gène codant pour le *calcitonin-gene related peptide*, un marqueur des fibres C peptidergiques chez les rongeurs) ce qui renforce l'idée que ces deux types neuronaux ne forment plutôt qu'une seule population neuronale chez

l'humain (Shiers et al., 2020; Shiers et al., 2021; Tavares-Ferreira et al., 2022; Shiers et al., 2023).

#### *1.2.4.1 Les fibres C LTMRs*

Les fibres C LTMRs sont uniquement présentes au niveau de la peau poilue, soit autour des follicules pileux poinçon, auchene et zigzag. Tout comme les A $\delta$  LTMRs, elles permettent un refroidissement rapide (Abraira et Ginty, 2013). Leur rôle principal est associé au toucher émotionnel. En effet, lorsqu'un mouvement lent comme une caresse est effectué sur la peau, ces récepteurs sont activés au maximum (Li et al., 2011; Basbaum et al., 2009). De plus, les humains ne possédant pas de fibres myélinisées, donc uniquement des fibres C, ressentent du plaisir lorsque leurs fibres C LTRMs sont activées ce qui démontre une activation de l'insula et non du cortex somatosensoriel (Björnsdotter et al., 2009). Pour terminer, ces fibres expriment la tyrosine hydroxylase (TH) et le marqueur des fibres C non peptidergiques cRet sans aussi exprimer les marqueurs CGRP/TrkA/TRPV1 et IB4/MrgprA4 associés aux fibres C peptidergiques et non peptidergiques respectivement (Rostock et al., 2018). C'est donc une sous-classe unique de fibres C non peptidergiques (Li et al., 2011; Le Pichon et Chesler, 2014).

#### *1.2.4.2 Les fibres C peptidergiques*

Les fibres C peptidergiques sont nommées ainsi puisqu'elles contiennent et sécrètent des neuropeptides comme la substance P et le CGRP dans la moelle épinière lorsqu'activées (Julius et Basbaum, 2001; Basbaum et al., 2009; Wiesenfeld-Hallin et al., 1984; Hokfelt et al., 1975). Ces fibres projettent au niveau des laminae I et II externes de la moelle épinière (Shiers et al., 2021). Leur rôle semble encore incertain dans la littérature. Effectivement, certaines équipes croient qu'elles sont impliquées dans la douleur thermique, puisque la délétion de ces fibres dans des souris diminue la réponse des animaux lors de stimuli nociceptifs thermiques et non mécaniques (Cavanaugh et al., 2009; Petitjean et al., 2019, McCoy et al., 2013). D'un autre côté, d'autres équipes croient que ces fibres ont plutôt un rôle dans la détection de stimuli thermiques, mécaniques et chimiques, donc qu'elles sont polymodales (Basbaum et al., 2009; Almeida et al., 2004).

#### *1.2.4.3 Les fibres C non peptidergiques*

De leur côté, les fibres C non peptidergiques portent ce nom parce qu'elles ne contiennent pas de neuropeptides comme les fibres C peptidergiques (Basbaum et al., 2009; Julius et Basbaum, 2001). La portion centrale de l'axone de ces fibres projette au niveau de la lamina 2 interne de la moelle épinière (Shiers et al., 2021). Tout comme les fibres C peptidergiques, leur rôle est encore controversé dans la littérature. En effet, certaines études indiquent que le rôle des fibres C non peptidergiques est dans la transmission de la douleur mécanique et non thermique, puisqu'en supprimant les fibres C non peptidergiques chez la souris, une diminution de la réponse aux stimuli mécaniques, mais pas aux stimuli thermiques, était présente (Petitjean et al., 2019; Cavanaugh et al., 2009; McCoy et al., 2013). De l'autre côté, d'autres études croient que ces fibres sont polymodales, car leur suppression, chez la souris, diminue les seuils de détection de la douleur induite par des stimuli mécaniques et thermiques (Tarpley et al., 2004; Vulchanova et al., 2001; Basbaum et al., 2009).

#### *1.2.5 Les nocicepteurs silencieux*

Les nocicepteurs silencieux sont des nocicepteurs qui ne répondent pas aux stimuli douloureux en général (Almeida et al., 2004). En effet, leur activation se produit uniquement lorsque de l'inflammation est retrouvée dans le lieu de leur activation puisqu'ils ont été sensibilisés par une lésion tissulaire (Julius et Basbaum, 2001; Almeida et al., 2004; Tavares-Ferreira et al., 2022). Les fibres A $\delta$  ainsi que les fibres C possèdent des nocicepteurs silencieux. Celles-ci peuvent être notamment distinguées par les marqueurs qu'elles expriment (Rau et al., 2005; Petruska et al., 2002). De plus, ces neurones possèdent un « post-hyperpolarisation (AHP) » unique qui peut les différencier des autres nocicepteurs (Petruska et al., 2002).

### **1.3 Types de classification des afférences primaires**

#### *1.3.1 Grosseur du corps cellulaire*

Une des façons les plus simples de classifier les différents types de neurones des afférences primaires est simplement grâce au diamètre de leur corps cellulaire. En effet, par le passé, de

nombreuses études se fiaient au diamètre des neurones pour les classer. Pour ce faire, une des méthodes les plus populaires est de mesurer le diamètre moyen de tous les neurones (Mennicken et al., 2003; Gold et al., 1996; Wang et Wessendorf, 2001; Rau et al., 2005; Davidson et al., 2014; Ji et al., 1995). La capacitance membranaire peut aussi être utilisée pour déterminer indirectement le diamètre des différents neurones, car elle est le reflet de l'aire des cellules (Zhang et al., 2017). Évidemment, un seuil doit être fixé pour tous les types de neurones et celui-ci varie entre chaque espèce et entre les études. Par exemple, chez le rat, en fonction des études un petit diamètre varie entre 15  $\mu\text{m}$ , 20-27  $\mu\text{m}$  et 15-30  $\mu\text{m}$ , un diamètre moyen varie entre 33-37  $\mu\text{m}$  et 35-45  $\mu\text{m}$  et un grand diamètre varie entre 30  $\mu\text{m}$  et 41-48  $\mu\text{m}$  (Mennicken et al., 2003; Gold et al., 1996; Rau et al., 2005). Il y a une bonne différence en comparant les diamètres chez le rat avec ceux chez la souris où des neurones de petit diamètre sont entre 10-20  $\mu\text{m}$  alors que ceux de large diamètre sont entre 35-50  $\mu\text{m}$  et avec le singe où les diamètres sont de 19  $\mu\text{m}$  et 40  $\mu\text{m}$  pour les petits et grands neurones (Wang et al., 2010; Mennicken et al., 2003). Évidemment, les neurones des afférences primaires les plus grands sont présents chez l'humain, mais encore une fois, beaucoup de variabilité existe entre les études (Haberberger et al., 2019). Pour les petits neurones, les diamètres varient entre plus petit que 25  $\mu\text{m}$ , 30-60  $\mu\text{m}$  et plus petit que 50  $\mu\text{m}$  alors que les gros diamètres sont d'environ 55  $\mu\text{m}$  (Han et al., 2015; Mennicken et al., 2003; Davidson et al., 2014; Chang et al., 2018, Haberberger et al., 2019). Les fibres de large diamètre peuvent être de type  $A\alpha$  ou  $A\beta$ , alors que les fibres de moyen diamètre sont associées aux fibres  $A\delta$  (Djourhi et Lawson, 2004; Viventi et Dottori, 2018; Khalid et Tubbs, 2017; Le Pichon et Chesler, 2014; Abreira et Ginty, 2013; Garland, 2012). Pour terminer, les fibres de petit diamètre comprennent les deux groupes de fibres C (Julius et Basbaum, 2001; Khalid et Tubbs, 2017; Cavanaugh et al., 2009; Zhang et al., 2013).

### ***1.3.2 Vitesse de conduction***

La vitesse de conduction des différents neurones présents dans les afférences primaires est aussi une méthode utilisée pour les classer. En effet, les groupes de fibres C,  $A\delta$  et  $A\beta$  et  $A\alpha$  ont tous des vitesses de conduction qui leur sont spécifiques, ce qui permet de les différencier (Djourhi et Lawson, 2004). Pour mesurer ces vitesses de conduction, les cellules

des ganglions sont implantées avec des microélectrodes qui provoquent des dépolarisations. La réponse des cellules est ensuite captée à l'aide d'un électromètre (Lee et al., 1986). Les enregistrements peuvent aussi être faits à distance sur des animaux vivants (Obreja et al., 2010). En d'autres mots, ce sont des enregistrements électrophysiologiques qui sont faits (Djoughri et Lawson, 2001; Djoughri et Lawson, 2004). Évidemment, de nombreux éléments peuvent, encore une fois, influencer la conduction électrique des neurones. Que ce soit en fonction des espèces, de l'âge ou de la température du milieu utilisé pour faire les enregistrements, des variations peuvent survenir (Djoughri et Lawson, 2004; Sato et al., 1985; Birren et Wall, 1956). La vitesse de conduction des différents types de neurones est directement liée au diamètre des fibres (Julius et Basbaum, 2001; Lee et al., 1986; Mense, 1990). Les fibres  $A\alpha$  et  $A\beta$  ont les plus larges diamètres, mais aussi les vitesses de conduction les plus grandes, car la résistance du courant au travers de l'axone est moins grande que pour les fibres de petit diamètre (Kandel et al., 2013). Les fibres  $A\alpha$  ont la vitesse de conduction la plus rapide avec des valeurs d'environ 120 m/s suivies des fibres  $A\beta$  pour lesquelles les valeurs varient entre 16 à 100 m/s (Kandel et al., 2013; Abaira et Ginty, 2013; Le Pichon et Chesler, 2014; Millan, 1999). Elles sont suivies des fibres  $A\delta$  dont la vitesse varie entre 5 et 30 m/s (Abaira et Ginty, 2013; Dubin et Patapoutian, 2010; Le Pichon et Chesler, 2014; Millan, 1999; Julius et al., 2001). Les fibres C sont donc les plus lentes au niveau de la conduction avec des vitesses variant entre 0,2 et 2,5 m/s (Abaira et Ginty, 2013; Dubin et Patapoutin, 2010; Almeida et al., 2004; Lee et al., 1986, Julius et al, 2001).

### ***1.3.3 Niveau de myélinisation***

Une autre façon simple de classifier les différents types de neurones des afférences primaires est avec la quantité de myéline qui recouvre les axones des différents types de neurones en question. Effectivement, les axones des différents types de neurones sont recouverts de différentes quantités de myéline ce qui permet de les séparer (Quirion et al., 2020; Abaira et Ginty, 2013). Pour ce faire, la microscopie électronique et des études histologiques peuvent être utilisées pour vérifier la présence et la quantité de myéline sur les axones des neurones (Paré et al., 2001; Stacey, 1969). Cela a permis de découvrir trois différentes catégories de myélinisation de neurones : les fibres largement myélinisées, légèrement myélinisées et non

myélinisées. Les fibres A $\beta$  et A $\alpha$  font partie des fibres fortement myélinisées, alors que les fibres A $\delta$  le sont légèrement et que les fibres C ne le sont pas du tout (Julius et Basbaum, 2001; Abaira et Ginty, 2013; Le Pichon et Chesler, 2014; Bear et al., 2016). Un lien direct existe entre le niveau de myéline autour de l'axone d'un neurone et sa vitesse de conduction. En effet, plus la quantité de myéline est grande, plus cela causera une augmentation de la vitesse de conduction (Purves et al., 2001; Kandel et al., 2013; Viventy et Dottori, 2018). La microscopie électronique a aussi été utilisée par le passé pour classifier les neurones des afférences primaires selon la distribution de leurs organelles en plus de leur taille (Rambourg et al., 1983). En effet, six différents types de neurones peuvent être distingués grâce à l'organisation de leurs corps de nissl et appareil de Golgi au niveau de leur soma (Rambourg et al., 1983).

#### ***1.3.4 Marqueurs***

Le travail effectué au cours des dernières années a permis de trouver de nombreux marqueurs cellulaires spécifiques aux différents types de neurones présents dans les afférences primaires. Ces marqueurs peuvent être observés par deux grandes méthodes : par immunofluorescence ou encore en marquant l'ARNm de ces différents marqueurs (Scherrer et al., 2009; Shiers et al., 2020; Quirion et al., soumis 2021, Bardoni et al., 2014; François et Scherrer, 2018, Moy et al., 2020). Les deux types de fibres C possèdent chacun plusieurs marqueurs ce qui permet de bien les distinguer. Les fibres C peptidergiques portent ce nom puisqu'elles contiennent de nombreux peptides dont la substance P et CGRP en plus d'exprimer le récepteur au NGF TrkA qui peuvent facilement être marqués (Zhang et al., 1998; Julius et Basbaum, 2001; Scherrer et al., 2009; Woolf et Ma, 2007; Pierce et al., 2006). Le canal TRPV1 sensible à la capsaïcine y est aussi présent (Scherrer et al., 2009; Le Pichon et Chesler, 2014; Zhang et al., 2013). Les fibres C non peptidergiques ne contiennent pas ces peptides, mais sont connues pour lier la lectine IB4 et exprimer le canal à ATP P2X3 et le récepteur Mrgprd (Julius et Basbaum, 2001; Scherrer et al., 2009; Cavanaugh et al., 2009; Zhang et al., 2013; Woolf et Ma, 2007; Pierce et al., 2006). Pour ce qui est des fibres myélinisées, soit celles de large et de moyen diamètre, le neurofilament de 200 kDa (NF200) qui marque les axones myélinisés est exprimé (Scherrer et al., 2009; Bardoni et al., 2014; Quirion et al., soumis 2021). De plus, le canal TRPV2, y est aussi retrouvé (Scherrer et al.,

2009). Pour ce qui est des fibres A $\alpha$ , les marqueurs TrkC et Runx3 y sont exprimés (Bardoni et al., 2014; Viventi et Dottori, 2018; de Nooij et al., 2013). Des marqueurs existent aussi pour les sous-classes des différentes fibres. Par exemple, les fibres A $\beta$  LTMRs (low-threshold mechanoreceptors) expriment le récepteur à la neurotrophine Ret et TrkC, alors que les fibres A $\delta$  LTMRs expriment TrkB (Bardoni et al., 2014; François et Scherrer, 2018). Ces différents marqueurs sont connus pour être spécifiques aux types de fibres auxquels ils sont associés chez les rongeurs. Par contre, chez les espèces supérieures, comme le singe et l'humain, les choses se compliquent puisque ce n'est plus nécessairement le cas. En effet, le marqueur NF200 utilisé chez les rongeurs pour marquer les fibres myélinisées marque presque tous les neurones chez l'humain (Shiers et al., 2020; Haberberger et al., 2019; Rosotck et al., 2018). De plus, la liaison à IB4, utilisée pour identifier les fibres C non peptidergiques chez les rongeurs ne se fait tout simplement chez l'humain (Davidson et al., 2014). Ce sont donc d'autres marqueurs, comme KCNS1 pour les fibres A $\beta$ , qui doivent être utilisés ce qui cause une hétérogénéité de marqueurs entre les différentes espèces (Shiers et al., 2020). Récemment, des études sur l'expression en ARNm des neurones des afférences primaires permet d'éclaircir les marqueurs présents dans les différents types de neurones au niveau de toutes les espèces ce qui permet de comparer les distinctions translationnelles présentes et éventuellement de trouver de meilleures cibles cliniques (Shiers et al., 2020).

### ***1.3.5 Expression en ARNm***

#### ***1.3.5.1 L'expression génique***

L'expression génique est le processus qui permet l'expression d'un gène codant pour une protéine (Fan et al., 2017). Cette série d'étapes débute au niveau du noyau où la chromatine subit différentes modifications comme l'acétylation des histones ce qui produit un gène prêt à être transcrit (Campbell et Reece, 2012). En effet, l'ADN sera transcrit en ARN prémessager à l'aide de son brin matrice. Pour ce faire, l'ARN polymérase II se lie à son promoteur à l'aide de facteurs de transcriptions : TFIID se lie à la boîte TATA du promoteur ce qui permet la formation du complexe TFIIA, TFIIB avec TFIID ce qui entraîne la liaison de l'ARN polymérase II grâce à TF11F (Campbell et Reece, 2012). L'ajout de TFIIE et TFIIH permet la preinitiation du complexe et l'ATP permet la phosphorylation de la queue de

l'ARN polymérase et l'initiation de la transcription (Macé et al., 2015; Campbell et Reece, 2012). L'ouverture du double brin d'ADN est faite et la synthèse d'ARN commence. Pour terminer la transcription, l'ARN polymérase II clive un point présent de 10 à 35 nucléotides en aval d'un signal de polyadénylation (Campbell et Reece, 2012). L'ARN prémessagé synthétisé subira ensuite plusieurs modifications post-transcriptionnelles pour devenir un ARNm mature. Une coiffe 5' est ajoutée pour permettre la stabilité de l'ARNm et son positionnement sur le ribosome pour l'initiation de la traduction ainsi qu'une queue polyA pour la stabilité de l'ARNm, l'exportation de l'ARNm au cytoplasme et l'initiation de la traduction par le ribosome (Campbell et Reece, 2012). L'épissage termine la maturation de l'ARNm en excisant les introns à l'aide de spliceosome et en liant les exons. Cet ARNm est ensuite transporté au niveau des ribosomes pour permettre la traduction, donc la synthèse de polypeptides (Campbell et Reece, 2012). La traduction comprend quatre grandes étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison (Anisimova et al., 2018). Lors de l'initiation, la petite sous-unité du ribosome associée à l'ARNt d'initiation se lie à la coiffe 5' l'ARNm et avance sur celui-ci jusqu'à l'atteinte du premier codon de départ (AUG) (Merrick et Pavitt, 2018). Cela permet la liaison de l'ARNt à cette séquence ainsi que le recrutement de la grande sous-unité du ribosome (Campbell et Reece, 2012). Pour l'élongation de la chaîne polypeptidique, les acides aminés sont ajoutés un à la fois à l'aide d'un ARN de transfert (ARNt) qui permet de faire l'intermédiaire entre l'acide aminé et l'ARNm grâce à son anticodon (Fan et al., 2017). L'ARNt se lie au niveau du site A du ribosome, puis un aminoacyl-ARNt synthétase permet ensuite de former un lien ester entre l'acide aminé et l'ARNt et donc de terminer l'appariement correct de l'ARNt et de son acide aminé (Fan et al., 2017; Campbell et Reece, 2012). Une liaison peptidique est ensuite formée entre le nouvel acide aminé et la chaîne du polypeptide localisé au site P de l'ARNm ce qui entraîne la le transfert du polypeptide du site P vers le site A (Brar et Weissman, 2015). Par la suite, l'ARNt du site A est transloqué vers le site P alors que celui du site P maintenant vide est transloqué vers le site E et se détache du ribosome (Merrick et Pavitt, 2018). Pour chacun des acides aminés ajoutés, l'hydrolyse de GTP est nécessaire lors de la reconnaissance du codon et de la translocation de l'ARNt (Campbell et Reece, 2012). La terminaison se produit lorsqu'un codon d'arrêt de l'ARNm est rencontré au niveau du site A (Anisimova et al., 2018; Campbell et Reece, 2012). Une réaction d'hydrolyse est donc produite ce qui permet de libérer le

polypeptide (Campbell et Reece, 2012). Celui-ci subira plusieurs modifications post-traductionnelles avant d'être acheminé vers sa cible finale.

#### *1.3.5.2 Utilisation de l'expression en ARNm pour la classification des afférences primaires*

Durant les dernières années, une nouvelle technique, le RNA-seq (RNA sequencing) a été développée et s'est répandue dans de nombreux laboratoires. Cette technique permet de faire la cartographie ainsi que la quantification complète du transcriptome étudié (Wang et al., 2009). Le RNA-seq peut donc être utilisé pour faire le séquençage complet d'échantillons de ganglions de la racine dorsale (DRG) ou de ganglions trijumeaux (TG) ou en se concentrant sur un seul neurone ou une seule population neuronale (Flegel et al., 2015; Ray et al., 2018; Hockley et al., 2019). Cela permet donc de déterminer l'expression de jusqu'à 20 000 gènes par cellule et de les séparer en groupes ayant des caractéristiques communes (Tavares-Ferreira et al., 2022; Usokin et al., 2014). Selon l'étude, plusieurs groupes d'afférences primaires sont identifiés et possèdent des rôles différents. Pour chacun d'entre eux, plusieurs marqueurs sont retrouvés et cette combinaison de marqueurs permet de différencier les types de neurones. La technique d'hybridation *in situ* y est souvent combinée pour valider les résultats obtenus (Tavares-Ferreira et al., 2022; Kupari et al., 2021; Hall et al., 2022; Nguyen et al., 2021). On peut notamment retrouver des groupes classifiés comme des propriocepteurs, les deux types de A $\beta$  LTMRs (celles à adaptation rapide et lente), des A $\delta$  LTMR et HTMR, des fibres C LTMRs et de nombreuses classes de nocicepteurs (Tavares-Ferreira et al., 2022; Kupari et al., 2021; Nguyen et al., 2021; Hockley et al., 2019). Chez l'humain, les propriocepteurs expriment la combinaison PVALB, NTRK3, ASIC1, NTRK2, KCNS1 et Runx3, alors que pour les A $\beta$  LTMRs à adaptation lente et rapide NTRK3 est fortement exprimé tout comme RAMP1 (Tavares-Ferreira et al., 2022; Nguyen et al., 2021; Saito-Diaz et al., 2021; Hall et al., 2022). Les neurones A $\delta$  LTMR sont caractérisés par leur haut niveau d'expression de NTRK2 alors que les A $\beta$  HTMR expriment NTRK1, CPNE6, SCN10A, CALCA et LPAR3 (Tavares-Ferreira et al., 2022). Parmi les nombreux groupes de nocicepteurs, SCN10A, TRPV1, TRPA1, TAC1, CALCA, P2RX3, TRPM8 ont de hauts niveaux d'expression (Flegel et al., 2015; Nguyen et al., 2021; Hall et al., 2022; Saito-Diaz et al., 2021; Tavares-Ferreira et al., 2022, Usokin et al., 2014; Ray et al., 2021; Zeisel et al.,

2018). Évidemment, cette technique peut aussi identifier des cellules non neuronales comme des marqueurs inflammatoires (Tavares-Ferreira et al., 2022; Usoskin et al., 2015).

#### **1.4 Traitement de la douleur**

Plusieurs options de traitement sont présentes sur le marché pour traiter la douleur, que ce soit par des approches pharmacologiques ou non. Du côté des approches non pharmacologiques, l'activité physique, la physiothérapie ou la thérapie cognitivo-comportementale peuvent réduire la douleur et améliorer la qualité de vie des patients (Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2012). Du côté pharmacologique, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et l'acétaminophène sont utilisés pour traiter les douleurs légères. Pour celles modérées à sévères, les anticonvulsivants et les antidépresseurs tricycliques font partie des options disponibles en plus, évidemment, des opioïdes qui sont encore largement utilisés (Lynch et Watson, 2006; Hylands-Withe et al., 2016; Pak et al., 2018).

#### **1.5 Les récepteurs opioïdes**

Il existe trois différents récepteurs opioïdes : le mu (MOP), le delta (DOP) et le kappa (KOP). Ces récepteurs sont tous des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de la classe A, soit celle à la rhodopsine. Ce sont donc des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, comprenant 3 boucles intracellulaires et 3 segments extracellulaires, un domaine extracellulaire N terminal et une queue C-terminale au niveau cytosolique, qui sont couplés aux protéines  $G_i/G_o$  (Kooistra et al., 2021). Les récepteurs opioïdes ont entre 55% et 63% d'homologie entre leurs séquences en acides aminés (Degrandmaison et al., 2021). Lors de l'activation d'un de ces récepteurs par un ligand endogène ou un agoniste, une inhibition de l'adénylate cyclase (AC) se produit, ce qui entraîne une diminution de la production d'AMP cyclique. Une hyperpolarisation membranaire est causée par l'ouverture de canaux potassiques et la fermeture de canaux calciques dépendants du voltage. Cela cause une diminution de la relâche de neurotransmetteurs, une diminution de l'excitabilité neuronale et donc une diminution de la transmission nerveuse (Law et al., 2000; Al-Hasani et Bruchas,

2011). Au final, l'activation des récepteurs aux opioïdes permet de réduire la transmission des signaux nociceptifs et, par le fait même, entraîner de l'analgésie.

### ***1.5.1 Le récepteur opioïde mu***

Les opioïdes présentement sur le marché, comme la morphine, la codéine ou encore le fentanyl sont des agonistes du récepteur mu opioïde (Quirion et al, 2020). Ce récepteur est grandement localisé au niveau du système nerveux central, ce qui a, entre autres, été montré à l'aide d'une souris MOP-mCherry où un signal intense était présent au niveau du putamen, du noyau olfactif antérieur, du noyau parabrachial, de la substance grise périaqueducatale (PAG) et de l'amygdale (Erbs et al., 2015). La distribution du MOP dans les voies de la douleur permet d'expliquer pourquoi l'activation de ce récepteur induit de l'analgésie. Par contre, son activation produit aussi une panoplie d'effets indésirables. Nous pouvons notamment compter, la constipation, la nausée, la dépression respiratoire, la tolérance et la dépendance. Des effets euphorisants sont produits par les agonistes du MOP, ce qui cause l'utilisation de ces drogues de façon récréative (Al-Hasani et Bruchas, 2011; Khademi et al., 2016; Morgan et Christie, 2011). Dû à la tolérance engendrée par ces molécules, les patients doivent malheureusement augmenter leur dose de médicament pour maintenir un même effet, ce qui augmente le risque d'effets gastro-intestinaux (nausée, constipation) et de dépendance. Tous ces facteurs sont des éléments déclencheurs à la crise des opioïdes que nous vivons depuis déjà plusieurs années qui est caractérisée par une augmentation des décès par surdoses d'opioïdes notamment à cause des détresses respiratoires. En effet, seulement entre janvier et juin 2022, plus de 3500 décès par intoxication ont eu lieu au Canada, ce qui représente environ 20 décès et 14 hospitalisations par jour (Gouvernement du Canada, 2022). Ces risques en plus de la diminution d'efficacité de ces analgésiques dans le temps illustrent bien l'intérêt de la recherche d'une nouvelle cible thérapeutique (Ballantyne et Shin, 2008).

### ***1.5.2 Le récepteur opioïde kappa***

Le récepteur opioïde kappa est aussi un récepteur qui peut apporter de l'analgésie lorsqu'il est activé en inhibant la neurotransmission excitatrice au niveau des laminae I et II de la moelle épinière et du tronc cérébral (Paton et al., 2020; Snyder et al., 2018). Il est aussi à

noter qu'environ le 2/3 des neurones KOP positif sont des neurones nociceptifs au niveau des afférences primaires (Snyder et al., 2018; Rau et al., 2005). Par contre, cette analgésie vient aussi avec un lot d'effets secondaires. Effectivement, l'activation du KOP entraîne entre autres des effets dysphoriques, du stress, de l'anxiété, de l'aversion, une augmentation de prise de drogues et de psychotomimétiques (Land et al., 2009; Clark et Abi-Dargham, 2019; Snyder et al., 2018; Degrandmaison et al., 2022). Évidemment, cela limite le développement et l'utilisation d'agonistes de ce récepteur pour le traitement de la douleur. D'un autre côté, de nombreux antagonistes du KOP sont développés pour le traitement de pathologies comme la dépression majeure, la schizophrénie ou la dépendance (Reed et al., 2018; Jacobson et al., 2020).

### ***1.5.3 Le récepteur opioïde delta***

Tout comme les deux récepteurs présentés précédemment, le DOP a aussi un fort potentiel analgésique, et ce, dans une condition aiguë (thermique, mécanique, chimique) et chronique (inflammatoire, cancéreuse, neuropathique et migraineuse) (Berthiaume et al., 2020; Normandin et al., 2013; Beaudry et al., 2011). L'activation de ce récepteur provoque aussi des effets antidépresseur, anxiolytique et de cardio/neuroprotection qui sont très intéressants pour aider avec l'aspect désagréable et émotionnel de la douleur en plus de traiter la douleur physique en elle-même (Gendron et al., 2015; Gallantine et Meert, 2005). Par contre, des risques de convulsion sont présents, principalement avec l'utilisation de hautes doses d'agonistes non peptidiques comme le SNC80 (Blaine et al., 2022). En effet, le DOP est grandement localisé au niveau de neurones GABAergique du proencéphale et son activité inhibitrice sur ces neurones induit une augmentation locale de l'excitabilité neuronale qui cause les convulsions (Chu Sin Chung et al., 2015). De plus, le recrutement des  $\beta$ -arrestines semble augmenter les activités convulsives, ce qui pousse vers le développement d'agonistes biaisés qui signalent principalement via la voie des protéines G plutôt que les  $\beta$ -arrestines et qui limite l'activité convulsive (Blaine et al., 2022). La plus grande problématique du DOP est sa localisation intracellulaire en condition basale qui limite son efficacité analgésique comparativement à celle du MOP. Contrairement aux autres GPCR comme le MOP, le DOP est majoritairement situé au niveau intracellulaire (appareil de Golgi, vésicules présynaptiques) et très peu à la membrane plasmique (Cahill et al., 2001; Gendron et al.,

2015). Dans certaines conditions, le DOP peut tout de même être exprimé à la membrane plasmique. En effet, lors d'un traitement chronique de 48 heures à la morphine, la densité de DOP à la membrane plasmique est augmentée dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière et dans les DRG (Cahill et al., 2001; Gendron et al., 2006). Lors d'une douleur inflammatoire chronique (72 heures) causée par l'adjuvant complet de Freund (CFA), d'une douleur inflammatoire aiguë (injection de capsaïcine), ou d'une douleur neuropathique, une augmentation du DOP à la membrane plasmique est aussi observée dans les DRG (Gendron et al., 2006; Gendron et al., 2015; Cahill et al., 2007). Dans toutes ces conditions, une analgésie plus grande était aussi présente en comparant à une condition basale avec l'utilisation d'agonistes DOP. Malheureusement, un mystère persiste quant aux mécanismes moléculaires et cellulaires favorisant l'adressage de DOP à la membrane des neurones.

#### ***1.5.4 Interaction entre le DOP et le MOP***

De nombreuses études montrent que les récepteurs DOP et MOP s'influencent l'un et l'autre. En effet, comme dit précédemment, l'activation de façon chronique du MOP augmente le nombre de DOP à la membrane plasmique, et donc permet l'augmentation de son efficacité analgésique (Gendron et al., 2015; Gendron et al., 2007; Gendron et al., 2006; Morinville et al., 2003). Le MOP est bel et bien important dans cette interaction, car dans des souris MOP-KO, cette augmentation du DOP à la membrane est perdue (Gendron et al., 2007; Morinville et al., 2004b; Morinville et al., 2003). De l'autre côté, les agonistes MOP ont des effets analgésiques plus grands lorsque le DOP est bloqué en plus d'avoir un développement de tolérance moins grand (Guan et al., 2005; Zhu et al., 1999; Chefer et Shippenberg, 2009; Gomes et al., 2004). Malheureusement, les mécanismes expliquant ces phénomènes sont encore méconnus à ce jour. Une autre chose intéressante à propos de ces récepteurs est qu'une hétéromérisation existe entre eux. Effectivement, il est connu qu'ils interagissent lorsqu'ils sont surexprimés dans les mêmes cellules et qu'ils sont présents dans le système nerveux central et périphérique (Gomes et al., 2000; Gendron et al., 2015; Gupta et al., 2010; Gendron et al., 2016; Yekkirala et al., 2012). Cela a pu être montré grâce à plusieurs techniques comme les co-immunoprécipitations, le BRET, ainsi que des souris transgéniques exprimant les récepteurs couplés à des protéines fluorescentes (Erbs et al., 2015; Gomes et al., 2000;

Gendron et al., 2016; Derouiche et al., 2020; Gomes et al., 2004). Cet hétéromère peut être activé par le SNC80, un agoniste du DOP, et produire des effets antinociceptifs (Metcalf et al., 2012). De plus, un nouvel agoniste biaisé, le CYM51010 a été montré comme spécifique à l'hétéromère DOP-MOP et produit des effets antinociceptifs avec moins de tolérance que la morphine lors d'une administration chronique (Gomes et al., 2013; Tiwari et al., 2020). La chaperonne RTP4 est aussi connue pour augmenter le nombre d'hétéromères DOP-MOP à la membrane plasmique en le protégeant de l'ubiquitination et de la dégradation (Degrandmaison et al., 2021; Fujita, 2020). Cet hétéromère est donc une cible fonctionnelle unique pour le développement d'agonistes opioïdes dans le traitement de la douleur (Gendron et al., 2015; Gupta et al., 2010; Fujita, 2020; Constantino et al., 2012; Fujita et al., 2014).

## **1.6 Distribution du récepteur opioïde delta**

### ***1.6.1 Distribution dans le cerveau***

Le récepteur opioïde delta est présent au niveau du cerveau, et ce, principalement au niveau frontal. En effet, le cortex cérébral, le bulbe olfactif, l'amygdale et le striatum sont riches en DOP (Degrandmaison et al., 2020; Pradhan et al., 2005; Mansour et al., 1988; Cahill et al., 2001; Slowe et al., 1999; Sharif et al., 1989; Mansour et al., 1987; Tempel et Zukin, 1987; Peng et al., 2012; Mansour et al., 1993). En utilisant une souris, DOR-eGFP et MOR-mCherry, il a été observé que le DOP est présent au niveau de la substance grise périaqueducatale (PAG), le thalamus, le noyau ventro-médian (RVM), l'hypothalamus et le noyau accumbens, des structures importantes dans les voies ascendantes et descendantes de la douleur ou liées aux émotions (Erbs et al., 2015; Scherrer et al., 2006). En condition basale, la coexpression entre le DOP et le MOP dans ce modèle était surtout limitée à l'hippocampe, à l'hypothalamus, au noyau parabrachial latéral et au noyau vestibulaire. Il est aussi important de mentionner que la distribution dans le cerveau de rongeur est très similaire à celle présente dans le cerveau de primate (Simonin et al., 1994; Mansour et al., 1988).

### ***1.6.2 Distribution dans la moelle épinière***

Le DOP est principalement localisé au niveau des laminae I et II de la moelle épinière, mais aussi un peu dans les laminae V et X. Cela a pu entre autres être observé grâce à

l'électrophysiologie, des essais de GTPyS et de liaison (Cahill et al., 2001; Pradhan et al., 2004; Cheng et al., 1995; Bardoni et al., 2014; Wang et al., 2018). En utilisant la souris DOR-eGFP et des immunofluorescences, il a été observé que le DOP coexprime beaucoup avec le marqueur des interneurons excitateurs PKC $\gamma$  et TLX3, localisé au niveau de la partie interne de la lamina II (Scherrer et al., 2009; Peirs et al., 2020; Wang et al., 2018). De façon intéressante, 85% des neurones DOP positifs coexprimaient aussi avec VGlut2, alors que très peu coexprimaient avec VGAT et PAX2, deux marqueurs des neurones inhibiteurs (Wang et al., 2018; Peirs et al., 2020). Contrairement à la distribution du DOP dans le cerveau, celle au niveau de la moelle épinière varie entre les espèces. Effectivement, chez les rongeurs, la liaison de la deltorphine II radiomarquée à l'iode 125 montre que le DOP est présent dans toutes les laminae (Mennicken et al., 2003). Cette même technique montre que chez le singe, le DOP est principalement localisé au niveau des laminae I et II, tout en marquant légèrement les autres laminae (Mennicken et al., 2003). Du côté humain, le DOP semble encore plus restreint au niveau des laminae superficielles, surtout la deuxième (Mennicken et al., 2003). Pour ce qui est de l'ARNm du DOP, il est absent dans la moelle épinière humaine alors qu'il est bien présent chez les autres espèces. Cela suggère que le récepteur est synthétisé au niveau des afférences primaires, puis transporté aux laminae superficielles de la moelle épinière. Ainsi, dans la moelle épinière chez l'humain, la majorité du DOP serait localisé au niveau des terminaisons des afférences primaires (Mennicken et al., 2003). Cette idée est aussi renforcée par le fait que lorsqu'une rhizotomie est effectuée chez les rongeurs, la quantité de DOP présente à la moelle épinière est drastiquement réduite, ce qui démontre le transport antérograde du DOP synthétisé des afférences primaires vers la moelle épinière (Dado et al., 1993; Abbadie et al., 2002). C'est environ le 2/3 du DOP qui est localisé au niveau présynaptique (au niveau des afférences primaires), alors qu'il est aussi détecté au niveau postsynaptique dans la corne dorsale de la moelle épinière (Abbadie et al., 2002; Morinville et al., 2003). Puisque l'ARNm du DOP est absent de la moelle épinière humaine et que la protéine est exprimée uniquement au niveau des laminae I et II, nous croyons que le DOP aurait un effet analgésique grâce à l'inhibition de la relâche de neurotransmetteurs excitateurs par les afférences primaires.

### ***1.6.3 Distribution dans les afférences primaires***

#### *1.6.3.1 Les ganglions de la racine dorsale*

La distribution du DOP au niveau des DRG est, encore à ce jour, un sujet très controversé. En effet, deux grandes écoles de pensées existent quant à la distribution chez les rongeurs, alors que les études chez les primates demeurent peu nombreuses.

Dans la première idéologie, le DOP est seulement exprimé dans les fibres de large diamètre myélinisées et dans les fibres de petit diamètre non peptidergiques. Contrairement au MOP, il ne serait pas exprimé dans les fibres de petit diamètre peptidergiques. Puisque selon cette école de pensées le DOP et le MOP sont distribués de façon différente, leur coexpression n'est pas possible dans les neurones de DRG (Scherrer et al., 2009; Bardoni et al., 2014). Ces observations reposent notamment sur des études réalisées avec un modèle de souris DOR-eGFP où le DOP dans la souris était lié à une étiquette GFP. Cela leur a permis d'observer que le DOR-eGFP avait un très haut niveau de coexpression avec le neurofillament 200 (NF200, 61%) et le *transient receptor potential vanilloid 2* (TRPV2, 65%) qui sont tous deux des marqueurs des fibres myélinisées ( $A\alpha$ ,  $A\beta$  et  $A\delta$ ) (Scherrer et al., 2009). Une étude de séquençage d'ARN dans les neurones sensoriels de souris a obtenu des résultats très similaires dans lesquels le DOP était localisé uniquement dans des neurones LTMR exprimant NF200 (Usokin et al., 2015; Zheng et al., 2019). Par contre, il est important de mentionner que ces études de RNA-seq souffrent possiblement d'un problème de détection du DOP, puisque son ARNm est retrouvé dans très peu de neurones comparativement à ce qui est observé dans les études d'hybridation *in situ* et lors d'essai de liaisons. Les neurones DOR-eGFP expriment aussi les marqueurs des LTMRs Ret et le récepteur kinase C de la tropomyosine (TrkC) (François et Scherrer, 2018). De plus, une bonne quantité des neurones DOR-eGFP étaient localisés dans des fibres C non peptidergiques (39% coexprimaient IB4 et une portion coexprime avec MrgprD) (Scherrer et al., 2009; Bardoni et al., 2014; François et Scherrer, 2018). Au contraire, il n'y avait pas de coexpression entre le DOR-eGFP et les fibres C peptidergiques (Substance P (SP) et TRPV1) (Scherrer et al., 2009; François et Scherrer, 2018). En combinant cette souris avec l'utilisation d'immunofluorescence contre le MOP, les auteurs ont observé moins de 5% de coexpression entre les deux récepteurs (Scherrer et al., 2009). En effectuant des tests comportementaux chez ces souris,

l'administration de DAMGO (un agoniste du MOP) diminuait la douleur thermique de façon dose-dépendante sans avoir d'effet sur la douleur mécanique. À l'inverse, le SNC80 (agoniste du DOP) permettait de diminuer les douleurs mécaniques, mais non celles d'origine thermique. Cela a été confirmé par une autre étude où lorsque le DOP est supprimé (KO) chez la souris, les animaux ont un seuil de nociception mécanique augmenté, alors que lorsque le MOP est supprimé, c'est plutôt la nociception thermique qui est affectée (Martinez-Navarro et al., 2020).

