

UNIVERSITE MONTPELLIER II
~ SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC ~

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Neurosciences

Formation doctorale : Neurobiologie des Processus de Communication et d'Intégration

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la santé

Présentée et soutenue publiquement

Par

LUCAS Olivier

Le 9 juin 2011

Titre

**Rôle et régulation des co-transporteurs cation-chlorure NKCC1 et
KCC3 dans les neurones sensitifs**

Jury

M. LE GUENNEC Jean-Yves, Professeur des universités, Montpellier	Président de jury
Mme SCAMPS Frédérique, Chargée de recherche, Montpellier	Directrice de thèse
Mme HILAIRE Cécile, Maître de conférences, Besançon	Co-directrice
M. LEGENDRE Pascal, Directeur de recherche, Paris	Rapporteur
M. VINAY Laurent, Directeur de recherche, Marseille	Rapporteur

UNIVERSITE MONTPELLIER II
~ SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC ~

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Neurosciences

Formation doctorale : Neurobiologie des Processus de Communication et d'Intégration

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la santé

Présentée et soutenue publiquement

Par

LUCAS Olivier

Le 9 juin 2011

Titre

**Rôle et régulation des co-transporteurs cation-chlorure NKCC1 et
KCC3 dans les neurones sensitifs**

Jury

M. LE GUENNEC Jean-Yves, Professeur des universités, Montpellier	Président de jury
Mme SCAMPS Frédérique, Chargée de recherche, Montpellier	Directrice de thèse
Mme HILAIRE Cécile, Maître de conférences, Besançon	Co-directrice
M. LEGENDRE Pascal, Directeur de recherche, Paris	Rapporteur
M. VINAY Laurent, Directeur de recherche, Marseille	Rapporteur

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	2
TABLE DES FIGURES	6
ABREVIATIONS	11
AVANT PROPOS	14
INTRODUCTION GENERALE	16
I. Le système somatosensoriel	17
A. Organisation morphologique du système nerveux périphérique	18
1. Le nerf périphérique	18
2. Le ganglion rachidien dorsal	19
B. Diversité et fonction des neurones de ganglions rachidiens dorsaux	20
1. Les différentes modalités sensorielles	21
2. Les marqueurs moléculaires	28
II. La lésion dans le système nerveux périphérique	31
A. Les lésions du nerf périphérique	31
1. Les neuropathies	31
2. La lésion nerveuse	32
B. Modèles expérimentaux	33
C. La régénération des nerfs périphériques	34
1. Les étapes de la régénération périphérique	35
2. Bases cellulaires et moléculaires de la régénération périphérique	36
III. L'homéostasie chlorure neuronale :	44
A. Les acteurs de l'homéostasie chlorure	45
1. Les canaux chlorures	45
2. Les cotransporteurs	47
B. Rôle de l'homéostasie chlorure dans le système nerveux	60
1. Homéostasie chlorure et développement.....	61
2. Homéostasie chlorure et parturition	63
3. Homéostasie chlorure chez l'adulte	64
4. Homéostasie chlorure et traumatisme	64
5. Homéostasie chlorure et douleur	65
IV. Problématique	67

MATERIEL ET METHODES.....	69
I. Animaux et modèles d'étude.....	70
A. Lignée KCC3.....	70
B. Lignée Il6 ^{-/-}	70
C. Génotypage.....	71
D. Culture cellulaire.....	72
1. Culture des neurones adultes.....	72
2. Culture de neurones post-nataux.....	73
E. Axotomie.....	73
II. Electrophysiologie.....	73
A. Mesure des concentrations en ions chlorures intracellulaires.....	73
B. Utilisation d'un inhibiteur de KCCs, le DIOA.....	75
III. Imagerie calcique.....	75
IV. Révélation de la β-galactosidase.....	77
V. Immunohistochimie sur tranche GRD.....	78
VI. RT-PCR quantitative sur les ganglions rachidiens dorsaux.....	79
A. Extraction et dosage de l'ARN.....	79
B. Rétro-transcription des ARN extraits (RT-PCR).....	80
C. Dosage des ADNc obtenus par RT-PCR (Q-PCR).....	81
VII. Statistiques.....	82
PRESENTATION DES RESULTATS.....	83
I. Régulation du cotransporteur NKCC1 par la cytokine Interleukine 6.....	85
A. Résumé et stratégie expérimentale.....	85
B. Résultats.....	85
1. L'IL6 régule la [Cl ⁻] _i des neurones sensitifs axotomisés <i>in vitro</i>	85
2. La lésion nerveuse augmente l'expression de l'IL6-Rα dans les neurones sensitifs.....	88
3. <i>In vivo</i> , IL6-Rα est exprimé dans une sous-population de neurones mécano- et proprioceptifs.....	91
4. L'IL6-Rα dans les neurones axotomisés de grand diamètre régule la [Cl ⁻] _i via la voie de signalisation JAK/STAT.....	93
5. La signalisation par l'IL6 permet la phosphorylation de NKCC1 au niveau de la membrane plasmique <i>in vivo</i>	95
C. Discussion de l'article.....	99

D. Résultats complémentaires	101
I. Régulation de l'homéostasie chlorure des neurones sensitifs par KCC3	104
A. Résumé et stratégie expérimentale	104
B. Résultats	104
1. Le switch chlorure développemental est altéré dans les neurones de souris KCC3 ^{-/-}	104
2. La [Cl] _i est régulée par KCC3 dans une sous-population de neurones	106
3. Expression des transcrits de la famille Slc12a au cours du développement chez les souris KCC3 ^{+/+} et KCC3 ^{-/-}	108
4. KCC3 est exprimé dans une sous-population de neurones sensitifs	111
5. KCC3 est exprimé par des mécanocapteurs et des nocicepteurs.....	114
C. Discussion de l'article	116
D. Résultats complémentaires : Mesure d'excitabilité des neurones	118
DISCUSSION GENERALE	122
I. Homéostasie chlorure	123
A. Les neurones sensoriels périphériques post-nataux	123
B. Les neurones sensoriels périphériques adultes.....	123
II. Les Co-transporteurs.....	124
A. Distribution de NKCC1 dans les GRD	124
B. Au cours du développement : NKCC1, oui...Mais KCC ?.....	125
C. KCC3 : Equivalent périphérique de KCC2 ?	125
D. Existe-il des compensations chez la souris KCC3 ^{-/-} ?	126
E. KCC3 : Un nouveau marqueur de population ?	127
III. Lésion et système nerveux périphérique.....	127
A. La phosphorylation de NKCC1	127
B. Signalisation et activation de NKCC1	128
C. KCC3 : rôle physiologique uniquement ?	129
IV. Homéostasie chlorure et excitabilité	130
V. La régénération des neurones sensoriels	131
A. IL6 et régénération	131
B. KCC3, une cible potentielle pour améliorer la vitesse de pousse régénérative ?.	131
VI. Epilogue	132
BIBLIOGRAPHIE	134
ANNEXE : Travail sur les neurones D-Hair	151

Neurotrophin-4 modulates the mechanotransducer $Ca_v3.2$ T-type calcium current in mice down-hair neurons 152

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Homonculus somatosensoriel décrit par Penfield et Rasmussen en 1950. Ils y présentent la représentation corticale des différentes régions du corps en fonction de leur niveau de sensibilité (Penfield and Rasmussen, 1950).....	17
Figure 2 : Anatomie d'un nerf périphérique.....	18
Figure 3 : Classification des fibres sensorielles et caractéristiques respectives (inspiré de (Bear et al., 2001).....	19
Figure 4 : Schématisation d'un segment de moelle épinière avec son ganglion rachidien dorsal. Les fibres sensorielles projettent dans la corne dorsale de la moelle épinière au niveau des Lamina I à VII et dans la corne ventrale.....	20
Figure 5 : Dessin représentant l'innervation de la peau par les mécanorécepteurs (Inspiré de (Bear et al., 2001).....	22
Figure 6 : Représentation schématique des terminaisons centrales et périphériques des neurones de la mécanoception (bleu) et de la mécano-nociception (rouge)	23
Figure 7 : Gammas de températures et composés chimiques activant les canaux TRP	24
Figure 8 : Schéma de l'innervation des fuseaux neuromusculaires et de l'organe tendineux de Golgi par les afférences proprioceptives Ia et Ib.....	26
Figure 9 : Schématisation des douleurs ressenties en fonction des vitesses de conduction des fibres sensibles (adapté de (Field, 1987)	27
Figure 10 : Morphologie en rosette et courants calciques LVA et HVA du neurone mécanoceptif D-Hair (Adapté de (Dubreuil et al., 2004)	30
Figure 11 : Représentation des différents modèles de lésion du nerf sciatique (inspiré de (Ueda, 2006)	34
Figure 12 : Schématisation de la dégénérescence Wallérienne et de la régénération (inspiré de (Navarro et al., 2007).....	36
Figure 13 : Voies de signalisation activées par la liaison de l'IL6 avec son récepteur IL6-R α (ou gp80)....	41
Figure 14 : La Signalisation JAK/STAT par la cytokine IL6 active l'expression de SOCS3 (Adapté de Sun and He, 2010)	42
Figure 17 : Arbre phylogénétique des cotransporteurs cation-chlorure (inspiré de (Mount et al., 1999)...	49
Figure 15 : Représentation schématique de l'activité neuronale des KCC et de NKCC1, dépendante de la Na ⁺ /K ⁺ ATPase.....	49
Figure 16 : Schématisation de l'extrémité N-terminale de NKCC1 avec les différents sites de phosphorylation et le site de liaison de la Protéine Phosphatase 1 (Adapté de (Flemmer et al., 2002)	53
Figure 18 : Schématisation de la structure de KCC2 (adapté de (Payne et al., 1996).....	55
Figure 19 : Schématisation de KCC3 avec les différentes mutations répertoriées ainsi que les sites de phosphorylation (Adapté de (Galanopoulou, 2010).....	59
Figure 20 : Régulation de l'homéostasie chlorure au cours du développement et chez le neurone adulte dans le SNC	62

Figure 21 : Mécanisme d'activation des canaux NMDA par les canaux GABA _A (adapté de (Ben-Ari, 2002))	63
Figure 22 : Schématisation de la théorie du "gate control" et conséquences de la lésion nerveuse	66
Figure 23 : Construction de la souris KCC3-KO (Howard et al., 2002)	70
Figure 24 : Construction de la souris IL6-KO (Kopf et al., 1994)	71
Figure 25 : Coupe frontale d'une colonne vertébrale de souris	73
Figure 26 : Schéma de la technique de patch perforé avec la gramicidine	74
Figure 27 : Composition du milieu intracellulaire	74
Figure 28 : Composition du milieu extracellulaire 0Ca	74
Figure 29 : Protocole d'enregistrement électrophysiologique	75
Figure 30 : Composition du milieu Lock Normal	76
Figure 31 : Composition du milieu KCl	77
Figure 32 : Composition de la solution détergente	77
Figure 33 : Composition du tampon de révélation	77
Figure 34 : Composition du tampon de citrate de sodium	79
Figure 35 : Liste des anticorps utilisés	79
Figure 36 : Composition de la solution de RT-PCR	80
Figure 37 : Protocole de Thermocycler	80
Figure 38 : Composition de la solution de Q-PCR	81
Figure 39 : Protocole de Lightcycler	81
Figure 40 : Séquences des primers utilisés pour la Q-PCR	82
Figure 41 : Mesure par qRT-PCR de la quantité d'ARNm codant pour l'IL6 dans des ganglions rachidiens dorsaux L4-L5 contrôles et axotomisés	86
Figure 42 : Dosage par la technique ELISA de la quantité d'IL6 présente dans le surnageant de culture de neurones de GRD L4-L5 axotomisés de souris IL6 ^{-/-} et IL6 ^{+/+}	86
Figure 43 : A: Enregistrement par la technique de patch perforé du potentiel d'inversion du GABA après perfusion de muscimol (50 μM). B: Détermination de la [Cl ⁻] _i dans des neurones contrôles, axotomisés et axotomisés puis traités avec l'anticorps anti-IL6 murin et humain (10 μg/ml). C: [Cl ⁻] _i dans des neurones contrôles et axotomisés en culture de souris IL6 ^{+/+} et IL6 ^{-/-}	88
Figure 44 : Mesure par RT-PCR quantitative du niveau d'expression de l'ARNm de l'IL6-Rα dans des ganglions contrôles et axotomisés	89
Figure 45 : Marquages immunohistochimiques au moyens d'anticorps anti-IL6-Rα sur des coupes transversales de ganglions rachidiens dorsaux contrôles, axotomisés, axotomisés sans anticorps anti-IL6-Rα et axotomisés après pré-incubation de l'anticorps anti-IL6-Rα avec la forme soluble du récepteur IL6-R (échelle 30μm)	90
Figure 46 : Marquages immunohistochimiques par microscopie confocale de coupes de GRD axotomisés L4-L5 au moyen d'anticorps anti-IL6-Rα et anti-glutamine synthétase, un marqueur des cellules satellites (échelle 30μm, encadré correspondant à un agrandissement de 3 fois d'une portion de membrane)	91

Figure 47 : Marquages immunohistochimiques sur tranches de ganglions L4-L5 axotomisés permettant de caractériser les neurones myélinisés (NF200) (A), les neurones mécanoceptifs (TrkB) (B), les neurones proprioceptifs (Parvalbumine) (C) et les neurones nociceptifs (TrkA) (D) parmi les neurones exprimant l'IL6-R α (IL6-R) (échelle 30 μ m)	92
Figure 48 : Photos en contraste de phase et marquages immunocytochimiques anti-IL6-R α associés effectués sur culture de neurones axotomisés (échelle 30 μ m)	93
Figure 49 : Mesures de la [Cl] _i dans les neurones contrôles, axotomisés et axotomisés puis soumis à une pré-incubation avec l'anticorps anti-IL6-R α , bloquant l'activité du récepteur et axotomisés puis incubés avec la forme soluble du récepteur IL6-R	94
Figure 50 : Mesure de la [Cl] _i dans des neurones de diamètre <30 μ m contrôles, axotomisés et axotomisés puis traités avec la forme soluble du récepteur IL6-R	94
Figure 51 : Détermination de la [Cl] _i dans les neurones axotomisés sans et après traitement avec des inhibiteurs de la voie JAK (AG490 à 50 μ M et cucurbitacine à 3 μ M)	95
Figure 52 : Quantification par qRT-PCR de l'expression des ARNm des cotransporteurs NKCC1 (Slc12a2), KCC1 (Slc12a4), KCC2 (Slc12a5), KCC3 (Slc12a6) et KCC4 (Slc12a7) sur des ganglions rachidiens dorsaux contrôles (normalisés par rapport au co-transporteur le plus exprimé) et comparaison des niveaux d'expression après axotomie chez la WT et la souris IL6 ^{-/-} (expressions normalisées à l'expression de la Polymérase PolrIIJ et exprimées en pourcentage du contrôle).....	96
Figure 53 : Marquages immunohistochimiques au moyen d'anticorps dirigés contre la forme phosphorylée du cotransporteur NKCC1 sur des tranches de ganglions de souris WT et IL6 ^{-/-} contrôles et axotomisés (échelle 30 μ m)	97
Figure 54 : Marquages immunohistochimiques par microscopie confocale aux moyens d'anticorps dirigés contre phospho-NKCC1 et la glutamine synthétase, marqueur des cellules satellites (échelle 30 μ m, encadré correspondant à un agrandissement de 3 fois d'une portion de membrane)	98
Figure 55 : Marquages immunohistochimiques par microscopie confocale aux moyens d'anticorps dirigés contre p-NKCC1 et IL6-R α (échelle 30 μ m, encadré correspondant à un agrandissement de 3 fois d'une portion de membrane)	98
Figure 56 : Mesure des concentrations intracellulaires en ions Cl ⁻ après traitement des neurones axotomisés avec des inhibiteurs (A) de la voie MAPK (U0126) et (B) de la voie PI3-Kinase (LY294002 et wortmannin)	102
Figure 57 : Tracés électrophysiologiques types obtenus sur des neurones de souris de 4 jours et adultes en culture par application d'un protocole de rampe toutes les 5 secondes, faisant passer le potentiel de membrane de -80 à +40 mV. Les courbes sont obtenues avant et après application de 50 μ M de Muscimol, agoniste des canaux GABA _A . Le point d'intersection correspond au potentiel d'inversion du GABA (E _{GABA}), et permet, grâce à l'équation de Nernst, de calculer la [Cl] _i	105
Figure 58 : Concentrations intracellulaires en ions chlorures dans des neurones de souris KCC3 ^{+/+} et KCC3 ^{-/-} en culture aux stades post-natal (P2 -P6) et adulte.....	105
Figure 59 : Comparaison des [Cl] _i moyennes obtenues chez les souris KCC3 ^{+/+} et KCC3 ^{-/-} post-natales (P2-P6) et adultes.....	106

Figure 60 : Analyse des fréquences de distribution en fonction de la $[Cl]_i$ dans les neurones post-nataux et adultes $KCC3^{+/+}$. Les moyennes obtenues sont données dans la Figure 58A.....	107
Figure 61 : Analyse des fréquences de distribution en fonction de la $[Cl]_i$ dans les neurones post-nataux et adultes $KCC3^{-/-}$. Les moyennes obtenues sont données dans la Figure 58B.	107
Figure 62 : Comparaison des proportions de neurones ayant une $[Cl]_i$ inférieure ou supérieure à 45mM aux stades post-natal et adulte chez les souris $KCC3^{+/+}$ et $KCC3^{-/-}$	108
Figure 63 : Quantification par qRT-PCR chez la souris $KCC3^{+/+}$ (A) de l'expression relative, normalisée à l'expression maximale, des co-transporteurs cation-chlorure au cours du développement (P4) et chez l'adulte et (B) du pourcentage de variation d'expression chez l'adulte, normalisée à l'expression de la Polr2j, par rapport au post-natal. Les données ont été obtenues à partir de quatre expériences, chacune faite sur des duplicats.	109
Figure 64 : Quantification chez la souris $KCC3^{-/-}$ par qRT-PCR de (A) l'expression relative, normalisée à l'expression maximale, des co-transporteurs cation-chlorure au cours du développement (P4) et chez l'adulte et (B) la variation d'expression chez l'adulte, normalisée à la Polr2j, par rapport au post-natal. Les données ont été obtenues à partir de quatre expériences, chacune faite sur des duplicats.	110
Figure 65 : Comparaison de l'expression relative, normalisée à la Polr2J, des CCC entre $KCC3^{+/+}$ et $KCC3^{-/-}$ chez (A) le post-natal et (B) l'adulte.....	111
Figure 66 : Fréquences de distribution des neurones en fonction de leur $[Cl]_i$, obtenues chez des neurones de souris $KCC3^{+/+}$ (A) sans traitement et (B) après traitement au DIOA (30 μ M), un inhibiteur des KCCs.....	112
Figure 67 : Révélation de la β -galactosidase grâce à son substrat, le X-gal. Le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indol- β -D-galactopyranoside) est transformé en un produit de dégradation bleu permettant de voir les cellules marquées. Les photos A et B correspondent à des temps de révélation de 9 heures et les photos C et D, des temps de révélation d'une nuit (échelle 30 μ m)	113
Figure 68 : Photos en contraste de phase (A, C) et marquages immunohistochimiques anti-KCC3 correspondants (B, D) sur des coupes de GRD de souris $KCC3^{-/-}$ (A, B) et $KCC3^{+/+}$ (C, D) (échelle 100 μ m)	114
Figure 69 : Doubles-marquages immunohistochimiques sur tranches de ganglions permettant de caractériser les neurones myélinisés (NF200) (A), les neurones mécanocéptifs (TrkB) (B), les neurones nociceptifs (TrkA) (C) et les neurones proprioceptifs (Parvalbumine) (D) parmi les neurones exprimant KCC3 (KCC3) (échelle 30 μ m)	115
Figure 70 : Analyse du pourcentage de neurones myélinisés (NF200), nociceptifs (TrkA), mécanocéptifs (TrkB) ou proprioceptifs (Parvalbumine) parmi les neurones $KCC3^{+/+}$	116
Figure 71 : Conséquences de la concentration intracellulaire en ions chlorures sur l'activité du canal ionotropique GABA _A	119
Figure 72 : Tracés obtenus par imagerie calcique sur des neurones $KCC3^{+/+}$ et $KCC3^{-/-}$. Du Lock Normal, du Muscimol 50 μ M et une solution de KCl 50mM sont perfusés respectivement au bout de 30 sec, 120 sec et 540 sec.....	120

Figure 73 : Pourcentage de neurones $KCC3^{+/+}$ et $KCC3^{-/-}$ en culture répondant au muscimol par une augmentation de calcium intracellulaire	120
Figure 74 : Amplitude de réponse des neurones sensitifs adultes, après 24h de culture, à la perfusion (A) de KCl 50mM dans les neurones ne répondant pas au muscimol et (B) de KCl 50mM et de muscimol 50μM dans des neurones répondant au muscimol	121
Figure 75 : Hypothèse sur la signalisation par l'IL6 aboutissant à l'activation de NKCC1	129
Figure 76 : Schéma récapitulatif de l'homéostasie chlorure dans les neurones sensoriels	133

ABREVIATIONS

AMPA	22-Amino-3-(5-Méthyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)Propanoic Acid
AMPC	Adénosine 3'-5'-Monophosphate Cyclique
ASIC	Acid Sensing Ion Channel
ATF3	Activated Transcription Factor 3
ATP	Adénosine 5'-Triphosphate
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
CaCC	Calcium-Activated Chloride Channel
CamK2	Calcium-Calmodulin dependant Kinase 2
CCC	Cation-Chloride Cotransporter
CCI	Chronic Constriction Injury
CCVD	Canal Calcique Voltage-Dépendant
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide
$[Cl^-]_i$	Concentration intracellulaire en ions chlorures
CIC	Chloride Channel
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
COX	Cyclooxygénase
CREB	cAMP Responsive Element Binding
PAD	Primary Afferent Depolarisation
E_{rev}/E_{GABA}	Potentiel d'inversion du GABA ou des ions Chlorures
GABA	γ -Animo-Butyric Acid
GAD	Glutamic Acid Decarboxylase
GAP43	Growth Associated Protein
GDNF	Glial-cell Derived Neurotrophic Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GFR α	GDNF Family Receptor α
GRD	Ganglions rachidiens dorsaux
GP80	Glycoprotéine de 80 kDa
HTM	High threshold mechanoreceptors
$I_{(Cl)Ca}$	Courant chlorure activé par le calcium
IB4	Isolectine B4
IGF-1	Insulin-like Growth Factor

JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KCC	Potassium-Chloride Cotransporter
IL6	Interleukine 6
LIF	Leukaemia Inhibitory Factor
LTM	Low threshold mechanoreceptors
LVA	Low-Voltage Activated current
MAG	Myelin-Associated Glycoprotein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	Matrice Extracellulaire
MQAE	N-6-meth-oxyquinolinium Acetoethylester
NCC	Sodium-Chloride Cotransporter
NGF	Nerve Growth Factor
NKCC	Sodium-Potassium-Chloride Cotransporter
NLS	Nuclear Localisation Signal
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
NPY	Neuropeptide Y
NT	Neurotrophine
OSM	Oncostatine M
OSR1	Oxydative Stress Kinase 1
P2X	Purinergique Receptor
PA	Potentiel d'action
PEST	Proline-Glutamate-Sérine-Thréonine
PI3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PKA	Protéine Kinase A
PPSE	Potentiel Post-Synaptique Excitateur
PPSI	Potentiel Post-Synaptique Inhibiteur
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RA	Rapidly Adapting
SA	Slowly Adapting
SAGE	Serial analysis of gene expression
siRNA	Small Interfering Ribonucleic Acid
Slc12	Solute-Linked Carrier 12
SNC	Système nerveux central

SNP	Système nerveux périphérique
SNI	Spared Nerve injury
SOCS	Suppressor Of Cytokines Signalling
SPAK	Ste-20 related Proline-Alanine rich Kinase
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
Trk	tropomyosin-Related Kinase
TRP	Transient Receptor Potential
WNK	With No Lysine Kinase

AVANT PROPOS

La perception de l'environnement est un facteur de survie pour l'individu. Elle régit nos décisions et nos actions, allant de la simple sensation de chaud/froid, à la fuite devant le danger. Cette perception est permise par le système somatosensoriel. On distingue trois types d'informations : les extéroceptives, captée par la peau, les proprioceptives, par le muscle et les intéroceptives, venant de l'intérieur de l'organisme, des viscères. Les mécanismes étant différents au niveau des viscères et les informations perçues, bien souvent inconscientes, l'introduction ne portera que sur l'extéroception et la proprioception. La première permet à l'organisme de ressentir des stimuli tels que la variation de température, le toucher et la pression exercés sur la peau, qu'ils soient douloureux ou non. La proprioception, quant à elle, est la capacité à ressentir le niveau de contraction des muscles et l'orientation spatiale de nos membres. En résumé, elle rend compte de la position du corps dans l'espace. L'ensemble de ces informations est capté par les afférences neuronales issues des ganglions rachidiens dorsaux (GRD). Situés de part et d'autre de la moelle épinière, au niveau dorsal, les GRD contiennent les corps cellulaires des neurones sensitifs, mais également des cellules gliales satellites, des vaisseaux sanguins, des fibroblastes et des cellules du système immunitaire. On distingue différentes populations de neurones au sein du GRD, en fonction des informations qu'ils perçoivent et de leur mode de fonctionnement. Ils émettent leurs prolongements vers la périphérie via les nerfs. Une fois l'information captée par les neurones, elle est transformée en activité électrique et transite jusqu'à la moelle épinière, voire directement dans le tronc cérébral, pour une intégration finale par le cerveau.

Les aléas de la vie font parfois subir à l'organisme des lésions de ces nerfs, à l'origine de défauts de captation de l'information, mais également de douleurs. Dans l'optique de traiter, de soigner, ou même tout simplement d'améliorer la vie de ces individus, il est nécessaire de comprendre les mécanismes sous-jacents au fonctionnement normal de ces neurones, mais également ceux mis en jeu au cours de l'ébauche de réparation post-lésionnelle.

Ma petite contribution à cette lutte scientifique s'est faite par l'étude de l'homéostasie chlorure (HC) des neurones sensitifs. L'HC intervient notamment dans le contrôle de l'activité électrique neuronale par le GABA (acide γ -amino-butérique), principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central chez l'adulte. Elle est liée à une régulation fine des concentrations intra- et extracellulaires en ions chlorure par différents

canaux, pompes et autres co-transporteurs. Ce n'est pas un paramètre fixe au cours du temps ; certains évènements, physiologiques, tel que le développement, ou pathologiques, telle que la lésion, peuvent la modifier. Le but de mon travail a été de comprendre, ou tout du moins de donner quelques pistes quant aux mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu pour réguler l'HC au cours du développement et chez l'adulte.

INTRODUCTION GENERALE

I. Le système somatosensoriel

Le système somatosensoriel permet à l'organisme d'acquérir une perception corporelle, ou somesthésie, via les stimulations de l'environnement. Les modalités sensorielles définissent les contours physiques de l'individu. La somesthésie regroupe différentes sensations telles que le toucher, les sensations de froid et de chaud, la proprioception, la douleur. Les neurones responsables de la perception des stimuli environnementaux sont appelés neurones sensitifs. Ces neurones projettent en périphérie pour capter l'information sensorielle et la transmettent à la moelle épinière, premier relai vers les centres supérieurs où l'information est traitée et la réponse, adaptée. L'ensemble des données fournies par le système somatosensoriel permet la représentation de son corps par un individu dans son environnement et donne lieu à une représentation schématique, décrite par Penfield et Rasmussen en 1950 (Penfield and Rasmussen, 1950) (Figure 1).



Figure 1 : Homonculus somatosensoriel décrit par Penfield et Rasmussen en 1950. Ils y présentent la représentation corticale des différentes régions du corps en fonction de leur niveau de sensibilité (Penfield and Rasmussen, 1950)

A. Organisation morphologique du système nerveux périphérique

1. Le nerf périphérique



Figure 2 : Anatomie d'un nerf périphérique

Les nerfs périphériques (ou nerfs rachidiens ou spinaux) sont les nerfs qui émergent de la moelle épinière. Les nerfs spinaux sont formés par la réunion de deux racines rachidiennes, l'une dorsale sensitive, faisant remonter les informations des récepteurs sensoriels vers le système nerveux central (SNC), et l'autre ventrale motrice, permettant la commande motrice du système nerveux central vers les effecteurs (principalement des muscles, mais également des glandes). Il s'agit donc d'une voie nerveuse mixte (sensitive et motrice). Sur le trajet de la racine dorsale, on retrouve les corps cellulaires des neurones sensoriels, regroupés dans un renflement, le ganglion rachidien dorsal (GRD) (Figure 4). Les nerfs spinaux émergent de la colonne vertébrale, entre chaque vertèbre par le *foramen intervertébral* (ou trou de conjugaison), puis rejoignent les fibres motrices pour former le nerf périphérique.

Le nerf périphérique est composé d'un assemblage très particulier de prolongements axonaux. Plusieurs fibres nerveuses s'associent en fascicules par le biais d'un tissu conjonctif nommé endonèvre (tissu conjonctif lâche contenant de nombreuses microfibrilles de collagène). Plusieurs fascicules sont regroupés dans un autre tissu, le périnèvre (constitué d'une dizaine de cellules aplaties revêtues par une lame basale), formant ainsi un "groupe de fascicules". Enfin, plusieurs "groupes de fascicules" s'associent par le biais de l'épinèvre (tissu

conjonctif dense contenant des adipocytes et des vaisseaux sanguins), faisant du nerf une unité anatomique (Figure 2).

Parmi les fibres sensorielles, on distingue plusieurs types classés selon leur fonction, leur taille, leur niveau de myélinisation, leur vitesse de conduction et leurs lieux de projections centrale et périphérique (Figure 3 et Figure 4):

- Les fibres A α ou groupe I, fortement myélinisées et ayant une vitesse de conduction élevée (80-120m/s)
- Les fibres A β ou groupe II, présentant un niveau de myélinisation et une vitesse de conduction moyens (35-75m/s)
- Les fibres A δ ou groupe III, présentant un niveau de myélinisation et une vitesse de conduction faibles (5-30m/s)
- Les fibres C ou groupe IV, non myélinisées et à conduction lente (0.5-2m/s)

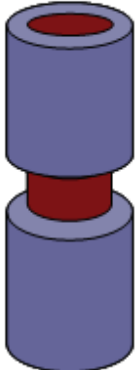



Fibre nerveuse de la peau	A α	A β	A δ	C
Fibres nerveuses du muscle	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV
				
Diamètre (μm)	13-20	6-12	1-5	0.2-1.5
Vitesse de conduction (m/s)	80-120	35-75	5-30	0.5-2
Rôle des récepteur associés	Propriocepteur de muscle	Mécanorécepteur de la peau	Douleur, température	Douleur, température

Figure 3 : Classification des fibres sensorielles et caractéristiques respectives (inspiré de (Bear et al., 2001))

2. Le ganglion rachidien dorsal

Les ganglions rachidiens dorsaux (GRD), situés de part et d'autre de la moelle épinière, au niveau dorsal, contiennent les somas des neurones sensoriels, ou neurones sensitifs primaires, qui sont des neurones pseudo-unipolaires en T (Figure 4). Ils émettent des

axones vers la périphérie, où des récepteurs spécialisés, les extéro-récepteurs pour la peau et les proprio-récepteurs pour le muscle (et les intéro-récepteurs pour les viscères), vont capter les informations environnantes qui sont ensuite véhiculées, via les axones centraux, vers la corne dorsale de la moelle épinière.

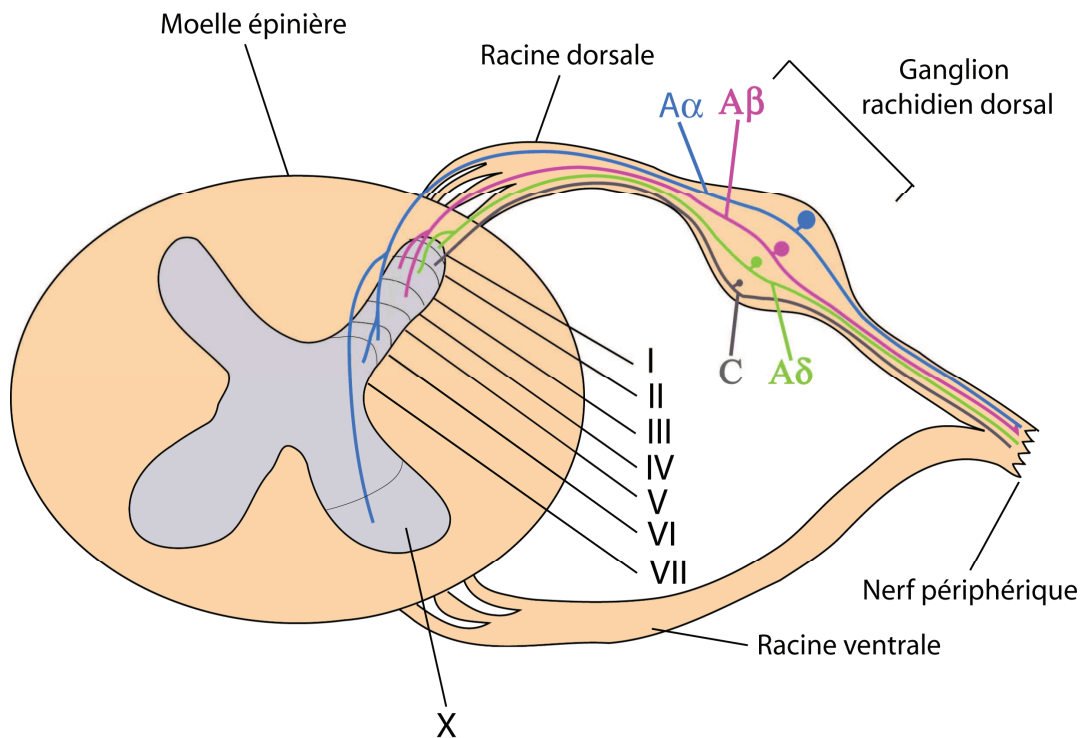


Figure 4 : Schématisation d'un segment de moelle épinière avec son ganglion rachidien dorsal. Les fibres sensorielles projettent dans la corne dorsale de la moelle épinière au niveau des Lamina I à VII et dans la corne ventrale.

B. Diversité et fonction des neurones de ganglions rachidiens dorsaux

Une des difficultés rencontrées dans l'étude des GRD est l'hétérogénéité de fonctions, de morphologies, de caractéristiques biochimiques et électrophysiologiques des neurones qui les composent. Par conséquent, de nombreux critères d'identification sont possibles, ce qui rend l'analyse d'autant plus difficile.

Une théorie, développée au 19^{ème} siècle est celle de la spécificité sensorielle. Charles Bell, en 1811, soutient que chaque organe périphérique ne peut véhiculer qu'un seul type d'information jusqu'au système nerveux central. Puis Johannes Müller, en 1837, avance que les nerfs afférents ne sont capables de véhiculer qu'un seul type d'information. Trois types de populations différentes se partageraient l'ensemble des sensations de la périphérie. La

classification d'appartenance à une population est basée sur la taille du soma de ces neurones sensoriels. Les neurones de petit diamètre ($<30\mu\text{m}$) sont dits nociceptifs, les neurones de diamètre compris entre 30 et $45\mu\text{m}$ sont dits mécanoceptifs et enfin ceux d'un diamètre supérieur à $45\mu\text{m}$ sont dits proprioceptifs (Figure 4). Aux vues des avancées de la science, nous savons aujourd'hui que cette théorie n'est pas en accord avec la réalité. D'une part, certains neurones de grand diamètre peuvent participer à la nociception. D'autre part, nous savons qu'un même neurone peut être activé par différentes modalités sensorielles (Leem et al., 1993). En fait, selon de récentes études, un grand nombre de neurones de ganglions rachidiens dorsaux seraient « polymodaux » (Belmonte and Viana, 2008). Bien qu'aujourd'hui le découpage des neurones en fonction de leur diamètre somatique reste encore d'actualité car facile à mesurer, il existe maintenant différentes caractérisations plus précises, basées sur des critères fonctionnels et moléculaires (pour revue : (Basbaum et al., 2009; Lumpkin et al., 2010).

1. Les différentes modalités sensorielles

a) La mécano-sensation

Ce terme désigne la propriété de détecter des stimulations de type mécanique. Les canaux ioniques mécanosensibles interviennent dans différentes modalités comme le toucher, l'ouïe, l'osmorégulation... Quoique n'intervenant pas uniquement dans la mécano-sensation, les canaux de type TRP (*Transient Receptor Potential*) semblent être des acteurs de cette détection. Bien que nous ne sachions pas encore s'il s'agit d'une activation directe ou non, ils permettent de convertir des stimuli mécaniques en influx électrique (pour revue : (Christensen and Corey, 2007). Chez les mammifères, nous connaissons à l'heure actuelle une trentaine de canaux de type TRP, divisés en sept sous-familles. Il existe cependant d'autres canaux jouant un rôle dans la mécanosensation tels que les canaux ASIC (*Acid Sensing Ion Channels*), les canaux P2X (*Purinergic receptors*) et quelques canaux potassiques.

Les informations de type mécanique véhiculées par les neurones de GRD peuvent être décelées au niveau de la peau mais également plus en profondeur, au niveau des viscères. Les mécanismes impliqués étant différents de ceux de la peau, ils ne seront pas traités dans cette introduction.

Des études *in vivo* de fibres sensorielles dans des modèles animaux ainsi que chez l'humain ont montré que les afférences de la peau véhiculent deux types d'informations : la mécanocéption et la mécano-nociception (pour revue : (Lewin and Moshourab, 2004)).

- La mécanocéption est permise par les mécano-récepteurs à bas seuil. Non douloureuse dans des conditions physiologiques normales, elle rend compte du toucher et des mouvements des poils sur la peau. Ces neurones, d'un diamètre compris entre 30 et 40 μ m, possèdent des fibres peu myélinisées de type A β . Ce sont des fibres de gros calibre myélinisées avec une vitesse de conduction élevée (35-75m/s) (Figure 3). Ils projettent dans la moelle épinière au niveau des lamina III et IV (Figure 4) et présentent des terminaisons périphériques spécialisées tels que les disques de Merkel, les corpuscules de Meissner, les corpuscules de Pacini, les corpuscules de Ruffini (Figure 5 et Figure 6).

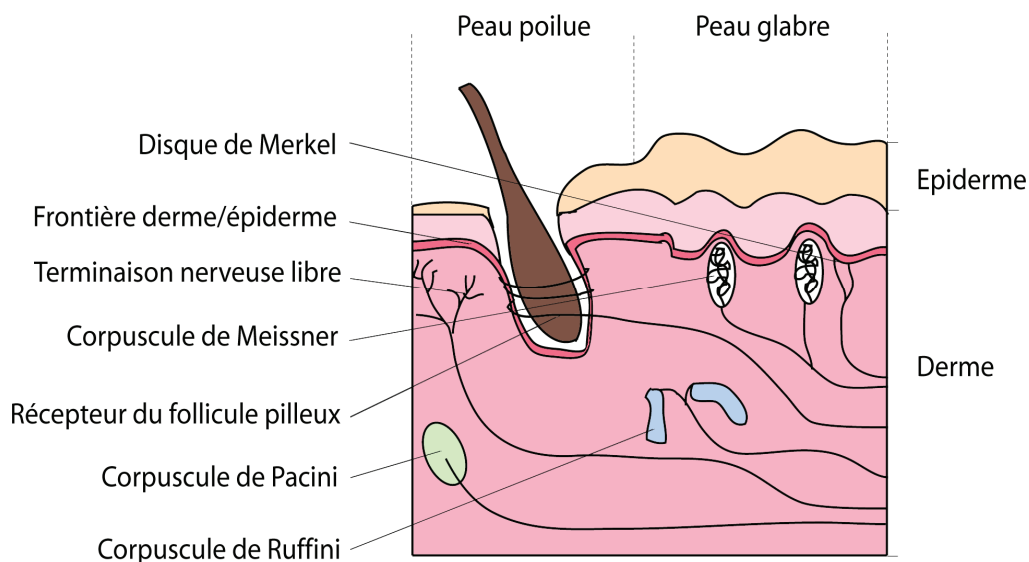


Figure 5 : Dessin représentant l'innervation de la peau par les mécanorécepteurs (Inspiré de (Bear et al., 2001))

D'un point de vue moléculaire, ces neurones sont caractérisés par l'expression à leur membrane du récepteur TrkB (*Tropomyosin-related kinase B*), récepteur à haute affinité des neurotrophines BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) et NT4 (*Neurotrophin 4*).

Au niveau électrophysiologique, les mécanorécepteurs peuvent être séparés en 2 groupes en fonction de leur vitesse d'adaptation à un stimulus persistant. On distingue ainsi les neurones à adaptation lente (SA ou *Slowly Adapting*) déchargeant pendant toute la durée du stimulus et les neurones à adaptation rapide (RA ou *Rapidly Adapting*) déchargeant brièvement au début et à la fin d'un stimulus de force constante.

Parmi les mécanoccepteurs, on distingue une autre catégorie de neurones caractérisés par des fibres peu myélinisées de type A β et extrêmement sensibles aux stimuli mécaniques. Ce sont les neurones D-Hair (*Down-Hair*). Ces neurones ont pour cible périphérique le follicule pileux (Dubreuil et al., 2004).

- La mécano-nociception, dont le but est d'alermer l'individu de la présence d'un risque de détérioration tissulaire est perçue de façon consciente et douloureuse. Cette information est captée par les mécanorécepteurs à haut seuil d'activation possédant des terminaisons dites "libres" et des fibres peu ou non myélinisées de type A δ et C à faible vitesse de conduction (respectivement 5-30m/s et 0.5-2m/s) (Figure 3 et Figure 6). En raison de leur vitesse de conduction, ce sont les fibres responsables de la première douleur suite à une stimulation nociceptive ainsi que du réflexe de retrait pour se soustraire à la source de nociception. Au niveau de la moelle épinière, ces neurones projettent dans les Lamina I et III (Figure 4). Exprimant les récepteurs TrkA et Ret, ils sont sous la dépendance des neurotrophines NGF (*Nerve Growth Factor*) et GDNF (*Glial-cell Derived Neurotrophic Factors*).

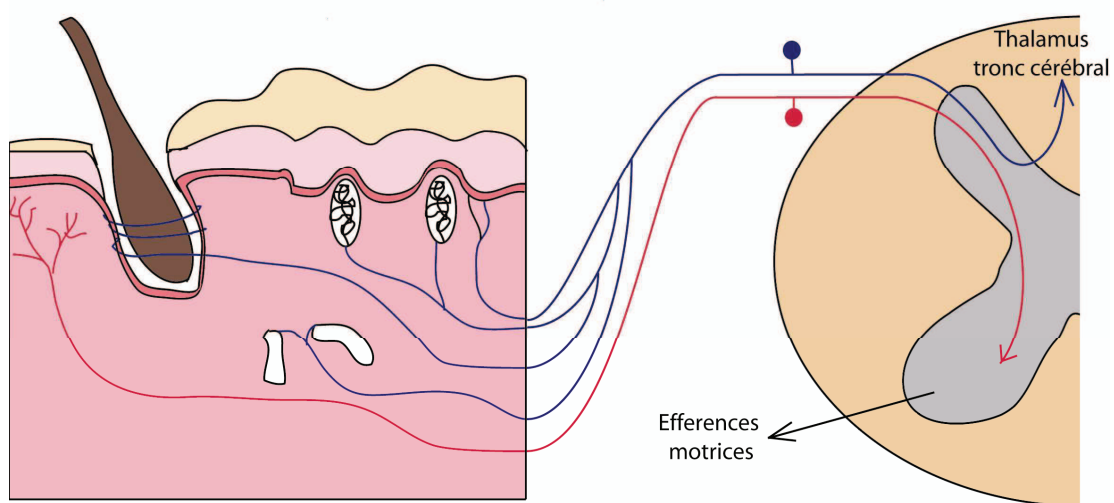


Figure 6 : Représentation schématique des terminaisons centrales et périphériques des neurones de la mécanoception (bleu) et de la mécano-nociception (rouge)

b) La thermosensation

La thermosensation est la propriété des neurones à fournir des informations sur les variations de température. Tout comme la mécanosensation, la thermosensation peut être de deux types : la thermoception et la thermo-nociception. L'information transmise peut être consciente (température d'un objet ou de la peau) ou inconsciente (thermorégulation du

corps). L'étude des canaux TRP, dont nous avons parlé précédemment, a permis de faire avancer les connaissances sur la thermosensation (Figure 7). En effet, ils jouent non seulement un rôle dans la mécanosensation, mais ce sont également des thermosenseurs. Le premier canal découvert et mis en évidence dans la détection de la chaleur et de molécules irritantes est le canal TRPV1, perméable au Ca^{2+} et non sélectif aux cations et exprimé par une sous-population de neurones sensoriels nociceptifs (Caterina et al., 1997). Ce canal est capable de lier la capsaïcine (composé actif du piment responsable de l'effet "piquant" de celui-ci) et de répondre à des températures douloureuses supérieures à 43°C , expliquant la sensation de chaleur intense lorsque l'on mange du piment. D'autres canaux de la famille des TRP ont été mis en évidence dans la détection de différentes températures. On trouve notamment le canal TRPM8 réagissant au menthol et à des températures froides non douloureuses (Peier et al., 2002), le canal TRPA1 (ANKTM1), à des températures douloureuses inférieures à 17°C (Story et al., 2003) et le canal TRPV2 (ou VRL1, *Vanilloid Receptor-Like Protein 1*) sensible à des températures supérieures à 52°C (Caterina et al., 1999).

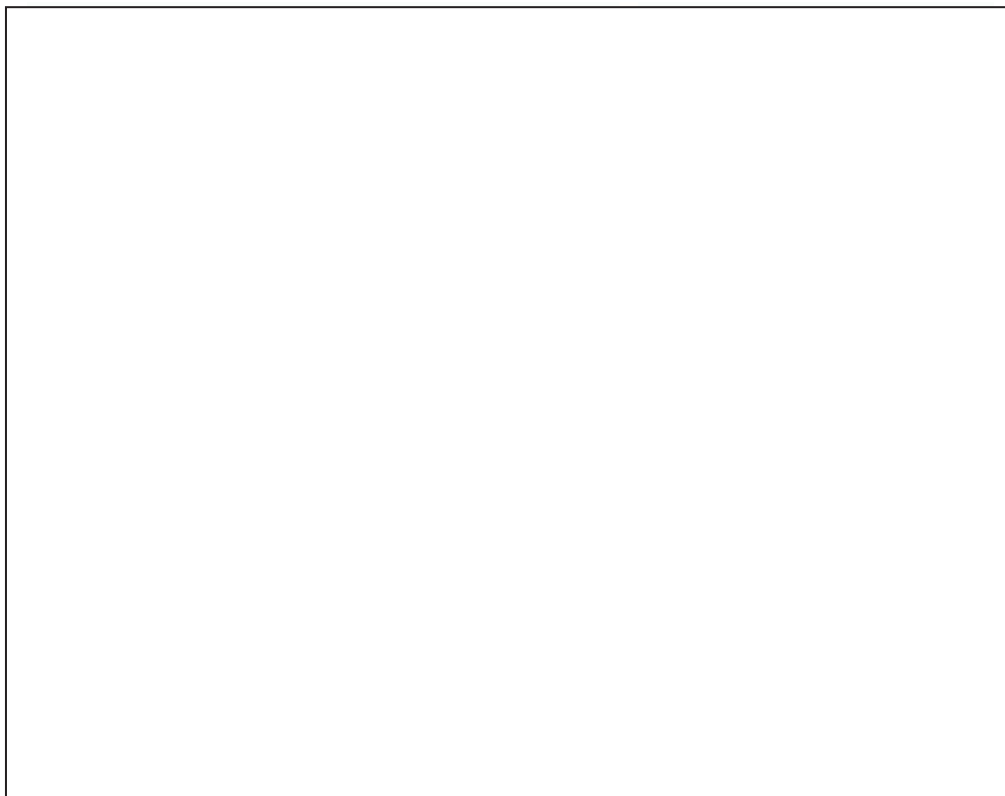


Figure 7 : Gammes de températures et composés chimiques activant les canaux TRP

Les neurones présentant ces récepteurs canaux appartiennent à des populations de neurones dits nociceptifs exprimant également les récepteurs au neurotrophines TrkA et Ret. Néanmoins, une sous-population de ces neurones TrkA⁺ semble ne pas être nociceptive. Ils sont activés par des températures non nocives et expriment TRPM8, TRPV3 et TRPV4 (Leem et al., 1993).

c) **La proprioception**

Cette faculté nous permet de connaître la position de notre corps dans l'espace. Avec l'oreille interne (vestibule) et la vision, elle permet l'équilibre et la gestion de nos mouvements. Les neurones proprioceptifs innervent les muscles et les tendons via des fibres de type A α et A β , myélinisées et de gros calibre à vitesse de conduction élevée (<35m/s) (Figure 3). On distingue deux types d'afférences selon qu'elles innervent les fuseaux neuromusculaires (type Ia et II) ou les organes de Golgi (type Ib). Les organes tendineux de Golgi sont situés aux jonctions myo-tendineuses et sont sensibles à des variations de tension. Les fuseaux neuromusculaires sont répartis dans le muscle et sont sensibles aux variations de longueur (Figure 8). Dans la moelle épinière, les neurones proprioceptifs projettent au niveau de la couche X pour contacter les motoneurones. Ils émettent également des collatérales qui font synapse sur des interneurones dans les couches VI et VII (Figure 4) et des collatérales ascendantes et descendantes, projetant sur les étages voisins et vers les centres nerveux supérieurs. Une partie des propriocepteurs adopte la voie dite « Lemniscale », à l'instar des mécanorecepteurs, pour permettre la sensibilité proprioceptive consciente. L'autre partie, responsable de la proprioception inconsciente, adopte la voie dite « Spino-cerebelleuse » (Pour revue : Bear et al., 2001).

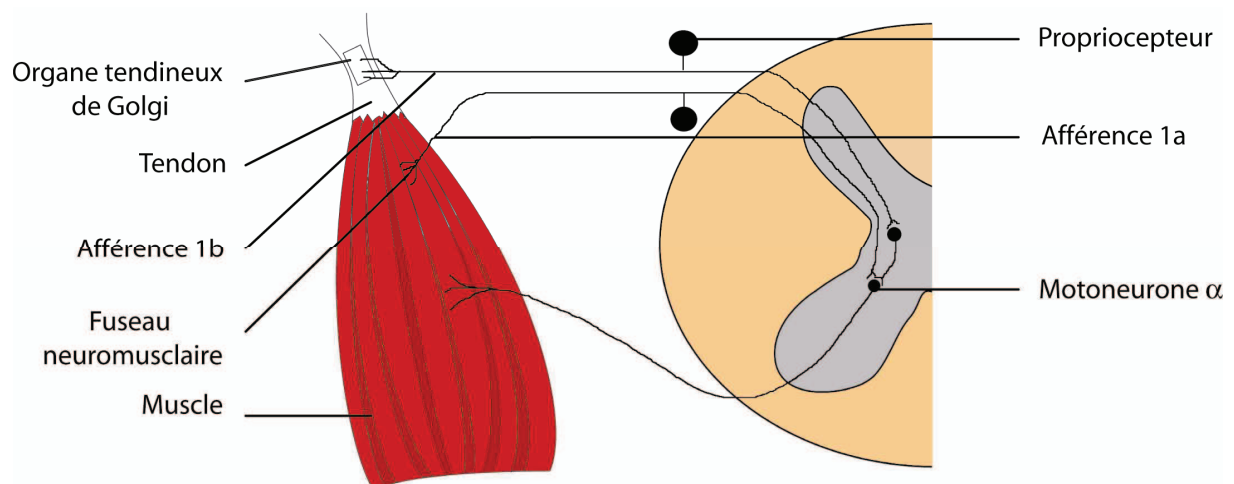


Figure 8 : Schéma de l'innervation des fuseaux neuromusculaires et de l'organe tendineux de Golgi par les afférences proprioceptives Ia et Ib

D'un point de vue moléculaire, les neurones proprioceptifs sont sous la dépendance de la neurotrophine 3 (NT3) en raison de l'expression à leur membrane du récepteur à haute affinité TrkC.

d) La nociception

La nociception est la détection par l'organisme d'un stimulus susceptible de porter atteinte à son intégrité. Cette perception est permise par les nocicepteurs. Déjà en 1906, Sherrington proposait l'existence de neurones activables par des stimuli capables de causer des lésions tissulaires. On distingue deux types de douleurs selon leur vitesse d'apparition, la douleur rapide et aiguë, et la douleur tardive plus diffuse et arrivant juste après la première (Figure 9). Le temps de latence entre les deux peut être expliqué par les vitesses de propagation différentes au sein des nocicepteurs A δ et C (Figure 3 p19) (Field, 1987).

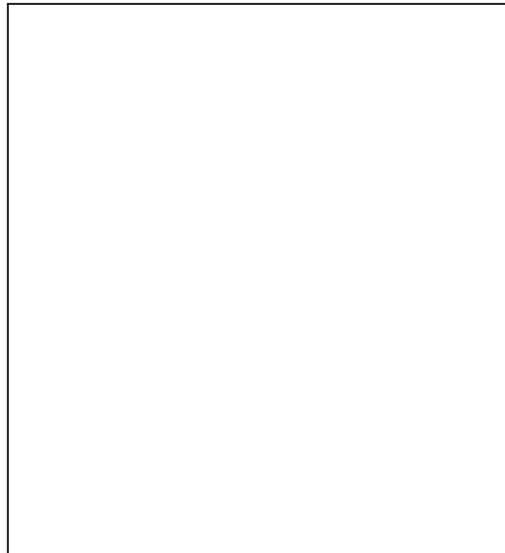


Figure 9 : Schématisation des douleurs ressenties en fonction des vitesses de conduction des fibres sensibles (adapté de (Field, 1987))

Comme nous l'avons vu précédemment, les thermo-nocicepteurs et les mécanonocicepteurs réagissent respectivement aux stimuli thermiques et mécaniques intenses. Il existe néanmoins d'autres types de nocicepteurs, répondant à différents stimuli douloureux (coupure, produits chimiques, pincements...), et générant diverses sensations douloureuses (picotements, brûlures, démangeaisons...).

La majorité des neurones nociceptifs possèdent des fibres de type A δ et C projetant dans les lamina I et II de la moelle épinière (Figure 4 p20). Bien que tous expriment au cours du développement embryonnaire le récepteur TrkA, récepteur à haute affinité au NGF (*Nerve Growth Factor*), ils se séparent ensuite en deux classes distinctes au cours de la neurogénèse, pour donner les nocicepteurs peptidergiques et les nocicepteurs non-peptidergiques (Marmigere and Ernfors, 2007). En effet, au cours de la période post-natale, environ 50% des nocicepteurs arrêtent d'exprimer le récepteur TrkA et se mettent à exprimer Ret, récepteur tyrosine-kinase couplé au récepteur au GDNF (*Glial-Derived Neurotrophic Factor*). Ces neurones, exprimant le récepteur purinergique P2X3 et fixant l'isolectine B4 (IB4) à leur membrane grâce à l'expression de protéoglycans spécifiques, deviennent alors non-peptidergiques, à l'inverse des neurones continuant à exprimer TrkA, qui deviennent eux des neurones peptidergiques. En effet, cette population de nocicepteurs synthétise des molécules spécifiques telles que le CGRP (*Calcitonin Gene Related Peptide*) et la substance P. Ces peptides jouent un rôle dans la neurotransmission au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière mais aussi en périphérie (vasodilatation, perméabilité...). A l'inverse des neurones

non-peptidergiques, la plupart des neurones peptidergiques ne fixent pas l'IB4 à leur membrane.

Les neurones nociceptifs n'interviennent pas uniquement dans la douleur aiguë, mais également dans la douleur persistante dans des conditions pathologiques. Ce mécanisme est appelé « allodynie ». Il résulte de deux mécanismes : une sensibilisation centrale dans laquelle on observe une augmentation de la réponse des neurones de la douleur situés dans la moelle épinière, ou une sensibilisation périphérique, liée à un abaissement du seuil d'activation des nocicepteurs. Dans la sensibilisation centrale, la douleur est produite par une augmentation anormale, spontanée et/ou évoquée de l'activité des neurones nociceptifs du SNC. Une sensibilisation périphérique se produit lorsque les terminaisons nociceptives se retrouvent exposées aux substances libérées par une lésion ou une inflammation, également appelées « soupe inflammatoire ». Parmi ces molécules, on trouve les protons, l'acide arachidonique, la sérotonine, la bradykinine, les nucléotides et le NGF, qui vont interagir avec les canaux ioniques et les récepteurs des terminaisons nerveuses.

2. Les marqueurs moléculaires

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, il est possible de classer les neurones sensoriels en fonction du type d'information détectée dans l'environnement. Néanmoins, ceci n'est pas suffisant pour aborder toute la complexité du système. Afin de mieux comprendre le système somatosensoriel, il est nécessaire de s'intéresser aux différents marqueurs moléculaires de ces neurones, permettant d'une part une caractérisation plus précise de ces derniers, mais également une meilleure compréhension de ce que l'on appelle la « pluri-modalité sensorielle ».

a) Les récepteurs aux neurotrophines

Les neurotrophines, libérées par les cibles périphériques, sont responsables, non seulement de la survie, du développement et du maintien de neurones, mais également de la plasticité et de la transmission synaptique. Elles ont un effet trophique sur les populations neuronales. Dans les neurones sensoriels, deux familles de neurotrophines interviennent : la famille des NGF (*Nerve Growth Factor*) et celle des GDNF (*Glial-Derived Neurotrophic Factor*). La famille des NGF, ou neurotrophines (NT), comprend le NGF lui-même, le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), la NT-3 (*Neurotrophin-3*) et la NT-4. Elles se fixent

sur un récepteur à haute affinité appelé Trk (*Tropomyosin-related kinases*) (TrkA pour le NGF, TrkB pour le BDNF et la NT-4 et TrkC pour la NT-3) dont elles activent la phosphorylation. La famille des GDNF comprend la neurturine, l'artemine et la persephine, se fixant sur un récepteur commun, résultats d'une hétéro-dimérisation du récepteur GFR α (*GDNF Family Receptor*) et du récepteur tyrosine-kinase Ret.

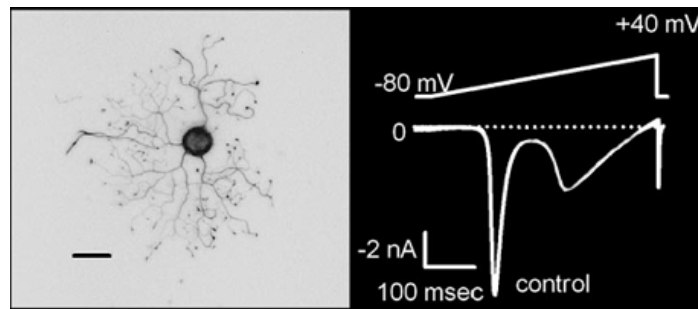
Les récepteurs aux neurotrophines sont les marqueurs les plus utilisés pour caractériser les grandes populations de neurones sensoriels. Cette classification fait donc apparaître quatre populations de neurones sensoriels primaires au sein du GRD : les neurones TrkA⁺, TrkB⁺, TrkC⁺ et Ret⁺ (voir paragraphe I.B.1). Selon certaines études, il existerait néanmoins une cinquième population de neurones, représentant 3% du ganglion rachidien dorsal, n'exprimant aucun de ces récepteurs (Kashiba et al., 2003).

Bien que représentative des différentes sous-populations de neurones sensoriels, cette classification ne prend pas en compte le fait qu'un certain nombre de neurones expriment plusieurs récepteurs en même temps (Kashiba et al., 2003).

b) Les canaux ioniques

Cette liste est bien sûr loin d'être exhaustive, mais voici quelques exemples de canaux pouvant permettre une classification de certaines populations de neurones :

- Les canaux sodiques sensibles au voltage de type Na_v1.8 et Na_v1.9 (résistants à la tétródotoxine) sont principalement retrouvés dans les neurones nociceptifs et thermoceptifs de petit diamètre (Benn et al., 2001; Fang et al., 2006).
- Les canaux calciques à haut seuil d'activation ou HVA (*High Voltage Activated Current*) et ceux à bas seuil d'activations ou LVA (*Low Voltage Activated Current*), également appelé courant de type T (*Transient current*, en raison de sa rapide inactivation) ou Ca_v3.x. Dans les neurones de ganglions rachidiens dorsaux, parmi les canaux LVA, on retrouve les canaux Ca_v3.1, 3.2 et 3.3. Ils sont situés plus particulièrement dans les neurones de petit et moyen diamètres, impliqués dans la transmission de la douleur (Bourinet et al., 2005; Jevtovic-Todorovic and Todorovic, 2006; Todorovic and Jevtovic-Todorovic, 2006). Notre équipe a également travaillé sur le rôle du canal Ca_v3.2 exprimé dans une population de neurones somatosensoriels mécanoceptifs appelée D-Hair (Figure 10). Ces neurones innervent le follicule pileux de la peau et dépendent de l'expression de la NT-4 (Dubreuil et al., 2004). Dans ces neurones, le courant calcique LVA, caractérisé par sa grande amplitude, est nécessaire à l'activité mécanoceptive (Shin et al., 2003).



**Figure 10 : Morphologie en rosette et courants calciques LVA et HVA du neurone mécanoceptif D-Hair
(Adapté de (Dubreuil et al., 2004))**

- Les canaux potassiques, intervenant dans la phase de repolarisation du potentiel d'action (PA). Les neurones sensoriels ne présentant pas tous la même durée de PA, il semble que différents canaux potassiques soient exprimés au sein du GRD (Campbell, 1992; Rasband et al., 2001). Chez le rat, par exemple, les mécano- et propriocepteurs expriment $K_v1.1$ et $K_v1.2$ (Rasband et al., 2001).
- Les canaux TRP dont nous avons parlé plus haut. Le canal TRPV1, par exemple est un marqueur de thermo-nociception (Caterina et al., 1999)
- Les canaux ASIC (*Acid-Sensing Ion Channel*). ASIC3, par exemple, est retrouvé dans les terminaisons mécanosensibles et permet la mécanosensation et la douleur chimio-induite (Price et al., 2001).
- Certains marqueurs de populations ont été mis en évidence lors d'études portant sur les lésions nerveuses. C'est le cas du courant CaCC (*Calcium-Activated Chloride Channel*), courant chlorure activé par l'entrée de calcium dans la cellule, dont l'expression augmente dans 80% des neurones sensoriels après lésion nerveuse périphérique (Boudes et al., 2009).

c) Autres marqueurs de population

D'autres marqueurs sont largement utilisés afin de caractériser des populations de neurones. Comme nous l'avons vu précédemment, les neuropeptides comme le neuropeptide Y (NPY) et la substance P permettent de distinguer une classe de neurones nociceptifs. On peut également séparer les neurones myélinisés de type $A\alpha$, $A\beta$ et $A\delta$, marqués en immunohistochimie par le neurofilament 200 (Rice et al., 1997), des neurones non myélinisés de type C, et marqués par la périphérine, filament intermédiaire (Escurat et al., 1990). On trouve également des facteurs de transcription comme ER81, exprimé dans les neurones

proprioceptifs et leur permettant au cours du développement de se connecter avec les motoneurones (Arber et al., 2000).

Bien évidemment cette liste ne se veut pas exhaustive. Bon nombre de marqueurs peuvent être utilisés afin de caractériser des sous-populations de neurones. Bien qu'augmentant la complexité du système, leur mise en évidence reste un point crucial dans la compréhension du système somatosensoriel tant au niveau de la prise d'information, qu'au niveau de la transmission au système nerveux central.

II. La lésion dans le système nerveux périphérique

Les pathologies du système nerveux périphérique, encore appelées neuropathies sensitives périphériques, touchent au minimum 3 millions de personnes en France avec une prévalence qui augmente considérablement avec l'âge et causent des déficits sensoriels multiples (douleurs, troubles de l'équilibre des personnes âgées, de la marche, du toucher). Les neuropathies post-traumatiques sont les plus fréquentes (50% environ des neuropathies périphériques), le plus souvent chroniques et pour la plupart, résistantes aux traitements actuels.

Afin de permettre la survie, voire la régénération, des neurones lésés, de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires sont mis en jeu. Ceci permet, à terme, d'aboutir à une récupération fonctionnelle la plus complète possible. Néanmoins, les modifications fonctionnelles que subissent les neurones entraînent un dérèglement des perceptions sensorielles pouvant aboutir à des douleurs neuropathiques. Afin d'optimiser la récupération post-lésionnelle et de peut être empêcher l'apparition de douleurs neuropathiques, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la régénération nerveuse post-traumatique.

A. Les lésions du nerf périphérique

1. Les neuropathies

Les neuropathies périphériques comprennent toutes les atteintes des nerfs périphériques, atteintes isolées ou diffuses, tronculaires (nerfs) ou radiculaires (racines), symétriques ou non. Les neuropathies peuvent avoir des origines très diverses : mécaniques (traumatiques, posturales, canalaire), immunitaires (syndrome de Guillain-Barré),

paranéoplasiques, infectieuses (VIH, Hépatite C), métaboliques (diabète, hypothyroïdie), médicamenteuses, toxiques (alcool) ou génétiques (maladie de Charcot-Marie-Tooth). En fonction de l'étiologie, on distingue :

- **Les mononévrites ou mononeuropathies** : Paralysie d'un seul nerf périphérique pouvant être secondaire à un traumatisme ou très souvent liée à une compression de ce nerf pendant plusieurs heures. Cette compression peut être d'origine interne (fragment osseux, cal vicieux, tumeur osseuse), d'origine externe (sommeil, anesthésie, coma), ou encore due au diabète.
- **Les multinévrites ou mononeuropathies multiples** : atteinte asymétrique de plusieurs nerfs. Parmi les causes, on trouve le diabète, la lèpre, la porphyrie aigüe intermittente, l'amylose, la périarthrite noueuse...
- **Les polynévrites ou polyneuropathies** : atteinte symétrique de plusieurs nerfs. L'alcoolisme et le diabète en sont deux causes connues.
- **Les polyradiculonévrites (PRN)** : Atteinte des racines nerveuses. Le syndrome de Guillain-Barré est la cause la plus connue de cette pathologie.

2. La lésion nerveuse

En 1943, Seddon a proposé une classification des lésions nerveuses en fonction de leur gravité (Seddon et al., 1943) :

- **La neurapraxie**, conséquence d'un arrêt de la conduction axonique sans lésion anatomique le plus souvent dû à un arrêt local de la circulation sanguine (syndrome du canal carpien par exemple). Dans ce cas, la récupération est rapide, dans les quelques semaines après réparation de la gaine de myéline.
- **L'axonotmésie** est une section de l'axone, sans atteinte du tube neural, souvent liée à une compression, un écrasement ou un étirement. On observe dans ce cas une dégénérescence Wallérienne, c'est-à-dire une dégénérescence de la partie distale du nerf dont nous parlerons plus longuement par la suite. Dans ce cas, la régénération est alors possible
- **La neurotmésie**, correspondant à une section du tube neural. La perte de conduction est complète et aucune régénération n'est dans ce cas possible.

B. Modèles expérimentaux

Basés sur la classification de Seddon, des modèles expérimentaux de lésions nerveuses ont été développés afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régénération. Dans le cas de la neurapraxie, l'atteinte n'étant pas nerveuse, nous ne nous attarderons pas sur le sujet. Concernant l'axonotmésie, le modèle expérimental correspond à un écrasement du nerf appelé « Crush ». Ainsi, les axones sont sectionnés, mais la gaine du nerf n'est pas touchée, ce qui laisse aux neurones un « chemin » pour aller réinnover leur cible périphérique. Ce modèle est adapté pour l'étude de la vitesse de régénération et de recouvrement de la sensibilité. Le modèle se rapprochant le plus de la neurotmésie est appelé « Axotomie ». C'est d'ailleurs sur ce modèle que porte une partie de mes travaux de thèse. Elle consiste en une section complète du nerf sciatique avec ablation de deux à trois millimètres de nerfs, autrement dit, une perte de continuité des axones et de la lame basale. Contrairement à la neurotmésie, ce modèle ne permet pas de réinnervation par le nerf lésé, donc de mesure de la récupération sensorielle, mais permet d'étudier les mécanismes de régénération des neurones périphériques qui, en culture adoptent une morphologie particulière dite « élonguée » (Andre et al., 2003).

D'autres modèles de lésion permettent bien évidemment d'étudier les douleurs neuropathiques. Il existe notamment les modèles de ligature du nerf (le plus souvent sciatique). Parmi elles, on distingue la ligature lâche chronique ou CCI (*Chronic Constriction Injury*) (Bennett and Xie, 1988), la ligature partielle du nerf sciatique (Seltzer et al., 1990), la ligature du nerf spinal (Kim and Chung, 1992) et la SNI (*Spared Nerve Injury*) (Decosterd and Woolf, 2000) dans laquelle on effectue une ligature sur deux des trois branches terminales du nerf sciatique sans toucher au nerf sural (Figure 11).

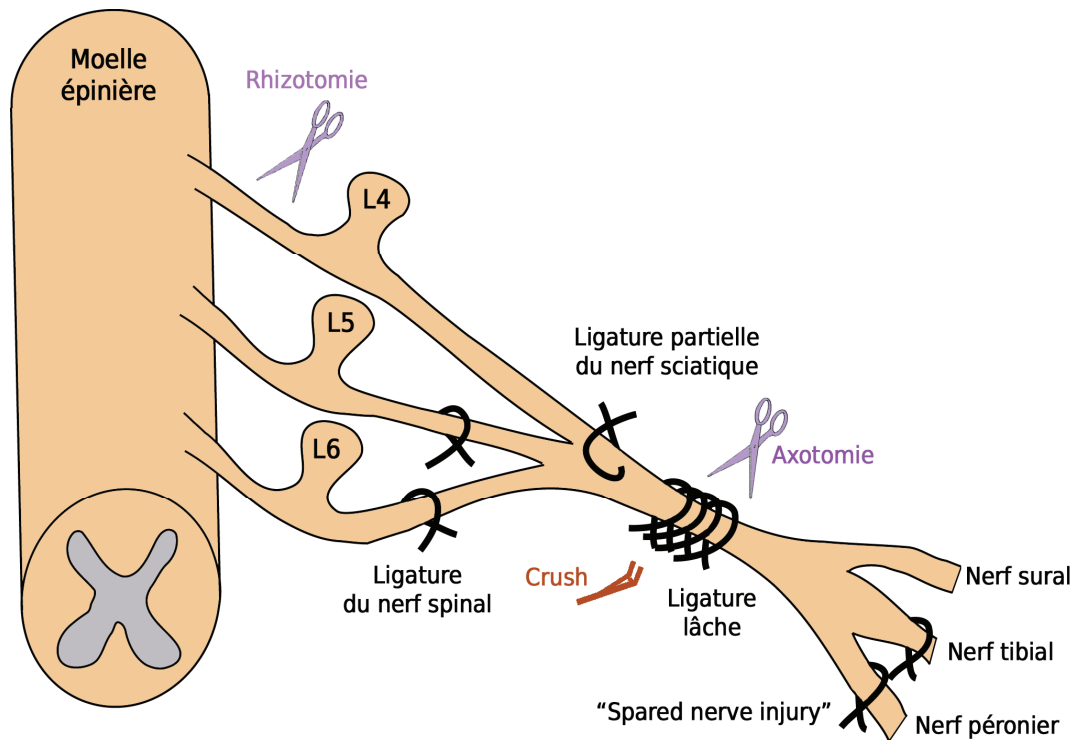


Figure 11 : Représentation des différents modèles de lésion du nerf sciatique (inspiré de (Ueda, 2006))

C. La régénération des nerfs périphériques

La lésion d'un nerf périphérique est responsable d'une perte partielle ou complète de la fonction motrice et sensitive en raison de l'interruption de continuité des axones, de la dégénérescence des fibres nerveuses distales et de la mort éventuelle des neurones axotomisés. Malgré les pertes fonctionnelles engendrées par la lésion, l'organisme est, selon la gravité de la lésion, capable de s'adapter pour permettre une récupération plus ou moins complète. Ainsi, on peut observer :

- Soit une réinnervation des tissus cible par le nerf lésé lui-même,
- Soit une réinnervation de ces tissus par des nerfs voisins, phénomène appelé « branchement collatéral » (ou *sprouting*),
- Soit un remodelage du système nerveux central.

Après une lésion nerveuse périphérique, la capacité des axones à régénérer et à reformer des connections fonctionnelles dépend de l'âge du sujet, de la portion de nerf lésée, du site et du type de lésion et du temps écoulé avant l'intervention chirurgicale. Chez l'homme par exemple, on considère qu'un nerf coupé sur portion de plus de 4cm ne retrouvera pas sa fonction (Reyes et al., 2005).

1. Les étapes de la régénération périphérique

Après une lésion nerveuse, les axones distaux sont déconnectés du corps cellulaire et dégènèrent selon un processus appelé « dégénérescence Wallérienne » (Figure 12) (Pour revue : (Navarro et al., 2007)). Celle-ci permet de créer un microenvironnement favorable à la repousse axonale. Cette dégénérescence affecte également un court segment de la portion proximale. Peu de temps après l'axotomie, les cellules de Schwann myélinisantes se détachent des axones et deviennent capables de phagocytose. Elles vont dégrader la gaine de myéline de manière à éliminer certains facteurs inhibiteurs de repousse axonale comme la MAG (*Myelin Associated Glycoprotein*). Elles se mettent également à libérer des facteurs comme les cytokines (MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*), LIF (*Leukaemia Inhibitory Factor*) et les Interleukines 1 et 6, notamment) qui vont permettre l'infiltration des macrophages dans le site de lésion (Tofaris et al., 2002). Ces cellules commencent alors à proliférer dans la partie distale de la lésion formant ainsi la « bande de Büngner » servant de support pour l'axone en élongation. Des cônes de croissance émergent des axones qui vont commencer à rechercher les cibles périphériques à innover. Bien que l'initiation de la régénération soit lente dans les premières heures, la vitesse de pousse des axones peut atteindre une vitesse de 2-3 mm par jour dans les 3-4 jours après la lésion. Bien sûr, ceci n'est possible que dans le cas d'une axonotmésie car il reste le tube neural qui peut guider les axones dans la recherche de leur cible. Après une neurotmésie, les axones immatures poussent de manière désordonnée sans jamais atteindre leur cible.

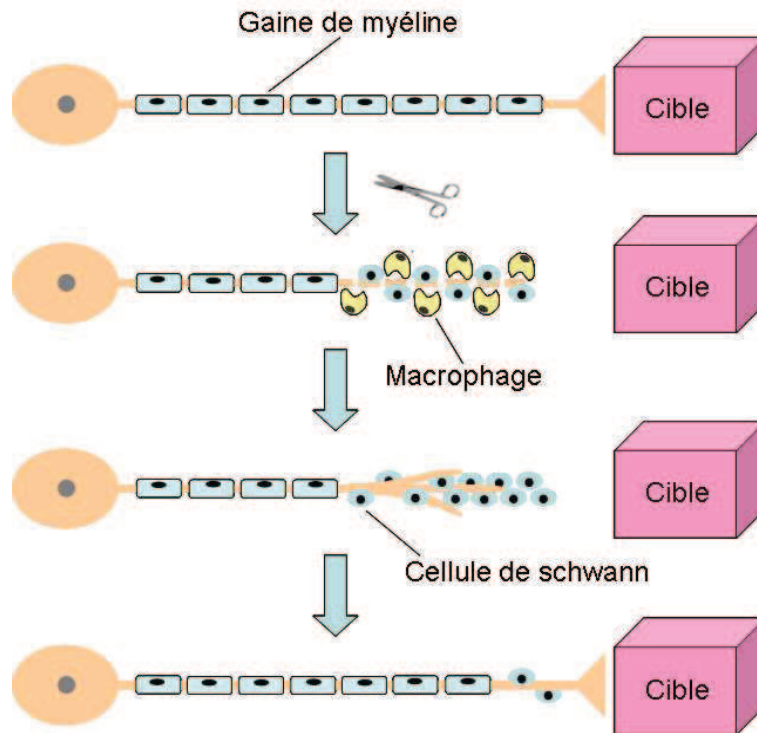


Figure 12 : Schématisation de la dégénérescence Wallérienne et de la régénération (inspiré de (Navarro et al., 2007))

2. Bases cellulaires et moléculaires de la régénération périphérique

a) La survie neuronale

Un des succès de la régénération est la capacité des neurones à survivre après la lésion. En effet, chez le rat, après une axotomie, 10 à 30% des neurones sensoriels meurent dans les 10 à 30 semaines suivant la lésion (Arvidsson et al., 1986; Ygge, 1989; Groves et al., 1997; Tandrup et al., 2000). La survie des neurones dépend à la fois de l'âge de l'individu, du type de lésion et de la proximité de la lésion par rapport au corps cellulaire.

Une des conséquences de l'axotomie est la privation rapide en facteurs neurotrophiques, issus des cibles à innover. Ces facteurs neurotrophiques comme par exemple le NGF, le BDNF, la NT3, la NT4, le CNTF et le GDNF sont connus pour stimuler la régénération axonale empêchant le processus de mort. Ainsi, les macrophages et les cellules de Schwann à proximité de la lésion libèrent des cytokines et des facteurs neurotrophiques qui remontent au soma par un transport rétrograde accéléré de manière à maintenir les capacités régénératives des neurones lésés (Curtis and DiStefano, 1994).

b) Chromatolyse et modifications morphologiques

Parmi les changements morphologiques majeurs intervenant après une lésion nerveuse périphérique, on observe une excentricité du noyau, un gonflement cellulaire, une rétractation des dendrites et une dissolution des corps de Nissl également appelée chromatolyse (Lieberman, 1971; Kreutzberg, 1995). Les corps de Nissl sont des agrégats de réticulum endoplasmique riches en ribosomes, structures intervenant dans la synthèse protéique, permettant une fabrication accrue de protéines nécessaires à la régénération. Le neurone axotomisé passe donc d'un mode de transmission à un mode de régénération. Très tôt après la lésion, on peut également observer l'apparition d'un cône de croissance au niveau du site de lésion (Chierzi et al., 2005; Willis and Twiss, 2006).

c) Signalisations intracellulaires

Le processus de régénération dépend d'une part des capacités intrinsèques des neurones à régénérer, plus importantes dans les neurones périphériques que centraux, et des signaux extracellulaires captés par le neurone. Ces signaux peuvent être inhibiteurs ou excitateurs de la repousse axonale. Ils sont à l'origine de nombreuses voies de signalisation qui auront pour but de faire entrer le neurone soit dans une voie d'apoptose, soit dans une voie de régénération.

(1) La cicatrice gliale

Dans le système nerveux central, la cicatrice gliale, composée de cellules microgliales, d'oligodendrocytes, d'astrocytes et de cellules inflammatoires, semble former une barrière mécanique pouvant être un frein à la régénération axonale (Windle and Chambers, 1950). Néanmoins nous savons aujourd'hui que cette cicatrice gliale est loin de n'être qu'une barrière physique. En effet, de nombreux facteurs, comme la MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*), la Sémaphorine 3, l'Ephrine B2 et les protéoglycans chondroïtine sulfate, sécrétés par les cellules gliales, interviennent dans l'inhibition de la régénération. D'autre part, même en l'absence de cette cicatrice, la régénération ne peut se faire dans le SNC (pour revue : (Fitch and Silver, 2008). Ceci laisse penser que d'autres signaux sont nécessaires à la régénération

(2) Les signaux précoces

Tout d'abord, le cytoplasme de l'axone lésé se retrouve au contact du milieu extracellulaire, ce qui a pour conséquence une entrée massive de calcium et de sodium, responsable de l'apparition d'une activité électrique. Cette activité se propage de manière rétrograde jusqu'au corps cellulaire sous la forme de trains de potentiels d'action à haute fréquence. Ils provoquent l'ouverture de canaux calciques sensibles au voltage (CCVD) et une entrée de calcium, responsable de l'activation de protéines kinases comme la CamKII (*Calcium/Calmoduline dependent Kinase II*), les PKA et C (*Protein Kinase*) et la MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (DeCoster, 1995). De plus, les décharges de potentiels d'action entraînent des libérations soutenues de neurotransmetteurs par les synapses des afférences primaires, ce qui intervient dans la plasticité centrale. Un autre signal précoce observé est le triplement du taux d'AMPc (Qiu et al., 2002) dans les neurones lésés intervenant de toute évidence dans la repousse axonale (Hannila and Filbin, 2008). Cet effet sur la pousse semble être en partie dû à une diminution d'expression de la protéine SOCS3 (*Suppressor Of Cytokine Signaling*) (Park et al., 2009). L'AMPc active notamment le facteur de transcription CREB qui lui-même permet l'augmentation d'expression de la cytokine interleukine 6 (Wu et al., 2007).

(3) Les facteurs neurotrophiques

La privation en facteurs trophiques issus de la périphérie (Raivich et al., 1991) est également un facteur important au cours du mécanisme d'activation de la régénération. Les neurotrophines sont positivement régulées par le traumatisme. Shadiack et coll. ont montré qu'en bloquant le transport du NGF, il était possible d'induire dans des neurones naïfs des modifications identiques à celles retrouvées dans les neurones axotomisés (Shadiack et al., 2001). Dans les motoneurones, le BDNF, quant à lui, favorise la régénération à faible dose, mais la réprime à forte dose (Gordon, 2010). En effet, via sa liaison au récepteur p75, le BDNF libéré par les fibres musculaires dénervées provoquerait l'arrêt de la pousse axonale et la mise en place de connections fonctionnelles. Comme nous l'avons vu plus haut, les neurones lésés eux-mêmes ainsi que des cellules non-neurales sont capables de produire certains de ces facteurs directement au niveau du site de lésion (Curtis and DiStefano, 1994). En effet, les cellules de Schwann et les macrophages (Figure 12 p36) libèrent des molécules comme les facteurs de survie (Neurégulines), les facteurs neurotrophiques (NGF, BDNF, GDNF) et des cytokines pro-inflammatoires (IL1, IL6, LIF) pouvant activer des facteurs de

transcription (STAT3, par exemple) ou subir un transport rétrograde jusqu'au corps cellulaire (CNTF, LIF) (Curtis et al., 1993; Curtis and DiStefano, 1994)

(4) Les cytokines

Les cytokines induites par la lésion, jouent de nombreux rôles au cours de la réponse immunitaire, de l'inflammation et de l'hématopoïèse. La famille de l'Interleukine 6 (IL6) comprend l'IL6 elle-même, l'IL11, le CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*), LIF (*Leukaemia Inhibitory Factor*), l'oncostatine-M (OSM), la cardiotrophine-1 (CT-1) et la CLC (*Cardiotrophin-Like Cytokine*). Pratiquement toutes les cytokines de la famille de l'Interleukine 6 sont sur-exprimées suite à une lésion nerveuse. Chez les souris LIF^{-/-} et CNTF^{-/-}, Cafferty et coll., puis Leibinger et coll., ont mis en évidence une diminution des capacités régénératives des neurones (Cafferty et al., 2001; Leibinger et al., 2009). Les auteurs ont également constaté que LIF promouvait la pousse dite « élonguée », caractéristique des neurones conditionnés, au détriment de la pousse dite « arborescente ». Une autre cytokine, qui fait l'objet d'une partie de mon travail, l'interleukine 6, intervient également dans la régénération. En effet, dans les huit heures qui suivent l'axotomie du nerf facial, l'expression d'IL6 est induite dans les astrocytes et la microglie entourant les motoneurones du noyau facial (Kiefer et al., 1993). Il en va de même dans les neurones sensoriels (Cao et al., 2006) où l'IL6 se trouve exprimée dans les neurones de moyen et grand diamètres suite à une section du nerf sciatique (Murphy et al., 1995). Le rôle de la cytokine a pu être confirmé par l'étude de la souris IL6^{-/-}. Celle-ci présente un retard de régénération après un crush du nerf sciatique (Zhong et al., 1999). D'autre part, une étude a montré que l'IL6 permettait la régénération des neurones axotomisés même sur un milieu non permissif (MAG). Cependant, les auteurs suggèrent ici que l'IL6 est suffisante, mais non nécessaire, à la mise en place des mécanismes de régénération lorsque ceux-ci sont induits par l'AMPC ou par une lésion (Cao et al., 2006). Selon une étude récente, portant sur une lésion de type CCI du nerf sciatique, il semblerait que l'IL6 soit produite dans le GRD à la fois par les neurones et par les cellules gliales satellites (Dubovy et al., 2010).

(5) La matrice extracellulaire

Parmi les signaux intervenant dans les voies de régénération, on retrouve ceux issus de la matrice extracellulaire. En effet, la MEC (Matrice Extracellulaire) est composée de nombreuses molécules capables d'interagir avec les récepteurs neuronaux. On trouve entre autre la laminine, produite par les cellules de Schwann, qui sert à la fois de support

d'adhérence, mais également d'activateur de cascades de signalisation par sa liaison aux intégrines membranaires. Chen et Strickland, en 2003, ont montré que l'absence de synthèse de laminine par les cellules de Schwann entraîne un défaut de régénération des axones après un crush de nerf sciatique (Chen and Strickland, 2003). Leurs résultats suggèrent que les laminines jouent un rôle dans la régénération soit en servant de support, soit en modulant l'activité des cellules de Schwann. La fibronectine, sur-exprimée après lésion du nerf périphérique (Lefcort et al., 1992) permet également, grâce à sa liaison à l'intégrine $\alpha 5$, d'augmenter les capacités de repousse des neurones traumatisés *in vitro* (Gardiner et al., 2007). Laminine et fibronectine se fixant toutes les deux sur le même type de récepteur, il paraît logique de se demander si l'intégrine joue un rôle dans la régénération. En effet, Werner et coll. ont observé, après axotomie, une augmentation de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ et chez la souris intégrine $\alpha 7$ Knock-out, une perturbation de la régénération des motoneurones (Werner et al., 2000).

(6) Voies de signalisation et facteurs de transcription

Les signalisations intracellulaires vont se modifier de manière à aboutir à deux possibilités, la régénération ou la mort. En parallèle de celles dont nous venons de parler, on retrouve à l'origine de nombreuses voies de signalisation, les récepteurs tyrosine kinase transmembranaires. Dans le cas des facteurs neurotrophiques, la liaison au récepteur provoque l'activation de la voie MAPK comprenant Erk1 et Erk2 (*Extracellular signal Regulated Kinase*) (Sheu et al., 2000). Dans le cas des cytokines comme l'IL-6, la liaison avec le récepteur non-signalant gp80 entraîne le recrutement de deux sous-unités gp130 permettant la signalisation via l'activation de la protéine JAK (*Janus Kinase*). JAK, grâce à son activité tyrosine kinase, est capable d'activer différentes voies de signalisation comme la voie STAT3, la voie PI3-Kinase et la voie MAPK (Figure 13) (Heinrich et al., 2003).

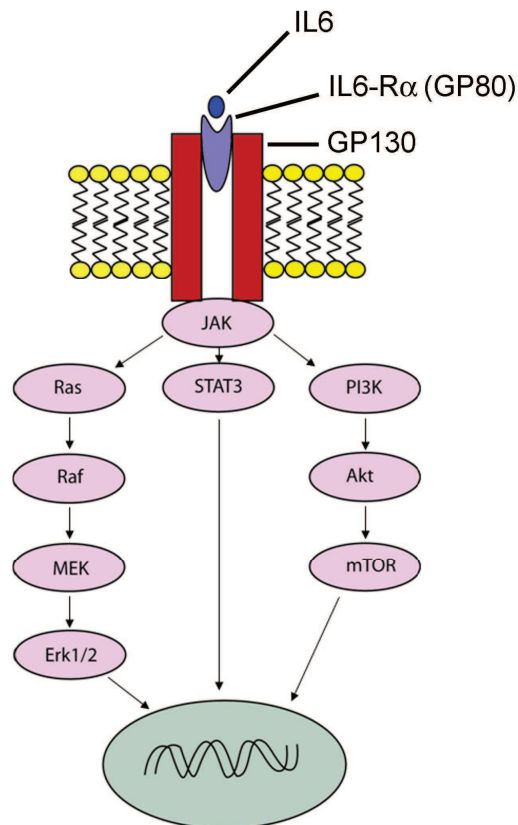


Figure 13 : Voies de signalisation activées par la liaison de l'IL6 avec son récepteur IL6-R α (ou gp80)

L'activation de voies de signalisation se traduit par des modifications transcriptionnelles, traductionnelles et/ou post-traductionnelles. Le facteur de transcription STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), transloqué au noyau après phosphorylation et dimérisation, voit son activité augmenter après lésion du nerf facial, hypoglosse et sciatique de rat (Schwaiger et al., 2000; Lee et al., 2004; Qiu et al., 2005). Il permet également d'améliorer la vitesse de pousse de neurones sensoriels en culture (Miao et al., 2006). En effet, l'inhibition de sa phosphorylation diminue la quantité de protéine GAP43, un marqueur de repousse axonale (Qiu et al., 2005). Il joue ainsi un rôle dans la régénération des neurones sensoriels et moteurs. Les protéines SOCS (*Suppressor Of Cytokine Signaling*), dont l'expression est régulée par la voie JAK/STAT, sont capables d'effectuer un rétrocontrôle négatif sur cette signalisation. Cette famille est composée de huit membres, dont trois (SOCS 1, 2 et 3) sont retrouvés dans les neurones. SOCS3 est notamment capable d'inhiber la signalisation via STAT3 en se liant à un résidu tyrosine de la gp130 (Fischer et al., 2004; Miao et al., 2006) (Figure 14). Or, des études ont montré que l'ARNm de SOCS3 était augmenté de manière importante dans les neurones de moyen et grand diamètres de ganglions rachidiens dorsaux après axotomie du nerf sciatique chez le rat (Miao et al., 2006).

De manière intéressante, les cytokines elles-mêmes augmentent l'expression de SOCS3 (Croker et al., 2008). Enfin, la délétion de SOCS, par une approche virale, permet d'améliorer la régénération du nerf optique après un crush (Smith et al., 2009).

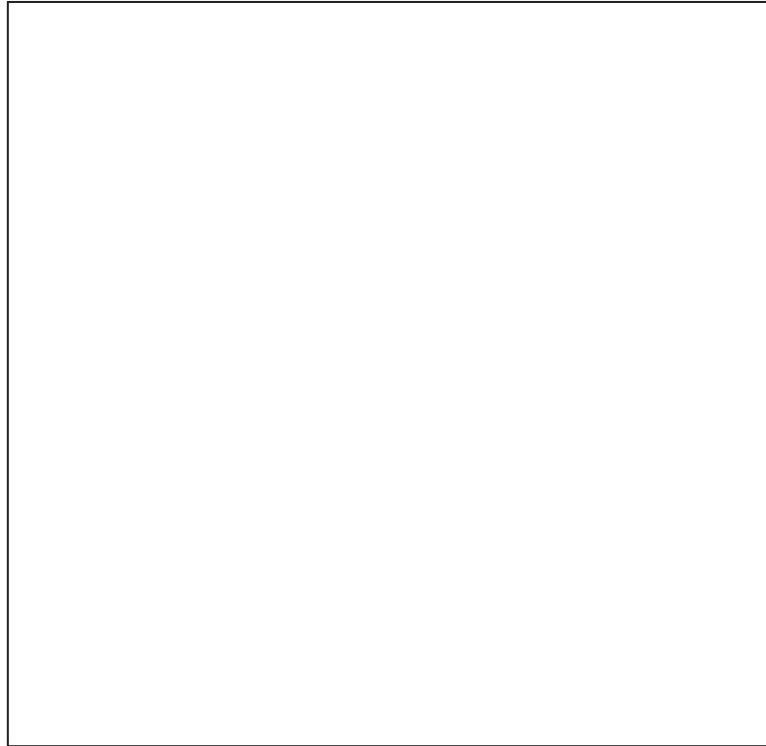


Figure 14 : La Signalisation JAK/STAT par la cytokine IL6 active l'expression de SOCS3 (Adapté de Sun and He, 2010)

La voie PI3 Kinase-Akt, également induite par les intégrines, est nécessaire à la survie des motoneurones après lésion (Namikawa et al., 2000). D'autres facteurs de transcription sont activés afin de promouvoir la régénération. La voie JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), présentant une activation précoce et durable, inhibée par l'ajout de neurotrophines (Kenney and Kocsis, 1998), après une lésion nerveuse, permet l'augmentation d'expression et la phosphorylation activatrice des facteurs de transcription c-Jun, JunD et Fos. Ils forment le complexe AP-1 (*Activator Protein 1*) capable d'activer de nombreux gènes intervenant dans la repousse axonale (Kenney and Kocsis, 1998; Raivich and Behrens, 2006). La délétion neuronale de c-Jun ralentit la réinnervation et bloque le *sprouting* central (Raivich et al., 2004). L'activation par l'AMPc et par différentes protéines kinases (telles que PKA et PKC) du facteur de transcription CREB (*cAMP Responsive Element Binding protein*) (Miyabe and Miletic, 2005), en réponse à la liaison de facteurs neurotrophiques, comme le BDNF, avec leur récepteur Trk, semble jouer un rôle dans la régénération nerveuse (Song et al., 2008). Il est à noter que CREB est connu pour augmenter l'expression de l'IL6. Un autre facteur de

transcription touché après lésion nerveuse est le facteur ATF-3 (*Activating Transcription Factor 3*) (Tsujino et al., 2000). Une particularité de ce facteur est qu'il est activé après lésion périphérique mais pas centrale. L'expression d'ATF-3 est induite par la perte des facteurs neurotrophiques périphériques comme le NGF et le GDNF suite à la lésion nerveuse périphérique (Averill et al., 2004). Enfin, l'expression constitutive d'ATF3 permet une amélioration de la régénération périphérique après un crush du nerf sciatique (Seijffers et al., 2007).

(7) Modifications d'expression génique

Des modifications d'activité de facteurs de transcription se traduisent par des modifications d'expression génique. C'est ce qu'ont observé bon nombre d'auteurs s'étant intéressés à la régulation des gènes suite à une lésion nerveuse, quel que soit le type de lésion (Kubo et al., 2002; Xiao et al., 2002; Schmitt et al., 2003; Yang et al., 2006). L'analyse SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), effectuée par notre équipe sur les gènes modulés suite à une lésion nerveuse périphérique, a mis en évidence que l'expression de certains gènes est diminuée alors que d'autres gènes, intervenant au cours du développement, sont ré-exprimés (Mechaly et al., 2006). Il semble que les gènes dont l'expression diminue soient ceux associés à la fonction de transmission et les gènes sur-exprimés, à la fonction de repousse et de reconnexion des cibles périphériques, tel que l'on peut le voir au cours du développement. Cette étude a également démontré l'expression de gènes spécifiques à la lésion, ce qui montre que ces gènes n'interviennent que dans le programme de régénération axonale ou de survie après lésion.

Parmi les milliers de gènes régulés suite à une lésion, on trouve un certain nombre de canaux ioniques, l'IL6 comme nous l'avons vu précédemment (Murphy et al., 1995) et les co-transporteurs cation-chlorure comme KCC2. Un chapitre entier leur est consacré plus loin.

(8) Modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles

Bien évidemment, les modifications d'expression génique ne sont pas les seules conséquences des voies de signalisations dont nous venons de parler. La plasticité neuronale post-lésionnelle passe également par des mécanismes d'épissage post-traductionnel et des jeux de phosphorylation / déphosphorylation par les kinases et phosphatases. C'est le cas par exemple du co-transporteur NKCC1, dont la phosphorylation, en réponse à l'axotomie, augmente l'activité (Pieraut et al., 2007).

d) Excitabilité neuronale

Bien que les modifications électrophysiologiques soient variables en fonction du type de neurone sensoriel et du type de lésion, tous les neurones de GRD voient leur excitabilité augmenter après lésion. Les neurones de moyen et grand diamètres, de type A, présentent une diminution de leur seuil d'excitabilité et un allongement de leur potentiel d'action sans modification de leur vitesse de conduction. A l'inverse, l'axotomie diminue le seuil d'excitabilité des neurones de petit diamètre, de type C, sans modification des propriétés physiques du potentiel d'action. De plus on observe une réduction de la rhéobase, l'intensité minimale de courant excitant qui permet de déclencher un potentiel d'action, dans tous les types cellulaires. Il semble donc que l'axotomie augmente l'excitabilité des neurones sensoriels en augmentant les résistances entrantes apparentes (correspondant à la différence de voltage entre le potentiel de repos et le pic de réponse divisé par le courant rhéobase) des cellules de type A et en dépolarisant le potentiel de repos membranaire des cellules C (Kim et al., 1998; Hilaire et al., 2005).

L'augmentation de l'excitabilité neuronale est à l'origine de la sensibilisation périphérique suite à une inflammation ou à un traumatisme. Elle fait intervenir de nombreuses modifications fonctionnelles neuronales, comme l'expression et la distribution des récepteurs périphériques et la modification de l'homéostasie ionique.

III. L'homéostasie chlorure neuronale :

L'homéostasie chlorure est connue pour être l'un des acteurs primordiaux dans le contrôle de la transmission nerveuse. Elle présente une régulation fine, que ce soit au cours du développement ou chez l'adulte. La concentration des ions chlorures, anion majoritaire des cellules, intervient dans de nombreuses fonctions au sein des neurones centraux et périphériques. Au cours du développement, son rôle dans la mise en place du système nerveux a été très largement étudié. Chez l'adulte, il permet le contrôle inhibiteur de la neurotransmission GABAergique.

A. Les acteurs de l'homéostasie chlorure

Les mouvements d'ions de part et d'autre de la membrane des neurones sont permis par deux grandes familles de protéines : les canaux chlorures et les co-transporteurs cation-chlorure.

1. Les canaux chlorures

(1) Les récepteurs-canaux au GABA et à la glycine :

Le GABA, ou acide γ -amino-butérique, est synthétisé par décarboxylation de l'acide glutamique, principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux, grâce à la GAD (*Glutamic Acid Decarboxylase*) ou à partir de la putrescine (Le-Corronc et al., 2011). Le GABA active 2 types de récepteurs : (i) GABA_A (et GABA_C), fonctionnant comme un canal chlorure et (ii) GABA_B récepteur métabotropique sensible au baclofène (Farrant and Kaila, 2007; Galanopoulou, 2008).

Le récepteur GABA de type A (GABA_A) est un récepteur ionotropique pentamérique appartenant à la même famille que le récepteur nicotinique à l'acétylcholine et le récepteur à la sérotonine de type 3, et activé par fixation de son ligand. Il est composé de cinq sous-unités glycoprotéiques, comprenant chacune entre 450 et 550 acides aminés, qui s'organisent de façon pseudo-symétrique autour d'un pore de conduction des ions chlorures (et bicarbonates). Chaque sous-unité comporte un domaine extra-membranaire contenant les sites de fixation du GABA et d'autres effecteurs, et un domaine hydrophobe membranaire qui définit le pore. Il existe plusieurs types de sous-unités : α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , π , ϵ et θ (Pour revue : Le-Corronc et al., 2011). Le complexe pentamérique comprend notamment 2 α , 3 β . La stœchiométrie la plus communément rencontré (45% des récepteurs du cerveau) est α 1: β 2: γ 2 (2:2:1) (Tretter et al., 1997). La combinaison de ces sous-unités confère ses propriétés pharmacologiques et pharmacocinétique (agonistes, modulateurs allostériques, antagonistes et localisation subcellulaire) au canal (Galanopoulou, 2010). Maddox et coll. ont pu observer une différence d'expression des sous-unités entre les neurones de GRD embryonnaires et adultes, responsable de propriétés pharmacologiques différentes (Maddox et al., 2004)

En 1991, Persohn et coll. ont mis en évidence une forte expression des ARNm codant pour des sous-unité du canal GABA_A dans les neurones de GRD, expliquant ainsi l'inhibition pré-synaptique des interneurones et des motoneurones via des synapses axo-axoniques entre

les interneurons GABAergiques et les terminaisons afférentes primaires dans la moelle épinière (Persohn et al., 1991). Selon eux, au moins 30% des récepteurs GABA_A sont localisés sur les terminaisons afférentes primaires. Leur hypothèse est que le récepteur serait synthétisé dans le ganglion et transporté de manière antérograde via les afférences primaires dans la moelle épinière.

Le récepteur glycinergique présente également une structure pentamérique et est perméable aux ions chlorures. On lui connaît quatre sous-unités α (GlyR α_{1-4}) et une sous-unité β , toutes retrouvées dans les ganglions rachidiens dorsaux. Ce récepteur est présent dans un grand nombre de structures du système nerveux dont la *substantia gelatinosa*, dans laquelle il joue un rôle au niveau de la modulation des messages nociceptifs provenant de la périphérie. Un des antagonistes de la glycine est la strychnine. (Lynch, 2004). L'activité du récepteur à la glycine semble extrêmement proche de celle de GABA_A.

(2) Canaux chlorures activés par le calcium (CaCC)

Les CaCC (*Calcium-Activated Chloride Channels*) sont des canaux anioniques activés principalement par l'augmentation intracellulaire de calcium. On les retrouve dans les cellules épithéliales, les cellules vasculaires endothéliales, les cellules musculaires et dans les neurones. Ils interviennent dans de nombreuses fonctions comme le transport transépithélial de fluide, le repolarisation des cardiomyocytes, l'inhibition latérale des cônes rétiniens en réponse à un stimulus visuel, la transmission d'informations olfactives et le contrôle de l'excitabilité neuronale en participant au déclenchement du potentiel d'action ou au maintien de l'activation des canaux calciques sensibles au voltage (Scott et al., 1995). Il existe trois familles de CaCC : les bestrophines (Best1-3 chez la souris et Best1-4 chez l'homme) (Sun et al., 2002), les tweety (TTYH1-3, où seuls TTYH2 et 3 répondent au Ca²⁺) (Suzuki and Mizuno, 2004) et la famille des TMEM16 (Caputo et al., 2008; Schroeder et al., 2008; Yang et al., 2008). Bien que très controversé, certains auteurs incluent la famille des CLCA dans les CaCC. La concentration élevée en Ca²⁺ nécessaire à leur activation (Britton et al., 2002), ainsi que leur forte homologie avec des molécules d'adhésion et leur capacité à être clivés en peptide soluble (Mundhenk et al., 2006) laisse plus penser à un rôle de modulateur qu'à un rôle de canal chlorure. Au sein des GRD, les CaCC sont présents surtout dans les neurones de moyen diamètre (30-40 μ m). Notre équipe a montré que l'axotomie induit une augmentation de l'expression de CaCC et de l'amplitude du courant I_{Cl(Ca)} dans les neurones de moyen diamètre ainsi que son expression dans une sous-population de neurones de grand diamètre

(40-50 μ m) (Andre et al., 2003). Ce courant est supporté par la Bestrophine 1 (Boudes et al., 2009), connue pour être un CaCC impliqué dans la dystrophie maculaire vitelliforme. Néanmoins, il est encore difficile de dire si dans les neurones sensitifs primaires Best1 joue le rôle de canal chlorure ou de sous-unité régulatrice d'un autre canal. Il a été montré que l'inflammation augmente l'expression de CaCC dans les nocicepteurs représentés par les neurones sensitifs de petit diamètre (< 30 μ m) dont la nature moléculaire serait TMEM16A (Liu et al., 2010). Enfin, les CaCC semblent également intervenir dans la libération de molécules. En effet, une étude a récemment démontré le rôle de la Bestrophine 1 dans la libération de GABA par les cellules gliales du cervelet, expliquant l'inhibition tonique des neurones par le GABA via un mécanisme non-vésiculaire et indépendant de l'activité électrique (Lee et al., 2010b).

(3) Canaux chlorures activés par le voltage

Les canaux chlorures activés par le voltage font partie de la famille des CIC (*Chloride Channels*). Ils sont présents à la membrane plasmique et à la membrane de certains organites intracellulaires. On les retrouve dans de nombreux organes tels que le muscle, le rein, l'oreille interne... Bien que leur fonction soit encore peu connue, ils interviennent dans la régulation de l'homéostasie chlorure (Staley et al., 1996), de l'excitabilité (Madison et al., 1986), et l'acidification des vésicules synaptiques (Stobrawa et al., 2001).

Les CIC4 et 5 ayant des propriétés d'antiports, ils seront traités dans le paragraphe suivant

2. Les cotransporteurs

a) Les antiports CIC

Parmi les canaux CIC, certains présentent une activité de type co-transporteur. C'est le cas des antiports CIC4 et CIC5 qui sont capables d'échanger un proton H⁺ avec un ion Cl⁻ (Picollo and Pusch, 2005). Ils permettent notamment la régulation du pH dans les endosomes. Une étude datant de 2008 a montré qu'un autre membre de la famille des CIC, CIC7 était capable d'activité antiport dans les lysosomes (Graves et al., 2008). Aucune étude n'ayant démontré leur présence au sein des ganglions rachidiens dorsaux, il ne semble pas qu'ils puissent y jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie chlorure.

b) Les cotransporteurs cation-chlorure (CCC):

Le passage des ions chlorures au travers des membranes dépend de leur gradient électrochimique. Celui-ci est permis par l'activité des cotransporteurs cation-chlorure (CCC, *Cation-Chloride Cotransporters*)

Les premières études concernant les CCC ont porté sur leur rôle dans la régulation du volume cellulaire après gonflement (RVD, *Regulatory Volume Decrease*) ou constriction (RVI, *Regulatory Volume Increase*) dans des milieux hypo- et hypertoniques (Hoffmann and Dunham, 1995; Payne et al., 2003).

Il est aujourd'hui connu que certains de ces cotransporteurs jouent un rôle important dans le contrôle du gradient électrochimique de l'ion chlorure et donc dans l'activité hyperpolarisante du GABA et de la glycine. Le transport de Cl^- est permis sans hydrolyse d'ATP, ni mouvement net de charges. L'énergie nécessaire à leur fonctionnement est obtenue par l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase qui maintient les gradients de concentration Na^+ et K^+ . Les CCC sont électroneutres, autrement dit, ils ne génèrent pas d'activité électrique. Dans les neurones, les CCC interviennent dans la prolifération neuronale, la différenciation, la plasticité synaptique, l'audition (Boettger et al., 2003; Blaesse et al., 2009)... En dehors du système nerveux, les CCC sont exprimés de manière ubiquitaire et interviennent également dans le transport du sel, le contrôle de la pression sanguine...(Russell, 2000; Boettger et al., 2003; Pedersen et al., 2006; Flatman, 2008)

La famille des CCC (*Cation-Chloride Cotransporters*) comprend 9 gènes appelés slc12a1 à 9 (*Solute-Linked Carrier 12*). Ce sont des glycoprotéines de 120 à 200 kDa. Ces 9 gènes codent pour trois sous-familles : 2 cotransporteurs NKCC (1 et 2) ($\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ cotransporters), 4 cotransporteurs KCC (1 à 4) (K^+/Cl^- cotransporters) (Figure 16), 1 cotransporteur NCC (Na^+/Cl^- cotransporters) (Figure 15), et deux autres cotransporteurs dont les rôles sont peu connus (CIP1 et CCC9) et dont nous ne parlerons pas ici. Les CCC présentent 12 domaines transmembranaires, à l'origine de leur nom, avec de larges domaines N- et C-terminaux intracellulaires constituant pratiquement la moitié de la protéine (Mount et al., 1998; Race et al., 1999).