Dans la seconde vision des choses, le DOP est présent dans tous les types de fibres (myélinisées ( $A\alpha$ ,  $A\beta$  et  $A\delta$ ), C non peptidergiques et C peptidergiques) et un certain niveau de coexpression existe entre le DOP et le MOP (Rau et al., 2005; Ji et al., 1995; Wang et al., 2010; Mennicken et al., 2003; Moy et al., 2020; Wang et Wessendorf, 2001; Quirion et al., 2022). En effet, de nombreuses équipes ont pu le montrer à l'aide de différentes méthodes. Premièrement, une équipe a montré à l'aide de RT-PCR sur cellules uniques de DRG de souris que le DOP était présent dans tous les types de neurones (large diamètre et petit diamètre) avec la plus petite proportion dans les neurones de petit diamètre n'exprimant pas IB4, alors qu'une autre équipe n'a pas observé de différence dans la distribution de récepteurs entre les neurones de petit et de large diamètre (Wang et al., 2010; Wang et Wessendorf, 2001). En combinant l'hybridation *in situ* à l'immunofluorescence, ils ont observé que le 1/3 des neurones DOP positifs coexprimaient la SP ou le CGRP, deux marqueurs des fibres C peptidergiques (Wang et al., 2010; Zhang et al., 1998; Guan et al., 2005; Dado et al., 1993). Cette coexpression a aussi été constatée par double hybridation *in situ* (Minami et al., 1995). Par PCR, les neurones DOP-MOP positifs sont considérablement coexprimés avec la préprotachykinine-A (PPT-A), un marqueur des fibres C peptidergiques (Wang et al., 2010). Une étude combinant l'immunofluorescence et le patch-clamp a observé des résultats très similaires, dans lesquels le DOP et le MOP étaient coexprimés dans les neurones nocicepteurs de fibres C (Rau et al., 2005). Plus récemment, nous avons étudié la distribution du DOP et du MOP dans les DRG de rat et de souris à l'aide de l'hybridation *in situ* avec la technologie RNAscope en combinant avec l'immunofluorescence. Nous avons observé que le DOP, le MOP et la coexpression entre les deux récepteurs étaient présents dans tous les types de neurones (NF200 positifs pour les neurones myélinisés, TAC1 positifs pour les

fibres C peptidergiques et IB4/P2RX3 positifs pour les fibres C non peptidergiques). Chez le rat, les neurones positifs pour l'ARNm du DOP étaient principalement NF200 positifs, alors que les neurones MOP-positifs étaient également positifs pour IB4 et TAC1 et que les neurones positifs pour la coexpression entre les deux récepteurs étaient aussi principalement NF200 positifs (Quirion et al., 2022; Mennicken et al., 2003). Chez la souris, les neurones DOP positifs étaient majoritairement P2RX3 positifs, alors que les MOP positifs étaient plus TAC1 positifs et que les neurones coexprimant l'ARNm du DOP et du MOP étaient NF200 positifs en majorité (Quirion et al., 2022). Puisque les deux récepteurs sont présents dans tous les types de neurones, ils pourraient inhiber tous les types de douleur. L'administration de deltorphine II (agoniste DOP) ou de DAMGO diminue significativement la douleur chimique causée par de la formaline ou de la capsaïcine ce qui est partiellement renversé lors de l'administration d'un antagoniste de ces récepteurs (Naltrindole et CTOP respectivement) (Beaudry et al., 2011). Par électrophysiologie, l'administration de deltorphine II ou de DAMGO a permis de diminuer l'action des CIDN en condition de douleur thermique et mécanique (Normandin et al., 2013). De plus, l'administration de ces deux drogues dans ces mêmes conditions de douleur permet une diminution de l'internalisation du récepteur NK1 (internalisation induite par la libération de SP par les afférences primaires) (Normandin et al., 2013). Pour terminer, lorsque le DOP est exprimé exclusivement au niveau des afférences primaires grâce à l'injection d'un virus AAV2/9-CBA-cre dans des souris KO, de l'analgésie est aussi présente lors de l'administration de deltorphine II dans un modèle d'inflammation chronique (Degrandmaison et al., 2021). Les récepteurs DOP et MOP peuvent donc inhiber tous les types de douleurs dû à leur localisation dans tous les types d'afférences primaires.

Chez les espèces supérieures, très peu d'études ont été menées à ce jour. Une première étude a fait la comparaison de la distribution du DOP dans les DRG de souris, de rat, de singe et d'humain à l'aide de l'hybridation *in situ*. Comme énoncé précédemment, chez les rongeurs le DOP était présent dans tous les types de neurones, mais principalement dans ceux de large diamètre (Mennicken et al., 2003). Chez le singe, le marquage DOP était encore une fois présent dans les neurones de tous les calibres, mais avec une préférence dans ceux de moyens diamètres, alors que chez l'humain le signal DOP était présent avec une même intensité dans tous les neurones (Mennicken et al., 2003). En regardant le pourcentage de neurones DOP

positifs dans toutes ces espèces, les auteurs ont observé qu'une augmentation significative du nombre de neurones DOP positifs était présente entre les DRG de rat vs singe et humain (30,2% rat, 79,8% singe et 64,6% humain). Puisque le DOP est présent dans des neurones nociceptifs (moyen et petit diamètre) en plus d'être présent en plus grande quantité chez les espèces supérieures, les auteurs croient que le DOP a une spécialisation dans le traitement de l'information nociceptive chez les primates (Mennicken et al., 2003). Une autre étude a utilisé l'immunohistochimie pour marquer le DOP dans les DRG de singe (Zhang et al., 1998). Les auteurs ont observé peu de marquage du DOP dans les DRG de singe. Par contre, ceux qui l'étaient avaient un petit diamètre (Zhang et al., 1998). Plusieurs études ont observé la présence de l'ARNm du DOP dans les DRG humain grâce au RT-PCR ou au RNA-seq et ce sans évaluer la distribution précise du récepteur dans les types de neurones des DRG (Xie et al., 1999; Peng et al., 2012; Flegel et al., 2015). Plus récemment, il a été observé que des récepteurs aux opioïdes fonctionnels étaient présents dans les DRG humains. En utilisant l'imagerie calcique, ils ont observé que 48% et 45% des neurones de DRG humains répondaient au SNC80 et au DADLE (deux agonistes DOP) (Moy et al., 2020). La majorité de ces neurones DOP positifs répondaient aussi au DAMGO (agoniste MOP) et à la capsaïcine (lie le récepteur TRPV1 présent dans les fibres C peptidergiques, 54% des neurones sont positifs pour TRPV1), ce qui indique qu'une bonne proportion des neurones DOP coexpriment avec le MOP et sont présents dans les fibres C peptidergiques (Moy et al., 2020). Au niveau de l'ARNm, seulement 4,5% des neurones étaient positifs pour le DOP, alors que 96,5% l'étaient pour TRPV1, ce qui démontre que l'utilisation de techniques différentes peut mener à des résultats très variables (Moy et al., 2020). Par RNA-seq, le DOP est retrouvé dans des groupes de neurones C-LTMRs, des récepteurs pruritogènes et légèrement dans les nocicepteurs A $\beta$  (Tavares-Ferreira et al., 2022; Flegel et al., 2015). Pour terminer, il a été montré que le DADLE permet de procurer de l'analgésie lorsqu'administré de façon intrathécale chez l'humain et ce, lorsque ceux-ci sont tolérants à la morphine et en condition de douleur cancéreuse chronique (Krames et al., 1986; Moulin et al., 1985; Onofrio et Yaksh, 1983).

### 1.6.3.2 Les ganglions trijumeaux

L'étude de la distribution du DOP au niveau des ganglions trijumeaux (TG) est beaucoup moins poussée comparativement à celle des DRG. Par hybridation *in situ*, l'ARNm du DOP a pu être observé dans les TG de rat et d'humain. Chez le rat, les neurones positifs étaient principalement de large diamètre alors que chez l'humain, il n'y avait pas de préférence pour un type cellulaire (Mennicken et al., 2003). En utilisant une souris DOR-eGFP combinée à de l'immunofluorescence, 40% des neurones DOP positifs coexpriment avec CGRP, un marqueur des fibres C peptidergiques alors que 3,7% des neurones totaux des TG coexprimaient DOP et CGRP. DOR-eGFP était principalement localisé dans des neurones de moyen à large diamètre, myélinisés, NF200 positifs (Moye et al., 2021). De plus, le DOP coexprime beaucoup avec RAMPI (le récepteur au CGRP) dans les TG de souris (Moye et al., 2021). Des résultats similaires ont aussi été observés dans des TG de rat (Rice et al., 2016; Ichikawa et al., 2005). Cette distribution dans les fibres nociceptives est appuyée par les agonistes DOP qui sont efficaces dans le traitement de modèle de douleur migraineuse aiguë et chronique (Bertels et al., 2022; Bertels et al., 2021; Moye et al., 2021; Dripps et al., 2020).

## 1.7 But, hypothèses et objectifs de recherche

Le but de ma maîtrise était d'étudier la distribution des récepteurs opioïdes delta et mu au niveau des afférences primaires de différentes espèces animales pour permettre d'obtenir une meilleure idée du potentiel analgésique des agonistes ciblant le DOP. Nous croyons que le DOP possède un rôle au niveau des afférences primaires pour plusieurs raisons. En effet, l'ARNm du DOP est absent de la moelle épinière humaine alors que le récepteur y est présent au niveau des laminae superficielles, ce qui suggère que son ARNm est plutôt exprimé au niveau des afférences primaires (Mennicken et al., 2003). Ensuite, nous avons récemment montré au laboratoire que l'expression du DOP uniquement au niveau des afférences primaires à l'aide d'un virus AAV dans des souris n'exprimant pas le DOP permettait d'induire de l'analgésie lors d'inflammation chronique (Degrandmaison et al., 2020). Un autre groupe a montré que lorsque le DOP est retiré des afférences primaires, il n'y a pas d'analgésie produite par l'injection intrapéritonéale de SNC80 (un agoniste DOP) lors de douleur mécanique dans des modèles de douleurs chroniques inflammatoire chronique et de

douleur neuropathique (Gaveriaux-Ruff et al., 2011). Le laboratoire a aussi montré par hybridation *in situ* avec la technologie RNAscope que l'ARNm du DOP est présent dans tous les types de neurones des afférences primaires, dont les nocicepteurs chez le rat et chez la souris (Quirion et al., 2022). Pour terminer, l'ARNm du DOP a aussi été détecté par RNA-seq dans les nocicepteurs présents dans les afférences primaires de primates et le DOP fonctionnel est présent dans les DRG humains (Tavares-Ferreira et al., 2022; Moy et al., 2020). Toutes ces informations semblent indiquer que le DOP détient un rôle dans l'analgésie procurée par les agonistes DOP grâce à son expression dans les afférences primaires. Cela mène donc à mon projet de maîtrise qui visait à analyser la distribution du DOP et du MOP dans les différents types de neurones des afférences primaires pour mieux comprendre le potentiel analgésique des agonistes DOP.

Deux grands objectifs composaient mon projet de recherche : le premier était d'étudier la distribution des récepteurs DOP et MOP au niveau des ganglions de la racine dorsale chez le singe et chez l'humain. Cela permettrait ensuite la comparaison avec les résultats obtenus récemment chez les rongeurs au laboratoire (Quirion et al., 2022). Le deuxième but était d'étudier la distribution des deux récepteurs dans les ganglions trijumeaux de rat et de souris pour, ensuite, identifier les différences présentes entre la distribution dans les différents types d'afférences primaires (entre les DRG et les TG). Dans ces deux cas, nous voulions aussi étudier la distribution de la coexpression entre les deux récepteurs pour voir si une hétérodimérisation au niveau des neurones des afférences primaires était possible. Ces deux objectifs ont pour but d'identifier le rôle des récepteurs dans le contrôle de la douleur et de mieux comprendre les différences interspèces/tissus observées quant à la réponse analgésique aux différents agonistes ciblant ces récepteurs. Pour ce faire, nous utiliserons une nouvelle technique grandement spécifique d'hybridation *in situ*, le RNAscope, pour marquer l'ARNm des récepteurs. Nous émettons comme hypothèse que les deux récepteurs seront localisés au niveau des neurones nociceptifs dans les DRG et le TG ce qui permet de moduler de l'analgésie. Nous croyons aussi que de la coexpression entre le DOP et le MOP se produira dans ces mêmes neurones.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Animaux

#### 2.1.1 Singes

Toutes les expériences ont été faites sur des tissus de singes *Cynomolgus* mâles âgés entre 4 et 5 ans. Les tissus (DRG) ont été obtenus du Laboratoire Charles River (Sherbrooke, Québec, Canada). Nous ne savons pas quels types d'expériences ont été effectués sur ces animaux avant leur décès.

#### 2.1.2 Humains

Les tissus humains ont été obtenus à partir de la banque de l'Université McGill. Les tissus ont été prélevés de quatre donneurs qui sont décrits dans le tableau 1. Les travaux ont été approuvés par le comité d'éthique de la recherche du CIUSSS de l'Estrie-CHUS (projet #2022-3999 – DRG et récepteurs opioïdes).

**Tableau 2 : Informations sur les donneurs humains**

Sexe	Âge	Cause du décès
Homme	41 ans	Hémorragie cérébrale
Femme	78 ans	Hémorragie subarachnoïde
Homme	63 ans	Inconnu
Inconnu	Inconnu	Inconnu

#### 2.1.3 Rats

Toutes les expériences ont été effectuées sur des rats mâles adultes Sprague-Dawley (poids entre 200-220g) obtenus des laboratoires Charles River (Québec, Canada). Les animaux étaient maintenus dans une salle ayant un cycle lumière-noirceur 12h/12h où ils avaient constamment accès à de la nourriture. Toutes les expérimentations effectuées sur les animaux ont été préalablement approuvées par le comité d'éthique de l'Université de Sherbrooke

(protocole 2018-2046) et respectent les politiques et les lignes directrices du conseil canadien de protection des animaux (CCPA).

#### ***2.1.4 Souris***

Toutes les expériences ont été effectuées sur des souris mâles et femelles adultes C57Bl6 (poids entre 20g et 30g) obtenus des laboratoires Charles River (Québec, Canada). Les animaux étaient maintenus dans une salle ayant un cycle lumière-noirceur 12h/12h où ils avaient constamment accès à de la nourriture. Toutes les expérimentations effectuées sur les animaux ont été préalablement approuvées par le comité d'éthique de l'Université de Sherbrooke (protocole 2018-2046) et respectent les politiques et les lignes directrices du conseil canadien de protection des animaux (CCPA).

## **2.2 Collecte de tissus**

### ***2.2.1 Singes***

Suite au décès, les DRG lombaires (L3 à L5) étaient prélevés puis gelés immédiatement sur glace sèche. Les tissus étaient ensuite recouverts avec le Tissue-Trek Optimal cutting temperature compound (OCT) puis rangés à -80 °C jusqu'à leur coupe. Le transport des DRG prédisséqués du Laboratoire Charles River jusqu'au nôtre s'est effectué sur glace sèche. Des coupes de 15 µm étaient faites au cryostat (Leica CM1860, Leica Biosystems Inc., Concord, ON, CAN), puis montées sur des lames SuperFrost plus. Les sections de tissus sur chaque lame étaient coupées avec environ 105 µm d'écart pour éviter de compter une même cellule à plus d'une reprise. Une fois les coupes terminées, les lames étaient rangées à -80°C jusqu'à ce que l'essai de RNAscope soit effectué.

### ***2.2.2 Humains***

Le prélèvement des DRG humains (L4-L5) était effectué entre 60 et 120 minutes après le serrage transversal de l'aorte des patients. Suite à la récolte, les tissus étaient gelés immédiatement sur glace sèche, puis recouverts avec de l'OCT puis rangés à -80 °C jusqu'à leur coupe. Le transport des DRG prédisséqués de l'Université McGill jusqu'au laboratoire

s'est effectué sur glace sèche. Des coupes de 15 à 20  $\mu\text{m}$  étaient faites au cryostat, puis montées sur des lames SuperFrost plus. Les sections de tissus sur chaque lame étaient coupées avec environ 105-140  $\mu\text{m}$  d'écart pour éviter de compter une même cellule à plus d'une reprise. Une fois les coupes terminées, les lames étaient rangées à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à ce que l'essai de RNAscope soit effectué.

### **2.2.3 Rongeurs**

Les animaux (rats et souris) étaient anesthésiés avec de l'isoflurane puis euthanasiés par décapitation. Les deux ganglions trijumeaux des animaux étaient récoltés (suite à la décapitation, le cerveau est retiré du crâne ce qui expose les deux ganglions trijumeaux et permet de les disséquer) puis gelés immédiatement sur glace sèche. Ils étaient ensuite couverts avec de l'OCT et rangés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur coupe. Des coupes de 15  $\mu\text{m}$  étaient faites au cryostat puis montées sur des lames SuperFrost plus. Les sections de tissus sur chaque lame étaient coupées avec environ 105  $\mu\text{m}$  d'écart pour éviter de compter une même cellule à plus d'une reprise. Une fois les coupes terminées, les lames étaient rangées à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à ce que l'essai de RNAscope soit effectué.

### **2.3 Hybridation *in situ* : RNAscope<sup>TM</sup>**

L'hybridation *in situ* à l'aide de la technologie RNAscope a été utilisée pour marquer l'ARNm des récepteurs delta et mu opioïde, les fibres de petit diamètre peptidergiques (TAC1) et non peptidergiques (P2RX3), les nocicepteurs (SNC10A), les propriocepteurs (PVALB) et les mécanorécepteurs (NTRK3). Le tableau 2, contient toutes les sondes utilisées pour procéder à l'hybridation *in situ*. Pour toutes les espèces, la version 1 du RNAscope a été utilisée en suivant les grandes lignes des instructions données par Advance Cell Diagnostics (ACDbio).

**Tableau 3 : Sondes de RNAscope utilisées**

<b>Sondes</b>	<b>Souris</b>	<b>Rat</b>	<b>Singe</b>	<b>Humain</b>
<b>DOP</b>	Mm-Oprd1 (#427371)	Rn-Oprd1 (#457011) Rn-Oprd1- C3 (#45011-C3)	Mmu-Oprd1 (#549281)	Hs-Oprd1 (#536061)
<b>MOP</b>	Mm-Oprm1-C2 (#315841-C2)	Rn-Oprm1-C2 (#410691-C2)	Mmu-Oprm1-C2 (#518941-C2)	Hs-Oprm1-C2 (#410681-C2)
<b>TAC1</b>	Mm-Tac1-C3 (#410351-C3)	Rn-Tac1-C3 (#450661-C3)	Mmu-TAC1-C3 (#837891-C3)	Hs-TAC1-C3 (#310711-C3)
<b>P2RX3</b>	Mm-P2rx3-C3 (#521611-C3)		Hs-P2RX3-C3/C2 (#406301-C3/C2)	Hs-P2RX3-C3 (#406301-C3)
<b>NTRK3</b>				Hs-NTRK3-C3 (#406341-C3)
<b>SCN10A</b>				Hs-SCN10A-C3 (#406291-C3)
<b>PVALB</b>				Hs-PVALB-C3 (#422181-C3)

### ***2.3.1 Introduction sur la technique RNAscope***

Le RNAscope est une nouvelle technologie permettant de faire de l'hybridation *in situ*. La technique est composée de trois étapes majeures : la perméabilisation, l'hybridation et l'amplification. Lors de la perméabilisation, les tissus sont post-fixés dans le paraformaldéhyde, puis déshydratés dans différents bains d'éthanol à concentration croissante. Par la suite, une protéase est ajoutée sur les tissus pour permettre son ouverture et éventuellement l'entrée de la sonde à ARNm. Suite à cette étape, l'hybridation commence. Une sonde en forme de double Z pour un ARNm précis est ajoutée au tissu qui ira s'hybrider à l'ARNm en question (base de 18 à 25 bases qui est complémentaire à l'ARN ciblé) (ACDBio, s.d.). Par la suite, différentes solutions d'amplification sont ajoutées au tissu pour permettre au signal de la sonde d'être amplifiée d'amplification en amplification. La première

amplification, la préamplification, s'hybride à la séquence de 28 bases formée par la sonde en forme de double Z (ACDBio, s.d.). La dernière solution d'amplification est couplée à un fluorophore ce qui permet de visualiser le signal en microscopie épifluorescence, d'imager et ensuite de performer notre quantification sur les résultats obtenus. Ce qui distingue le RNAscope de l'hybridation *in situ* conventionnelle est sa sensibilité et sa spécificité. En effet, la liaison de seulement trois sondes en forme de double Z est nécessaire pour permettre l'amplification du signal et sa détection ce qui démontre la sensibilité de la technique (ACDBio, s.d.). Puisqu'il est peu probable qu'autant de sondes se lient de façon non spécifique l'une à côté de l'autre pour que l'amplification du signal soit possible, la spécificité du signal est obtenue (ACDBio, s.d.).

### **2.3.2 Tissus de singes**

Pour commencer, les sections de tissus étaient post-fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4% (PFA) diluée dans une solution de Tampon phosphate (PB) 0,1M pH 7,4. Ensuite, deux lavages dans du PBSi (Tampon phosphate saline immuno) étaient faits avant de déshydrater les coupes dans différents bains d'éthanol. En effet, les bains d'une durée de 5 minutes, étaient faits dans l'éthanol 50%, 70% puis deux fois 100%. Une ligne hydrophobe a ensuite été tracée autour des sections de tissus avec le crayon Immedge hydrophobic barrier pen (Vector Laboratories, #H-4000, Burlingame, CA, USA). Une fois la ligne sèche, les tissus étaient incubés pendant 30 minutes avec la protéase IV, puis lavés à deux reprises dans le PBSi. Un traitement au TrueBlack 2X (Biotium, #23007, Fremont, CA, USA) pendant une minute était ensuite fait, pour éliminer le signal d'autofluorescence causé par la lipofuscine présente dans les tissus, pour ensuite laver les lames deux fois dans le PBSi. Les sondes DOP, MOP, TAC1, P2RX3 ainsi que la solution de dilution des sondes étaient chauffées à 40°C pendant 10 minutes, puis refroidies à température pièce avant d'être utilisées (Une dilution 50 : 1 : 1 était utilisée pour préparer les sondes C1, C2 et C3 : 48ul de sonde C1 avec 1ul de C2 et 1ul de C3, pour un total de 50ul). Les sondes étaient incubées sur les coupes de tissus pour procéder à l'hybridation pendant deux heures dans le four Hybez à 40°C. Les lames étaient ensuite lavées deux fois dans le RNAscope wash buffer 1X pendant 2 minutes à température pièce, puis retournées 30 minutes dans le four avec l'amplification 1. Les lavages et amplifications étaient répétés en utilisant l'amplification 2 (15 minutes),

l'amplification 3 (30 minutes) et l'amplification 4. L'amplification 4C était utilisée pour toutes les expériences chez le singe (C1 = Atto 550, C2 = Atto 647 et C3 = Alexa 488). Les lames ont ensuite été utilisées pour faire un marquage par immunofluorescence ou ont été montées avec le Prolong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen, #P36971, Burlington, ON, CAN) (lorsque les sondes TAC1 et P2RX3 étaient utilisées). Les sondes, la protéase IV (#322336), les solutions d'amplification (#320851), le RNAscope wash buffer (#310091) et le four Hybez ont été achetés chez ACDbio (Newark, CA, USA).

### ***2.3.3 Tissus humains***

Pour commencer, les sections de tissus étaient post-fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4% (PFA) diluée dans une solution de Tampon phosphate (PB) 0,1M pH 7,4. Ensuite, deux lavages dans du PBSi (Tampon phosphate saline immuno) étaient faits avant de déshydrater les coupes dans différents bains d'éthanol. En effet, les bains d'une durée de 5 minutes, étaient faits dans l'éthanol 50%, 70% puis deux fois 100%. Une ligne hydrophobe a ensuite été tracée autour des sections de tissus avec le crayon Immedge hydrophobic barrier pen. Une fois la ligne sèche, les tissus étaient incubés pendant 15 minutes avec la protéase IV, puis lavés à deux reprises dans le PBSi. Un traitement au TrueBlack 2X pendant une minute était ensuite fait, pour éliminer le signal d'autofluorescence causé par la lipofuscine présente dans les tissus, pour ensuite laver les lames deux fois dans le PBSi. Les sondes DOP, MOP, TAC1, P2RX3, NTRK3, SNC10A et PVALB étaient chauffées à 40°C pendant 10 minutes, puis refroidies à température pièce avant d'être utilisées (Une dilution 50 : 1 : 1 était utilisée pour préparer les sondes C1, C2 et C3). Les sondes étaient mises sur les coupes de tissus pour procéder à l'hybridation pendant deux heures dans le four Hybez à 40°C. Les lames étaient ensuite lavées deux fois dans le RNAscope wash buffer 1X pendant 2 minutes à température pièce, puis retournées 30 minutes dans le four avec l'amplification 1. Les lavages et amplifications étaient répétés en utilisant l'amplification 2 (15 minutes), l'amplification 3 (30 minutes) et l'amplification 4. L'amplification 4C était utilisée pour toutes les expériences chez l'humain. Les lames ont ensuite été utilisées pour faire un marquage par immunofluorescence ou ont été montées avec le Prolong Diamond Antifade Mountant with DAPI.

### ***2.3.4 Tissus de rats***

Pour commencer, les sections de tissus étaient post-fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4% (PFA) diluée dans une solution de Tampon phosphate (PB) 0,1M pH 7,4. Ensuite, deux lavages dans du PBSi étaient faits avant de déshydrater les coupes dans différents bains d'éthanol. En effet, les bains d'une durée de 5 minutes, étaient faits dans l'éthanol 50%, 70% puis deux fois 100%. Une ligne hydrophobe a ensuite été tracée autour des sections de tissus avec le crayon Immedge hydrophobic barrier pen. Une fois la ligne sèche, les tissus étaient incubés pendant 30 minutes avec la protéase IV, puis lavés à deux reprises dans le PBSi. Les sondes DOP, MOP, TAC1 ainsi que la solution de dilution des sondes étaient chauffées à 40°C pendant 10 minutes, puis refroidies à température pièce avant d'être utilisées (Une dilution 50 : 1 : 1 était utilisée pour préparer les sondes C1, C2 et C3). Les sondes étaient mises sur les coupes de tissus pour procéder à l'hybridation pendant deux heures dans le four Hybez à 40°C contenant un papier humidificateur. Les lames étaient ensuite lavées deux fois dans le RNAscope wash buffer 1X pendant 2 minutes à température pièce, puis retournées 30 minutes dans le four avec l'amplification 1. Les lavages et amplifications étaient répétés en utilisant l'amplification 2 (15 minutes), l'amplification 3 (30 minutes) et l'amplification 4. L'amplification 4C était utilisé lorsque la sonde TAC1 était mise sur la lame (C1 = Atto 550, C2 = Atto 647 et C3 = Alexa 488), alors que l'amplification 4A l'était lorsque le RNAscope était combiné avec une immunofluorescence (C1 = Alexa 488, C2 = Atto 550 et C3 = Atto 647). Les lames ont ensuite été utilisées pour faire un marquage par immunofluorescence ou ont été montées avec le Prolong Diamond Antifade Mountant with DAPI (lorsque la sonde TAC1 était utilisée).

### ***2.3.5 Tissus de souris***

Pour commencer, les sections de tissus étaient post-fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4% (PFA) diluée dans une solution de Tampon phosphate (PB) 0,1M pH 7,4. Ensuite, deux lavages dans du PBSi étaient faits avant de déshydrater les coupes dans différents bains d'éthanol. En effet, les bains d'une durée de 5 minutes, étaient faits dans l'éthanol 50%, 70% puis deux fois 100%. Une ligne hydrophobe a ensuite été tracée autour des sections de tissus avec le crayon Immedge hydrophobic barrier pen. Une fois la ligne sèche, les tissus étaient incubés pendant 30 minutes avec la protéase IV, puis lavés à deux

reprises dans le PBSi. Un traitement au TrueBlack 0,5X pendant 30 secondes était ensuite fait, pour éliminer le signal d'autofluorescence causé par la lipofuscine présente dans les tissus, pour ensuite laver les lames deux fois dans le PBSi. Les sondes DOP, MOP, TAC1 et P2RX3 étaient chauffées à 40°C pendant 10 minutes, puis refroidies à température pièce avant d'être utilisées (Une dilution 50 : 1 : 1 était utilisée pour préparer les sondes C1, C2 et C3). Les sondes étaient mises sur les coupes de tissus pour procéder à l'hybridation pendant deux heures dans le four Hybez à 40°C. Les lames étaient ensuite lavées deux fois dans le RNAscope wash buffer 1X pendant 2 minutes à température pièce, puis retournées 30 minutes dans le four avec l'amplification 1. Les lavages et amplifications étaient répétés en utilisant l'amplification 2 (15 minutes), l'amplification 3 (30 minutes) et l'amplification 4. L'amplification 4C était utilisée pour toutes les expériences chez la souris (C1 = Atto 550, C2 = Atto 647 et C3 = Alexa 488). Les lames ont ensuite été utilisées pour faire un marquage par immunofluorescence ou ont été montées avec le Prolong Diamond Antifade Mountant with DAPI (lorsque les sondes TAC1 et P2RX3 étaient utilisées).

## **2.4 Immunofluorescence**

Suite au RNAscope, les lames étaient lavées deux fois deux minutes dans le TBST (TBS; 50 mM Tris et 15 mM NaCl pH 7,6 contenant 0,05% de Tween-20). Un blocage était ensuite effectué dans du TBS supplémenté avec 1% BSA (Bovine Serum Albumin) et 10% NGS (Normal Goat Serum) durant toute une nuit à 4°C pour bloquer les sites non spécifiques. Le lendemain, les tissus étaient incubés pendant 2 heures avec l'anticorps primaire souris anti-NF200 (Sigma Life science, #N0142-2ML, Saint-Louis, MO, USA) 1 : 5 000 ou l'isolectine B4 (IB4) (Sigma-Aldrich, #I-2140, St-Louis, MO, USA) 1 : 1000 dilué dans du TBS-1% BSA à température pièce. Trois lavages de cinq minutes étaient ensuite faits avec du TBST avant l'incubation de 30 minutes à température pièce de l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (Invitrogen, #A11001, Waltham, MA, USA) 1 : 500 ou la streptavidine Alexa Fluor 488 (Invitrogen, #S11223) 1 : 500 dilué dans le TBS-1% BSA. Encore une fois, trois lavages de cinq minutes étaient faits dans le TBST avant de monter les lames avec le Prolong Diamond Antifade Mountant with DAPI. Une fois sèches, les lames étaient visualisées avec les microscopes à épifluorescence Leica DM4000 (Leica Biosystems Inc., Concord, ON, CAN) et Zeiss AxioImager M2 Apotome (Zeiss, Jena, Allemagne) pour

quantification ou avec les microscopes Leica TCS SP8 STED et Olympus FV1000 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japon) pour avoir des images de plus grande qualité.

## **2.5 Quantification**

### ***2.5.1 Singes et rongeurs***

La distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les différents types de neurones des afférences primaires a été déterminée à l'aide de quatre sujets différents (N) pour chacune des espèces étudiées. Pour chaque N, cinq différentes coupes de tissus ont été analysées et quantifiées. En effet, celles-ci ont été prises entièrement en photo, donc aucune cellule n'a été prise en photo à deux reprises (15-60 photos par DRG/TG). Pour chacune des images, le nombre de cellules DOP positives, MOP positives, DOP et fibres spécifiques (NF200, P2RX3/IB4 et TAC1) positives, MOP et fibres spécifiques positives (NF200, P2RX3/IB4 et TAC1), DOP et MOP positives et DOP, MOP et fibres positives (NF200, P2RX3/IB4 et TAC1) a été déterminé. Pour être considérée positive pour un ARNm spécifique, une cellule devait contenir au moins cinq points fluorescents (chaque point représente une copie de l'ARNm). Chacune des photos a été montée à l'aide d'Adobe Photoshop (version 22.4.2) et la quantification a été faite manuellement à l'aide du logiciel ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

### ***2.5.2 Humains***

La distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les différents types de neurones des afférences primaires a été déterminée à l'aide de quatre sujets différents (N) pour chacune des espèces étudiées. Pour chaque N, quatre différentes coupes de tissus ont été analysées dans lesquels 5 images ont été acquises pour effectuer la quantification (25 photos par DRG). Pour chacune des images, le nombre de cellules DOP positives, MOP positives, DOP et fibres spécifiques (NF200, P2RX3 et TAC1) positives, MOP et fibres spécifiques positives (NF200, P2RX3 et TAC1), DOP et MOP positives et DOP, MOP et fibres positives (NF200, P2RX3 et TAC1) a été déterminé. Pour être considérée positive pour un ARNm spécifique, une cellule devait contenir au moins cinq points fluorescents (chaque point représente une copie de l'ARNm). Chacune des photos a été montée à l'aide d'Adobe Photoshop (version 22.4.2)

et la quantification a été faite manuellement à l'aide du logiciel ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

## **2.5 Analyses statistiques**

Les graphiques ainsi que les analyses statistiques ont été faits à l'aide de GraphPad Prism version 9.4.1 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA). L'analyse statistique utilisée pour les différents marqueurs d'une même espèce et pour les différences interspèces est une Anova unidirectionnelle Brown-Forsythe suivie d'une comparaison multiple de Dunnett. Pour les analyses de différences dans la distribution entre les DRG et le TG, le test t de Welch ou le test t nonpaire étaient utilisés. Un  $p \leq 0,05$  était considéré comme une différence significative. Tous les graphiques sont présentés avec la moyenne  $\pm$  SD. Les graphiques en pointe de tarte ont été générés en effectuant la moyenne des résultats des différents N (N=3 chez le singe et N=4 chez la souris). Le nombre total de neurones comptés entre les différents N est indiqué sur les graphiques en question.

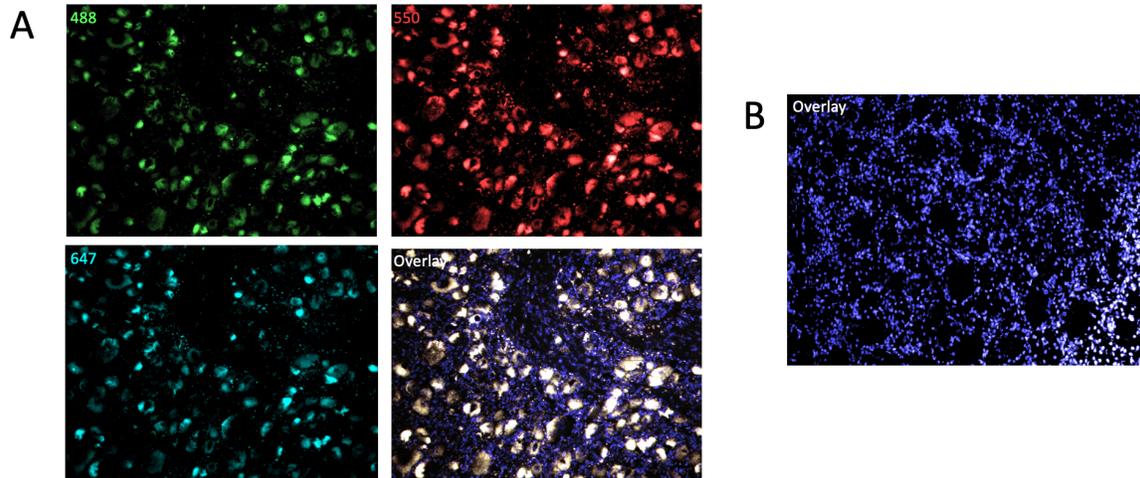
# RÉSULTATS

## 3.1 Ganglions de la racine dorsale

### 3.1.1 DRG de singes

#### 3.1.1.1 Présence d'autofluorescence dans les DRG de singes

Nous avons précédemment observé au laboratoire que les DRG de souris contenaient de l'autofluorescence causée par la lipofuscine, un mélange d'accumulation de lipides, de protéines mal repliées, de sucres et de mélanine qui autofluoresce et augmente avec l'âge des sujets (Haberberger et al., 2019). Nous nous sommes donc demandés si c'était aussi le cas dans les DRG de singes. Avant de procéder aux manipulations de RNAscope et d'immunofluorescence, une lame de DRG de singes sans traitement avec DAPI a été placée au microscope. Le résultat obtenu peut être observé dans la figure 2A, où l'on peut bien voir la présence d'autofluorescence dans toutes les longueurs d'onde (488 nm, 550 nm et 647 nm). On peut aussi observer que ce marquage d'autofluorescence dans toutes les couleurs se superpose parfaitement ce qui suggère la présence de lipofuscine dans les DRG de singes. Pour éliminer ce marquage, nous nous sommes tournés vers l'utilisation du TrueBlack que nous avons utilisé sur des DRG de souris dans une publication récente du laboratoire portant sur la distribution du DOP et du MOP dans les DRG de rongeurs (Quirion et al., 2022). Suite à plusieurs essais, nous avons choisi d'utiliser le TrueBlack à une concentration de 2X pendant une minute ce qui enlève entièrement l'autofluorescence présente dans les tissus (Figure 2B). Évidemment, ce traitement n'affecte pas la qualité du marquage par RNAscope et par immunofluorescence.



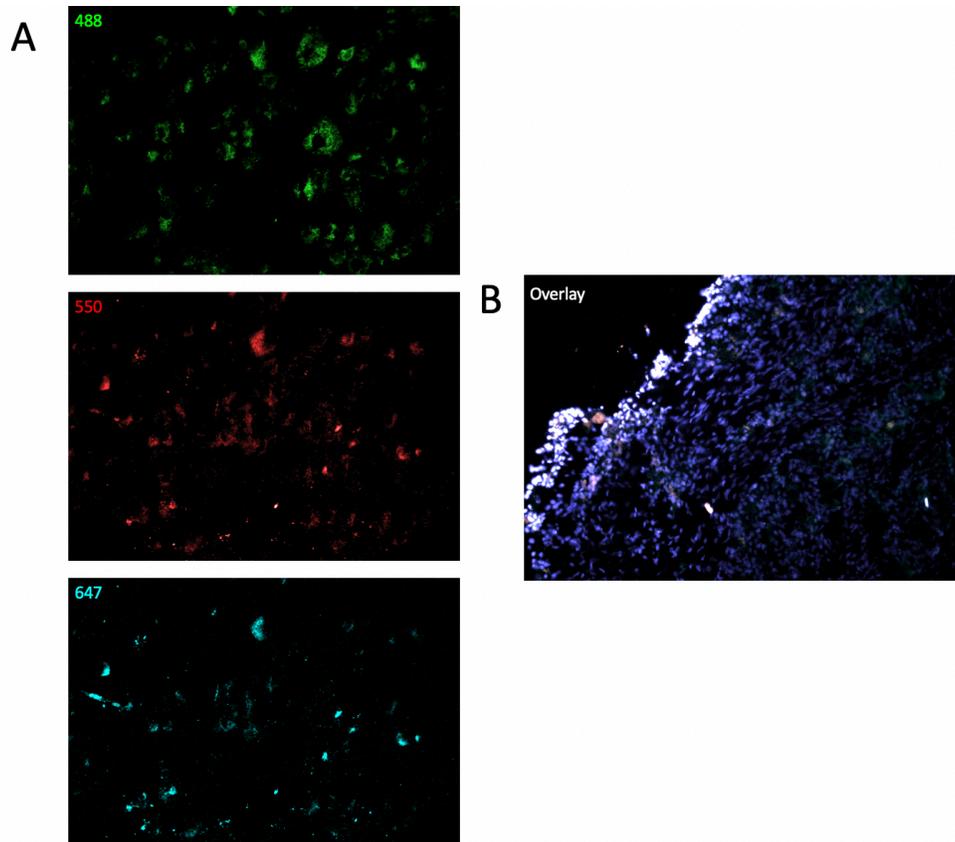
**Figure 2 : Présence d'auto fluorescence dans les DRG de singes**

A) Visualisation d'auto fluorescence dans un DRG de singe sans marquage causée par la lipofuscine vue dans 3 différentes longueurs d'onde (488 nm en vert, 550 nm en rouge et 647 nm en turquoise) ainsi que la fusion des 3 images avec l'ajout de DAPI vu en bleu. B) Visualisation de la fusion des images dans les 3 longueurs d'onde avec ajout de DAPI (488 nm, 550 nm et 647 nm) dans un DRG de singe sans marquage qui a reçu un traitement au TrueBlack 2X pendant une minute. Grossissement 20X.