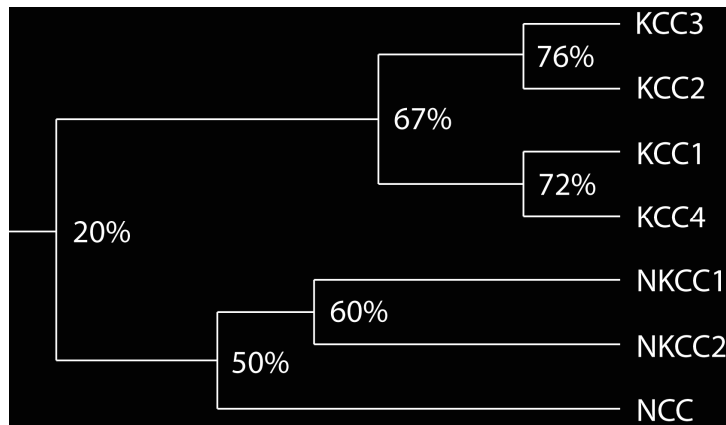


Figure 15 : Arbre phylogénétique des cotransporteurs cation-chlorure (inspiré de (Mount et al., 1999))

Les CCCs sont principalement régulés par la phosphorylation (Krarup et al., 1998), le cytosquelette (Matthews et al., 1998), les variations de concentration en magnésium intracellulaire (Lauf et al., 1992; Haas, 1994), le pH intracellulaire (Zade-Oppen and Lauf, 1990), la concentration en oxygène (Gibson et al., 1998), le niveau d'ATP (Lauf, 1983), et les variations de volume cellulaire (Lauf et al., 1992; Haas, 1994).

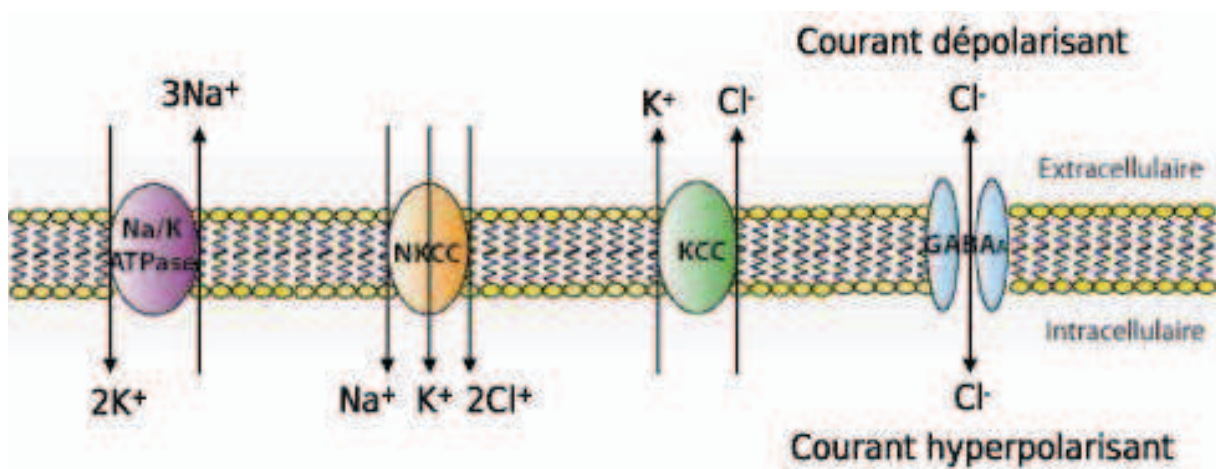


Figure 16 : Représentation schématique de l'activité neuronale des KCC et de NKCC1, dépendante de la Na^+/K^+ ATPase

(1) Les NKCC

Leur activité est basée sur l'existence de gradients électrochimiques d'ions sodiques et chlorures qui apportent une source d'énergie suffisante pour faire entrer les ions Cl^- . Ce gradient électrochimique est fourni par la sortie d'ions Na^+ générée par la pompe Na^+/K^+ ATPase. Ainsi, sous l'impulsion du sodium, les NKCC sont capable de faire entrer deux ions

Cl⁻ associés à un ion K⁺ et un ion Na⁺ (Race et al., 1999). Il existe deux types de NKCC, NKCC1 et NKCC2.

- NKCC1 (Slc12a2) (ou BSC2, *Bumetanide-sensitive cotransporter 2*) est le CCC le plus étudié au niveau moléculaire. Il intervient dans la régulation du volume cellulaire en réponse à un stress osmotique et le contrôle de l'activité excitatrice / inhibitrice par le GABA grâce à sa capacité à faire rentrer des ions Cl⁻. Sa structure ainsi que sa fonction ont été décrites dans de nombreux organismes (Xu et al., 1994). Son couplage dans les neurones centraux avec le cotransporteur KCC2 a fait l'objet de nombreuses publications en raison de leur rôle primordial dans la régulation de l'excitabilité au cours du développement et chez l'adulte.

Localisation : L'expression de NKCC1 est ubiquitaire. Il est notamment présent dans les neurones et les cellules gliales, mais également dans les cellules épithéliales du plexus choroïde et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. NKCC1 est présent dans les motoneurones à des stades embryonnaires précoces (Delpy et al., 2008), mais sa présence en post-natal est beaucoup moins évidente. En effet, son ARNm n'y est presque plus détecté à la naissance et chez l'adulte (Kanaka et al., 2001; Balakrishnan et al., 2003). Il se pourrait donc que certains marquages retrouvés sur les motoneurones ne soient en fait des marquages des afférences primaires (Stil et al., 2009), dans lesquels NKCC1 est impliqué dans le maintien d'une forte concentration intracellulaire en ions chlorures (Alvarez-Leefmans et al., 1988; Plotkin et al., 1997).

Isoformes : Chez l'homme, on connaît 2 variants d'épissage, hNKCC1a (Payne et al., 1995) et hNKCC1b avec le 1a identique à mNKCC1 (Delpire et al., 1994) à 87%. Les 2 sont ubiquitaires, mais le 1b est surtout retrouvé dans le cerveau, mais absent du plexus choroïde (Randall et al., 1997; Vibat et al., 2001). La formation d'homodimères à la surface des cellules pourrait permettre la formation de pores fonctionnels pour le transport des ions (Moore-Hoon and Turner, 2000).

Rôle : Le premier rôle mis en évidence pour NKCC1 est un rôle de régulateur du volume cellulaire au cours du phénomène de RVI (*Regulatory Volume Increase*), par sa capacité à faire entrer des ions dans la cellule. Il intervient également dans la sécrétion de sel par les épithéliums. Mais son rôle le plus étudié est lié à sa participation dans la régulation de l'homéostasie chlorure dans le SN en association avec le cotransporteur KCC2 dont nous parlerons plus loin (Payne et al., 2003). NKCC1 est fortement exprimé dans le cerveau et sa fonction d'accumulation des ions chlorures dans les neurones contribuerait à l'action

excitatrice du GABA à des stades précoces (Plotkin et al., 1997; Vardi et al., 2000; Yamada et al., 2004; Achilles et al., 2007; Delpy et al., 2008) (Cf. Paragraphe IIIB, p60). La souris NKCC1^{-/-} a permis de mettre en évidence le rôle du co-transporteur dans la maintenance d'un haut niveau de Cl⁻ dans les neurones de ganglions rachidiens dorsaux (Sung et al., 2000). En effet, chez cette souris, les auteurs ont observé une diminution significative de la [Cl⁻]_i dans les neurones sensoriels. Cette souris présente également des troubles de l'audition, de l'équilibre, de la fertilité, une augmentation du seuil de douleur à la chaleur nocive et une diminution de l'allodynie induite par l'injection de capsaïcine (Delpire et al., 1999; Laird et al., 2004). Confirmant les résultats obtenus chez la souris KO, des études ont mis en évidence un rôle anti-nociceptif des antagonistes des NKCC (Granados-Soto et al., 2005). Le rôle de NKCC1 dans les neurones sera traité plus en détail dans le chapitre IIIB.

Régulation : En ce qui concerne la régulation de NKCC1, de nombreuses études ont démontré le rôle majeur de la phosphorylation sur son activité (Galan and Cervero, 2005). Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'augmentation de la phosphorylation était associée à une mobilisation membranaire du co-transporteur. Parmi les kinases responsables de la phosphorylation de NKCC1, on trouve les protéines SPAK (*Ste20-related Proline-Alanine rich Kinase*) et OSR1 (*Oxidative Stress Response 1*) appartenant à la famille des kinases ste20. Elles sont connues pour interagir avec le domaine cytoplasmique N-terminal des CCC (Piechotta et al., 2002; Dowd and Forbush, 2003; Gagnon et al., 2006). Elles phosphorylent NKCC1 sur 3 thréonines (203, 207 et 212) (Flemmer et al., 2002; Vitari et al., 2006) (Figure 17). L'expression d'un dominant négatif de SPAK abolit l'activité de NKCC1 (Dowd and Forbush, 2003). SPAK et OSR1 présentent 66% d'homologie, dont 90% d'homologie entre leur extrémité C-terminale catalytique. SPAK subit lui-même une phosphorylation activatrice par la famille des kinases WNK (*With No Lysine*), notamment WNK1, WNK3 et WNK4. WNK3 est capable d'activer l'influx de Cl⁻ via NKCC1 (Kahle et al., 2005). WNK4 et WNK1 phosphorylent SPAK sur deux sites, une sérine en 383 et une thréonine en 243 (Moriguchi et al., 2005; Gagnon et al., 2006; Villa et al., 2007). Concernant OSR1, deux théories expliquant l'activation par WNK s'affrontent : il semble que la phosphorylation par WNK soit capable soit de faire ségréger la kinase en deux monomères actifs, soit de faire se rapprocher les monomères pour former une kinase active. Dans les deux cas, OSR1 activé peut phosphoryler à son tour le cotransporteur. L'utilisation de shRNA dirigé contre les kinases sur la lignée cellulaire 50B11, dérivée des neurones de ganglions rachidiens dorsaux, exprimant donc toutes les protéines impliquées dans notre système, a entraîné une diminution significative, de l'activité de NKCC1 (Geng et al., 2009). De plus,

selon les auteurs, la sur-expression de l'une des kinases est capable de compenser l'absence de l'autre. Notons par ailleurs qu'au cours de notre travail, nous avons utilisé un anticorps dirigé de manière spécifique contre NKCC1 phosphorylé en 212 et 217 (Flemmer et al., 2002). Même s'il semble que SPAK et OSR1 soient les kinases majeures intervenant dans la phosphorylation de NKCC1, d'autres protagonistes ne sont pas à exclure. En effet, Vitari et coll. ont publié deux sites de phosphorylation différents de ceux de SPAK et OSR1 sur les thréonines 217 et 230 (Vitari et al., 2006). De plus, Darman et Forbush ont constaté que les thréonines 212, 217 et 230 étaient phosphorylées suite à un traitement à la forskoline, activateur de l'adénylate cyclase et donc de la protéine kinase A (Darman and Forbush, 2002). Enfin, NKCC1 présente des sites consensus de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) et la caséine kinase II, mais aucun lien direct n'a encore été démontré entre ces kinases et NKCC1. Pour contrebalancer l'activation par les kinases, il existe une inactivation par la protéine phosphatase 1 (PP1) (Darman et al., 2001) (Figure 17). Selon les auteurs, non seulement PP1 est capable de déphosphoryler NKCC1 pour l'inactiver, mais elle est également capable de déphosphoryler SPAK lorsque la kinase est associée à l'extrémité N-terminale du cotransporteur.

Pathologie : Dans le SNC, avant la maturation neuronale, NKCC1 est fortement exprimé dans les neurones primaires, expliquant en partie leur forte $[Cl^-]_i$. Après la naissance son expression diminue, excepté dans les neurones sensoriels où elle reste élevée. Suite à une lésion nerveuse, il se produit le phénomène inverse, à savoir une augmentation de l'activité NKCC1 due à une augmentation de la phosphorylation du cotransporteur et non à une augmentation de son expression (van den Pol et al., 1996; Pieraut et al., 2007).

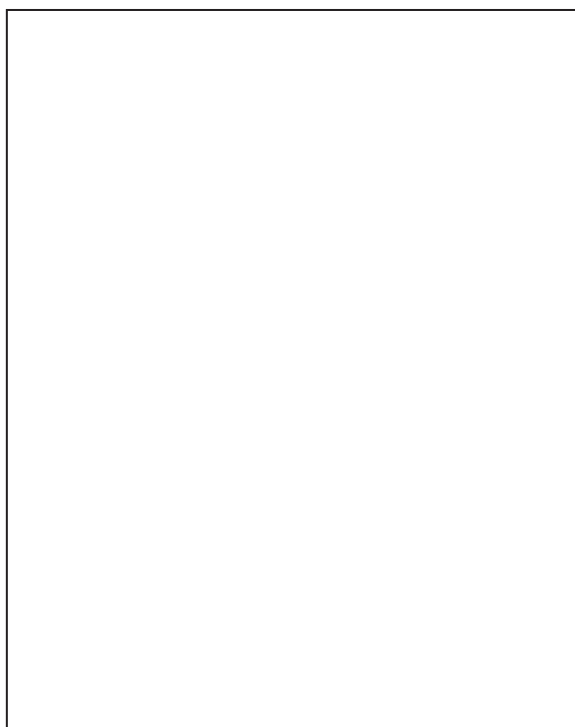


Figure 17 : Schématisation de l'extrémité N-terminale de NKCC1 avec les différents sites de phosphorylation et le site de liaison de la Protéine Phosphatase 1 (Adapté de (Flemmer et al., 2002))

- NKCC2 (Slc12a1)(ou BSC1, *Bumetanide-Sensitive Cotransporter 1*) a d'abord été caractérisé chez le rat, puis le lapin (Gamba et al., 1994; Payne and Forbush, 1994). Il est spécifique du rein où il permet la réabsorption du NaCl par la branche ascendante de l'anse de Helné. Sa mutation est responsable du syndrome de Bartter de type I, caractérisé par une hypertension artérielle.

(2) Les KCCs :

Le transport KCC a été observé pour la première fois comme un efflux de potassium activé par le gonflement osmotique au niveau des érythrocytes (Lauf et al., 1992; Cossins and Gibson, 1997). Dans des conditions physiologiques, ils font sortir le potassium et le chlorure avec une stœchiométrie de 1:1 (Lauf et al., 1992). Des études ont montré que le domaine transmembranaire 2 était impliqué dans le transport cationique (Isenring et al., 1998a) et le 4, dans le transport anionique (Isenring et al., 1998b). C'est le gradient électrochimique du potassium qui apporte l'énergie nécessaire à la sortie d'ions Cl⁻. Les KCCs ne sont pas influencés par le potentiel transmembranaire. Mis à part KCC2, le transport KCC est activé par l'hypotonie et intervient le phénomène de *Regulatory Volume Decrease (RVD)*, c'est-à-dire l'extrusion d'ions en réponse à l'hypotonie ou à l'activité neuronale, de manière à la limiter et à protéger la cellule du gonflement cellulaire (Lauf et al., 1992; Cossins and Gibson,

1997). Les différents KCCs semblent se différencier principalement par leurs segments transmembranaires et la distribution des sites de phosphorylation, bien que certains soient conservés au sein de la famille (Mount et al., 1999). En effet, contrairement à NKCC1, les KCCs sont activés par la déphosphorylation. Les KCCs sont sensibles au bumétanide, mais de manière moindre par rapport aux NKCC, et au furosémide, qui sont des *loop diuretics*. A l'heure actuelle, l'inhibiteur le plus spécifique des KCC est le DIOA (acide dihydroindenyl-oxy-alkanoïque). L'activateur spécifique des KCC est le NEM (N-éthylmaleimide).

- KCC1 (Slc12a4) : Il est retrouvé dans tous les tissus. C'est notamment le KCC majeur des érythrocytes (Pellegrino et al., 1998). hKCC1 possède 2 transcrits de 5.5 et 6-7kb (Larsen et al., 1993; Gillen et al., 1996; Liapis et al., 1998). C'est un « gène de ménage » intervenant dans la régulation du volume cellulaire et inactif en conditions isotoniques (Gillen et al., 1996; Holtzman et al., 1998). L'injection de KCC1 par Mount et coll. en 1999 dans l'oocyte de Xénope a en effet montré une augmentation de l'entrée de ^{86}Rb (X35) en condition hypotonique dépendante du chlorure extracellulaire et inhibée par le furosémide (Mount et al., 1999). Il présente une forte expression dans les neurones sensoriels (Rivera et al., 1999), mais son rôle reste encore à élucider.

- KCC2 (Slc12a5) :

Localisation : Son expression est restreinte au système nerveux. En effet, l'analyse du gène murin a permis d'identifier une séquence de 21pb correspondant à une séquence consensus NRSE (*Neuronal Restrictive Silencing Element*) dans l'exon 1. Cette séquence permettrait l'expression neurone-spécifique de KCC2 (Karadsheh and Delpire, 2001). Dans les cellules non-neuronales, le facteur de transcription NRSF (ou REST) réprime la transcription du gène en se fixant sur la NRSE, alors que dans les cellules neuronales, l'absence de ce facteur de transcription autorise la transcription du gène et potentiellement l'expression de la protéine. Néanmoins, d'autres éléments semblent entrer en jeu pour assurer l'expression neuronale de KCC2 puisque l'ablation de la séquence NRSE n'empêche pas l'expression de KCC2 dans les neurones (Uvarov et al., 2005). Si l'on s'intéresse de plus près aux neurones sensitifs, la plupart des auteurs ont détecté un niveau faible, voire nul, de KCC2 dans les neurones de GRD (Rivera et al., 1999; Coull et al., 2003; Stein et al., 2004; Gilbert et al., 2007).

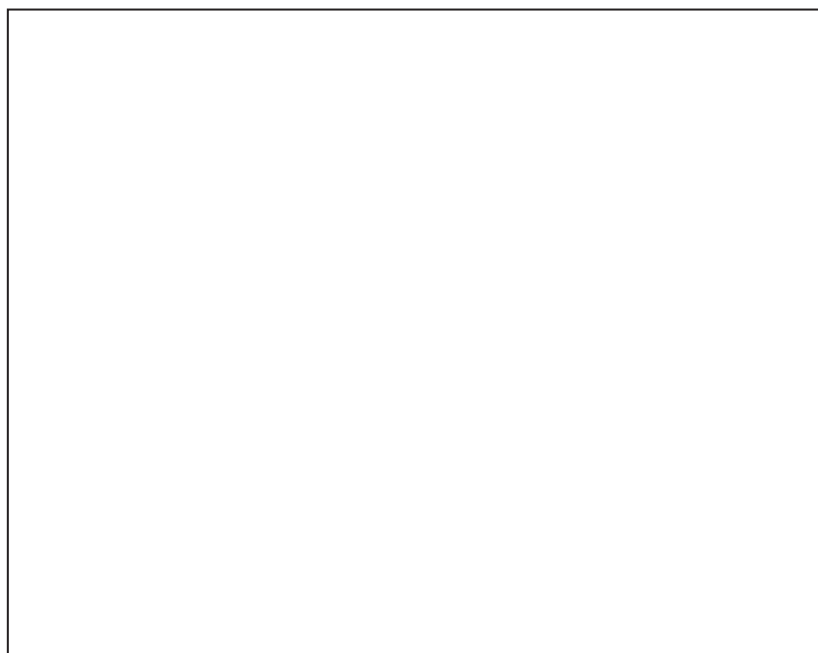


Figure 18 : Schématisation de la structure de KCC2 (adapté de (Payne et al., 1996)

Régulation : La présence en C-terminal d'un motif PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) lui permet d'être actif en conditions isotoniques (Mercado et al., 2006). Une étude basée sur l'expression ectopique de KCC2 dans les HEK-293 a montré que ce cotransporteur était insensible au gonflement cellulaire (Payne, 1997). Différents facteurs comme le BDNF (Rivera et al., 2002; Aguado et al., 2003; Rivera et al., 2004; Boulenguez et al., 2010), l'oestradiol et la testostérone (Galanopoulou and Moshe, 2003), des facteurs d'expression neuronale (Karadsheh and Delpire, 2001; Uvarov et al., 2005) et d'autres, régulent l'expression de KCC2. L'activité GABAergique est également capable de moduler le niveau d'expression de KCC2, ce qui permet de limiter la fenêtre de réponse dépolarisante durant la première semaine post-natale (Ganguly et al., 2001). En parallèle, le blocage chronique des canaux GABA_A entraîne un décalage du switch en empêchant l'up-régulation de KCC2 (Fiumelli and Woodin, 2007). Le contrôle par les neurones supra-spinaux semble être un paramètre important dans la régulation de KCC2. En effet, les projections sérotoninergiques, modifient l'activité des motoneurones lombaires, en activant le switch hyperpolarisant, sans doute via des modifications d'expression de KCC2 (Jean-Xavier et al., 2006). Bien que des modifications de son expression soient le plus souvent retrouvées après traumatisme, certaines pertes de fonction sont trop rapides pour être compatible avec cette seule explication (Fiumelli et al., 2005). D'autres mécanismes, comme des modifications post-traductionnelles sont impliqués dans la régulation de l'activité KCC2. En effet, la co-expression d'un mutant de SPAK, catalytiquement inactif, avec KCC2 stimule l'activité du cotransporteur (Gagnon et

al., 2006). Il apparaît que KCC2 est, au même titre que NKCC1, régulé par des mécanismes de phosphorylation / déphosphorylation, mais de manière inverse. Enfin, il a été démontré que WNK3, permettant comme nous l'avons vu la phosphorylation de NKCC1 par SPAK, est un inhibiteur de KCC2 (Kahle et al., 2005).

Rôle : Dans le SNC, il y joue, aux côtés de NKCC1, un rôle important dans la régulation du gradient chlorure transmembranaire, et donc, dans la réponse neuronale au GABA, grâce à sa capacité à faire sortir les ions Cl^- (Lu et al., 1999; Rivera et al., 1999). L'augmentation de son expression au cours de la période périnatal (Rivera et al., 1999) permet notamment le phénomène de « switch chlorure », c'est-à-dire la forte diminution de la $[\text{Cl}^-]_i$ après la naissance. L'ARNm de KCC2 est détectable dans la moelle épinière dès E10.5 et son expression augmente au cours des 15 premiers jours après la naissance. Une expression précoce au cours du développement rend le GABA hyperpolarisant par une diminution prématurée du Cl^- intracellulaire (Chudotvorova et al., 2005; Fiumelli et al., 2005; Cancedda et al., 2007). A l'inverse, Stein et coll. ont montré que l'inhibition de KCC2 empêchait le shift du potentiel d'inversion du courant GABA (E_{GABA}) au cours de la deuxième semaine post-natal dans des neurones d'hippocampe en culture (Stein et al., 2004). A la fin de cette période, le niveau d'expression de KCC2 est le même que chez l'adulte. Comme nous le verrons par la suite (paragraphe IIIB.4), la diminution d'expression de KCC2 permet l'augmentation de la $[\text{Cl}^-]_i$ en réponse à un traumatisme (Nabekura et al., 2002; Coull et al., 2003).

Pathologie : Peu de mutations lui sont connues. En effet, un défaut d'activité KCC2 mène à une létalité embryonnaire, comme ce qui est observé chez la souris $\text{KCC2}^{-/-}$ (Hubner et al., 2001). Néanmoins, l'étude de la souris mutante KCC2, présentant 8-20% d'expression par rapport à la WT, a permis de mieux comprendre son rôle, par exemple dans la genèse des activités spontanées au cours du développement post-natal (Stil et al., 2011)

- KCC3 (Slc12a6) : Ce cotransporteur a été mis en évidence en 1999 par trois équipes (Hiki et al., 1999; Mount et al., 1999; Race et al., 1999). Il présente 70 à 80% d'homologie avec les autres KCC.

Localisation : KCC3 est retrouvé dans les cellules vasculaires endothéliales, le placenta, le foie, le poumon, le cœur, le muscle squelettique et le rein, le cerveau, la moelle épinière et les ganglions rachidiens dorsaux (Mount et al., 1999; Howard et al., 2002; Boettger et al., 2003; Byun and Delpire, 2007; Gilbert et al., 2007). Le gène Slc12a6, situé sur le chromosome 15, donne lieu à un épissage alternatif au niveau de l'exon 1, aboutissant à 2 protéines, KCC3a, long de 1150 acides aminés et KCC3b, long de 1099 acides aminés et

essentiellement retrouvé dans le rein, au niveau du tube ascendant intermédiaire. Dans le cerveau, KCC3 semble exprimé par les neurones. Son expression par les cellules gliales est encore difficile à déterminer. En effet, bien qu'il soit co-exprimé dans le cerveau avec un marqueur d'oligodendrocytes (Delpire and Mount, 2002), d'autres auteurs ne l'ont pas observé dans la glie du cerveau, de la moelle épinière et des GRD (Boettger et al., 2003; Byun and Delpire, 2007). Selon Pearson et coll., il serait associé à la gaine de myéline entourant les axones (Pearson et al., 2001). Dans la moelle épinière, KCC3 semble exprimé dans les motoneurones (Boettger et al., 2003; Byun and Delpire, 2007), ce qui ne serait pas étonnant, puisque la souris $KCC3^{-/-}$, dont nous parlerons plus loin présente une atteinte motrice notable. Enfin, dans les corps cellulaires des neurones sensitifs, KCC3 est retrouvé au niveau de la membrane plasmique et en intracellulaire (Byun and Delpire, 2007), alors que son ARNm n'est présent qu'entre P2 et P14 dans le nerf sciatique (Byun and Delpire, 2007).

Régulation : Il est encore difficile d'affirmer avec exactitude que KCC3 est régulé par le gonflement hypotonique. En effet, certains auteurs pensent que c'est le cas (Mount et al., 1999; Race et al., 1999), alors que d'autres non (Hiki et al., 1999; Shen et al., 2001). KCC3 présente des sites de phosphorylation communs avec KCC2 au niveau des tyrosines 1087 et 1054 (Mount et al., 1999). Rinehart et coll. ont montré qu'il existe 5 sites de phosphorylation sur KCC3, dont deux sont phosphorylés par WNK en conditions isotoniques et déphosphorylés par PP1 et/ou PP2 en conditions d'hypotonie (Rinehart et al., 2009). Les auteurs ont également montré que cette déphosphorylation permet d'augmenter l'adressage de KCC3 à la membrane. WNK4 fait partie des kinases régulant les KCC, et plus particulièrement KCC3 (Garzon-Muvdi et al., 2007). Elle n'est cependant pas la seule, puisque la PKC, SPAK et OSR1 sont également connus pour réguler KCC3 (Mount et al., 1999; Piechotta et al., 2002). L'étude de son extrémité C-terminale a montré que cette portion de la protéine permettait l'interaction et l'activation de KCC3 par la créatine kinase B (Salin-Cantegrel et al., 2008). Enfin, concernant les kinases, une étude de 2003 a mis en évidence une régulation de KCC3 par le protoxyde d'azote (NO), via la voie PKG (Di Fulvio et al., 2003). Il est régulé par le VEGF dans les cellules vasculaires endothéliales, phénomène prenant une grande importance au cours de la néo-vascularisation tumorale (Hiki et al., 1999). L'étude des neurones de l'hippocampe a permis de mettre en évidence son pattern d'expression développemental. KCC3, trouvé en faible quantité dans le cerveau à la naissance, voit son expression multipliée par 30 chez l'adulte (Pearson et al., 2001), ce qui sous-tend un rôle prépondérant dans ces neurones après la naissance et/ou uniquement chez l'adulte.

Rôle : Les rôles de KCC3 sont nombreux : réabsorption du K^+ dans le plexus choroïde, développement et maintien de l'audition (cochlée), régulation de la pression artérielle, ... et, ce qui nous concerne plus particulièrement, contrôle de l'homéostasie chlorure dans les neurones du cervelet, où il régule l'activité GABAergique dans les cellules de Purkinje (Boettger et al., 2003). En effet, grâce à des enregistrements en patch perforé, les auteurs ont montré que le GABA est moins hyperpolarisant en l'absence de KCC3. Une étude plus récente a également démontré le rôle de KCC3 dans la propagation du potentiel d'action le long du nerf périphérique (Sun et al., 2010). KCC3 jouerait donc un rôle dans le contrôle de l'activité électrique neuronale, ainsi que dans la propagation des signaux.

Pathologie : Chez l'homme, le locus KCC3 est associé à des épilepsies idiopathiques (Delpire and Mount, 2002). Il est également en cause dans certains troubles bipolaires, ainsi que dans des cas de schizophrénie et d'autisme... Toutes les mutations pathogènes connues de KCC3 mènent à une coupure plus ou moins importante de l'extrémité C-terminale. Parmi les mutations de KCC3 responsables de pathologies humaines, on trouve celles conduisant à la polyneuropathie sensitivomotrice avec agénésie du corps calleux (ACCPN, *Agenesis of the Corpus Callosum associated with Peripheral Neuropathy*), ou syndrome d'Andermann. C'est le premier désordre neuro-développemental du système nerveux central causé par un défaut de transport d'ions. En plus de l'aréflexie, du retard mental et de l'agénèse plus ou moins complète du corps calleux, cette maladie présente de nombreux symptômes, comme une amyotrophie, une scoliose, des caractéristiques morphologiques (hypertélorisme, un maxillaire hypoplasique, un menton proéminent, un front étroit, de grandes oreilles, une syndactylie, une brachycéphalie...), un retard psychomoteur et un trouble bipolaire (Howard et al., 2002; Meyer et al., 2005; Uyanik et al., 2006). Les premiers signes cliniques de cette maladie apparaissent durant la première année de vie. Des EEG épileptiformes sont également retrouvés chez des patients présentant une mutation de KCC3 (Boettger et al., 2003).

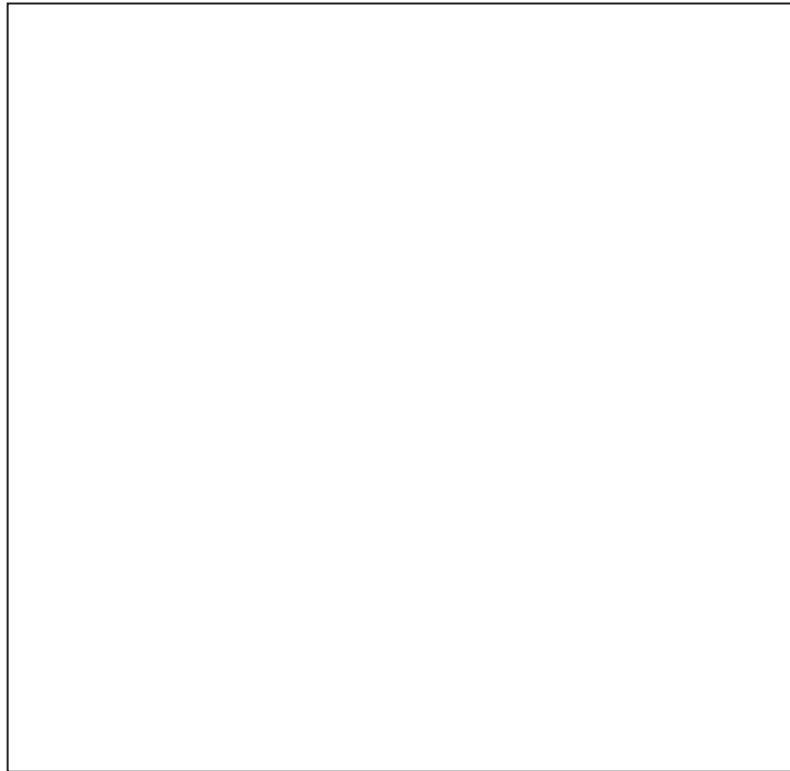


Figure 19 : Schématisation de KCC3 avec les différentes mutations répertoriées ainsi que les sites de phosphorylation (Adapté de (Galanopoulou, 2010))

Pour mieux comprendre les conséquences de ces mutations, deux souris knock-out pour KCC3 ont été créées (Howard et al., 2002; Boettger et al., 2003). Ces souris montrent des déficits de locomotion, une hypomyélinisation et un gonflement axonal des nerfs périphériques à partir de deux semaines après la naissance (Howard et al., 2002; Boettger et al., 2003; Byun and Delpire, 2007). Néanmoins, seule la souris du Dr Jentsch présente une atteinte centrale, au niveau de l'hippocampe et du cervelet, mais sans atteinte du corps calleux. Ils ont également observé une perte d'audition chez ces souris, due à des défauts de régulation ionique et volumique par les cellules ciliées de la cochlée (Boettger et al., 2003). Enfin, ils ont mis en évidence une augmentation de la concentration en Cl^- intracellulaire et un shift des réponses GABAergiques vers des valeurs plus hyperpolarisées dans les neurones du cervelet. Ceci prouve que KCC3 intervient dans le contrôle de l'homéostasie chlorure dans ces neurones. De plus, la diminution de la vitesse de conduction des motoneurones observée par Byun et coll. montre un rôle de KCC3 dans les motoneurones (Byun and Delpire, 2007). Bien que certaines études aient démontré la présence de KCC3 dans les cellules gliales, l'atteinte observée chez la souris serait principalement neuronale et non gliale (Boettger et al., 2003). Selon les auteurs, KCC3 pourrait jouer le même rôle que KCC2 sur la régulation de la $[\text{Cl}^-]_i$ et donc sur les effets du GABA.

- KCC4 (Slc12a7) : Tout comme KCC1, KCC4 est exprimé dans de nombreux tissus. Néanmoins, c'est dans le rein et la cochlée qu'il semble jouer un rôle plus important. Il permet le transport des ions potassiques et chlorures au travers des membranes épithéliales du tube proximal. D'ailleurs, la souris KCC4^{-/-} présente un défaut des sécrétions acides par les cellules intercalaires (Boettger et al., 2002). Dans la cochlée, l'absence de KCC4 est responsable d'une surdité liée au manque d'absorption du potassium par les cellules de Deiter, provoquant une dégénérescence des cellules externes de la cochlée (Boettger et al., 2002).

(3) Les NCC :

Jusqu'à présent (1999), un seul NCC est connu. Il est inhibé par les diurétiques dérivés des thiazides. Sa structure a été découverte dans la vessie (Gamba et al., 1993), puis dans le cortex rénal (Gamba et al., 1994). Il permet la réabsorption du NaCl. Chez les mammifères, NCC est surtout exprimé au niveau de la membrane apicale rénale.

c) Autres transporteurs de la famille slc:

On trouve parmi eux les familles de slc26 et des slc4. Elles interviennent dans la régulation du pH intracellulaire en transportant les ions chlorures couplés aux ions bicarbonates HCO₃⁻. De part leur expression principalement rénale, peu de choses sont connues sur leur rôle dans les neurones. Au sein de la famille slc4, slc4a10 intervient dans le contrôle de l'excitabilité des neurones hippocampaux (Jacobs et al., 2008). La prestine, ou slc26a5, permet la détection des variations de voltage dans les cellules ciliées externes de l'organe de Corti (Rybalchenko and Santos-Sacchi, 2008).

B. Rôle de l'homéostasie chlorure dans le système nerveux

Dans le système nerveux central, il existe une balance entre l'activité et l'inhibition d'activité. Cette régulation est permise grâce à deux neurotransmetteurs majeurs que sont le glutamate et le GABA (et glycine). Le glutamate peut se fixer sur des récepteurs ionotropiques, comme les récepteurs NMDA, AMPA et kainate, et activer l'entrée d'ions Ca²⁺ et Na⁺. La dépolarisation ainsi obtenue est appelée potentiel post-synaptique excitateur (PPSE). En parallèle, le GABA se fixe sur son récepteur GABA_A, perméable comme nous l'avons vu aux ions Cl⁻. Après fixation coopérative de deux molécules de GABA, un

changement de conformation du récepteur est transmis au pore qui le fait passer d'un état fermé vers un état ouvert, ce qui a pour conséquence de le rendre perméable aux ions chlorures. Le passage de ces ions dépend de leur gradient électrochimique. Quand leur concentration intracellulaire est faible, l'ouverture de GABA_A fait entrer les ions Cl⁻, entraînant une hyperpolarisation. Lorsqu'elle est élevée, c'est une sortie dépolarisante d'ions Cl⁻ qui se produit. Dans certaines conditions, physiologiques ou pathologiques, l'homéostasie chlorure peut être modifiée, déplaçant le potentiel d'inversion des ions chlorures (E_{rev} ou E_{GABA} ou E_{Cl}) (potentiel pour lequel aucun mouvement passif n'est possible). Ceci entraîne une inversion de l'activité du GABA associée à une modification de l'activité électrique neuronale.

1. Homéostasie chlorure et développement

Le rôle de l'homéostasie chlorure au cours du développement a été très étudié, notamment dans le système nerveux central. Au cours du développement, l'activité excitatrice du GABA permet la mise en place de nombreux processus physiologiques comme la prolifération ou la différenciation neuronale, la migration des cellules, l'arborisation neuritique... Un des éléments majeurs de la transmission GABAergique est le « switch développemental » (Figure 20). En effet, la réponse médiée par les récepteurs GABA_A peut être, soit dépolarisante, soit hyperpolarisante, en fonction de la concentration intracellulaire en ions chlorures. Chez les mammifères, dans le système nerveux central, NKCC1 et KCC2 sont connus pour réguler la $[Cl^-]_i$ (Uvarov et al., 2007). De nombreuses publications ont démontré l'expression réciproque de ces deux cotransporteurs pendant le développement post-natal (Plotkin et al., 1997; Kanaka et al., 2001; Li et al., 2002; Shimizu-Okabe et al., 2007; Lee et al., 2010a). Durant les premiers stades du développement et jusqu'à la 2^{ème} semaine post-natale, l'expression préférentielle de NKCC1, dont l'ARNm est détectable dès E12.5, a pour conséquence une $[Cl^-]_i$ élevée (25-30mM), produisant une dépolarisation membranaire en réponse au GABA (Plotkin et al., 1997), menant à une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺ (Hales et al., 1994; Leinekugel et al., 1995; Obrietan and van den Pol, 1995; Owens et al., 1996). Suivant le tissu, l'expression de NKCC1 diminue, voire disparaît au cours du développement (Kanaka et al., 2001; Wang et al., 2002). Lee et al., en 2010 ont montré que les régulations épigénétiques par méthylation de l'ADN et acétylation des histones intervenaient dans la régulation de l'expression de NKCC1 durant le développement post-natal (Lee et al., 2010a). Quant à KCC2, en fonction de la localisation, son ARNm est

retrouvé plus ou moins tôt au cours du développement (Li et al., 2002), mais son expression augmente dans bon nombre de zones du cerveau (cortex, hippocampe), ainsi que dans les motoneurones, durant 1 mois après la naissance (Lu et al., 1999; Rivera et al., 1999; Hubner et al., 2001; Li et al., 2002; Wang et al., 2002; Stil et al., 2009). Ainsi donc, la diminution d'activité de NKCC1 associée à l'augmentation de KCC2 font diminuer la $[Cl^-]_i$ (10mM) rendant le GABA hyperpolarisant (Rivera et al., 1999; Payne et al., 2003). Plusieurs études ont montré que l'expression de KCC2 était entre autre régulée par le BDNF (Aguado et al., 2003; Rivera et al., 2004; Carmona et al., 2006; Ludwig et al., 2011). Cette régulation est différente entre le développement, où le BDNF induit une augmentation de l'expression de KCC2 (Aguado et al., 2003; Wardle and Poo, 2003; Coull et al., 2005) et l'adulte, où la neurotrophine est responsable d'une diminution de son expression (Rivera et al., 2002; Ludwig et al., 2011). De plus, le GABA lui-même, ainsi que l'activité synaptique, sont capables d'augmenter d'expression de KCC2 après la naissance (Ganguly et al., 2001).

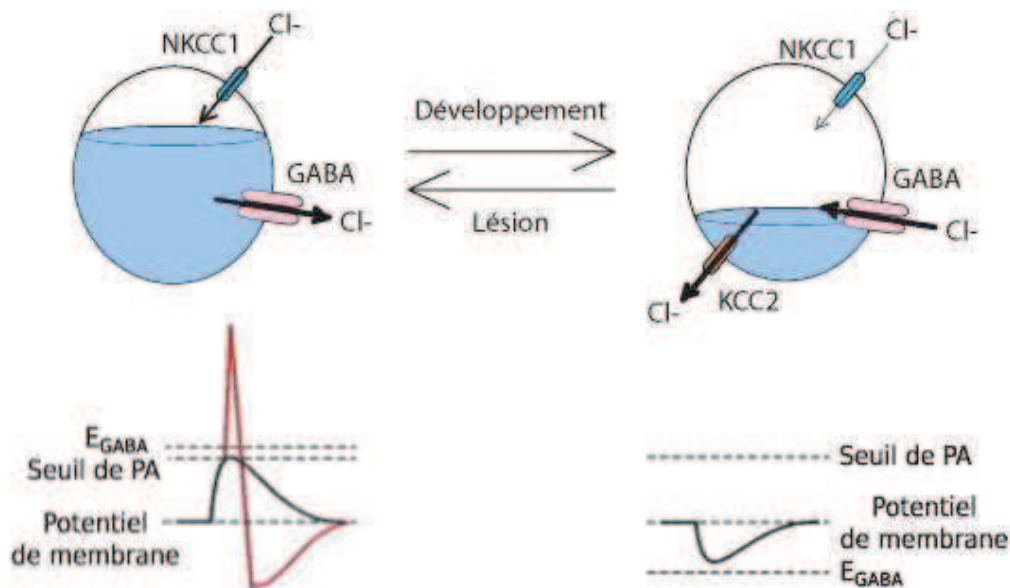


Figure 20 : Régulation de l'homéostasie chlorure au cours du développement et chez le neurone adulte dans le SNC

En raison des résistances membranaires élevées chez l'embryon, l'ouverture d'un seul canal GABA_A est capable de générer un potentiel d'action (Serafini et al., 1995). La dépolarisation induite par l'activation des récepteur GABA_A peut entraîner l'entrée de calcium via les canaux calciques voltage-dépendants. Ceci permet de supprimer le blocage des canaux NMDA par le magnésium et donc d'augmenter l'entrée de Ca²⁺ (Leinekugel et al.,

1995) (Figure 21). L'expression différentielle des canaux NMDA chez l'embryon et chez l'adulte en fait un composant majeur de l'activité des réseaux neuronaux en développement.



Figure 21 : Mécanisme d'activation des canaux NMDA par les canaux GABA_A (adapté de (Ben-Ari, 2002))

Bien évidemment, le système est plus complexe qu'il n'y paraît. En effet, « dépolarisation » ne signifie pas obligatoirement « genèse d'un potentiel d'action ». Cette dépolarisation peut aboutir à l'inactivation des conductances sodiques par un mécanisme de « shunt » (Zhang and Jackson, 1995). Le GABA peut donc jouer le rôle d'inhibiteur et d'excitateur dans les neurones immatures.

Dans les GRD, trois d'études ont été conduites sur l'homéostasie chlorure au cours du développement (Gilbert et al., 2007; Rocha-Gonzalez et al., 2008; Chabwine et al., 2009). Seule l'étude de Gilbert et coll., qui utilise une technique d'imagerie chlorure utilisant le MQAE (*N-6-meth-oxyquinolinium acteoethylester*), postule clairement qu'il y aurait un shift de la concentration intracellulaire en ions chlorure entre la première semaine post-natal et l'âge adulte. Ils n'ont pas mis en évidence de modifications d'expression des différents CCC entre le post-natal et l'adulte. Ils attribuent donc leurs résultats à des modifications post-traductionnelles. Toutes ces études s'accordent à dire que NKCC1 est le co-transporteur principal permettant l'accumulation intracellulaire d'ions chlorures.

2. Homéostasie chlorure et parturition

La parturition est connue pour être un moment traumatisant pour le nouveau né et peut entraîner des dommages neuronaux liés à l'anoxie. Tysio et coll. ont montré que la sécrétion

d'ocytocine par la mère au moment du travail, permet une protection contre le stress du nouveau né, en rendant le GABA inhibiteur (Tyzio et al., 2006). Ceci est dû à une chute brutale et transitoire de la concentration intracellulaire en ions Cl^- au niveau de l'hippocampe. Selon les auteurs, l'ocytocine interviendrait en inhibant l'activité de NKCC1.

3. Homéostasie chlorure chez l'adulte

Dans le SNC adulte, l'activité neuronale est contrôlée par le glutamate et le GABA. Le premier est excitateur grâce à son action sur les récepteurs ionotropiques AMPA et NMDA, perméables au sodium, potassium et calcium. L'entrée de cation par ces canaux provoque l'apparition de potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE). En parallèle, le GABA, comme nous venons de le voir, possède une activité hyperpolarisante sur les neurones. Grâce au shift chlorure, la $[\text{Cl}^-]_i$ est passée de 30mM à 5-10mM, ce qui permet une entrée d'ions chlorures via les récepteurs-canaux GABA_A et la genèse de potentiel post-synaptiques inhibiteurs (PPSI). C'est par l'intermédiaire du GABA que les interneurons inhibiteurs régulent l'activité neuronale.

Dans les GRD, les neurones sensitifs adultes présentent une $[\text{Cl}^-]_i$ de l'ordre de 30mM, bien supérieure à celle retrouvée dans les neurones centraux (Sung et al., 2000; Gilbert et al., 2007; Pieraut et al., 2007). En raison de cette forte $[\text{Cl}^-]_i$, l'ouverture des canaux GABA_A et GlyR entraîne une légère sortie d'ions Cl^- , associée à une dépolarisation membranaire du soma (Desarmenien et al., 1984), des fibres périphériques (Ault and Hildebrand, 1994) et des fibres centrales projetant dans la corne dorsale de la moelle épinière (Curtis and Lodge, 1982). Cette dépolarisation conduit à l'inactivation partielle des canaux sodiques et calciques sensibles au voltage. C'est ce que l'on appelle la dépolarisation afférente primaire (PAD, *Primary Afferent Depolarisation*).

4. Homéostasie chlorure et traumatisme

Certaines conditions pathologiques entraînant des dommages neuronaux, comme l'inflammation, l'axotomie, l'ischémie ou l'excitotoxicité peuvent modifier la $[\text{Cl}^-]_i$, même dans des neurones matures (Rivera et al., 2004; Pond et al., 2006; Pieraut et al., 2007). D'une façon générale il y a, soit une perte de l'effet inhibiteur (mort de neurones GABAergiques) (Moore et al., 2002), soit une inversion de l'inhibition vers l'excitation. L'augmentation de la $[\text{Cl}^-]_i$ dans les neurones centraux a fait l'objet de nombreuses publications. Il est également

apparu que la $[Cl^-]_i$ des neurones périphériques peut être augmentée suite à un traumatisme nerveux (Pieraut et al., 2007). Cette augmentation de l'homéostasie chlorure est cruciale pour permettre une amélioration de la vitesse de pousse des neurones.

D'autres auteurs ont également mis en évidence une modification de la $[Cl^-]_i$ dans les motoneurones suite à une lésion du nerf vague ou du nerf facial (Nabekura et al., 2002; Toyoda et al., 2003). Dans le système nerveux central, de tels changements résultent majoritairement de la diminution d'expression de KCC2, responsable de la spasticité (Nabekura et al., 2002; Wake et al., 2007; Boulenguez et al., 2010). Certaines études ont montré que la lésion nerveuse ne modifie pas l'expression de NKCC1 (Nabekura et al., 2002; Galeffi et al., 2004), alors que d'autres montrent une sur-expression (Pond et al., 2006; Shimizu-Okabe et al., 2007). Plus récemment, il a été démontré que l'ischémie augmente l'expression de l'ARNm de NKCC1 via des jeux de méthylation de l'ADN (Lee et al., 2010a). Enfin, comme nous l'avons vu précédemment (paragraphe III.A.2.b)(1)), l'activité de NKCC1 dépend de régulations post-traductionnelles via des jeux de phosphorylation / déphosphorylation. Néanmoins, les mécanismes de régulation développementale et physiopathologique de leur expression ainsi que de leur activité restent peu connus.

5. Homéostasie chlorure et douleur

Au niveau de la moelle épinière, il existe un mécanisme permettant de filtrer les informations provenant de la périphérie avant qu'elles n'atteignent le cerveau ou ne retournent à la périphérie : c'est l'inhibition pré-synaptique. Une des hypothèses expliquant cette inhibition est la théorie du « *gate control* » (Melzack and Wall, 1965).

Théorie du «gate control» :

Les fibres mécanocéptives A β de grand diamètre et myélinisées peuvent antagoniser les entrées afférentes primaires nociceptives de la corne dorsal via un mécanisme d'inhibition par les interneurones GABAergiques (Figure 22). C'est la dépolarisation afférente primaire (PAD, *Primary Afferent Depolarisation*). C'est un barrage d'impulsions dans les afférences primaires entraînant une dépolarisation dans les autres afférences primaires de la moelle épinière. Les PAD diminuent l'amplitude des PA en approche et diminuent la libération d'acides aminés excitateurs. Ceci explique l'inhibition pré-synaptique au niveau des terminaisons centrales des afférences primaires, premier relai au niveau de la moelle épinière.

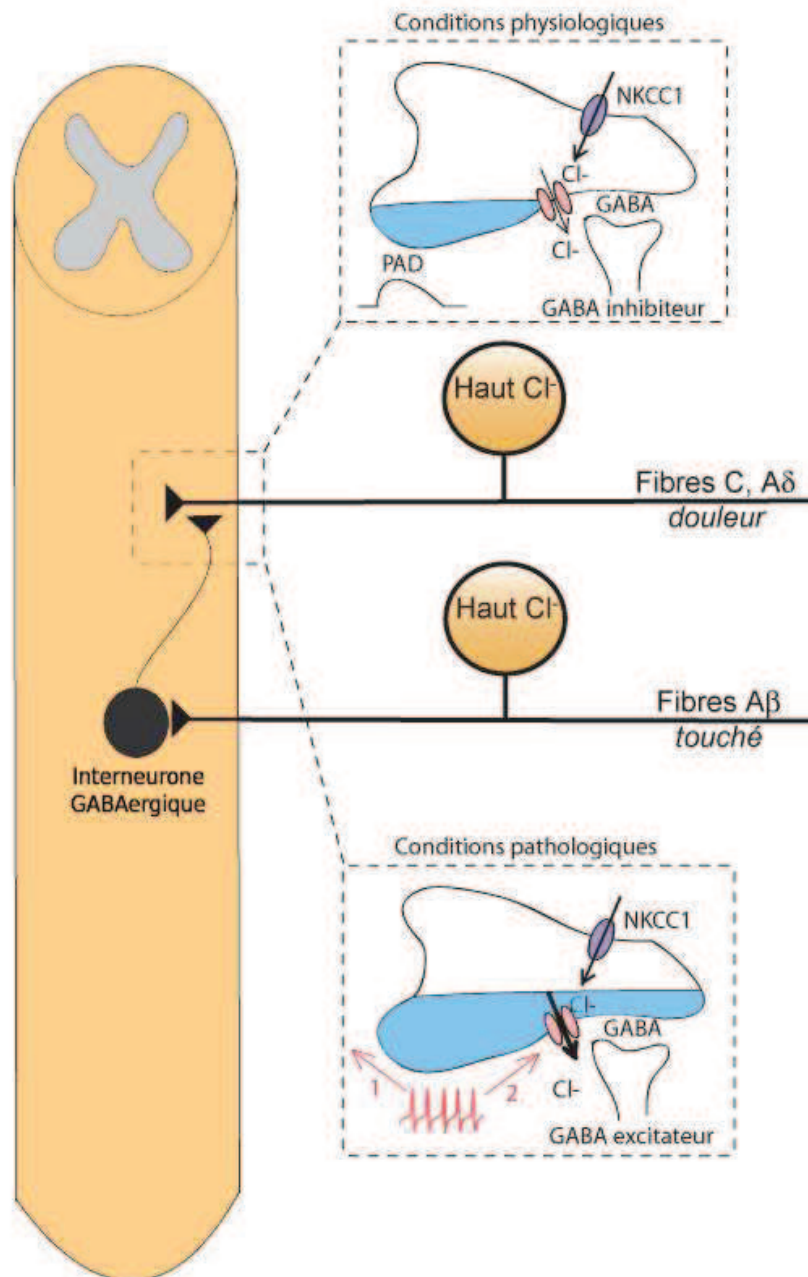


Figure 22 : Schématisation de la théorie du "gate control" et conséquences de la lésion nerveuse

Dans des conditions normales, la dépolarisation des afférences primaires C et A δ par les fibres A β mène à une inhibition des fibres nociceptives. En cas d'inflammation, les PAD seraient augmentés et entraîneraient une dépolarisation excessive et persistante des fibres C et A δ au dessus de leur seuil de PA (Figure 22). En effet, de manière similaire à ce qui se produit au cours du développement, l'augmentation des PAD permettrait une dépolarisation post-synaptique suffisante pour activer les récepteurs NMDA et provoquer la génération des potentiel d'action ortho- et antidromiques (Figure 21) (Pour revue : (Delpire and Austin, 2010). La propagation antidromique du PA (notée 2 sur la Figure 22), appelée « réflexe des

racines dorsales » (DRR, *Dorsal Root Reflex*) est responsable de la douleur dite neurogénique. La propagation orthodromique (notée 1 sur la Figure 22), quant à elle, induit des entrées des fibres A β dans la voie nociceptive, et pourrait être le mécanisme à l'origine de l'allodynie mécanique. Les récepteurs NMDA semblent jouer un rôle prépondérant dans ce mécanisme. De plus, l'injection intradermique de capsaïcine chez la souris NKCC1^{-/-} montre une réduction de l'allodynie par rapport aux souris sauvages (Laird et al., 2004). NKCC1 est donc effectivement impliqué dans les mécanismes de douleur et l'apparition du réflexe de racines dorsale.

Il existe dans la moelle un deuxième niveau d'inhibition, proche de l'inhibition pré-synaptique. C'est l'inhibition post-synaptique, également permise par les interneurons inhibiteurs. Ces derniers, en réponse à la stimulation par les fibres A β , libèrent du GABA sur les neurones spinaux produisant une hyperpolarisation membranaire. Celle-ci est due à l'activité prépondérante de KCC2 dans ces neurones qui diminue la [Cl]⁻_i.

En l'absence de lésion, l'administration dans la moelle épinière d'antagonistes des récepteurs GABA_A et GlyR entraînent une hypersensibilité similaire à celle observée après lésion nerveuse. Ceci est dû à une diminution des courants post-synaptiques inhibiteurs dans les neurones de la corne dorsale. Bien que cette théorie soit contredite (Polgar et al., 2005), Moore et coll. ont émis l'hypothèse d'une mort des interneurons inhibiteurs suite à la lésion (Moore et al., 2002).

La désinhibition semble également être liée à une modulation de la signalisation glycinergique (Harvey et al., 2004). En effet, la lésion spinale induit une libération de la prostaglandine PGE2 qui agit sur son récepteur EP2, exprimés par les interneurons excitateurs et les neurones de projection dans la corne dorsale superficielle. L'activation de la voie AMPc-PKA par ces récepteurs serait à l'origine de la phosphorylation de la sous-unité GlyR α 3 du récepteur à la glycine, rendant les neurones insensibles au ligand.

IV. Problématique

Mon travail de thèse a donc porté sur deux points. Tout d'abord, nous avons étudié une voie de signalisation impliquée dans la balance de l'homéostasie chlorure neuronale après lésion. Partant du principe que l'interleukine 6 intervient dans la régulation post-traumatique de l'homéostasie chlorure neuronale, et que d'autre part, le co-transporteur cation-chlorure NKCC1 est responsable de l'augmentation de la [Cl]⁻_i dans les neurones sensitifs axotomisés, nous avons voulu déterminer si l'IL6 permettait l'activation de NKCC1 après lésion nerveuse

périphérique, et si oui, par quelle voie de signalisation. La seconde partie de mon travail a été d'étudier le rôle de KCC3 dans la régulation de l'homéostasie chlorure de ces mêmes neurones au cours du développement et chez l'adulte. En effet, l'existence d'une pathologie sensorimotrice liée à KCC3 (le syndrome d'Andermann) fait de ce co-transporteur un régulateur clé dans la physiologie neuronale. De plus, la souris KCC3^{-/-} présente, elle aussi, un phénotype sensorimoteur dès la période post-natale et continuant chez l'adulte. Selon certains auteurs le phénotype murin observé ne serait pas lié aux cellules gliales, mais plutôt aux neurones. Par des approches principalement électrophysiologiques et immunohistochimiques, nous avons donc cherché à comprendre le rôle de KCC3 dans la mise en place et le fonctionnement du système nerveux périphérique.

MATERIEL ET METHODES

I. Animaux et modèles d'étude

Pour le projet KCC3, les animaux utilisés sont des souris de la souche C57/Bl6. Pour le projet IL6, les animaux utilisés sont des souris SWISS et C57/Bl6. Elles sont hébergées dans une animalerie conventionnelle à température ambiante de 19-21°C et hydrométrie contrôlée. Elles sont manipulées selon les règles en vigueur du comité d'éthique français.

A. Lignée KCC3

Cette lignée a été créée par l'équipe du Docteur Eric Delpire (Nashville, Tennessee, USA) (Howard et al., 2002) selon la construction décrite Figure 23.



Figure 23 : Construction de la souris KCC3-KO (Howard et al., 2002)

Brièvement, au moyen d'enzymes de restriction, une cassette LacZ, codant pour l'enzyme bactérienne β -galactosidase a été intégrée dans l'exon 3 du gène codant pour la protéine KCC3. De cette manière, non seulement les cellules KCC3 n'expriment plus la protéine, mais en plus, le gène rapporteur β -gal permet de les mettre en évidence. L'accouplement des souris hétérozygotes KCC3^{+/-} permet d'obtenir des individus KO, mais également des WT, qui servent de contrôle dans toute cette étude, afin de s'affranchir de tout problème de dérive du génome et donc toute différence non liée à l'absence de KCC3.

B. Lignée Il6^{-/-}

Cette lignée, fournie par S. Hopkins et R. Grencis (University of Manchester, UK) (Kopf et al., 1994). Chez cette souris, une cassette néo est intégrée dans l'exon 2, correspondant au premier exon codant (Figure 24).

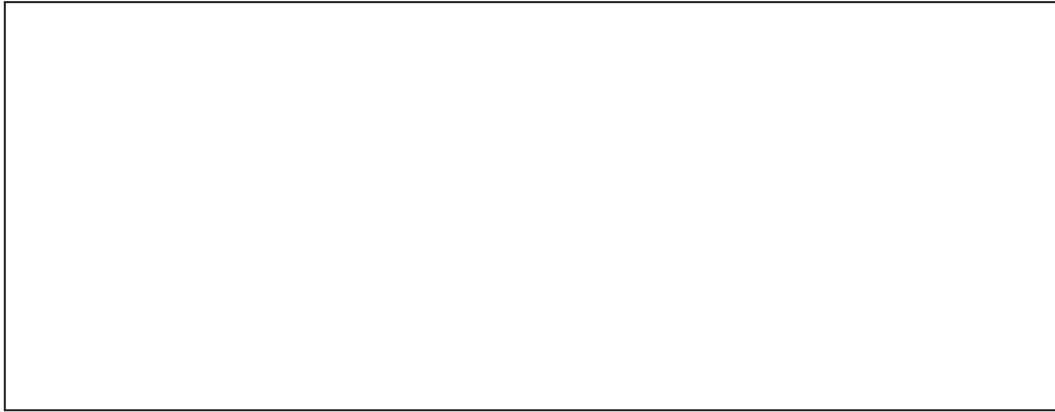


Figure 24 : Construction de la souris IL6-KO (Kopf et al., 1994)

C. Génotypage

Les souris $KCC3^{-/-}$ étant stériles, il n'est possible de croiser que des individus hétérozygotes. La descendance se retrouve donc composée de souris hétérozygotes, de souris KO et de souris sauvages. Le problème ne se pose pas chez la lignée IL6, puisque les individus KO restent fertiles. De manière générale, un génotypage systématique est effectué sur chaque animal dans les trois semaines suivant la naissance. Un échantillon est prélevé sur l'animal et est digéré dans une solution de tampon de lyse (100 µg/ml) (100 mM de TrisHCl, 5 mM d'EDTA, 200 mM de NaCl et 0.2% de sodium dodécyl sulfate (SDS)) et de protéinase K (100 µg/ml). Après 5h de digestion à 55°C, la solution est centrifugée à 14000 rpm de manière à culoter les débris, l'ADN restant en suspension. Une fois le surnageant prélevé, l'ADN est précipité au moyen d'isopropanol. Après une centrifugation à 14000 rpm, le surnageant est retiré et le culot d'ADN est séché puis resuspendu dans 100 µL d'eau.

Une PCR permet, grâce à l'utilisation de primers (1µM) dirigés contre chacune des deux séquences d'ADN, et à un kit de génotypage (Red Extract, Sigma®) contenant tous les constituants nécessaires (dont la taq polymérase et les dNTP), d'amplifier la portion de séquence du gène contrôle et/ou mutant. Les séquences des primers sont les suivantes :

Gène KCC3 :

Séquence sens : 5'-GAACTTTGTGTTGATTCCTTTGG-3'

Séquence anti-sens allèle contrôle : 5'-TCTCCTAACTCCATCTCCAGGG-3'

Séquence anti-sens allèle mutant: 5'-TACAACACACACTCCAACCTCCG-3'

Gène IL6 :

Séquence sens : 5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTTGG-3'

Séquence anti-sens allèle contrôle: 5'-TTCTCATTTCACGATTTCCCAG-3'

Séquence anti-sens allèle mutant : 5'-CCGGAGAACCTGCGTGCAATCC-3'

L'amplification des 2 séquences pour chacun des gènes se fait à 59°C et séparément afin d'éviter toute interférence entre les 2 couples de primers.

Suite à la PCR, les solutions d'ADN sont transférées sur gel d'agarose 1.5% contenant du SybrSafe (0.01%), et révélée aux ultra-violets.

D. Culture cellulaire

1. Culture des neurones adultes

Les animaux sont sacrifiés entre six et douze semaines après leur naissance par inhalation de CO₂ et dislocation cervicale. Après ouverture de la colonne vertébrale, les ganglions rachidiens dorsaux L4 et L5 sont prélevés sous hotte stérile (Figure 25). Ils subissent tout d'abord une dissociation enzymatique au moyen de collagénase A (1mg/ml, 2 fois 45 minutes d'incubation) et de trypsine (0.25%, 30 minutes d'incubation). Puis une dissociation mécanique grâce à une pipette pasteur érodée à la flamme permet de séparer complètement les neurones. Après centrifugation, ils sont ressuspendus dans un milieu de culture Neurobasal, supplémenté de B27 (2%), de glutamine (2mM) et d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine) (0.2mg/ml), et ensemencés, à raison de 10000 neurones/puit, dans des boîtes de cultures préalablement traitées à la poly-ornitine (0.5mg/ml) et à la laminine (5µg/ml) pour permettre l'adhérence des cellules. Les neurones sont maintenus dans un incubateur à 37°C à 5% de CO₂. Environ 2h après la mise en culture, le milieu de culture est renouvelé afin d'enlever les cellules mortes et les débris tissulaires. Les neurones sont ensuite étudiés après un jour *in vitro*.

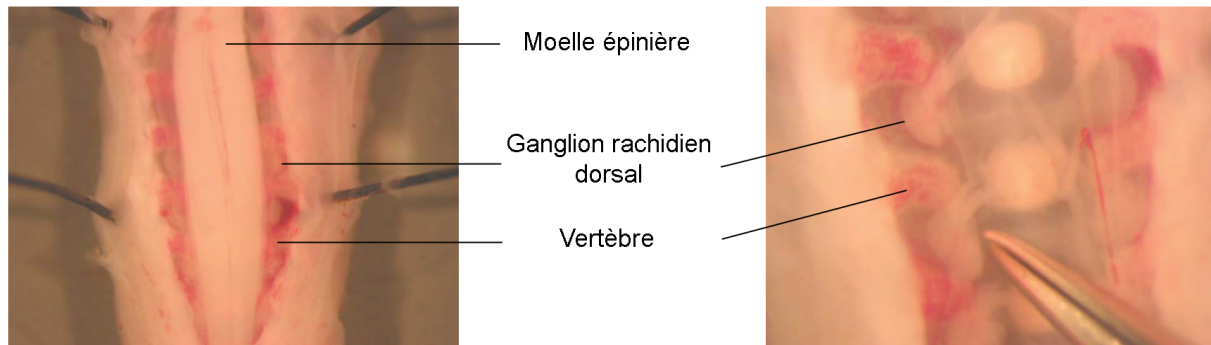


Figure 25 : Coupe frontale d'une colonne vertébrale de souris

2. Culture de neurones post-nataux

L'étude post-natale porte sur des nouveaux nés âgés de 1 à 6 jours. Après décapitation, la colonne vertébrale est ouverte en deux et les GRD sont prélevés directement. Ils subissent une dissociation enzymatique à la collagénase (1mg/ml, 18 à 25 minutes d'incubation), puis à la trypsine (0.25% dans du PBS $0Ca^{2+}$ - $0Mg^{2+}$, 18 à 25 minutes d'incubation). La suite du protocole est la même que pour les GRD adultes.

E. Axotomie

Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane. Le nerf sciatique est sectionné à mi-cuisse et une portion de 2-3 mm est retirée afin d'empêcher toute reconnexion des fibres nerveuses. Les animaux sont sacrifiés 4 à 7 jours après axotomie et les ganglions sont prélevés.

II. Electrophysiologie

A. Mesure des concentrations en ions chlorures intracellulaires

La technique de patch perforé est utilisée afin de déterminer la concentration en ions chlorures intracellulaire. Cette technique est basée sur l'utilisation dans l'électrode d'un antibiotique, la gramicidine A. Celle-ci crée des pores dans la membrane, plus exactement des pores sélectifs, car perméables aux cations, mais imperméables aux anions comme le chlorure. L'utilisation de la gramicidine permet ainsi de garder intacte la concentration en Cl^- intracellulaire, et donc de pouvoir la mesurer (Figure 26).

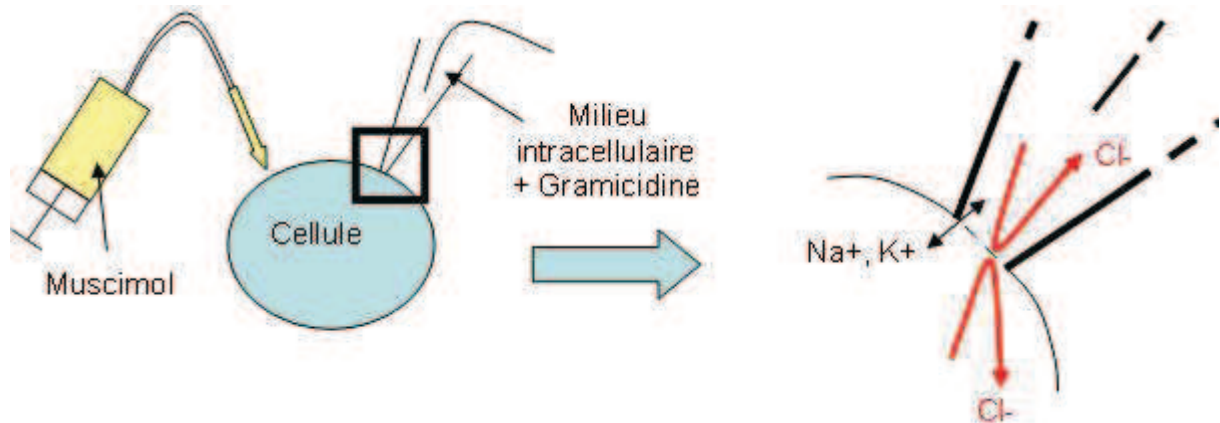


Figure 26 : Schéma de la technique de patch perforé avec la gramicidine

Afin d'isoler les conductances chlorures, les milieux d'enregistrement utilisés permettent le blocage des autres courants ioniques. Le milieu intra-pipette contient du césium (145mM), bloqueur des courants potassiques (Figure 27). Les conductances sodiques sont supprimées grâce à l'utilisation de tétra-éthyle-ammonium (TEA) (140mM) en remplacement du sodium dans le milieu extracellulaire. Afin de s'affranchir des courants calciques, le milieu extracellulaire est dépourvu de calcium, remplacé par du magnésium de manière à conserver la même quantité d'ions divalents et une osmolarité extracellulaire correcte, de l'ordre de 310mOsm (Figure 28).

Composition du milieu intracellulaire	
CsCl	145mM
MgATP	2mM
NaGTP	0,5mM
Hepes	10mM
CsOH	pH=7,3

Figure 27 : Composition du milieu intracellulaire

Composition du milieu extracellulaire 0Ca	
TEACl	140mM
MgCl ₂	3,5mM
Glucose	10mM
Hepes	10mM
CsOH	pH=7,3

Figure 28 : Composition du milieu extracellulaire 0Ca

Après avoir formé un gigaseal avec les cellules, un temps d'attente est nécessaire pour permettre à la gramicidine (50µg/ml) (Fluka, St Quentin Fallvier, France) d'opérer. L'enregistrement, effectué au moyen du logiciel pClamp8.2 (Dipsi Industrie, Chatillon, France) est possible lorsque la résistance d'accès (R_a) est comprise entre 80 et 50M Ω . Un protocole de rampe faisant passer le potentiel de -80 mV à +40 mV est ensuite appliqué à la cellule en mode Voltage Clamp (Figure 29).

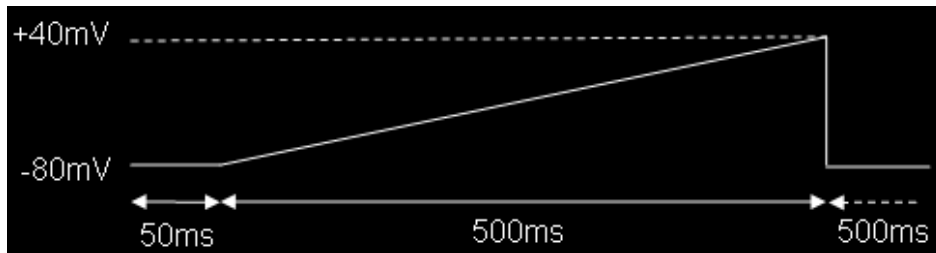


Figure 29 : Protocole d'enregistrement électrophysiologique

Une fois atteint une résistance d'accès de 50M Ω , une application brève de 100 µM de muscimol, agoniste des canaux chlorures GABA_A, permet d'activer la conductance chlorure et donc de mesurer le potentiel d'inversion des ions chlorures. Grâce à l'équation de Nernst ($E_{rev} = RT/ZF \cdot (\log([Cl^-]_i/[Cl^-]_e))$), et connaissant la valeur de RT/ZF (≈ 58 mV à température ambiante) et de $[Cl^-]_e$ (147mM), il est aisé de déterminer $[Cl^-]_i$.

B. Utilisation d'un inhibiteur de KCCs, le DIOA

De manière à reproduire les effets observés chez la souris $KCC3^{-/-}$, nous avons utilisé la pharmacologie. Le DIOA (Acide dihydroindenyl-oxy-alkanoïque) est un inhibiteur spécifique des KCCs. Afin de déterminer si $KCC3$ joue ou non un rôle physiologique chez l'adulte, nous avons enregistré l'homéostasie chlorure de neurones adultes en culture pré-incubés durant 1h avec du DIOA à 30µM.

III. Imagerie calcique

L'effet de l'activation des récepteurs GABA_A des neurones est évaluée le jour de la culture cellulaire ou après 24h par imagerie via la mesure du calcium intracellulaire au moyen d'une sonde fluorimétrique à double excitation et simple émission, le Fura-2-acetoxyméthyl ester (Fura-2-AM). Cette sonde, capable de traverser la membrane, est estérifiée, ce qui la

piège dans le cytoplasme. La liaison du Fura-2, ainsi obtenue, avec le calcium intracellulaire provoque un déplacement du spectre d'émission ($\lambda=510\text{nm}$) sans changement des spectres d'excitation ($\lambda=340$ et 380nm). Ainsi, une augmentation de la concentration en Ca^{2+} se traduit par une augmentation de l'émission de fluorescence à 340nm et par une diminution de l'émission de fluorescence à 380nm . L'alternance des deux longueurs d'onde est obtenue grâce à un miroir tournant à une fréquence de 50Hz . Tous les résultats présentés correspondent au ratio de fluorescence $340/380$.

Après un chargement de 40-45 minutes à 37°C des neurones avec une solution de Fura-2-AM ($2.5\mu\text{M}$), et de pluronique (0.02%, détergent non-ionique facilitant l'entrée et la déestérification du fluorophore), un protocole d'imagerie est appliqué :

La composition des différents milieux est donnée dans les Figure 30 et Figure 31. Environ 30 secondes après le début du protocole, un puff de Lock Normal est appliqué de manière à exclure toute réponse due à la l'effet "perfusion". Puis, après 120 secondes, une solution de muscimol ($50\mu\text{M}$, dilué dans du Lock Normal) est injectée afin d'observer l'effet du muscimol sur la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et donc l'apparition éventuelle d'une dépolarisation membranaire. Pour finir, environ 7 minutes après, lapse de temps permettant à la cellule de retrouver une physiologie normale, un puff de KCl (50mM) est effectué pour confirmer que les cellules sont excitables, donc en vie. En effet, le potentiel de repos étant principalement lié aux conductances potassiques, une augmentation de sa concentration extracellulaire permet de dépolariser la membrane, entraînant l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage et l'entrée de calcium dans la cellule. Il est à noter que toutes les cellules ne répondant pas au KCl sont retirées de l'analyse, de même que celles répondant à la perfusion de Lock Normal, pour ne pas prendre en compte un éventuel effet lié à la perfusion en elle même.

Composition du milieu Lock Normal	
NaCl	145mM
KCl	5mM
CaCl ₂	2mM
MgCl ₂	1,5mM
Hepes	10mM
Glucose	10mM
NaOH	pH=7,4

Figure 30 : Composition du milieu Lock Normal

Composition du milieu KCl	
NaCl	95mM
KCl	50mM
CaCl ₂	2mM
MgCl ₂	1,5mM
Hepes	10mM
Glucose	10mM
NaOH	pH=7,4

Figure 31 : Composition du milieu KCl

IV. Révélation de la β -galactosidase

Le protocole utilisé est très proche de celui développé par Vernet et al. en 1993 (Rosenberg et al., 1992; Vernet et al., 1993; Kelley et al., 1994). Une fois prélevés, les GRD sont fixés dans du glutaraldéhyde 2% pendant 2 heures à 4°C. Après incubation d'une nuit dans du sucrose 25% à 4°C, les GRD sont inclus dans de l'OCT à -50°C et des coupes de 14 μ m sont effectuées au moyen d'un cryostat. Après rinçage au PBS à 37°C, les lames sont incubées à 37°C en présence d'une solution de révélation, contenant un substrat chromogénique de la β -galactosidase, le X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside), jusqu'à apparition d'une coloration bleutée (\approx 9h), voire toute une nuit. En effet, la β -galactosidase coupe son substrat, donnant un précipité bleu. La composition du milieu de révélation est donnée dans les Figure 32 et Figure 33. Les lames sont ensuite rincées abondamment au PBS afin d'arrêter la réaction de révélation, et montées sous lamelle avec du moviol.

Solution détergente (dans PBS)	
MgCl ₂	2mM
Sodium déoxycholate	0,01%
NP40	0,02%

Figure 32 : Composition de la solution détergente

Tampon de révélation (dans solution détergente)	
K ₃ Fe(CN) ₆	5mM
K ₄ Fe(CN) ₆	5mM
Tris pH=7,3	20mM
X-Gal	1mg/ml

Figure 33 : Composition du tampon de révélation

Les coupes sont observées au moyen d'un scanner de lame de type Nanozoomer® (Hamamatsu®)

V. Immunohistochimie sur tranche GRD

Les ganglions rachidiens dorsaux sont prélevés et fixés pendant 2h dans du Paraformaldéhyde 4% à température ambiante. Après un rinçage dans un tampon phosphate de type PBS, les GRD sont incubés durant une nuit à 4°C dans une solution de sucrose à 25% afin de les cryo-conserver. Pour finir, ils sont inclus dans de l'OCT à -50°C et conservés à -80°C jusqu'à la coupe. Des coupes de 14µm sont obtenues au moyen d'un cryostat et déposées sur lames. Ces lames sont ensuite conservées à -20°C jusqu'au jour de l'expérience.

Après avoir réhydraté les coupes au moyen de PBS, on effectue un blocage des sites aspécifiques de liaison de l'anticorps secondaire. Pour ce faire, les lames sont incubées 30 min à température ambiante dans une solution de PBS contenant du sérum d'âne (10%), dont les anticorps permettent de saturer les sites aspécifiques. Les lames sont ensuite incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-KCC3 (400ng/ml dans du PBS 1% Sérum d'âne 0.1% Triton, sc-19424, Santa Cruz®) ou l'anticorps anti-IL6-R α (10µg/ml), tous deux issus de la chèvre. Le site de fixation de l'anticorps anti-KCC3 se trouve dans la partie C-Terminale intracellulaire de la protéine, partie présente chez les animaux sauvages, mais délétée chez les animaux KO. Après 3 lavages au PBS, les lames sont incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire, l'Alexa 594, créé chez l'âne et reconnaissant les anticorps primaires de chèvre, et dilué au 1/1500^{ème} dans du PBS 1% Sérum d'âne \pm 0.1% Triton. Enfin les coupes sont rincées au PBS et montées sous lamelle au moyen de moviol.

Afin de mettre en évidence les populations KCC3 et IL6-R α , j'ai effectué des double-immunohistochimies au moyen d'anticorps connus de sous-populations : TrkA, trkB, Parvalbumine, glutamine synthétase et phospho-NKCC1 (Flemmer et al., 2002). Dans le cas de TrkB, de la Parvalbumine et de phospho-NKCC1, un démasquage est nécessaire pour permettre aux anticorps d'avoir accès à leur site antigénique (Figure 34). Pour ce faire, les lames sont incubées 5 minutes à température ambiante, puis 15 minutes à 68°C dans un tampon de citrate de sodium. Après refroidissement les échantillons sont rincés avec du PBS et le protocole d'immunohistochimie est appliqué. Les images ont été prises avec un microscope droit équipé d'un module apotome (Zeiss) et d'une caméra CCD AxioCam, aux objectifs X20 ou X40 ou un microscope confocal LSM5 (Zeiss) pour l'analyse de

colocalisation. L'acquisition d'image et l'analyse ont été faites au moyen du logiciel Axio Vision (Zeiss).

Tampon de citrate de sodium	
Tri-sodium citrate (dihydrate)	2,94% mM
Tween 20	0,05%
HCl 1N	pH=6

Figure 34 : Composition du tampon de citrate de sodium

Anticorps	Espèce	Dilution finale	Fournisseur
TrkA	Rabbit	1/500	R&D
TrkB	Rabbit	1/1000	Upstate
Parvalbumine	Rabbit	1/10000	Swant
NF200	rabbit	1/100	Sigma-Aldrich
IL6R α	Goat	10 μ g/ml	R&D systems
P-NKCC1	rabbit	1/500	Dr Forbush
Glutamine synthetase	mouse	1/500	Chemicon
KCC3 C-term	Goat	1/500	Santa Cruz

Figure 35 : Liste des anticorps utilisés

VI. RT-PCR quantitative sur les ganglions rachidiens dorsaux

A. Extraction et dosage de l'ARN

Les ganglions rachidiens dorsaux sont prélevés et stockés à -20°C dans du RNA later, afin d'éviter la dégradation de l'ARN, jusqu'à extraction. Le jour de l'extraction, les GRD sont décongelés dans la glace et le RNA later est retiré au moyen d'une seringue et d'une aiguille pour ne pas absorber les GRD.

L'extraction de l'ARN est faite au moyen d'un kit d'extraction RNeasy® de Qiagen® (#74104). Les GRD sont mis en suspension dans environ 500 μ l de tampon RLT (fourni dans le kit) contenant du β -mercaptoéthanol (1%) et sont dissociés par écrasement au moyen d'un pilon puis homogénéisés au moyen d'une seringue et d'aiguilles de plus en plus fines. Après la dissociation, le liquide est trouble, et sans morceaux de GRD. Le lysat est ensuite centrifugé 3 minutes à 14000rpm (à 4°C, tout comme les centrifugations suivantes) et le surnageant, contenant les acides nucléiques, est récupéré. On ajoute ensuite de l'éthanol

70% à une stœchiométrie de 1:1 et on mélange la solution par pipetage de façon à précipiter les acides nucléiques. Environ 500µl de solution sont déposés sur une colonne de filtration (fournie dans le kit) et centrifugé à 10000rpm de manière à éliminer le liquide et à conserver les acides nucléiques. On dépose ensuite 700µl de tampon RW1 (fourni dans le kit) sur la colonne de manière à éluer l'ADN, puis on centrifuge 15s à 10000rpm. Du tampon RPE (fourni dans le kit), auquel on a préalablement ajouté 4 volumes d'éthanol 100%, est ajouté dans la colonne qui est ensuite centrifugée 15s à 10000rpm. Après avoir recommencé cette étape, on effectue une centrifugation à 14000rpm durant 1 minute pour bien rincer. Pour finir, 25µl (post-natal) ou 30µl (adulte) d'eau RNase free (fournie dans le kit) est ajoutée à la colonne et centrifugée 1 minute à 10000rpm afin d'éluer l'ARN.

Le dosage de l'ARN se fait au moyen d'un Nanodrop® et du logiciel d'analyse fourni. La concentration est mesurée dans 1.5µl de solution et donnée en µg/µl. Connaissant la quantité totale de solution, on détermine la quantité totale d'ARN

B. Rétro-transcription des ARN extraits (RT-PCR)

Le même jour que l'extraction, la RT-PCR est faite au moyen du kit miScript Reverse Transcription® de Qiagen®. La solution pour la RT-PCR ainsi que le protocole pour thermocycler sont donnés dans les Figure 36 et Figure 37.

Produits	Volume
Tampon miScript RT (5X)	4µl
Eau RNase free	Variable
Mix miScript RT	1µl
ARN extrait	Variable (1µg)

Figure 36 : Composition de la solution de RT-PCR

Etapes	Temps	Température
Rétrotranscription	60min	37°C
Inactivation du Mix RT	5min	95°C

Figure 37 : Protocole de Thermocycler

La transcription inverse se fait dans un thermocycler. Les échantillons sont incubés 60 minutes à 37°C, température d'activation de la HotStar Taq polymérase, puis 5 minutes à 95°C pour inactiver l'enzyme. Puis les échantillons sont stockés à -20°C jusqu'à quantification.

C. Dosage des ADNc obtenus par RT-PCR (Q-PCR)

Les échantillons d'ADNc sont d'abord dilués dans de l'eau RNase free au 1/10^{ème} ou au 1/5^{ème} de façon à obtenir 100 ng. La Q-PCR est réalisée sur 10 ng d'ADNc au moyen d'un kit miScript SYBR Green PCR® de Quiagen® et de primers spécifiques à chaque ADNc d'intérêt (0.5µM). Les proportions de chaque solution ainsi que le protocole d'amplification par Lightcycler (Roche Diagnostics) et les séquences des primers sont donnés dans les Figure 38, Figure 39 et Figure 40.

Produits	Volume
QuantiTectSybrGreen PCR Master Mix	5 µl
Primer	1 µl
Eau RNase free	3 µl
ADNc	1 µl

Figure 38 : Composition de la solution de Q-PCR

Etapes	Temps	Température	Cycles
Activation de la Taq	15 min	95°C	1 cycle
Dénaturation	15s	94°C	40 cycles
Annealing	30s	55°C	
Extension	30s	72°C	

Figure 39 : Protocole de Lightcycler

Gènes cibles	Séquences	Longueur Des amplicons	T _m (°C)
Slc 12a2 (NKCC1)	F: AAGGGCAGCGAGG AAGCCAA R: GCCGTTCTGGAAGCTCACGTT	135	61
Slc 12a4 (KCC1)	F: AACGAGGTCATTGTCACGCGCT R: ACGCACCAACAACAACCCGTT	147	62
Slc 12a5 (KCC2)	F: TGCCATCAAACGGCTCAGGTGT R: TTGAGCCAAGCAACAGGGCAGT	68	62
Slc 12a6 (KCC3)	F: AGTGAAGATGCTGCGCTTGGAA R: AGCATGCCOCCATCATGACAAA	170	62
Slc 12a7 (KCC4)	F: AACTGGCGTCCACGCTTCAAGT R: CCGGCAATGAGCATGGCGAAA A	122	62
Il6	F: ACAACCACGGCCTTCCCTACTT R: AGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT	100	62
Il6-Rα	F: TGTTGAAGACTCTGCCAACCCAA R: ACAGAGAAGCAACCCAA ACGCCAA R: TGGTCAAATCTTTGCGCAGCCC	145	62
Polr2j	F: ACCACACTCTGGGGAACATC R: CTCGCTGATGAGGTCTGTGA	160	59

Slc 12, solute carrier 12 family; Il6, interleukin 6; Il6ra, interleukin 6 receptor α chain; Jak, janus kinase; Polr2j, Polymerase (RNA) II polypeptide J; in bracket: corresponding protein.

Figure 40 : Séquences des primers utilisés pour la Q-PCR

Après amplification, les courbes d'amplification et de fusion sont analysées. Afin de contrôler qu'il n'y a pas eu d'amplification aspécifique, les échantillon sont récupérés et déposés sur gel d'agarose 1.5% afin de contrôler que la taille des séquences amplifiées correspond à la taille prédéterminée des ARNm. Les produits de PCR sont également envoyés pour séquençage (Millegen, Labège, France). L'analyse des variations d'expression des transcrits est effectuée par la méthode du ΔC_t . Celui-ci correspond à la différence entre les valeurs de C_t , déterminée par l'équation $2^{-\Delta C_t}$.

VII. Statistiques

Toutes les valeurs sont exprimées comme la moyenne \pm écart moyen à la moyenne. Les comparaisons de moyennes observées dans les différents groupes sont calculées en utilisant un test d'analyse de variances (One way ANOVA suivi d'un test post-hoc de Bonferroni), ou un test t de Student ou un test de χ^2 . Pour les résultats de qRT-PCR, un test U de Mann et Whitney a été utilisé. Une valeur de $P < 0.05$ est considérée comme significative. Le logiciel utilisé pour les analyses statistiques est GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, Californie).

PRESENTATION DES RESULTATS

1. Article soumis dans “Journal of Neuroscience”

An autocrine neuronal interleukin-6 loop mediates chloride accumulation and NKCC1 phosphorylation in axotomized sensory neurons

Olivier Lucas^{1,3}, Simon Pieraut^{1,3}, Carine Bouffi², Danièle Noel² and Frédérique Scamps¹

¹ *Inserm, U-583, Institute for Neurosciences of Montpellier, Montpellier, F-34000 France*

² *Inserm, U-844, F-34000 France*

³ These authors contributed equally to this work.

I. Régulation du cotransporteur NKCC1 par la cytokine Interleukine 6

A. Résumé et stratégie expérimentale

Notre équipe a précédemment démontré qu'une lésion nerveuse entraînait une augmentation de la $[Cl^-]_i$ dans les neurones axotomisés présentant une pousse dite élonguée (Pieraut et al., 2007). Néanmoins, peu de choses sont connues concernant les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène. Parmi les acteurs moléculaires connus intervenant dans la régénération nerveuse, la cytokine pro-inflammatoire Interleukine 6 apparaît comme un candidat intéressant dans notre système.

Par des approches *in vitro* et *in vivo*, nous avons constaté que l'expression de l'IL6, ainsi que son récepteur, l'IL6-R α , étaient augmentés dans les neurones sensitifs après axotomie du nerf sciatique. Par la suite, l'étude de l'homéostasie chlorure de ces neurones en culture a montré que l'IL6, via son récepteur, permettait la phosphorylation activatrice de NKCC1 dans les neurones mécano- et proprioceptifs, de moyen et grand diamètres.

B. Résultats

1. L'IL6 régule la $[Cl^-]_i$ des neurones sensitifs axotomisés *in vitro*

Avant d'avancer que l'IL6 joue un rôle dans la régulation de la $[Cl^-]_i$ des neurones sensitifs *in vitro*, il faut d'abord démontrer que la cytokine est exprimée et sécrétée dans notre milieu de culture. Nous avons tout d'abord étudié l'effet de la lésion sur l'expression de l'IL6 dans les GRD. Trois jours après l'axotomie l'expression normalisée de l'ARNm de l'IL6 dans les GRD L4-L5 lésés (1.45 ± 0.06 , n=4) est trois fois plus élevée que dans les contrôles (0.50 ± 0.08 , n=4) (Figure 41).

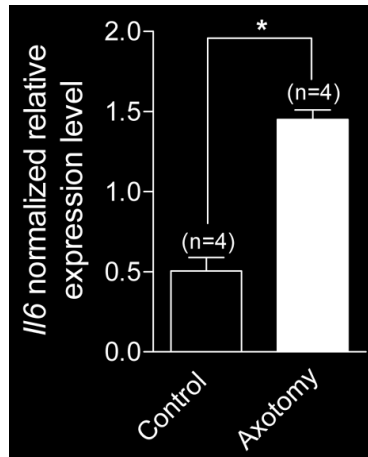


Figure 41 : Mesure par qRT-PCR de la quantité d'ARNm codant pour l'IL6 dans des ganglions rachidiens dorsaux L4-L5 contrôles et axotomisés

Par la technique ELISA, nous avons ensuite quantifié la production d'IL6 dans le milieu de culture. L'analyse montre que dans le milieu de culture de neurones axotomisés, après un jour *in vitro*, la quantité d'IL6 dans le surnageant est de 78 ± 12 pg/ml, (n=6). A contrario, aucune sécrétion d'IL6 n'a été observée dans des cultures de neurones issus de la souris IL6^{-/-}, ce qui prouve la spécificité de notre technique (Figure 42).

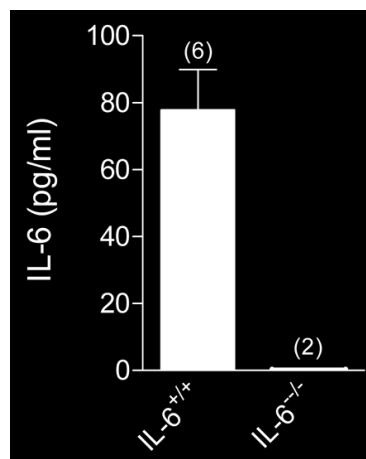


Figure 42 : Dosage par la technique ELISA de la quantité d'IL6 présente dans le surnageant de culture de neurones de GRD L4-L5 axotomisés de souris IL6^{-/-} et IL6^{+/+}

S'il existe un lien entre l'IL6 produite et l'augmentation de la $[Cl^-]_i$ observée par Pierraut et coll. dans les neurones axotomisés, alors le blocage, ou l'absence de l'IL6 doit avoir des conséquences sur la $[Cl^-]_i$. La technique de patch perforé permet d'enregistrer le potentiel d'inversion du courant GABA_A, correspondant à celui des ions chlorures (Figure

43A). Appliquant ensuite l'équation de Nernst, il est possible de déterminer la concentration intracellulaire en ions Cl^- .

Les mesures de E_{GABA} effectuées sur les neurones de diamètre supérieur à $30\mu\text{m}$ (permettant de discriminer les neurones mécano-proprioceptifs des nociceptifs) montrent un potentiel d'inversion dépolarisé dans les neurones axotomisés par rapport aux neurones contrôles (respectivement, $-26.5 \pm 1.3 \text{ mV}$, $n=14$ et $-41.8 \pm 1.0 \text{ mV}$, $n=16$) (Figure 43B). L'anticorps dirigé contre l'IL6 murine, mIL6, est capable de neutraliser l'IL6 sécrétée dans le milieu, et donc d'empêcher sa liaison à son récepteur. E_{rev} tend vers des valeurs hyperpolarisées après prétraitement des neurones axotomisés avec $10 \mu\text{g/ml}$ de mIL6 ($-41.2 \pm 2.5 \text{ mV}$, $n=11$), mais pas avec $10\mu\text{g/ml}$ de hIL6 ($-25.1 \pm 2.5 \text{ mV}$, $n=7$), reconnaissant la forme humaine de l'IL6 (Figure 43B).

L'analyse de l'homéostasie chlorure chez la souris $\text{IL6}^{-/-}$ ne montre pas de différence significative dans le E_{GABA} des neurones contrôles ($-47.3 \pm 2.6 \text{ mV}$, $n=6$) par rapport à la souris $\text{IL6}^{+/+}$ ($-41.3 \pm 1.9\text{mV}$, $n=6$) (Figure 43C). Néanmoins, après axotomie, E_{GABA} est significativement moins dépolarisé chez la souris $\text{IL6}^{-/-}$ ($-36.6 \pm 1.9 \text{ mV}$, $n=13$, contre $-25.4 \pm 1.5 \text{ mV}$, $n=10$ chez l' $\text{IL6}^{+/+}$). Chez l' $\text{IL6}^{-/-}$, nous n'observons plus de différence significative dans la $[\text{Cl}^-]_i$ entre les neurones contrôles et axotomisés (Figure 43C). Ces résultats montrent que l'IL6 produite de manière endogène régule la $[\text{Cl}^-]_i$ dans les neurones sensitifs axotomisés.

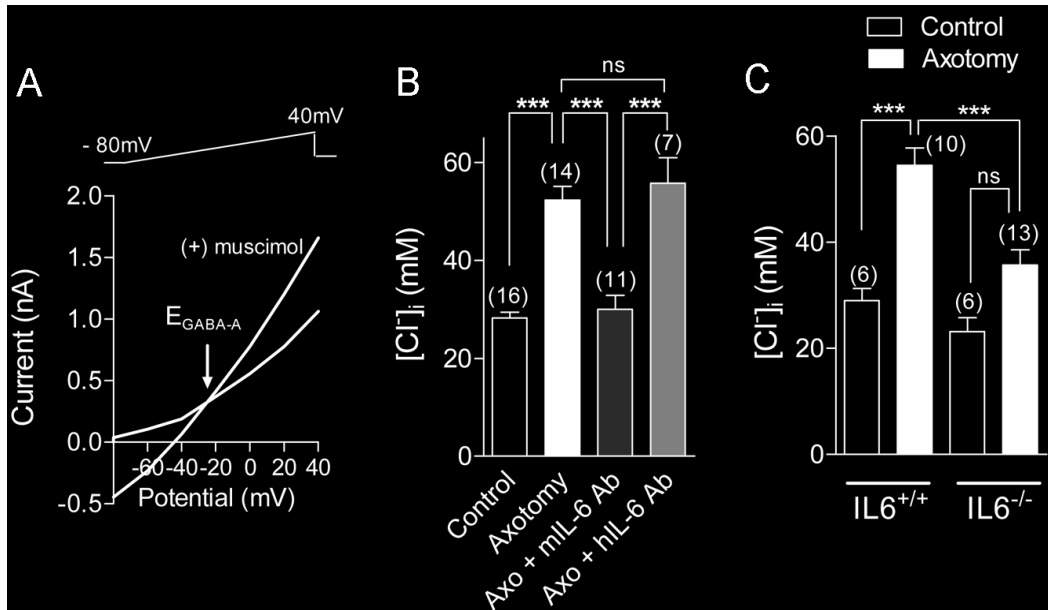


Figure 43 : A: Enregistrement par la technique de patch perforé du potentiel d'inversion du GABA après perfusion de muscimol (50 μ M). B: Détermination de la $[Cl^-]_i$ dans des neurones contrôles, axotomisés et axotomisés puis traités avec l'anticorps anti-IL6 murin et humain (10 μ g/ml). C: $[Cl^-]_i$ dans des neurones contrôles et axotomisés en culture de souris IL6^{+/+} et IL6^{-/-}

2. La lésion nerveuse augmente l'expression de l'IL6-R α dans les neurones sensitifs

Pour voir si la lésion nerveuse est responsable d'une augmentation d'expression de l'IL6 et son récepteur, IL6-R α , nous avons dosé par RT-PCR quantitative la quantité relative d'ARNm codant pour l'IL6 et pour IL6-R α . Les résultats montrent une augmentation significative de la transcription de l'IL6-R α (Figure 44). En effet, 3 jours après la lésion, le niveau de transcription de l'IL6-R α est multiplié par 2 (de 0.75 ± 0.05 à 1.49 ± 0.04 , n=7).

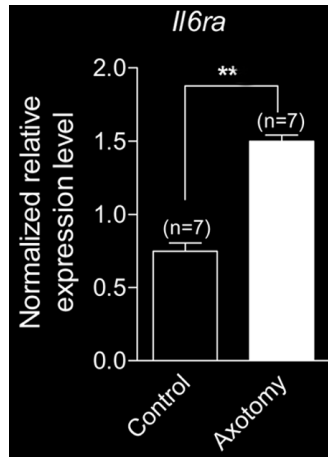


Figure 44 : Mesure par RT-PCR quantitative du niveau d'expression de l'ARNm de l'IL6-R α dans des ganglions contrôles et axotomisés

Par immunohistochimie au moyen d'un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire du récepteur endogène IL6-R α , nous avons voulu savoir si l'expression de la protéine était également augmentée après axotomie. Dans des GRD contrôles, nous avons obtenu un marquage linéaire au niveau péri-membranaire dans 5% des neurones (60/1142) (Figure 45). Après axotomie, le pourcentage de neurones exprimant l'IL6-R α a significativement augmenté (23%, 305/1303) (Figure 45). Afin de tester la spécificité de notre marquage, nous avons dans un premier temps omis l'anticorps primaire dirigé contre l'IL6-R α , et dans un second temps, pré-incubé cet anticorps primaire avec la forme soluble du récepteur, sIL6-R, correspondant à la partie extracellulaire du récepteur endogène. Dans ces deux conditions, aucun marquage IL6-R α chez la souris axotomisée n'est observé (Figure 45).

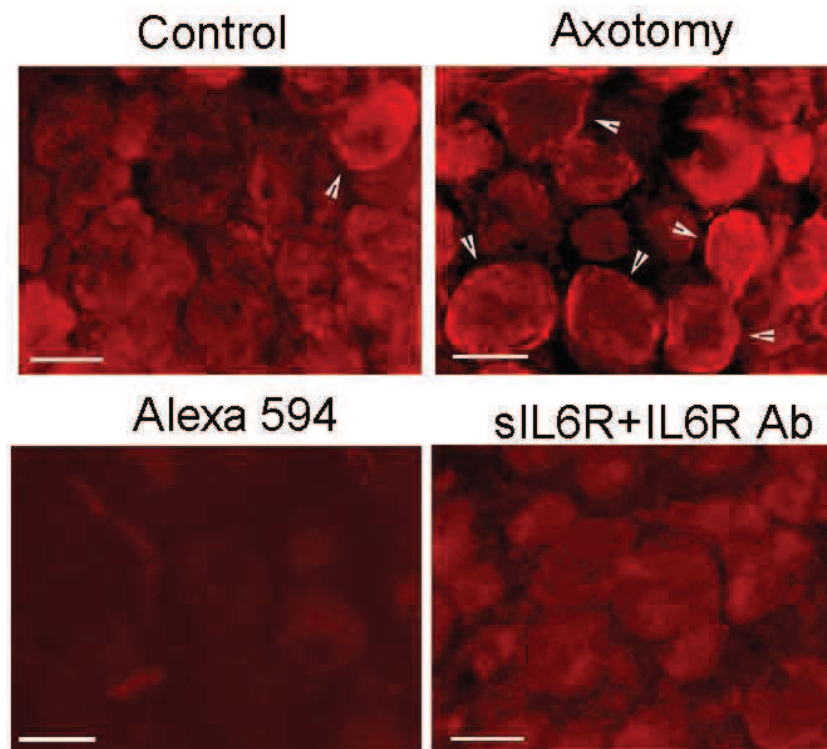


Figure 45 : Marquages immunohistochimiques au moyens d'anticorps anti-IL6-R α sur des coupes transversales de ganglions rachidiens dorsaux contrôles, axotomisés, axotomisés sans anticorps anti-IL6-R α et axotomisés après pré-incubation de l'anticorps anti-IL6-R α avec la forme soluble du récepteur IL6-R (échelle 30 μ m)

Bien que l'expression de l'IL6-R α par les cellules satellites soit connue, on ne sait pas si les neurones l'expriment de manière constitutive. Or, nos marquages ne permettant pas de localiser précisément IL6-R α à la membrane des neurones ou des cellules satellites des doubles marquages avec la glutamine synthétase, marqueur des cellules satellites gliales, ont donc été nécessaires. L'analyse des images montre d'une part une absence de co-localisation entre les deux marqueurs, et d'autre part, un marquage GS entourant le marquage IL6-R α (Figure 46). Ces marquages démontrent que la lésion nerveuse augmente l'expression du transcrit de l'IL6-R α et induit la localisation la protéine au niveau de la membrane plasmique dans une sous-population de neurones sensitifs.

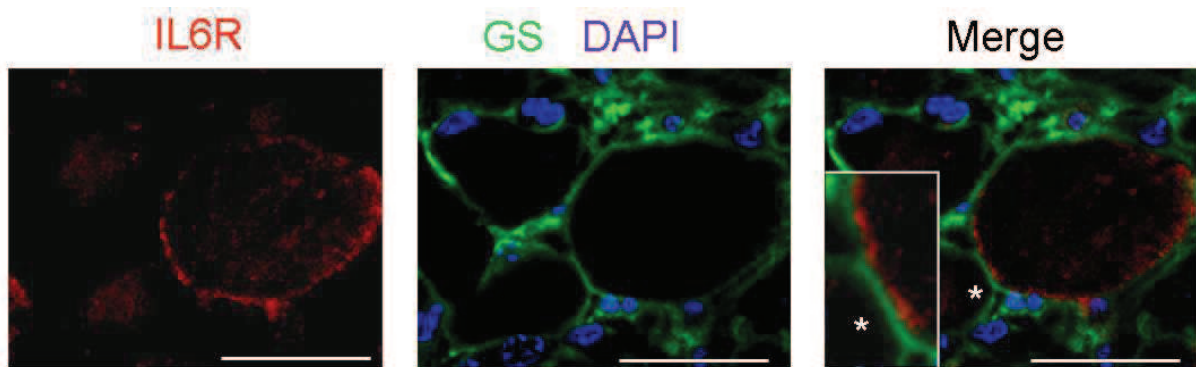


Figure 46 : Marquages immunohistochimiques par microscopie confocale de coupes de GRD axotomisés L4-L5 au moyen d'anticorps anti-IL6-R α et anti-glutamine synthétase, un marqueur des cellules satellites (échelle 30 μ m, encadré correspondant à un agrandissement de 3 fois d'une portion de membrane)

3. *In vivo*, IL6-R α est exprimé dans une sous-population de neurones mécano- et proprioceptifs

Afin de caractériser la population de neurones exprimant IL6-R α , une série de doubles marquages avec des marqueurs de sous-population connus a été effectuée. Les co-marquages avec la chaîne lourde (200 kda) du Neurofilament, NF200, spécifique des neurones myélinisés, montrent que pratiquement tous les neurones exprimant IL6-R α expriment également le NF200 (92%, 56/61) (Figure 47A). Autrement dit, les neurones exprimant le récepteur IL6-R α sont des neurones myélinisés. Les doubles marquages avec TrkB, récepteur à haute affinité du BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) et de la NT4 (*Neurotrophine 4*) exprimé dans une population de neurones mécanosensibles de moyen diamètre, montrent également qu'une majorité de neurones IL6-R α ⁺ co-expriment TrkB (80%, 67/84) (Figure 47B). N'ayant pas réussi à obtenir un marquage correct avec l'anticorps anti-TrkC, marqueur des neurones proprioceptifs, nous avons utilisé un autre marqueur de cette sous-population, la Parvalbumine. Nous avons obtenu que 30-40% (37/107) des neurones IL6-R α ⁺ expriment également la Parvalbumine (Figure 47C). En accord avec l'expression de l'IL6-R α par les mécanocepteurs myélinisés, aucun neurone IL6-R α ⁺ ne co-exprime TrkA, récepteur à haute affinité du NGF (*Nerve growth Factor*), retrouvé dans les neurones nociceptifs non-myélinisés (2%, 1/61) (Figure 47C). De ces résultats, nous pouvons conclure que la lésion nerveuse induit l'expression de l'IL6-R α *in vivo* par les neurones sensitifs mécano- et proprioceptifs.

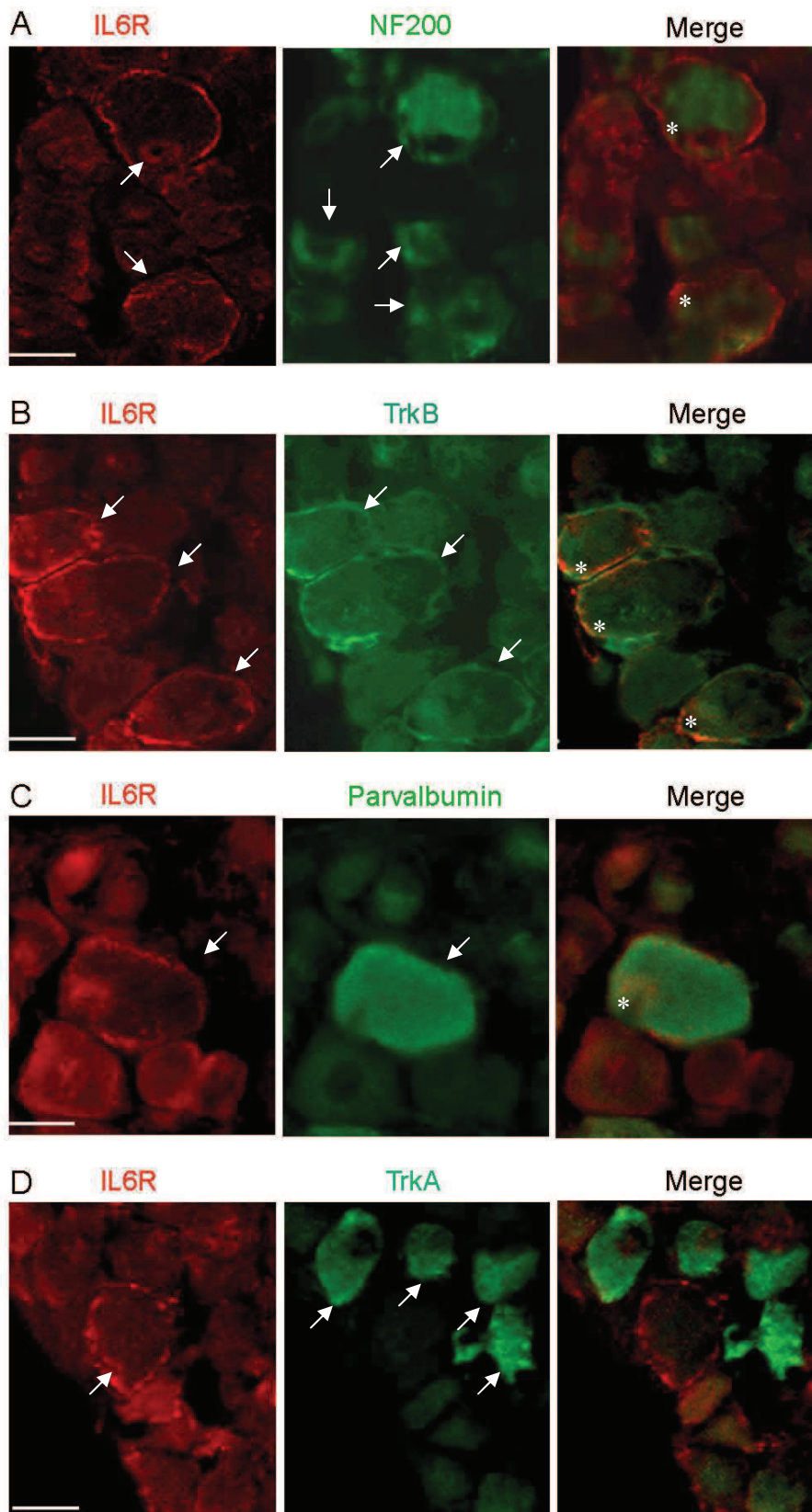


Figure 47 : Marquages immunohistochimiques sur tranches de ganglions L4-L5 axotomisés permettant de caractériser les neurones myélinisés (NF200) (A), les neurones mécanocéptifs (TrkB) (B), les neurones proprioceptifs (Parvalbumine) (C) et les neurones nociceptifs (TrkA) (D) parmi les neurones exprimant l'IL6-R α (IL6-R) (échelle 30 μ m)

4. L'IL6-R α dans les neurones axotomisés de grand diamètre régule la [Cl]_i via la voie de signalisation JAK/STAT

Pour vérifier que les effets de l'IL6 passent bien par l'expression neuronale de son récepteur, nous avons effectué des marquages immunocytochimiques sur des cultures primaires de neurones axotomisés (Figure 48). Les résultats confirment l'expression de l'IL6-R α à la membrane de neurones axotomisés de moyen et grand diamètres (>30 μ m), soit 34% de la population totale (228/883) et sans marquage des neurones de petit diamètre (<30 μ m) ni des cellules non neuronales.