### *3.1.1.2 Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les DRG de singes*

La technique de RNAscope a été utilisée durant ma maîtrise pour étudier la distribution des récepteurs opioïdes delta et mu dans des ganglions de la racine dorsale chez le singe. Pour ce faire, des sondes spécifiques à l'ARNm des récepteurs DOP et MOP ont été utilisées (vues en rouge et en turquoise respectivement sur les panneaux centraux de la Figure 4A, B et C). Pour déterminer dans quels types de neurones étaient présents les récepteurs, trois marqueurs ont été utilisés (vu en vert sur les panneaux de gauche de la Figure 4A, B et C). Ces marqueurs sont connus pour être spécifiques à trois types de neurones chez les rongeurs (ils ont notamment été utilisés précédemment au laboratoire pour identifier ces mêmes neurones dans les DRG de souris et de rat). Les marqueurs TAC1 et P2RX3 ont été utilisés par RNAscope. En effet, l'essai nous permet de détecter jusqu'à trois sondes à la fois. Nous avons donc pu combiner les sondes DOP, MOP et TAC1 ainsi que DOP, MOP et P2RX3. Le marqueur NF200 a plutôt été utilisé par immunofluorescence. La coexpression entre ces marqueurs neuronaux et les deux récepteurs étudiés peut être observée dans les panneaux à droite de la Figure 3A, B et C. Avant de procéder à ces essais, les sondes contrôles positives et négatives ont préalablement été testées sur les DRG de

singes. Comme souhaité, du marquage était présent dans tous les canaux avec la sonde positive (Figure 3A), alors qu'aucun marquage n'a été observé dans tous les canaux avec la sonde négative (Figure 3B).



**Figure 3 : Marquage des sondes contrôles de RNAscope dans des DRG de singes**

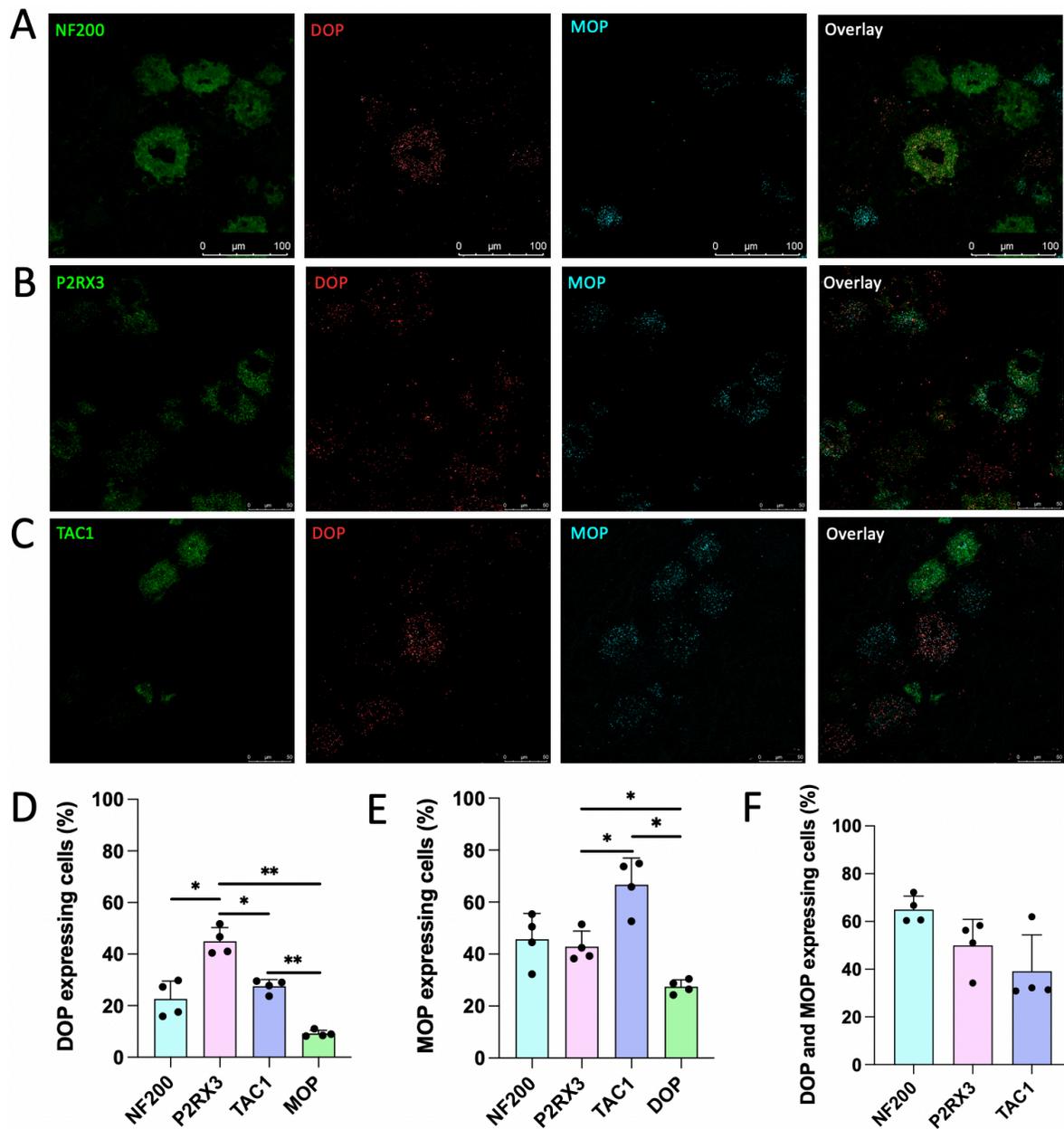
A) Visualisation du marquage de la sonde contrôle positive dans les longueurs d'onde 488 nm (vert), 550 nm (rouge) et 647 nm (turquoise) dans un DRG de singe. B) Visualisation de l'absence de marquage avec la sonde contrôle négatif avec une fusion du résultat des longueurs d'onde 488 nm, 550 nm, 647 nm et du DAPI dans un DRG de singe. Grossissement 20X.

Dans cette étude, nous avons montré que l'ARNm du DOP est présent dans tous les types de neurones. En effet,  $45.0\% \pm 5,3\%$  des neurones positifs pour le DOP étaient aussi positifs pour l'ARNm de P2RX3, un marqueur des neurones de petit diamètre non peptidergiques (Figure 4D).  $27,5\% \pm 2,6\%$  des neurones DOP-positifs étaient aussi positifs pour l'ARNm de TAC1, un marqueur des neurones de petit diamètre peptidergiques, alors que  $22,6\% \pm 6,9\%$  des neurones DOP-positifs le sont aussi pour NF200, un marqueur des neurones myélinisés (Figure 4D). Nous avons seulement observé que  $9,2 \pm 1,3\%$  des neurones positifs pour le DOP coexprimaient aussi l'ARNm du MOP (Figure 4D). La

distribution du DOP entre les marqueurs P2RX3 et TAC1 ( $p = 0,0176$ ), entre les marqueurs P2RX3 et NF200 ( $p = 0,0108$ ), entre le marqueur P2RX3 et les neurones coexprimant le MOP ( $p = 0,0036$ ) et entre le marqueur TAC1 et les neurones coexprimant le MOP ( $p = 0,0010$ ) était significativement différente.

Comme pour la distribution de l'ARNm du DOP, celle du MOP a aussi été étudiée et est présente dans tous les types de neurones (Figure 4E). Nous avons observé que  $66,7\% \pm 10,2\%$  des neurones positifs pour l'ARNm du MOP étaient aussi positifs pour TAC1 (Figure 4E). De façon intéressante, le MOP était présent en proportion presque égal dans les neurones myélinisés et ceux de petit diamètre non peptidergiques. Effectivement,  $45,7\% \pm 10,0\%$  des neurones MOP-positifs étaient aussi positifs pour NF200, alors que  $42,9\% \pm 6,0\%$  coexprimaient P2RX3 (Figure 4E). De façon intéressante,  $27,5\% \pm 2,7\%$  des neurones MOP-positifs étaient aussi DOP-positifs (Figure 4E). La distribution du MOP entre les marqueurs P2RX3 et TAC1 ( $p = 0,0456$ ), entre le marqueur P2RX3 et les neurones coexprimant le DOP ( $p = 0,0394$ ) et entre le marqueur TAC1 et les neurones coexprimant le DOP ( $p = 0,0190$ ) était significativement différente.

Finalement, nous nous sommes aussi intéressés aux types de neurones qui coexprimaient l'ARNm des deux récepteurs. En effet, l'hétéromère formé par ces deux récepteurs pourrait aussi être une cible intéressante dans le traitement de la douleur en plus de produire des effets antinociceptifs chez les macaques rhésus (Gendron et al., 2015; Gupta et al., 2010; Fujita, 2020; Constantino et al., 2012; Fujita et al., 2014; Yekkirala et al., 2012). Nous avons observé que  $65,0\% \pm 5,6\%$  des neurones contenant l'ARNm du DOP et du MOP étaient NF200 positifs (Figure 4F). La proportion des neurones coexprimant les deux récepteurs ainsi que le marqueur des neurones de petit diamètre peptidergiques, TAC1 était plus bas, soit à  $39,1\% \pm 15,3\%$  (Figure 4F). Pour terminer,  $50,0\% \pm 11,0\%$  des neurones DOP-MOP positifs étaient des neurones de petit diamètre non peptidergiques, P2RX3 positifs (Figure 4F). Aucune différence significative n'a été observée dans la distribution des deux récepteurs entre les différents marqueurs neuronaux utilisés dans les DRG de singes.



**Figure 4 : Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les DRG de singes**

A) Visualisation du marqueur NF200 (vert), de l'ARNm du DOP (rouge) et du MOP (turquoise) par hybridation *in situ* et de la fusion des trois images (expression des deux récepteurs dans des neurones myélinisés). B) Visualisation de l'ARNm du marqueur P2RX3 (vert), C) TAC1 (vert), du DOP (rouge) et du MOP (turquoise) et de la fusion des trois images (expression des deux récepteurs dans des neurones de petit diamètre non peptidergiques (B) et peptidergiques (C)). D) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du DOP dans les différents types de neurones des DRG de singes et coexpression avec l'ARNm du MOP. E) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du MOP dans les différents types de neurones des DRG de singes et coexpression avec l'ARNm du DOP. F) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les différents types de neurones des DRG de singes. Anova unidirectionnelle Brown-Forsythe suivie d'une comparaison multiple de Dunnett's. \*  $p \leq 0,05$  ; \*\*  $p \leq 0,01$ . Les résultats montrent la moyenne  $\pm$  SD.

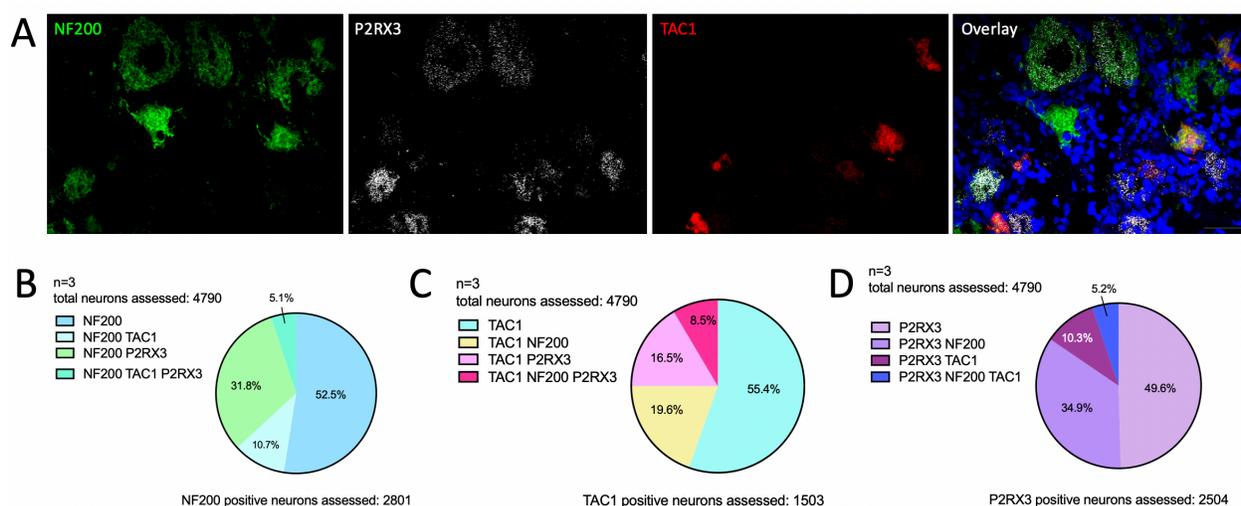
### 3.1.1.3 Coexpression entre les différents marqueurs neuronaux utilisés chez le singe

Après avoir obtenu les résultats quant à la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les différents types de neurones de DRG de singes, nous nous sommes demandés si ces marqueurs étaient spécifiques à un type neuronal précis. En effet, chez les rongeurs, ces marqueurs sont fréquemment utilisés pour marquer les mêmes neurones que dans notre étude (NF200 pour les fibres myélinisées, P2RX3 pour les fibres C non peptidergiques et TAC1 pour les fibres C peptidergiques) (Shiers et al., 2021; Shiers et al., 2020). Comme mentionné plus tôt, ce genre d'association est beaucoup plus complexe chez l'humain où un marqueur peut être présent dans plusieurs types de neurones et où un groupe de marqueurs représente mieux un type neuronal (Shiers et al., 2020; Tavares-Ferreira et al., 2022; Nguyen et al., 2021). Comme exemple, nous pouvons notamment regarder NF200 qui est présent dans environ 98% des neurones de DRG humains au lieu de seulement ceux myélinisés chez les rongeurs (Rostock et al., 2018; Haberberger et al., 2019; Chang et al., 2018). Nous avons donc procédé à des essais de RNAscope avec les sondes TAC1 et P2RX3 combinés à une immunofluorescence avec NF200. La coexpression entre ces marqueurs peut être observée à la Figure 5A où NF200 est vu en vert (panneau de gauche), P2RX3 en blanc (panneau centre gauche), TAC1 en rouge (panneau centre droit).

Sur les 4790 neurones comptés, 2801 étaient positifs pour NF200 (Figure 5B). Parmi ces neurones, 52,3% étaient positifs pour NF200 uniquement, alors que 10,7% des neurones NF200 positifs coexprimaient aussi avec TAC1 (Figure 5B). C'est près de 32% des neurones comptés qui coexprimaient NF200 et P2RX3 (Figure 5B). Pour terminer, seulement 5% des neurones étaient positifs pour NF200, TAC1 et P2RX3 (Figure 5B).

Du côté de TAC1, 1503 des 4790 neurones comptés étaient positifs pour ce marqueur (Figure 5C). La majorité de ces neurones, soient 55,4% d'entre eux étaient positifs pour TAC1 uniquement (Figure 5C). 19,6% des neurones coexprimaient TAC1 et NF200 alors que 16,5% coexprimaient TAC1 et P2RX3 (Figure 5C). Finalement, c'est 8,5% de ces neurones qui coexprimaient TAC1, P2RX3 et NF200 (Figure 5C).

Pour terminer, 2504 neurones des 4790 quantifiés étaient positifs pour P2RX3 (Figure 5D). Dans ces neurones, 49,6% étaient positifs pour P2RX3 seul alors que 35% d'entre eux coexprimaient P2RX3 et NF200 (Figure 5D). Seulement 10,3% et 5,2% des neurones possédaient respectivement P2RX3 et TAC1/ P2RX3, TAC1 et NF200 comme marqueur (Figure 5D).



**Figure 5 : Coexpression entre les marqueurs neuronaux utilisés dans les DRG de singes**

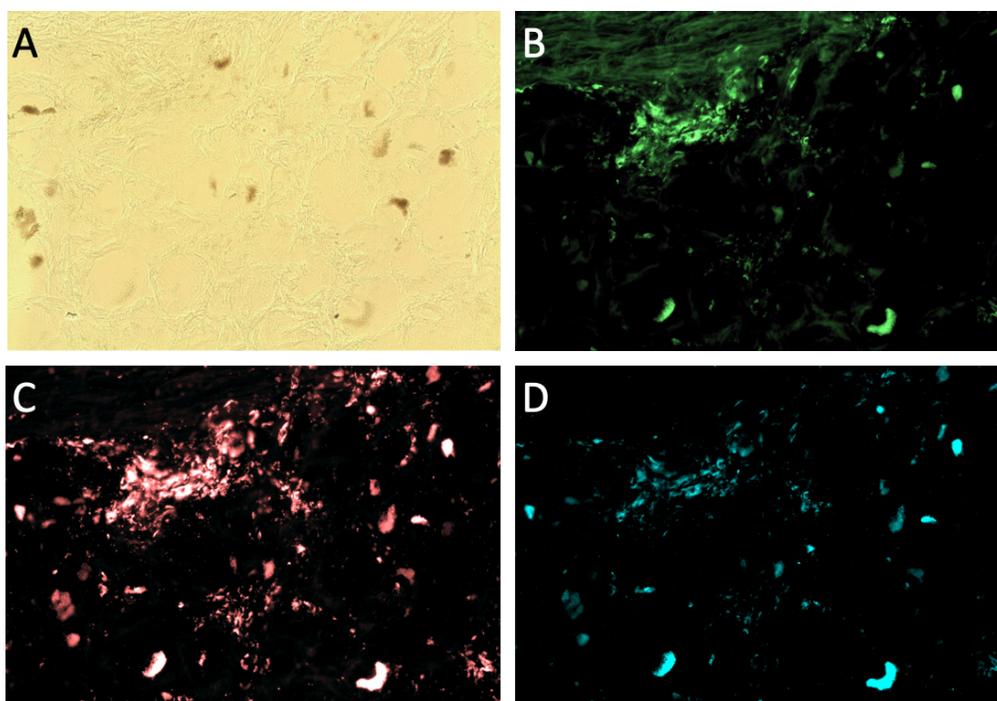
A) Visualisation du marqueur NF200 (vert), P2RX3 (blanc), TAC1 (rouge) et de la fusion des trois images avec l'ajout de DAPI. B) Graphique pointe de tarte représentant les sous-populations NF200 positives dans un DRG de singe. C) Graphique pointe de tarte représentant les sous-populations TAC1 positives dans un DRG de singe. D) Graphique pointe de tarte représentant les sous-populations P2RX3 positives dans un DRG de singe. Échelle 50  $\mu$ m.

### 3.1.2 DRG humains

#### 3.1.2.1 Présence d'autofluorescence dans les DRG humains

Puisque nous savions que les DRG de singes et de souris contenaient de la lipofuscine et qu'il a été montré à plusieurs reprises dans la littérature que les DRG humains en contenaient aussi (Haberberger et al., 2019; Shiers et al., 2020; Tavares-Ferreira et al., 2022; Shiers et al., 2021), nous avons voulu voir quelle intensité avait la lipofuscine dans nos DRG humains. Comme pour le singe, nous avons placé une lame de DRG humains au microscope et le résultat obtenu peut être vu à la Figure 6. En A, on peut observer la lipofuscine (les résidus bruns granuleux) en champ clair, alors qu'en B, C et D on peut voir

l'autofluorescence causée par celle-ci dans les longueurs d'onde 488 nm, 550 nm et 647 nm respectivement. Nous avons encore une fois effectué des tests avec le TrueBlack pour voir quelle concentration allait bloquer le signal d'autofluorescence. Malheureusement, le signal chez l'humain semble trop fort et nous ne sommes pas arrivés à enlever complètement l'autofluorescence (plusieurs tests avec différents temps d'exposition ont été effectués, mais une exposition plus longue entraînait le TrueBlack à sécher et abîmer le marquage. Résultats non montrés). Nous avons tout de même utilisé un traitement au TrueBlack 2x pendant 1 minute pour minimiser le signal d'autofluorescence.



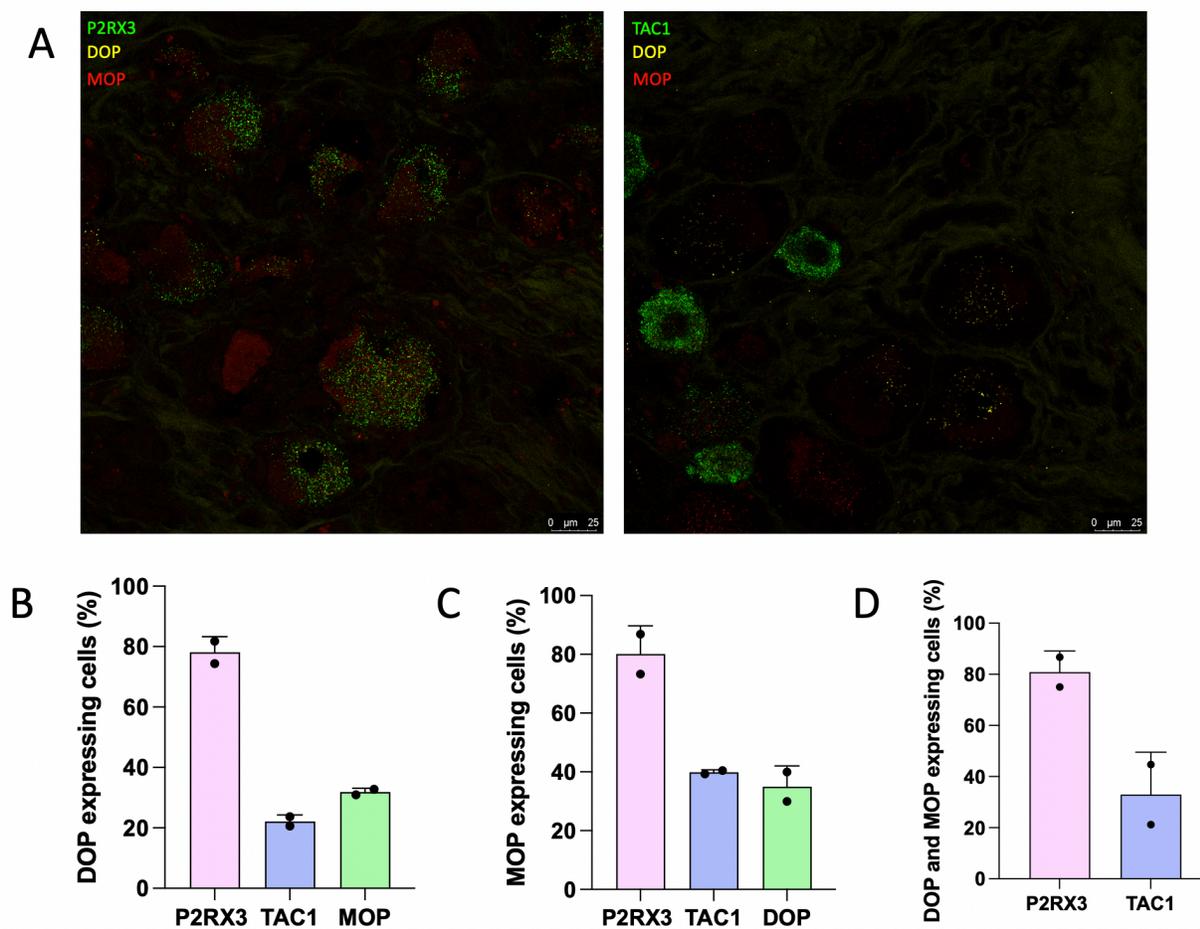
**Figure 6: Présence d'autofluorescence dans les DRG d'humain**

A) Visualisation d'autofluorescence dans un DRG humain sans marquage causée par la lipofuscine (brun) vue en champ clair. B) Visualisation d'autofluorescence dans un DRG humain sans marquage causée par la lipofuscine dans la longueur d'onde 488 nm (vert) C) Visualisation d'autofluorescence dans un DRG humain sans marquage causée par la lipofuscine dans la longueur d'onde 550 nm (rouge) D) Visualisation d'autofluorescence dans un DRG humain sans marquage causée par la lipofuscine dans la longueur d'onde 647 nm (turquoise). Grossissement 20X.

### 3.1.2.2 Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les DRG humains

Pour comparer la distribution des récepteurs opioïdes dans les DRG de singes à celles d'autres espèces, nous avons encore une fois utilisé la technique de RNAscope, mais cette

fois-ci dans des DRG humains. Encore une fois, des sondes spécifiques à l'ARNm des récepteurs DOP et MOP ont été utilisées (vues en jaune et rouge respectivement sur la figure 7A). Les marqueurs des nocicepteurs P2RX3 et TAC1 peuvent aussi être visualisés grâce au RNAscope en vert sur la Figure 7A. Les deux images de la Figure 7A représentent donc la coexpression entre l'ARNm des deux récepteurs dans différents marqueurs de nocicepteurs. Comme pour le singe, du marquage était présent en utilisant une sonde contrôle positive, alors que rien n'était présent lors de l'utilisation d'une sonde contrôle négative.



**Figure 7: Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les DRG humains**

A) Visualisation des marqueurs P2RX3 et TAC1 (vert), de l'ARNm du DOP (jaune) et du MOP (rouge) par hybridation *in situ* (expression des deux récepteurs dans les nocicepteurs). B) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du DOP dans les différents types de neurones des DRG humains et coexpression avec l'ARNm du MOP. C) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du MOP dans les différents types de neurones des DRG humains et coexpression avec l'ARNm du DOP. D) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les différents types de neurones des DRG humains. Les résultats montrent la moyenne  $\pm$  SD.

Durant ma maîtrise, j'ai dû faire face à différents problèmes techniques qui m'empêchent de montrer des résultats complets pour les DRG humains, ceux qui seront présentés dans les prochaines lignes sont donc préliminaires. Les résultats présentés proviennent de deux patients différents (les deux autres n'ont pas encore été analysés). Pour ces deux patients, une lame contenant 4 tranches de DRG a été analysée par marqueur (donc deux lames par patient : une pour TAC1 et une pour P2RX3). Pour le moment, l'ARNm du DOP est présent à 78,1% dans les neurones P2RX3 positifs alors qu'il est beaucoup moins dans ceux TAC1 positifs (22,1%) (Figure 7B). Pour ce qui est de la coexpression avec MOP, c'est 31,9% des neurones positifs pour l'ARNm de DOP qui possèdent aussi l'ARNm de MOP (Figure 7B).

En ce qui a trait à l'ARNm du MOP, 80,1% des neurones positifs pour celui-ci coexpriment avec le marqueur des nocicepteurs P2RX3 (Figure 7C). C'est 39,9% des neurones MOP positifs qui sont aussi positifs pour TAC1, un autre marqueur des nocicepteurs (Figure 7C). De façon intéressante, 35,0% des neurones positifs pour l'ARNm du MOP expriment aussi celle du DOP (Figure 7C).

Pour terminer, les neurones qui coexpriment l'ARNm des deux récepteurs sont à 80,8% P2RX3 positifs et à 32,9% TAC1 positifs (Figure 7D).

### ***3.1.3 Comparaison interspèce de la distribution du DOP et du MOP dans les DRG***

Avec les résultats sur la distribution des récepteurs opioïdes dans les DRG de singes montrés ci-haut et ceux dans les DRG de rats et de souris obtenus au laboratoire dans une précédente publication (Quirion et al., 2022), nous avons procédé à différentes analyses statistiques pour voir si des différences interspèces étaient présentes. Puisque les données quant à la distribution dans les DRG humains ne sont pas toutes acquises, nous avons dû exclure cette espèce de nos analyses.

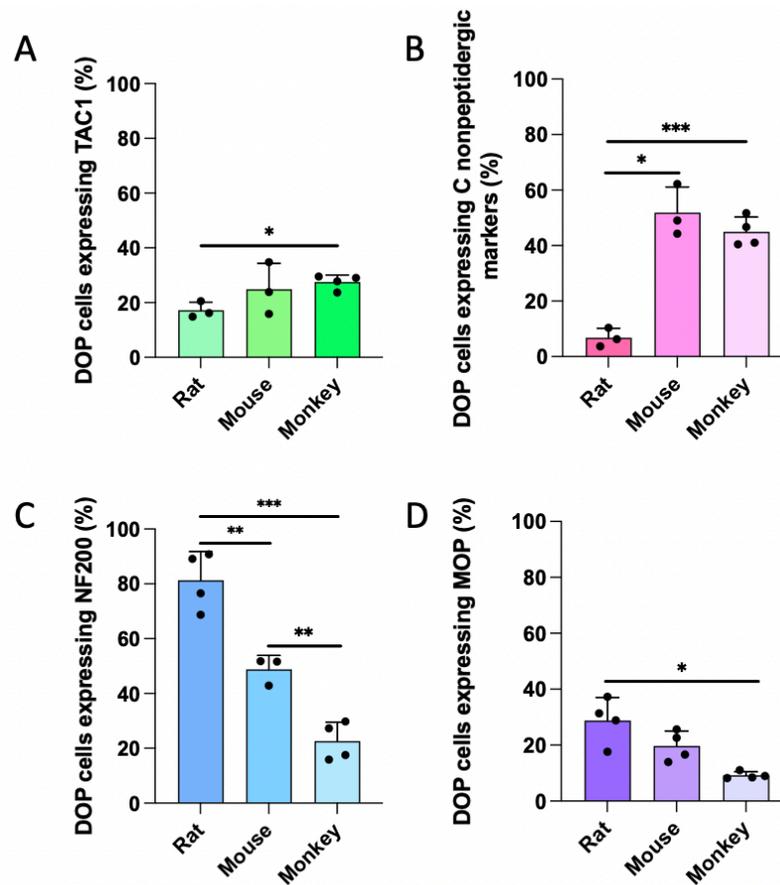
Lors de l'analyse de la distribution de l'ARNm du DOP dans les neurones de petit diamètre peptidergiques (TAC1 positifs), une seule différence est notable entre les espèces. En effet,

la proportion de neurones DOP-TAC1 positifs est significativement plus grande chez le singe en comparaison avec le rat ( $p = 0,0218$ ) (Figure 8A).

Quant à la distribution du DOP dans les fibres C non peptidergiques (IB4 positives chez le rat et P2RX3 chez la souris et le singe), deux différences significatives sont présentes entre les espèces. Le rat possède une coexpression entre le DOP et IB4 significativement plus petite que celle du DOP-P2RX3 chez la souris ( $p = 0,0100$ ) et chez le singe ( $p = 0,0002$ ) (Figure 8B). Puisque le marqueur des fibres C non peptidergiques n'est pas le même entre les trois espèces, nous ne sommes pas certains que les différences notables soient réellement dues à une différence interspèce.

Contrairement aux autres marqueurs, des différences significatives sont présentes entre toutes les espèces lorsqu'on observe la coexpression de l'ARNm du DOP avec les fibres myélinisées (NF200 positives). L'espèce qui possède la plus grande proportion de coexpression entre le DOP et NF200 est le rat alors que le singe possède la plus faible coexpression ( $p = 0,0007$ ) (Figure 8C). La souris se situe à mi-chemin entre les deux avec une différence significative en comparaison avec le rat ( $p = 0,0080$ ) et le singe ( $p = 0,0061$ ) (Figure 8C).

La seule différence significative observable dans la distribution de l'ARNm du DOP qui coexprime avec l'ARNm du MOP est entre le rat et le singe. Effectivement, la proportion de neurones DOP-MOP positifs est significativement plus grande chez le rat que chez le singe ( $p = 0,0422$ ) (Figure 8D).

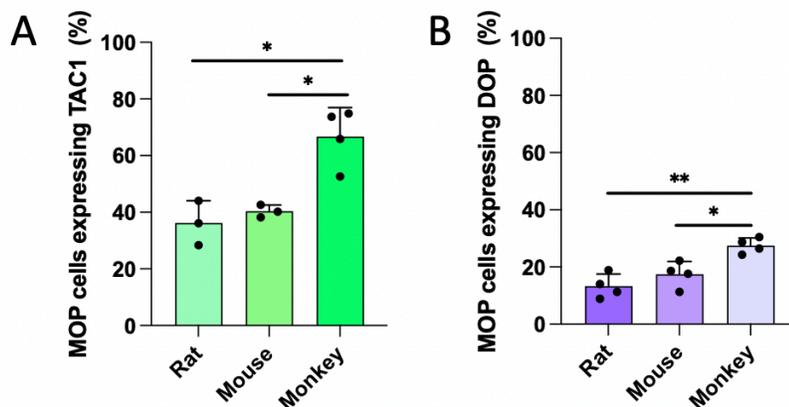


**Figure 8: Différences significatives dans la distribution du DOP entre différentes espèces**

A) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du DOP qui coexprime avec le marqueur TAC1 dans les DRG de rats, de souris et de singes. B) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du DOP qui coexprime avec les marqueurs des fibres C non peptidergiques dans les DRG de rats (IB4), de souris et de singes (P2RX3). C) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du DOP qui coexprime avec le marqueur NF200 dans les DRG de rats, de souris et de singes. D) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du DOP qui coexprime avec l'ARNm du MOP dans les DRG de rats, de souris et de singes. Anova unidirectionnelle Brown-Forsythe suivie d'une comparaison multiple de Dunnett's. \*  $p \leq 0,05$  ; \*\*  $p \leq 0,01$  ; \*\*\* $p \leq 0.001$ . Les résultats montrent la moyenne  $\pm$  SD.

Nous avons ensuite poursuivi nos analyses pour la distribution de l'ARNm du MOP entre les différentes espèces étudiées. Encore une fois, des différences significatives sont présentes dans la distribution du MOP dans les neurones TAC1 positifs. Effectivement, il y a significativement plus de neurones MOP-TAC1 positifs chez le singe comparativement au rat ( $p = 0,0174$ ) ainsi qu'à la souris ( $p = 0,0362$ ) (Figure 9A).

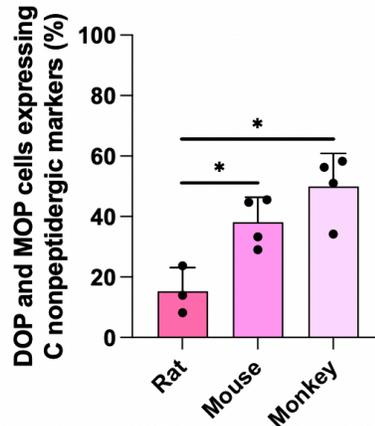
Les seules autres différences dans la distribution du MOP entre les espèces sont au niveau des neurones positifs pour l'ARNm du MOP qui coexpriment avec l'ARNm du DOP. Tout comme pour TAC1, il y a significativement plus de neurones MOP-DOP positifs chez le singe comparativement au rat ( $p = 0,0066$ ) et à la souris ( $p = 0,0324$ ) (Figure 9B).



**Figure 9: Différences significatives dans la distribution du MOP entre différentes espèces**

A) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du MOP qui coexprime avec le marqueur TAC1 dans les DRG de rats, de souris et de singes. B) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du MOP qui coexprime avec l'ARNm du DOP dans les DRG de rats, de souris et de singes. Anova unidirectionnelle Brown-Forsythe suivie d'une comparaison multiple de Dunnett's. \*  $p \leq 0,05$  ; \*\*  $p \leq 0,01$ . Les résultats montrent la moyenne  $\pm$  SD.

Pour terminer, nous avons analysé les différences présentes entre les espèces pour la distribution de la coexpression entre l'ARNm du DOP et du MOP. Cette fois-ci, les seules différences obtenues sont pour la coexpression entre les deux récepteurs dans les fibres C non peptidergiques. En effet, la quantité de coexpression chez le singe avec le marqueur P2RX3 est significativement plus grande qu'avec le marqueur IB4 chez le rat ( $p = 0,0120$ ) (Figure 10). De plus, la coexpression chez le rat avec le marqueur IB4 est significativement plus petite que chez la souris avec le marqueur P2RX3 ( $p = 0,0353$ ) (Figure 10). Encore une fois, le marqueur des fibres C non peptidergiques n'est pas identique pour toutes les espèces ce qui ne peut confirmer que les différences obtenues soient dues à des différences interspécifiques.



**Figure 10: Différences dans la distribution de la coexpression entre le DOP et le MOP entre différentes espèces**

Pourcentage de la distribution de la coexpression entre l'ARNm du DOP et du MOP qui coexprime avec les marqueurs des fibres C non peptidergiques dans les DRG de rats (IB4), de souris et de singes (P2RX3). Anova unidirectionnelle Brown-Forsythe suivie d'une comparaison multiple de Dunnett's. \*  $p \leq 0,05$ . Les résultats montrent la moyenne  $\pm$  SD.

## 3.2 Ganglions trijumeaux

### 3.2.1 TG de rats

#### 3.2.1.1 Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les TG de rats

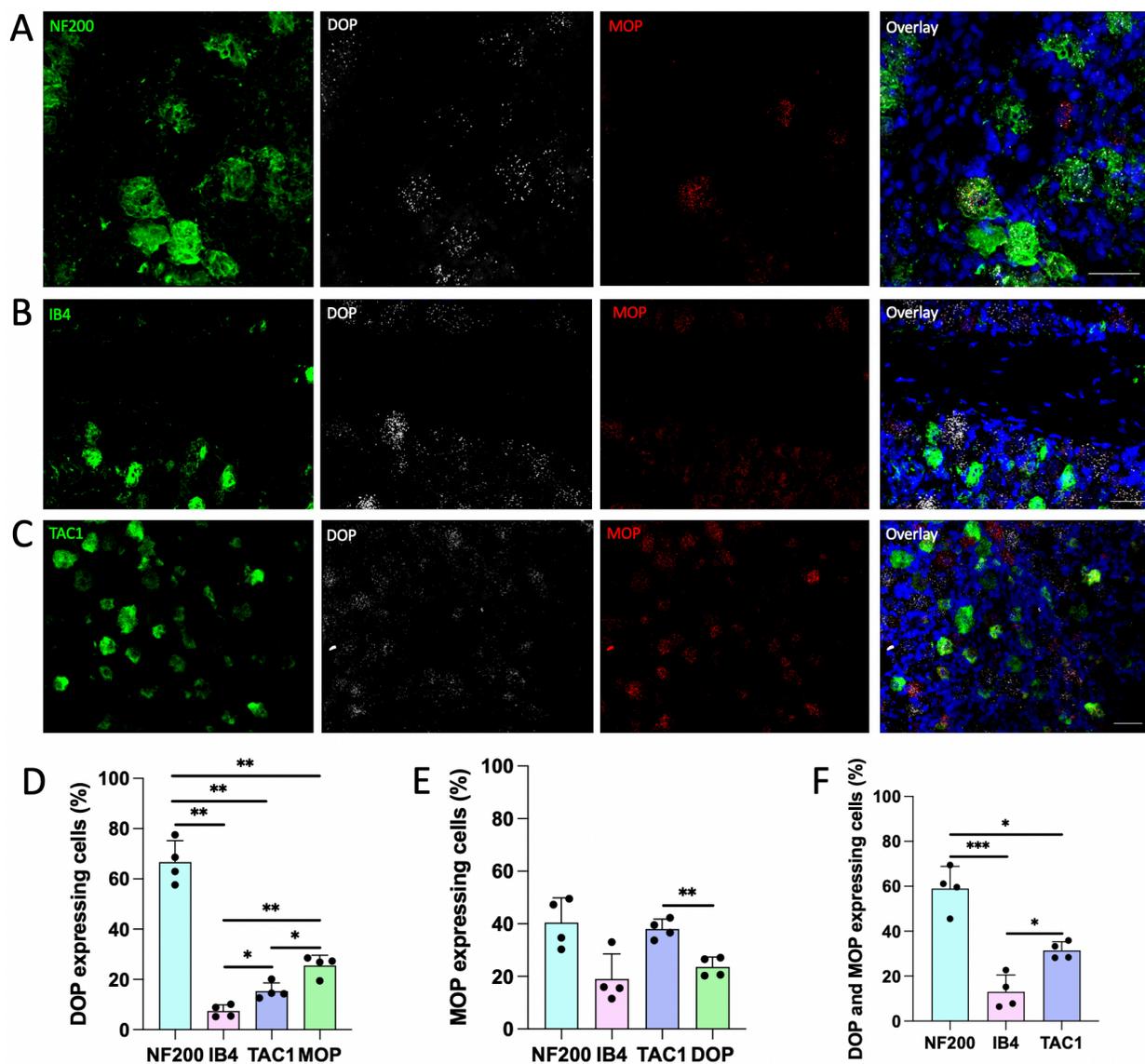
Pour comparer les patrons d'expression du DOP et du MOP entre les types d'afférences primaires, l'ARNm des deux récepteurs a aussi été étudié dans les ganglions trijumeaux de rats en utilisant toujours la technique d'hybridation *in situ* RNAscope comme décrite dans les sections précédentes. Encore une fois, des sondes spécifiques à l'ARNm du DOP et du MOP ont été utilisées (vues en blanc et en rouge respectivement sur les panneaux centraux de la Figure 11A, B et C). Les différents types neuronaux présents dans les TG ont été étudiés grâce à un anticorps NF200 (marque les neurones myélinisés), à l'isolectine B4 (IB4; marque les neurones de petit diamètre non peptidergiques) et à une sonde spécifique à TAC1 (marque les neurones de petit diamètre peptidergiques). Tous ces marqueurs peuvent être vus en vert sur les panneaux de gauche de la Figure 11A, B et C. La coexpression entre les différents marqueurs neuronaux et l'ARNm des deux récepteurs peut être observée dans les panneaux de droite de la Figure 11A, B et C.

Dans cette étude, nous avons trouvé que  $66,7\% \pm 8,5\%$  des neurones positifs pour l'ARNm du DOP étaient aussi des neurones myélinisés (NF200 positifs; Figure 11D). Une portion

beaucoup plus faible des neurones DOP-positifs exprimait aussi IB4 (neurones de petit diamètre non peptidergiques;  $7,3\% \pm 2,5\%$ ), alors que  $15,3\% \pm 3,3\%$  des neurones DOP-positifs étaient de petit diamètre peptidergiques (TAC1 positifs; Figure 11D). De façon intéressante,  $25,5\% \pm 4,1\%$  des neurones positifs pour l'ARNm du DOP coexprimaient l'ARNm du MOP (Figure 11D). La distribution du DOP entre les marqueurs NF200 et IB4 ( $p = 0,0034$ ), entre les marqueurs NF200 et TAC1 ( $p = 0,0015$ ), entre le marqueur NF200 et les neurones coexprimant le MOP ( $p = 0,0042$ ), entre les marqueurs IB4 et TAC1 ( $p = 0,0383$ ), entre le marqueur IB4 et les neurones coexprimant le MOP ( $p = 0,0030$ ) et entre le marqueur TAC1 et les neurones coexprimant le MOP ( $p = 0,0374$ ) était significativement différente.

Nous avons ensuite étudié la distribution de l'ARNm du MOP et avons observé que  $40,5\% \pm 9,4\%$  de ces neurones exprimaient aussi NF200 (Figure 11E). Une autre bonne proportion des neurones MOP-positifs étaient aussi TAC1-positifs ( $38,0\% \pm 3,7\%$ ; Figure 11E). Nous avons aussi montré que  $19,0\% \pm 9,5\%$  des neurones MOP-positifs étaient aussi positifs pour IB4 (Figure 11E). Pour terminer,  $23,6\% \pm 3,7\%$  des neurones positifs pour l'ARNm du MOP coexprimaient aussi celle du DOP (Figure 11E). La distribution du MOP entre le marqueur TAC1 et les neurones coexprimant le DOP ( $p = 0,0076$ ) était significativement différente)

Évidemment, l'identité des neurones coexprimant l'ARNm des deux récepteurs a aussi été analysée ce qui nous a permis d'apprendre qu'une grande proportion de ces neurones était myélinisée, donc positifs pour NF200 ( $58,9\% \pm 9,9\%$ ; Figure 11F). Nous avons aussi démontré que  $13,1\% \pm 7,5\%$  des neurones DOP-MOP-positifs étaient aussi de petit diamètre non peptidergiques (IB4 positifs) et que  $31,5\% \pm 3,8\%$  des neurones exprimant les deux récepteurs étaient aussi positifs pour TAC1, donc de petit diamètre peptidergiques (Figure 11F). La distribution de la coexpression du DOP et du MOP entre les marqueurs NF200 et IB4 ( $p = 0,0009$ ), entre les marqueurs NF200 et TAC1 ( $p = 0,0168$ ) et entre les marqueurs IB4 et TAC1 ( $p = 0,0301$ ) était significativement différente.

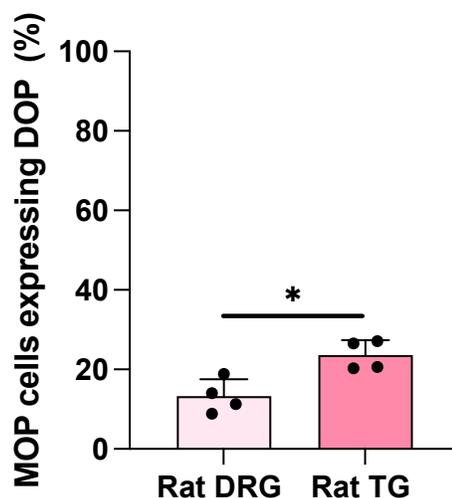


**Figure 11: Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans des TG de rats**

A) Visualisation du marqueur NF200 (vert), de l'ARNm du DOP (blanc) et du MOP (rouge) par hybridation *in situ* et de la fusion des trois images (expression des deux récepteurs dans des neurones myélinisés). B) Visualisation du marqueur IB4 (vert), de l'ARNm du DOP (blanc) et du MOP (rouge) et de la fusion des trois images (expression des deux récepteurs dans des neurones de petit diamètre non peptidergiques). C) Visualisation de l'ARNm du marqueur TAC1 (vert), du DOP (blanc) et du MOP (rouge) et de la fusion des trois images (expression des deux récepteurs dans des neurones de petit diamètre peptidergiques). D) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du DOP dans les différents types de neurones des TG de rats et coexpression avec l'ARNm du MOP. E) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du MOP dans les différents types de neurones des TG de rats et coexpression avec l'ARNm du DOP. F) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les différents types de neurones des TG de rats. Anova unidirectionnelle Brown-Forsythe suivie d'une comparaison multiple de Dunnett's. \*  $p \leq 0,05$  ; \*\*  $p \leq 0,01$  ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Échelle 50  $\mu\text{m}$ . Les résultats montrent la moyenne  $\pm$  SD.

### 3.2.1.2 Différences dans la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP entre les types d'afférences primaires chez le rat

Nous avons vérifié si des différences dans la distribution des récepteurs aux opioïdes étaient présentes entre les ganglions de la racine dorsale et les ganglions trijumeaux de rats. Les résultats de la distribution du DOP et du MOP dans les DRG de rats sont tirés d'une publication récente du laboratoire (Quirion et al., 2022). Suite à ces comparaisons, nous avons seulement obtenu une différence dans les distributions pour le DOP, le MOP et la coexpression entre les deux récepteurs. En effet, la distribution de l'ARNm du MOP dans les neurones positifs pour l'ARNm du DOP était significativement différente entre les DRG et les TG ( $p = 0,0109$ ). En effet, la proportion de neurones MOP-positifs qui coexprimait aussi DOP est plus grande dans les ganglions trijumeaux de rats en comparant aux ganglions de la racine dorsale de ce même animal (Figure 12).



**Figure 12 : Différence notable entre la distribution des récepteurs opioïdes dans les ganglions de la racine dorsale vs les ganglions trijumeaux de rats**

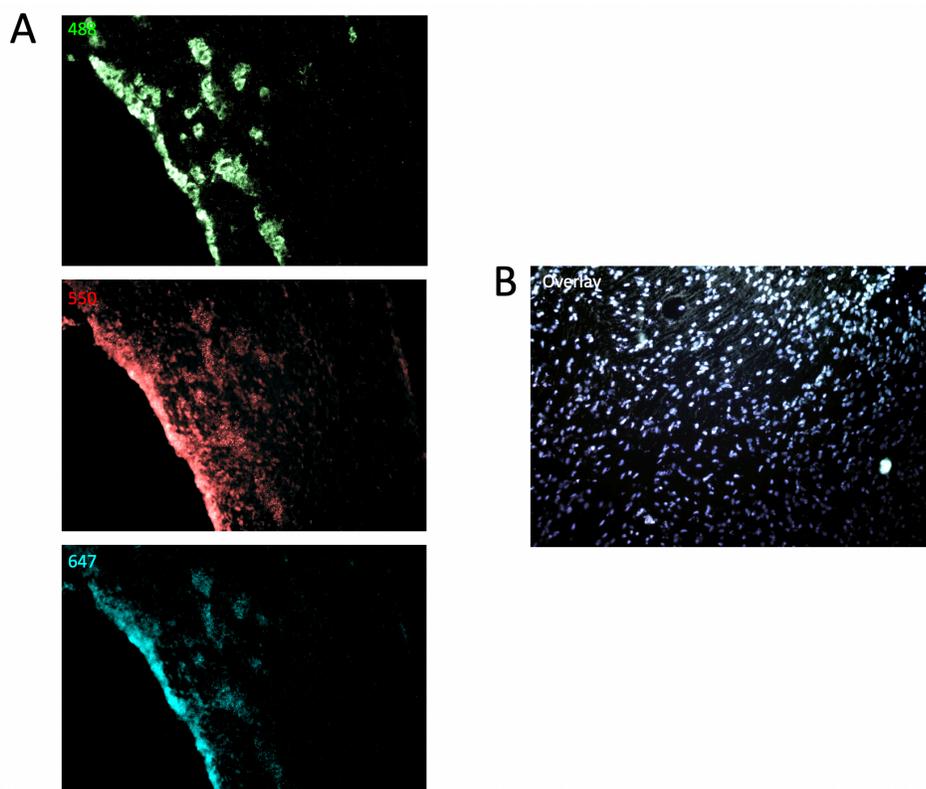
Pourcentage de la distribution de l'ARNm du MOP qui coexprime avec l'ARNm du DOP dans les DRG et TG de rats. Test t de Welch,  $* p \leq 0,05$ . Les résultats montrent la moyenne  $\pm$  SD.

### 3.2.2 TG de souris

#### 3.2.2.1 Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les TG de souris

Pour permettre la comparaison des patrons d'expression du DOP et du MOP non seulement entre les types d'afférences primaires, mais aussi entre les espèces pour un tissu donné, l'ARNm des deux récepteurs a aussi été étudié dans les ganglions trijumeaux de souris, et

ce, en utilisant toujours la technique d'hybridation *in situ* RNAscope. Comme décrit précédemment, des sondes spécifiques pour l'ARNm du DOP et du MOP ont été utilisées (vues en blanc et en rouge respectivement sur les panneaux centraux de la Figure 14A, B et C). Les différents types neuronaux présents dans les TG ont été étudiés grâce à un anticorps NF200 (marque les neurones myélinisés), à l'isolectine B4 (IB4; marque les neurones de petit diamètre non peptidergiques) et à une sonde spécifique à TAC1 (marque les neurones de petit diamètre peptidergiques). Tous ces marqueurs peuvent être vus en vert sur les panneaux de droite de la Figure 14A, B et C. Avant de procéder aux essais de RNAscope, les sondes contrôles positives et négatives ont préalablement été testées sur les TG de souris. Comme attendu, du marquage était présent dans tous les canaux avec la sonde positive (Figure 13A), alors qu'aucun marquage n'a été observé dans tous les canaux avec la sonde négative (Figure 13B).



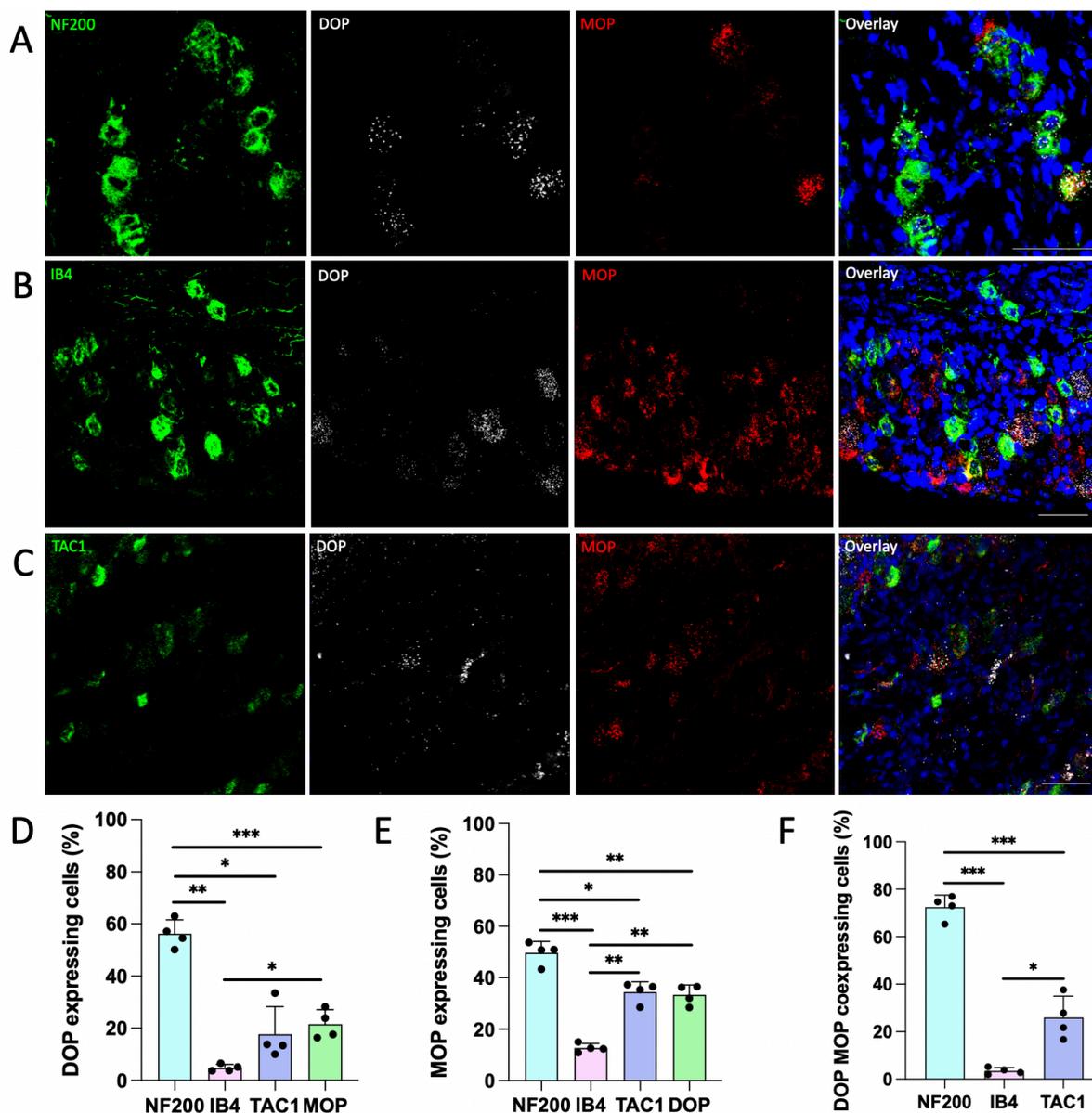
**Figure 13 : Marquage des sondes contrôles de RNAscope dans des TG de souris**

A) Visualisation du marquage de la sonde contrôle positive dans les longueurs d'onde 488 nm (vert), 550 nm (rouge) et 647 nm (turquoise) dans un TG de souris. B) Visualisation de l'absence de marquage avec la sonde contrôle négatif avec une fusion du résultat des longueurs d'onde 488 nm, 550 nm, 647 nm et du DAPI dans un TG de souris. Grossissement 20X.

Ce travail nous a permis d'apprendre qu'une large proportion des neurones positifs pour l'ARNm du DOP était aussi positive pour NF200, un marqueur des fibres myélinisées ( $56,1\% \pm 5,4\%$ , Figure 14D). À l'opposé, seulement  $4,8\% \pm 1,3\%$  des neurones DOP-positifs étaient aussi de petit diamètre non peptidergiques (IB4 positif), alors que  $17,7\% \pm 10,6\%$  des neurones positifs pour le DOP étaient de petit diamètre peptidergiques (TAC1 positifs) (Figure 14D). C'est  $21,5\% \pm 5,6\%$  des neurones DOP qui coexprimaient avec l'ARNm du MOP (Figure 14D).

Pour ce qui est des neurones positifs à l'ARNm du MOP,  $12,7\% \pm 1,7\%$  d'entre eux sont aussi positif pour l'isolectine B4 (Figure 14E). Une bonne proportion des neurones MOP-positifs l'étaient aussi pour NF200 ( $49,7\% \pm 4,5\%$ ). De façon intéressante, une proportion égale de neurones MOP-positifs sont aussi TAC1 positifs ( $34,4\% \pm 4,0\%$ ) ou coexpriment l'ARNm du DOP ( $33,3\% \pm 3,9\%$ ) (Figure 14E).

Lors de l'étude du phénotype des neurones coexprimant l'ARNm des deux récepteurs dans les TG de souris, nous avons découvert que  $26,0\% \pm 9,0\%$  de ces neurones sont positifs à l'ARNm de TAC1 (Figure 14F). Une grande proportion ( $72,5\% \pm 5,0\%$ ) des neurones DOP-MOP positifs sont aussi NF200 positifs, alors que seulement  $3,4\% \pm 1,4\%$  des neurones positifs à l'ARNm du DOP et du MOP le sont aussi pour IB4 (Figure 14F).



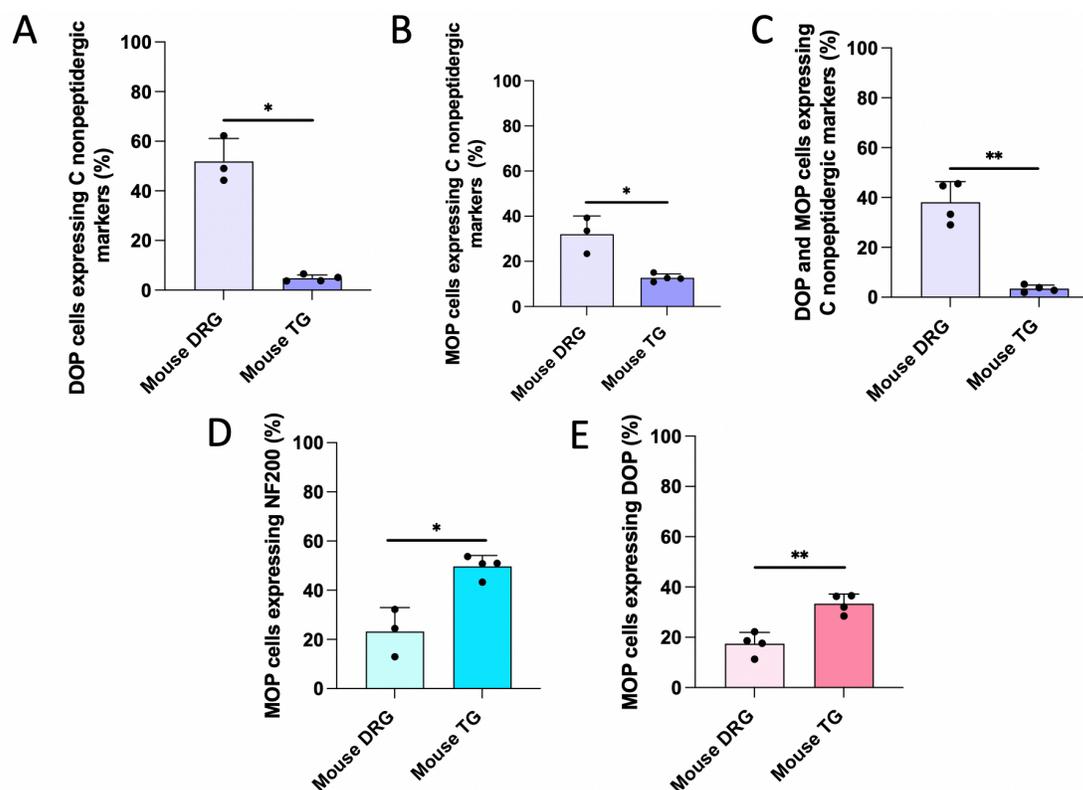
**Figure 14: Distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans des TG de souris**

A) Visualisation du marqueur NF200 (vert), de l'ARNm du DOP (blanc) et du MOP (rouge) par hybridation *in situ* et de la fusion des trois images (expression des deux récepteurs dans des neurones myélinisés). B) Visualisation du marqueur IB4 (vert), de l'ARNm du DOP (blanc) et du MOP (rouge) et de la fusion des trois images (expression des deux récepteurs dans des neurones de petit diamètre non peptidergiques). C) Visualisation de l'ARNm du marqueur TAC1 (vert), du DOP (blanc) et du MOP (rouge) et de la fusion des trois images (expression des deux récepteurs dans des neurones de petit diamètre peptidergiques). D) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du DOP dans les différents types de neurones des TG de souris et coexpression avec l'ARNm du MOP. E) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du MOP dans les différents types de neurones des TG de souris et coexpression avec l'ARNm du DOP. F) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les différents types de neurones des TG de souris. Anova unidirectionnelle Brown-Forsythe suivie d'une comparaison multiple de Dunnett's. \*  $p \leq 0,05$  ; \*\*  $p \leq 0,01$  ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ . Échelle 50  $\mu\text{m}$ . Les résultats montrent la moyenne  $\pm$  SD.

### 3.2.2.2 Différences dans la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP entre les types d'afférences primaires chez la souris

Nous avons ensuite effectué différentes analyses statistiques pour voir si des différences étaient notables entre la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP dans les ganglions de la racine dorsale et les ganglions trijumeaux de souris. Les résultats de la distribution du DOP et du MOP dans les DRG de souris sont tirés d'une publication récente du laboratoire (Quirion et al., 2022). Les différences obtenues sont pour la distribution du DOP ( $p = 0,0117$ , Figure 15A), du MOP ( $p = 0,0490$ , Figure 15B) et de la coexpression entre les deux récepteurs dans les neurones de petit diamètre non peptidergiques ( $p = 0,0030$ , Figure 15C). Dans tous les cas, la quantité du DOP et/ou MOP présente dans ce type de fibres est plus grande dans les DRG de souris en comparant au TG de souris (Figure 15). Il est important de se rappeler que les marqueurs utilisés pour les fibres non peptidergiques dans ces deux tissus sont différents. En effet, dans les DRG, la sonde de RNAscope P2RX3 avait été utilisée alors que dans les TG de souris, c'est plutôt IB4. Il est donc possible que ces différences soient dues à une différence de marqueur et non à une différence de tissus. Cela nous a donc poussés à faire de nouvelles expériences pour tenter de répondre à cette nouvelle question.

Des différences ont aussi été obtenues pour la distribution du MOP dans les neurones myélinisés NF200-positifs et coexprimant avec le DOP. En effet, ces proportions étaient plus grandes, dans les deux cas, dans les TG de souris en comparaison avec les DRG de souris ( $p = 0,0283$  pour NF200, Figure 15D;  $p = 0,0019$  pour DOP, Figure 15E).



**Figure 15: Différences notoires entre la distribution des récepteurs opioïdes dans les ganglions de la racine dorsale vs les ganglions trijumeaux de souris**

A) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du DOP qui coexprime avec les marqueurs des fibres C non peptidergiques (P2RX3 pour les DRG et IB4 pour les TG) dans les DRG et TG de souris. B) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du MOP qui coexprime avec les marqueurs des fibres C non peptidergiques dans les DRG et TG de souris. C) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP qui coexprime avec les marqueurs des fibres C non peptidergiques dans les DRG et TG de souris. D) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du MOP qui coexprime avec NF200 dans les DRG et TG de souris. E) Pourcentage de la distribution de l'ARNm du MOP qui coexprime avec l'ARNm du DOP dans les DRG et TG de souris. Test t de Welch, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ . Les résultats montrent la moyenne  $\pm$  SD.

### 3.2.2.3 Différences dans la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP entre les différents marqueurs des fibres C non peptidergiques

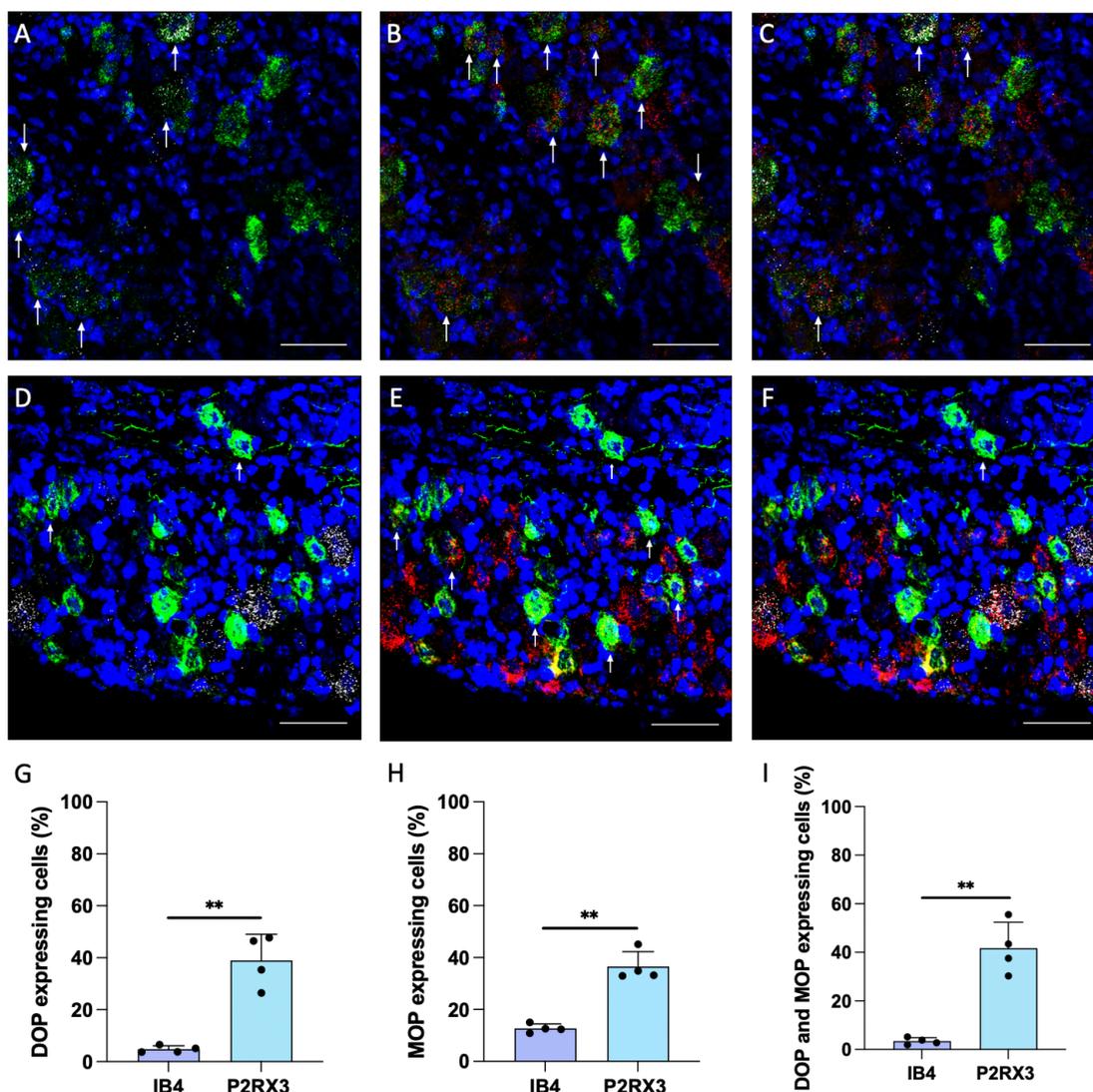
Puisque nous n'étions pas certains si les différences obtenues entre la distribution dans les DRG et les TG dans les fibres C non peptidergiques étaient dues à une différence de marqueur ou à une différence de tissu, nous avons étudié les marqueurs P2RX3 et IB4 en profondeur. Pour ce faire, nous avons effectué un co-marquage par RNAscope DOP-MOP-P2RX3 sur des lames de TG de souris et avons fait la comparaison avec le marquage DOP-MOP-IB4 montré ci-haut. La coexpression entre l'ARNm du DOP (blanc) et l'ARNm de

P2RX3 ou IB4 (vert) est montrée à l'aide de flèches sur la Figure 16A et D. Pour ce qui est de la coexpression entre l'ARNm du MOP (rouge) et P2RX3/IB4 (vert), elle est encore une fois identifiée à l'aide de flèches à la Figure 16B et E. Pour terminer, la coexpression entre les deux récepteurs et les deux marqueurs des fibres C non peptidergiques peut être vue à l'aide de flèches sur la Figure 16C et F.

Cette étude nous a permis de voir que  $4,8\% \pm 1,3\%$  des neurones DOP positifs coexpriment IB4 alors que  $39,0\% \pm 10,0\%$  des neurones DOP sont aussi positifs pour l'ARNm de P2RX3 (Figure 16G). Une différence significative est présente pour la distribution du DOP entre ces deux marqueurs ( $p = 0,0060$ ) (Figure 16G). En ce qui a trait à l'ARNm du MOP,  $12,7\% \pm 1,7\%$  des neurones y étant positifs le sont aussi pour IB4 ce qui est significativement plus petit que pour les neurones MOP-P2RX3 positifs ( $36,5\% \pm 5,8\%$ ;  $p = 0,0023$ ) (Figure 16H).

La coexpression entre l'ARNm du DOP et du MOP est de  $41,7\% \pm 10,7\%$  avec l'ARNm de P2RX3 ce qui est significativement plus grand qu'entre les deux récepteurs et IB4 ( $3,4\% \pm 1,4\%$ ;  $p = 0,0051$ ) (Figure 16I).

Puisque de grandes différences sont présentes entre les deux marqueurs, nous avons regardé si des différences étaient présentes entre la distribution du DOP, du MOP et des deux récepteurs avec P2RX3 entre les TG et les DRG de souris. Aucune différence n'a été observée, ce qui nous amène à confirmer que les différences vues plutôt étaient dues à la différence de marqueur et non de tissus.

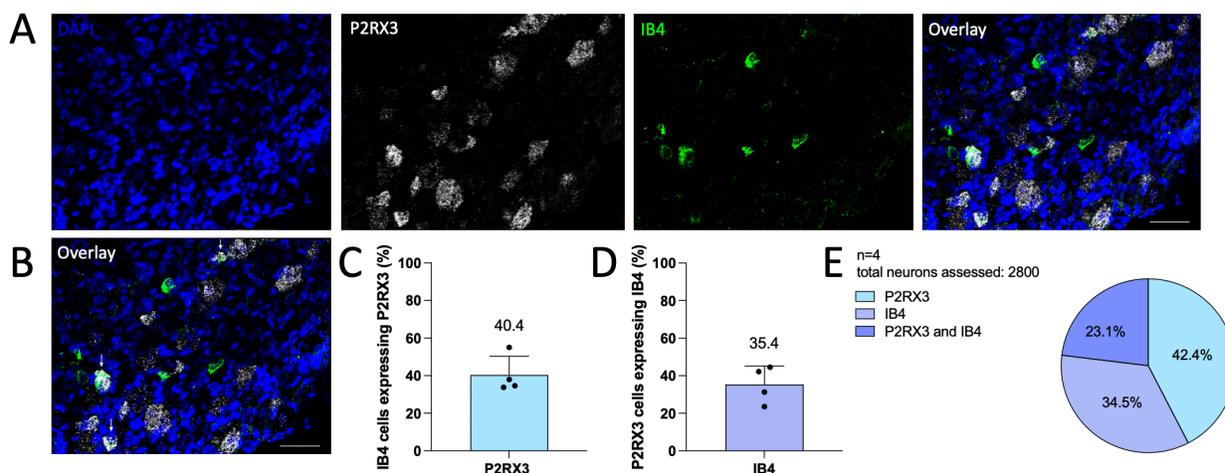


**Figure 16: Différences dans la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP entre les différents marqueurs des fibres C non peptidergiques dans les ganglions trijumeaux de souris**

A) Visualisation avec flèches des neurones positifs pour l'ARNm du DOP (blanc) qui coexpriment avec l'ARNm de P2RX3 (vert). B) Visualisation avec flèches des neurones positifs pour l'ARNm du MOP (rouge) qui coexpriment avec l'ARNm de P2RX3 (vert). C) Visualisation avec flèches des neurones positifs pour l'ARNm du DOP (blanc) et du MOP (rouge) qui coexpriment avec l'ARNm de P2RX3 (vert). D) Visualisation avec flèches des neurones positifs pour l'ARNm du DOP (blanc) qui coexpriment avec IB4 (vert). E) Visualisation avec flèches des neurones positifs pour l'ARNm du MOP (rouge) qui coexpriment avec IB4 (vert). F) Visualisation avec flèches des neurones positifs pour l'ARNm du DOP (blanc) et du MOP (rouge) qui coexpriment avec IB4 (vert). G) Pourcentage de distribution de l'ARNm du DOP, du MOP (H) et de la coexpression entre les deux récepteurs (I) dans les deux marqueurs des fibres C non peptidergiques dans des TG de souris. Test t de Welch, \*\*  $p \leq 0,01$ . Échelle 50  $\mu$ m. Les résultats montrent la moyenne  $\pm$  SD.

Puisque d'aussi grandes différences ont été obtenues quant à la distribution des récepteurs dans les TG en utilisant deux marqueurs des fibres C non peptidergiques, soit IB4 et P2RX3, nous nous sommes demandés si ces deux marqueurs identifiaient réellement la même population neuronale dans les TG de souris. Pour le vérifier, nous avons fait des essais de RNAscope avec la sonde P2RX3 en combinant avec une immunofluorescence avec le marqueur IB4. Les résultats obtenus peuvent être observés à la Figure 17. En effet, on peut y voir le marquage des noyaux cellulaires en bleu avec le marqueur DAPI, l'ARNm de P2RX3 en blanc, IB4 en vert ainsi que la fusion des trois images (Figure 17A). En 17B, il est possible de voir des flèches sur l'image qui fusionne les trois marqueurs qui représentent les neurones coexprimant P2RX3 et IB4 (trois flèches sont présentes).

Cet exercice nous a permis de voir que  $40,4\% \pm 9,9\%$  des neurones IB4 positifs sont aussi positifs pour l'ARNm de P2RX3 (Figure 17C). À l'inverse,  $35,4\% \pm 9,8\%$  des neurones positifs pour l'ARNm de P2RX3 coexpriment IB4 (Figure 17D). Environ 35% de la population neuronale quantifiée (quantifiée lorsque positif pour IB4 et/ou P2RX3) dans ces TG de souris est positive pour IB4, alors qu'environ 42% de ces neurones sont positifs pour P2RX3 (Figure 17E). Seulement 23% des neurones quantifiés sont positifs pour ces deux marqueurs à la fois (Figure 17E).

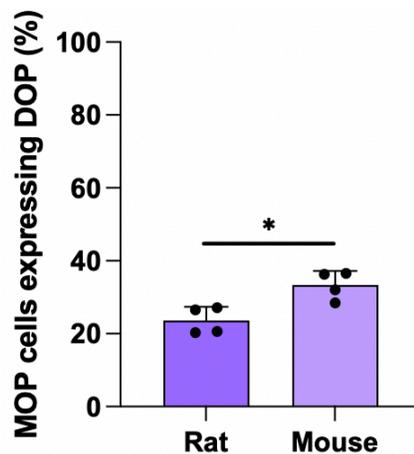


**Figure 17: Distribution des marqueurs des fibres C non peptidergiques dans les ganglions trijumeaux de souris**

A) Visualisation du DAPI (bleu), de l'ARNm de P2RX3 (blanc), d'IB4 (vert) et de la fusion des trois images dans un TG de souris. B) Fusion des trois images avec flèche qui montrent les neurones coexprimant IB4 et P2RX3. C) Pourcentage des neurones IB4 positifs qui coexpriment avec l'ARNm de P2RX3. D) Pourcentage des neurones positifs pour l'ARNm de P2RX3 qui coexpriment avec IB4. E) Graphique pointe de tarde qui représente la distribution des deux marqueurs dans les TG de souris. Échelle 50µm. Les résultats montrent la moyenne  $\pm$  SD.

### 3.2.3 Comparaison de la distribution du DOP et du MOP dans les TG interspèce

Pour terminer ma maîtrise, j'ai voulu voir si des différences étaient présentes dans la distribution du DOP et du MOP entre les TG de rats et de souris. Lors de nos analyses statistiques, une seule différence est apparue, et ce, pour les neurones positifs pour l'ARNm du MOP qui expriment aussi l'ARNm du DOP. Effectivement, la proportion de neurones MOP-DOP positifs est significativement plus grande dans les TG de souris en comparaison à ceux de rats ( $p = 0,0109$ ) (Figure 18).

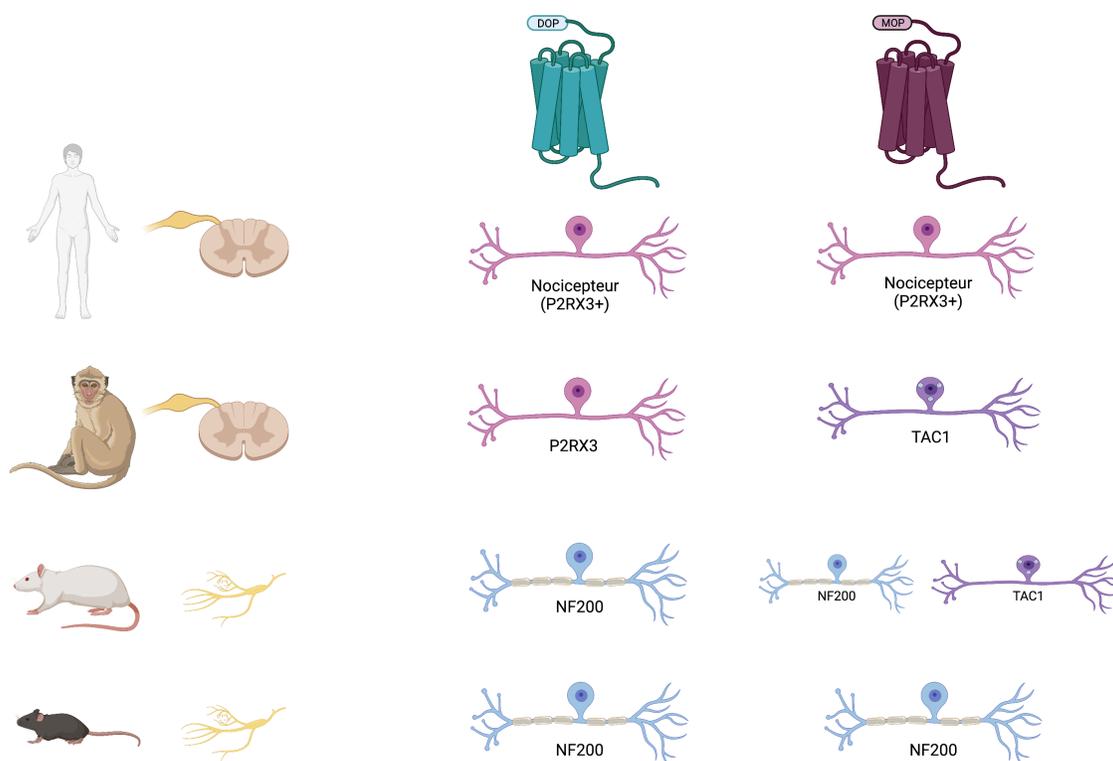


**Figure 18: Différence dans la distribution des récepteurs opioïdes dans les ganglions trijumeaux entre les différents rongeurs**

Pourcentage de la distribution de l'ARNm du MOP qui coexprime avec l'ARNm du DOP dans les TG de rats et de souris. Test t de Welch, \*  $p \leq 0,05$ . Les résultats montrent la moyenne  $\pm$  SD.