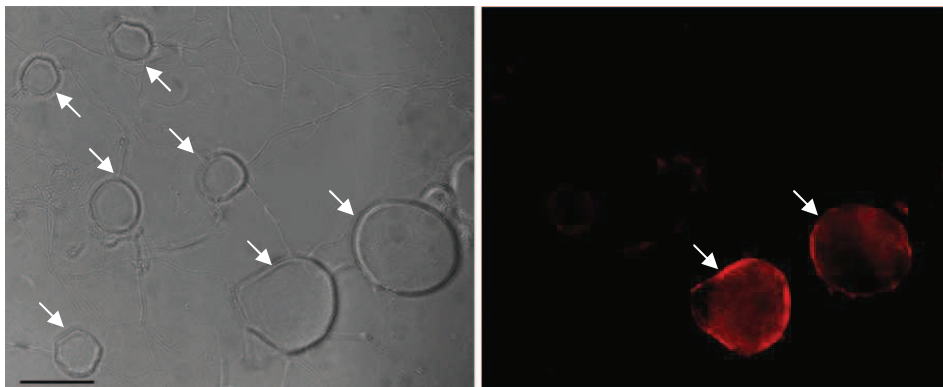


Figure 48 : Photos en contraste de phase et marquages immunocytochimiques anti-IL6-R α associés effectués sur culture de neurones axotomisés (échelle 30 μ m)

Afin de confirmer que l'effet de l'IL6 passe par sa liaison avec l'IL6-R α , et ne retrouvant un marquage du récepteur que dans les neurones de diamètre >30 μ m, nous avons mesuré la [Cl]_i dans ces neurones après traitement avec l'anticorps anti-IL6-R α (10 μ g/ml) bloquant l'activité du récepteur. Les résultats montrent que E_{GABA} est significativement moins dépolarisé après traitement par rapport aux neurones axotomisés non traités (-47.2 ± 2.6 mV, n=15 et -23.5 ± 1.9 mV, n=8, respectivement) (Figure 49). Pour confirmer que l'expression de l'IL6-R α est constitutive, les neurones axotomisés ont été incubés avec le récepteur soluble IL6-R. Ce récepteur soluble entre en compétition avec le récepteur membranaire vis-à-vis du ligand et pourrait donc agir comme un antagoniste dans les cellules exprimant l'IL6-R α (Marz et al., 1999). Comme nous le supposions, E_{rev} est significativement moins dépolarisé après traitement avec l'IL6-R soluble (-49.8 ± 2.0 mV, n=6) (Figure 49).

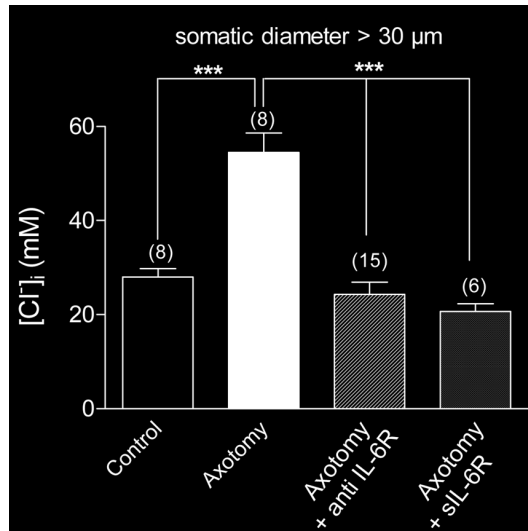


Figure 49 : Mesures de la [Cl]_i dans les neurones contrôles, axotomisés et axotomisés puis soumis à une pré-incubation avec l'anticorps anti-IL6-R α , bloquant l'activité du récepteur et axotomisés puis incubés avec la forme soluble du récepteur IL6-R

Pour confirmer la spécificité d'expression de l'IL6-R α , nous avons enregistré les neurones axotomisés de diamètre <30 μ m après traitement avec l'anticorps anti-IL6-R α . Bien qu'après axotomie, l'accumulation de Cl⁻ dans les neurones de petit diamètre soit similaire aux neurones de moyen et grand diamètres, le traitement avec l'anticorps ne modifie pas significativement E_{GABA} (-20.2 \pm 2.2 mV, n=5 dans les neurones axotomisés et -19.0 \pm 1.8 mV, n=7 dans les neurones axotomisés traités avec l'anticorps anti-IL6-R α) (Figure 50).

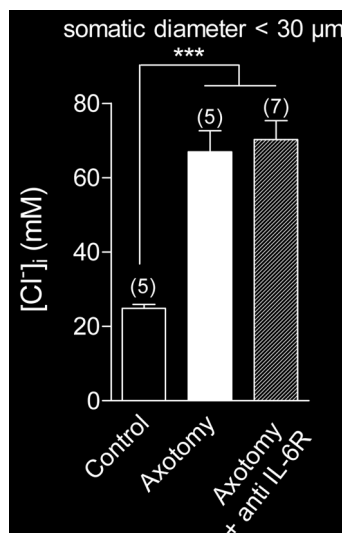


Figure 50 : Mesure de la [Cl]_i dans des neurones de diamètre <30 μ m contrôles, axotomisés et axotomisés puis traités avec la forme soluble du récepteur IL6-R

L'activation de l'IL6-R α par l'IL6 est connue pour activer la voie JAK (*Janus Kinase*). Nous avons, par une approche pharmacologique, testé l'implication de cette voie dans notre système. L'incubation des neurones axotomisés avec des inhibiteurs de la voie JAK, l'AG490 (50 μ M) et la cucurbitacine (3 μ M), entraîne un shift de E_{GABA} vers des potentiels hyperpolarisés de -17.5 ± 3.2 (n=14) à -33.2 ± 1.3 mV (n=11) pour l'AG490 et -41.9 ± 4.5 mV (n=10) pour la Cucurbitacine (Figure 51A). Nos résultats démontrent que la signalisation via le récepteur IL6-R α exprimé de manière constitutive, régule la [Cl⁻]_i dans les neurones sensitifs de moyen et grand diamètres après lésion nerveuse périphérique.

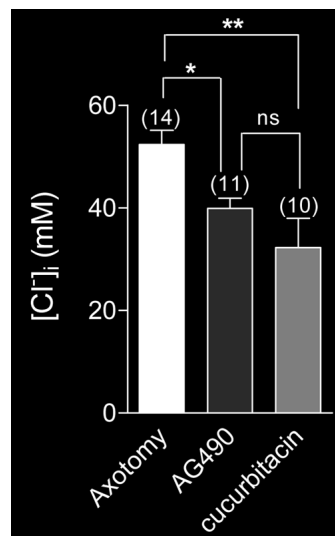


Figure 51 : Détermination de la [Cl⁻]_i dans les neurones axotomisés sans et après traitement avec des inhibiteurs de la voie JAK (AG490 à 50 μ M et cucurbitacine à 3 μ M)

5. La signalisation par l'IL6 permet la phosphorylation de NKCC1 au niveau de la membrane plasmique *in vivo*

Dans un article publié par notre équipe, il a été démontré que l'axotomie ne modifie pas le niveau d'expression du cotransporteur NKCC1, mais que l'activation de NKCC1 par phosphorylation est responsable de l'augmentation de la [Cl⁻]_i induite par l'axotomie (Pieraut et al., 2007). Néanmoins, rien ne dit que l'expression des cotransporteurs cation-chlorure (KCC) n'est pas modifiée. L'analyse par RT-PCR quantitative de l'expression des différents membres de la famille CCC montre que les transcrits préférentiellement retrouvés dans les ganglions rachidiens dorsaux contrôles correspondent à NKCC1, KCC1 et KCC3 majoritairement (Figure 52A). De plus, l'axotomie ne modifie pas le niveau d'expression de ces cotransporteurs Slc12a que l'on soit chez la souris sauvage ou chez la souris IL6^{-/-} (Figure 52B). Notre analyse d'expression génique confirme que des modifications transcriptionnelles

des co-transporteurs CCC ne sont pas en cause dans les effets de l'IL6 sur l'homéostasie chlorure de nos neurones.

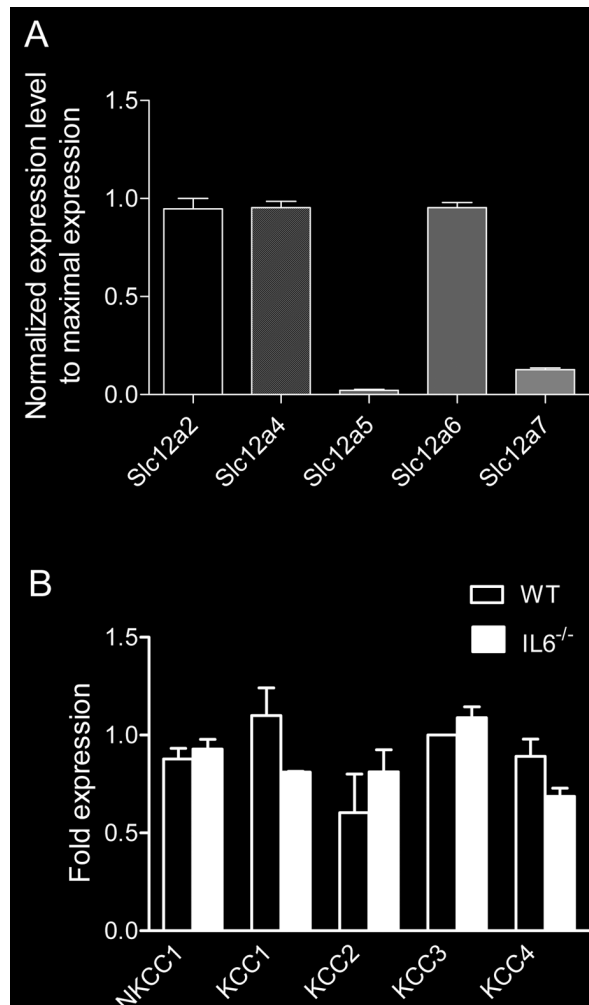


Figure 52 : Quantification par qRT-PCR de l'expression des ARNm des cotransporteurs NKCC1 (Slc12a2), KCC1 (Slc12a4), KCC2 (Slc12a5), KCC3 (Slc12a6) et KCC4 (Slc12a7) sur des ganglions rachidiens dorsaux contrôles (normalisés par rapport au co-transporteur le plus exprimé) et comparaison des niveaux d'expression après axotomie chez la WT et la souris IL6^{-/-} (expressions normalisées à l'expression de la Polymérase PolrIIIJ et exprimées en pourcentage du contrôle)

L'IL6 ne jouant pas sur le niveau d'expression des cotransporteurs, nous nous sommes demandés s'il ne jouait pas sur la phosphorylation activatrice de NKCC1, intervenant après axotomie. Nous avons donc, grâce à un anticorps spécifique de la forme phosphorylée de NKCC1, p-NKCC1, étudié le niveau d'activation de la protéine, ainsi que sa localisation. L'étude par immunohistochimie de p-NKCC1 montre que l'axotomie provoque son accumulation en péri-membranaire dans une sous-population de neurones, alors qu'aucun marquage n'apparaît chez la souris contrôle (Figure 53A et B). De manière intéressante, chez

la souris $IL6^{-/-}$, aucun marquage péri-membranaire n'est observé en contrôle ou après axotomie (Figure 53C et D).

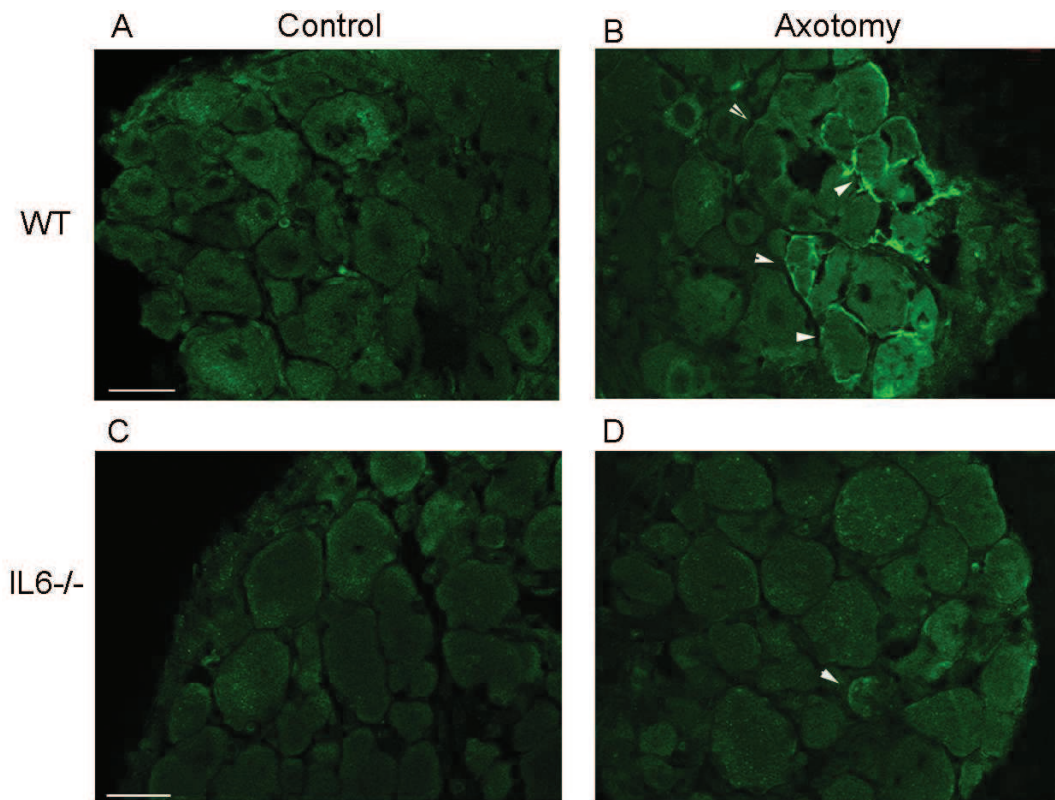


Figure 53 : Marquages immunohistochimiques au moyen d'anticorps dirigés contre la forme phosphorylée du cotransporteur NKCC1 sur des tranches de ganglions de souris WT et $IL6^{-/-}$ contrôles et axotomisées (échelle 30 μ m)

Comme pour l' $IL6$ précédemment, ces marquages de p-NKCC1 ne permettent pas de différencier une localisation membranaire neuronale d'une localisation gliale. De manière à confirmer sa présence dans les neurones, un double marquage avec la glutamine synthétase a été effectué. Les images montrent une absence de co-localisation entre les 2 marqueurs, confirmant que les neurones axotomisés expriment la forme phosphorylée de NKCC1 à leur membrane ou en tout cas, très proche de cette dernière (Figure 54).

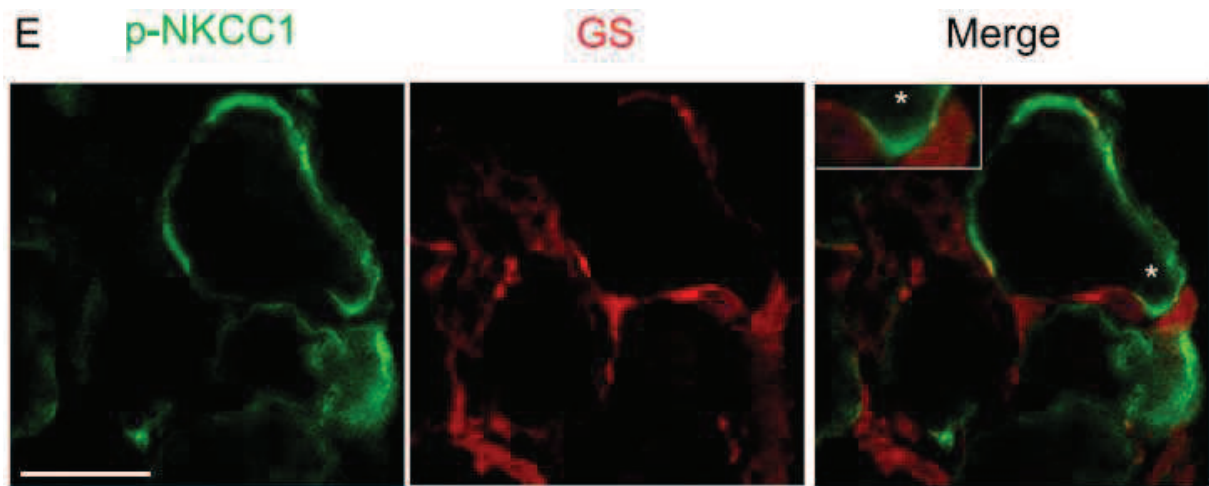


Figure 54 : Marquages immunohistochimiques par microscopie confocale aux moyens d'anticorps dirigés contre phospho-NKCC1 et la glutamine synthétase, marqueur des cellules satellites (échelle 30 μ m, encadré correspondant à un agrandissement de 3 fois d'une portion de membrane)

Afin de voir si les neurones exprimant l'IL6-R α expriment également p-NKCC1, des doubles marquages ont été réalisés sur des tranches de ganglion de souris axotomisées. Les résultats confirment la co-expression des deux protéines dans une sous-population de neurones sensitifs (Figure 55). Nous pouvons en conclure que l'IL6 permet l'expression de phospho-NKCC1 près, voire au niveau de la membrane plasmique des neurones sensitifs axotomisés exprimant l'IL6-R α

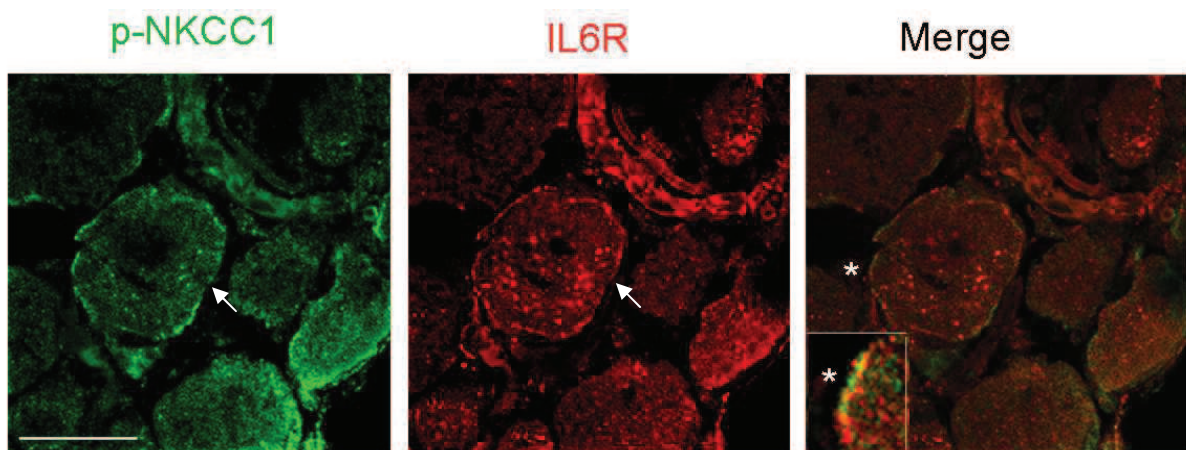


Figure 55 : Marquages immunohistochimiques par microscopie confocale aux moyens d'anticorps dirigés contre p-NKCC1 et IL6-R α (échelle 30 μ m, encadré correspondant à un agrandissement de 3 fois d'une portion de membrane)

C. Discussion de l'article

Notre étude montre qu'à la suite d'une lésion nerveuse, la cytokine Interleukine 6 et son récepteur IL6-R voient leur expression augmenter dans une sous-population de neurones sensitifs mécano- et proprioceptifs. La signalisation par l'IL6 dans les neurones axotomisés exprimant de manière constitutive l'IL6-R est responsable de l'augmentation de la concentration intracellulaire en ions chlorures et de l'expression de la forme phosphorylée de NKCC1 à la membrane de ces neurones.

De nombreuses études fonctionnelles et morphologiques ont mis en évidence que les ganglions rachidiens dorsaux n'expriment pas de manière constitutive le récepteur à l'IL6 dans des conditions physiologiques (Gadient and Otten, 1996; Thier et al., 1999; Wang et al., 2009). Ces résultats sont en corrélation avec ceux montrant, dans différents types neuronaux, et plus particulièrement les nocicepteurs, que la réponse à l'IL6 dépend d'une trans-signalisation via le récepteur IL6-R soluble (Jones et al., 2001; Obreja et al., 2005). Notre étude montre que les GRD expriment l'ARNm codant pour l'IL6-R et que la lésion augmente son expression. La lésion nerveuse induit l'expression de la protéine à la membrane plasmique des neurones sensitifs *in vivo* et *in vitro*. Autre preuve de l'expression constitutive de l'IL6-R, l'incubation des neurones axotomisés avec le récepteur IL6-R soluble inhibe l'augmentation de la $[Cl^-]_i$. Les effets antagonistes du récepteur soluble pourraient être attribués à une compétition avec le récepteur membranaire vis-à-vis de l'IL6 (Marz et al., 1999). L'augmentation d'expression du récepteur à l'IL6 en réponse à la lésion a déjà été observée dans le nerf hypoglosse et les cellules de Schwann (Hirota et al., 1996; Ito et al., 1998; Lara-Ramirez et al., 2008). Dans un modèle de douleur induite par constriction chronique (CCI), une augmentation de l'expression du récepteur IL6-R a été observée dans les cellules satellites entourant les neurones sensitifs (Dubovy et al., 2010). Au cours de ce travail, aucune co-localisation avec la glutamine synthétase, marqueur de cellules satellites, n'a été observée, ce qui confirme que la lésion nerveuse induit une signalisation par l'IL6 neuronale.

De plus, nos résultats montrent que seule une sous-population de neurones axotomisés exprime l'IL6-R. Cette population, positive pour le marqueur de neurones myélinisés, NF200, exprime également TrkB, marqueur de neurones mécanoceptifs et la Parvalbumine, marqueur de neurones proprioceptifs. Par des marquages immunocytochimiques effectués *in vitro*, nous avons confirmé que l'expression de l'IL6-R était retrouvée dans les neurones de moyen et grand diamètres. Néanmoins, en culture, 34% des neurones étaient marqués, contre 23% sur

des tranches de GRD. Ceci peut s'expliquer par le fait que la mise en culture elle-même est une forme d'axotomie, qui permettrait déjà une augmentation de l'expression de l'IL6-R dans les neurones. De manière intéressante, aucun marquage du récepteur n'a été observé dans les neurones exprimant TrkA, ce qui suggère que les neurones nociceptifs n'expriment pas l'IL6-R. Cependant des études ont montré un lien entre la signalisation de l'IL6 et les processus intervenant dans la douleur. Dans ces études, les auteurs ont mis en évidence que l'IL6 et le NGF agissaient en synergie sur la plasticité nociceptive (Cafferty et al., 2004; Melemedjian et al., 2010). Il est donc possible que le NGF induise l'expression de l'IL6-R dans les neurones TrkA. De plus, des cultures primaires à long-terme pourraient induire une expression de l'IL6-R dans les nocicepteurs (von Banchet et al., 2005). Dans ces expériences, l'IL6 endogène pourrait avoir une action paracrine sur les neurones. Après axotomie, nous avons constaté une augmentation de la $[Cl^-]_i$ dans les neurones de petit diamètre qui pourtant ne semblent pas exprimer le récepteur à l'IL6. Le fait que l'axotomie augmente l'expression du récepteur au facteur LIF dans une sous-population de nocicepteurs et que LIF intervienne dans la régénération des neurones sensitifs de petit diamètre pourrait rendre compte de l'accumulation d'ions chlorures observée dans ces neurones (Cafferty et al., 2001; Gardiner et al., 2002). De ceci, nous pouvons conclure que la régulation cellule-spécifique de l'expression de l'IL6-R est un évènement majeur dans le contrôle de la réponse à la lésion nerveuse et la régénération.

L'étude par qRT-PCR a montré que les transcrits les plus exprimés au sein de la famille Slc12a sont ceux codant pour les co-transporteurs NKCC1, KCC1 et KCC3. Nous avons confirmé que suite à l'axotomie, l'expression de NKCC1 n'était pas modifiée (Pieraut et al., 2007), pas plus que celle des KCC. Une des limites liées à cette technique est l'absence de discrimination possible entre les différentes sous-populations neuronales. En utilisant la souris IL6^{-/-}, nous n'avons trouvé aucune modification d'expression des membres de la famille. Par contre, l'utilisation d'un anticorps spécifique de la forme phosphorylée de NKCC1 a montré un marquage membranaire dans les neurones exprimant le récepteur IL6-R. De manière inattendue, phospho-NKCC1 n'a pas été retrouvé dans les neurones de petit diamètre. Notre hypothèse est que l'accumulation de Cl⁻ dans les nocicepteurs serait due soit à une inhibition de l'activité KCC, soit à la phosphorylation de NKCC1 au niveau d'un ou plusieurs autres sites que ceux détectés par notre anticorps. En effet, celui que nous avons utilisé dans notre étude reconnaît la phosphorylation des thréonines 212 et 217. Or nous savons aujourd'hui qu'il existe au moins cinq sites de phosphorylation intervenant dans la régulation de NKCC1 (Thr²⁰³, Thr²⁰⁷, Thr²¹², Thr²¹⁷ et Thr²³⁰) (Flemmer et al., 2002). Une

étude de 2008 a montré, grâce à l'utilisation d'un anticorps reconnaissant la phosphorylation des thréonines 203, 207 et 212, que ces sites étaient phosphorylés en réponse à un agent inflammatoire dans les neurones nociceptifs de petit diamètre (Funk et al., 2008). On peut donc se poser la question de l'identité des kinases phosphorylant ces thréonines. Parmi elles, on trouve les kinases SPAK et OSR1 (Delpire and Austin, 2010). Toutes deux sont sous le contrôle des kinases WNK (Kahle et al., 2010). Vitari et collaborateurs ont montré que les Thréonines 203, 207 et 212 interagissaient avec SPAK et OSR1, alors que les Thréonines 217 et 230 n'étaient phosphorylées ni par SPAK, ni par OSR1 (Vitari et al., 2006). Etant donné que notre anticorps ne reconnaît que les sites 212 et 217 phosphorylés, nous pouvons en conclure que dans notre modèle, SPAK et OSR1 ne sont pas les seules kinases activant NKCC1 après lésion nerveuse. A l'heure actuelle la signalisation IL6 permettant la phosphorylation de NKCC1 n'est pas connue. Quoi qu'il en soit, IL6 pourrait agir en inhibant la déphosphorylation et NKCC1 (Darman et al., 2001; Pieraut et al., 2007).

En conclusion, notre étude met en évidence une nouvelle mécanistique permettant la régulation de l'homéostasie chlorure dans les neurones sensitifs et prouve que la signalisation de l'IL6, via l'expression constitutive de son récepteur soluble, l'IL6-R, est une voie majeure régulant l'homéostasie chlorure dans les neurones sensitifs myélinisés axotomisés. Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives quant aux partenaires moléculaires intervenant dans la régulation chlorique.

D. Résultats complémentaires

Afin de savoir si les voies MAPK et PI3-Kinase, également activées par l'IL6, interviennent dans la régulation de l'homéostasie chlorure dans les neurones sensitifs, nous avons effectué des mesures de $[Cl^-]_i$ sur des neurones axotomisés, après traitement au moyen d'inhibiteurs de ces voies de signalisation. Ainsi, l'U0126, inhibiteur de la voie MAPK, n'a eu aucune incidence sur le potentiel d'inversion du GABA des neurones (-22.13 ± 1.79 mV (62.11 ± 4.15 mM) contre -25.71 ± 2.26 mV (54.24 ± 4.74 mM), respectivement sans et après traitement avec l'U0126) (Figure 56A). Par contre, les inhibiteurs de la voie PI3K, LY294002 et wortmaninn, ont entraîné une hyperpolarisation significative de E_{GABA} par rapport aux neurones axotomisés non traités (sans traitement : -22.13 ± 1.79 mV (62.11 ± 4.15 mM) et après traitement : -38.11 ± 3.16 mV (34.47 ± 4.29 mM) pour LY294002 et -40.56 ± 3.48 mV (31.51 ± 3.87 mM) pour la wortmaninn) (Figure 56B). Nos résultats montrent que,

contrairement à la voie MAPK, la voie PI3K est impliquée dans la régulation post-lésionnelle de l'oméostasie chlorure des neurones sensitifs.

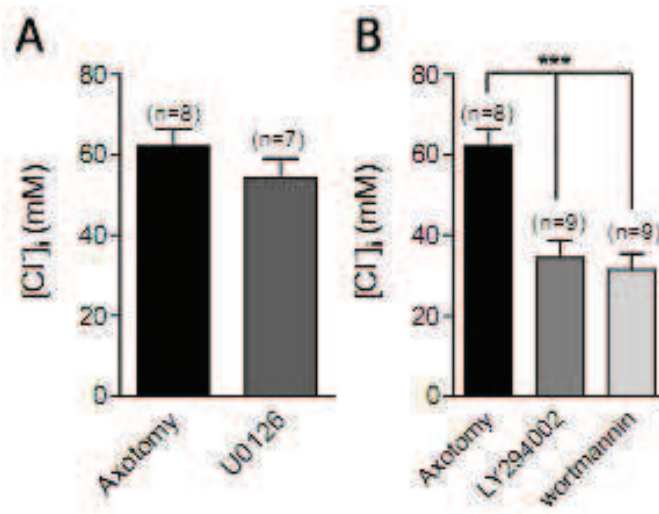


Figure 56 : Mesure des concentrations intracellulaires en ions Cl^- après traitement des neurones axotomisés avec des inhibiteurs (A) de la voie MAPK (U0126) et (B) de la voie PI3-Kinase (LY294002 et wortmannin)

2. Article soumis dans “Molecular and Cellular Neuroscience“

The cation-chloride cotransporter KCC3 contributes to intracellular chloride balance in sensory neurons

Olivier Lucas¹, Cécile Hilaire¹, Eric Delpire² and Frédérique Scamps¹

¹ *Inserm, U-583, Institute for Neurosciences of Montpellier, Montpellier, F-34000 France*

² *Vanderbilt University, Nashville, USA*

I. Régulation de l'homéostasie chlorure des neurones sensitifs par KCC3

A. Résumé et stratégie expérimentale

Dans les neurones sensitifs, l'homéostasie chlorure est principalement régulée par l'activité de NKCC1. Néanmoins, aucune étude à l'heure actuelle ne s'est intéressée à l'éventuelle présence d'un co-transport de type KCC. Le syndrome d'Andermann, caractérisé par une mutation de KCC3, est responsable d'atteintes sensorielles et motrices. De plus, la création d'une lignée de souris KCC3^{-/-}, présentant également une atteinte sensori-motrice dès la deuxième semaine post-natale, a montré que cette protéine est impliquée dans le fonctionnement du système nerveux périphérique et ce dès le développement.

En utilisant la lignée KCC3^{-/-}, nous avons étudié l'homéostasie chlorure des neurones sensitifs en culture. Nous avons ainsi observé un défaut de régulation de la [Cl⁻]_i dans une sous-population de neurones dès la première semaine post-natale et perdurant jusqu'à l'âge adulte. Ces résultats donnent de nouvelles pistes quant à la compréhension du rôle de l'homéostasie chlorure dans le SNP.

B. Résultats

1. Le switch chlorure développemental est altéré dans les neurones de souris KCC3^{-/-}

La première partie de ce travail a cherché à confirmer l'existence d'un switch chlorure dans les neurones sensitifs au cours du développement post-natal. Pour ce faire, nous avons effectué des mesures de la concentration intracellulaire en ions chlorures par une technique dérivée du patch clamp, le patch perforé. L'application d'un protocole de rampe faisant passer le potentiel de membrane de -80, potentiel de repos membranaire, à +40 mV permet, après perfusion de 50µM de Muscimol, agoniste des canaux GABA_A, de déterminer le potentiel d'inversion du GABA, ou potentiel d'inversion des ions chlorures (Figure 57). Ainsi, grâce à l'équation de Nernst, nous pouvons en conclure la [Cl⁻]_i.

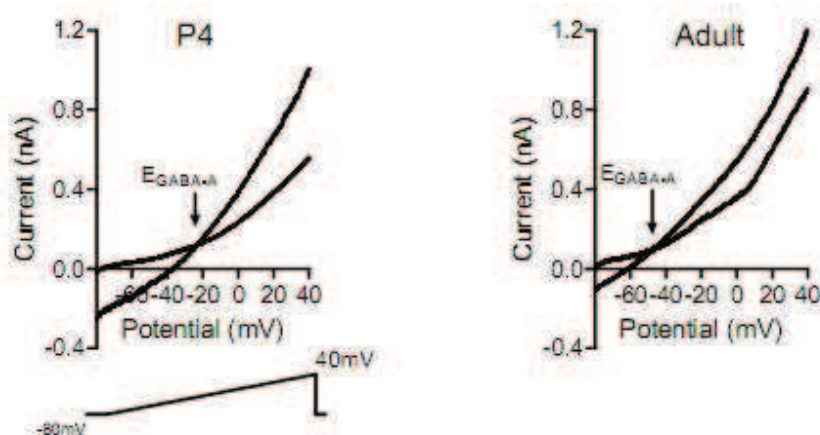


Figure 57 : Tracés électrophysiologiques types obtenus sur des neurones de souris de 4 jours et adultes en culture par application d'un protocole de rampe toutes les 5 secondes, faisant passer le potentiel de membrane de -80 à +40 mV. Les courbes sont obtenues avant et après application de 50 μ M de Muscimol, agoniste des canaux GABA_A. Le point d'intersection correspond au potentiel d'inversion du GABA (E_{GABA}), et permet, grâce à l'équation de Nernst, de calculer la $[Cl^-]_i$

L'étude des neurones de GRD $KCC3^{+/+}$ post-nataux (P2-P6) en culture a montré que le potentiel d'inversion E_{GABA} était significativement plus dépolarisé chez les souris post-natales, correspondant à une diminution de la $[Cl^-]_i$ globale au cours du développement chez la souris $KCC3^{+/+}$ (-25.85 ± 1.15 mV soit 54.1 ± 2.2 mM, $n=33$) par rapport aux adultes (-42.39 ± 1.12 mV soit 28.0 ± 1.2 mM, $n=28$) (Figure 58A). L'enregistrement des neurones de souris $KCC3^{-/-}$ n'a, contrairement aux souris $KCC3^{+/+}$, mis en évidence aucune différence significative dans le E_{GABA} entre le post-natal et l'adulte (respectivement, -32.69 ± 1.80 mV, soit 43.3 ± 3.0 mM, $n=31$ et -37.32 ± 1.76 mV, soit 35.8 ± 2.7 mM, $n=28$) (Figure 58B). Chez l'adulte $KCC3^{-/-}$, contrairement à la souris $KCC3^{+/+}$ (Figure 60B), la $[Cl^-]_i$ reste élevée dans une sous-population de neurones (Figure 61B).

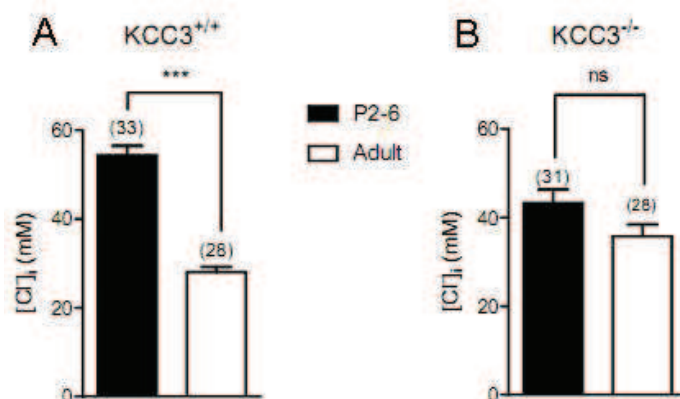


Figure 58 : Concentrations intracellulaires en ions chlorures dans des neurones de souris $KCC3^{+/+}$ et $KCC3^{-/-}$ en culture aux stades post-natal (P2 -P6) et adulte

Si l'on compare la souris KO par rapport à la WT à chacun des deux stades, on se rend compte qu'en post-natal, E_{GABA} est significativement plus dépolarisé chez la KO, alors qu'il est plus hyperpolarisé chez l'adulte. Ceci se traduit par une $[Cl^-]_i$ inférieure chez le post-natal KO (42.31 ± 3.08 mM contre 54.31 ± 2.17 mM chez la $KCC3^{+/+}$) et supérieure chez l'adulte KO (35.79 ± 2.67 mM contre 28.03 ± 1.20 mM chez la $KCC3^{+/+}$) par rapport aux $KCC3^{+/+}$ (Figure 59). $KCC3$ semble donc jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie chlorure des neurones sensitifs au cours du développement et chez l'adulte.

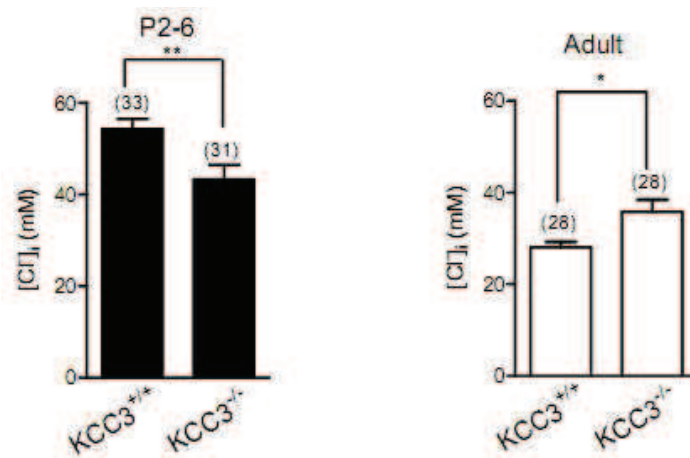


Figure 59 : Comparaison des $[Cl^-]_i$ moyennes obtenues chez les souris $KCC3^{+/+}$ et $KCC3^{+/-}$ post-natales (P2-P6) et adultes

2. La $[Cl^-]_i$ est régulée par $KCC3$ dans une sous-population de neurones

Afin de mieux caractériser les résultats ci-dessus, nous avons effectué une analyse des fréquences de distribution basée sur la $[Cl^-]_i$. Les résultats obtenus chez les souris $KCC3^{+/+}$ post-natales montrent que la majorité des neurones (85%, $n=28/33$) ont une $[Cl^-]_i$ supérieure ou égale à 45 mM. Chez l'adulte, la totalité des neurones enregistrés ont une $[Cl^-]_i$ inférieure à 45 mM ($n=28$) (Figure 60). Ces distributions sont significativement différentes (Figure 62).

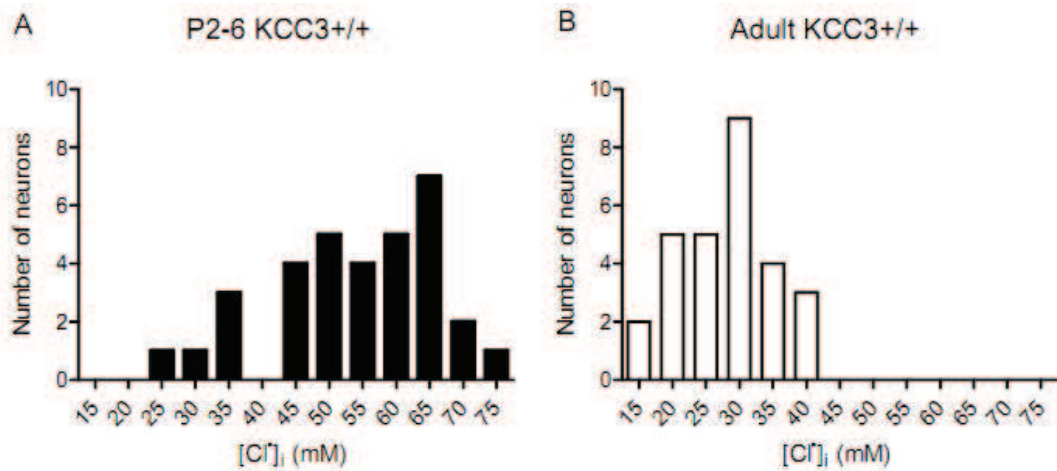


Figure 60 : Analyse des fréquences de distribution en fonction de la $[Cl^-]_i$ dans les neurones post-nataux et adultes $KCC3^{+/+}$. Les moyennes obtenues sont données dans la Figure 58A.

La même analyse effectuée chez la souris $KCC3^{-/-}$ montre que 60% des neurones (17/31) ont une $[Cl^-]_i$ inférieure à 45 mM. Au stade adulte, on voit apparaître une sous-population de neurones représentant 30% de la population totale avec une $[Cl^-]_i$ supérieure à 45mM. Autrement dit, 30% des neurones $KCC3^{-/-}$ adultes ont une $[Cl^-]_i$ doublée par rapport au contrôle. Contrairement aux contrôles, Il n'existe pas de différences significatives chez la souris $KCC3^{-/-}$ entre la distribution des neurones post-nataux et celle chez l'adultes (Figure 62). Nos résultats montrent que dans les neurones sensitifs, il existe un switch chlorure entre la première semaine post-natale et l'adulte. La délétion de $KCC3$ empêche ce switch aux deux stades de développement.

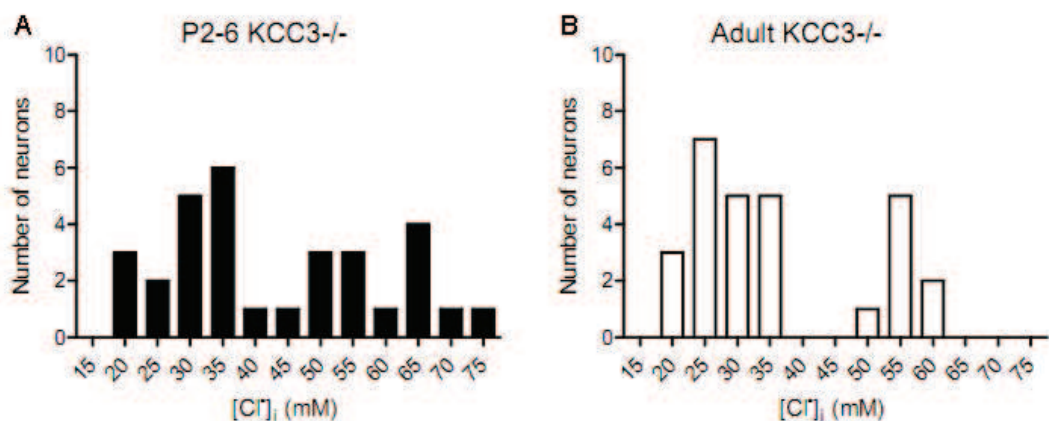


Figure 61 : Analyse des fréquences de distribution en fonction de la $[Cl^-]_i$ dans les neurones post-nataux et adultes $KCC3^{-/-}$. Les moyennes obtenues sont données dans la Figure 58B.

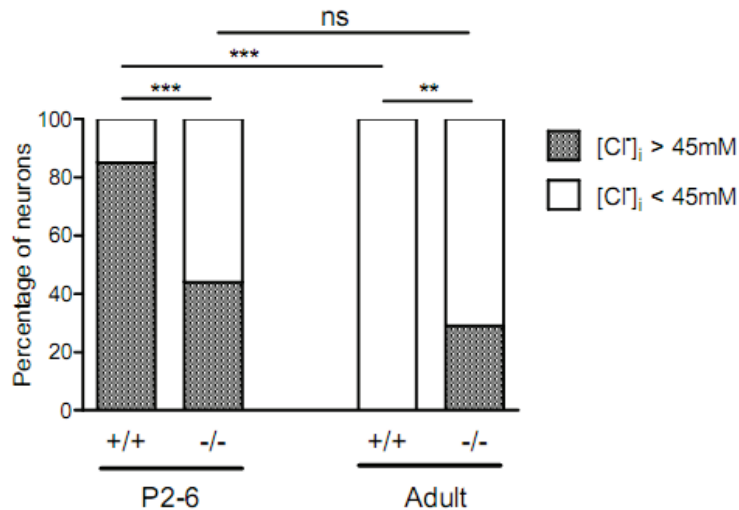


Figure 62 : Comparaison des proportions de neurones ayant une $[Cl^-]_i$ inférieure ou supérieure à 45mM aux stades post-natal et adulte chez les souris $KCC3^{+/+}$ et $KCC3^{-/-}$

3. Expression des transcrits de la famille Slc12a au cours du développement chez les souris $KCC3^{+/+}$ et $KCC3^{-/-}$

L'accumulation d'ions Cl^- peut être induite par différents mécanismes moléculaires, comme une augmentation de l'expression ou de l'activité de NKCC1, ou une diminution de l'expression ou de l'activité de KCCs. De manière à comprendre ce qui régule l'homéostasie chlorure au cours du développement, nous avons effectué des qRT-PCR sur les différents membres de la famille des CCC au cours du développement post-natal (P4) et chez l'adulte. Les résultats reportés sur la Figure 63A correspondent à une comparaison des expressions relatives des CCC à chaque stade, normalisés à l'expression la plus élevée. Dans la Figure 63B, sont analysés les ratios d'expression, normalisés à la Polr2j, des différents co-transporteurs au cours du développement. Nous constatons que chez le post-natal et l'adulte, les CCC les plus exprimés sont KCC1 (Slc12a4) (respectivement 0.90 ± 0.05 n=4 et 0.87 ± 0.02 n=4), KCC3 (Slc12a6) (respectivement 0.48 ± 0.03 n=5 et 0.96 ± 0.02 n=5) et NKCC1 (Slc12a2) (respectivement 0.92 ± 0.08 n=5 et 0.96 ± 0.02 n=5) (contre 0.06 ± 0.01 n=4 et 0.08 ± 0.01 n=5 pour KCC2 (Slc12a5), et 0.08 ± 0.01 n=5 et 0.10 ± 0.00 n=5 pour KCC4 (Slc12a7)) (Figure 63A). Si l'on compare les niveaux d'expression relatifs entre le post-natal et l'adulte, KCC3 est doublé (0.48 ± 0.03 n=5 en post-natal contre 0.96 ± 0.02 n=5 chez l'adulte) alors que les autres co-transporteurs ne bougent pas (Figure 63A). De plus, Bien que tous les ARNm des co-transporteurs de la famille soient significativement augmentés chez l'adulte (1.7 ± 0.06 pour KCC1 n=4, 1.9 ± 0.24 n=4 pour KCC2, 2.14 ± 0.33 n=4 pour KCC4

et 1.6 ± 0.17 n=5 pour NKCC1), KCC3 est celui qui présente la plus forte augmentation (3.26 ± 0.22 n=5) (Figure 63B).

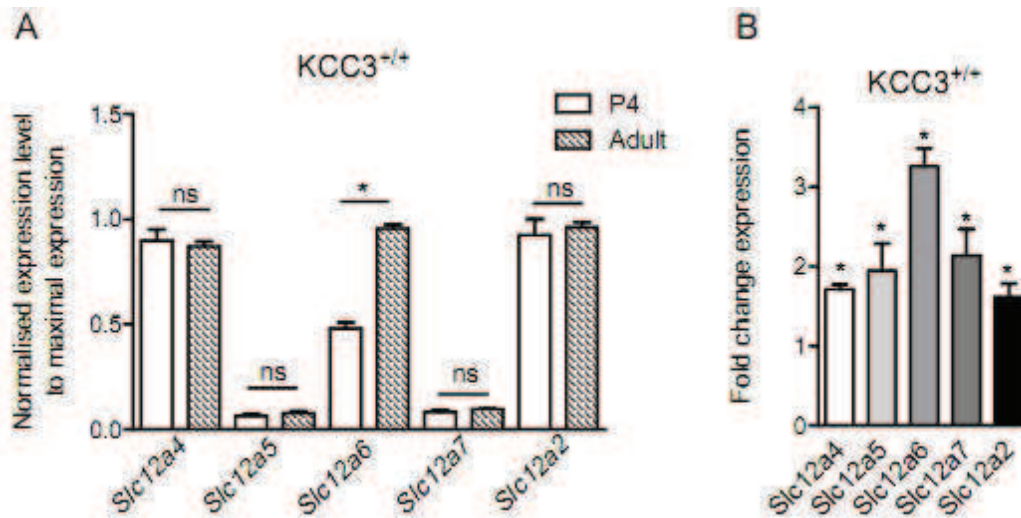


Figure 63 : Quantification par qRT-PCR chez la souris KCC3^{+/+} (A) de l'expression relative, normalisée à l'expression maximale (Slc12a2), des co-transporteurs cation-chlorure au cours du développement (P4) et chez l'adulte et (B) du pourcentage de variation d'expression chez l'adulte, normalisée à l'expression de la Polr2j, par rapport au post-natal. Les données ont été obtenues à partir de quatre expériences, chacune faite sur des duplicats.

Chez la souris KCC3^{-/-}, nous n'observons pas non plus de différence entre le post-natal et l'adulte dans l'expression relative des co-transporteurs KCC1 (respectivement 0.91 ± 0.07 n=5 et 0.81 ± 0.05 n=5), KCC2 (respectivement 0.07 ± 0.01 n=5 et 0.05 ± 0.00 n=5), KCC4 (respectivement 0.1 ± 0.01 n=5 et 0.12 ± 0.00 n=5) et NKCC1 (respectivement 0.96 ± 0.02 n=5 et 1.00 ± 0.00 n=5) (Figure 64A). Les niveaux d'expression normalisés au post-natal montrent également des augmentations significatives d'expression des différents ARNm (1.77 ± 0.17 n=5 pour KCC1, 1.6 ± 0.16 n=4 pour KCC2, 2.78 ± 0.55 n=4 pour KCC4 et 2.3 ± 0.40 n=4 pour NKCC1) (Figure 64B).

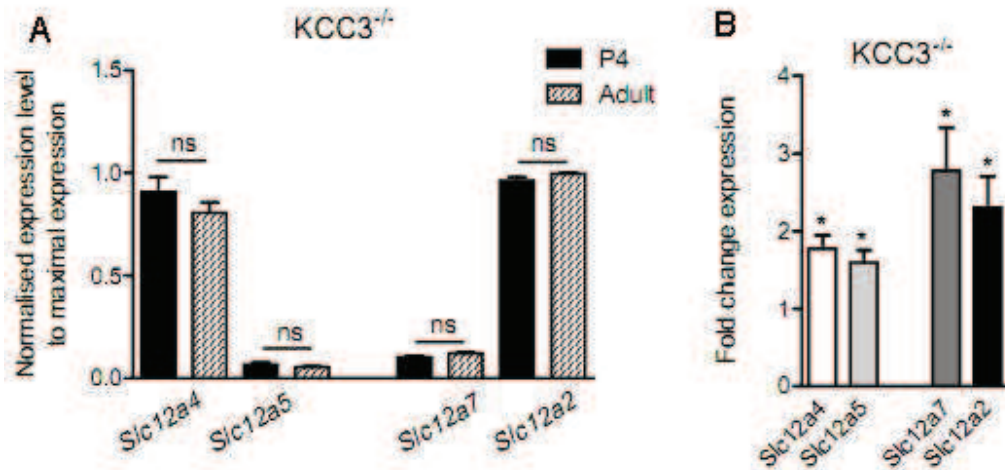


Figure 64 : Quantification chez la souris *KCC3*^{-/-} par qRT-PCR de (A) l'expression relative, normalisée à l'expression maximale, des co-transporteurs cation-chlorure au cours du développement (P4) et chez l'adulte et (B) la variation d'expression chez l'adulte, normalisée à la *Polr2j*, par rapport au post-natal. Les données ont été obtenues à partir de quatre expériences, chacune faite sur des duplicats.