## DISCUSSION

Dans le cadre de mes travaux de maîtrise, je me suis intéressée à la distribution et à la coexpression du DOP et du MOP dans les afférences primaires de différentes espèces pour avoir une meilleure idée du rôle de ces récepteurs dans le contrôle de la douleur ainsi que du potentiel analgésique d'agonistes DOP dans différents types de douleur. Comme énoncé précédemment, le DOP semble avoir un rôle majeur au niveau des afférences primaires. En effet, son rôle dans les afférences primaires est supporté par le fait que de sa délétion des fibres nociceptives des afférences primaires empêche la réponse analgésique des agonistes DOP lors de l'utilisation de stimulus mécanique dans des modèles de douleur chronique inflammatoire et neuropathique (Gaveriaux-Ruff et al., 2011). De plus, la réintroduction du DOP uniquement dans les afférences primaires dans des souris n'exprimant pas le DOP à l'aide d'un virus AAV permet de produire de l'analgésie dans un modèle de douleur inflammatoire provoquée par l'injection de CFA (Degrandmaison et al., 2020). Puisque nous savons que les agonistes DOP sont efficaces pour procurer de l'analgésie dans des modèles de douleur migraineuse, nous nous sommes aussi penchés sur la distribution du DOP dans les ganglions trijumeaux de rats et de souris grâce au RNAscope, une technique d'hybridation *in situ* très spécifique (Dripps et al., 2020; Moye et al., 2021). De plus, une spécialisation du DOP dans le traitement de la douleur est suggérée chez les primates dû à l'augmentation de sa présence dans les DRG et sa localisation dans les fibres nociceptives chez les espèces supérieures (Mennicken et al., 2003). Sachant que les humains répondent aux agonistes DOP et que ce récepteur est retrouvé dans les DRG humains, nous nous sommes aussi intéressés à sa distribution dans les DRG de primates, soit de singes et d'humains. Encore une fois, le RNAscope a été utilisé pour atteindre nos objectifs de recherche. Dans ces deux cas, nous avons aussi évalué la distribution du MOP et de la coexpression entre le DOP et le MOP. De nombreuses études montrent qu'une interaction fonctionnelle entre le DOP et le MOP existe et que l'hétéromérisation entre ces récepteurs est possible et est aussi une cible potentielle dans le traitement de la douleur (Gendron et al., 2007; Gendron et al., 2006; Gomes et al., 2000; Tiwari et al., 2020). Ceci montre donc l'importance de voir dans quel type de neurones cette coexpression entre les deux récepteurs est présente (Fujita, 2020; Constantino et al., 2012; Gendron et al., 2015).



**Figure 19: Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans cette étude**

Schéma montrant le type de neurone où l'expression du DOP et du MOP est la plus grande dans les DRG humains et de singes ainsi que dans les TG de rat et de souris. Figure créée à l'aide de Biorender.

#### 4.1 Distribution du DOP et du MOP dans les DRG de primates

La distribution des récepteurs opioïdes dans les ganglions de la racine dorsale est un sujet très étudié et controversé chez les rongeurs (Quirion et al., 2022; Scherrer et al., 2009; Wang et al., 2010; Bardoni et al., 2014). Chez les primates, il y a encore peu d'étude qui ont été faites à ce jour sur ce sujet (Moy et al., 2020; Mennicken et al., 2003; Zhang et al., 1998). Cela démontre l'importance d'effectuer des études chez les espèces supérieures pour voir si une dichotomie existe entre les espèces et donc si le rôle des récepteurs peut varier au cours de l'évolution. Les études menées chez les primates non humains ont des résultats un peu contradictoires. Une première étude utilisant l'hybridation *in situ* montre que le DOP est présent dans les neurones de toutes dimensions avec une préférence dans ceux de moyen diamètre alors qu'une autre utilisant l'immunohistochimie voit uniquement du marquage DOP dans les neurones de petit diamètre (Mennicken et al., 2003; Zhang et al., 1998). Pour ce qui est du MOP, environ 18% des neurones des DRG de singes y sont positifs et la majorité

d'entre eux sont de petit diamètre en plus d'être positifs pour le CGRP, un marqueur des fibres C peptidergiques, ce qui est confirmé par RNA-seq (Zhang et al., 1998; Kupari et al., 2021). Chez l'homme, le DOP a été observé par hybridation *in situ* avec une intensité égale entre tous les types neuronaux, un résultat correspondant à ceux obtenus par RNA-seq (Mennicken et al., 2003; Tavares-Ferreira et al., 2022; Flegel et al., 2015). L'imagerie calcique a aussi permis de détecter des récepteurs opioïdes fonctionnels dans les DRG humains où le DOP était présent dans près de 50% des neurones avec plusieurs indices indiquant une coexpression avec le MOP au niveau de fibres C peptidergiques (cette coexpression avec le MOP au niveau des fibres C peptidergiques est aussi vu au niveau de l'ARNm) (Moy et al., 2020). Pour terminer, le gène OPRM1 (codant pour le MOP) est détecté dans les DRG humains et est présent dans de nombreux nocicepteurs (nocicepteurs silencieux, sensibles au froid, TRPA1 positifs, A $\delta$ -HTMRs, A $\beta$ -HTMRs) par RNA-seq (Wangzhou et al., 2020; Tavares-Ferreira et al., 2022). Nos résultats obtenus grâce à l'hybridation *in situ* avec la technologie RNAscope combinée à l'immunofluorescence chez le singe sont plutôt en accord avec les résultats présents dans la littérature. Effectivement, le DOP est principalement localisé dans les fibres C non peptidergiques ( $45,0\% \pm 5,3\%$ ) et moins retrouvé dans les fibres myélinisées ( $22,6\% \pm 6,9\%$ ).

Inversement, le MOP est surtout exprimé au niveau des fibres C peptidergiques ( $66,7\% \pm 10,2\%$ ), puis également entre les fibres myélinisées A $\alpha$ , A $\beta$  et A $\delta$  ( $45,7\% \pm 10,0\%$ ) et les fibres C non peptidergiques ( $42,9\% \pm 6,0\%$ ). Les neurones coexprimant le DOP et le MOP étaient essentiellement myélinisés ( $65,0\% \pm 5,6\%$ ), mais aussi présents dans les fibres C non peptidergiques ( $50,0\% \pm 11,0\%$ ) et peptidergiques ( $39,1\% \pm 15,3\%$ ). Ces données sont assez près de la littérature, car tout comme l'équipe de Zhang et al., nous voyons le DOP en plus grande partie dans les neurones de petit diamètre. Effectivement, les fibres C (peptidergiques ou non), marquées par TAC1 et P2RX3, possèdent le plus petit diamètre de tous les types de neurones des afférences primaires et ce toutes espèces confondues (Julius et Basbaum, 2001; Khalid et Tubbs, 2017; Cavanaugh et al., 2009; Zhang et al., 2013). Tout comme dans l'étude de Mennicken et al., nous observons l'ARNm du DOP dans tous les types de neurones. Par contre, ils voient le DOP majoritairement dans les neurones de moyen diamètre, donc les fibres A $\delta$  (Khalid et Tubbs, 2017; Le Pichon et Chesler, 2014; Mennicken et al., 2003). La

différence peut peut-être s'expliquer par les techniques d'hybridation *in situ* différentes utilisées. En effet, la technologie RNAscope est connue pour être très sensible et spécifique, car pour marquer un ARNm, trois sondes en double Z doivent lier le même ARNm, pour ainsi permettre au signal d'être amplifié si ces deux Z sont présents (ACDBio, s.d.). Cela peut donc éviter du marquage non spécifique qui s'est peut-être produit avec l'étude de Mennicken qui utilise l'hybridation *in situ* (sans le RNAscope) qui est beaucoup moins spécifique. De plus, l'anticorps que nous utilisons (NF200) ne fait pas la distinction entre les fibres de type A $\alpha$ , A $\beta$  et A $\delta$  ce qui peut potentiellement expliquer la différence entre nos deux études (Chen et al., 2010; Scherrer et al., 2009; Quirion et al., 2022). Nos résultats sont aussi en accord avec la littérature quant à la distribution du MOP chez le singe. Effectivement, nous l'observons en majorité dans les neurones TAC1 positifs (fibres C peptidergiques), tout comme la littérature qui le retrouve présent dans les neurones de petit diamètre exprimant le CGRP, un autre marqueur des fibres C peptidergiques (Zhang et al., 1998). De plus, une étude de RNA-seq voit le gène du MOP en majorité dans les groupes neuronaux non peptidergiques et peptidergiques (Kupari et al., 2021). Malheureusement, aucun de ces ouvrages ne s'intéresse à la distribution des deux récepteurs, donc ne permet de comparer nos résultats sur la coexpression des deux résultats. Pour ce qui est des résultats obtenus dans les DRG humains, ceux-ci sont encore très préliminaires et incluent seulement deux marqueurs des nocicepteurs, TAC1 et P2RX3. Présentement, le DOP (78,1%), le MOP (80,1%) et la coexpression entre le DOP et le MOP (80,8%) sont principalement localisés dans les neurones P2RX3 positifs. Même s'il est évidemment beaucoup trop tôt pour tirer des conclusions face à ces résultats, le MOP est fortement présent au niveau des nocicepteurs tout comme dans l'étude de RNA-seq de Tavares-Ferreira en 2022. L'étude de Moy et al., est la seule qui s'intéresse, tout comme nous, à la coexpression entre les deux récepteurs. Les auteurs voient beaucoup de coexpression entre le DOP et le MOP dans les fibres possédant le récepteur TRPV1, donc nociceptives, tout comme nous à ce stade précoce de notre étude. Puisque nous avons seulement, pour l'instant, inclus des marqueurs de nocicepteurs dans notre étude, il n'est pas possible de faire la comparaison avec l'étude de Mennicken qui observe le DOP dans tous les types neuronaux. L'utilisation d'autres marqueurs sera très importante, car les données de RNA-seq voient le DOP dans plusieurs groupes de neurones non nociceptifs (Tavares-Ferreira et al., 2022; Flegel et al., 2015).

**Tableau 4: Récapitulatif des résultats des études portant sur la distribution des récepteurs opioïdes dans les ganglions de la racine dorsale chez les primates**

Étude	Distribution du DOP		Distribution du MOP		Distribution de la coexpression entre DOP et MOP	
	Singe	Humain	Singe	Humain	Singe	Humain
Beaulieu et al., 2023	Tous les neurones Principalement C non peptidergiques	Principalement nocicepteur P2RX3+	Tous les neurones Principalement C peptidergiques	Principalement nocicepteur P2RX3+	Tous les neurones Principalement myélinisés	Principalement nocicepteur P2RX3+
Moy et al., 2020		-Environ 50% des neurones répondent aux agonistes DOP  -4,5% positifs pour ARNm		-Majorité des neurones positifs aux agonistes DOP répondent aussi à ceux du MOP -24,0% positifs pour ARNm		Majorité des neurones positifs aux agonistes DOP et MOP répondent aussi à la capsaïcine (nocicepteur)
Mennicken et al., 2003	Neurones de tous les calibres avec préférence pour moyen diamètre	Tous les neurones				
Zhang et al., 1998			Principalement de petit diamètre et coexpression avec CGRP (C peptidergique)			
Zhang et al., 1998	Neurones de petit diamètre					
Kupari et al., 2021			OPRM1 détecté dans cluster non peptidergiques et peptidergiques			

Tavares-Ferreira et al., 2022		ORPD1 détecté clusters C-LTMRs, pruritogène, nocicepteurs A $\beta$		OPRM1 présent dans de nombreux clusters de nocicepteurs		
Flegel et al., 2015		ORPD1 détecté				
Xie et al., 1999		ARNm détecté		ARNm détecté		
Peng et al., 2012		ARNm grandement détecté		ARNm grandement détecté		
Wangzhou et al., 2020				OPRM1 détecté		

Nos résultats actuels suivent donc l'idée que les deux récepteurs opioïdes auxquels nous nous intéressons sont localisés au niveau des nocicepteurs, soit le premier neurone impliqué dans la perception de stimuli intenses pouvant potentiellement être dangereux pour l'organisme. J'ai confiance que notre méthode s'avèrera efficace pour valider la distribution des récepteurs opioïdes dans les DRG humains. En effet, cette technique est très spécifique et sensible et a déjà été utilisée au laboratoire pour marquer le DOP et le MOP dans les DRG de rongeurs (Quirion et al., 2022). De plus, le RNAscope est de plus en plus utilisé pour marquer différents récepteurs et types neuronaux dans les DRG humains ce qui prouve son fonctionnement (Shiers et al., 2020; Tavares-Ferreira et al., 2022; Shiers et al., 2023; Papalampropoulou-Tsiridou et al., 2022; Hall et al., 2022; Ray et al., 2022).

#### 4.2 Coexpression entre les marqueurs neuronaux

Les marqueurs utilisés chez les rongeurs pour identifier chacun des types de neurones des afférences primaires sont connus pour être assez spécifiques chez les rongeurs. Classiquement, la substance P (TAC1), CGRP (CALCA) et TRPV1 sont utilisés pour identifier les fibres C peptidergiques, alors qu'IB4, P2RX3 et Mrgprd le sont pour les fibres C non peptidergiques (Scherrer et al., 2009; Julius et Basbaum, 2001; Basbaum et al., 2009). De leur côté, les fibres contenant de la myéline (A $\alpha$ , A $\beta$  et A $\delta$ ) peuvent être vues grâce aux

marqueurs NF200 et TRPV2 (Scherrer et al., 2009; Quirion et al., 2022; Bardoni et al., 2014). Chez les primates, les choses sont différentes, puisqu'un marqueur peut être dans plus d'un type cellulaire et un groupe de marqueurs représente mieux chaque type neuronal (Shiers et al., 2020; Tavares-Ferraira et al., 2022; Nguyen et al., 2021). En effet, NF200 est présent dans presque tous les neurones des DRG, alors que la liaison à IB4 ne se fait pas chez l'humain (Shiers et al., 2020; Haberberger et al., 2019; Rosotck et al., 2018; Davidson et al., 2014). P2RX3 est tout de même retrouvé dans des neurones de petit diamètre nociceptif dans les DRG humains tout comme TAC1 (Flegel et al., 2015; Saito-Diaz et al., 2021). Chez le macaque, TAC1 est retrouvé dans les groupes de neurones peptidergiques, alors que P2RX3 est retrouvé dans les groupes de neurones peptidergiques et non par RNA-seq (Kupari et al., 2021). Chez le singe-écureuil, 30% des neurones des DRG sont marqués par RT97, un marqueur des fibres myélinisées, alors que 54% des neurones le sont pour IB4 et 61% pour CGRP (Pierce et al., 2006). Les neurones marqués par RT97 étaient significativement plus grands que ceux marqués par IB4 et CGRP. Seulement 3% de coexpression était présent entre RT97 et IB4, alors que celle entre IB4 et CGRP était très grande (Pierce et al., 2006). Par RNAscope, les marqueurs CALCA et P2RX3 coexpriment beaucoup dans les DRG humains ce qui n'est pas observé chez la souris. Cette augmentation semble être due à un nombre significativement plus élevé de neurones CALCA positifs chez l'humain comparativement à la souris (aucun changement dans la proportion de neurones P2RX3 positifs entre les deux espèces). Des niveaux de coexpression similaires sont présents entre les protéines CGRP et P2RX3 par immunofluorescence sur des DRG humains. Ces résultats indiquent donc que, chez l'humain, les populations de fibres C peptidergiques et non peptidergiques distinctes n'existent pas et sont plutôt mélangées contrairement aux rongeurs (Shiers et al., 2020; Shiers et al., 2021). Puisque la majorité du travail sur la spécificité des marqueurs neuronaux chez les primates est effectuée chez l'humain, nous avons voulu déterminer quel niveau de coexpression était présent entre nos trois marqueurs des fibres des afférences primaires dans les DRG de singes. Avec notre technique de RNAscope grâce aux sondes TAC1 et P2RX3 combinées à l'immunofluorescence NF200, nous avons observé de forts niveaux de coexpression entre nos différents marqueurs. Effectivement, pour les neurones NF200-positifs, nous avons identifié 10,7% de coexpression entre NF200 et TAC1, 32% de coexpression entre NF200 et P2RX3 ainsi que 5% entre les trois marqueurs. Les neurones

TAC1-positifs avaient près de 20% de coexpression avec NF200, 16,5% de coexpression avec P2RX3 ainsi que 8,5% avec NF200 et P2RX3. Quant à eux, les neurones positifs pour P2RX3 coexprimaient à 35% avec NF200, 10,3% avec TAC1 et 5% avec les deux autres marqueurs à la fois. Il est difficile de comparer nos données avec celles de la littérature, car elles sont peu présentes chez le singe. La seule étude comparant différents marqueurs le fait partiellement. En effet, nous avons comparé nos trois marqueurs, alors que l'équipe de Pierce a seulement comparé les fibres myélinisées aux C peptidergiques et les deux types de fibres C ensemble. Nous avons observé de forts niveaux de coexpression entre NF200 et P2RX3, nos marqueurs pour les fibres myélinisées et C non peptidergiques, alors que l'autre étude voit seulement 3% de coexpression avec ses marqueurs (RT97 et IB4) (Pierce et al., 2006). Entre TAC1 et P2RX3, nous avons environ 15% de coexpression alors que l'autre équipe en voyait beaucoup plus (près de 80%) (Pierce et al., 2006). Ces grandes différences sont potentiellement dues aux différents marqueurs utilisés entre nos deux études et aux techniques utilisées. Nous avons utilisé par RNAscope les marqueurs TAC1 et P2RX3 et NF200 par immunofluorescence, alors que l'autre étude a utilisé uniquement par immunofluorescence les marqueurs RT97, IB4 et CGRP (Pierce et al., 2006). Nous avons montré dans nos résultats dans les TG de souris que les neurones marqués par IB4 et P2RX3 représentent seulement 23% de la population neuronale marquée par au moins un de ces deux marqueurs, ce qui peut aussi expliquer la différence observée. Chez l'humain, la présence de CGRP (CALCA) est significativement plus grande que chez la souris (Shiers et al., 2020). C'est peut-être aussi le cas chez le singe, ce qui explique le 80% de coexpression avec IB4 (Pierce et al., 2006). Comme expliqué plus tôt, le RNAscope est extrêmement sensible et spécifique, alors que l'immunofluorescence comme dans l'étude de Pierce peut être très subjective. Puisque les marqueurs que nous utilisons pour marquer les fibres C peptidergiques (TAC1) et non peptidergiques (P2RX3) ont été confirmés spécifiques à ces types neuronaux par RNA-seq chez le singe, je crois qu'il est correct de poursuivre le travail avec ces deux marqueurs et continuer de les associer à leur type de fibre respectif (Kupari et al., 2021). Évidemment, une étude similaire dans les DRG humains serait pertinente pour voir l'état et comparer les niveaux de coexpression entre les différents primates que nous étudions.

### 4.3 Distribution du DOP et du MOP dans les TG de rongeurs

Contrairement à la distribution des récepteurs opioïdes dans les ganglions de la racine dorsale, celle dans les ganglions trijumeaux est très peu étudiée. Les études actuelles démontrent que, chez les rongeurs, le DOP est principalement localisé dans les fibres myélinisées ( $A\alpha$ ,  $A\beta$  et  $A\delta$ ; NF200 positives) et les fibres C peptidergiques (CGRP positives), alors qu'il n'est pas localisé dans les fibres C non peptidergique (IB4 positives) (Mennicken et al., 2003; Moye et al., 2021; Rice et al., 2016; Ichikawa et al., 2005). De son côté, le MOP semble seulement exprimé dans les neurones C peptidergiques (Lee et al., 2016). Malheureusement, ces études n'abordent pas la coexpression entre ces deux récepteurs opioïdes. Les résultats que nous avons obtenus à l'aide de l'hybridation *in situ* avec la technologie RNAscope couplée à l'immunofluorescence sont partiellement en accord avec ce que la littérature actuelle présente, puisque nous voyons bel et bien le DOP dans les fibres myélinisées et C peptidergiques. Chez le rat, nous avons montré que le DOP est majoritairement localisé dans les neurones myélinisés  $A\alpha$ ,  $A\beta$  et  $A\delta$  ( $66,7\% \pm 8,5\%$ ) et le moins retrouvé dans les fibres C non peptidergiques ( $7,3\% \pm 2,5\%$ ) pendant qu'une petite proportion était dans les fibres C peptidergiques ( $15,3\% \pm 3,3\%$ ). Du côté de la souris. Le DOP était aussi présent en majeure partie dans les fibres myélinisées ( $56,1\% \pm 5,4\%$ ), suivi des fibres C peptidergiques ( $17,7\% \pm 10,6\%$ ) et des fibres C non peptidergiques ( $4,8\% \pm 1,3\%$ ) des neurones DOP positifs étaient positifs pour IB4 pendant que  $39,0\% \pm 10,0\%$  coexprimaient P2RX3). En ce qui a trait au MOP, sa distribution est presque égale entre les fibres myélinisées ( $40,5\% \pm 9,4\%$  chez le rat et  $49,7\% \pm 4,5\%$  chez souris) et C peptidergiques ( $38,0 \pm 3,7\%$  chez le rat et  $34,4\% \pm 4,0\%$  chez la souris), alors qu'une plus faible proportion est dans les fibres C non peptidergiques ( $19,0\% \pm 9,5\%$  chez le rat et  $12,7\% \pm 1,7\%$  pour IB4 et  $36,5\% + 5,8\%$  pour P2RX3 chez la souris). Pour ce qui est de la localisation de la coexpression entre les deux récepteurs, la majeure proportion d'entre elle était encore une fois dans les fibres myélinisées  $A\alpha$ ,  $A\beta$  et  $A\delta$  pour les deux espèces étudiées ( $58,9\% \pm 9,9\%$  chez le rat et  $72,5\% \pm 5,0\%$  chez la souris), suivi des fibres C peptidergiques ( $31,5\% \pm 3,8\%$  chez le rat et  $26,0\% \pm 9,0\%$  chez la souris) et non peptidergiques ( $13,1\% \pm 7,5\%$  chez le rat et  $3,4\% \pm 1,4\%$  pour IB4 et  $41,7\% + 10,7$  pour P2RX3 chez la souris). Comme mentionné plus tôt, nos résultats supportent donc en partie le fait que le DOP est

localisé dans les fibres myélinisées et C peptidergiques. Par contre, ils sont différents puisque nous retrouvons aussi du DOP dans les fibres C non peptidergiques. En effet, en utilisant une souris DOR-eGFP combinée à des immunofluorescences, le DOP est retrouvé en grande partie dans les neurones myélinisés et C peptidergiques (NF200 et CGRP positifs) et non dans les neurones C non peptidergiques (IB4 positifs) au niveau des ganglions trijumeaux (Moye et al., 2021). Pour ce qui est du MOP, la littérature cite qu'il est uniquement présent dans les neurones C peptidergiques (Lee et al., 2016; Rice et al., 2016) ce qui n'est pas le cas dans notre étude, puisque notre technique le détecte dans tous les types de neurones. Les disparités dans les résultats obtenus peuvent être expliquées par les différentes techniques utilisées dans les études. En effet, nous avons utilisé une technique extrêmement sensible et spécifique pour marquer l'ARNm messager des récepteurs opioïdes delta et mu, alors que dans les études étudiant le MOP, un anticorps a plutôt été utilisé ce qui peut moins bien détecter un récepteur présent en moins grande quantité, surtout sachant que la protéine est principalement localisée dans les terminaisons des afférences primaires contrairement à l'ARNm. En effet, avec l'utilisation d'immunofluorescence, un seuil doit être appliqué pour distinguer les cellules positives du bruit de fond de l'image ce qui est très subjectif. De ce fait, des cellules MOP positives, dans d'autres types de neurones, dans ces études auraient pu ne pas être quantifiées à cause de ce seuil. Ensuite, l'utilisation d'une étiquette GFP sur un récepteur comme le DOP au niveau de sa queue C-terminale (souris DOR-eGFP) peut changer sa localisation subcellulaire et donc provoquer des résultats divergents des nôtres (Gendron et al., 2016; Gendron et al., 2015; Degrandmaison et al., 2022). Pour terminer, le marqueur IB4 était utilisé dans les études citées pour identifier les fibres C non peptidergiques et il n'y avait pas de coexpression avec les récepteurs opioïdes (Moye et al., 2021; Rice et al.). Dans notre étude, peu de coexpression était présente avec ce marqueur, alors qu'avec P2RX3 la coexpression entre les récepteurs opioïdes et les fibres C non peptidergiques était significativement augmentée chez la souris. Les différences notées sont potentiellement seulement dues à la différence de marqueurs entre les études.

**Tableau 5: Récapitulatif des résultats des études portant sur la distribution des récepteurs opioïdes dans les ganglions trijumeaux chez les rongeurs**

Étude	Distribution du DOP		Distribution du MOP		Distribution de la coexpression entre DOP et MOP	
	Rat	Souris	Rat	Souris	Rat	Souris
Beaulieu et al., 2023	Tous les neurones  Principalement myélinisés	Tous les neurones  Principalement myélinisés	Tous les neurones  Principalement myélinisés et C peptidergiques	Tous les neurones  Principalement myélinisés	Tous les neurones  Principalement myélinisés	Tous les neurones  Principalement myélinisés
Mennicken et al., 2003	Neurones principalement de large diamètre					
Moye et al., 2021		40% des neurones DOP coexpriment CGRP (C peptidergiques)  3,7% des neurones totaux coexpriment DOP et CGRP  Principalement localisé dans les neurones myélinisés				
Rice et al., 2016	Forte coexpression entre DOP et CGRP  Très peu de coexpression avec NF200 (myélinisés)					

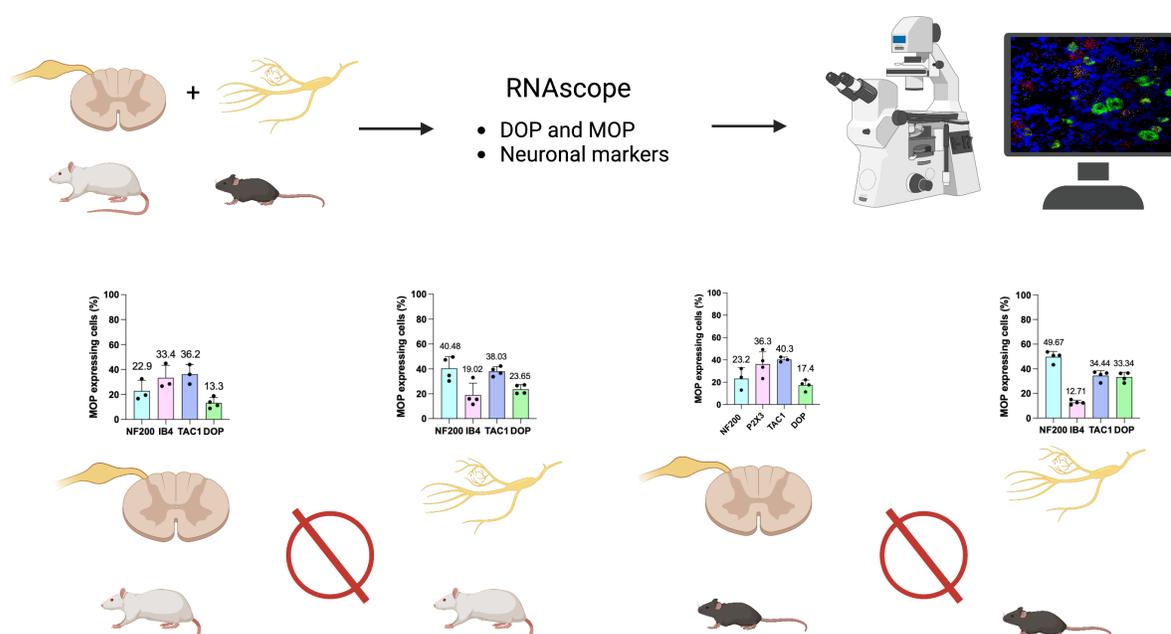
Ichikawa et al., 2005	Principalement neurone petit-moyen diamètre  Tous les neurones DOP coexpriment CGRP					
Lee et al., 2016			Coexpression avec TRPV1 (C peptidergiques)			

Même si nos données face à la distribution du DOP semblent près de ce qui est présent actuellement dans la littérature (principalement dans les fibres myélinisées et C peptidergiques), nous ne pouvons pas conclure que nous avons exactement les mêmes puisque nous retrouvons aussi le DOP dans les fibres C non peptidergiques et que nous voyons le MOP dans tous les types de neurones des ganglions trijumeaux. Comme mentionné ci-haut, le fait que nous utilisons l'hybridation *in situ* avec la technologie RNAscope peut être lié à ces différences puisqu'aucune autre des études ne l'a utilisée. En effet, cette technique très spécifique marque l'ARNm de nos récepteurs et non la protéine même. En sachant que ce n'est pas tout l'ARNm qui sera traduit en protéine, donc en un récepteur fonctionnel, il est possible que cela entraîne des différences. De plus, certains marqueurs neuronaux utilisés divergeaient entre les études. Par exemple, la littérature citée utilisait majoritairement CGRP comme marqueur des fibres C peptidergiques, alors que nous nous sommes plutôt tournés vers TAC1 que nous possédions déjà au laboratoire. Du côté des fibres C non peptidergiques, nous avons remarqué dans notre étude que le marquage par IB4 et P2RX3 a seulement 23% de coexpression et que la distribution des récepteurs opioïdes est significativement différente entre ces deux marqueurs. Cela peut donc expliquer que les études citées ne voient pas de coexpression entre le DOP/MOP et les fibres C non peptidergiques, sachant que seulement IB4 a été employé. Je crois tout de même que cette étude peut très bien démontrer la distribution des récepteurs au niveau de tous les neurones des ganglions trijumeaux chez le rat comme chez la souris. Le RNAscope est encore une

nouvelle technique ce qui peut expliquer pourquoi les études plus anciennes ne l'ont pas utilisé.

#### 4.4 Différences dans la distribution du DOP et du MOP entre les types d'afférences primaires

Pendant cette étude, nous avons découvert quelques différences dans la distribution des récepteurs opioïdes entre les différents types d'afférences primaires d'une même espèce. En effet, la distribution du DOP et du MOP n'est pas nécessairement la même dans un DRG et un TG. Chez le rat, nous avons seulement observé une différence pour les neurones MOP positifs qui coexpriment aussi avec le DOP où la quantité de neurones était significativement plus grande dans les DRG que dans les TG. Chez la souris, le DOP, le MOP et la coexpression entre le DOP et le MOP dans les fibres C non peptidergiques sont significativement plus grands dans les DRG (marqueur utilisé P2RX3) que dans les TG (marqueur utilisé IB4). De plus, le MOP coexprime significativement plus avec NF200 et le DOP dans les TG de souris en comparaison avec les DRG de souris.



**Figure 20: Schématisation des différences obtenues dans la distribution des récepteurs opioïdes entre les types d'afférences primaires**

Schéma expliquant la méthodologie utilisée pour étudier la distribution des récepteurs opioïdes dans les afférences primaires de rongeurs ainsi que les résultats obtenus pour la distribution du MOP dans les DRG et TG. Comme observé sur le schéma, la distribution est différente entre les deux tissus. Inspiré de Papalampropoulou-Tsiridou et al., 2022. Figure créée à l'aide de Biorender.

Comme mentionné plus tôt, le même marqueur des fibres C non peptidergiques n'a pas été utilisé pour toutes les espèces étudiées (IB4 pour le rat et les TG de souris et P2RX3 pour la souris et le singe). En effet, l'anticorps IB4 que nous avons utilisé chez le rat ne fonctionnait pas dans les DRG frais de souris avec lesquels nous devons travailler. Le choix du marqueur P2RX3 par RNAscope a été fait, puisque celui-ci est aussi reconnu pour marquer les fibres C non peptidergiques et certaines études mentionnent qu'il colocalise à 94% avec IB4 (Basbaum et al., 2009; Julius et Basbaum, 2001; Vulchanova et al., 1998). Par contre, dans nos analyses nous avons obtenu des résultats assez différents de ce que présente la littérature. En effet, nous avons comparé le marquage IB4 à celui de P2RX3 dans les TG de souris dû aux nombreuses différences obtenues entre les espèces et les types d'afférences primaires dans les fibres C non peptidergiques qui n'avaient pas le même marqueur. En combinant le RNAscope pour P2RX3 et l'immunofluorescence avec IB4, nous avons observé que seulement 40% des neurones IB4-positifs sont P2RX3-positifs et qu'à l'inverse, 35% des neurones P2RX3-positifs sont IB4-positifs. De façon encore plus surprenante, seulement 23% de la population neuronale positive pour au moins un de ces deux marqueurs coexprimaient IB4 et P2RX3. Cela nous amène donc à croire que ces deux marqueurs n'identifient pas exactement la même population neuronale. La technique de RNA-seq chez la souris a récemment montré qu'un groupe de neurones non peptidergiques exprime légèrement P2RX3 alors qu'IB4 y est absent (Usoskin et al., 2015). En poursuivant nos analyses statistiques, nous avons vu que les différences observées entre la distribution du DOP, MOP et de la coexpression entre les récepteurs dans les fibres C non peptidergiques avec le marqueur P2RX3 dans les TG et les DRG de souris n'étaient plus présentes. Cela confirme donc notre hypothèse que c'est plutôt le changement de marqueur qui induisait les différences observées. Les réelles différences présentes, soient le MOP qui coexprime plus avec le DOP dans les TG de rats et de souris et le MOP qui coexprime plus avec NF200 dans les TG de souris que dans les DRG, peuvent indiquer que l'interaction entre le DOP et le MOP est différente entre les DRG et les TG, toutes espèces confondues, et que le rôle du MOP est potentiellement plus important pour la détection des douleurs mécaniques faciales que celles dans le reste du corps chez la souris. Une seule autre étude compare la distribution du DOP entre les DRG et le TG d'une même espèce (aucune ne s'intéresse au MOP ou à la

coexpression entre les deux récepteurs). Dans cette étude faite par hybridation *in situ*, les auteurs ne voient aucune différence dans la distribution de l'ARNm du DOP entre les DRG et les TG de rats et d'humains (Mennicken et al., 2003). En effet, pour le rat, le marquage le plus intense se situe au niveau des neurones de large diamètre dans les DRG et TG, alors que pour l'humain le marquage était présent avec la même intensité dans tous les types de neurones dans les deux tissus (Mennicken et al., 2003). Leurs résultats correspondent donc avec les nôtres, car tout comme nous, ils ne voient pas de différence dans la distribution du DOP entre les différents types de neurones chez le rat. Une étude assez récente de transcriptomique a obtenu des différences entre l'expression génique dans les DRG vs les TG de souris, car certains gènes étaient spécifiques au DRG ou au TG (Sharma et al., 2020). De façon similaire à ce que nous avons obtenu, les récepteurs opioïdes ne sont pas identifiés dans les gènes dont l'expression change entre les DRG et les TG (Sharma et al., 2020; Megat et al., 2019). Dans notre cas, l'expression du MOP dans les neurones myélinisés est présente dans une plus grande proportion de neurones dans les TG comparativement aux DRG, ce qui n'est pas montré dans les études de RNAseq. Cette différence est peut-être due au fait que les techniques utilisées sont différentes. Cela nous amène à émettre comme hypothèse que le rôle des récepteurs opioïdes est similaire dans les DRG et dans les TG. Évidemment, de nouvelles études sont nécessaires pour confirmer notre résultat et cette nouvelle hypothèse.

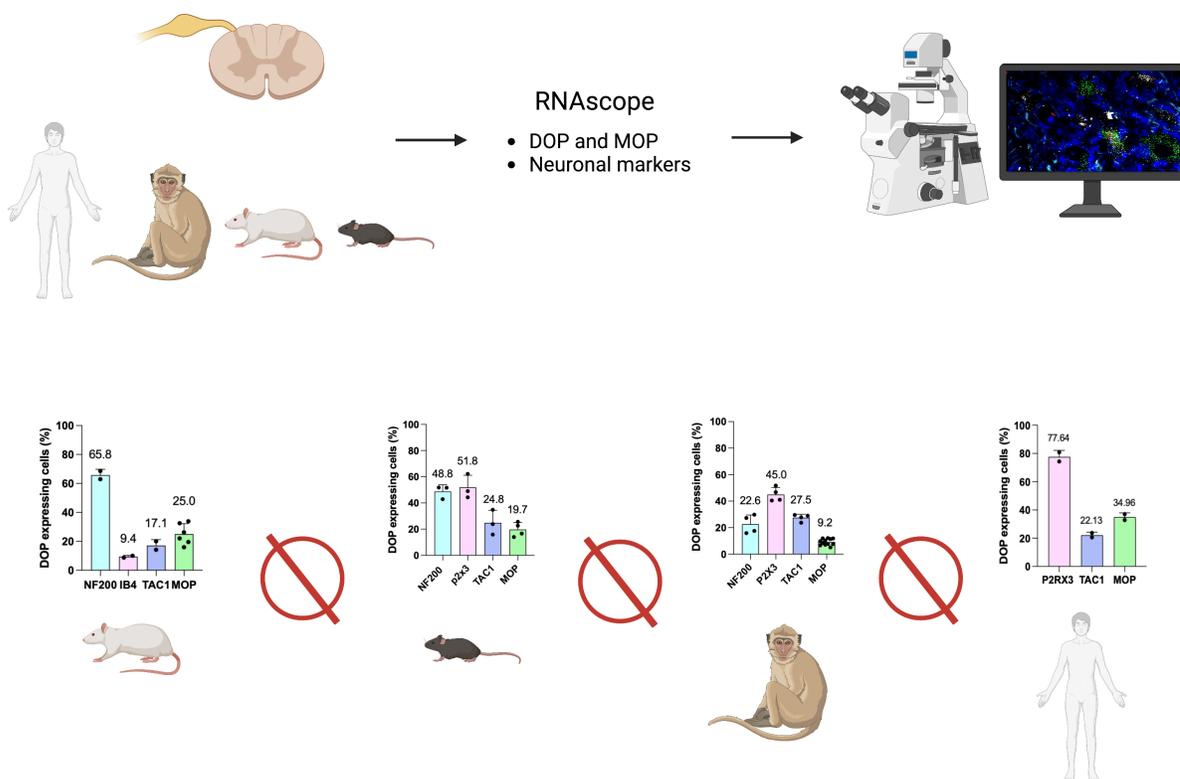
#### **4.5 Différences dans la distribution du DOP et du MOP entre les espèces**

Une des choses que nous avons observées dans cette étude est la présence de différences significatives entre la distribution du DOP et du MOP dans les DRG et les TG entre les espèces étudiées (rat, souris et singe). Le plus grand nombre de divergences perçu était pour la distribution du DOP, suivi du MOP alors qu'une seule différence était présente pour la coexpression entre le DOP et le MOP. Toutes les différences présentes pour la distribution du DOP entre les espèces sont détectées au niveau des DRG. Un des grands changements interspèce pour le DOP est qu'il est moins exprimé dans les fibres myélinisées chez le singe en comparant au rat et à la souris alors qu'il est dans un plus grand nombre de fibres C peptidergiques chez le singe comparativement au rat. Le rat possède aussi plus du DOP dans ses fibres myélinisées que chez la souris. Ensuite, l'ARNm du DOP qui coexprime avec le MOP est significativement plus grand chez le rat que chez le singe. Pour les fibres C non

peptidergiques, le rat possède significativement plus de coexpression DOP-IB4 que le singe et la souris avec DOP-P2RX3. Pour ce qui est des différences interspèces pour le MOP, la quantité de neurones MOP-TAC1 et MOP-DOP dans les DRG est significativement plus grande chez le singe que chez le rat et la souris. Dans les TG, la quantité de neurones MOP positifs qui coexprime le DOP est plus grande chez la souris que chez le rat. Pour les différences entre les neurones qui coexpriment le DOP et le MOP, les seules présentes sont au niveau des fibres C non peptidergiques des DRG. En effet, la quantité de neurones DOP-P2RX3 est plus grande chez le singe et la souris que chez le rat avec DOP-IB4. Comme expliqué dans la section précédente, nous avons remarqué que les marqueurs P2RX3 et IB4 n'identifient pas exactement la même population neuronale. Comme pour les différences perçues entre les DRG et les TG de souris dans les fibres C non peptidergiques, celles obtenues aussi dans ces fibres peuvent être oubliées puisqu'elles sont dues à l'utilisation de marqueurs différents ne marquant pas la même population neuronale. Aucune autre étude ne s'intéresse à la comparaison de la distribution du DOP et du MOP à la fois dans les DRG. Par contre, certaines le font pour un récepteur à la fois. Pour commencer, deux études ont observé par immunohistochimie le DOP et le MOP dans des neurones de petit diamètre dans les DRG de rats et de singes, donc il n'y avait pas de différence entre les espèces (Zhang et al., 1998; Zhang et al., 1998). Ces résultats sont différents des nôtres, où nous voyons une différence dans la distribution des fibres C peptidergiques pour le DOP et le MOP. En effet, nous voyons plus de neurones positifs pour les récepteurs opioïdes et TAC1 chez le singe que chez le rat. Cette différence peut encore une fois être expliquée par la différence de techniques utilisées. Le RNAscope est très spécifique et sensible alors que l'utilisation d'anticorps contre le DOP ne l'est pas nécessairement. Une autre étude sur le DOP a obtenu des différences dans la distribution de celui-ci dans les DRG entre espèces (Mennicken et al., 2003). Chez le rat, le DOP était principalement dans les fibres de large diamètre, alors que chez le singe il était plus au niveau des fibres de moyen diamètre (Mennicken et al., 2003). Ces résultats sont partiellement en accord avec ceux que nous avons obtenus. Effectivement, nous ne pouvons pas tirer de conclusion pour les fibres de moyen diamètre, car les fibres A $\delta$  sont marquées avec les autres fibres myélinisées avec le marqueur NF200. Par contre, nos résultats montrent qu'il y a significativement plus de DOP qui coexprime avec NF200 dans les DRG de rats comparativement à ceux de singes ce qui concorde bien avec l'augmentation

du DOP dans les fibres de large diamètre chez le rat comparativement au singe dans l'étude de Mennicken. La seule différence obtenue dans l'étude de Zhang était pour la quantité du MOP qui était plus grande chez le rat que chez le singe. Une étude de RNA-seq a aussi obtenu des résultats sur la quantité du MOP, où il était enrichi dans les DRG humains comparativement à ceux de souris (Tavares-Ferreira et al., 2022). Ce même genre de changement dans la quantité de récepteurs a aussi été observé avec l'ARNm du DOP où il était plus présent dans les DRG de singes et d'humains que chez le rat (Mennicken et al., 2003). Puisque nous n'avons pas quantifié la quantité de récepteurs dans les DRG, nous ne pouvons malheureusement pas comparer nos résultats de ce côté. Malheureusement, aucune autre étude ne s'est intéressée aux différences interspèces de la distribution du MOP au niveau des TG ce qui empêche la comparaison de nos résultats. Le reste de nos différences suggère tout de même que le rôle du DOP et du MOP pourrait varier entre les espèces, puisqu'ils ne sont pas localisés au même endroit. En effet, le DOP pourrait être plus impliqué dans le contrôle de la douleur mécanique chez le rat (beaucoup plus dans les fibres myélinisées que les deux autres espèces), alors que chez le singe il pourrait être plus impliqué dans la douleur thermique (plus forte expression dans les fibres C peptidergiques que le rat) (Cavanaugh et al., 2009; Petitjean et al., 2019, McCoy et al., 2013; Almeida et al., 2004; Millan, 1999). De plus les changements interspèces entre le DOP qui coexprime avec le MOP (et vice versa), incite à croire que l'interaction entre ces récepteurs est différente entre chacune des espèces. En observant la distribution du DOP entre les espèces, il est possible de voir que la plupart des différences présentes sont entre le rat et le singe. Cela porte donc à croire que la distribution du DOP chez la souris est plus près de celle des espèces supérieures. La souris serait donc potentiellement un meilleur modèle que le rat pour étudier le DOP au niveau des DRG. Quant au MOP, ce genre d'observation n'est pas possible, puisque les différences sont présentes entre le rat et le singe et entre la souris et le singe. Ce genre de conclusion n'est pas possible pour les TG, puisque nous n'avons pas étudié la distribution au niveau des espèces supérieures. Pour étudier ce récepteur, l'utilisation de neurones de DRG d'humains/singes en culture serait donc à privilégier pour mieux comprendre leur fonctionnement. En effet, même s'il est plus facile de se procurer des souris, il ne faut pas oublier qu'au bout du compte, nous voulons aider les humains avec leur douleur. En étudiant un récepteur qui ne correspond pas à ce que nous retrouvons chez l'humain, nous

risquons d'obtenir des données qui ne se pas transposables à l'humain et qui ne permettent pas de se rapprocher d'un éventuel traitement. Évidemment, avoir la distribution complète du DOP chez l'humain sera nécessaire pour confirmer cette idée. Ces différences montrent aussi l'importance de comparer nos résultats avec ceux d'équipes qui travaillent avec la même espèce (arrêter de comparer des résultats obtenus chez la souris avec ceux chez le rat) que nous, puisque ceux-ci peuvent varier d'une espèce à l'autre. Comme démontré dans ma maîtrise, la quantité de DOP présent dans les neurones NF200 positifs est significativement plus grand chez le rat que chez la souris. Pour terminer, les variations interespèces obtenues pour un récepteur n'étaient pas nécessairement présentes pour l'autre. Cela indique que ces changements étaient spécifiques à chacun des deux récepteurs, ce qui montre que ceux-ci n'agissent potentiellement pas de la même façon dans chacune des espèces. Au final, nous avons maintenant plein d'outils disponibles pour effectuer de la recherche translationnelle. Les utiliser permettra seulement d'avoir des résultats plus représentatifs pour l'humain.



**Figure 21: Schématisation des différences obtenues dans la distribution des récepteurs opioïdes dans les DRG de différentes espèces**

Schéma expliquant la méthodologie utilisée pour étudier la distribution des récepteurs opioïdes dans les DRG de différentes espèces ainsi que les résultats obtenus pour la distribution du DOP chez celles-ci. Comme observé sur le schéma, la distribution est différente entre chacune des espèces. Inspiré de Papalampropoulou-Tsiridou et al., 2022. Figure créée à l'aide de Biorender.

#### **4.6 Potentiel analgésique du DOP et du MOP selon leur distribution**

Que ce soit dans les DRG ou les TG, les rongeurs ou les primates, le DOP et le MOP sont distribués dans tous les types de neurones des afférences primaires. Cela suggère donc que les deux récepteurs sont impliqués dans le contrôle de la douleur, et ce dans celles de type mécanique et thermique. Comme expliqué en introduction, les fibres A $\delta$  sont impliquées dans les douleurs mécaniques (principalement type 1) et thermiques (principalement type 2) (Almeida et al., 2004; Millan et al., 1999). Le rôle des fibres C est encore discutable, car certaines équipes croient qu'elles sont polymodales pendant que d'autres croient qu'elles sont plutôt impliquées dans les douleurs thermiques (C peptidergiques) et mécaniques (C non peptidergiques) séparément (Tarpley et al., 2004; Almeida et al., 2004; Vulchanova et al., 2001; Basbaum et al., 2009; Petitjean et al., 2019; Cavanaugh et al., 2009; McCoy et al., 2013). Puisque les deux récepteurs sont présents dans les fibres A $\delta$  (marquées par NF200) et dans les fibres C peptidergiques et non peptidergiques, nous croyons que ces deux récepteurs sont impliqués dans le contrôle des deux types de douleur. Évidemment, nous pensons que les proportions d'expression des récepteurs dans chacun des types de neurones peuvent influencer le rôle principal d'un récepteur. Par exemple, le rôle du DOP dans les DRG chez le singe pourrait être principalement dans les douleurs mécaniques, puisqu'il est principalement localisé dans les fibres C non peptidergiques, alors que celui du MOP serait plus au niveau des douleurs thermiques, car il est majoritairement exprimé dans les fibres C peptidergiques (Cavanaugh et al., 2009; Petitjean et al., 2019; McCoy et al., 2013). Dans les TG de rats comme de souris, le rôle du DOP pourrait être principalement impliqué dans la douleur mécanique, puisque son plus fort niveau d'expression est dans les fibres myélinisées. Pour le MOP dans les deux espèces de rongeurs, exprimé presque également dans les fibres myélinisées et C peptidergiques, le rôle pourrait être autant dans le contrôle des douleurs mécaniques que thermiques. Plusieurs études comportementales chez les rongeurs semblent en accord avec cela. En effet, le laboratoire a déjà montré par électrophysiologie extracellulaire que des agonistes DOP et MOP peuvent inhiber la transmission de l'influx nerveux douloureux suivant une stimulation nociceptive mécanique et thermique (Normandin et al., 2013). La délétion du DOP au niveau des neurones nociceptifs des afférences primaires (exprimant Nav1.8) empêche la réponse analgésique du SNC80, un agoniste DOP, lors de stimuli mécaniques ce qui indique son rôle dans le contrôle de la

douleur thermique (Gaveriaux-Ruff et al., 2011). En réinstaurant le DOP au niveau des afférences primaires, la deltorphine II, un autre agoniste DOP, permet de réinstaurer l'analgésie perdue dans des souris DOP-KO lors de stimuli nociceptifs thermiques, ce qui montre aussi l'implication du DOP dans ce type de douleur (Degrandmaison et al., 2020). L'efficacité d'agonistes DOP lors de stimulations mécaniques nociceptives dans un modèle migraineux permet de supporter l'idée du rôle du DOP dans le contrôle des douleurs mécaniques, mais cette fois-ci au niveau du visage (Bertels et al., 2022; Bertels et al., 2021; Dripps et al., 2020; Moye et al., 2021). Évidemment, ce genre de test comportemental est beaucoup plus complexe chez l'humain. Sachant, que le DADLE (agoniste DOP) permet de procurer de l'analgésie chez l'humain souffrant de douleurs cancéreuses et que le DOP est localisé dans les nocicepteurs chez les primates nous pousse à croire que le DOP a un rôle dans le contrôle des douleurs thermiques et mécaniques chez l'humain (Krames et al., 1986; Moulin et al., 1985; Onofrio et Yaksh, 1983).

La coopération entre le DOP et le MOP est quelque chose qui est observé depuis plusieurs années déjà. Que ce soit par l'absence de tolérance des agonistes MOP lors d'un KO DOP ou de l'augmentation de l'analgésie des agonistes DOP lors de la stimulation du MOP, une interaction entre les deux récepteurs est belle et bien présente (Gendron et al., 2007; Gendron et al., 2006; Guan et al., 2005; Zhu et al., 1999; Chefer et Shippenberg, 2009). L'hétéromère formé par ces deux récepteurs a aussi été démontré et certaines molécules sont même développées pour l'activer (Metcalf et al., 2012; Gomes et al., 2013; Tiwari et al., 2020; Fujita et al., 2020). Cet hétéromère est donc lui-même une cible dans le traitement de la douleur (Gendron et al., 2015; Gupta et al., 2010; Fujita, 2020; Constantino et al., 2012; Fujita et al., 2014). Bien que nos résultats ne regardent pas l'hétéromérisation entre les deux récepteurs, mais bien l'expression du DOP et du MOP dans les mêmes neurones des afférences primaires, nous voyons de bonnes proportions neuronales les exprimant tous deux. Puisqu'ils sont présents au même endroit, nous croyons que l'hétéromérisation entre le DOP et le MOP est possible dans les neurones de DRG et de TG, et ce, dans toutes les espèces étudiées. Puisque le plus fort niveau de coexpression entre les deux récepteurs est toujours au niveau des neurones myélinisés (TG, DRG et différentes espèces), nous croyons que le

rôle de cet hétéromère serait potentiellement plus au niveau du traitement des douleurs mécaniques.

#### **4.7 Impact du sexe et de l'âge dans la distribution du DOP et du MOP**

##### ***4.7.1 Impact du sexe***

Comme mentionné en introduction, des différences de sexe et de genre sont présentes dans la douleur chronique où les femmes sont plus touchées que les hommes (Mogil, 2020; Loyd et Murphy, 2014). Du côté de l'analgésie procurée par les opioïdes, de nombreuses études énoncent qu'une efficacité diminuée est présente chez la femme comparativement à l'homme (Fullerton et al., 2018; Wang et al., 2006). Différentes études de transcriptomique se sont donc intéressées aux gènes exprimés de façon différents dans les DRG humains d'hommes et de femmes. Ces études ont permis d'identifier de nombreux gènes exprimés de façon différentiels entre les hommes et les femmes (Tavares-Ferreira et al., 2022). Parmi ceux-ci, plusieurs étaient grandement impliqués dans la réponse neuro-immunitaire et la plasticité neuronale (Ray et al., 2023; North et al., 2019). Par contre, ces études ont toutes en commun de ne pas voir d'expression différentielle au niveau des récepteurs opioïdes. Les études se penchent donc sur le fait que les différences intersexes pourraient être dues à des différences anatomiques et physiologiques dans le circuit PAG-RVM-moelle épinière puisque l'administration de morphine systémique permet une activation plus grande de ce circuit chez l'homme que chez la femme (Fullerton et al., 2018; Loyd et Murphy, 2014; Shansky et Murphy, 2021). De plus, les rats mâles présentent une plus grande densité de MOP au niveau du PAG que les rats femelles (Fullerton et al., 2018). Aussi, l' $EC_{50}$  pour l'administration de morphine systémique est deux fois plus grand chez la femme que chez l'homme (Loyd et Murphy, 2014). Chez l'humain, une douleur musculaire active moins le MOP chez la femme que chez l'homme et l'activation de ce même récepteur est estradiol dépendant chez la femme (Greenspan et al., 2007). Le PAG et les voies descendantes seraient donc plus impliqués dans les différences observées que les voies ascendantes auxquelles je m'intéresse dans cette étude (Cantu et al., 2022; Shansky et Murphy, 2021). Ces données correspondent à des données obtenues au laboratoire. En effet, j'ai fait une collaboration avec un laboratoire en France durant laquelle j'ai étudié la distribution du DOP dans le TG de rats mâles et femelles en

condition de migraine où non (résultats non montrés dans ce manuscrit) durant laquelle aucune différence n'a pu être observée entre les rats mâles et femelles en condition de migraine ou non. De plus, un modèle de souris cKI-FLAG-DOP est présent au laboratoire (Figure 22) dans lequel le DOP est uniquement exprimé au niveau des afférences primaires. Les résultats préliminaires sur ces souris nous indiquent qu'aucune différence n'est présente dans les tests comportementaux douloureux entre les mâles et les femelles ayant reçu un agoniste DOP (résultats non montrés dans ce manuscrit).

#### ***4.7.2 Impact de l'âge***

Plusieurs études démontrent que la douleur chronique augmente avec l'âge ce qui est notamment observé avec le vieillissement de la population et l'augmentation de la prévalence des conditions associées aux douleurs persistantes (Tinnirello et al., 2021). La prévalence de différents types de douleur varie aussi avec l'âge. Par exemple, les douleurs migraineuses ont tendance à diminuer dans la population à partir de la quarantaine, alors que la fibromyalgie et les douleurs articulaires persistent beaucoup plus longtemps (Greenspan et al., 2007). De nombreux changements tant au niveau du système nerveux périphérique que central seraient la cause des changements avec l'âge du traitement de la douleur. Par exemple, une perte des mécanorécepteurs et des fibres neuronales en plus d'une diminution du flux sanguin de la peau et de la vitesse de conduction peuvent expliquer la diminution de sensibilité (Tinnirello et al., 2021). De plus, les CIDN sont moins efficaces chez les personnes âgées et une diminution de la densité du MOP au niveau supraspinal est observée (Tinnirello et al., 2021). Des études chez l'humain ont aussi observé une diminution du MOP par autoradiographie au niveau des centres supérieurs chez des individus souffrant de douleur chronique (Jones et al., 1994; Harris et al., 2007). Du côté de l'analgésie procurée par les opioïdes sur le marché, des différences sont aussi observées en fonction de l'âge comme des différences dans la pharmacocinétique des opioïdes observées dans le temps (Zhao et al., 2012). Ensuite, des rats âgés ont besoin de dose de morphine deux fois plus grande que les rats adultes pour obtenir un même effet analgésique dans un modèle de douleur inflammatoire chronique (Fullerton et al., 2021). Il a aussi été démontré que des rats âgés avaient une signalisation du MOP diminuée au niveau du PAG ventrolatéral (vIPAG) : une diminution de l'expression du MOP, du potentiel de liaison d'un agoniste MOP à son récepteur, de l'activation des protéines G et

de l'inhibition de l'AMPC (Fullerton et al., 2022; Fullerton et al., 2021). Étonnamment, l'âge ne cause aucune différence sur l'expression de l'ARNm du MOP au niveau du vIPAG de rat ce qui indique que les différences présentes seraient dues à une dérégulation de la synthèse de protéine (Fullerton et al., 2022). Au niveau des ganglions de la racine dorsale, l'inverse est plutôt observé où une douleur inflammatoire chronique permet l'augmentation de la quantité de MOP ce qui suggère un effet région spécifique de la douleur inflammatoire sur le récepteur mu (Zollner et al., 2003). Au final, tout comme pour le sexe, la majorité des différences présentes entre les individus jeunes, adultes et âgés semble provenir du cerveau et non au niveau des voies ascendantes de la douleur qui sont mon centre d'intérêt.

#### ***4.7.3 Explication des modèles utilisés***

##### *4.7.3.1 Humains*

Les DRG humains que nous avons obtenus proviennent d'une plateforme à l'Université McGill qui collabore avec Transplant Québec. Lorsqu'une personne décède et qu'elle donne ses organes, l'équipe est envoyée sur place pour récolter les tissus qui me sont ensuite envoyés. Évidemment, nous ne savons jamais qui décède (son âge, cause du décès, origine ethnique, sexe et genre) et puisqu'il n'y a pas beaucoup d'opportunité d'obtenir ces tissus précieux, nous acceptons ce que nous avons déjà la chance d'obtenir. Pour terminer, les études étudiants les DRG humains sont toutes similaires sur ce même point : les individus sont tous d'âge variable avec une proportion homme-femme qui est très rarement 1 :1 (Shiers et al., 2020; Shiers et al., 2021; Papalampropoulou-Tsiridou et al., 2022; Shiers et al., 2023; Mitchell et al., 2023).

##### *4.7.3.2 Singes*

Puisque nous n'utilisons pas de modèle de singes au laboratoire, nous avons dû trouver un laboratoire utilisant ce modèle animal pour obtenir nos DRG. Sachant que les laboratoires Charles Rivers de Sherbrooke utilisent ces animaux, nous les avons contactés. Nous avons donc réussi à obtenir les DRG d'une cohorte de singes cynomolgus mâles âgés de 4 et 5 ans qui étaient euthanasiés la semaine suivante du contact. Puisque seuls ces singes étaient euthanasiés, nous ne pouvions pas avoir de DRG de femelles ni d'âge différent.

#### 4.7.3.3 Rats

Puisque nous intéressons aux différences entre la distribution du DOP et du MOP dans les ganglions trijumeaux et les ganglions de la racine dorsale de rat, nous voulions minimiser les différences dans le modèle utilisé dans les deux études. Puisque l'étude effectuée dans les DRG (Quirion et al., 2022) était uniquement faite sur des rats mâles adultes, nous avons choisi d'utiliser des rats mâles adultes pour la distribution dans les TG.

#### 4.7.3.4 Souris

Puisque la seule autre étude s'intéressant à la distribution du DOP dans les TG de souris est faite chez un mélange de souris mâles et femelles (Moye et al., 2021), nous avons choisi de faire la même chose. Dans l'étude de Moye et al., les données sont distribuées de façon normale ce qui indique que les souris mâles et femelles ont une distribution similaire (Moye et al., 2021). Les souris utilisées dans mon étude sont du même âge (poids) que celle utilisée dans une étude précédente au laboratoire s'intéressant à la distribution du DOP et du MOP dans les DRG de souris (Quirion et al., 2022).

### 4.8 Forces et limitations de l'étude

Je crois que la force majeure de notre étude est l'utilisation du RNAscope pour marquer l'ARNm des récepteurs opioïdes. Même si nous marquons l'ARNm et non les récepteurs eux-mêmes, je crois que cette technique est très pertinente dans notre cas puisque les anticorps contre les RCPG (comme les récepteurs opioïdes) s'avèrent non spécifiques. De son côté, le RNAscope est extrêmement sensible, spécifique et permet même de détecter de l'ARN partiellement dégradé, ce qui n'était pas le cas avec l'hybridation *in situ* plus ancienne (ACDBio, s.d.). Pour y parvenir, trois sondes en forme de double Z doivent s'hybrider une à côté de l'autre avec l'ARNm ciblé pour être amplifiée à plusieurs reprises, puis détectée (il est peu probablement qu'autant de sondes se lient de façon non spécifique une à côté de l'autre, ce qui empêche l'amplification de signal non spécifique) ce qui assure la spécificité et la sensibilité du signal (ACDbio, s.d.).

La technique de RNAscope mène à notre seconde force, soit la comparaison entre les différentes espèces. Effectivement, en ciblant l'ARNm, l'outil que nous utilisons permet de regarder la distribution dans toutes les espèces souhaitées. L'utilisation de souris transgéniques peut être très utile dans certains cas, mais il est impossible de modifier génétiquement un humain pour étudier la distribution du DOP grâce à une protéine fluorescente qui y est attachée. Cela rend donc notre étude unique. La comparaison interspèce nous a permis de voir des différences dans la distribution des récepteurs opioïdes qui n'avaient jamais été observées auparavant dû au manque d'études chez les espèces supérieures. Effectivement, ces différences indiquent des rôles différents du DOP entre les espèces ce qui prouve l'importance d'effectuer des études chez l'humain.

Du côté des limitations, il ne faut pas oublier le fait que nous étudions l'ARNm des récepteurs et non les protéines. Les résultats obtenus peuvent donc varier pour la protéine fonctionnelle. En effet, un ARNm peut être instable et produire moins de protéine ce qui surestimerait nos résultats ou à l'inverse, un ARNm peut être traduit à de multiples reprises par cascade d'amplification ce que sous-estimerait nos résultats. Malheureusement, la corrélation entre la transcriptomique et la protéomique est très difficile pour les récepteurs opioïdes. Effectivement, les GPCR comme les récepteurs opioïdes manquent d'anticorps spécifiques (d'où l'utilisation de leur ARNm) en plus d'avoir des niveaux d'expression protéique très bas (Degrandmaison et al., 2020). Par exemple, le DOP n'est pas détecté par autoradiographie dans les DRG ainsi que dans des études de protéomique dans les DRG de rats et humains (Mennicken et al., 2003; Schwaid et al., 2018). Pour le moment, nous ne pouvons donc pas corrélérer nos données sur l'ARNm de nos récepteurs opioïdes avec ceux de leurs protéines fonctionnelles. Certaines expériences pourraient être mises en place au laboratoire dans le futur pour remédier à ce problème (présent dans la section perspective). Par la suite, la présence de l'ARNm dans un type neuronal ne peut confirmer que la protéine y sera aussi présente, ce qui peut induire des changements dans la distribution de l'ARNm et la protéine. Dans le même ordre des choses, nous avons établi que le seuil pour un neurone positif était de cinq copies de l'ARNm, mais ne nous ne savons pas si ce seuil est suffisant pour entraîner une réponse physiologique des récepteurs.

Pour terminer, je crois que le nombre de marqueurs neuronaux utilisés pourrait être augmenté. Il est vrai que NF200, TAC1, IB4 et P2RX3 sont fortement utilisés dans la littérature, mais nous avons vu de grandes différences entre le marquage IB4 et P2RX3 qui doivent marquer les mêmes neurones. Il est donc possible que d'autres soient présentes entre TAC1 et CALCA, deux marqueurs des fibres C peptidergiques. De plus, des marqueurs existent pour des sous-populations précises de fibres comme TH pour les fibres C-LTMRs (Rostock et al., 2018). Au final, je crois qu'avoir plus de marqueurs permettrait seulement d'avoir des résultats plus précis sur la distribution et éventuellement sur le rôle potentiel de nos récepteurs.

## PERSPECTIVES

Suite à cette étude, de nombreuses voies s'offrent à nous pour des projets futurs visant à mieux comprendre le rôle et le fonctionnement des récepteurs opioïdes dans le contrôle de la douleur. Comme mentionné à plusieurs reprises, nous avons évalué la distribution du DOP et du MOP à l'aide de l'ARNm des récepteurs. Nous avons donc seulement quantifié les neurones positifs aux récepteurs et aux marqueurs neuronaux. Quelque chose qui serait intéressant de faire, serait de quantifier le nombre total de neurones qui expriment les récepteurs (et ceux qui ne l'expriment pas) pour voir si l'expression varie entre les espèces. Pour amener plus de précision, le diamètre de tous les neurones quantifiés pourrait aussi être compté pour avoir une meilleure idée de la distribution du DOP et du MOP dans une même population neuronale et si cette population change entre les espèces (Shiers et al., 2020).

### 5.1 Utilisation de marqueurs spécifiques à l'humain

Une des premières choses à faire une fois les manipulations terminées avec les marqueurs actuels sur les DRG humains est l'utilisation de marqueurs plus spécifiques aux types de neurones des DRG humains. Comme énoncée, la distinction entre les fibres C peptidergiques et non peptidergiques ne se fait pas chez l'humain, le terme nocicepteur est beaucoup plus approprié (Shiers et al., 2020; Shiers et al., 2021). Puisque NF200 marque presque tous les neurones de DRG humains, nous n'avons plus de marqueurs pour les fibres  $A\alpha$ ,  $A\beta$  et  $A\delta$  (Shiers et al., 2020; Haberberger et al., 2019; Rosotck et al., 2018). Nous allons donc utiliser un marqueur pour les propriocepteurs, un autre pour les nocicepteurs et un dernier pour les mécanorécepteurs pour mieux comprendre le rôle du DOP chez l'humain, ce qui s'avère plus complexe que chez les autres espèces étudiées. Suite aux recherches effectuées, nous nous sommes tournés vers les marqueurs PVALB, SCN10A et NTRK3 (sondes présentes dans le tableau 2). Parmi les études consultées, PVALB (gène codant pour la parvalbumine) faisait partie des gènes les plus exprimés pour identifier les propriocepteurs chez l'humain (Saito-Diaz et al., 2021; Nguyen et al., 2021; Tavares-Ferreira et al., 2022; Hall et al., 2022). Ensuite, SCN10A est le gène codant pour le canal Nav1.8, un nocicepteur bien connu et fonctionnel et ce même dans les DRG humains (Tavares-Ferreira et al., 2022; Nguyen et al.,

2021; Shiers et al., 2020; Han et al., 2015; Flegel et al., 2015; Saito-Diaz et al., 2021). Pour ce qui est des mécanorécepteurs, nous avons choisi NTRK3, car il est présent dans les DRG humains au niveau des fibres A $\beta$  SA et RA (Tavares-Ferreira et al., 2022). De plus, la sonde Piezo2 (un autre fort candidat) n'existait pas chez ACDBio, ce qui a facilité notre choix. Pour terminer, plusieurs études ont montré que ces différentes sondes de RNAscope fonctionnent bien dans les DRG humains ce qui justifie nos décisions (Hall et al., 2022; Tavares-Ferreira et al., 2022; Shiers et al., 2020). Tout comme dans les DRG de singes, nous voulons aussi vérifier si de la coexpression est présente entre les marqueurs des fibres afférentes. Effectivement, je crois qu'il serait intéressant de voir si les patrons de coexpression sont similaires entre les deux types de primates.

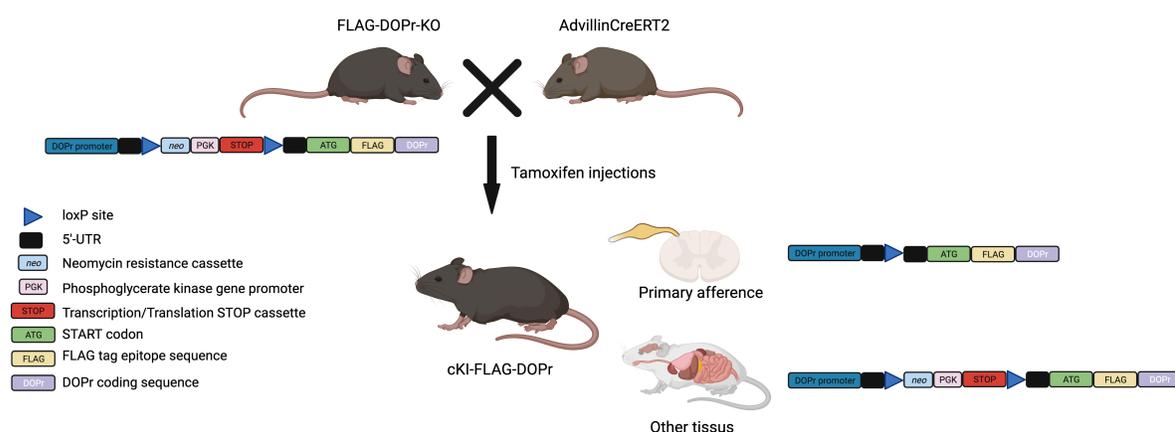
## **5.2 Étude de la distribution du DOP et du MOP dans les TG de primates**

En second lieu, je pense qu'investiguer la distribution du DOP et du MOP dans les TG d'humains pourrait être intéressant. Effectivement, une étude de RNA-seq a vu la présence du DOP dans les TG humains (Flegel et al., 2015). La plupart des différences obtenues pour la distribution du DOP et du MOP entre les espèces dans les DRG étaient principalement entre les rongeurs et les primates et non entre les rongeurs eux-mêmes. Il est donc possible que des différences soient aussi notables entre le rat et l'humain ou entre la souris et l'humain au niveau des TG. Cela permettrait donc de mieux transposer le rôle de DOP dans les douleurs orofaciales chez l'humain. Pour ce faire, nous pourrions utiliser le contact que nous avons à l'Université McGill qui nous a procuré les DRG humains. Sinon, nous pourrions faire affaire avec les neurochirurgiens présents à Sherbrooke pour prélever les TG lorsque les patients décédés font don de leurs organes.

## **5.3 Étude d'une souris humanisée**

Une troisième chose à faire serait d'étudier le rôle du DOP plus précisément dans les afférences primaires à l'aide d'une souris dite humanisée. En combinant la souris FLAG-DOP KO que nous possédons au laboratoire avec une souris advillinCreERT2 et en effectuant une injection de tamoxifène, le DOP sera exprimé uniquement au niveau des afférences primaires. Effectivement, la Cre de la souris advillin coupera seulement les sites loxP au

niveau des afférences primaires dû au récepteur à l'oestrogène ERT2 qui s'y retrouve (Figure 22). Avoir cette souris permettra donc de découvrir sur quel type de douleur les agonistes DOP agissent le mieux au niveau des afférences primaires. Des tests comportementaux avec des douleurs mécaniques, thermiques et même chimiques pourraient être faits dans les souris humanisées en condition de douleur inflammatoire ou même neuropathique. L'étude pourrait même être poussée plus loin grâce à mes résultats. À ce stade-ci, le DOP semble plus présent dans les neurones P2RX3 positifs dans les DRG humains. Hypothétiquement que ce résultat est le résultat final, la souris humanisée pourrait être croisée avec une souris Flp-FRT pour P2RX3 ce qui permettrait d'étudier le rôle du DOP dans les afférences primaires dans les neurones P2RX3 où il est majoritairement exprimé chez l'humain.



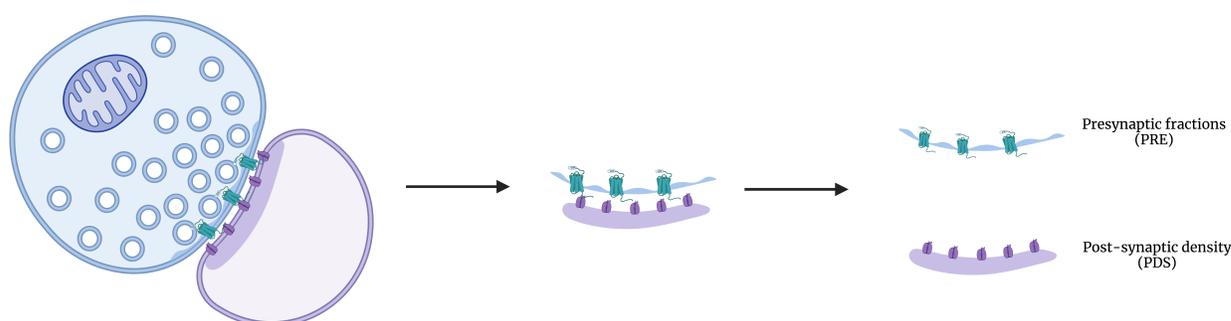
**Figure 22 : Modèle de souris humanisée où le DOP est uniquement exprimé dans les afférences primaires**

Représentation schématique de la génération de la souris cKI-FLAG-DOP qui exprime seulement le DOP au niveau des afférences primaires, suite au croisement d'une souris FLAG-DOP-KO avec une souris Advillin-CreERT2 et d'une injection au tamoxifène. Figure créée à l'aide de Biorender

#### 5.4 Localisation du DOP au niveau de synaptosomes

Comme mentionné précédemment, chez l'humain, l'ARNm du DOP ne se retrouve pas au niveau de la moelle épinière, alors que le récepteur y est dans les laminae superficielles ce qui suggère que l'ARNm se retrouverait plutôt au niveau des afférences primaires, donc au niveau présynaptique (Mennicken et al., 2003). Puisque l'ARNm du DOP est retrouvé dans les afférences primaires et dans la moelle épinière de souris, nous croyons que chez cette espèce, le DOP se retrouverait au niveau pré et post-synaptique (Mennicken et al., 2003).

Pour tester cette théorie, les synaptosomes des souris FLAG-DOP pourraient être isolés (étapes à la Figure 23) de la moelle épinière et du cerveau, puis le FLAG-DOP pourrait être immunoprécipité pour voir sur quelle portion de la synapse se situe réellement le DOP. Pour tester l'hypothèse de la localisation du DOP chez l'humain, le modèle de souris cKI-FLAG-DOP présenté ci-haut pourrait être utilisé avec le même protocole d'isolation des synaptosomes que celui chez la souris FLAG-DOP. Dans les deux cas, la souris FLAG-DOP KO devra être utilisée comme contrôle négatif, puisqu'elle ne contient pas le DOP. Les résultats pourraient ensuite être confirmés par microscopie électronique où l'on pourrait voir directement la localisation du DOP aux synaptosomes.



**Figure 23 : Visualisation du FLAG-DOP au niveau de synaptosomes de souris cKI-FLAG-DOP**

Représentation schématique de l'isolation des fractions pré et post-synaptiques des synaptosomes isolés à partir de moelle épinière de souris contenant le récepteur FLAG-DOP. Figure créée à l'aide de Biorender.

### 5.5 Électrophysiologie

Évidemment, tous les résultats présentés dans cet ouvrage portent sur la distribution de l'ARNm du DOP et du MOP et non sur les récepteurs fonctionnels. Effectivement, ce n'est pas tout l'ARNm qui sera traduit en protéine, donc en nos récepteurs opioïdes. Une possibilité sera de faire des enregistrements d'électrophysiologie par patch-clamp et par imagerie calcique dans nos DRG humains pour voir exactement quels neurones répondent lors de stimulations avec des agonistes DOP et/ou MOP. Cela permettrait donc d'obtenir une distribution plus précise puisque ce sont les récepteurs fonctionnels qui seraient analysés, donc il n'y aurait pas de surestimation des résultats.

Pour mieux comprendre le rôle du DOP dans le contrôle des douleurs orofaciales, comme la migraine, nous pourrions faire des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires de neurones centraux trigéminaux chez le rat anesthésié. Cela nous permettrait de mesurer les effets de l'administration d'agonistes DOP comme le SNC80 sur la réponse des fibres A et C lors de stimulations mécaniques et électriques nociceptives ou non au niveau facial et méningé du rat.

## CONCLUSIONS

Le récepteur opioïde delta est une cible intéressante dans le traitement de la douleur. En effet, son analgésie associée aux faibles effets indésirables et son rôle dans les afférences primaires amènent de nombreuses équipes à s'y intéresser. Il est très important de mieux connaître sa distribution au niveau des afférences primaires, car celles-ci sont la porte d'entrée des voies ascendantes de la douleur et cela permettrait de mieux connaître son rôle dans le contrôle de la douleur. Puisque des différences sont possibles entre les espèces, il est aussi important d'en étudier plusieurs pour voir si le rôle du DOP est similaire entre un rongeur et l'humain. C'est sur ces points que mon projet de maîtrise est basé : soit étudier la distribution des récepteurs opioïdes dans les afférences primaires de différentes espèces (rat, souris, singe et humain). Pour ce faire, nous avons employé la technique de RNAscope, une nouvelle façon de faire de l'hybridation *in situ* pour marquer l'ARNm du DOP et du MOP dans les DRG et TG de plusieurs espèces. Nous avons découvert que les deux récepteurs sont présents dans tous les types de neurones des DRG et des TG ( $A\alpha$ ,  $A\beta$ ,  $A\delta$ , C peptidergiques et non peptidergiques) chez le rat, la souris (DRG et TG), le singe et l'humain (DRG uniquement). Nous avons aussi observé un fort niveau de coexpression entre le DOP et le MOP et ce principalement dans les fibres myélinisées, tous tissus et espèces confondus. Notre étude va donc à l'encontre de d'autres qui voient le DOP uniquement dans les fibres C peptidergiques et myélinisées dans les TG ou que la coexpression entre le DOP et le MOP est inexistante dans les DRG. Cela confirme donc notre hypothèse selon laquelle les récepteurs aux opioïdes sont localisés au niveau des nocicepteurs dans les DRG et TG dans toutes les espèces, où ils peuvent jouer un rôle dans le contrôle de la douleur mécanique et thermique.

Les différences entre la distribution chez les rongeurs et le singe suggèrent que celle chez l'humain est aussi différente. Cela montre donc l'importance d'étudier l'humain pour mieux comprendre le fonctionnement du DOP dans cette espèce. En effet, les découvertes faites chez un rat ne sont nécessairement transposables à l'humain, ce qui complique le développement de nouvelles thérapies efficaces pour nous.

Au final, je crois que ce travail sur la distribution du DOP et du MOP entre les espèces au niveau des afférences primaires nous montre réellement que le DOP est une cible dans le traitement de la douleur, puisqu'il est présent au niveau des nocicepteurs, et ce même chez les primates. Évidemment, je souhaite que le travail sur les DRG humains et le DOP se poursuive pour mieux comprendre les mécanismes associés à l'activation du DOP dans ces neurones. J'espère que ce travail mènera éventuellement à un nouvel agoniste DOP efficace dans le traitement de la douleur chez l'humain, et ce sans avoir besoin de faire une injection intrathécale.