Nous avons ensuite voulu savoir si la délétion de *KCC3* induisait des modifications d'expression transcriptionnelle chez les autres CCC. L'analyse des expressions des ARNm codant pour les CCC n'a montré aucune différence entre les souris *KCC3*^{+/+} et *KCC3*^{-/-} que l'on soit chez le post-natal (respectivement 1.01 ± 0.04 n=2 et 1.0 ± 0.00 n=3 pour *KCC1*, 1.02 ± 0.05 n=3 et 1.00 ± 0.00 n=3 pour *KCC2*, 1.01 ± 0.03 n=3 et 1.00 ± 0.00 n=3 pour *KCC4*, 1.09 ± 0.00 n=3 et 0.92 ± 0.01 n=3 pour *NKCC1*) (Figure 65A) ou chez l'adulte (respectivement 0.80 ± 0.18 n=3 et 1.00 ± 0.00 n=3 pour *KCC1*, 1.12 ± 0.00 n=3 et 0.81 ± 0.01 n=3 pour *KCC2*, 0.74 ± 0.01 n=3 et 1.00 ± 0.00 n=3 pour *KCC4*, 0.81 ± 0.02 n=3 et 1.00 ± 0.00 n=3 pour *NKCC1*) (Figure 65B). Notre analyse d'expression génique montre que l'augmentation d'expression de *KCC3* dans une sous-population de neurones sensitifs pourrait permettre la sortie d'ions Cl⁻. L'absence de *KCC3* mène à une accumulation d'ions Cl⁻.

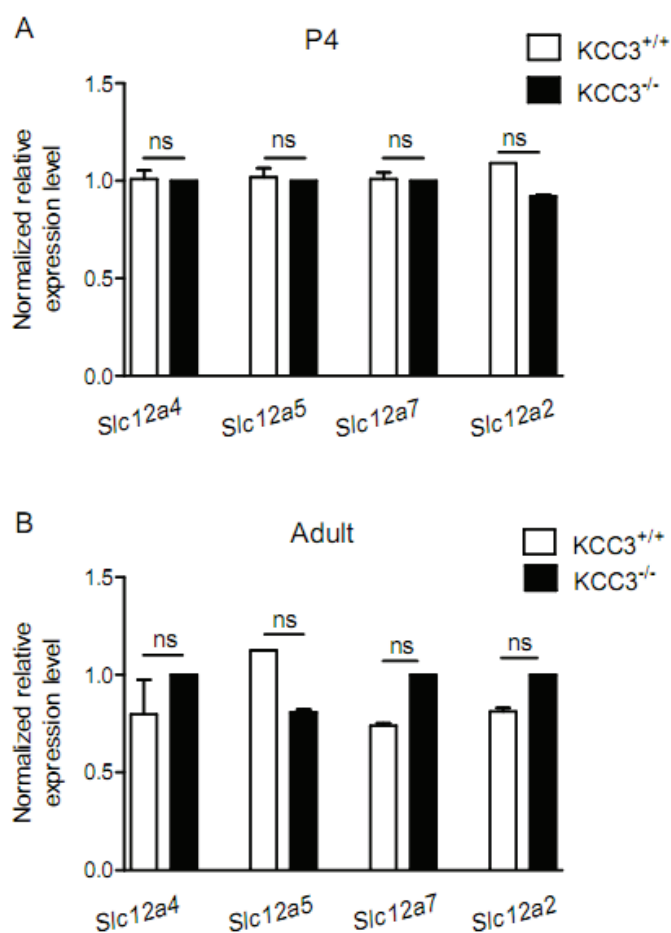


Figure 65 : Comparaison de l'expression relative, normalisée à la Polr2J, des CCC entre KCC3^{+/+} et KCC3^{-/-} chez (A) le post-natal et (B) l'adulte

4. KCC3 est exprimé dans une sous-population de neurones sensitifs

Par une approche pharmacologique, nous avons voulu reproduire les effets du KO de KCC3 sur l'homéostasie chlorure des neurones sensitifs. Ainsi, le traitement avant enregistrement, durant 1 heure, avec un inhibiteur de KCC, le DIOA (30 μ M) (Figure 66B), fait apparaître, comme chez la souris KCC3^{-/-}, une sous-population à forte concentration en ions Cl⁻ n'existant pas dans les neurones non traitée (Figure 66A). Cette sous-population représente ici encore 30% de la population totale (Figure 66C).

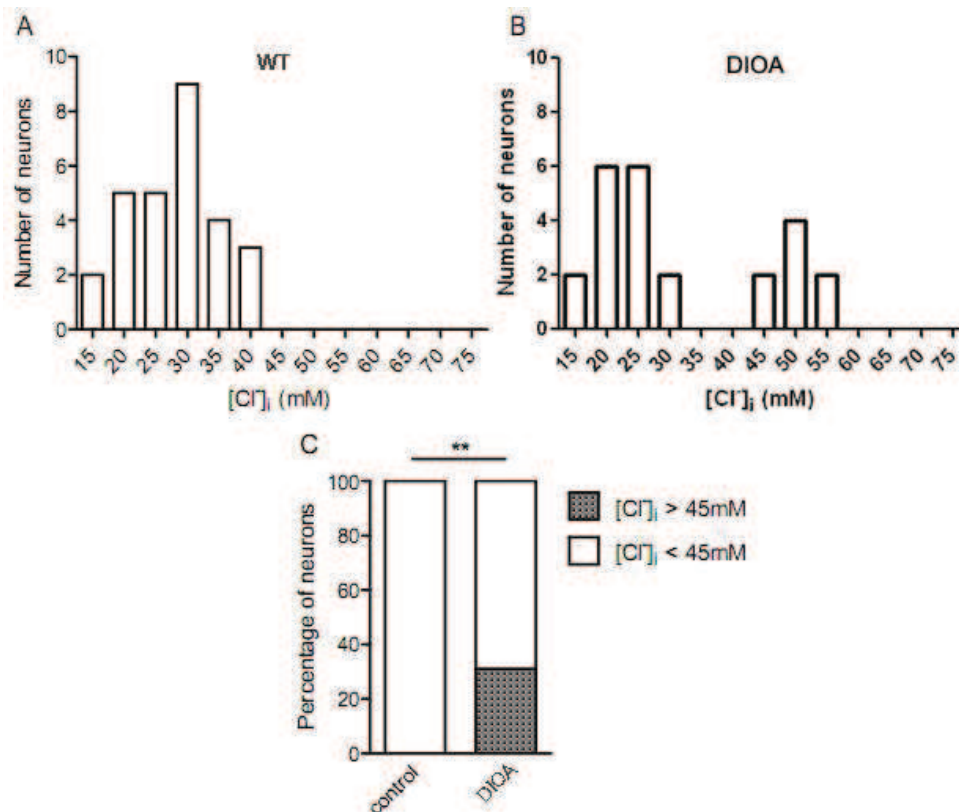


Figure 66 : Fréquences de distribution des neurones en fonction de leur $[Cl]_i$, obtenues chez des neurones de souris $KCC3^{+/+}$ (A) sans traitement et (B) après traitement au DIOA ($30\mu M$), un inhibiteur des KCCs.

Pour confirmer l'expression neuronale de KCC3, nous avons utilisé l'une des particularités du transgène, à savoir l'insertion dans l'exon 3 du gène *Slc12a6*, du gène bactérien *LacZ*, codant pour la β -galactosidase. Ainsi, les cellules exprimant normalement KCC3 expriment à la place la β -galactosidase. Au moyen de son substrat, le X-Gal (ou 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside), nous avons voulu mettre en évidence les neurones exprimant le gène *LacZ*. Afin de s'assurer de la spécificité du signal, nous avons comparé les marquages à deux différents temps d'incubation. La révélation fait apparaître, au bout de 9h d'incubation, dans les coupes de GRD $KCC3^{-/-}$ un marquage ponctiforme intra-neuronal dans une sous-population de neurones (Figure 67B), absent dans les coupes de GRD $KCC3^{+/+}$ (Figure 67A). Après une nuit de révélation, une coloration bleutée apparaît également dans les neurones de souris $KCC3^{+/+}$ (Figure 67D), mais de manière moins importante que pour les neurones de souris $KCC3^{-/-}$ (Figure 67C). Il semble que ce marquage corresponde à l'expression d'une β -galactosidase endogène. Afin de ne pas contaminer nos résultats avec le signal endogène, nous avons effectué le comptage après 9h de révélation.

Ainsi, nous avons obtenu un marquage dans 34% (1116/3251) des neurones $KCC3^{-/-}$. Aucun marquage des cellules satellites gliales n'a été détecté.

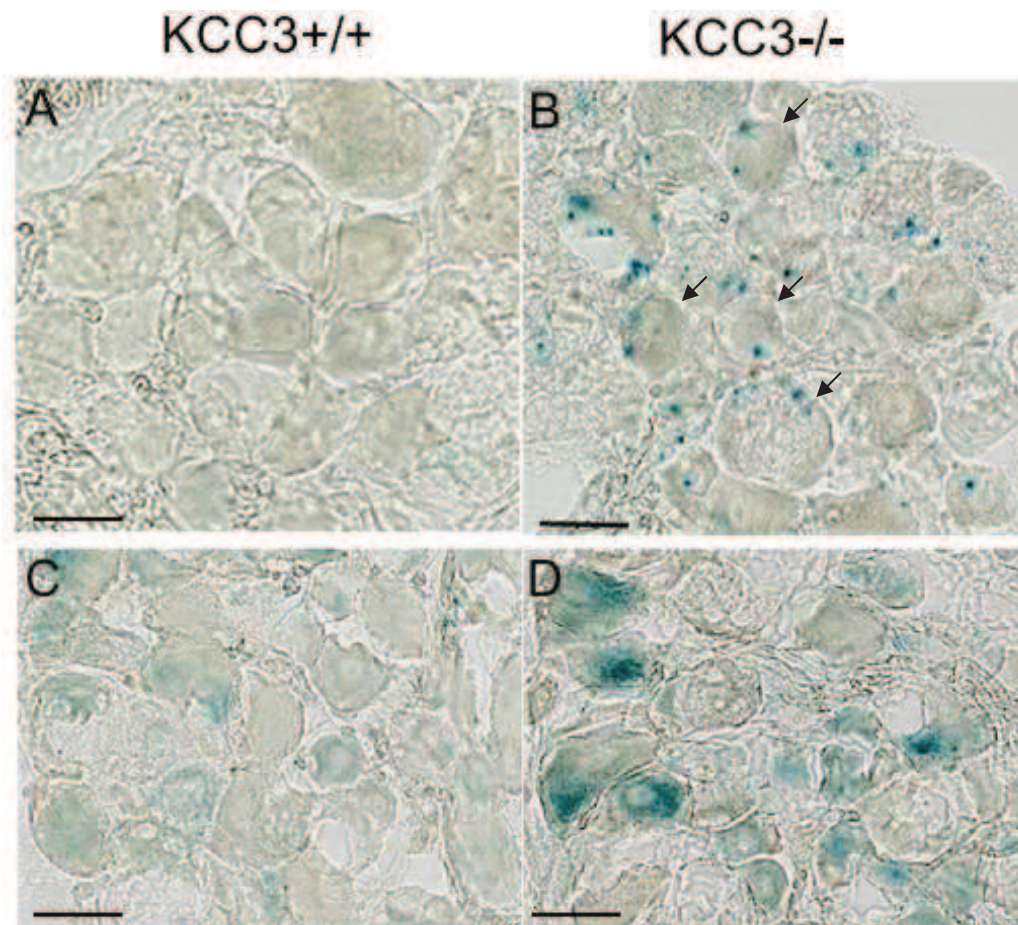


Figure 67 : Révélation de la β -galactosidase grâce à son substrat, le X-gal. Le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indol- β -D-galactopyranoside) est transformé en un produit de dégradation bleu permettant de voir les cellules marquées. Les photos A et B correspondent à des temps de révélation de 9 heures et les photos C et D, des temps de révélation d'une nuit (échelle 30 μ m)

Des marquages immunohistochimiques ont également été effectués au moyen d'un anticorps anti-KCC3 reconnaissant la partie C-terminale. L'analyse des marquages montre que 30% (1501/4778) des neurones sensitifs de souris $KCC3^{+/+}$ sont positifs pour la protéine (Figure 68D). Aucun marquage n'est observé dans les coupes de GRD $KCC3^{-/-}$ (Figure 68B), ce qui montre la spécificité de notre anticorps.

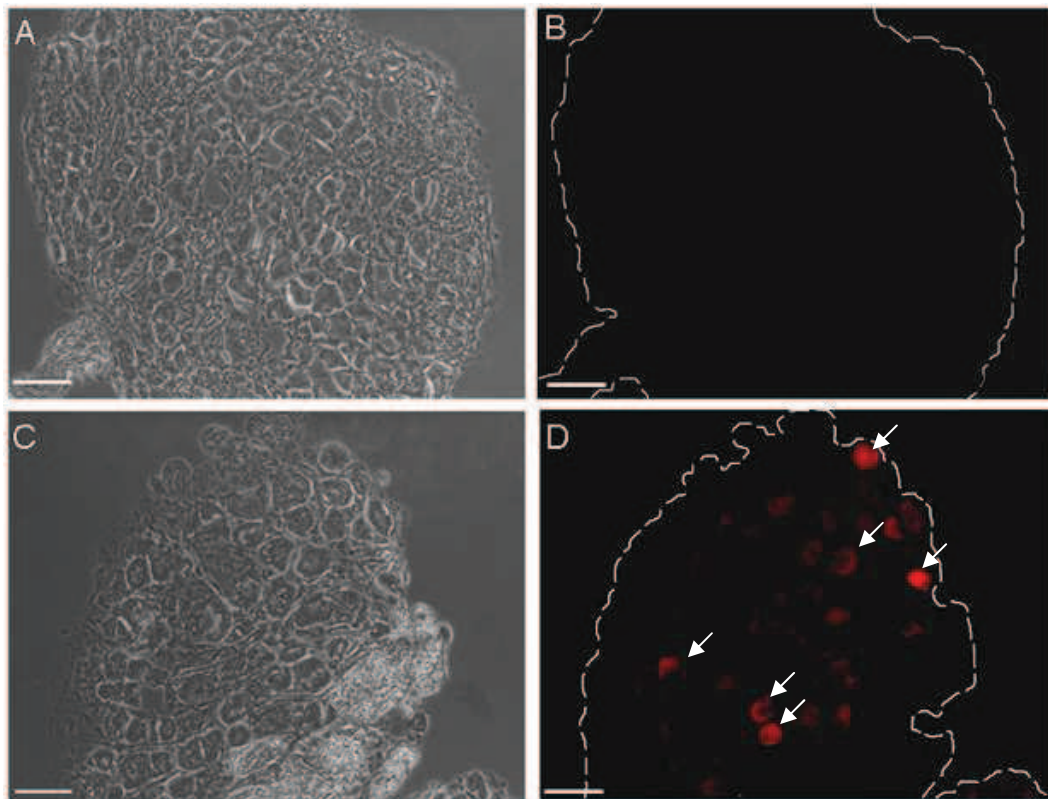


Figure 68 : Photos en contraste de phase (A, C) et marquages immunohistochimiques anti-KCC3 correspondants (B, D) sur des coupes de GRD de souris KCC3^{-/-} (A, B) et KCC3^{+/+} (C, D) (échelle 100 μ m)

5. KCC3 est exprimé par des mécanoccepteurs et des nocicepteurs

De manière à mieux caractériser la sous-population de neurones exprimant KCC3, nous avons effectué des doubles marquages immunohistochimiques avec des marqueurs connus de populations de neurones sensitifs (Figure 69). L'analyse de ces données révèle que parmi les neurones KCC3⁺, 70% sont myélinisés (NF200), 37% expriment le marqueur neuronale de nociception TrkA (récepteur du NGF), 49% le marqueur de mécanocception TrkB (récepteur du BDNF et de la NT4) et qu'aucun n'est positif pour la Parvalbumine, marqueur de proprioception (Figure 70A).

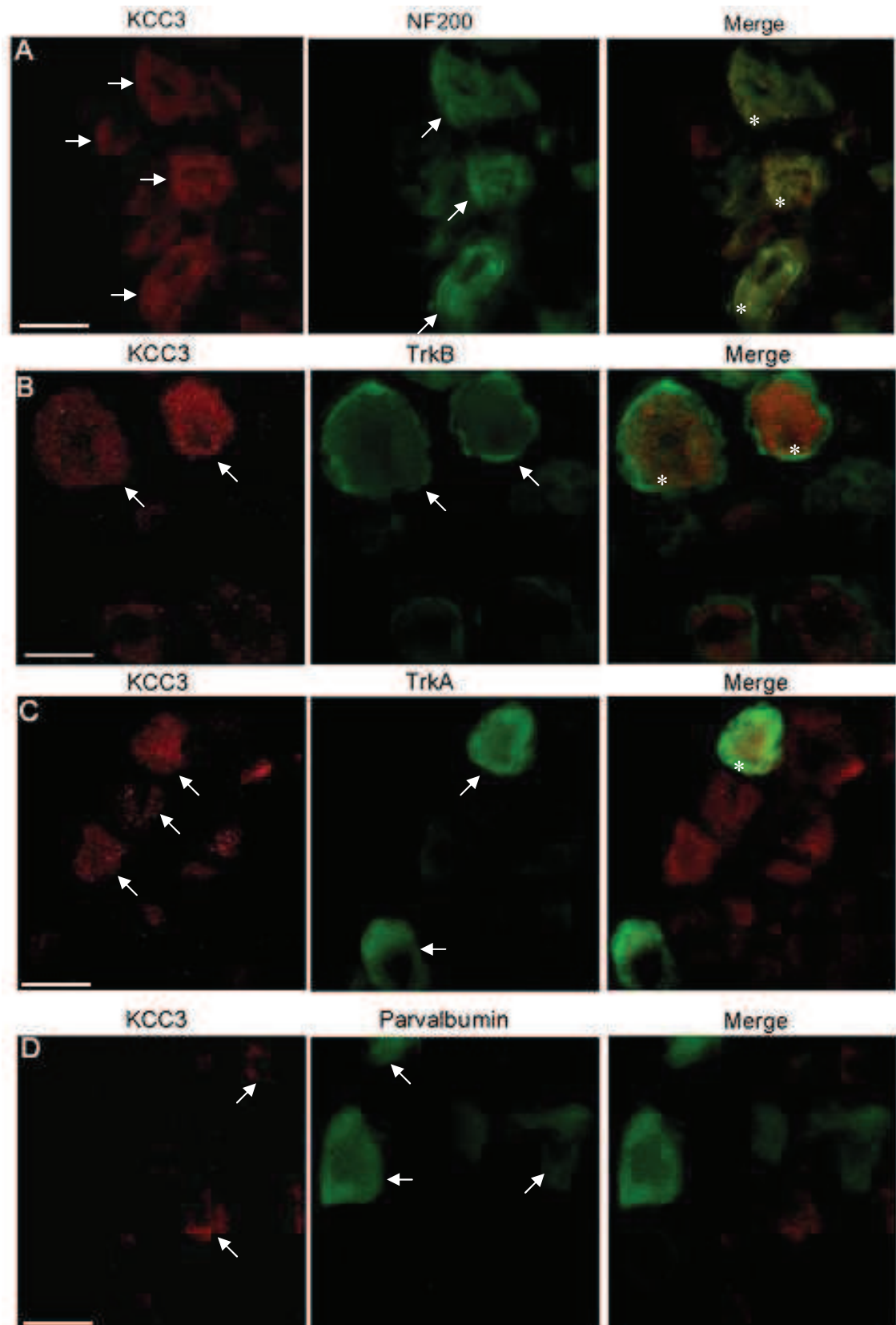


Figure 69 : Doubles-marquages immunohistochimiques sur tranches de ganglions permettant de caractériser les neurones myélinisés (NF200) (A), les neurones mécanocéptifs (TrkB) (B), les neurones nociceptifs (TrkA) (C) et les neurones proprioceptifs (Parvalbumine) (D) parmi les neurones exprimant KCC3 (KCC3) (échelle 30 μ m)

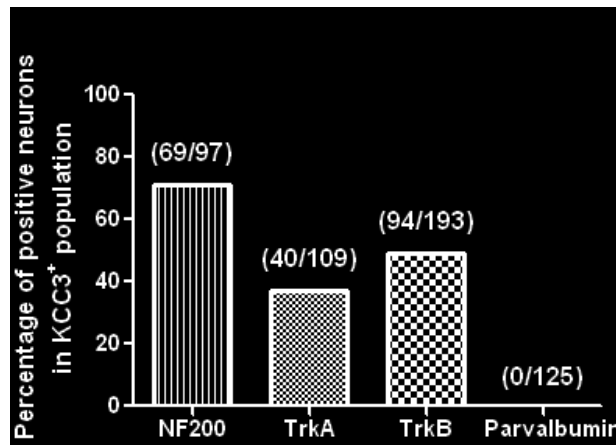


Figure 70 : Analyse du pourcentage de neurones myélinisés (NF200), nociceptifs (TrkA), mécanocéptifs (TrkB) ou proprioceptifs (Parvalbumine) parmi les neurones KCC3⁺

C. Discussion de l'article

Les résultats présentés dans cette étude montrent qu'il existe un switch chlorure développemental dans les neurones sensitifs se produisant après la première semaine post-natale. Ce switch est absent dans les neurones de souris KCC3^{-/-}. KCC3 est exprimé dans une sous-population de neurones sensitifs de GRD, dans laquelle il contribue à maintenir un niveau faible d'ions Cl⁻.

(1) Homéostasie chlorure des neurones sensitifs adultes

Des mesures par la technique de patch perforé au moyen de la gramicidine ont révélé une [Cl⁻]_i significativement supérieure dans les neurones post-nataux (54 mM) par rapport à l'adulte (28 mM). Le potentiel d'équilibre par transport passif des ions Cl⁻ prévoit une [Cl⁻]_i de l'ordre de 13 mM (Rocha-Gonzalez et al., 2008), ce qui suggère que NKCC1, co-transporteur permettant l'entrée d'ions Cl⁻, est le principal mécanisme maintenant une concentration élevée de Cl⁻ dans les neurones sensitifs. L'inhibition pharmacologique de NKCC1 et l'étude de la souris NKCC1^{-/-} ont démontré que NKCC1 est le co-transporteur qui contrôle l'accumulation d'ions Cl⁻ dans les neurones sensitifs adultes (Sung et al., 2000; Pieraut et al., 2007). Cependant, la diminution de l'homéostasie chlorure retrouvée dans les neurones sensitifs adultes comparée aux neurones post-nataux peut être attribuée soit à une diminution de l'activité de NKCC1, soit à une augmentation de l'activité des co-transporteurs KCC. Le ratio d'expression de ces cotransporteurs chlorure est primordial pour permettre la modification du potentiel d'inversion des ions Cl⁻ au cours du développement. Nos résultats

montrent que la maturation induit une augmentation de la transcription à la fois de NKCC1 mais également des KCC, ce qui, en fonction de leur importance fonctionnelle relative, pourrait expliquer la diminution de la $[Cl^-]_i$ chez l'adulte. Au cours de ce travail, nous avons montré que l'inhibition pharmacologique des KCC au moyen de DIOA induisait une augmentation de la $[Cl^-]_i$ dans un tiers des neurones sensitifs adultes, confortant que l'activité de type KCC régule la sortie d'ions Cl^- . Dans les neurones centraux, l'expression de KCC2 est concomitante à la maturation et à l'émergence d'une faible concentration en ions chlorures (Stein et al., 2004). Bien que le rôle de KCC2 dans le système nerveux central fait de lui un candidat légitime pour l'extrusion d'ions Cl^- dans les neurones périphériques, l'utilisation de la souris $KCC3^{-/-}$ démontre que la sortie d'ion Cl^- est assurée par l'activité KCC3 dans une sous-population de neurones sensitifs. En utilisant l'expression de la β -galactosidase et l'immunohistochimie, nous avons confirmé l'expression de KCC3 dans une sous-population de neurones sensitifs de GRD adultes. De plus, nos données montrent que les neurones insensibles au DIOA ne sont pas sous le contrôle de KCC2. Ceci pourrait être contrôlé par l'activité des kinases-phosphatases sur NKCC1. Les osmo-senseurs que sont SPAK et OSR1 pourraient intervenir dans la régulation cellule spécifique de la concentration intracellulaire en ions Cl^- (Delpire and Austin, 2010).

(2) Homéostasie chlorure des neurones sensitifs post-nataux

De manière surprenante, dans les neurones sensitifs $KCC3^{-/-}$, la $[Cl^-]_i$ est similaire entre le post-natal (32 mM) et l'adulte (37 mM). Ces résultats montrent que, contrairement à l'adulte, KCC3 interviendrait dans la maintenance de la forte concentration en ions Cl^- juste après la naissance. On peut supposer que les effets de KCC3 sur l'accumulation d'ions Cl^- dans les neurones sensitifs post-nataux pourraient être liés à des effets indirects affectant le système de régulation de l'homéostasie chlorure. En effet, il a été montré que l'hypertension retrouvée chez les souris $KCC3^{-/-}$ ne serait pas directement liée à des modulations de la $[Cl^-]_i$ dans les cellules vasculaires, mais plutôt à des effets neurogéniques via le système sympathique (Rust et al., 2006). Ceci serait cohérent avec le fait que des changements dans l'homéostasie chlorure, médiés par des récepteurs, apparaissent à des moments clés de la vie. En effet, au moment de la délivrance, l'ocytocine maternelle diminue de manière transitoire la $[Cl^-]_i$ de façon à protéger les neurones centraux du stress de la naissance (Tyzio et al., 2006). Notre étude ouvre de nouvelles perspectives quant au fait qu'après la naissance, des régulations médiées par des récepteurs pourraient intervenir de manière transitoire dans le SNP, aboutissant à une augmentation de l'état de phosphorylation de NKCC1. Ces

phosphorylations joueraient un rôle fondamental non seulement dans des conditions physiopathologiques, mais également au cours de l'ontogénie des neurones sensitifs.

(3) Le phénotype de la souris KCC3^{-/-} permet-il de comprendre le rôle de la régulation de l'homéostasie chlorure dans les neurones sensitifs ?

Des modifications d'homéostasie chlorure chez la souris KCC3^{-/-} ont déjà été observées à P2 et les signes morphologiques de la neuropathie périphérique se développent au même moment, soit à partir de P1 (Boettger et al., 2003; Byun and Delpire, 2007). L'analyse morphométrique du nerf sciatique de souris KCC3^{-/-} montre que dans les premiers stades de la pathologie, la myélinisation est normale, mais le diamètre des axones est augmenté (Byun and Delpire, 2007). KCC3 intervient dans le phénomène de RVD (*Regulatory Volume Decrease*), ce qui expliquerait les défauts de régulation volumique dans le nerf périphérique de la souris KCC3^{-/-}. En plus de la régulation volumique, nos données supposent que la dépolarisation induite par les courants chlorures dans le système nerveux périphérique pourrait jouer un rôle fonctionnel pour le développement et le fonctionnement adéquat des neurones post-nataux. Un shift dans le potentiel d'équilibre des ions Cl⁻ au dessus du seuil de potentiel d'action, à -25 mV, pourrait aboutir à des effets excitateurs comme ceux observés au cours de l'inflammation neurogénique chez l'adulte et pourrait intervenir dans la formation des connections synaptiques durant la maturation post-natale.

En conclusion, l'absence d'un switch chlorure dans les neurones sensitifs KCC3^{-/-} apporte de nouvelles connaissances quant à la complexité des mécanismes cellulaires régulant l'homéostasie chlorure au cours de la maturation. Contrairement aux neurones post-nataux, KCC3 pourrait intervenir directement dans l'établissement de la concentration cytoplasmique en ions chlorures dans une sous-population de neurones sensitifs adultes.

D. Résultats complémentaires : Mesure d'excitabilité des neurones

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le GABA est connu pour être, avec la glycine, le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. En effet, son récepteur ionotropique, GABA_A, permet l'entrée ou la sortie d'ions Cl⁻ en fonction des concentrations intracellulaires et extracellulaires en chlorure.

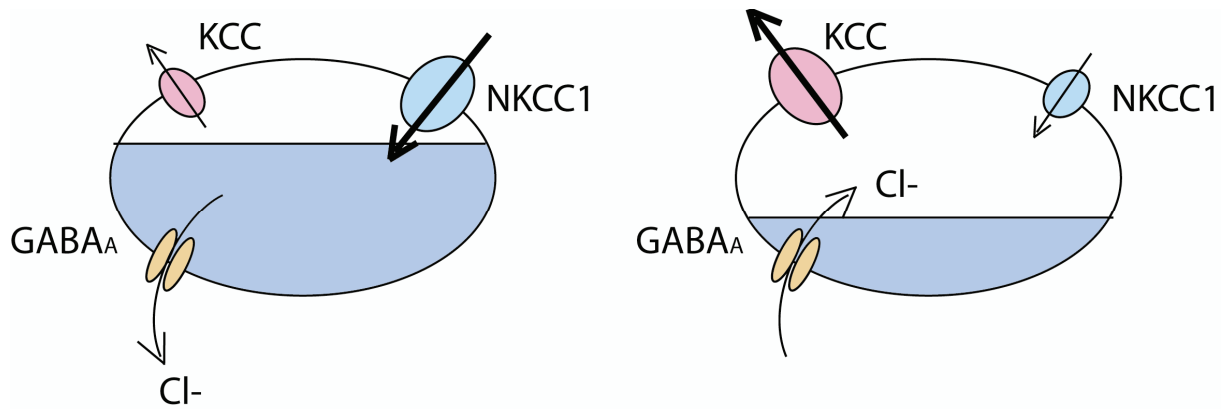


Figure 71 : Conséquences de la concentration intracellulaire en ions chlorures sur l'activité du canal ionotropique GABA_A.

Comme le montre la Figure 71, en fonction des activités respectives de NKCC1 et du ou des KCCs, la concentration intracellulaire en ions chlorures est plus ou moins importante. La $[Cl^-]_i$ dans les neurones sensitifs est relativement élevée, voir même très élevée dans une sous-population de neurones $KCC3^{-/-}$, ce qui entraîne une sortie d'ions Cl^- après ouverture des canaux GABA_A. Si la dépolarisation générée est suffisante pour en atteindre le seuil d'activation, une activité électrique se produit. Dans le cas contraire, la dépolarisation induit une inactivation des canaux sodiques et calciques dépendants du voltage (« gate control »).

La technique que nous avons utilisée pour étudier les conséquences de l'absence de KCC3 sur la physiologie neuronale est la mesure de calcium intracellulaire, basée sur l'utilisation d'un fluorophore calcique, le Fura-2 AM. En effet, si la concentration en ions chlorures est suffisante pour induire un potentiel d'action, nous devons pouvoir générer, via les canaux calciques dépendant du voltage, une entrée majeure d'ions Ca^{2+} dans la cellule.

La Figure 72 présente 2 tracés types obtenus par imagerie calcique sur des cultures de neurones sensitifs lombaires adultes de souris sauvages et $KCC^{-/-}$ enregistrés environ 2h après la mise en culture.

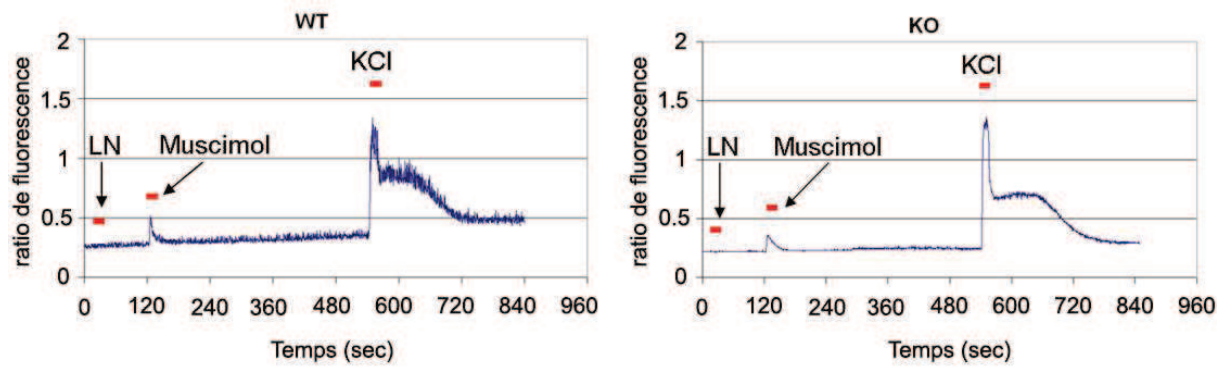


Figure 72 : Tracés obtenus par imagerie calcique sur des neurones $KCC3^{+/+}$ et $KCC3^{-/-}$. Du Lock Normal, du Muscimol $50\mu\text{M}$ et une solution de KCl 50mM sont perfusés respectivement au bout de 30 sec, 120 sec et 540 sec.

Les mesures par imagerie calcique des variations de calcium intracellulaire montrent que 29% (29/98) des neurones $KCC3^{+/+}$ et que 34% (37/109) des neurones $KCC3^{-/-}$ répondent au muscimol par une entrée de calcium (Figure 73). De plus, aucune différence significative n'a été observée dans les amplitudes de réponse à la perfusion de KCl 50mM (1.43 ± 0.08 et 1.24 ± 0.11 , respectivement pour les neurones $KCC3^{+/+}$ et $KCC3^{-/-}$) ou de Muscimol $50\mu\text{M}$ (0.17 ± 0.04 et 0.14 ± 0.02 , respectivement pour les neurones $KCC3^{+/+}$ et $KCC3^{-/-}$) (Figure 74). Ces résultats montrent donc que $KCC3$ ne régit pas l'excitabilité au muscimol seul dans les neurones sensitifs en culture.

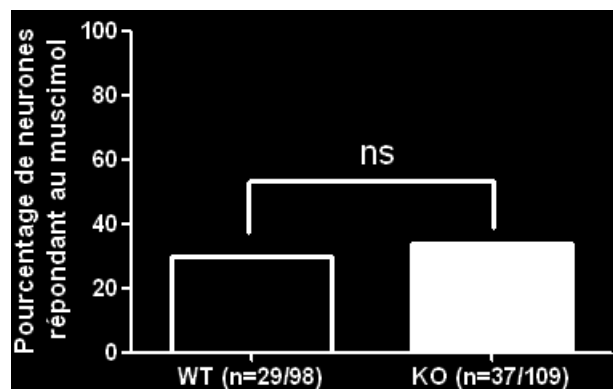


Figure 73 : Pourcentage de neurones $KCC3^{+/+}$ et $KCC3^{-/-}$ en culture répondant au muscimol par une augmentation de calcium intracellulaire

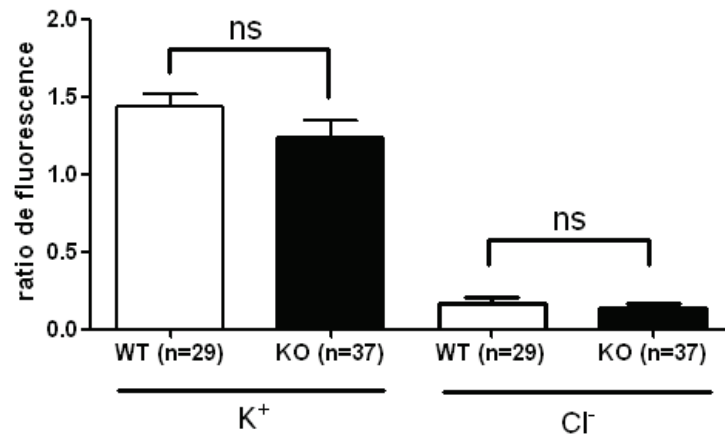


Figure 74 : Amplitude de réponse des neurones sensitifs adultes, après 24h de culture, à la perfusion (A) de KCl 50mM dans les neurones ne répondant pas au muscimol et (B) de KCl 50mM et de muscimol 50µM dans des neurones répondant au muscimol.

DISCUSSION GENERALE

I. Homéostasie chlorure

A. Les neurones sensoriels périphériques post-nataux

Dans le SNC, un très grand nombre d'études a démontré que les neurones effectuaient un switch chlorure au cours des deux semaines suivant la naissance. Dans les neurones périphériques, il existe un flou sur l'existence de ce switch en raison de la forte $[Cl^-]_i$ conservée chez l'adulte. Les résultats concernant les neurones de ganglions rachidiens dorsaux sont, selon les études, contradictoires. En effet, en utilisant l'imagerie chlorure, basée sur l'utilisation du MQAE, le groupe du Dr Frings a mis en évidence un switch de cette concentration entre 6 et 14 jours après la naissance (Gilbert et al., 2007). A l'inverse, Rocha-Gonzales et coll. n'ont pas observé cette modification. Ils avancent que à P1, comme à P21, les neurones ont une $[Cl^-]_i$ élevée (Rocha-Gonzalez et al., 2008). Chabwine et coll. ont mesuré des valeurs identiques de $[Cl^-]_i$ chez des rats au stade E14 (Chabwine et al., 2009). Au cours de notre étude, basée sur l'utilisation d'une technique électrophysiologique, nous avons constaté que entre P2 et P6, 80% des neurones possédaient une $[Cl^-]_i$ élevée. Une des hypothèses que nous pouvons avancer est l'âge auquel ces études ont été menées. En effet, alors que Rocha-Gonzales et coll. ont travaillé sur des animaux de P0-P1, Gilbert et coll. ont travaillé entre P1 et P4. Or, depuis les travaux du Dr Ben Ari, nous savons qu'au moment de la naissance, certaines hormones, comme l'ocytocine, sont capables de modifier brutalement et transitoirement, l'homéostasie chlorure dans les neurones sensoriels (Tyzio et al., 2006). Rien n'empêche de penser qu'un mécanisme similaire puisse se produire dans les neurones sensoriels, qui sont également au premier rang en ce qui concerne le traumatisme de la naissance. D'autre part, notre étude, comme celle de Gilbert et coll. a été conduite sur des souris, et non des rats. Il existe de nombreuses différences entre ces deux espèces pouvant être à l'origine de régulations différentes du système exposé ici. Pour finir, en raison des limites liées à l'utilisation du MQAE, pouvons-nous vraiment prendre pour acquis des résultats obtenus par imagerie chlorure ?

B. Les neurones sensoriels périphériques adultes

Les mesures de $[Cl^-]_i$ obtenues chez l'adulte par la technique de patch perforé sont en corrélation avec celles de la littérature (Sung et al., 2000). Néanmoins, certains résultats obtenus par l'équipe du Pr Frings ont mis en évidence des valeurs supérieures de

concentration en ions Cl^- (autour de 60mM) (Gilbert et al., 2007). Deux hypothèses pourraient expliquer ces variations. D'une part, ils ont utilisé une sonde chlorure, le MQAE (*N-6-methoxyquinolinium Acetoethylester*), qui est une sonde non-ratiométrique. Autrement dit, l'intensité de fluorescence utilisée dépend de la concentration dans les cellules, ce qui ne peut être contrôlé par l'expérimentateur. De plus, cette sonde subit une perte de rendement au cours du temps, pouvant être à l'origine d'erreurs dans l'analyse. Enfin, leur travail a été réalisé sur des tranches de GRD et non sur des cultures primaires comme dans notre étude. En 2008, une autre étude, utilisant la même sonde, mais cette fois, sur des cultures de neurones sensoriels de souris de 21 jours, a montré des $[\text{Cl}^-]_i$ inférieures (de l'ordre de 47mM), mais tout de même supérieures aux nôtres et présentant, comme dans l'étude de Gilbert et coll., une distribution large des valeurs de $[\text{Cl}^-]_i$ (Rocha-Gonzalez et al., 2008).

Enfin, en mesurant les $[\text{Cl}^-]_i$ de manière aléatoire, nous montrons une homogénéité de concentration au sein de nos neurones qui ne dépend pas du diamètre somatique.

II. Les Co-transporteurs

A. Distribution de NKCC1 dans les GRD

Sung et coll., puis Alvarez-Leefmans et coll. ont observé par différentes techniques que NKCC1 était exprimé dans tous les neurones de GRD (Alvarez-Leefmans et al., 1988; Sung et al., 2000; Alvarez-Leefmans et al., 2001). Une seule étude suggère que NKCC1 ne serait exprimé que par les neurones de petit diamètre et les cellules gliales satellites qui entourent les neurones (Price et al., 2006). L'anticorps utilisé dans leur travail est remis en question par Gilbert et coll. (Gilbert et al., 2007). Nous ne pouvons ni confirmer ni infirmer la véracité de ces résultats. En effet, notre anticorps ne reconnaît que la forme phosphorylée sur les Thr 212 et 217 de NKCC1 (Flemmer et al., 2002). Néanmoins, après axotomie, nous avons détecté la protéine à la membrane d'une sous-population de neurones de moyen et grand diamètres, exprimant également le récepteur IL6-R. Ceci confirme l'expression de NKCC1 dans ces neurones, au moins après lésion. Les résultats de RT-PCR n'ayant démontré aucune différence d'expression de l'ARNm de NKCC1 au sein du ganglion entier, il est difficile d'imaginer une néo-expression du co-transporteur induite par la lésion. Nos résultats, associés à la littérature confirment donc une expression ubiquitaire de NKCC1 dans les GRD.

B. Au cours du développement : NKCC1, oui...Mais KCC ?

La forte $[Cl^-]_i$ enregistrée dans ces neurones chez l'adulte a longtemps suggéré une absence de switch chlorure développemental (Rocha-Gonzalez et al., 2008; Chabwine et al., 2009), et un rôle prépondérant de NKCC1 (Gilbert et al., 2007; Rocha-Gonzalez et al., 2008; Chabwine et al., 2009). D'un autre côté, le rôle prédominant de KCC2 au niveau central, a fait de lui le seul candidat plausible en périphérie. Cependant, en mesurant le niveau d'expression de KCC2 juste après la naissance, on constate une expression très faible, voire inexistante de ce co-transporteur (Rivera et al., 1999; Coull et al., 2003; Stein et al., 2004), qui, bien qu'elle augmente chez l'adulte, n'en demeure pas moins très inférieure à celle de KCC1, KCC3 et NKCC1. Au cours du développement, nous avons constaté que l'expression de l'ARNm de KCC3 était significativement plus augmentée que les autres co-transporteurs. Ceci est en corrélation avec les résultats de Pearson et coll. qui montrent une augmentation de son expression dans le cerveau entre le post-natal et l'adulte (Pearson et al., 2001). Cependant, les auteurs suggèrent un rôle dans la myélinisation des neurones en raison d'un pattern d'expression similaire à celui de la *Myelin Binding Protein*. Cette hypothèse est contredite par le Dr Eric Delpire (Byun and Delpire, 2007). Nos résultats électrophysiologiques chez le post-natal tendent à prouver que KCC3 n'interviendrait pas uniquement dans la myélinisation, mais également dans le contrôle de l'homéostasie chlorure neuronale. Par contre, cette augmentation d'expression de KCC3 est en contradiction avec les résultats du Dr Frings (Gilbert et al., 2007). Cependant, leurs résultats sont basés sur des RT-PCR semi-quantitatives, qui ne permettent pas des analyses fines des niveaux d'expression.

C. KCC3 : Equivalent périphérique de KCC2 ?

Bien que le rôle de NKCC1 ne soit plus à remettre en cause dans ce système, il apparaissait logique qu'un KCC permette une régulation inverse. Sa forte expression chez l'adulte fait de KCC3 un candidat plus intéressant que KCC2. De plus, l'étude de la souris $KCC3^{-/-}$, a permis de mettre en évidence que 30% des neurones sensoriels régulent au moins en partie leur homéostasie chlorure grâce à KCC3. L'approche pharmacologique au moyen de DIOA, touchant tous les KCCs, a donné les mêmes résultats que la souris $KCC3^{-/-}$, à savoir un doublement de la concentration intracellulaire en ions Cl^- . Cela exclu donc que les autres CCC présents puissent jouer un rôle. Une question reste alors en suspend : Comment les autres neurones régulent-ils leur homéostasie chlorure ? La théorie la plus probable est que la

régulation de NKCC1 est suffisante dans ces neurones (Rocha-Gonzalez et al., 2008). Dans ce cas, qu'est ce qui distingue ces neurones ? Delpire et coll. ont étudié par RT-PCR et western blots semi-quantitatifs, l'expression de SPAK et OSR1 dans les GRD. Ils ont montré que ces kinases avaient un niveau d'expression similaire. Malheureusement, ils n'ont pas regardé la distribution de SPAK et OSR1 par immunohistochimie. Une expression différentielle des kinases entre les sous-populations neuronales pourrait expliquer nos résultats.

D. Existe-il des compensations chez la souris KCC3^{-/-} ?

L'apparition du syndrome d'Andermann chez l'homme, ainsi que des phénotypes lourds observés chez la souris KCC3^{-/-} laissent penser qu'il n'existerait pas de compensation par les autres KCC neuronaux (Boettger et al., 2003; Howard et al., 2003). Des analyses préliminaires d'expression des ARNm des autres canaux chlorures n'ont pas apporté la preuve d'une compensation transcriptionnelle de l'activité KCC3. Bien que nous ne puissions pas dire s'il existe ou non des jeux de phosphorylation / déphosphorylation permettant de compenser l'activité de KCC3 chez l'adulte, nos résultats ne le suggèrent pas. En effet, l'augmentation d'homéostasie chlorure chez l'adulte est en accord avec l'activité de KCC3 et le pourcentage de neurones l'exprimant *in vivo*. Cependant, la question peut se poser sur nos résultats post-nataux. Contrairement à ce que nous imaginions, c'est une diminution de la [Cl⁻]_i moyenne que nous avons observé. Des analyses préliminaires d'expression des ARNm des autres canaux chlorures n'ont pas apporté la preuve d'une compensation transcriptionnelle de l'activité KCC3. Autrement dit, chez le post-natal, KCC3 permettrait la maintenance d'une forte [Cl⁻]_i. Une interprétation plausible serait que l'expression de KCC3 dans d'autres tissus ou systèmes, régule de façon indirecte l'homéostasie chlorure des neurones sensitifs. Ainsi, il a été démontré que l'hypertension artérielle chez la souris KCC3^{-/-} est consécutive à une dérégulation du système sympathique et non à un effet mécanique direct (Rust et al., 2006). Des marquages immunohistochimiques chez la souris post-natale sont en cours afin de voir si les neurones expriment déjà KCC3, et si oui, quel pourcentage. L'absence d'un marquage KCC3 permettrait de confirmer notre hypothèse.

E. KCC3 : Un nouveau marqueur de population ?

La mise en évidence de marqueurs de population dans les ganglions rachidiens dorsaux est un enjeu crucial dans la compréhension. Il existe une grande quantité de critères fonctionnels, morphologiques, biochimiques et électrophysiologiques. KCC3 semble être un nouveau marqueur. Nos doubles marquages montrent que ces neurones sont uniquement nociceptifs et mécanoceptifs. Une étude plus poussée est nécessaire pour affiner la population. Notre pattern d'expression pourrait correspondre à celui d'un canal calcique sensible au voltage, Cav3.2, exprimé dans les neurones D-Hair mécanosensibles (Dubreuil et al., 2004; Aptel et al., 2007). Pour le confirmer, il est nécessaire d'effectuer des doubles marquages au moyen de l'anticorps reconnaissant Ca_v3.2 (Bourinet et al., 2005). L'intérêt serait alors de pouvoir étudier le rôle de KCC3 dans une population neuronale précise et identifiable *in vitro*.

III. Lésion et système nerveux périphérique

A. La phosphorylation de NKCC1

Nous avons montré au cours de ce travail que l'interleukine 6 active NKCC1 par phosphorylation du cotransporteur. Cependant, nous ne savons pas si cette phosphorylation permet la translocation de NKCC1 à la membrane, ou si la protéine est déjà à la membrane, mais inactive. Rinehart et coll. ont montré que la déphosphorylation de KCC3 par la protéine phosphatase augmentait son adressage à la membrane (Rinehart et al., 2009). Galan et Cervero ont également observé, après injection de capsaïcine dans le colon, induisant une hyperalgie mécanique, une augmentation de la phosphorylation de NKCC1, associée à une mobilisation membranaire (Galan and Cervero, 2005). A l'inverse, Gagnon et coll. ont montré que SPAK et WNK4 ne jouaient pas sur l'adressage de NKCC1 à la membrane (Gagnon et al., 2006). Deux expériences nous permettraient de répondre à la question. D'une part, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la forme déphosphorylée de NKCC1 (ou simplement NKCC1) permettrait de connaître sa localisation subcellulaire (par exemple, l'anticorps T4 (Stil et al., 2009)). D'autre part, il serait possible d'injecter dans le cytoplasme des neurones en culture, un plasmide, codant pour la protéine de fusion NKCC1-GFP. La technique utilisée est l'électroporation sur cellule isolée (Boudes et al., 2008). Cette méthode nous donnerait la possibilité de suivre la fluorescence chez des souris contrôles et axotomisées.

B. Signalisation et activation de NKCC1

Parmi les nombreuses voies de signalisation impliquées dans la régénération nerveuse après lésion, celle de l'IL6 semble primordiale dans la régulation de l'homéostasie chlorure des neurones de moyen et grand diamètres. Trois voies émergent du récepteur à l'IL6 via la protéine JAK : la voie MAPK, la voie PI3K et la voie STAT3 (Heinrich et al., 2003). Nos résultats montrent que la voie MAPK n'est pas impliquée dans le phénomène, contrairement à la voie PI3K. En effet, l'inhibition pharmacologique de la voie PI3K (LY294002 et wortmannin) empêche l'accumulation d'ion Cl⁻ induite par la lésion. Ces résultats sont en corrélation avec ceux de Ito et coll. et Okamoto et coll. qui ont montré qu'une lésion du nerf hypoglosse entraînait une augmentation de l'expression de certaines sous-unités de la PI3K (Ito et al., 1996; Okamoto et al., 2004). Le lien avec NKCC1 pourrait alors être la kinase Akt (Figure 75). En effet, Akt est à la fois un substrat de la PI3K, et une kinase phosphorylant WNK1 (Vitari et al., 2004), qui, comme nous l'avons vu dans l'introduction, intervient dans la phosphorylation de NKCC1. La voie STAT3, quant à elle, est fortement impliquée dans les mécanismes de régénération après lésion (Schwaiger et al., 2000; Lee et al., 2004; Qiu et al., 2005). Or, l'un des gènes cible de ce facteur de transcription est le gène codant pour la protéine SOCS (Suppressor of cytokines signaling), permettant d'inhiber la voie des cytokines (Fischer et al., 2004; Miao et al., 2006). SOCS est induit en réponse à l'axotomie via la voie STAT3 de façon à effectuer un rétrocontrôle négatif sur la voie IL6-R (Miao et al., 2006) (Figure 75). Il empêche la phosphorylation de STAT3 par JAK. Selon une étude de 2009, la délétion de SOCS permet une régénération axonale selon une voie dépendante de la gp130, sous-unité signalante de l'IL6 (Smith et al., 2009). La question est maintenant de savoir si l'une et/ou l'autre des deux voies intervient dans l'activation de NKCC1.

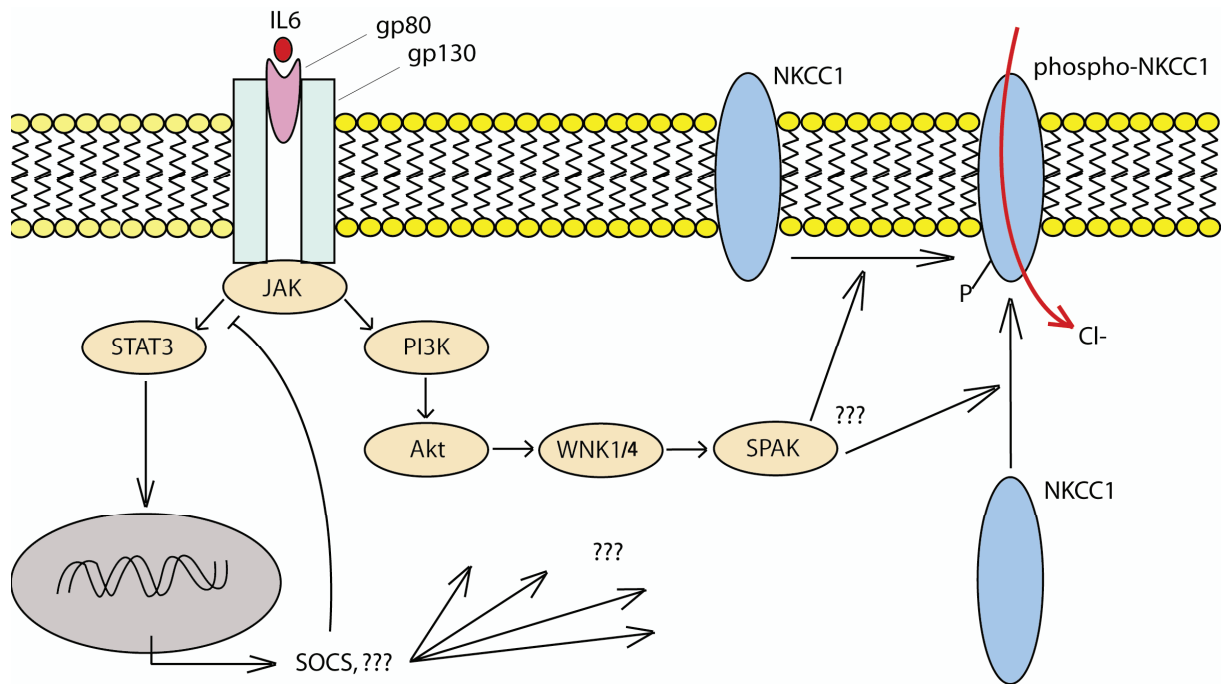


Figure 75 : Hypothèse sur la signalisation par l'IL6 aboutissant à l'activation de NKCC1

C. KCC3 : rôle physiologique uniquement ?

Nous n'avons pas analysé les conséquences de l'axotomie sur l'homéostasie chlorure et la régénération des neurones axotomisés dans la souris $KCC3^{-/-}$. Cependant, nous avons vu que la lésion induisait une accumulation d'ions Cl^- dans les neurones sauvages. Que pourrait provoquer l'axotomie sur les 30% de neurones présentant déjà une forte concentration en ions chlorures en l'absence de KCC3 ? Dans le SNC, une diminution de l'activité de KCC2 est observée après lésion. Les résultats, publiés par notre équipe en 2007, ont montré que même en bloquant l'activité NKCC1 par le bumétanide, il subsiste une augmentation de la $[Cl^-]_i$ après axotomie (Pieraut et al., 2007). Il se pourrait que KCC3 soit, au moins en partie, responsable de cette accumulation résiduelle. L'étude de la souris $KCC3^{-/-}$ après lésion du nerf sciatique permettrait de vérifier cette hypothèse.

IV. Homéostasie chlorure et excitabilité

Certes, la concentration intracellulaire en ions Cl^- dans les neurones sensitifs est très supérieure à celle des neurones centraux. En conditions physiologiques, bien que dépolarisant, le GABA n'en reste pas moins inhibiteur. Malgré une augmentation significative de la $[\text{Cl}^-]_i$ après axotomie, une augmentation de l'excitabilité reste encore hypothétique.

Nous aurions pu imaginer que KCC3 permette de réguler l'homéostasie chlorure de manière à empêcher le GABA de devenir excitateur. Afin d'aborder le rôle de KCC3 sur l'excitabilité neuronale, l'imagerie calcique a permis d'effectuer un « screening » global de nos neurones. Nos résultats sur la souris $\text{KCC3}^{+/+}$ sont en corrélation avec ceux de la littérature (Viero et al., 2006). Les auteurs ont observé que 23% des neurones (contre 30% dans notre étude) répondaient au muscimol par une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Nous avons constaté que l'absence de KCC3 n'entraînait pas d'augmentation des entrées calciques dans les neurones en réponse au muscimol. Bien évidemment, des mesures électrophysiologiques du potentiel de membrane des neurones ainsi que de l'activité électrique auraient permis une étude plus fine du système. Il se peut que nous soyons passés à côté de phénomènes rapides, tels que des potentiels d'action. Les modifications post-traductionnelles des CCC permettant des régulations rapides de leur activité, nous avons tenté de mesurer ces variations calciques le jour même de la mise en culture. Ces expériences préliminaires ont montré une augmentation du pourcentage de neurones à répondre au muscimol chez la souris $\text{KCC3}^{-/-}$. Ceci laisse penser que KCC3 permettrait d'inhiber l'activité électrique à court terme. Via des phénomènes rapides de phosphorylation / déphosphorylation, KCC3 pourrait donc permettre d'inhiber l'activité électrique post-lésionnelle des neurones sensoriels. Après un jour de culture, la souris $\text{KCC3}^{-/-}$ ne montrant pas de différence avec la $\text{KCC3}^{+/+}$, il est probable que d'autres mécanismes, plus tardifs, se mettent en place.

Bien évidemment, tout ceci n'est que pure conjecture, puisque nous ne prenons pas en compte ici les entrées excitatrices. Il aurait donc été intéressant de coupler le glutamate au muscimol lors de l'imagerie calcique, afin de voir si nous avons réellement à faire à une augmentation de l'excitabilité des neurones $\text{KCC3}^{-/-}$. Lors d'une étude menée sur les neurones mécanosensibles D-Hair, notre équipe a mis en évidence que le courant calcique à bas seuil d'activation de type T, $\text{Ca}_v3.2$, amplifiait la dépolarisation membranaire induite par le courant GABA, permettant ainsi le déclenchement de potentiels d'action (Aptel et al., 2007). Ce travail montre que le canal calcique de type T est une condition permettant l'excitabilité par le

GABA. Autrement dit, bien que nous ayons à faire à des dépolarisations induites par le GABA, les entrées excitatrices semblent nécessaires pour promouvoir l'excitation neuronale. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe II.E, le pattern d'expression de KCC3 pourrait correspondre à celui du canal $Ca_v3.2$. Si cela se confirme, KCC3 pourrait être un acteur majeur de l'excitabilité des neurones D-Hair par le GABA.

V. La régénération des neurones sensoriels

A. IL6 et régénération

Suite à une lésion nerveuse, les neurones vont s'engager soit vers une voie d'apoptose, soit vers une voie de régénération. Au cours du processus de régénération, les neurones adoptent une pousse neuritique dite « élonguée ». Des travaux antérieurs de l'équipe ont montré que la vitesse de pousse des neurones était significativement augmentée après axotomie, et que cette augmentation était dépendante de la $[Cl^-]_i$ (Pieraut et al., 2007). L'IL6, cytokine pro-inflammatoire, connue pour intervenir dans les processus de régénération, semble jouer sur l'homéostasie chlorure. Un point que nous n'avons pas abordé ici est de savoir si l'IL6 modifie la vitesse de pousse. L'étude par immunohistochimie de la vitesse de pousse des neurones semble être la technique la plus adaptée, contrairement à la vidéo microscopie, qui ne permet pas de cibler les neurones d'intérêt. Ces travaux sont actuellement en cours de réalisation. L'utilisation des drogues et autres anticorps bloquants, ainsi que la souris $IL6^{-/-}$, utilisés dans ce travail, pourrait semble-t-il ralentir la vitesse de régénération des neurones lésés. L'IL6 et sa voie de signalisation feraient donc une cible de choix dans le traitement des pathologies nerveuses traumatiques.

B. KCC3, une cible potentielle pour améliorer la vitesse de pousse régénérative ?

La souris $KCC3^{-/-}$ a montré une accumulation intracellulaire en ions Cl^- dans une sous-population de neurones, même chose après traitement des neurones contrôles par des inhibiteurs de KCC. Cette augmentation de la $[Cl^-]_i$ est identique à celle retrouvée après axotomie. Il aurait donc été intéressant de mesurer la vitesse de pousse des neurones en culture par vidéo microscopie. Un résultat positif sur la régénération donnerait de nouvelles pistes pour la compréhension du phénomène. Néanmoins, la croissance des neurones est un

phénomène complexe, faisant intervenir de nombreuses voies de signalisation. Caractériser plus précisément la population $KCC3^+$ est un enjeu de taille. Nous ne savons toujours pas si les neurones exprimant $KCC3$ correspondent à une population de neurones connue. Il reste donc encore beaucoup de travail avant d'élucider le rôle précis de $KCC3$ dans la régénération

VI. Epilogue

Mon travail de thèse s'est porté sur l'étude des rôles de l'interleukine 6 et du co-transporteur cation-chlorure $KCC3$ dans la régulation de l'homéostasie chlorure des neurones sensoriels. La Figure 76 récapitule les résultats obtenus. Deux points majeurs ressortent de ces résultats. Tout d'abord, l'IL6, après liaison à son récepteur, l'IL6-R α , permet la mise en jeu d'une voie de signalisation responsable de l'activation de $NKCC1$ et donc de l'accumulation intracellulaire d'ions chlorures. La connaissance de cette voie de signalisation peut s'avérer cruciale pour la compréhension, et peut être l'amélioration, des mécanismes de régénération périphérique suite à une lésion nerveuse. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un switch chlorure dans les neurones sensoriels. Dans une sous-population de neurones, ce switch est lié à l'activité de $KCC3$. Bien que nous soyons encore très loin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans le syndrome d'Andermann, pathologie liée à une mutation de $KCC3$, cette découverte explique pourquoi le phénotype sensoriel chez la souris $KCC3^{-/-}$ apparaît au cours des deux premières semaines d'existence. Cette preuve d'une atteinte fonctionnelle neuronale donne de nouvelles pistes quant à la compréhension de la maladie, mais également de l'ontogénie des neurones sensoriels.

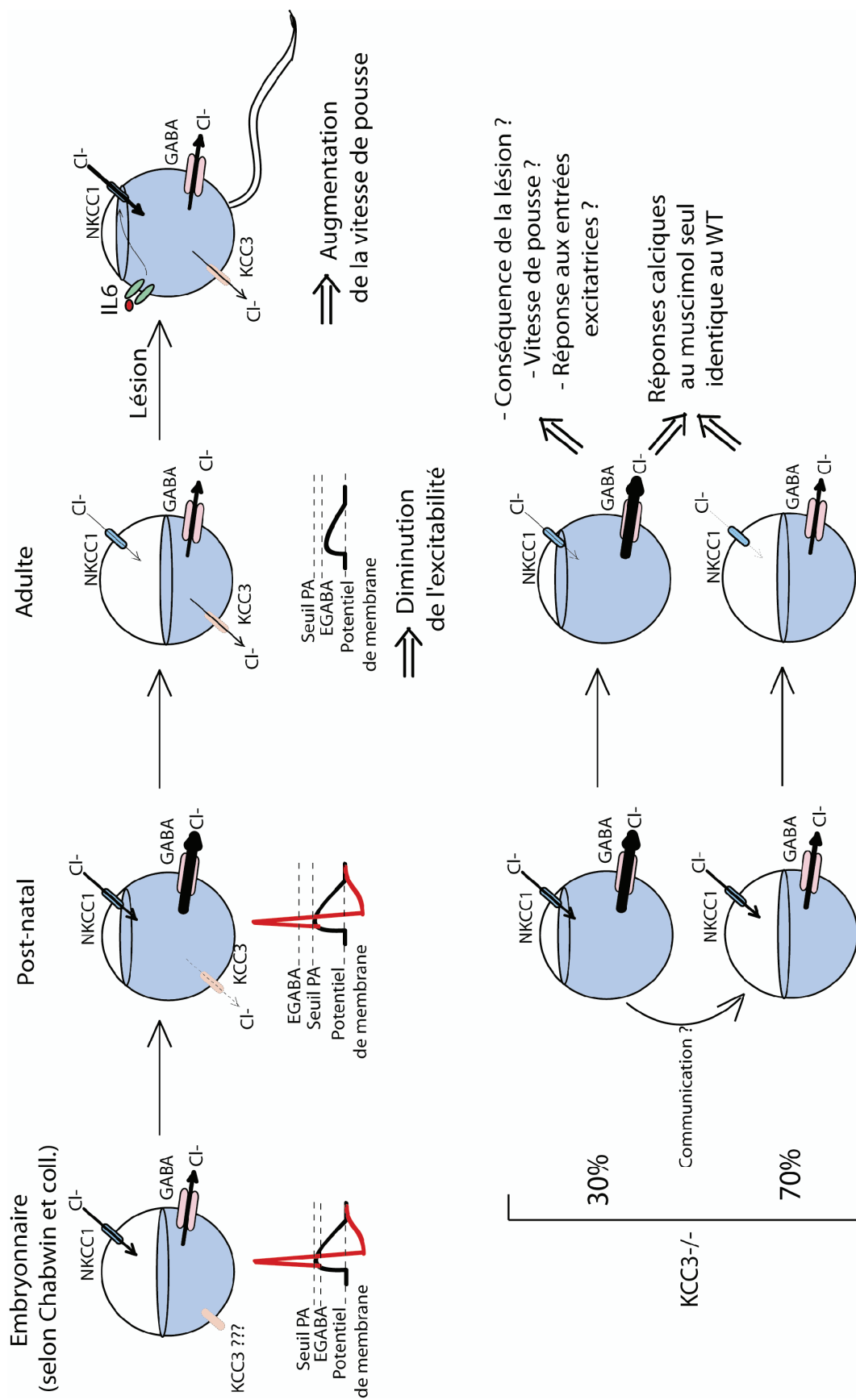


Figure 76 : Schéma récapitulatif de l'homéostasie chlorure dans les neurones sensoriels

BIBLIOGRAPHIE

- Achilles K, Okabe A, Ikeda M, Shimizu-Okabe C, Yamada J, Fukuda A, Luhmann HJ, Kilb W (2007) Kinetic properties of Cl uptake mediated by Na⁺-dependent K⁺-2Cl cotransport in immature rat neocortical neurons. *J Neurosci* 27:8616-8627.
- Aguado F, Carmona MA, Pozas E, Aguilo A, Martinez-Guijarro FJ, Alcantara S, Borrell V, Yuste R, Ibanez CF, Soriano E (2003) BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2. *Development* 130:1267-1280.
- Alvarez-Leefmans FJ, Gamino SM, Giraldez F, Nogueron I (1988) Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studied with ion-selective microelectrodes. *J Physiol* 406:225-246.
- Alvarez-Leefmans FJ, Leon-Olea M, Mendoza-Sotelo J, Alvarez FJ, Anton B, Garduno R (2001) Immunolocalization of the Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-2Cl⁽⁻⁾ cotransporter in peripheral nervous tissue of vertebrates. *Neuroscience* 104:569-582.
- Andre S, Boukhaddaoui H, Campo B, Al-Jumaily M, Mayeux V, Greuet D, Valmier J, Scamps F (2003) Axotomy-induced expression of calcium-activated chloride current in subpopulations of mouse dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 90:3764-3773.
- Aptel H, Hilaire C, Pieraut S, Boukhaddaoui H, Mallie S, Valmier J, Scamps F (2007) The Cav3.2/ α 1H T-type Ca²⁺ current is a molecular determinant of excitatory effects of GABA in adult sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 36:293-303.
- Arber S, Ladle DR, Lin JH, Frank E, Jessell TM (2000) ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons. *Cell* 101:485-498.
- Arvidsson J, Ygge J, Grant G (1986) Cell loss in lumbar dorsal root ganglia and transganglionic degeneration after sciatic nerve resection in the rat. *Brain Res* 373:15-21.
- Ault B, Hildebrand LM (1994) GABAA receptor-mediated excitation of nociceptive afferents in the rat isolated spinal cord-tail preparation. *Neuropharmacology* 33:109-114.
- Averill S, Michael GJ, Shortland PJ, Leavesley RC, King VR, Bradbury EJ, McMahon SB, Priestley JV (2004) NGF and GDNF ameliorate the increase in ATF3 expression which occurs in dorsal root ganglion cells in response to peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 19:1437-1445.
- Balakrishnan V, Becker M, Lohrke S, Nothwang HG, Guresir E, Friauf E (2003) Expression and function of chloride transporters during development of inhibitory neurotransmission in the auditory brainstem. *J Neurosci* 23:4134-4145.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267-284.
- Bear M, Connors B, Paradisio M (2001) *Neuroscience, Exploring the brain - Third edition.*
- Belmonte C, Viana F (2008) Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Mol Pain* 4:14.
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728-739.
- Benn SC, Costigan M, Tate S, Fitzgerald M, Woolf CJ (2001) Developmental expression of the TTX-resistant voltage-gated sodium channels Nav1.8 (SNS) and Nav1.9 (SNS2) in primary sensory neurons. *J Neurosci* 21:6077-6085.
- Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.
- Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K (2009) Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* 61:820-838.

- Boettger T, Hubner CA, Maier H, Rust MB, Beck FX, Jentsch TJ (2002) Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter *Kcc4*. *Nature* 416:874-878.
- Boettger T, Rust MB, Maier H, Seidenbecher T, Schweizer M, Keating DJ, Faulhaber J, Ehmke H, Pfeffer C, Scheel O, Lemcke B, Horst J, Leuwer R, Pape HC, Volkl H, Hubner CA, Jentsch TJ (2003) Loss of K-Cl co-transporter *KCC3* causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *Embo J* 22:5422-5434.
- Boudes M, Pieraut S, Valmier J, Carroll P, Scamps F (2008) Single-cell electroporation of adult sensory neurons for gene screening with RNA interference mechanism. *J Neurosci Methods* 170:204-211.
- Boudes M, Sar C, Menigoz A, Hilaire C, Pequignot MO, Kozlenkov A, Marmorstein A, Carroll P, Valmier J, Scamps F (2009) *Best1* is a gene regulated by nerve injury and required for Ca²⁺-activated Cl⁻ current expression in axotomized sensory neurons. *J Neurosci* 29:10063-10071.
- Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, Bras H, Jean-Xavier C, Brocard C, Stil A, Darbon P, Cattaert D, Delpire E, Marsala M, Vinay L (2010) Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter *KCC2* contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat Med* 16:302-307.
- Bourinet E, Alloui A, Monteil A, Barrere C, Couette B, Poirot O, Pages A, McRory J, Snutch TP, Eschalier A, Nargeot J (2005) Silencing of the *Cav3.2* T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *Embo J* 24:315-324.
- Britton FC, Ohya S, Horowitz B, Greenwood IA (2002) Comparison of the properties of *CLCA1* generated currents and *I(Cl(Ca))* in murine portal vein smooth muscle cells. *J Physiol* 539:107-117.
- Byun N, Delpire E (2007) Axonal and periaxonal swelling precede peripheral neurodegeneration in *KCC3* knockout mice. *Neurobiol Dis* 28:39-51.
- Cafferty WB, Gardiner NJ, Das P, Qiu J, McMahon SB, Thompson SW (2004) Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice. *J Neurosci* 24:4432-4443.
- Cafferty WB, Gardiner NJ, Gavazzi I, Powell J, McMahon SB, Heath JK, Munson J, Cohen J, Thompson SW (2001) Leukemia inhibitory factor determines the growth status of injured adult sensory neurons. *J Neurosci* 21:7161-7170.
- Campbell DT (1992) Large and small vertebrate sensory neurons express different Na and K channel subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9569-9573.
- Cancedda L, Fiumelli H, Chen K, Poo MM (2007) Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *J Neurosci* 27:5224-5235.
- Cao Z, Gao Y, Bryson JB, Hou J, Chaudhry N, Siddiq M, Martinez J, Spencer T, Carmel J, Hart RB, Filbin MT (2006) The cytokine interleukin-6 is sufficient but not necessary to mimic the peripheral conditioning lesion effect on axonal growth. *J Neurosci* 26:5565-5573.
- Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeffer U, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galletta LJ (2008) *TMEM16A*, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 322:590-594.
- Carmona MA, Pozas E, Martinez A, Espinosa-Parrilla JF, Soriano E, Aguado F (2006) Age-dependent spontaneous hyperexcitability and impairment of GABAergic function in the hippocampus of mice lacking *trkB*. *Cereb Cortex* 16:47-63.
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436-441.

- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.
- Chabwine JN, Talavera K, Verbert L, Eggermont J, Vanderwinden JM, De Smedt H, Van Den Bosch L, Robberecht W, Callewaert G (2009) Differential contribution of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter NKCC1 to chloride handling in rat embryonic dorsal root ganglion neurons and motor neurons. *FASEB J* 23:1168-1176.
- Chen ZL, Strickland S (2003) Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J Cell Biol* 163:889-899.
- Chierzi S, Ratto GM, Verma P, Fawcett JW (2005) The ability of axons to regenerate their growth cones depends on axonal type and age, and is regulated by calcium, cAMP and ERK. *Eur J Neurosci* 21:2051-2062.
- Christensen AP, Corey DP (2007) TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat Rev Neurosci* 8:510-521.
- Chudotvorova I, Ivanov A, Rama S, Hubner CA, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Medina I (2005) Early expression of KCC2 in rat hippocampal cultures augments expression of functional GABA synapses. *J Physiol* 566:671-679.
- Cossins AR, Gibson JS (1997) Volume-sensitive transport systems and volume homeostasis in vertebrate red blood cells. *J Exp Biol* 200:343-352.
- Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y (2003) Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424:938-942.
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017-1021.
- Crocker BA, Mielke LA, Wormald S, Metcalf D, Kiu H, Alexander WS, Hilton DJ, Roberts AW (2008) Socs3 maintains the specificity of biological responses to cytokine signals during granulocyte and macrophage differentiation. *Exp Hematol* 36:786-798.
- Curtis DR, Lodge D (1982) The depolarization of feline ventral horn group Ia spinal afferent terminations by GABA. *Exp Brain Res* 46:215-233.
- Curtis R, DiStefano PS (1994) Neurotrophic factors, retrograde axonal transport and cell signalling. *Trends Cell Biol* 4:383-386.
- Curtis R, Adryan KM, Zhu Y, Harkness PJ, Lindsay RM, DiStefano PS (1993) Retrograde axonal transport of ciliary neurotrophic factor is increased by peripheral nerve injury. *Nature* 365:253-255.
- Darman RB, Forbush B (2002) A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1. *J Biol Chem* 277:37542-37550.
- Darman RB, Flemmer A, Forbush B (2001) Modulation of ion transport by direct targeting of protein phosphatase type 1 to the Na-K-Cl cotransporter. *J Biol Chem* 276:34359-34362.
- DeCoster MA (1995) Calcium dynamics in the central nervous system. *Adv Neuroimmunol* 5:233-239.
- Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158.
- Delpire E, Mount DB (2002) Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *Annu Rev Physiol* 64:803-843.
- Delpire E, Austin TM (2010) Kinase regulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport in primary afferent neurons. *J Physiol* 588:3365-3373.
- Delpire E, Rauchman MI, Beier DR, Hebert SC, Gullans SR (1994) Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter from

- mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells. *J Biol Chem* 269:25677-25683.
- Delpire E, Lu J, England R, Dull C, Thorne T (1999) Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat Genet* 22:192-195.
- Delpy A, Allain AE, Meyrand P, Branchereau P (2008) NKCC1 cotransporter inactivation underlies embryonic development of chloride-mediated inhibition in mouse spinal motoneuron. *J Physiol* 586:1059-1075.
- Desarmenien M, Santangelo F, Loeffler JP, Feltz P (1984) Comparative study of GABA-mediated depolarizations of lumbar A delta and C primary afferent neurones of the rat. *Exp Brain Res* 54:521-528.
- Di Fulvio M, Lauf PK, Adragna NC (2003) The NO signaling pathway differentially regulates KCC3a and KCC3b mRNA expression. *Nitric Oxide* 9:165-171.
- Dowd BF, Forbush B (2003) PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *J Biol Chem* 278:27347-27353.
- Dubovy P, Klusakova I, Svizenska I, Brazda V (2010) Satellite glial cells express IL-6 and corresponding signal-transducing receptors in the dorsal root ganglia of rat neuropathic pain model. *Neuron Glia Biol* 6:73-83.
- Dubreuil AS, Boukhaddaoui H, Desmadryl G, Martinez-Salgado C, Moshourab R, Lewin GR, Carroll P, Valmier J, Scamps F (2004) Role of T-type calcium current in identified D-hair mechanoreceptor neurons studied in vitro. *J Neurosci* 24:8480-8484.
- Escurat M, Djabali K, Gumpel M, Gros F, Portier MM (1990) Differential expression of two neuronal intermediate-filament proteins, peripherin and the low-molecular-mass neurofilament protein (NF-L), during the development of the rat. *J Neurosci* 10:764-784.
- Fang X, Djouhri L, McMullan S, Berry C, Waxman SG, Okuse K, Lawson SN (2006) Intense isolectin-B4 binding in rat dorsal root ganglion neurons distinguishes C-fiber nociceptors with broad action potentials and high Nav1.9 expression. *J Neurosci* 26:7281-7292.
- Farrant M, Kaila K (2007) The cellular, molecular and ionic basis of GABA(A) receptor signalling. *Prog Brain Res* 160:59-87.
- Field HL (1987) Pain. In: McGraw-Hill. New York.
- Fischer P, Lehmann U, Sobota RM, Schmitz J, Niemand C, Linnemann S, Haan S, Behrmann I, Yoshimura A, Johnston JA, Muller-Newen G, Heinrich PC, Schaper F (2004) The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling. *Biochem J* 378:449-460.
- Fitch MT, Silver J (2008) CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol* 209:294-301.
- Fiumelli H, Woodin MA (2007) Role of activity-dependent regulation of neuronal chloride homeostasis in development. *Curr Opin Neurobiol* 17:81-86.
- Fiumelli H, Cancedda L, Poo MM (2005) Modulation of GABAergic transmission by activity via postsynaptic Ca²⁺-dependent regulation of KCC2 function. *Neuron* 48:773-786.
- Flatman PW (2008) Cotransporters, WNKs and hypertension: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:186-192.
- Flemmer AW, Gimenez I, Dowd BF, Darman RB, Forbush B (2002) Activation of the Na-K-Cl cotransporter NKCC1 detected with a phospho-specific antibody. *J Biol Chem* 277:37551-37558.
- Funk K, Woitecki A, Franjic-Wurtz C, Gensch T, Mohrlen F, Frings S (2008) Modulation of chloride homeostasis by inflammatory mediators in dorsal root ganglion neurons. *Mol Pain* 4:32.

- Gadient RA, Otten U (1996) Postnatal expression of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat sympathetic and sensory ganglia. *Brain Res* 724:41-46.
- Gagnon KB, England R, Delpire E (2006) Volume sensitivity of cation-Cl⁻ cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related proline-alanine-rich kinase and WNK4. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C134-142.
- Galan A, Cervero F (2005) Painful stimuli induce in vivo phosphorylation and membrane mobilization of mouse spinal cord NKCC1 co-transporter. *Neuroscience* 133:245-252.
- Galanopoulou AS (2008) GABA(A) Receptors in Normal Development and Seizures: Friends or Foes? *Curr Neuropharmacol* 6:1-20.
- Galanopoulou AS (2010) Mutations affecting GABAergic signaling in seizures and epilepsy. *Pflugers Arch*.
- Galanopoulou AS, Moshe SL (2003) Role of sex hormones in the sexually dimorphic expression of KCC2 in rat substantia nigra. *Exp Neurol* 184:1003-1009.
- Galeffi F, Sah R, Pond BB, George A, Schwartz-Bloom RD (2004) Changes in intracellular chloride after oxygen-glucose deprivation of the adult hippocampal slice: effect of diazepam. *J Neurosci* 24:4478-4488.
- Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, Hebert SC (1994) Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 269:17713-17722.
- Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger MA, Brenner BM, Hebert SC (1993) Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2749-2753.
- Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M (2001) GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 105:521-532.
- Gardiner NJ, Cafferty WB, Slack SE, Thompson SW (2002) Expression of gp130 and leukaemia inhibitory factor receptor subunits in adult rat sensory neurones: regulation by nerve injury. *J Neurochem* 83:100-109.
- Gardiner NJ, Moffatt S, Fernyhough P, Humphries MJ, Streuli CH, Tomlinson DR (2007) Preconditioning injury-induced neurite outgrowth of adult rat sensory neurons on fibronectin is mediated by mobilisation of axonal alpha5 integrin. *Mol Cell Neurosci* 35:249-260.
- Garzon-Muvdi T, Pacheco-Alvarez D, Gagnon KB, Vazquez N, Ponce-Coria J, Moreno E, Delpire E, Gamba G (2007) WNK4 kinase is a negative regulator of K⁺-Cl⁻ cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F1197-1207.
- Geng Y, Hoke A, Delpire E (2009) The Ste20 kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase and oxidative-stress response 1 regulate NKCC1 function in sensory neurons. *J Biol Chem* 284:14020-14028.
- Gibson JS, Speake PF, Ellory JC (1998) Differential oxygen sensitivity of the K⁺-Cl⁻ cotransporter in normal and sickle human red blood cells. *J Physiol* 511 (Pt 1):225-234.
- Gilbert D, Franjic-Wurtz C, Funk K, Gensch T, Frings S, Mohrlen F (2007) Differential maturation of chloride homeostasis in primary afferent neurons of the somatosensory system. *Int J Dev Neurosci* 25:479-489.
- Gillen CM, Brill S, Payne JA, Forbush B, 3rd (1996) Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat, and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem* 271:16237-16244.

- Gordon T (2010) The physiology of neural injury and regeneration: The role of neurotrophic factors. *J Commun Disord* 43:265-273.
- Granados-Soto V, Arguelles CF, Alvarez-Leefmans FJ (2005) Peripheral and central antinociceptive action of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter blockers on formalin-induced nociception in rats. *Pain* 114:231-238.
- Graves AR, Curran PK, Smith CL, Mindell JA (2008) The Cl⁻/H⁺ antiporter ClC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature* 453:788-792.
- Groves MJ, Christopherson T, Giometto B, Scaravilli F (1997) Axotomy-induced apoptosis in adult rat primary sensory neurons. *J Neurocytol* 26:615-624.
- Haas M (1994) The Na-K-Cl cotransporters. *Am J Physiol* 267:C869-885.
- Hales TG, Sanderson MJ, Charles AC (1994) GABA has excitatory actions on GnRH-secreting immortalized hypothalamic (GT1-7) neurons. *Neuroendocrinology* 59:297-308.
- Hannila SS, Filbin MT (2008) The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury. *Exp Neurol* 209:321-332.
- Harvey RJ, Depner UB, Wassle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schutz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Muller U (2004) GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304:884-887.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374:1-20.
- Hiki K, D'Andrea RJ, Furze J, Crawford J, Woollatt E, Sutherland GR, Vadas MA, Gamble JR (1999) Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K⁺-Cl⁻ cotransporter. *J Biol Chem* 274:10661-10667.
- Hilaire C, Inquimbert P, Al-Jumaily M, Greuet D, Valmier J, Scamps F (2005) Calcium dependence of axotomized sensory neurons excitability. *Neurosci Lett* 380:330-334.
- Hirota H, Kiyama H, Kishimoto T, Taga T (1996) Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *J Exp Med* 183:2627-2634.
- Hoffmann EK, Dunham PB (1995) Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int Rev Cytol* 161:173-262.
- Holtzman EJ, Kumar S, Faaland CA, Warner F, Logue PJ, Erickson SJ, Ricken G, Waldman J, Dunham PB (1998) Cloning, characterization, and gene organization of K-Cl cotransporter from pig and human kidney and *C. elegans*. *Am J Physiol* 275:F550-564.
- Howard HC, Dupré N, Mathieu J, Bouchard JP, Rouleau GA (2003) La neuropathie sensitivomotrice héréditaire avec agénésie du corps calleux. *Médecine/Sciences* 19:414-416.
- Howard HC, Mount DB, Rochefort D, Byun N, Dupre N, Lu J, Fan X, Song L, Riviere JB, Prevost C, Horst J, Simonati A, Lemcke B, Welch R, England R, Zhan FQ, Mercado A, Siesser WB, George AL, Jr., McDonald MP, Bouchard JP, Mathieu J, Delpire E, Rouleau GA (2002) The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet* 32:384-392.
- Hubner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ (2001) Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 30:515-524.
- Isenring P, Jacoby SC, Forbush B, 3rd (1998a) The role of transmembrane domain 2 in cation transport by the Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7179-7184.

- Isenring P, Jacoby SC, Chang J, Forbush B (1998b) Mutagenic mapping of the Na-K-Cl cotransporter for domains involved in ion transport and bumetanide binding. *J Gen Physiol* 112:549-558.
- Ito Y, Sakagami H, Kondo H (1996) Enhanced gene expression for phosphatidylinositol 3-kinase in the hypoglossal motoneurons following axonal crush. *Brain Res Mol Brain Res* 37:329-332.
- Ito Y, Yamamoto M, Li M, Doyu M, Tanaka F, Mutch T, Mitsuma T, Sobue G (1998) Differential temporal expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), and their receptors (CNTFR alpha, LIFR beta, IL-6R alpha and gp130) in injured peripheral nerves. *Brain Res* 793:321-327.
- Jacobs S, Ruusuvuori E, Sipila ST, Haapanen A, Damkier HH, Kurth I, Hentschke M, Schweizer M, Rudhard Y, Laatikainen LM, Tyynela J, Praetorius J, Voipio J, Hubner CA (2008) Mice with targeted Slc4a10 gene disruption have small brain ventricles and show reduced neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:311-316.
- Jean-Xavier C, Pflieger JF, Liabeuf S, Vinay L (2006) Inhibitory postsynaptic potentials in lumbar motoneurons remain depolarizing after neonatal spinal cord transection in the rat. *J Neurophysiol* 96:2274-2281.
- Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM (2006) The role of peripheral T-type calcium channels in pain transmission. *Cell Calcium* 40:197-203.
- Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM (2001) The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *Faseb J* 15:43-58.
- Kahle KT, Rinehart J, Lifton RP (2010) Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl cotransporters by the WNK kinases. *Biochim Biophys Acta* 1802:1150-1158.
- Kahle KT, Rinehart J, de Los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G, Gimenez I, Lifton RP (2005) WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16783-16788.
- Kanaka C, Ohno K, Okabe A, Kuriyama K, Itoh T, Fukuda A, Sato K (2001) The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience* 104:933-946.
- Karadshah MF, Delpire E (2001) Neuronal restrictive silencing element is found in the KCC2 gene: molecular basis for KCC2-specific expression in neurons. *J Neurophysiol* 85:995-997.
- Kashiba H, Uchida Y, Senba E (2003) Distribution and colocalization of NGF and GDNF family ligand receptor mRNAs in dorsal root and nodose ganglion neurons of adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 110:52-62.
- Kelley KA, Friedrich VL, Jr., Sonshine A, Hu Y, Lax J, Li J, Drinkwater D, Dressler H, Herrup K (1994) Expression of Thy-1/lacZ fusion genes in the CNS of transgenic mice. *Brain Res Mol Brain Res* 24:261-274.
- Kenney AM, Kocsis JD (1998) Peripheral axotomy induces long-term c-Jun amino-terminal kinase-1 activation and activator protein-1 binding activity by c-Jun and junD in adult rat dorsal root ganglia *In vivo*. *J Neurosci* 18:1318-1328.
- Kiefer R, Lindholm D, Kreutzberg GW (1993) Interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 mRNAs are induced in rat facial nucleus following motoneuron axotomy. *Eur J Neurosci* 5:775-781.
- Kim SH, Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355-363.

- Kim YI, Na HS, Kim SH, Han HC, Yoon YW, Sung B, Nam HJ, Shin SL, Hong SK (1998) Cell type-specific changes of the membrane properties of peripherally-axotomized dorsal root ganglion neurons in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 86:301-309.
- Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G (1994) Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368:339-342.
- Krarup T, Jakobsen LD, Jensen BS, Hoffmann EK (1998) Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport in Ehrlich cells: regulation by protein phosphatases and kinases. *Am J Physiol* 275:C239-250.
- Kreutzberg GW (1995) Reaction of the neuronal body to axonal damage. In: *The axon: Structure, Function and Pathophysiology* (Waxman K, Stys, ed), pp 355-374. Oxford: Oxford University Press.
- Kubo T, Yamashita T, Yamaguchi A, Hosokawa K, Tohyama M (2002) Analysis of genes induced in peripheral nerve after axotomy using cDNA microarrays. *J Neurochem* 82:1129-1136.
- Laird JM, Garcia-Nicas E, Delpire EJ, Cervero F (2004) Presynaptic inhibition and spinal pain processing in mice: a possible role of the NKCC1 cation-chloride co-transporter in hyperalgesia. *Neurosci Lett* 361:200-203.
- Lara-Ramirez R, Segura-Anaya E, Martinez-Gomez A, Dent MA (2008) Expression of interleukin-6 receptor alpha in normal and injured rat sciatic nerve. *Neuroscience* 152:601-608.
- Larsen F, Solheim J, Kristensen T, Kolsto AB, Prydz H (1993) A tight cluster of five unrelated human genes on chromosome 16q22.1. *Hum Mol Genet* 2:1589-1595.
- Lauf PK (1983) Thiol-dependent passive K⁺-Cl⁻ transport in sheep red blood cells. V. Dependence on metabolism. *Am J Physiol* 245:C445-448.
- Lauf PK, Bauer J, Adragna NC, Fujise H, Zade-Oppen AM, Ryu KH, Delpire E (1992) Erythrocyte K-Cl cotransport: properties and regulation. *Am J Physiol* 263:C917-932.
- Le-Corrone H, Rigo JM, Branchereau P, Legendre P (2011) GABA(A) Receptor and Glycine Receptor Activation by Paracrine/Autocrine Release of Endogenous Agonists: More Than a Simple Communication Pathway. *Mol Neurobiol*.
- Lee HA, Hong SH, Kim JW, Jang IS (2010a) Possible involvement of DNA methylation in NKCC1 gene expression during postnatal development and in response to ischemia. *J Neurochem*.
- Lee N, Neitzel KL, Devlin BK, MacLennan AJ (2004) STAT3 phosphorylation in injured axons before sensory and motor neuron nuclei: potential role for STAT3 as a retrograde signaling transcription factor. *J Comp Neurol* 474:535-545.
- Lee S, Yoon BE, Berglund K, Oh SJ, Park H, Shin HS, Augustine GJ, Lee CJ (2010b) Channel-mediated tonic GABA release from glia. *Science* 330:790-796.
- Leem JW, Willis WD, Weller SC, Chung JM (1993) Differential activation and classification of cutaneous afferents in the rat. *J Neurophysiol* 70:2411-2424.
- Lefcort F, Venstrom K, McDonald JA, Reichardt LF (1992) Regulation of expression of fibronectin and its receptor, alpha 5 beta 1, during development and regeneration of peripheral nerve. *Development* 116:767-782.
- Leibinger M, Muller A, Andreadaki A, Hauk TG, Kirsch M, Fischer D (2009) Neuroprotective and axon growth-promoting effects following inflammatory stimulation on mature retinal ganglion cells in mice depend on ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor. *J Neurosci* 29:14334-14341.

- Leinekugel X, Tseeb V, Ben-Ari Y, Bregestovski P (1995) Synaptic GABAA activation induces Ca²⁺ rise in pyramidal cells and interneurons from rat neonatal hippocampal slices. *J Physiol* 487 (Pt 2):319-329.
- Lewin GR, Moshourab R (2004) Mechanosensation and pain. *J Neurobiol* 61:30-44.
- Li H, Tornberg J, Kaila K, Airaksinen MS, Rivera C (2002) Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *Eur J Neurosci* 16:2358-2370.
- Liapis H, Nag M, Kaji DM (1998) K-Cl cotransporter expression in the human kidney. *Am J Physiol* 275:C1432-1437.
- Lieberman AR (1971) The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int Rev Neurobiol* 14:49-124.
- Liu B, Linley JE, Du X, Zhang X, Ooi L, Zhang H, Gamper N (2010) The acute nociceptive signals induced by bradykinin in rat sensory neurons are mediated by inhibition of M-type K⁺ channels and activation of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J Clin Invest* 120:1240-1252.
- Lu J, Karadsheh M, Delpire E (1999) Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J Neurobiol* 39:558-568.
- Ludwig A, Uvarov P, Soni S, Thomas-Crusells J, Airaksinen MS, Rivera C (2011) Early growth response 4 mediates BDNF induction of potassium chloride cotransporter 2 transcription. *J Neurosci* 31:644-649.
- Lumpkin EA, Marshall KL, Nelson AM (2010) The cell biology of touch. *J Cell Biol* 191:237-248.
- Lynch JW (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* 84:1051-1095.
- Maddox FN, Valeyev AY, Poth K, Holohean AM, Wood PM, Davidoff RA, Hackman JC, Luetje CW (2004) GABAA receptor subunit mRNA expression in cultured embryonic and adult human dorsal root ganglion neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 149:143-151.
- Madison DV, Malenka RC, Nicoll RA (1986) Phorbol esters block a voltage-sensitive chloride current in hippocampal pyramidal cells. *Nature* 321:695-697.
- Marmigere F, Ernfors P (2007) Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat Rev Neurosci* 8:114-127.
- Marz P, Otten U, Rose-John S (1999) Neural activities of IL-6-type cytokines often depend on soluble cytokine receptors. *Eur J Neurosci* 11:2995-3004.
- Matthews JB, Hassan I, Meng S, Archer SY, Hrnjez BJ, Hodin RA (1998) Na-K-2Cl cotransporter gene expression and function during enterocyte differentiation. Modulation of Cl⁻ secretory capacity by butyrate. *J Clin Invest* 101:2072-2079.
- Mechaly I, Bourane S, Piquemal D, Al-Jumaily M, Venteo S, Puech S, Scamps F, Valmier J, Carroll P (2006) Gene profiling during development and after a peripheral nerve traumatism reveals genes specifically induced by injury in dorsal root ganglia. *Mol Cell Neurosci* 32:217-229.
- Melemedjian OK, Asiedu MN, Tillu DV, Peebles KA, Yan J, Ertz N, Dussor GO, Price TJ (2010) IL-6- and NGF-induced rapid control of protein synthesis and nociceptive plasticity via convergent signaling to the eIF4F complex. *J Neurosci* 30:15113-15123.
- Melzack R, Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150:971-979.
- Mercado A, Broumand V, Zandi-Nejad K, Enck AH, Mount DB (2006) A C-terminal domain in KCC2 confers constitutive K⁺-Cl⁻ cotransport. *J Biol Chem* 281:1016-1026.
- Meyer J, Johannssen K, Freitag CM, Schraut K, Teuber I, Hahner A, Mainhardt C, Mossner R, Volz HP, Wienker TF, McKeane D, Stephan DA, Rouleau G, Reif A, Lesch KP (2005) Rare variants of the gene encoding the potassium chloride co-transporter 3 are associated with bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 8:495-504.

- Miao T, Wu D, Zhang Y, Bo X, Subang MC, Wang P, Richardson PM (2006) Suppressor of cytokine signaling-3 suppresses the ability of activated signal transducer and activator of transcription-3 to stimulate neurite growth in rat primary sensory neurons. *J Neurosci* 26:9512-9519.
- Miyabe T, Miletic V (2005) Multiple kinase pathways mediate the early sciatic ligation-associated activation of CREB in the rat spinal dorsal horn. *Neurosci Lett* 381:80-85.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ (2002) Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* 22:6724-6731.
- Moore-Hoon ML, Turner RJ (2000) The structural unit of the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) is a homodimer. *Biochemistry* 39:3718-3724.
- Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura S, Uchida S, Natsume T, Matsumoto K, Shibuya H (2005) WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. *J Biol Chem* 280:42685-42693.
- Mount DB, Delpire E, Gamba G, Hall AE, Poch E, Hoover RS, Hebert SC (1998) The electroneutral cation-chloride cotransporters. *J Exp Biol* 201:2091-2102.
- Mount DB, Mercado A, Song L, Xu J, George AL, Jr., Delpire E, Gamba G (1999) Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem* 274:16355-16362.
- Mundhenk L, Alfalah M, Elble RC, Pauli BU, Naim HY, Gruber AD (2006) Both cleavage products of the mCLCA3 protein are secreted soluble proteins. *J Biol Chem* 281:30072-30080.
- Murphy PG, Grondin J, Altares M, Richardson PM (1995) Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons. *J Neurosci* 15:5130-5138.
- Nabekura J, Ueno T, Okabe A, Furuta A, Iwaki T, Shimizu-Okabe C, Fukuda A, Akaike N (2002) Reduction of KCC2 expression and GABA_A receptor-mediated excitation after in vivo axonal injury. *J Neurosci* 22:4412-4417.
- Namikawa K, Honma M, Abe K, Takeda M, Mansur K, Obata T, Miwa A, Okado H, Kiyama H (2000) Akt/protein kinase B prevents injury-induced motoneuron death and accelerates axonal regeneration. *J Neurosci* 20:2875-2886.
- Navarro X, Vivo M, Valero-Cabre A (2007) Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol* 82:163-201.
- Obreja O, Biasio W, Andratsch M, Lips KS, Rathee PK, Ludwig A, Rose-John S, Kress M (2005) Fast modulation of heat-activated ionic current by proinflammatory interleukin 6 in rat sensory neurons. *Brain* 128:1634-1641.
- Obrietan K, van den Pol AN (1995) GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca²⁺ elevating to depressing. *J Neurosci* 15:5065-5077.
- Okamoto T, Namikawa K, Asano T, Takaoka K, Kiyama H (2004) Differential regulation of the regulatory subunits for phosphatidylinositol 3-kinase in response to motor nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* 131:119-125.
- Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 16:6414-6423.
- Park KK, Hu Y, Muhling J, Pollett MA, Dallimore EJ, Turnley AM, Cui Q, Harvey AR (2009) Cytokine-induced SOCS expression is inhibited by cAMP analogue: impact on regeneration in injured retina. *Mol Cell Neurosci* 41:313-324.
- Payne JA (1997) Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K⁺]_o regulation. *Am J Physiol* 273:C1516-1525.

- Payne JA, Forbush B, 3rd (1994) Alternatively spliced isoforms of the putative renal Na-K-Cl cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4544-4548.
- Payne JA, Stevenson TJ, Donaldson LF (1996) Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem* 271:16245-16252.
- Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K (2003) Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26:199-206.
- Payne JA, Xu JC, Haas M, Lytle CY, Ward D, Forbush B, 3rd (1995) Primary structure, functional expression, and chromosomal localization of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter in human colon. *J Biol Chem* 270:17977-17985.
- Pearson MM, Lu J, Mount DB, Delpire E (2001) Localization of the K(+)-Cl(-) cotransporter, KCC3, in the central and peripheral nervous systems: expression in the choroid plexus, large neurons and white matter tracts. *Neuroscience* 103:481-491.
- Pedersen SF, O'Donnell ME, Anderson SE, Cala PM (2006) Physiology and pathophysiology of Na⁺/H⁺ exchange and Na⁺ -K⁺ -2Cl⁻ cotransport in the heart, brain, and blood. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R1-25.
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108:705-715.
- Pellegrino CM, Rybicki AC, Musto S, Nagel RL, Schwartz RS (1998) Molecular identification and expression of erythroid K:Cl cotransporter in human and mouse erythroleukemic cells. *Blood Cells Mol Dis* 24:31-40.
- Penfield W, Rasmussen T (1950) The cerebral cortex of man : A clinical study of localization of function. In, pp 214-215. New York: Macmillan.
- Persohn E, Malherbe P, Richards JG (1991) In situ hybridization histochemistry reveals a diversity of GABAA receptor subunit mRNAs in neurons of the rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Neuroscience* 42:497-507.
- Piccollo A, Pusch M (2005) Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins ClC-4 and ClC-5. *Nature* 436:420-423.
- Piechotta K, Lu J, Delpire E (2002) Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). *J Biol Chem* 277:50812-50819.
- Pieraut S, Laurent-Matha V, Sar C, Hubert T, Mechaly I, Hilaire C, Mersel M, Delpire E, Valmier J, Scamps F (2007) NKCC1 phosphorylation stimulates neurite growth of injured adult sensory neurons. *J Neurosci* 27:6751-6759.
- Plotkin MD, Snyder EY, Hebert SC, Delpire E (1997) Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J Neurobiol* 33:781-795.
- Polgar E, Hughes DI, Arham AZ, Todd AJ (2005) Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *J Neurosci* 25:6658-6666.
- Pond BB, Berglund K, Kuner T, Feng G, Augustine GJ, Schwartz-Bloom RD (2006) The chloride transporter Na(+)-K(+)-Cl- cotransporter isoform-1 contributes to intracellular chloride increases after in vitro ischemia. *J Neurosci* 26:1396-1406.
- Price MP, McIlwrath SL, Xie J, Cheng C, Qiao J, Tarr DE, Sluka KA, Brennan TJ, Lewin GR, Welsh MJ (2001) The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 32:1071-1083.

- Price TJ, Hargreaves KM, Cervero F (2006) Protein expression and mRNA cellular distribution of the NKCC1 cotransporter in the dorsal root and trigeminal ganglia of the rat. *Brain Res* 1112:146-158.
- Qiu J, Cafferty WB, McMahon SB, Thompson SW (2005) Conditioning injury-induced spinal axon regeneration requires signal transducer and activator of transcription 3 activation. *J Neurosci* 25:1645-1653.
- Qiu J, Cai D, Dai H, McAtee M, Hoffman PN, Bregman BS, Filbin MT (2002) Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* 34:895-903.
- Race JE, Makhlof FN, Logue PJ, Wilson FH, Dunham PB, Holtzman EJ (1999) Molecular cloning and functional characterization of KCC3, a new K-Cl cotransporter. *Am J Physiol* 277:C1210-1219.
- Raivich G, Behrens A (2006) Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. *Prog Neurobiol* 78:347-363.
- Raivich G, Hellweg R, Kreutzberg GW (1991) NGF receptor-mediated reduction in axonal NGF uptake and retrograde transport following sciatic nerve injury and during regeneration. *Neuron* 7:151-164.
- Raivich G, Bohatschek M, Da Costa C, Iwata O, Galiano M, Hristova M, Nateri AS, Makwana M, Riera-Sans L, Wolfer DP, Lipp HP, Aguzzi A, Wagner EF, Behrens A (2004) The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. *Neuron* 43:57-67.
- Randall J, Thorne T, Delpire E (1997) Partial cloning and characterization of Slc12a2: the gene encoding the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. *Am J Physiol* 273:C1267-1277.
- Rasband MN, Park EW, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Trimmer JS (2001) Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13373-13378.
- Reyes O, Sosa I, Kuffler DP (2005) Promoting neurological recovery following a traumatic peripheral nerve injury. *P R Health Sci J* 24:215-223.
- Rice FL, Fundin BT, Arvidsson J, Aldskogius H, Johansson O (1997) Comprehensive immunofluorescence and lectin binding analysis of vibrissal follicle sinus complex innervation in the mystacial pad of the rat. *J Comp Neurol* 385:149-184.
- Rinehart J, Maksimova YD, Tanis JE, Stone KL, Hodson CA, Zhang J, Risinger M, Pan W, Wu D, Colangelo CM, Forbush B, Joiner CH, Gulcicek EE, Gallagher PG, Lifton RP (2009) Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity. *Cell* 138:525-536.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999) The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397:251-255.
- Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipila S, Payne JA, Minichiello L, Saarma M, Kaila K (2004) Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Neurosci* 24:4683-4691.
- Rivera C, Li H, Thomas-Crusells J, Lahtinen H, Viitanen T, Nanobashvili A, Kokaia Z, Airaksinen MS, Voipio J, Kaila K, Saarma M (2002) BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *J Cell Biol* 159:747-752.
- Rocha-Gonzalez HI, Mao S, Alvarez-Leefmans FJ (2008) Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransport and intracellular chloride regulation in rat primary sensory neurons: thermodynamic and kinetic aspects. *J Neurophysiol* 100:169-184.

- Rosenberg WS, Breakefield XO, DeAntonio C, Isacson O (1992) Authentic and artifactual detection of the E. coli lacZ gene product in the rat brain by histochemical methods. *Brain Res Mol Brain Res* 16:311-315.
- Russell JM (2000) Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* 80:211-276.
- Rust MB, Faulhaber J, Budack MK, Pfeffer C, Maritzen T, Didie M, Beck FX, Boettger T, Schubert R, Ehmke H, Jentsch TJ, Hubner CA (2006) Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3. *Circ Res* 98:549-556.
- Rybalchenko V, Santos-Sacchi J (2008) Anion control of voltage sensing by the motor protein prestin in outer hair cells. *Biophys J* 95:4439-4447.
- Salin-Cantegrel A, Shekarabi M, Holbert S, Dion P, Rochefort D, Laganier J, Dacal S, Hince P, Karemera L, Gaspar C, Lapointe JY, Rouleau GA (2008) HMSN/ACC truncation mutations disrupt brain-type creatine kinase-dependant activation of K⁺/Cl⁻ cotransporter 3. *Hum Mol Genet* 17:2703-2711.
- Schmitt AB, Breuer S, Liman J, Buss A, Schlangen C, Pech K, Hol EM, Brook GA, Noth J, Schwaiger FW (2003) Identification of regeneration-associated genes after central and peripheral nerve injury in the adult rat. *BMC Neurosci* 4:8.
- Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Jan LY (2008) Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 134:1019-1029.
- Schwaiger FW, Hager G, Schmitt AB, Horvat A, Streif R, Spitzer C, Gamal S, Breuer S, Brook GA, Nacimiento W, Kreutzberg GW (2000) Peripheral but not central axotomy induces changes in Janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcription (STAT). *Eur J Neurosci* 12:1165-1176.
- Scott RH, Sutton KG, Griffin A, Stapleton SR, Currie KP (1995) Aspects of calcium-activated chloride currents: a neuronal perspective. *Pharmacol Ther* 66:535-565.
- Seddon HJ, Medawar PB, Smith H (1943) Rate of regeneration of peripheral nerves in man. *J Physiol* 102:191-215.
- Seiffers R, Mills CD, Woolf CJ (2007) ATF3 increases the intrinsic growth state of DRG neurons to enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci* 27:7911-7920.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205-218.
- Serafini R, Valeyev AY, Barker JL, Poulter MO (1995) Depolarizing GABA-activated Cl⁻ channels in embryonic rat spinal and olfactory bulb cells. *J Physiol* 488 (Pt 2):371-386.
- Shadiack AM, Sun Y, Zigmond RE (2001) Nerve growth factor antiserum induces axotomy-like changes in neuropeptide expression in intact sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci* 21:363-371.
- Shen MR, Chou CY, Hsu KF, Liu HS, Dunham PB, Holtzman EJ, Ellory JC (2001) The KCl cotransporter isoform KCC3 can play an important role in cell growth regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14714-14719.
- Sheu JY, Kulhanek DJ, Eckenstein FP (2000) Differential patterns of ERK and STAT3 phosphorylation after sciatic nerve transection in the rat. *Exp Neurol* 166:392-402.
- Shimizu-Okabe C, Okabe A, Kilb W, Sato K, Luhmann HJ, Fukuda A (2007) Changes in the expression of cation-Cl⁻ cotransporters, NKCC1 and KCC2, during cortical malformation induced by neonatal freeze-lesion. *Neurosci Res* 59:288-295.
- Shin JB, Martinez-Salgado C, Heppenstall PA, Lewin GR (2003) A T-type calcium channel required for normal function of a mammalian mechanoreceptor. *Nat Neurosci* 6:724-730.