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche Pr Louis Gendron, qui m'a accueillie dans son laboratoire lorsque j'étais encore en première année de baccalauréat et m'a permis d'y faire quatre stages. Ces stages m'ont donné la piqûre pour la science et m'ont fait réaliser qu'une carrière en recherche était faite pour moi. Durant ces quatre années au laboratoire, il m'a donné de nombreuses opportunités en or : la possibilité de faire le passage bacc-maîtrise, de travailler sur plusieurs projets, de faire des présentations dans de nombreux congrès dont deux internationaux, des collaborations avec plusieurs autres laboratoires et mon stage de l'automne dernier en France. Notre travail ensemble m'a permis de prendre confiance en moi, que ce soit dans les présentations orales ou dans la prise de décision quant à mon projet. Merci de m'avoir permis d'avoir une liberté avec mon projet pour tester les différentes idées qui me venaient en tête et de toujours avoir eu une grande écoute dans les moments difficiles. Je vais assurément manquer la complicité que nous avons développée durant mon passage au labo. Bref, merci d'avoir été un aussi bon mentor que j'espère pouvoir garder.

Je veux ensuite remercier les « OG » du laboratoire : Béatrice, Sophie et Alexandre qui m'ont intégré au labo dès mon arrivée. Vous avez rendu l'ambiance du laboratoire agréable et avez sans aucun doute contribué à mon retour au labo. Les soirées et activités avec vous font partie des meilleurs souvenirs que je garde de Sherbrooke!

Je veux aussi remercier certains étudiants qui ont été des mentors pour moi durant mon parcours : Jade, Laurie et Emméran. Vous avoir durant mon parcours m'a permis d'avoir plusieurs discussions scientifiques qui m'ont permis de développer mon esprit scientifique et d'apprendre énormément. Merci d'avoir été présents pour moi dans les moments difficiles.

J'aimerais aussi dire merci aux autres étudiants qui sont passés au laboratoire durant mon parcours : Sarah, Ariane, Gemma, Samuel, Olivier, Charline qui m'ont permis de passer de très bons moments! Merci à Sarah, collègue et amie depuis le tout début du bacc en pharmaco (qui détient maintenant le rôle de mère lorsque je viens à Sherbrooke). Nous sommes

définitivement passées par toutes sortes d'émotions durant notre parcours et j'espère que nous garderons contact pendant encore longtemps! Merci à mon stagiaire Étienne Vallière qui a participé au début de projet sur les synaptosomes.

Finalement, je voudrais dire merci à l'équipe du Pr Radhouane Dallel qui m'a accueillie l'automne dernier durant mon stage. Tout le monde a contribué à mon intégration à l'équipe ce qui m'a donnée une expérience exceptionnelle. Un merci spécial à Gisela qui m'a formée en électrophysiologie extracellulaire et qui m'a permis de découvrir mon fort intérêt pour l'électrophy!

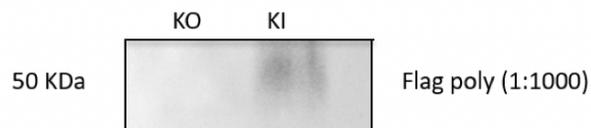
## AUTRES RÉSULTATS

Les prochaines sections comportent différents autres résultats que j'ai acquis durant mon passage au laboratoire Gendron. Ces résultats font en grande partie suite aux résultats présentés dans mon mémoire. Ils comprennent aussi un projet connexe sur lequel j'ai travaillé portant sur le trafic intracellulaire du DOP.

### 8.1 Localisation du DOP au niveau de synaptosomes

Comme énoncé dans la section perspective, nous nous intéressons à la localisation du DOP au niveau des synaptosomes. En effet, nous croyons que le DOP est localisé au niveau pré- et post-synaptique chez la souris alors qu'il est uniquement présent au niveau présynaptique chez l'humain.

Lors de manipulations préliminaires au laboratoire, nous avons réussi à immunoprécipiter FLAG-DOP dans les cerveaux de souris FLAG-DOP (Figure 24), tout comme une récente étude du laboratoire (Degandmaison et al., 2020). Nous n'avons tout de fois pas encore réussi à la faire au niveau de la moelle épinière et des synaptosomes.



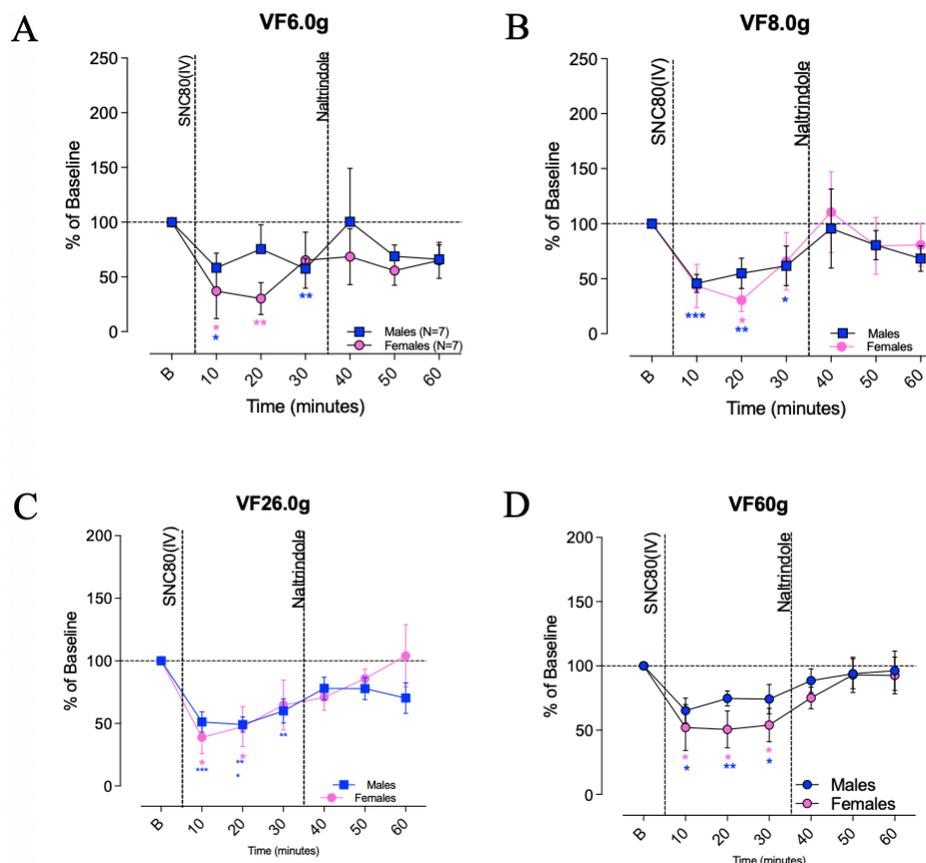
**Figure 24 : Immunoprécipitation de FLAG-DOP dans des cerveaux de souris FLAG-DOP**

L'immunoprécipitation de FLAG-DOP (bande à environ 50 kDa) a été faite à partir de la partie frontale de trois cerveaux de souris KO et KI en utilisant un anticorps de souris M2 monoclonal anti-FLAG sur billes magnétiques. La révélation a été faite à l'aide d'un anticorps lapin anti-FLAG polyclonal.

### 8.2 Électrophysiologie extracellulaire

Encore une fois, dans la section perspective, l'utilisation de l'électrophysiologie a été mentionnée pour permettre l'enregistrement de neurones centraux trigéminaux chez le rat anesthésié dans le but de mieux comprendre le rôle du DOP dans le contrôle des douleurs orofaciales.

Des résultats préliminaires ont été générés lors d'un stage que j'ai effectué dans le laboratoire du Pr Radhouane Dallel à Clermont-Ferrand. Le SNC80 a été utilisé pour mesurer l'effet d'un agoniste DOP sur la réponse des fibres A et C lors de stimulations mécaniques et électriques nociceptives ou non au niveau facial et méningé du rat. Nous avons enregistré des neurones WDR, méningés de rat lors de stimulations périorbitales avec différents filaments de von Frey. Les résultats peuvent être observés à la Figure 25, où le SNC80 semble diminuer l'activation des fibres C chez la femelle (avec tous les filaments) et le mâle (avec les filaments de 8g, 26g et 60g). Nous croyons que la dose de naltrindole donnée n'était pas assez grande pour renverser complètement l'effet du SNC80, donc de nouvelles manipulations sont en cours pour voir si l'effet vu avec l'injection de SNC80 est spécifique à l'activation du DOP.



**Figure 25 : Réponse des fibres C lors que stimulations nociceptives et non nociceptives à l'aide de filament de von Frey**

Réponse des fibres C lors de stimulations périorbitales avec un von Frey de 6g (A), 8g (B), 26g (C) et 60g (D) de neurones localisés au niveau du noyau caudalis 30 min après l'injection (i.v.) de SNC80 10mg/kg puis 30 min après l'injection (i.v.) de naltrindole 4mg/kg. \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01; \*\*\*p < 0.001 (ANOVA unidirectionnelle avec comparaison multiple de Holm-Sidak).

### 8.3 Rôle de la Cdk5 dans l'adressage du récepteur opioïde delta

#### 8.3.1 Mise en contexte du projet

Comme mentionné en introduction, le laboratoire s'intéresse au DOP comme potentielle cible thérapeutique dans le traitement de la douleur grâce à son potentiel analgésique et sa moins grande production d'effets indésirables (Gallantine et Meert, 2005). Malheureusement, l'efficacité analgésique du récepteur opioïde delta est beaucoup plus faible que celle du MOP. La cause de cette efficacité moindre pourrait être la localisation du DOP. En effet, contrairement aux autres GPCR comme le MOP, le DOP est situé majoritairement au niveau intracellulaire et très peu à la membrane plasmique ce qui rend son activation beaucoup plus complexe (Cahill et al., 2001). Par contre, dans certaines conditions, le DOP peut être trafiqué à la membrane plasmique. En effet, lors d'un traitement chronique de 48 heures à la morphine la densité de DOP à la membrane plasmique est augmentée dans la corne dorsale de la moelle épinière et dans les DRG (Cahill et al., 2001; Gendron et al., 2006). Lors d'une douleur inflammatoire chronique (72 heures) causée par l'adjuvant complet de Freund (CFA), une augmentation du DOP à la membrane plasmique est aussi observée dans les DRG (Gendron et al., 2006).

Un des partenaires régulant la localisation intracellulaire du DOP est COPI. Effectivement, COPI permet le transport rétrograde entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique ce qui permet au récepteur de rester au niveau intracellulaire (Brandizzi et Barlowe, 2013). C'est la sous-unité  $\beta$ -COP de COPI qui se lie spécifiquement au DOP ce qui provoque sa rétention dans le Golgi et le RE. En mutant la lysine 166 présente sur la deuxième boucle intracellulaire (ICL2) du DOP, la quantité du récepteur à la membrane plasmique est augmentée ce qui empêche la liaison de COPI et donc l'empêche de retenir le DOP à l'intérieur de la cellule et donc prouve qu'il est un acteur dans la rétention du DOP (St-Louis et al., 2017).

Un autre des partenaires participants à la régulation du trafic du DOP est la cyclin-dépendent kinase 5 (Cdk5). Cette kinase sérine/thréonine n'est pas impliquée dans le cycle cellulaire comme les autres Cdks, mais plutôt dans la croissance des neurites, la migration neuronale, l'activité neuronale et dans les phénomènes de récompenses présents dans le système nerveux

central (Beaudry et al., 2015). Cdk5 est majoritairement activé par la cyclin-like p35 (Beaudry et al., 2015) ce qui lui permet de phosphoryler une séquence (S/T) PX (K/H/R) ou X représente n'importe quel acide aminé (Jeong et al., 2013). C'est sur cette séquence (TPAK) que Cdk5 phosphoryle le DOP. Les résidus importants sont présents sur l'ICL2 du récepteur et sont de la thréonine 161 à la lysine 164 (Xie et al., 2009). Pour sa liaison, Cdk5 préfère se lier sur des résidus basiques comme une lysine ou une arginine en position n+3 ou le n équivaut à une sérine ou une thréonine (Sharma et al., 1999). De plus, en utilisant de la roscovitine, un inhibiteur de la Cdk5, sur des rats ayant été traités à la morphine et ayant reçu une injection de deltorphine II (un agoniste du récepteur delta), une diminution de l'effet analgésique a été observée (Beaudry et al., 2015). Cette diminution d'analgésie peut être expliquée par l'inhibition de Cdk5 ce qui amène une diminution du nombre de récepteurs à la membrane plasmique et donc une diminution de leur activation. L'hypothèse présente au laboratoire est que p35 active Cdk5 ce qui lui permet de phosphoryler le DOP sur un site chevauchant le site de liaison de COPI sur l'ICL2 du DOP. Cette phosphorylation bloquerait donc la liaison de COPI ce qui permettrait au récepteur de ne plus être retenu dans le Golgi et le RE et donc de se rendre à la membrane plasmique où il peut être activé. Cdk5 est aussi impliquée dans le trafic d'autres récepteurs comme le récepteur D2 (Jeong et al., 2013), le TRPV1 (Xing et al., 2012) et le récepteur NMDA (Zhang et al., 2008). Nous nous intéressons donc à déterminer si Cdk5 se lie réellement au Dop et si oui, le site de liaison de Cdk5 sur le DOP.

### **8.3.2 Méthodologie employée**

#### *8.3.2.1 Production des constructions d'ADN*

Pour produire les différentes constructions utilisées dans le projet, 3ul des amorces sens et antisens ont été mélangées, puis chauffées pendant 2 minutes à 94°C pour ensuite être laissées à température pièce pendant 1 heure. Ensuite, 0,5ul de ces amorces a été ajouté à 6ul du vecteur PGEX-4T1, 1ul de tampon de ligation, 1ul de T4 ligase et 1,5ul d'eau pour incuber pendant 2 heures à température pièce pour effectuer la ligation des amorces dans le vecteur. Le produit de ligation est ensuite ajouté à 100ul de bactéries DH5a pour être incubé pendant 30 minutes sur glace, puis 45 secondes à 42°C et pour terminer 2 minutes sur glace ce qui

permet de transférer les bactéries sur une plaque LB ampicilline pour incubé durant la nuit à 37°C. Le lendemain, une colonie est piquée, puis mise dans 2ml de LB ampicilline pour incubation, encore une fois, toute la nuit à 37°C. Le lendemain, des minipreps sont faites sur les bouillons obtenus pour extraire l'ADN des bactéries.

#### 8.3.2.2 *Production protéique*

Pour produire des protéines recombinantes, 5ml de milieu LB ampicilline a été inoculé avec des bactéries C41 transformées avec la construction voulue pour être incubé durant une nuit à 37 °C. Le lendemain, 2ml de ce mélange est utilisé pour ensemencer 100ml de LB ampicilline pour ensuite laisser croître à 37 °C jusqu'à ce que la densité optique à 595 nm soit entre 0,4 et 0,6. La croissance est ensuite arrêtée en mettant les bouillons sur glace pendant au moins 10 minutes, puis ils sont induits en fin de journée avec 0,4mM d'IPTG et 2% d'éthanol ce qui est incubé pendant toute une nuit. Le lendemain, les culots de bactéries sont resuspendus dans 2ml de tampon A (150mM NaCl, 10mM Tris-Hcl pH 7,4, 1mM EDTA pH 8,0, 10% Glycérol, 0,5% IGPAL, 2mM DTT et 1 pastille cOplete mini EDTA-free par 10ml de solution). Ce mélange est ensuite incubé pendant 1 heure avec 1mg/ml de lysozyme à 4°C avec rotation. Les billes glutathion-sépharose (0.2ml de billes/100ml de culture) sont ensuite bloquées et lavées 3 fois avec du PBS 1X-BSA pour ensuite être incubées 30 minutes à température pièce avec agitation suite au dernier lavage. Les échantillons sont ensuite soniqués 1 fois 20 secondes à intensité 1, puis 3 fois 20 secondes à intensité 3, puis sont centrifugés. Les surnageants sont combinés aux billes bloquées pour ensuite être incubés pendant 1 heure à 4°C avec rotation. Les billes sont ensuite lavées 5 fois avec le tampon A, puis sont resuspendues dans le volume initial de billes et 30% glycérol. 10ul de SB4X est ajouté aux échantillons contrôles pour être bouillis à 100°C pendant 5 minutes. Ces contrôles sont ensuite analysés par SDS page, puis le gel est coloré au bleu de Coomassie (0,4% bleu de Coomassie, 50% éthanol, 10% acide acétique), puis décoloré avec la solution de décoloration (15% éthanol, 5% acide acétique) durant la nuit ce qui donne le contrôle d'expression des protéines purifiées.

### 8.3.2.3 Essais de GST-pulldown

Pour l'essai de pulldown, environ 0,5ul (ce volume dépend de l'expression de chaque domaine fusionné à la GST vu lors du gel de Coomassie) de protéines fusionnées à la GST, soit l'ICL1, l'ICL2, l'ICL3 et la queue C terminale, sont combinées à des billes glutathion-sépharose 4B (GE Healthcare) pour un total de 30ul. Ce mélange est ensuite lavé deux fois avec du tampon A. Ensuite, 5ul de Cdk5-Histidine est ajouté au mélange de protéines fusionnées à la GST et de billes glutathion-sépharose, puis le volume est complété à 500ul avec du tampon A (pour les GST-pulldown avec les peptides mimétiques (voir tableau 3), 0,5ul de CDK5 est utilisée). C'est aussi à cette étape que 10ul des différents peptides mimétiques sont ajoutés lors des GST pulldown avec ceux-ci. 10ul sont prélevés pour le contrôle input auquel 3ul de SB4x est ajouté pour conserver à -80 °C. Les tubes sont incubés durant la nuit à 4 °C avec rotation, puis le lendemain, un autre 10ul du surnageant est prélevé pour le contrôle surnageant auquel 3ul de SB4x est ajouté. Le reste du mélange est lavé trois fois avec du tampon A, puis 10ul de SB4X est ajouté. Tous les tubes sont ensuite bouillis pendant 5 minutes à 100 °C pour débiter l'analyse sur gel SDS page. Lors de cette analyse, les résultats sont révélés à l'aide des anticorps souris alpha-Cdk5 DC17 1 : 1000 dans du lait 5%-TBST et mouse-HRP 1 : 5000 dans du BSA 3%-TBST pour le pulldown et les contrôles input et surnageant et de l'anticorps GST-HRP 1 : 15 000 dans du lait 5%-TBST pour le contrôle GST.

**Tableau 6: Structure des peptides mimétiques de la troisième boucle intracellulaire du récepteur opioïde delta**

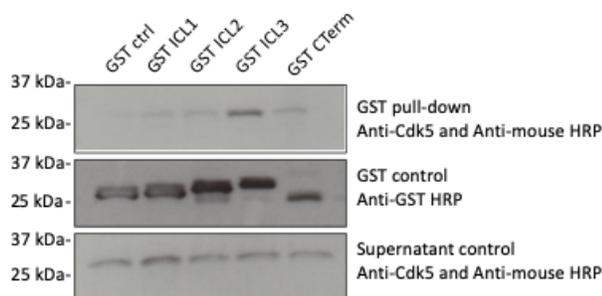
Nom	Structure
Peptide 1	Ac-LMLLRLRSVR-amide
Peptide 2	Ac-SKEKDRSLRRITRM-amide
Peptide 3	Ac-VRLLSGSKEKDR-amide

### 8.3.3 Résultats préliminaires obtenus

#### 8.3.3.1 Cdk5 interagit avec l'ICL3 du DOP

Pour identifier le site de liaison de Cdk5 sur le DOP, des GST pulldown ont été effectués. Pour ce faire, les boucles intracellulaires (ICL1, ICL2 et ICL3) et la queue C terminale

purifiées du DOP couplées à la GST ont été utilisées. En utilisant Cdk5, il a été possible de voir que cette kinase a été « pulldown » par l'ICL3 du DOP (Figure 26) ce qui démontre une interaction entre Cdk5 et le DOP sur son ICL3.

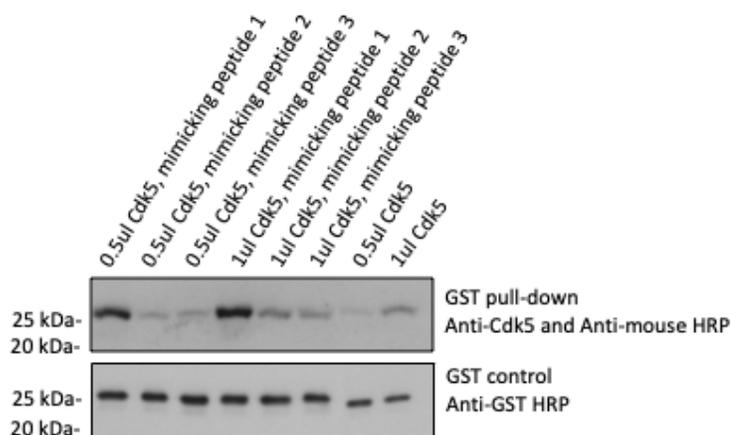


**Figure 26: Cdk5 se lie sur la troisième boucle intracellulaire du DOP**

Les protéines purifiées des boucles intracellulaires 1, 2, 3 et de la queue C terminale du DOP ont été couplées à des billes glutathion-sépharose, puis des GST pulldown ont été faits pour déterminer sur quelle partie du récepteur se lie Cdk5. La présence d'une interaction a été détectée par Western blot en utilisant l'anticorps anti-Cdk5 (1 :1000) et l'anticorps anti-mouse-HRP (1 :5000) pour le GST pulldown et le contrôle surnageant et en utilisant l'anticorps GST-HRP (1 :15000) pour le contrôle GST. Les résultats sont la représentation d'au moins 3 expériences. Les chiffres sur le côté gauche représentent le marqueur de poids moléculaire.

### 8.3.3.1 La liaison de Cdk5 au DOP semble augmenter lors de l'utilisation du troisième peptide mimétique

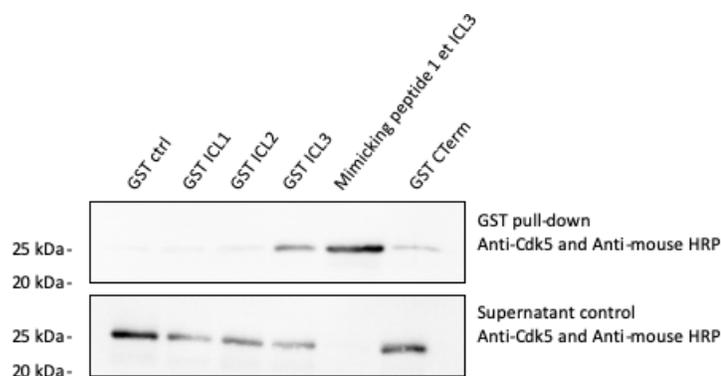
Pour obtenir un site de liaison plus spécifique de Cdk5 sur l'ICL3 du DOP, des peptides mimétiques, 0,5/1ul de Cdk5 et l'ICL3 du DOP ont été utilisés pour faire des GST pulldown. Le peptide correspondant à la séquence de liaison de Cdk5 aurait dû lier Cdk5 ce qui aurait causé une diminution de la liaison de Cdk5 à l'ICL3 et donc une bande plus faible. Par contre, ce que l'on peut voir à la figure 27, est plutôt une bande plus foncée avec l'utilisation du premier peptide mimétique, donc une augmentation de la liaison de Cdk5 en présence de ce peptide. Aucune bande n'est présente avec les peptides mimétiques 2 et 3 tout comme avec les deux contrôles (ICL3 du DOP et Cdk5 seulement) ce qui ne permet pas de montrer une interaction entre ces deux peptides et Cdk5.



**Figure 27: La liaison de Cdk5 au DOP semble augmenter lors de l'utilisation du troisième peptide mimétique**

Les GST-pulldown ont été effectués avec un volume fixe des protéines GST-DOP-ICL3 purifiées, d'un volume fixe de peptide mimétique et de Cdk5 pour déterminer sur quelle section de l'ICL3 se lie Cdk5. La présence d'une interaction a été détectée par Western blot en utilisant les anticorps anti-Cdk5 (1 :1000) et anti-mouse-HRP (1 :5000) pour le GST-pulldown et en utilisant l'anticorps anti-GST-HRP (1 :15000) pour le contrôle GST. Ces résultats sont représentatifs d'au moins 3 expériences. Les chiffres sur le côté gauche représentent le marqueur de poids moléculaire.

Pour confirmer la liaison de Cdk5 qui semble augmentée en présence du premier peptide mimétique, des GST pulldown ont été faits en comparant les différentes boucles du DOP avec l'utilisation du peptide mimétique 1 en présence de l'ICL3 du DOP. En observant la figure 28, il est possible de constater que la liaison de Cdk5 est plus importante en présence du premier peptide qu'en son absence, car la bande du pulldown est beaucoup plus foncée. De plus, en regardant le contrôle surnageant soit la quantité de Cdk5 qui ne s'est pas liée à l'ICL3 lors du pulldown, on peut voir une absence complète de bande avec l'utilisation du premier peptide mimétique ce qui n'est pas le cas avec l'ICL3 seul.



**Figure 28: Cdk5 se lie entièrement à l'ICL3 du récepteur opioïde delta lors de l'utilisation du premier peptide mimétique**

Les GST pulldown ont été faits en utilisant un volume fixe des différentes boucles du DOP, du peptide mimétique et de Cdk5 pour vérifier la quantité de Cdk5 qui se lie au DOP. La présence d'une interaction a été détectée par SDS page en utilisant l'anticorps anti-Cdk5 (1 :1000) et l'anticorps anti-mouse-HRP (1 :5000) pour le GST pulldown et le contrôle surnageant. Les chiffres sur le côté gauche représentent le marqueur de poids moléculaire. Résultat préliminaire.

En somme, les résultats acquis dans ce projet ouvrent la voie à plusieurs autres questions non répondues. Premièrement, le site de liaison de Cdk5 à l'ICL3 du DOP n'a pas été découvert grâce aux peptides mimétiques. Nous avons donc généré plusieurs clones de l'ICL3 du DOP mutée couplée à la GST pour effectuer de nouveau GST-pulldown ce qui nous permettra de trouver un site de liaison de Cdk5 plus spécifique (Tableau 4). Puisqu'il est connu dans la littérature que Cdk5 se lie sur des résidus basiques (lysine et arginine) en position n+3 ou n est une sérine ou une thréonine (Sharma et al., 1999), nous croyons que le site de liaison plus précis de Cdk5 contient la sérine 247 ou 249 jusqu'aux lysines 250 et 252 ce qui correspond aux constructions B et C. Éventuellement, des clones contenant des mutations ponctuelles des acides aminés clés des constructions liant Cdk5 présentes dans le tableau 4 pourront être faites pour déterminer le site exact de liaison. De plus, il serait intéressant de déterminer par quel mécanisme le premier peptide mimétique semble faire augmenter la liaison de Cdk5 à l'ICL3 du DOP, ce qui est très intéressant en sachant que Cdk5 permet l'augmentation du trafic du DOP vers la membrane plasmique (en bloquant la liaison de COPI et ainsi permettant son adressage à la membrane). Nous voulons d'abord effectuer des essais d'Elisa de surface pour voir si le premier peptide mimétique permet réellement d'augmenter la quantité de DOP présent à la membrane des cellules. Évidemment, plusieurs expériences seront nécessaires pour confirmer les hypothèses que nous avons face à ce projet.

**Tableau 7: Structure des différentes constructions de la troisième boucle intracellulaire du récepteur opioïde delta**

<b>Nom</b>	<b>Structure</b>
A	RLRSVRL
B	RLRSVRLSGSKEKDR
C	SGSKEKDRSLRRITR
D	SLRRITR

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abbadie, C., Lombard, MC., Besson, JM., Trafton, J.A. et Basbaum, A.I. (2002). Mu and delta opioid receptor-like immunoreactivity in the cervical spinal cord of the rat after dorsal rhizotomy or neonatal capsaicin: an analysis of pre- and postsynaptic receptor distributions. *Brain Res.* 930(1-2): 150-162.
- Abraira, VE. et Ginty, DD. (2013) The sensory neurons of touch. *Neuron.* 79(4):618-39.
- ACDbio. (s.d.) *RNAScope technology : How it works.* <https://acdbio.com/science/how-it-works>.
- Al-Hasani, R. et Bruchas, MR. (2011) Molecular mechanisms of opioid receptor- dependent signaling and behavior. *Anesthesiology.* 115(6):1363-81.
- Almeida, TF., Roizenblatt, S. et Tufik, S. (2004) Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res.* 1000 (1-2):40-56.
- Anisimova, AS., Alexandrov, AI., Makarova, NE., Gladyshev. et Dmitriev, SE. (2018) Protein synthesis and quality control in aging. *Aging (Albany NY).* 10(12):4269-4288.
- Apkarian, AV., Bushnell, MC., Treede, RD. et Zubieta, JK. (2005) Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain.* 9(4):463-84.
- Ballantyne, J et Shin, N. (2008) Efficacy of opioids for chronic pain: A review of the evidence. *Clin J Pain.* 24(6) :469-78.
- Bardoni, R., Tawfik, VL., Wang, D., François, A., Solorzano, C., Shuster, SA., Choudhury, P., Betelli, C., Cassidy, C., Smith, K., de Nooij, JC., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, BL., Woodbury, CJ., Basbaum, AI., MacDermott, AB. et Scherrer, G. (2014) Delta Opioid Receptors Presynaptically Regulate Cutaneous Mechanosensory Neuron Input to the Spinal Cord Dorsal Horn. *Neuron.* 81(6) :1312-1327.
- Basbaum, AI., Bautista, DM., Scherrer, G. et Julius, D. (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell.* 139(2):267-284.
- Basbaum, AI. et Julius, D. (2006) Toward better pain control. *Sci Am.* 294(6):60-67.
- Beaudry, H., Buboïs, D. et Gendron, L. (2011) Activation of spinal mu and delta opioid receptors potently inhibits substance P release induced by peripheral noxious stimuli. *J Neurosci.* 31(37) :13068-13077.

- Beaudry, H., Mercier-Blais, AA., Delaygue, C., Lavoie, C., Parent, JL., Neugebauer, W. et Gendron, L. (2015) Regulation of mu and delta opioid receptor functions : involvement of cyclin-dependent kinase 5. *Br J Pharmacol.* 172(10):2573-2587.
- Bear, MF., Connors, BW., Connors, BW., Paradiso, MA., Paradiso, MA., Nieoullon André, et Bear, MF. (2016) *Neurosciences : à la découverte du cerveau.* (Nieoullon André, Trans.) (4e édition). Éditions Pradel, John Libbey Eurotext.
- Bell, J., Bolanowski, S. et Holmes, MH. (1994) The structure and function of Pacinian corpuscles: A review. *Prog Neurobiol.* 42(1):79-128.
- Bertels, Z., Witkowski, WD., Asif, S., Siegersma, K., M van Rijn, R. et Pradhan, AA. (2021) A non-convulsant delta opioid receptor agonist, KNT-127, reduces cortical spreading depression and nitroglycerin-induced allodynia. *Headache.* 61(1) :170-178.
- Bertels, Z., Dripps, IJ., Shah, P., Moye, LS., Tipton, AF., Siegersma, K. et Pradhan, AA. (2022) Delta opioid receptors in Nav1.8 expressing peripheral neurons partially regulate the effect of delta agonist in models of migraine and opioid-induced hyperalgesia. *Neurobiol Pain.* 12:100099.
- Berthiaume, S., Abdallah, K., Blais, V. et Gendron, L. (2020) Alleviating pain with delta opioid receptor agonists: Evidence from experimental models. *J Neural Transm (Vienna).* 127(4) :661-672.
- Bičanić, I., Hladnik, A., Džaja, D. et Petanjek, Z. (2019) The anatomy of orofacial innervation. *Acta Clin Croat.* 58(Suppl 1) :35-42.
- Birren, JE. et Wall, PD. (1956) Age changes in conduction velocity, refractory period, number of fibers, connective tissue space and blood vessels in sciatic nerve of rats. *J Comp Neurol.* 104(1):1-16.
- Björnsdotter, M. Löken, L., Olausson, H., Vallbo, A. et Wessberg. (2009) Somatotopic organization of genital touch processing in the posterior insular cortex. *J Neurosci.* 29(29) :9314-9320.
- Blaine, AT., Miao, Y., Yuan, J., Palant, S., Liu, RJ., Zhang, ZY. et van Rijn, RM. (2022) Exploration of beta-arrestin isoform signaling pathways in delta opioid receptor agonist-induced convulsions. *Front Pharmacol.* 13 :914651.
- Brandizzi, F. et Barlowe, C. (2013) Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(6):382-392.
- Brar, G. et Weissman, JS. (2015) Ribosome profiling reveals the what, when, where, and how protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 16(11):651-664.
- Brown, AG. et Iggo, A. (1967b) A quantitative study of cutaneous receptors and afferent fibres in the cat and rabbit. *J Physiol.* 193(3):707-733.

Burgess, PR. et Perl, ER. (1967) Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *J Physiol.* 190(3):541-562.

Cahill, CM., Holdridge, SV. Et Morinville, A. (2007) Trafficking of delta opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. *Trends Pharmacol Sci.* 28(1):23-31.

Cahill, CM., McClellan, KA., Morinville, A., Hoffert, C., Hubatsch, D., O'Donnell, D., et Beaudet, A. (2001) Immunohistochemical distribution of delta opioid receptors in the rat central nervous system: Evidence for somatodendritic labeling and antigen-specific cellular compartmentalization. *J Comp Neurol.* 440(1):65–84.

Campbell, NA. et Reece, JB. (2012) *Biologie.* (4e edition). ERPI.

Cahill, CM., Morinville, A., Lee, MC., Vincent, JP., Collier, B. et Beaudet, A. (2001) Prolonged morphine treatment targets delta opioid receptors to neuronal plasma membranes and enhances delta-mediated antinociception. *J Neurosci,* 21(19):7598-7607.

Cantu, DJ., Kaur, S., Murphy, AZ. et Averitt, DL. (2022) Sex differences in the amygdaloid projections to the ventrolateral periaqueductal gray and their activation during inflammatory pain in the rat. *J Chem Neuroanat.* 124:102123.

Cauna, N. et Ross, LL. (1960) The fine structure of meissner's touch corpuscles of human fingers. *J Biophys Biochem Cytol.* 8(2):467-82.

Cavanaugh, DJ., Lee, H., Lo, L., Shields, SD., Zylka, MJ., Basbaum, AI. et Anderson, DJ. (2009) Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(22):9075-9080.

Center for Substance Abuse Treatment. (2012) *Managing chronic pain in adults with or in recovery from substance use disorders.* Rockville (MD): Substance abuse and mental health services administration (US). TIP, series no.54.

Chang, W., Berta, T., Kim, YH., Lee, S., Lee, SY. et Ji, RR. (2018) Expression and role of voltage-gated sodium channels in human dorsal root ganglion neurons with special focus on Nav1.7, species differences, and regulation by paclitaxel. *Neurosci Bull.* 34(1):4-12.

Chefer, VI et Shippenberg,, TS. (2009) Augmentation of morphine-induced sensitization but reduction in morphine tolerance and reward in delta-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology.* 34(4) :887-898.

Chen, KH., Yang, HC., Cheng, JT., Wu, CH., Sy, WD. et Lin, CR. (2010) Altered neuronatin expression in the rat dorsal root ganglion after sciatic nerve transection. *J Biomed Sci.* 17(1):41.

Cheng, PY., Svingos, AL., Wang, H., Clarke, CL., Jenab, S., Beczkowska, IW., Inturrisi, CE. et Pickel, VM. (1995). Ultrastructural immunolabeling shows prominent presynaptic vesicular localization of delta-opioid receptor with both enkephalin- and nonenkephalin-containing axon terminals in the superficial layers of the rat cervical spinal cord. *J Neurosci.* 15(9) :5976-5988.

Chu Sin Chung, P., Boehrer, A., Stephan, A., Matifas, A., Scherrer, G., Darcq, E., Befort, K. et Kieffer, BL. (2015) Delta opioid receptors expressed in forebrain GABAergic neurons are responsible for SNC80-induced seizures. *Behav Brain Res.* 278:429-434.

Clark, SD. et Abi-Dargham, A. (2019) The role of dynorphin and the kappa opioid receptor in the symptomatology of schizophrenia: A review of the evidence. *Biol Psychiatry.* 86(7):502-511.

Constantino, CM., Gomes, I., Stockton Jr., SD., Lim, MP. et Devi, L. (2012) Opioid receptor heteromers in analgesia. *Expert Rev Mol Med.* 14 :e9.

Dado, RJ., Law, PY., Loh, HH et Elde, R. (1993) Immunofluorescent identification of a delta-opioid receptor on primary afferent nerve terminals. *Neuroreport.* 5(3):341-4.

Davidson, S., Copits, BA., Zhang, J., Page, G., Guetti, A. et Gereau, RW. (2014) Human sensory neurons: Membrane properties and sensitization by inflammatory mediators. *Pain.* 155(9):1861-1870.

Degradmaison, J., Abdallah, K., Blais, V., Génier, S., Lalumière, MP., Bergeron, F., Cahill, CM., Boulter, J., Lavoie, CL., Parent, JL. et Gendron, L., (2020) In vivo mapping of a GPCR interactome using knocking mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 117(23):13105-13116.

Degradmaison, J., Grisé, O., Parent, JL. et Gendron, L. (2021) Differential barcoding of opioid receptors trafficking. *J Neurosci. Res.* 100(1):99–128.

Degradmaison, J., Rochon-Haché, S., Parent, JL. et Gendron, L. (2022). Knock-in mouse models to investigate the functions of opioid receptors *in vivo*. *Front Cell Neurosci.* 16:807549.

De Nooij, JC., Doobar, S. et Jessel, TM. (2013) Etv1 Inactivation Reveals Proprioceptor Subclasses that Reflect the Level of NT3 Expression in Muscle Targets. *Neuron.* 77(6) :1055-1068.

Derouiche, L., Pierre, F., Doridot, S., Ory, S. et Massotte, D. (2020) Heteromerization of endogenous mu and delta opioid receptors induces ligand-selective co-targeting to lysosomes. *Molecules.* 25(19) :4493.

Djoughri, L. et Lawson, SN. (2004) A $\beta$ -fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Bain Res Rev.* 46(2):131-145.

- Djoughri, L. et Lawson, SN. (2001) Increased conduction velocity of nociceptive primary afferent neurons during unilateral hindlimb inflammation in the anaesthetised guinea-pig. *Neuroscience*. 102(3):669-79.
- Dubin, AE. et Patapoutian, A. (2010) Nociceptors : the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*. 120(11):3760-3772.
- Dripps, IJ., Bertels, Z., Moye, LS., Tiptom, AF., Siegersma, K., Baca, SM., Kieffer, BL. et Pradhan, AA. (2020) Forebrain delta opioid receptors regulate the response of delta agonist in models of migraine and opioid-induced hyperalgesia. *Sci Rep*. 10(1):17629.
- Erbs, E., Faget, L., Scherrer, G., Matifas, A., Filliol, D., Vonesch, JL., Koch, M., Kessler, P., Hentsch, D., Birling, MC., Koutsourakis, M., Vasseur, L., Veinante, P., Kieffer, BL. et Massotte. (2015) A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Struct Funct*. 220(2):677-702.
- Fan, Y., Evans, CR. et Ling, J. (2017) Rewiring protein synthesis: From natural to synthetic amino acids. *Biochim Biophys Acta*. 1861(11 Pt B):3024-3029.
- Flegel, C., Schöbel, N., Altmüller, J., Becker, C., Tannapfel, A., Hatt, H. et Gisselmann, G. (2015) RNA-Seq analysis of human trigeminal and dorsal root ganglia with a focus on chemoreceptors. *PLoS ONE*. 10(6) : e0128951.
- François, A. et Scherrer, G. (2018) Delta opioid receptor expression and function in primary afferent somatosensory neurons. *Handb Exp Pharmacol*. 247:87-114.
- Frigon, A., Akay, T. et Prilutsky, BI. (2022) Control of mammalian locomotion by somatosensory feedback. *Compr Physiol*. 12(1):2877-2947.
- Fujita, W. (2020) The possible role of MOPr-DOPr heteromers and its regulatory protein RTP4 at sensory neurons in relation to pain perception. *Front Cell Neurosci*. 14:609362.
- Fujita, W., Gomes, I. et Devi, LA. (2014) Revolution in GPCR signalling: opioid receptor heteromers as novel therapeutic targets: IUPHAR review 10. *Br J Pharmacol*. 171(18) :4155-4176.
- Fullerton, EF., Doyle, HH. et Murphy, AZ. (2018) Impact of sex on pain and opioid analgesia: a review. *Curr Opin Behav Sci*. 23:183-190.
- Fullerton, EF., Karom, MC., Streicher, JM., Young, LJ. et Murphy, AZ. (2022) Age-induced changes in mu-opioid receptor signaling in the midbrain periaqueductal gray of male and female rats. *J Neurosci*. 42(32):6232-6242.
- Fullerton, EF., Rubaharan, M., Karom, MC., Hanberry, RI. et Murphy, AZ. (2021) Advanced age attenuates the antihyperalgesic effect of morphine and decreases mu-opioid receptor expression and binding in the rat midbrain Periaqueductal gray in male and female rats. *Neurobiol Aging*. 98:78-87.

Gallantine, EL. et Meert, TF. (2005) A comparison of the antinociceptive and adverse effects of the mu-opioid agonist morphine and the delta-opioid agonist SNC80. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 97(1):39-51.

Garland, EL. (2012) Pain processing in the human nervous system: A selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. *Prim Care.* 39(3):561-571.

Gaskin, DJ. et Richard, P. (2012) The economics costs of pain in the United States. *J Pain.* 13(8):715-24.

Gatto, G., Smith, KM., Ross, SE. et Goulding, M. (2019) Neuronal diversity in the somatosensory system: Bridging the gap between cell type and function. *Curr Opin Neurobiol.* 56:167-174.

Gaveriaux-Ruff, C., Nozaki, C., Nadal, X., Hever, X. C., Weibel, R., Matifas, A., Reiss, D., Filliol, D., Nassar, MA., Wood, JN., Maldonado, R. et Kieffer, BL. (2011) Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia. *Pain.* 152(6):1238–1248.

Gendron, L., Cahill, CM., von Zastro, M., Schiller, PW. et Pineyro, G. (2016) Molecular pharmacology of delta-opioid receptors. *Pharmacol Rev.* 68(3) :631-700.

Gendron, L., Lucido, AL., Mennicken, F., O'Donnell, D., Vincent, JP., Stroh, T. et 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(3):953-962.

Gendron, L., Mittal, N., Beaudry, H. et Walwyn, W. (2015) Recent advances on the delta opioid receptor: From trafficking to function. *Br J Pharmacol.* 172(2):403-419.

Gendron, L., Pintar, JE. et Chavkin, C. (2007). Essential role of MOR in the regulation of DOR-mediated antihyperalgesia. *Neuroscience.* 150(4) :807-817.

Goadsby, PJ., Holland, PR., Martins-Oliveira, M., Hoffmann, J., Schankin, C. et Akerman, S. (2017) Pathophysiology of migraine: A disorder of sensory processing. *Physiol Rev.* 97(2):553-622.

Gold, MS., Dastmalchi, S. et Levine, JD. (1996) Co-expression of nociceptor properties in dorsal root ganglion neurons from the adult rat *in vitro*. *Neuroscience.* 71(1) :265-275.

Gomes, I., Fujita, W., Gupta, A., Saldanha, SA., Negri, A., Pinello, CE., Eberhart, C., Roberts, E., Filizola, M., Hodder, P. et Devi, LA. (2013) Identification of a mu-delta opioid receptor heteromer-biased agonist with antinociceptive activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110(29) :12072-12077.

Gomes, I., Jordan, BA., Gupta, A., Trapaidze, N., Nagy, V. et Devi, A. (2000) Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci.* 20(22) :RC110.

Gomes, I., Gupta, A., Filipovska, J., Szeto, HH., Pintar, JE. et Devi, LA. (2004) A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(14) :5135-5139.

Gouvernement du Canada. (2021, 10 septembre). Rapport du groupe de travail canadien sur la douleur : juin 2019. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/organisation/a-propos-sante-canada/mobilisation-publique/organismes-consultatifs-externes/groupe-travail-douleur-chronique/rapport-2019.html>

Gouvernement du Canada. (2022, 14 décembre). Mesures fédérales sur les opioïdes à ce jour. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/opioides/mesures-federales/aperçu.html>

Greenspan, J., Craft, RM., LeRescheche, L., Arendt-Nielsen, L., Berkley, KJ., Fillingim, RB., Gold, MS., Holdcroft, A., Lautenbacher, S., Mayer, EA., Mogil, JS., Murphy, AZ. et Traub, RJ. (2007) Studying sex and gender differences in pain and analgesia: A consensus report. *Pain.* 132(Suppl 1):S2-S45.

Guan, JS., Xu, ZZ., Gao, H., He, SQ., Ma, GQ., Sun, T., Wang, LH., Zhang, ZN., Lena, I., Kitchen, I., Elde, R., Zimmer, A., He, C., Pei, G., Bao, L. et Zhang, X. (2005) Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of delta-opioid receptors and opioid analgesia. *Cell.* 122(4) :619-31.

Gupta, A., Mulder, J., Gomes, I., Rozenfeld, R., Bushlin, I., Ong, E., Lim, M., Maillet, E., Junek, M., Cahill, CM., Harkany, T. et Devi, LA. (2010) Increased abundance of opioid receptor heteromers following chronic morphine administration. *Sci Signal.* 3(131) :ra54.

Haberberger, RV., Barry, C., Dominguez, N. et Matusica, D. (2019) Human dorsal root ganglia. *Front Cell Neurosci.* 13 :271.

Hall, BE., Macdonald, E., Cossidy, M., Yun, S., Sapio, MR., Ray, P., Doty, M., Nara, P., Burton, MD., Shiers, S., Ray-Chaudhury, A., Mannes, AJ., Price, TJ., Iadarola, MJ. Et Kulkarni, AB. (2022) Transcriptomic analysis of human sensory neurons in painful diabetic neuropathy reveals inflammation and neuronal loss. *Sci Rep.* 12 :4729.

Han, C., Estacion, M., Huang, J., Vasylyev, D., Zhao, P., Dib-Hajj, SD. et Waxman, SG. (2015) Human Nav1.8: Enhanced persistent and ramp currents contribute to distinct firing properties of human DRG neurons. *J Neurophysiol.* 113(9):3172-3185.

Harris, RE., Clauw, DJ., Scott, DJ., McLean, SA., Gracely, RH. et Zubieta, JK. (2007) Decreased central mu-opioid receptor availability in fibromyalgia. *J Neurosci.* 27(37):10000-10006.

Hockley, JRF., Taylor, TS., Callejo, G., Wilbrey, AL., Gutteridge, A., Bach, K., Winchester, WJ., Bulmer, DC., McMurray, G. et Smith, ESJ. (2019) Single-cell RNAseq reveals seven classes of colonic sensory neuron. *Gut*. 68(4):633-644.

Hokfelt, T., Kellerth, J., Nilsson, G., & Pernow, B. (1975) Substance P: Localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science*. 190(4217) :889–890.

Hylands-White, N., Duarte, RV. et Raphael, JH. (2016) An overview of treatment approaches for chronic pain management. *Rheumatol Int*. 37(1):29-42.

Ichikawa, H., Schulz, S., Hölt, V. et Sugimoto, T. (2005) Delta-opioid receptor-immunoreactive neurons in the rat cranial sensory ganglia. *Brain Res*. 1043(1-2):225-30.

International Association for the Study of Pain. (2020). *Terminology: Pain*. <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/#pain>.

Jacobson, ML., Browne, CA et Lucki, I. (2020) Kappa opioid receptor antagonists as potential therapeutics for stress-related disorders. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 60:615-636.

Jeong, J., Park, YY., Kim, DK., Lee, S., Kwak, Y., Lee, SA., Lee, H., Suh, YH., Gho, YS., Hwang, D. et Park, SK. (2013) Cdk5 phosphorylates dopamine D2 receptor and attenuates downstream signaling. *PLoS ONE*, 8(12): e84482.

Ji, RR., Zhang, Q., Law, PY., Low, HH., Elde, R. et Hökfelt, T. (1995) Expression of mu, delta, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J Neurosci*. 15(12):8156-8166.

Johansson, RS. et Flanagan, JR. (2009) Coding and use of tactile signals from the fingertips in object manipulation tasks. *Nat Rev Neurosci*. 10(5):345-59.

Jones, AK., Cunningham, VJ., Ha-Kawa, S., Fujiwara, T., Luthra, SK., Silva, S., Derbyshire, S. et Jones, T. (1994) Changes in central opioid receptor binding in relation to inflammation and pain in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 33(10):909-916.

Julius, D. et Basbaum, AI. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 413(6852):203-10.

Kandel, ER., Koester, JD., Mack, SH. et Siegelbaum, SA. (2021) *Principles of neural science* (Sixth). McGraw-Hill.

Khademi, H., Kamangar, F., Brennan, P. et Malekzadeh, R. (2016) Opioid therapy and its side effects: A review. *Arch Iran Med*. 19(12):870-876.

Khalid, S. et Tubbs, RS. (2017) Neuroanatomy and neuropsychology of Pain. *Cureus*. 9(10): e1754.

- KimmeY, BA., McCall, NM., Wooldrige, LM., Satterthwaite, TD. et Corder, G. (2022) Engaging endogenous opioid circuits in pain affective processes. *J Neurosci Res.* 100(1):66-98.
- Kooistra, AJ., Mordalski, S., Pandy-Szekeres, G., Esguerra, M., Mamyrbekov, A., Munk, C., Keseru, GM. et Gloriam, DE. (2021) GPRCRdb in 2021: integrating GPCR sequence, structure and function. *Nucleic Acids Res.* 49(D1):D335-D343.
- Kose, SG., Kose, HC., Celikel, F., Tulgar, S., De Cassai, A., Akkaya, OT. et Hernandez, N. (2022) Chronic pain: An update of clinical practices and advances in chronic pain management. *Eurasian J Med.* 54(Suppl1):57-61.
- Loyd, DR. et Murphy, AZ. (2014) The neuroanatomy of sexual dimorphism in opioid analgesia. *Exp Neurol.* 0:57-63.
- Moulin, DE., Max, MB., Kaiko, RF., Inturrisi, CE., Maggard, J., Yaksh, TL. et Foley, KM. (1985) The analgesic efficacy of intrathecal d-ala2-d-leu5-enkephalin in cancer patients with chronic pain. *Pain.* 23(3): 213–221.
- Kupari, J., Usokin, D., Parisien, M., Lou, D., Hu, Y., Fatt, M., Lönnerberg, P., Spångberg, M., Eriksson, B., Barkas, N., Kharchenko, PV., Loré, K., Khoury, S., Diatchenko, L. et Ernfors, P. (2021) Single cell transcriptomics of primate sensory neurons identifies cell types associated with chronic pain. *Nat Commun.* 12(1):1510.
- Land, BB., Bruchas, MR., Schattauer, S., Giardino, WJ., Aita, M., Messinger, D. Hnasko, TS., Palmiter, RD. et Chavkin, C. (2009) Activation of the kappa opioid receptor in the dorsal raphe nucleus mediates the aversive effects of stress and reinstates drug seeking. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(45) :19168-73.
- Law, PY., Wong, YH. et Loh, HH. (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 40:389- 430.
- Le Bars, D., Dickenson, AH. et Besson, J. (1979) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications. *Pain.* 6(3), 305–327.
- Le Bars, D., Villanueva, L., Bouhassira, D. et Willer, JC. (1992) Diffuse noxious Inhibitory controls (DNIC) in animals and in man. *Patol Fiziol Eksp Ter.* (4):55-65.
- Lee, KH., Chung, K., Chung, JM. et Coggeshall, RE. (1986) Correlation of cell body size, axon Size and signal conduction velocity for individually labelled dorsal root ganglion cells in the cat. *J Comp Neurol.* 243(3):335-346.
- Lee, KS., Zhang, Y, Asgar, J, Auh, QS., Chung, MK. et Ro, JY. (2016) Androgen receptor transcriptionally regulates mu-opioid receptor expression in rat trigeminal ganglia. *Neuroscience.* 331:52-61.

- Le Pichon, CE. et Chesler, AT. (2014) The functional and anatomical dissection of somatosensory subpopulations using mouse genetics. *Front Neuroanat.* 8:21.
- Li, L., Rutlin, M., Abaira, VE., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, MP., Luo, W., Heintz, N., Koerber, HR., Woodbury, CJ. Et Ginty, DD. (2011). The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell.* 147(7) :1615-1627.
- Lynch, ME. et Watson, CPN. (2006) The pharmacotherapy of chronic pain: A review. *Pain Res Manag.* 11(1):11-38.
- Lynn, B. et Carpenter, SE. (1982) Primary afferent units from the hairy skin of the rat hind limb. *Brain Res.* 238(1), 29–43.
- Macé, K., Giudice, E. et Gillet. (2015) Protein synthesis by the ribosome: a pathway full of pitfalls. *Med Sci (Paris).* 31(3):282-290.
- Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, ME., Akil, H., et Watson, SJ. (1988) Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends in Neurosci.* 11(7), 308–314.
- Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, ME., Akil, H. et Watson, SJ. (1987) Autoradiographic differentiation of mu, delta and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J Neurosci.* 7(8) :2445-64.
- Mansour, A., Thompson, RC. Et Watson, SJ. (1993) Delta opioid receptor mRNA distribution in the rat brain: Comparison to delta receptor binding and proenkephalin mRNA. *J Chem Neuroanat.* 6(6):351-62.
- Marshall, KL., Saade, D., Ghitani, N., Coombs, AM., Szczot, M., Keller, J., Ogata, T., Daou, I., Stowers, LT., Bönnemann, CG., Chesler, AT. et Patapoutian, A. (2020) PIEZO2 in sensory neurons and urothelial cells coordinates urination. *Nature.* 588(7837) :290-295.
- Martinez-Navarro, M., Cabanero, D., Wawrzczak-Bargiela, A., Robe, A., Gavériaux-Ruff, C., Kieffer, BL., Przewlocki, R., Banos, JE. et Maldonado. (2020) Mu and delta opioid receptors play opposite nociceptive and behavioural roles on nerve-injured mice. *Br J Pharmacol.* 177(5) :1187-1205.
- McCoy, ES., Taylor-Blake, B., Street, SE., Pribisko, AL., Zheng, J. et Zylka, MJ. (2013). Peptidergic CGRP $\alpha$  primary sensory neurons encode heat and itch and tonically suppress sensitivity to cold. *Neuron.* 78(1) :138-151.
- Melzack, R. et Wall, PD. (1965) Pain mechanisms: A new theory. *Science.* 150(3699) :971–979.

Megat, S., Ray, PR., Tavares-Ferreira, D., Moy, JK., Sankaranarayanan, I., Wangzhou, A., Lou, TF., Barragan-Iglesias, P., Campbell, ZT., Dussor, G. et Price, TJ. (2019) Differences between dorsal root and trigeminal ganglion nociceptors in mice revealed by translational profiling. *J Neurosci.* 39(25):6829-6847.

Mennicken, F., Zhang, J. Hoffert, C., Ahmad, S., Beaudet, A. et O'Donnell, D. (2003) Phylogenetic changes in the expression of delta opioid receptors in spinal cord and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol.* 465(3):349-60.

Mense, S. (1990) Structure-function relationships in identified afferent neurons. *Anat Embryol.* 181:1-17.

Mense, S. (1983) Basic neurobiologic mechanisms of pain and analgesia. *Am J Med.* 75(5A): 4-14.

Merrick, WC. et Pavitt, G. (2018) Protein synthesis initiation in eukaryotic cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 10(12):a033092.

Metcalf, MD., Yekkirala, AS., Powers, MD., Kitto, KF., Fairbanks, CA., Wilcox, GL. et Portoghese, PS. (2012) The delta opioid receptor agonist SNC80 selectively activates heteromeric mu-delta opioid receptors. *ACS Chem Neurosci.* 3(7):505-509.

Millan, MJ. (1999) The induction of pain: An integrative review. *Prog Neurobiol.* 57(1):1-164.

Minami, M., Maekawa, K., Yabuuchi, K. et Satoh, M. (1995) Double in situ hybridization study on coexistence of mu-, delta- and kappa-opioid receptor mRNAs with preprotachykinin A mRNA in the rat dorsal root ganglia. *Brain Res Mol Brain Res.* 30(2) :203-10.

Mitchell, ME., Cook, LC., Shiers, S., Tavares-Ferreira, D., Akopian, AN., Dussor, G. et Price, TJ. (2023) Characterization of fragile X mental retardation protein expression in human nociceptors and their axonal projections to the spinal dorsal horn. *J Comp Neurol.* 531(7):814-835.

Mogil, JS. (2020) Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nat Rev Neurosci.* 21:353-365.

Morinville, A., Cahill, CM., Esdaile, MJ., Aibak, H., Collier, B., Kieffer, BL. et Beaudet, A. (2003) Regulation of delta-opioid receptor trafficking via mu-opioid receptor stimulation: Evidence from u-opioid receptor knock-out mice. *J Neurosci.* 23(12): 4888-4898.

Morinville, A., Cahill, CM., Kieffer, B., Collier, B. et Beaudet, A. (2004) Mu-opioid receptor knockout prevents changes in delta-opioid receptor trafficking induced by chronic inflammatory pain. *Pain.* 109(3) :266-273.

Morgan, MM. et Christie, MJ. (2011) Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *Br J Pharmacol.* 164(4) :1322-1334.

Moulin, DE., Max, MB., Kaiko, RF., Inturrisi, CE., Maggard, J., Yaksh, TL. et Foley, KM. (1985) The analgesic efficacy of intrathecal d-ala2-d-leu5-enkephalin in cancer patients with chronic pain. *Pain.* 23(3), 213–221.

Moye, LS., Siegersma, K., Dripps, I., Witkowski, W., Mangutov, E., Wang, D., Scherrer, G. et Pradhan, AA. (2021) Delta opioid receptor regulation of CGRP dynamics in the trigeminal complex. *Pain.* 162(8) : 2297-2308.

Moy, JK., Hartung, JE., Dugue, MG., Friedman, R., Nagarajan, V., Loeza-Alcocer, E., Koerber, HR., Christoph, T., Schröder, W. et Gold, MS. (2020) Distribution of functional opioid receptors in human dorsal root ganglia neurons. *Pain.* 161(7):1636-1649.

Nagi, SS., Marshall, AG., Makdani, A., Jarocka, E., Liljencrantz, J., Ridderström, M., Shaikh, S., O'Neill, F., Saada, D., Donkervoort, S., Foley, AR., Minde, J., Trulsson, M., Cole, J., Bönnemann, CG., Chesler, AT., Bushnell, MC., McGlone, F. et Olausson, H. (2019) An ultrafast system for signaling mechanical pain in human skin. *Sci Adv.* 5(7), eaaw1297.

Nguyen, MQ., von Buchholtz, LJ., Reker, AN., Ryba, NP. et Davidson, S. (2021) Single-nucleus transcriptomic analysis of human dorsal root ganglion neurons. *ELife.* 10:e71752.

North, RY., Li, Y., Ray, P., Rhines, LD., Tatsui, CE., Rao, G., Johansson, CA., Zhang, H., Kim, YH., Zhang, B., Dussor, G., Kim, TH., Price, TJ. et Dougherty, PM. (2019) Electrophysiological and transcriptomic correlates of neuropathic pain in human dorsal root ganglion neurons. *Brain.* 142(5):1215-1226.

Obreja, O., Ringkamp, M., Namer, B., Forsh, E., Klusch, A., Rukwied, R., Petersen, M. et Schmelz, M. (2010) Patterns of activity-dependent conduction velocity changes differentiate classes of unmyelinated mechano-insensitive afferents including cold nociceptors, in pig and in human. *Pain.* 148(1):59-69.

Olausson, H., Lamarre, Y., Backlund, H., Morin, C., Wallin, BG., Starck, G., Ekholm, S., Strigo, I., Worsley, K., Valbo, AB. et Bushnell, MC. (2002) Unmyelinated tactile afferents signal touch and project to insular cortex. *Nat Neurosci.* 5(9):900-904.

Onofrio, B. et Yaksh, TL. (1983) Intrathecal delta-receptor ligand produces analgesia in man. *Lancet.* 1(8338):1386–1387.

Pak, DJ., Yong, RJ., Kaye, AD., & Urman, RD. (2018) Chronification of pain: Mechanisms, current understanding, and clinical implications. *Curr Pain Headache Rep.* 22(2):9.

Papalampropoulou-Tsiridou, M., Shiers, S., Wang, F., Godin, AG., Price, TJ. Et De Koninck, Y. (2022) Distribution of acid-sensing ion channel subunits in human sensory neurons contrasts with that in rodents. *Brain Commun.* 4(6) :fcac256.

Paré, M., Elde, R., Mazurkiewicz, JE., Smith, AM. et Rice, FL. (2001) The meissner corpuscle revised: A multiafferented mechanoreceptor with nociceptor immunochemical properties. *J Neurosci.* 21(18):7236-7246.

Pasluosta, C., Kiele, P. et Stieglitz, T. (2018) Paradigms for restoration of somatosensory feedback via stimulation of the peripheral nervous system. *Clin Neurophysiol.* 129(4) :851-862.

Paton, KF., Atigari, DV., Kasta, S., Prisinzano, T. et Kivell, BM. (2020) Strategies for developing kappa opioid receptor agonists for the treatment of pain with fewer side effects. *J Pharmacol Exp Ther.* 375(2) :332-328.

Peirs, C., Dallel, R. et Todd, AJ. (2020) Recent advances in our understanding of the organization of dorsal horn neuron populations and their contribution to cutaneous mechanical allodynia. *J Neural Transm (Vienna).* 127(4) :505-525.

Peng, J., Sarkar, S. et Chang, SL. (2012) Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR. *Drug Alcohol Depend.* 124(3) :223-228.

Petitjean, H., Bourojeni, FB., Tsao, D., Davidova, A., Sotocinal, SG., Mogil, JS., Kania, A. et Sharif-Naeni, R. (2019). Recruitment of spinoparabrachial neurons by dorsal horn calretinin neurons. *Cell Rep.* 28(6):1429-1438.e4.

Petruska, J., Napaporn, J., Johnson, R. et Cooper, B. (2002) Chemical responsiveness and histochemical phenotype of electrophysiologically classified cells of the adult rat dorsal root ganglion. *Neuroscience.* 115(1):15–30.

Pierce, LM., Rankin, MR., Foster, RT., Dolber, PC., Coates, KW., Kuehl, TJ. et Thor, KB. (2006) Distribution and immunohistochemical characterization of primary afferent neurons innervating the levator ani muscle of the female squirrel monkey. *Am J Obstet Gynecol.* 195(4), p. 987-996.

Pradhan, AA. Et Clarke, PB. (2004) Comparison between delta-opioid receptor functional response and autoradiographic labeling in rat brain and spinal cord. *J CompNeurol.* 481(4): 416–26.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A-S., McNamara, J.O. et Williams, S.M. (2001) *Neuroscience, 2<sup>nd</sup> edition.* Sinauer Associates.

Quirion, B., Beaulieu, C., Côté, L., Parent, J.L. et Gendron, L. (2022) *Distribution of delta and mu opioid receptors mRNA in rodent dorsal root ganglia neurons. Eur J Neurosci.* 56(3) :4031-4044.

Quirion, B., Bergeron, F., Blais, V. et Gendron, L. (2020) The delta-opioid receptor: A target for the treatment of pain. *Front Mol Neurosci.* 13:52.

Rambourg, A., Clermont, Y. et Beaudet, A. (1983) Ultrastructural features of six types of neurons in rat dorsal root ganglia. *J Neurocytol.* 12(1): 47-66.

Rau, K.K., Caudle, R.M., Cooper, B.Y. et Johnson, R.D. (2005) Diverse immunocytochemical expression of opioid receptors in electrophysiologically defined cells of rat dorsal root ganglia. *J Chem Neuroanat.* 29(4):255-264.

Ray, P.R., Shiers, S., Caruso, J.P., Tavares-Ferreira, D., Sankaranarayanan, I., Uhelski, M.L., Li, Y., North, R.Y., Tatsui, C., Dussor, G., Burton, M.D., Dougherty, P.M. et Price, T.J. (2022) RNA profiling of human dorsal root ganglia reveals sex differences in mechanisms promoting neuropathic pain. *Brain.* awac266.

Ray, P., Torck, A., Quigley, L., Wangzhou, A., Neiman, M., Rao, C., Lam, T., Kim, J.Y., Kim, T.M., Zhang, M.Q., Dussor, G. et Price, T.J. (2018) Comparative transcriptome profiling of the human and mouse dorsal root ganglia: A RNA-seq-based resource for pain and sensory neuroscience research. *Pain.* 157(7):1325-1345.

Reed, B., Butelman, E.R., Fry, R.S., Kimani, R. et Kreek, M.J. (2018) Repeated administration of opra kappa (LY2456302), a novel, short-acting, selective KOP-r antagonist, in persons with and without cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology.* 43(4):739-750.

Rice, F.L., Xie, J.Y., Albrecht, P.J., Acker, E., Bourgeois, J., Navratilova, E., Dodick, D.W. et Porreca, F. (2016) Anatomy and immunochemical characterization of the non-arterial peptidergic diffuse dural innervation of the rat and Rhesus monkey: Implications for functional regulation and treatment in migraine. *Cephalalgia.* 37(14) :1350-1372.

Rostock, C., Schrenk-Siemens, K., Pohle, J. et Siemens, J. (2018) Human vs. Mouse nociceptors – similarities and differences. *Neuroscience.* 387 :13-27.

Saito-Diaz, K., Street, J.R., Ulrichs, H. et Zeltner, N. (2021) Derivation of peripheral nociceptive, mechanoreceptive, and proprioceptive sensory neurons from the same culture of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports.* 16(3):446-457.

Sato, A., Sato, Y. et Suzuki, H. (1985) Aging effects on conduction velocities of myelinated and unmyelinated fibers of peripheral nerves. *Neurosci Lett.* 53(1) :15-20.

Schaffler, M.D., Middleton, L.J. Et Abdus-Saboor. (2019) Mechanisms of tactile sensory phenotypes in autism: Current understanding and future directions for research. *Curr Psychiatry Rep.* 21(12) :134.

Scherrer, G., Imamachi, N., Cao, YQ., Contet, C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, BL. et Basbaum, AI. (2009) Dissociation of the Opioid Receptor Mechanisms that Control Mechanical and Heat Pain. *Cell*. 137(6):1148-1159.

Scherrer, G., Tryoen-Toth, P., Filliol, D., Matifas, A., Laustriat, D., Cao, YQ., Basbaum, AI., Dierich, A., Vonesh, JL., Gavériaux-Ruff, C. et Kieffer, BL. (2006) Knocking mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(25):9691-9696.

Sean, M., Coulombe-Lévêque, A., Vincenot, M., Martel, M., Gendrom, L., Marchand, S. et Léonard, G. (2021) Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) : Towards the development of a clinic-friendly method for the evaluation of excitatory and inhibitory pain mechanisms. *Can J Pain*. 5(1) :56-65.

Shansky, RM. et Murphy, AZ. (2021) Considering sex as a biological variable will require a global shift in science culture. *Nat Neurosci*. 24:457-464.

Sharif-Naeini, R. et Basbaum, AI. (2011) Targeting Pain Where It Resides ... In the Brain. *Sci Transl Med*. 3(65):65ps1.

Sharif, NA. et Hughes, J. (1989) Discrete mapping of brain mu and delta opioid receptors using selective peptides: Quantitative autoradiography, species differences and comparison with kappa receptors. *Peptides*. 10(3):499-522.

Sharma, N., Flaherty, K., Lezgiyeva, K., Wagner, DE., Klein, AM. et Ginty, DD. (2020) The emergence of transcriptional identity in somatosensory neurons. *Nature*. 577(7790):392-398.

Sharma, P., Steinbach, PJ., Sharma, M., Amin, ND., Barchi Jr., JJ. et Pant, HC. (1999) Identification of substrate binding site of cyclin-dependent kinase 5. *J Biol Chem*. 274(14):9600-9606.

Sherrington, C. S. (1906). *The Integrative Action of the Nervous System*. <https://liberationchiropractic.com/wp-content/uploads/research/1906Sherrington-IntegrativeAction.pdf>.

Shiers, S., Klein, RM. et Price, TJ. (2020) Quantitative differences in neuronal subpopulations between mouse and human dorsal root ganglia demonstrated with RNAscope *in situ* hybridization. *Pain*. 161(10) :2410-2424.

Shiers, S., Sankaranarayanan, I., Jeevakumar, V., Cervantes, A., Reese, JC. et Price, TJ. (2021) Convergence of peptidergic and non-peptidergic protein markers in the human dorsal root ganglion and spinal dorsal horn. *J Comp Neurol*. 529(10) :2771-2788.

Shiers, S., Sahn, JJ. Et Price, TJ. (2023) MNK1 and MNK2 expression in the human dorsal root and trigeminal ganglion. *Neuroscience*. 515(1): 96-107.

Silberstein, SD. (2004) Migraine. *Lancet*. 363(9406) :381-391.

Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Matthes, H., Nappey, V., Lannes, B., Micheletti, G. et Kieffer, B. (1994) The human delta-opioid receptor: genomic organization, cDNA cloning, functional expression, and distribution in human brain. *Mol Pharmacol*. 46(6):1015-21.

Slowe, SJ., Simonin, F., Kieffer, B. et Kitchen, I. (1999) Quantitative autoradiography of  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ 1 opioid receptors in  $\kappa$ -opioid receptor knockout mice. *Brain Res*. 818(2):335–345.

Snyder, LM., Chiang, MC., Loeza-Alcocer, E., Omori, Y., Hachisuka, J., Sheahan, TD., Gale, JR., Adelman, PC., Sypek, EI., Fulton, SA., Friedman, RL., Wright, MC., Duque, MG., Lee, YS., Hu, Z., Huang, H., Cai, X., Meerschaert, KA., Nagarajan, V., Hirai, T., Scherer, G., Kaplan, DH., Porreca, F., Davis, BM., Gold, MS., Koerber, HR. Et Ross, SE. (2018) Kappa opioid receptor distribution and function in primary afferents. *Neuron*. 99(6) :1274-1288.e6.

Sobinov, AR. et Bensmaia, SJ. (2021) The neural mechanisms of manual dexterity. *Nat rev neurosci*. 22(12) :741-757.

Sonner, MJ., Walters, MC. Et Ladle, DR. (2017) Analysis of proprioceptive sensory innervation of the mouse soleus: A whole-mount muscle approach. *PLoS One*. 12(1) :e0170751.

Stacey, MJ. (1969) Free nerve endings in skeletal muscle of the cat. *J Anat*. 105(Pt 2):231-254.

St-Louis, É., Degrandmaison, J., Grastilleur, S., Génier, S., Blais, V., Lavoie, C., Parent, JL. et Gendron, L. (2017) Involvement of the coatamer protein complex I in the intracellular traffic of the delta opioid receptor. *Mol Cell Neurosci*. 79:53-63.

Schwaib, AG., Krasowka-Zoladek, A., Chi, A. et Cornella-Taracido, I. (2018) Comparison of the rat and human dorsal root ganglion proteome. *Sci Rep*. 8(1):13469.

Tarpley, JW., Kohler, MG. et Martin, WJ. (2004) The behavioral and neuroanatomical effects of IB4-saporin treatment in rat models of nociceptive and neuropathic pain. *Brain Res*. 1029(1) :65-76.

Tavares-Ferreira, D., Shiers, S., Ray, PR., Wangzhou, A., Jeevakumar, V., Sankaranarayanan, I., Cervantes, AM., Reese, JC., Chamesian, A., Copits, BA., Dougherty, PM., Gereau 4<sup>th</sup>, RW., Burton, MD., Dussor, G. et Price, TJ. (2022) Spatial transcriptomics of dorsal root ganglia identifies molecular signatures of human nociceptors. *Sci Transl Med*. 14(632) :eabj8186.

Terrier, LM., Hadjikhani, N. et Destrieux, C. (2022) The trigeminal pathways. *J Neurol*. 269(7) :3443-3460.

Teruel, A. et Romero-Reyes, M. (2022) Interplay of oral, mandibular, and facial disorders and migraine. *Curr Pain Headache Rep.* 26(7):517-523.

Tempel, A. et Zukin, RS. (1987) Neuroanatomical patterns of the mu, delta and kappa opioid receptors of rat brain as determined by quantitative *in vitro* autoradiography. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84(12):4308-12.

Tinnirello, A., Mazzoleni, S. et Santi, C. (2021) Chronic Pain in the elderly: Mechanisms and distinctive features. *Biomolecules.* 11(8) :1256.

Tiwari, V., He, SQ., Huang, Q., Liang, L., Yang, F., Chen, Z., Tiwari, V., Fujita, W., Devi, LA., Dong, X., Guan, Y. et Raja, SN. (2020) Activation of mu-delta opioid receptor heteromers inhibits neuropathic pain behavior in rodents. *Pain.* 161(4) :842-855.

Treede, RD., Meyer, RA. et Campbell, JN. (1998) Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: Heat-response properties. *J Neurophysiol.* 80(3):1082–1093.

Usoskin, D., Furlan, A., Islam, S., Abdo, H., Lönnnerberg, P., Lou, D., Hjerling-Leffler, J., Haeggström, J., Kharchenko, O., Kharchenko, PV., Linnarsson, S. et Ernfors, P. (2015) Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci.* 18(1):145-153.

Viventy, S. et Dottori, M. (2018) Modelling the dorsal root ganglia using human pluripotent stem cells: A platform to study peripheral neuropathies. *Intl J Biochem Cell Biol.* 100:61-68.

Vulchanova, L., Riedl, MS., Shuster, SJ., Stone, LS., Hargreaves, KM., Buell, G., Suprenant, A., North, RA. et Elde, R. (1998) P2X<sub>3</sub> is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II. *Eur J Neurosci.* 10(11) :3470–3478.

Vulchanova, L., Olson, TH., Stone, LS., Riedl, MS., Elde, R. et Honda, CN. (2001) Cytotoxic targeting of isolectin IB<sub>4</sub>-binding sensory neurons. *Neuroscience.* 108(1) :143-55.

Wang, D., Tawfik, VL., Corder, G., Low, SA., François, A., Basbaum, AI. et Scherrer, G. (2018) Functional divergence of delta and mu opioid receptor organization in CNS pain circuits. *Neuron.* 98(1) :90-108.

Wang, HB., Zhong, YQ., Li, KC., Li, ZY., Wang, Q., Lu, YJ., Zhang, ZN., He, SQ., Zheng, HC., Wu, SX., Hökfelt, T.G., Bao, L. et Zhang, X. (2010) Coexpression of delta and mu opioid receptors in nociceptive sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(29):13117-13122.

Wang, H. et Wessendorf, MW. (2001) Equal proportions of small and large DRG neurons express opioid receptor mRNAs. *J Comp Neurol.* 429(4):590- 600.

Wang, X., Traub, R.J. et Murphy, A.Z. (2006) Persistent pain model reveals sex difference in morphine potency. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 291(2):R300-R306.

Wang, Z., Gerstein, M. et Snyder, M. (2009) RNA-seq : a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 10(1):57-63.

Wangzhou, A., McIlvried, L.A., Paige, C., Barragan-Iglesias, P., Shiers, S., Ahmad, A., Guzman, C.A., Dussor, G., Ray, P.R., Gereau IV, R.W. et Price, T.J. (2020) Pharmacological target-focused transcriptomic analysis of native versus cultured human and mouse dorsal root ganglia. *Pain.* 161(7):1497-1517.

Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., Lundberg, J.M., Forssmann, W.G., Reinecke, M., Tschopp, F.A. et Fischer, J.A. (1984) Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat. *Neurosci Lett.* 52(1-2) :199–204.

Wilson, M.G., Lavis, J.N. et Ellen, M.E. (2015) Supporting chronic pain management across provincial and territorial health systems in Canada: Findings from two stakeholder dialogues. *Pain Res Manag.* 20(5) :269-279.

Woolf, C.J. et Ma, Q. (2007) Nociceptors : Noxious stimulus detectors. *Neuron.* 55(3) :353-364.

Xie, G.X., Meuser, T., Pietruck, C., Sharma, M. et Palmer, P.P. (1999) Presence of opioid receptor-like (ORL1) receptor mRNA splice variants in peripheral sensory and sympathetic neuronal ganglia. *Life Sci.*, 64(22), 2029–2037.

Xie, W.Y., He, Y., Yang, Y.R., Li, Y.F., Kang, K., Xing, B.M. et Wang, Y. (2009) Disruption of Cdk5-associated phosphorylation of residue threonine-161 of the delta-opioid receptor: Impaired receptor function and attenuated morphine antinociceptive tolerance. *J Neurosci.* 29(11):3551-3564.

Xing, B.M., Yang, Y.R., Du, J.X., Chen, H.J., Qi, C., Huang, Z.H., Zhang, Y. et Wang, Y. (2012) Cyclin-dependent kinase 5 controls TRPV1 membrane trafficking and the heat sensitivity of nociceptors through KIF13B. *J Neurosci.* 32(42):14709-14721.

Yekkirala, A.S., Banks, M.L., Lunzer, M.M., Negus, S.S., Rice, K.C. et Portoghese, P.S. (2012) Clinically employed opioid analgesics produce antinociception via mu-delta opioid receptor heteromers in rhesus monkeys. *ACS Chem Neurosci.* 3(9) :720-727.

Zeisel, A., Hochgerner, H., Lönnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., van der Zwan, J., Häring, M., Braun, E., Borm, L.E., La Manno, G., Codeluppi, S., Furlan, A., Lee, K., Skene, N., Harris, K.D., Hjerling-Leffler, J., Arenas, E., Ernfors, P., Marklund, U. et Linnarsson, S. (2018) Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell.* 174(4):999-1014.e22.

Zimmerman, A., Bai, L. et Ginty, DD. (2014) The gentle touch receptors of mammalian skin. *Science*. 346(6212) :950-954.

Zhang, X., Bao, L., Arvidsson, U., Eldes, R. et Hökfelt T. (1998) Localization and regulation of the delta-opioid receptor in dorsal root ganglia and spinal cord of the rat and monkey: Evidence for association with the membrane of large dense-core vesicles. *Neuroscience*. 82(4) :1225-1242.

Zhang, X., Bao, L., Shi, TJ., Ju, G., Elde, R. et Hökfelt, T. (1998) Down-regulation of  $\mu$ -opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. *Neuroscience*. 82(1):223–240.

Zhang, J., Cavanaugh, DJ., Nemenov, MI. et Basbaum, AI. (2013) The modality-specific contribution of peptidergic and non-peptidergic nociceptors in manifest at the level of dorsal horn nociresponsive neurons. *J Physiol*. 591(Pt 4):1097-1110.

Zhang, S., Edelmann, L., Liu, J., Crandall, JE. et Morabito, MA. (2008) Cdk5 regulates the phosphorylation of tyrosine 1472 NR2B and the surface expression of NMDA receptors. *J Neurosci*. 28(2):415-424.

Zhang, X., Priest, BT., Belfer, I. et Gold, MS. (2017) Voltage-gated  $\text{Na}^+$  currents in human dorsal root ganglion neurons. *ELife*. 6 :e23235.

Zhao, J., Xin, X., Xie, Gx., Palmer, PP. et Huang, YG. (2012) Molecular and cellular mechanisms of the age-dependency of opioid analgesia and tolerance. *Mol Pain*. 8:38.

Zheng, Y., Liu, P., Bai, L., Trimmer, JS., Bean, BP. et Ginty, DD. (2019) Deep sequencing of somatosensory neurons reveals molecular determinants of intrinsic physiological properties. *Neuron*. 103(4) :598-616.e.7.

Zhu, Y., King, MA., Schuller, AGP., Nitsche, JF., Reidl, M., Elde, RP., Unterwald, E., Pasternak, GW. et Pintar, JE. (1999) Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. *Neuron*. 24(1) :243-52.

Zollner, C., Shaqura, MA., Bopaiah, CP., Mousa, S., Stein, C. et Schafer, M. (2003) Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. *Mol Pharmacol*. 64(2):202-210.