- Smith PD, Sun F, Park KK, Cai B, Wang C, Kuwako K, Martinez-Carrasco I, Connolly L, He Z (2009) SOCS3 deletion promotes optic nerve regeneration in vivo. *Neuron* 64:617-623.
- Song XY, Li F, Zhang FH, Zhong JH, Zhou XF (2008) Peripherally-derived BDNF promotes regeneration of ascending sensory neurons after spinal cord injury. *PLoS One* 3:e1707.
- Staley K, Smith R, Schaack J, Wilcox C, Jentsch TJ (1996) Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. *Neuron* 17:543-551.
- Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Jentsch TJ, Hubner CA (2004) Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *J Comp Neurol* 468:57-64.
- Stil A, Liabeuf S, Jean-Xavier C, Brocard C, Viemari JC, Vinay L (2009) Developmental up-regulation of the potassium-chloride cotransporter type 2 in the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience* 164:809-821.
- Stil A, Jean-Xavier C, Liabeuf S, Brocard C, Delpire E, Vinay L, Viemari JC (2011) Contribution of the potassium-chloride co-transporter KCC2 to the modulation of lumbar spinal networks in mice. *Eur J Neurosci*.
- Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S, Engel D, Schweizer M, Zdebik AA, Bosl MR, Ruether K, Jahn H, Draguhn A, Jahn R, Jentsch TJ (2001) Disruption of CLC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* 29:185-196.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112:819-829.
- Sun H, Tsunenari T, Yau KW, Nathans J (2002) The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4008-4013.
- Sun YT, Lin TS, Tzeng SF, Delpire E, Shen MR (2010) Deficiency of electroneutral K⁺-Cl⁻ cotransporter 3 causes a disruption in impulse propagation along peripheral nerves. *Glia* 58:1544-1552.
- Sung KW, Kirby M, McDonald MP, Lovinger DM, Delpire E (2000) Abnormal GABAA receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *J Neurosci* 20:7531-7538.
- Suzuki M, Mizuno A (2004) A novel human Cl⁻ channel family related to *Drosophila* flightless locus. *J Biol Chem* 279:22461-22468.
- Tandrup T, Woolf CJ, Coggeshall RE (2000) Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve. *J Comp Neurol* 422:172-180.
- Thier M, Marz P, Otten U, Weis J, Rose-John S (1999) Interleukin-6 (IL-6) and its soluble receptor support survival of sensory neurons. *J Neurosci Res* 55:411-422.
- Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V (2006) The role of T-type calcium channels in peripheral and central pain processing. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:639-653.
- Tofaris GK, Patterson PH, Jessen KR, Mirsky R (2002) Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci* 22:6696-6703.
- Toyoda H, Ohno K, Yamada J, Ikeda M, Okabe A, Sato K, Hashimoto K, Fukuda A (2003) Induction of NMDA and GABAA receptor-mediated Ca²⁺ oscillations with KCC2 mRNA downregulation in injured facial motoneurons. *J Neurophysiol* 89:1353-1362.
- Tretter V, Ehya N, Fuchs K, Sieghart W (1997) Stoichiometry and assembly of a recombinant GABAA receptor subtype. *J Neurosci* 17:2728-2737.

- Tsujino H, Kondo E, Fukuoka T, Dai Y, Tokunaga A, Miki K, Yonenobu K, Ochi T, Noguchi K (2000) Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol Cell Neurosci* 15:170-182.
- Tyzio R, Cossart R, Khalilov I, Minlebaev M, Hubner CA, Represa A, Ben-Ari Y, Khazipov R (2006) Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science* 314:1788-1792.
- Ueda H (2006) Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacol Ther* 109:57-77.
- Uvarov P, Pruunsild P, Timmusk T, Airaksinen MS (2005) Neuronal K⁺/Cl⁻ co-transporter (KCC2) transgenes lacking neurone restrictive silencer element recapitulate CNS neurone-specific expression and developmental up-regulation of endogenous KCC2 gene. *J Neurochem* 95:1144-1155.
- Uvarov P, Ludwig A, Markkanen M, Pruunsild P, Kaila K, Delpire E, Timmusk T, Rivera C, Airaksinen MS (2007) A novel N-terminal isoform of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Biol Chem* 282:30570-30576.
- Uyanik G, Elcioglu N, Penzien J, Gross C, Yilmaz Y, Olmez A, Demir E, Wahl D, Scheglmann K, Winner B, Bogdahn U, Topaloglu H, Hehr U, Winkler J (2006) Novel truncating and missense mutations of the KCC3 gene associated with Andermann syndrome. *Neurology* 66:1044-1048.
- van den Pol AN, Obrietan K, Chen G (1996) Excitatory actions of GABA after neuronal trauma. *J Neurosci* 16:4283-4292.
- Vardi N, Zhang LL, Payne JA, Sterling P (2000) Evidence that different cation chloride cotransporters in retinal neurons allow opposite responses to GABA. *J Neurosci* 20:7657-7663.
- Vernet M, Bonnerot C, Briand P, Nicolas JF (1993) Application of LacZ gene fusions to preimplantation development. *Methods Enzymol* 225:434-451.
- Vibat CR, Holland MJ, Kang JJ, Putney LK, O'Donnell ME (2001) Quantitation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport splice variants in human tissues using kinetic polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 298:218-230.
- Viero C, Mechaly I, Aptel H, Puech S, Valmier J, Bancel F, Dayanithi G (2006) Rapid inhibition of Ca²⁺ influx by neurosteroids in murine embryonic sensory neurones. *Cell Calcium* 40:383-391.
- Villa F, Goebel J, Rafiqi FH, Deak M, Thastrup J, Alessi DR, van Aalten DM (2007) Structural insights into the recognition of substrates and activators by the OSR1 kinase. *EMBO Rep* 8:839-845.
- Vitari AC, Thastrup J, Rafiqi FH, Deak M, Morrice NA, Karlsson HK, Alessi DR (2006) Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 and downstream substrate NKCC1. *Biochem J* 397:223-231.
- Vitari AC, Deak M, Collins BJ, Morrice N, Prescott AR, Phelan A, Humphreys S, Alessi DR (2004) WNK1, the kinase mutated in an inherited high-blood-pressure syndrome, is a novel PKB (protein kinase B)/Akt substrate. *Biochem J* 378:257-268.
- von Banchet GS, Kiehl M, Schaible HG (2005) Acute and long-term effects of IL-6 on cultured dorsal root ganglion neurones from adult rat. *J Neurochem* 94:238-248.
- Wake H, Watanabe M, Moorhouse AJ, Kanematsu T, Horibe S, Matsukawa N, Asai K, Ojika K, Hirata M, Nabekura J (2007) Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress result in functional downregulation. *J Neurosci* 27:1642-1650.
- Wang C, Shimizu-Okabe C, Watanabe K, Okabe A, Matsuzaki H, Ogawa T, Mori N, Fukuda A, Sato K (2002) Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 139:59-66.

- Wang L, Lee HK, Seo IA, Shin YK, Lee KY, Park HT (2009) Cell type-specific STAT3 activation by gp130-related cytokines in the peripheral nerves. *Neuroreport* 20:663-668.
- Wardle RA, Poo MM (2003) Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. *J Neurosci* 23:8722-8732.
- Werner A, Willem M, Jones LL, Kreutzberg GW, Mayer U, Raivich G (2000) Impaired axonal regeneration in alpha7 integrin-deficient mice. *J Neurosci* 20:1822-1830.
- Willis DE, Twiss JL (2006) The evolving roles of axonally synthesized proteins in regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 16:111-118.
- Windle WF, Chambers WW (1950) Regeneration in the spinal cord of the cat and dog. *J Comp Neurol* 93:241-257.
- Wu D, Zhang Y, Bo X, Huang W, Xiao F, Zhang X, Miao T, Magoulas C, Subang MC, Richardson PM (2007) Actions of neurotrophic cytokines and cyclic AMP in regenerative conditioning of rat primary sensory neurons. *Exp Neurol* 204:66-76.
- Xiao HS, Huang QH, Zhang FX, Bao L, Lu YJ, Guo C, Yang L, Huang WJ, Fu G, Xu SH, Cheng XP, Yan Q, Zhu ZD, Zhang X, Chen Z, Han ZG (2002) Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8360-8365.
- Xu JC, Lytle C, Zhu TT, Payne JA, Benz E, Jr., Forbush B, 3rd (1994) Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2201-2205.
- Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A (2004) Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurons is mediated by NKCC1. *J Physiol* 557:829-841.
- Yang Y, Xie Y, Chai H, Fan M, Liu S, Liu H, Bruce I, Wu W (2006) Microarray analysis of gene expression patterns in adult spinal motoneurons after different types of axonal injuries. *Brain Res* 1075:1-12.
- Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, Park SP, Lee J, Lee B, Kim BM, Raouf R, Shin YK, Oh U (2008) TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455:1210-1215.
- Ygge J (1989) Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compared to distal sciatic nerve resection: a quantitative study in the rat. *Brain Res* 478:193-195.
- Zade-Oppen AM, Lauf PK (1990) Thiol-dependent passive K⁺: Cl⁻ transport in sheep red blood cells: IX. Modulation by pH in the presence and absence of DIDS and the effect of NEM. *J Membr Biol* 118:143-151.
- Zhang SJ, Jackson MB (1995) GABA_A receptor activation and the excitability of nerve terminals in the rat posterior pituitary. *J Physiol* 483 (Pt 3):583-595.
- Zhong J, Dietzel ID, Wahle P, Kopf M, Heumann R (1999) Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice. *J Neurosci* 19:4305-4313.

ANNEXE : Travail sur les neurones D-Hair

Neurotrophin-4 modulates the mechanotransducer $Ca_v3.2$ T-type calcium current in mice down-hair neurons

Cécile Hilaire¹, Olivier Lucas¹, Jean Valmier² and Frédérique Scamps¹

¹ *Institute for Neurosciences of Montpellier, Montpellier, F34000, France.*

² *Inserm U-1051, Montpellier, F34000, France.*

Running title: NT-4 regulation of T-current in sensory neurons

Key words: T-type calcium current, dorsal root ganglion; sensory neuron.

Number of words: 4394

Corresponding author Frédérique Scamps, INM-Hôpital St Eloi, 80, rue Augustin Fliche, 34091 Montpellier Cedex 5, France.

E-mail: frederique.scamps@inserm.fr

Table of Contents category: Molecular and Cellular

Abstract

The T-type calcium channel $Ca_v3.2$ is expressed in nociceptive and mechanosensitive sensory neurons. The mechanosensitive D-hair neurons, which innervate hair follicles, are characterized by a large-amplitude $Ca_v3.2$ T-current involved in the amplification of slow moving stimuli. However, the molecules and signaling pathways that regulate T-current expression in mechanoreceptors are unknown. Through *in-vitro* identification of D-hair neurons, we investigated the effects of the putative target-derived neurotrophin NT-4 on $Ca_v3.2$ T-current expression in D-hair neurons. Interruption of NT-4 supply with peripheral

nerve axotomy induced a non-transcriptional decrease in the T-current amplitude of fluoro-gold labeled axotomized sensory neurons. The T-current amplitude was restored with NT-4 incubation. Deletion of NT-4 through genetic ablation resulted in a similar selective loss of large amplitude T-current in NT-4^{-/-} sensory neurons, which was rescued with addition of NT-4. NT-4 had no effects on the T-current in axotomized Ca_v3.2^{-/-} D-hair neurons. Neither T-current biophysical properties nor Ca_v3.2 transcript expression were modified by NT-4. Pharmacological screening of signaling pathways activated under the high-affinity NT-4 receptor, TrkB, identified a role of PI3 kinase in the potentiation of T-current. These data demonstrate the post-transcriptional up-regulation of Ca_v3.2 T-current through activation of high-affinity NT-4 receptor and identify NT-4 as a target-derived factor that regulates mechanosensitive function of D-hair neurons through T-current expression.

Abbreviations CAMKII, calmodulin kinase II; DRB, 5,6-dichlorobenzimidazole riboside; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; p75^{NTR}, low affinity neurotrophin receptor; Trk tropomyosin receptor kinase.

Introduction

Low-threshold tactile mechanoreceptors are composed of different functional neuronal types innervating glabrous and hairy skin (Martin & Jessell 1992). Ionic channels are molecular signatures of a somatic sensation converting a specific physical stimulus into electrical activity. Despite their prominent role in the detection, propagation, and integration of somatic sensations, only few ionic channels have been identified as specific functional markers of mechanoreceptors or proprioceptors; even less is known about the regulation of their expression (Tsunozaki & Bautista 2009).

Among the low-threshold mechanoreceptors, the down-hair mechanoreceptors innervating the hair follicles are probably the best functionally characterized. A molecular hallmark of D-hair neurons is the high expression of $Ca_v3.2$ gene, coding for a low-voltage activated Ca^{2+} channel, together with the high-affinity tropomyosin receptor, TrkB (Stucky *et al.* 2002; Shin *et al.* 2003; Dubreuil *et al.* 2004). Although the mechanoreceptor responsible for stimulus detection in D-hair neurons is unknown, functional studies using *ex vivo* skin-nerve preparations have demonstrated that the $Ca_v3.2$ T-current increases the mechanical sensitivity of D-hair neurons (Shin *et al.* 2003). Identification of D-hair neurons in culture, based on induction of a rosette-like neuritic growth after treatment with neurotrophin-4 or brain-derived neurotrophic factor, confirmed the presence of a large-amplitude T-current mainly due to the $Ca_v3.2$ gene (Dubreuil *et al.* 2004; Aptel *et al.* 2007). The role of the T-current in mechanotransduction was further clarified by showing that it reduces the threshold to trigger electrical activity in culture, and may enhance the sensitivity of these neurons to slowly moving stimuli *ex vivo* (Dubreuil *et al.* 2004). Having demonstrated that the T-current is involved in stimulus amplification of hair movement, the next issue was to determine whether the T-current in D-hair neurons is sensitive to external cues, particularly neurotrophin-4 (NT-4).

Neurotrophins are molecular mediators of synaptic and morphological plasticity and play a role not only during development but also in the maintenance of normal functioning (McAllister *et al.* 1999). The importance of neurotrophins in mechanotransduction has been demonstrated by showing that they are necessary for normal functioning of slowly adapting fibers (Carroll *et al.* 1998). They have also been shown to regulate expression of the mechanosensitive ASIC2 channel (McIlwrath *et al.* 2005), and are involved in the differentiation of sensory neuron mechanosensitivity (Lechner *et al.* 2009). NT-4 induces rosette-like neurite growth *in vitro* is evocative of large receptive fields and exuberant

terminal growth of D-hairs in the skin (Heppenstall & Lewin 2006). This suggests that NT-4 could be a target-derived neurotrophin. In the present study, we investigated the effects of NT-4 on the large-amplitude T-current in cultured D-hair neurons. To address this question, a peripheral nerve injury model was used to induce peripheral NT-4 deprivation. Following nerve injury, we show that NT-4 restores $Ca_v3.2$ T-current amplitude in axotomized D-hair neurons through post-transcriptional effects of TrkB activation. Analysis of the T-current in sensory neurons from NT-4^{-/-} mice confirmed the role of NT-4 in the maintenance of large-amplitude T-current expression.

Methods

Ethical approval

Experimental procedures were approved by the local ethics committee.

Animals and surgery

Adult female Swiss mice and C57/Bl6 mice (CERJ, Le Genest St Isle, France) were housed in cages with a 12/12 h light/dark cycle and fed food and water *ad libitum*. Adult mice lacking Cav3.2 (Cav3.2^{-/-}) and NT-4 (NT-4^{-/-}) were generated as described previously (Chen *et al.* 2003) and (Conover *et al.* 1995). Care and use of the mice conformed to institutional policies and guidelines. For surgery, mice were anaesthetized by constant isoflurane inhalation. The left sciatic nerve was exposed at the mid-thigh level, sectioned, and a 2-3 mm fragment of nerve was removed. For retrograde neuronal tracing, 5 μ l of 2 % fluoro-gold in sterile distilled water (Molecular Probes) was injected close to the proximal sciatic stump and the wound was sutured. Mice were kept alive for 4 to 5 days.

DRG neuron isolation

Mice were killed by CO₂ inhalation followed by cervical dislocation in accordance with European guidelines and their dorsal root ganglia were then removed. Neuronal cultures were established from L4-L6 lumbar dorsal root ganglia as previously reported (Andre *et al.* 2003). Two hours after plating, the culture medium was carefully removed and replaced to eliminate dead cells and tissue debris, and recombinant NT-4 (PeproTech) was added when required.

Electrophysiology

Currents were recorded after 1 day *in vitro* (DIV), at 20-22°C, with the whole-cell patch-clamp technique. For recordings of calcium currents, the bath solution contained 140 mM TEA-Cl, 2 mM CaCl₂ or 1 mM BaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4. The pipette solution contained 145 mM CsCl, 1.5 mM Mg-ATP, 0.5 mM Na-GTP, 0.1 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.35. Signals were filtered at 2 kHz and sampled at 5 kHz. Cell capacitance was determined by fitting an exponential curve to the uncompensated current trace resulting from a voltage-clamp step from -80 mV to -90 mV. NT-4-induced rosette like neurite growth after 1 DIV led to the appearance of a second slower capacitive time constant and best fits were obtained with two exponential curves; the fast component accounted for 75-80 % of the total capacitance signal and the slow component 15-20 %. Corresponding values of capacitance varied from 25 to 30 pF and from 80 to 130 pF (n = 20), respectively. As T-channel expression within soma and neurites is unknown, T-current amplitude in D-hair neurons was not normalized to cell capacitance to allow comparison of the total T-channel pool within a same population. As far as possible, series resistance compensation (40-70 %) was used to reduce voltage errors, and only activation curves displaying regular increases in current amplitude following threshold potential were analyzed. Activation curves were fitted with the Boltzman equation:

$$I/I_{\max} = (1 + \exp (V_{1/2\text{act}} - V) k)^{-1},$$

where I is the current amplitude at membrane voltage V , I_{\max} is the T-current maximal conductance at -40 mV, $V_{1/2\text{act}}$ is the half-activation voltage, and k is the slope factor.

Inactivation curves were fitted with a Boltzman equation using normalized current values:

$$I/I_{\max} = (1 + \exp (V_{1/2\text{inac}} - V) k)^{-1},$$

where I is current at membrane voltage V , I_{\max} is maximal current with a -100 mV conditioning prepulse, and $V_{1/2\text{inac}}$ and k have the same meaning as above.

For patch-clamp experiments, identification of axotomized neurons was performed using wide-field epifluorescence illumination achieved by using an X-cite lamp with a standard filter set for ultra-violet excitation. For morphological analysis, neurons were fixed and images were collected using a 20X pan-fluor objective on an upright Leica microscope equipped with a CCD camera. For each experiment, cell-size was estimated on an eyepiece micrometer scale.

All drugs were from Sigma, prepared as stock solutions and stored at -20°C for two weeks. Anti-NGF receptor p75 (p75^{NTR}) (working dilutions 1:1000 to 1:100) was from Millipore and stored at -20°C .

Quantification of mRNA expression levels by real-time quantitative PCR

Total mRNA was extracted at day 1 from *in vitro* primary cultures obtained from nine L4-L6 DRG in adult mice, using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Reverse transcription was performed with 200 ng mRNA using the Quantitect RT kit (Qiagen). Primers were designed using the Primers 3.0 software. The mouse *Cav3.2* forward primer sequence was 5' AGCAAGCTGCGTCGCATTGT and the reverse sequence was 5' TCCAGCGCGTTAGTCAGCTCAT. To confirm the efficiency of nerve axotomy, we used the injury marker *Sprrla* (small proline-rich repeat protein 1A) forward primer,

5'CCAGCAGAAGACAAAGCAGA and reverse primer, 5'GGGCAATGTTAAGAGGCTCA. PCR in real time was performed on 10 ng cDNA using SYBR Green I dye detection in the Light Cycler system (Roche Diagnostics) as previously described (Pieraut *et al.* 2007). Relative amounts of cDNA were calculated using the comparative delta-Ct method from two independent experiments. The internal reference gene was polymerase (RNA) II polypeptide J, *Polr2j* whose expression does not change after axotomy.

Statistical analysis

All values are reported as mean \pm s.e.m. Statistical significance was evaluated using one-way ANOVA (followed by *post hoc* analysis using Bonferroni test), Student's unpaired *t* test as indicated, with $P < 0.05$ considered to be significant. The non parametric Mann-Whitney test was used for the RT-qPCR experiments (Graphpad Prism 5, Graphpad software Inc., La Jolla CA).

Results

NT-4 rescues T-current amplitude in axotomized D-hair neurons

To examine whether NT-4 deprivation at the periphery could affect T-current amplitude recorded *in vitro*, the sciatic nerve was sectioned *in vivo* to interrupt the supply of target-derived neurotrophic factors for several days. To assess the effects of NT-4 on T-current amplitude, the distribution of T-current amplitude was randomly analyzed, under control conditions and five days after *in vivo* sciatic-nerve transection, within the medium-sized population of sensory neurons which contains D-hair neurons. 30 % of medium-sized sensory neurons (32 out of 106) expressed a T-current as recorded with a ramp protocol (Fig. 1A). The peak amplitude of the T-current inside this population varied widely from -0.1 nA up

to -6.7 nA, which is representative of different sub-populations of sensory neurons (Fig. 1B). A molecular hallmark of the mechanosensitive D-hair neurons is the expression of large-amplitude T-current. Overnight incubation of primary cultures with NT-4 induced a specific rosette-like neurite growth in D-hair neurons, which allowed us to specifically analyze this mechanosensitive population within the medium-sized neurons (Dubreuil *et al.* 2004). On 12 recorded D-hair neurons, T-current amplitude ranged from -3 nA to -6.7 nA (Fig. 1B).

Following nerve injury, axotomized neurons were identified with fluoro-gold staining and Ca^{2+} current recordings were performed in the same somatic diameter range as the controls. 25 % of axotomized neurons (33 out of 130) expressed a T-current, but the frequency histogram of T-current amplitude among axotomized neurons was shifted towards smaller amplitudes ranging from -0.1 nA to -2.4 nA (Fig. 1A, C). Overnight treatment of axotomized neurons with 10 ng/ml NT-4 induced a typical rosette-like neurite growth in a subset of sensory neurons. Distribution analysis of T-current amplitude ranging from -2.5 nA to -6 nA among NT-4 treated axotomized D-hair neurons confirmed the recovery of large-amplitude T-current in 12 D-hair neurons (Fig. 1C). Thus, D-hair neurons do not die following nerve injury and *in vivo* retrograde labelling with fluoro-gold shows that 80-90 % of the rosette-bearing neurons are axotomized and express a similar Ca^{2+} current profile to controls (Fig. 1D). Following NT-4 incubation, no significant differences were observed in T-current amplitude between controls (-4.5 ± 0.4 nA, $n = 12$) and axotomized D-hair neurons (-4.4 ± 0.3 , $n = 12$, *t*-test). These data demonstrate that NT-4 is a target-derived neurotrophin involved in T-current amplitude regulation.

T-current amplitude is reduced in NT-4^{-/-} D-hair neurons

To confirm that NT-4 is an endogenous regulator of T-current expression in D-hair neurons, the effects of NT-4 deprivation obtained with NT-4 genetic deletion were assessed

on T-current expression. For this series of experiments, T-current expression was analyzed in neurons from 5-weeks old C57/BL6 mice to ensure that D-hair neurons were still alive (Stucky *et al.* 1998). Random recordings of Ca^{2+} currents with ramp protocol were performed on neurons with a 30-40 μm somatic diameter from NT-4^{+/+} and NT-4^{-/-} mice (Fig. 2A). T-current is present in roughly 25 % of sensory neurons isolated from 5-week old C57/BL6 mice (NT-4^{+/+}; 33 out of 143, from 3 cultures) or from NT-4^{-/-} DRG (33 out of 140, from 3 cultures). Although maximal values of T-current amplitude are smaller in 5-week old neurons than in 8-10 week old neurons, the distribution frequency of T-current amplitudes was shifted towards lower values in the NT-4^{-/-} sensory neurons (Fig. 2B). Current-voltage relationships and inactivation properties of the largest T-current expressed in NT-4^{+/+} neurons were compared with those expressed in NT-4^{-/-} neurons. Under both conditions, T-current activated close to -65 mV and maximal amplitude was reached at around -40 mV, and then high-voltage activated Ca^{2+} current was activated (Fig. 2C, D). From the Boltzmann fits, no significant differences were observed in half-activation or inactivation voltage. We next assessed the effects of an overnight incubation of 10 ng/ml NT-4 on the T-current amplitude in NT-4^{+/+} and NT-4^{-/-} D-hair neurons. As in mature D-hair neurons, NT-4 induced a rosette-like growth in a subset of medium sized young NT-4^{+/+} and NT-4^{-/-} neurons (not shown). Ca^{2+} current recordings with ramp protocol demonstrated the presence of large amplitude T-current (Fig. 3A). The distribution histogram illustrates that NT-4 shifted the maximal amplitude of T-current towards higher values among both NT-4^{+/+} and NT-4^{-/-} neurons ($p = 0.0014$, t -test) (Fig. 3B). The maximal amplitude averaged -4.2 ± 0.2 nA, $n = 16$ in NT-4^{+/+} neurons and -3.1 ± 0.2 nA, $n = 10$, in NT-4^{-/-} neurons. Analysis of the biophysical properties of the T-current showed that NT-4 addition did not significantly modify $V_{0.5\text{act}}$ and $V_{0.5\text{inac}}$ in NT-4^{-/-} D-hair neurons (Fig. 3C). Thus exogenous NT-4 is able to rescue T-current amplitude in NT-4^{-/-} D-hair sensory neurons.

NT-4 regulates T-current arising from Cav3.2 gene in axotomized D-hair neurons

In a previous study, we demonstrated that over 90 % of the T-current expressed in D-hair neurons arises from the $Ca_v3.2$ gene (Aptel *et al.* 2007). To uncover the molecular identity of T-current up-regulated under NT-4 treatment, we compared T-current expression and biophysical properties in axotomized adult $Ca_v3.2^{+/+}$ and $Ca_v3.2^{-/-}$ D-hair neurons. Axotomized $Ca_v3.2^{+/+}$ and $Ca_v3.2^{-/-}$ were identified with fluoro-gold retrograde labelling and a rosette like neurite growth. For these experiments, the T-current was recorded in 1 mM $BaCl_2$ instead of 2 mM $CaCl_2$ to reduce current amplitude and to prevent activation of a calcium-activated chloride current frequently observed in axotomized neurons (Andre *et al.* 2003). Recordings of Ba^{2+} current expression with ramp protocol in axotomized D-hair neurons revealed the presence of a small-amplitude T-current in $Ca_v3.2^{-/-}$ neurons compared with $Ca_v3.2^{+/+}$ neurons (Fig. 4A). Analysis of activation properties shows that, following axotomy, the T-current expressed in wild-type activated D-hair neurons is close to -70 mV and maximal amplitude was reached at around -40 mV (Fig.4B). After this the high-voltage activated Ba^{2+} current began to be activated. In axotomized D-hair neurons from $Ca_v3.2^{-/-}$ mice, the T-current activated close to -50 mV and maximal amplitude was reached at around -35 mV (Fig. 4B). The maximal amplitude of the Ba^{2+} T-current was -0.6 ± 0.1 nA in $Ca_v3.2^{-/-}$ D-hair neurons (n =4), and -1.9 ± 0.2 nA in $Ca_v3.2^{+/+}$ D-hair neurons (n =5). From the Boltzmann fits, the potential for the half voltage for activation was 12 mV more depolarized in $Ca_v3.2^{-/-}$ neurons than in $Ca_v3.2^{+/+}$ neurons (Fig. 4C). Analysis of the inactivation properties revealed no significant differences between the T-current expressed in both strains (Fig. 4C).

TrkB activation mediates post-transcriptional up-regulation of T-current

Having demonstrated that the down regulation of the Ca_v3.2 T-current was related to NT-4 deprivation, we next focused our study on the signalling pathway involved in the effects of NT-4. We first assessed whether the effects of neurotrophin were related to activation of the cognate high-affinity NT-4 receptor, TrkB, or to the low-affinity p75 neurotrophin receptor, p75^{NTR} whose expression is up-regulated following nerve injury (Obata *et al.* 2006) and necessary for the normal mechanical functioning of D-hair receptors (Stucky *et al.* 1998). Before addition of NT-4, axotomized neurons were pre-treated for 1-2 h with either K252a, an inhibitor of the high affinity Trk receptors, or a blocking function antibody to the p75^{NTR}. Following overnight incubation, NT-4 still induced rosette-like neurite growth in the presence of anti p75^{NTR} antibody and amplitude of T-current was not significantly different from control values (Fig. 5A). In the presence of K252a, we never observed the rosette-like structure and thus medium-sized neurons were randomly recorded as described above. As expected from TrkB inhibition, the distribution curve of T-current amplitude in the presence of K252a evidenced the disappearance of large amplitude T-current amplitude (Fig. 5B).

To get insight into the cellular mechanisms leading to T-current amplitude regulation in D-hair neurons, we examined whether specific changes in transcript levels of Ca_v3.2 were associated with sciatic nerve injury and with TrkB activation. RT-qPCR was conducted on control, axotomized and NT-4 treated axotomized L4-L6 DRG neuron primary culture. For positive control of axotomy, we analyzed transcript level of *Sppr1a*, a known marker of injury (Bonilla *et al.* 2002). At four days following nerve injury, there was a 16 fold increase in *Sppr1a* expression in primary culture from conditioned axotomized sensory neurons compared to control culture (normalized expression levels were increased from 0.062 ± 0.003 to 1, n =2, not shown). Under the same experimental conditions, the normalized expression level of Ca_v3.2 transcript was not significantly modified compared to control culture (Fig. 5C). RT-qPCR performed on control and axotomized DRG also showed no significant

difference in Cav3.2 transcript expression level (not shown). Overnight treatment of axotomized primary culture with 10 ng/ml NT-4 had no significant effects on Cav3.2 transcript expression (Fig. 5C). To confirm the lack of transcriptional effects at the cellular level, the effects of 80 μ M 5,6-dichlorobenzimidazole riboside, DRB, an inhibitor of *de novo* mRNA synthesis, were tested on D-hair neuron T-current amplitude. Axotomized neurons were pre-treated for 2 h with DRB before adding NT-4. Following overnight incubation, electrophysiological recordings among axotomized D-hair neurons showed no significant difference between DRB-treated and untreated cultures (Fig. 5D).

These data show that transcriptional regulation of the Cav3.2 T-current is not the signalling pathway induced by axotomy or TrkB activation. In the following experiments on NT-4-treated axotomized neurons, we have investigated the downstream kinases that could be involved in the regulation of T-current amplitude. Three major pathways are activated following neurotrophin activation of Trk receptors: the phospholipase C, mitogen activated kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathways. In addition to these pathways, the CAMKII pathway is activated under Trk receptor activation. We thus assessed the effects of overnight incubation with the pharmacological inhibitors of each pathway. The phospholipase-C cascade was investigated by using bis-indolylmaleimide XI to inhibit protein kinase C and intracellular calcium stores were depleted with thapsigargin to prevent IP3-induced calcium transients. None of these pharmacological inhibitions significantly inhibited the T-current amplitude of NT-4-treated axotomized D-hair neurons, or the rosette-like neurite growth morphology. Similarly, inhibition of CAMKII with KN62, and of MAP kinase with PD98059 had no significant effects on both parameters (Fig. 6A).

Lastly, only wortmannin, an inhibitor of PI3K, induced a significant and specific decrease in the T-current amplitude in axotomized NT-4-treated D-hair neurons from -5.2 ± 0.3 nA (n =11) to -2.7 ± 0.1 nA (n=22; $p < 0.01$, t-test, Fig. 6B). In control neurons T-current

amplitude averaged -5.1 ± 0.4 nA (n=5) in the absence of wortmannin, and -4.9 ± 0.2 nA (n=6) in the presence of wortmannin ($p > 0.05$; Fig. 6C). Collectively, these data indicate that $Ca_v3.2$ T-current expression under NT-4 involved post-transcriptional modifications consecutive to PI3K activation.

Discussion

This study demonstrates that the neurotrophin NT-4 up-regulates $Ca_v3.2$ T-current amplitude in D-hair neurons, which are a subset of mechanosensitive sensory neurons expressing the high-affinity receptor, TrkB. Deprivation of NT-4 following peripheral-nerve injury or gene deletion allowed us to unmask the regulation of the T-current. The loss on NT-4 effects in $Ca_v3.2^{-/-}$ D-hair neurons established T-current generated by the $Ca_v3.2$ gene as a molecular target of effects of NT-4.

The major T-current expressed in D-hair neurons arises from the $Ca_v3.2$ gene $\alpha 1H$ subunit (Aptel *et al.* 2007). D-hair neurons are the unique sensory sub-population where the presence of the $Ca_v3.2$ T-current is unambiguously identified. This allowed us to provide a biophysical analysis of native $Ca_v3.2$ T-current. Hallmarks of the $Ca_v3.2$ T-current in D-hair neurons is a rather negative threshold of activation, around -65 mV, and the presence of a substantial window current between -65 and -50 mV. Our biophysical data are similar to those of T-currents present in a subpopulation of nociceptors and in thalamic neurons, which are also attributed to $Ca_v3.2$ gene (Joksovic *et al.* 2006; Jagodic *et al.* 2007). Analysis of $Ca_v3.2^{-/-}$ mice confirmed that NT-4 up-regulated the $Ca_v3.2$ T-current in axotomized D-hair neurons and uncovered the presence of a small-amplitude T-current. This low-voltage activated current had similar inactivation properties to the $Ca_v3.2$ T-current, but its threshold for activation was shifted towards positive voltages. A consequence of this shift is the absence of a window current in $Ca_v3.2^{-/-}$ neurons. *In situ* experiments in NT-4^{-/-} mice suggest that the

Ca_v3.3 gene is co-expressed at low levels in D-hair mechanoreceptor neurons (Shin *et al.* 2003). Comparison of the biophysical properties of native T-currents with those of heterologously expressed T-type channel Ca_v3.3 α 1I subunits also suggests an expression arising from Cav3.3 (Chemin *et al.* 2001). This is the first report that analyzes the expression of this current in D-hair neurons and despite a relatively small quantitative contribution compared with the Ca_v3.2 T-current, our study does not rule out possibly important pathophysiological contributions. Our data from Ca_v3.2^{-/-} D-hair neurons demonstrate that the presence of a window current affected neither cell survival nor the induction of rosette neurite growth as reported in cell lines (Chemin *et al.* 2002). The effects of the window current are probably on the electrical properties of the D-hair neurons, and are within the potential range to positively contribute to membrane depolarization and activation of the mechanoreceptor. Although never directly demonstrated, *ex vivo* skin-nerve experiments support a peripheral localization of the T-current at the nerve endings. Pharmacological blockade with mibefradil suggested that T-current activation acts as an amplifier of the mechanotransducer (Shin *et al.* 2003). To date, there is no molecular demonstration confirming that the Ca_v3.2 gene contributes to mechanical sensitivity *in vivo*.

Following peripheral nerve injury, the rescue of T-current amplitude with NT-4 addition suggests that the site of the NT-4 effects is peripheral. The cellular source of NT-4 is uncertain, but it is expressed in skin and is involved in the control of hair-follicle cycling and influences innervation density (Botchkarev *et al.* 2004; Krimm *et al.* 2006). In addition, our study demonstrates that NT-4 specifically regulates the Ca_v3.2 T-current which further supports an expression of the Ca_v3.2 T-current at the nerve endings of sensory neurons. No differences were observed in the biophysical properties of the T-current recorded in NT-4^{+/+} and NT-4^{-/-} D-hair neurons and addition of NT-4 did not modify these properties. Consequently, the potential range of window current was also unchanged. Analysis of NT-4^{-/-}

D-hair neurons also showed that the ability of NT-4 to restore T-current amplitude is impaired because the NT-4-induced increase in T-current amplitude is significantly less in NT-4^{-/-} D-hair neurons than in NT-4^{+/+} D-hair neurons. This suggests that NT-4 gene deletion leads to irreversible defects in either available Ca_v3.2 pools or signaling machinery. By increasing the T-current amplitude, NT-4 is expected to interfere with the mechanical sensitivity of D-hair neurons. In support of this hypothesis, it has been shown that D-hair afferents recorded in NT-4^{-/-} mice had their responsiveness to mechanical stimuli markedly reduced (Stucky *et al.* 1998). Thus, in addition to the well-established requirement of NT-4 for the survival of D-hair receptors, our data suggest NT-4 plays a role in the functional maintenance of D-hair mechanoreceptors by regulating T-current availability.

NT-4 signaling involves activation of high or low affinity receptors, named TrkB or p75 receptors. Low-threshold D-hair receptors in p75^{-/-} mice have a significantly reduced responsiveness to mechanical stimuli at all stimulus intensities tested leading to the suggestion that presence of p75 is necessary to mediate the NT-4-dependent function of D-hair receptors (Stucky *et al.* 1998) (Stucky & Koltzenburg 1997). Therefore, p75^{NTR} appeared as a good candidate mediating the NT-4 effects on the T-current. However, our data on axotomized D-hair neurons demonstrate that the NT-4 effects on neurite growth and T-current amplitude up-regulation are mediated through the high-affinity TrkB receptor, not p75^{NTR}. Accordingly, T-current regulation cannot be responsible for the reduced mechanical sensitivity in p75^{-/-} D-hair neurons. Interestingly, p75^{-/-} D-hair receptors display reduced firing properties (Stucky & Koltzenburg 1997), whereas the T-current acts as an amplifier of the mechanoreceptor, with no obvious effects on firing properties (Dubreuil *et al.* 2004). Altogether these data suggest that NT-4 signaling *via* TrkB receptor activation may specifically control the sensitivity of these neurons to very slow-moving stimuli.

In contrast to adult D-hair neurons, the effects of NT-4 on T-current could be observed after one day *in vitro* in young D-hair neurons. In addition, our data demonstrate that T-current regulation in adult mice did not involve an increase in the expression level of Ca_v3.2. These data suggest that NT-4 acts through TrkB activation and could be related to protein turn-over instead of Ca_v3.2 α -subunit phosphorylation. The pharmacological screening to sort out the specific pathways involved in NT-4 /TrkB, demonstrated a role for PI3 kinase. This is consistent with the suggestion that TrkB activation increases the availability of functional channels at the plasma membrane (Huang & Reichardt 2003). The involvement of PI3 kinase suggests that the regulation of trafficking or stability of Ca_v3.2 channels in the plasma membrane could be the cellular mechanism leading to increased T-current amplitude. Although many regions within the I–II loop of Ca_v3.2 have been shown to be involved in regulating surface expression (Vitko *et al.* 2007), the cellular mechanisms that regulate the trafficking of T-type calcium channels to the plasma membrane are currently unknown.

In conclusion, our findings strongly suggest that NT-4 regulates the functional expression of Cav3.2 channels and may thus contribute to mechanotransduction in D-hair neurons. This raises the question as to whether Cav3.2 T-currents expressed in other sensory cell sub-populations, such as nociceptors, are similarly regulated by their corresponding neurotrophins and associated high-affinity receptors.

References

Andre S, Boukhaddaoui, H, Campo, B, Al-Jumaily, M, Mayeux, V, Greuet, D, Valmier, J & Scamps, F (2003). Axotomy-induced expression of calcium-activated chloride current

- in subpopulations of mouse dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* **90**, 3764-3773.
- Aptel H, Hilaire, C, Pieraut, S, Boukhaddaoui, H, Mallie, S, Valmier, J & Scamps, F (2007). The Cav3.2/ α 1H T-type Ca^{2+} current is a molecular determinant of excitatory effects of GABA in adult sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* **36**, 293-303.
- Bonilla Ie, Tanabe, K & Strittmatter, Sm (2002). Small proline-rich repeat protein 1A is expressed by axotomized neurons and promotes axonal outgrowth. *J Neurosci* **22**, 1303-1315.
- Botchkarev Va, Botchkareva, Nv, Peters, Em & Paus, R (2004). Epithelial growth control by neurotrophins: leads and lessons from the hair follicle. *Prog Brain Res* **146**, 493-513.
- Carroll P, Lewin, Gr, Koltzenburg, M, Toyka, Kv & Thoenen, H (1998). A role for BDNF in mechanosensation. *Nature Neuroscience* **1**, 42-46.
- Chemin J, Monteil, A, Dubel, S, Nargeot, J & Lory, P (2001). The α 1I T-type calcium channel exhibits faster gating properties when overexpressed in neuroblastoma/glioma NG 108-15 cells. *Eur J Neurosci* **14**, 1678-1686.
- Chemin J, Nargeot, J & Lory, P (2002). Neuronal T-type α 1H calcium channels induce neuritogenesis and expression of high-voltage-activated calcium channels in the NG108-15 cell line. *J Neurosci* **22**, 6856-6862.
- Chen Cc, Lamping, Kg, Nuno, Dw, Barresi, R, Prouty, Sj, Lavoie, Jl, Cribbs, Ll, England, Sk, Sigmund, Cd, Weiss, Rm, Williamson, Ra, Hill, Ja & Campbell, Kp (2003). Abnormal coronary function in mice deficient in α 1H T-type Ca^{2+} channels. *Science* **302**, 1416-1418.
- Conover Jc, Erickson, Jt, Katz, Dm, Bianchi, Lm, Poueymirou, Wt, McClain, J, Pan, L, Helgren, M, Ip, Ny, Boland, P & Et Al. (1995). Neuronal deficits, not involving motor neurons, in mice lacking BDNF and/or NT4. *Nature* **375**, 235-238.
- Dubreuil As, Boukhaddaoui, H, Desmadryl, G, Martinez-Salgado, C, Moshourab, R, Lewin, Gr, Carroll, P, Valmier, J & Scamps, F (2004). Role of T-type calcium current in identified d-hair mechanoreceptor neurons studied in vitro. *J Neurosci* **24**, 8480-8484.
- Heppenstall Pa & Lewin, Gr (2006). A role for T-type Ca^{2+} channels in mechanosensation. *Cell Calcium* **40**, 165-174.
- Huang Ej & Reichardt, Lf (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* **72**, 609-642.
- Jagodic Mm, Pathirathna, S, Nelson, Mt, Mancuso, S, Joksovic, Pm, Rosenberg, Er, Bayliss, Da, Jevtovic-Todorovic, V & Todorovic, Sm (2007). Cell-specific alterations of T-

- type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons. *J Neurosci* **27**, 3305-3316.
- Joksovic Pm, Nelson, Mt, Jevtovic-Todorovic, V, Patel, Mk, Perez-Reyes, E, Campbell, Kp, Chen, Cc & Todorovic, Sm (2006). CaV3.2 is the major molecular substrate for redox regulation of T-type Ca²⁺ channels in the rat and mouse thalamus. *J Physiol* **574**, 415-430.
- Krimm Rf, Davis, Bm, Noel, T & Albers, Km (2006). Overexpression of neurotrophin 4 in skin enhances myelinated sensory endings but does not influence sensory neuron number. *J Comp Neurol* **498**, 455-465.
- Lechner Sg, Frenzel, H, Wang, R & Lewin, Gr (2009). Developmental waves of mechanosensitivity acquisition in sensory neuron subtypes during embryonic development. *Embo J* **28**, 1479-1491.
- Martin Jh & Jessell, Tm. (1992). Modality coding in the somatic sensory system. In *Sensory Neurons, Diversity, Development, and Plasticity*. ed. SCOTT, S., pp. 341-352. Oxford University Press, New York.
- Mcallister Ak, Katz, Lc & Lo, Dc (1999). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience* **22**, 295-318.
- Mcilwrath Sl, Hu, J, Anirudhan, G, Shin, Jb & Lewin, Gr (2005). The sensory mechanotransduction ion channel ASIC2 (acid sensitive ion channel 2) is regulated by neurotrophin availability. *Neuroscience* **131**, 499-511.
- Obata K, Katsura, H, Sakurai, J, Kobayashi, K, Yamanaka, H, Dai, Y, Fukuoka, T & Noguchi, K (2006). Suppression of the p75 neurotrophin receptor in uninjured sensory neurons reduces neuropathic pain after nerve injury. *J Neurosci* **26**, 11974-11986.
- Pieraut S, Laurent-Matha, V, Sar, C, Hubert, T, Mechaly, I, Hilaire, C, Mersel, M, Delpire, E, Valmier, J & Scamps, F (2007). NKCC1 phosphorylation stimulates neurite growth of injured adult sensory neurons. *J Neurosci* **27**, 6751-6759.
- Shin J-B, Martinez-Salgado, C, Heppenstall, Pa & Lewin, Gr (2003). A T-type calcium channel required for normal function of a mammalian mechanoreceptor. *Nature neuroscience* **AOP**, 1-7.
- Stucky Cl, Dechiara, T, Lindsay, Rm, Yancopoulos, Gd & Koltzenburg, M (1998). Neurotrophin 4 is required for the survival of a subclass of hair follicle receptors. *J Neurosci* **18**, 7040-7046.

- Stucky Cl & Koltzenburg, M (1997). The low-affinity neurotrophin receptor p75 regulates the function but not the selective survival of specific subpopulations of sensory neurons. *J Neurosci* **17**, 4398-4405.
- Stucky Cl, Shin, Jb & Lewin, Gr (2002). Neurotrophin-4: a survival factor for adult sensory neurons. *Curr Biol* **12**, 1401-1404.
- Tsunozaki M & Bautista, Dm (2009). Mammalian somatosensory mechanotransduction. *Curr Opin Neurobiol* **19**, 362-369.
- Vitko I, Bidaud, I, Arias, Jm, Mezghrani, A, Lory, P & Perez-Reyes, E (2007). The I-II loop controls plasma membrane expression and gating of Ca(v)3.2 T-type Ca²⁺ channels: a paradigm for childhood absence epilepsy mutations. *J Neurosci* **27**, 322-330.

Acknowledgments

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), MRT grant (O.L.) and INSERM (F.S.). We are most grateful to Drs. Kevin Campbell and Emmanuel Bourinet for providing the Ca_v3.2^{-/-} mice and to Dr Gary Lewin for providing the NT-4^{-/-} mice. We thank Sylvie Mallié for technical support.

Figure legends

Figure 1. Effects of NT-4 on T-current expression in axotomized D-hair neurons

A, typical traces of the largest low-voltage, T-type (*) current amplitudes that could be recorded, with a ramp protocol from -80 mV to +40 mV, in medium sized control and fluoro-gold labeled axotomized sensory neurons (*i.e.* 30-40 μ m somatic diameter). *B*, frequency distribution of T-current amplitudes in control and axotomized neurons shows that, five days after nerve injury, there is a shift of T-current amplitude frequency distribution towards smaller amplitudes. Abscissa gives mean amplitude value ± 0.1 nA, *i. e.* bin 0.1 represents number of neurons expressing T-current amplitude from -0.0 nA to -0.2 nA. *C*, following overnight treatment with 10 ng/ml NT-4, frequency distribution of T-current amplitudes expressed in control and axotomized D-hair neurons, morphologically identified with a

rosette-like neurite growth. Under both conditions, T-currents are characterized by a large amplitude ranging from -2.5 nA to -6 nA. *D*, Differential interface contrast image of an NT-4-treated axotomized neuron bearing a typical rosette-like neurite growth (scale bar 40 μ m). Fluorescence analysis of fluoro-gold positive neurons demonstrates that this neuron belongs to the axotomized population (right panel). *E*, typical current trace of T-current amplitude (*) recorded in an NT-4 treated axotomized D-hair neuron five days following nerve injury.

Figure 2. T-current expression in 5-week old NT-4^{+/+} and NT-4^{-/-} sensory neurons

A, typical large T-current (*) expression in NT-4^{+/+} and NT-4^{-/-} sensory neurons recorded with a ramp protocol. *B*, T-current amplitude frequency distribution in 5-week old NT-4^{-/-} sensory neurons shows a leftward shift towards smaller amplitudes compared with NT-4^{+/+}. *C*, two-pulse protocol from -100 mV holding potential was applied to analyze activation (PP) and inactivation (TP) properties of the T-current expressed in NT-4^{+/+} and NT-4^{-/-} sensory neurons. Prepulse potentials (PP, duration, 1 sec; range -100 to +30 mV in 5 mV increments) were followed by a test pulse (TP; duration, 500 msec). Pulse pairs were applied every 20 sec. Typical current traces are shown for different values of PP (same neurons as in *A*). *D*, the currents resulting from the test pulse were normalized and plotted as a function of the PP (n =4 NT-4^{+/+} neurons, and n =3 NT-4^{-/-} neurons). Activation curves were normalized to maximal peak T-current. Voltages for half activation ($V_{1/2act}$) and inactivation ($V_{1/2inac}$) were obtained from fits with the Boltzman equation (smooth curves) and showed no significant differences between NT-4^{+/+} and NT-4^{-/-} neurons (*t*-test).

Figure 3. Effects of NT-4 on T-current amplitude in D-hair neurons from 5 weeks old NT-4^{+/+} and NT-4^{-/-} mice

A, typical T-current recordings (*) obtained with a ramp protocol in a D-hair neuron from NT-4^{+/+} and NT-4^{-/-} mice. Cultures were incubated overnight with 10 ng/ml NT-4 and D-hair neurons identified with a rosette like neurite growth. *B*, histograms of T-current amplitude distribution in D-hair neurons from NT-4^{+/+} and NT-4^{-/-} mice show a significant shift in amplitude towards smaller values in NT-4^{-/-} D-hair neurons ($p < 0.01$, t-test). *C*, two-pulse protocol from -100 mV holding potential was applied to analyze activation (PP) and inactivation (TP) properties of T-current expressed in NT-4^{-/-} D-hair neurons treated with 10 ng/ml NT-4. Typical current traces are shown for different values of PP (same neuron as in *A*). *D*, the currents resulting from the test pulse were normalized and plotted as a function of the PP ($n=3$ NT-4^{-/-} D-hair neurons). Activation curves were normalized to maximal peak T-current. Voltages for half activation ($V_{1/2act}$) and half inactivation ($V_{1/2inac}$) were obtained from fits with Boltzman equation (smooth curves).

Figure 4. T-current expression in axotomized D-hair neurons from Ca_v3.2^{+/+} and Ca_v3.2^{-/-} mice

A, T-current (*) recordings in 1 mM Ba²⁺ with a ramp protocol in NT-4 treated fluoro-gold positive, axotomized neurons from Ca_v3.2^{+/+} and Cav3.2^{-/-} mice. *B*, current traces of Ba²⁺ currents recorded at -40 mV and -20 mV to show activation of low and high voltage-activated Ba²⁺ current, respectively, in NT-4 treated axotomized Ca_v3.2^{+/+} and Ca_v3.2^{-/-} neurons. Current-voltage relationships of Ba²⁺ currents obtained from a 1 sec duration prepulse potential (PP) increased in 5 mV increments from a -100 mV holding potential to +30 mV, every 20 sec, in WT and Ca_v3.2^{-/-} axotomized D-hair neurons. To minimize voltage drops due to series resistance and to prevent contamination with calcium-activated chloride currents, 1 mM Ba²⁺ + 1 mM Mg²⁺ were used in place of 2 mM Ca²⁺. Current-voltage relationships of peak current (■) and current at 1 sec (○) were constructed from currents activated during the

PP. C, Mean activation and inactivation curves were obtained from current-voltage relationships and normalized relative to the maximal current (I/I_{max}). To construct inactivation curves, the PP was followed by a test pulse potential to -40 mV for 500 ms (see Fig. 2). Voltages for half activation ($V_{1/2act}$) and half inactivation ($V_{1/2inac}$) were obtained from fits with the Boltzman equation (smooth curve). A significant 12 mV shift towards depolarized potential was observed in $V_{1/2act}$ of T-current expressed in axotomized $Ca_v3.2^{-/-}$ D-hair neurons.

Figure 5. Signaling pathway in NT-4 regulation of T-type current in axotomized D-hair neurons

A, the amplitude of T-current in NT-4-treated axotomized D-hair neurons was not significantly modified in the presence of the blocking function anti-p75^{NTR} antibody used in the dilution range of 1:1000 to 1:100. B, K252a, at 200 nM, an inhibitor of the high-affinity neurotrophin receptors shifted the frequency distribution of the T-current amplitude of NT-4-treated axotomized neurons towards smaller values. C, RT-qPCR analysis of *Cav3.2* transcripts in primary neuronal cultures from control and axotomized L4-L6 DRG shows no effects of axotomy. Overnight incubation of axotomized culture with 10 ng/ml NT-4 did not increase gene expression. Transcript expression is normalized to *Polr2J*, data are the mean of 4 repeat experiments ($p > 0.05$, Man-Whitney *t*-test). D, DRB, up to 80 μ M, did not significantly modify the T-current amplitude of NT-4-treated D-hair neurons ($p > 0.05$, *t*-test).

Figure 6. Intracellular cascade activated under NT-4-regulation of T-current in axotomized D-hair neurons.

A, inhibition of protein kinase C (PKC) with overnight incubation of 200 nM Bis-indolylmaleimide XI hydrochloride, depletion of intracellular calcium stores with

thapsigargin, inhibition of calmodulin kinase II (CAMKII) with 10 μ M KN62 and inhibition of MAP kinase kinase pathway (MAPKK) with 10 μ M PD98059 had no effect on NT-4 signaling on the T-current amplitude of axotomized D-hair neurons. *B*, in the presence of 200 nM wortmannin to inhibit PI3 kinase (PI3K) the amplitude of the T-current in NT-4-treated axotomized D-hair neurons was significantly smaller (48 % decrease in T-current amplitude). *C*, wortmannin had no effects on the T-current amplitude recorded in control D-hair neurons. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *t*-test).

Figure 1

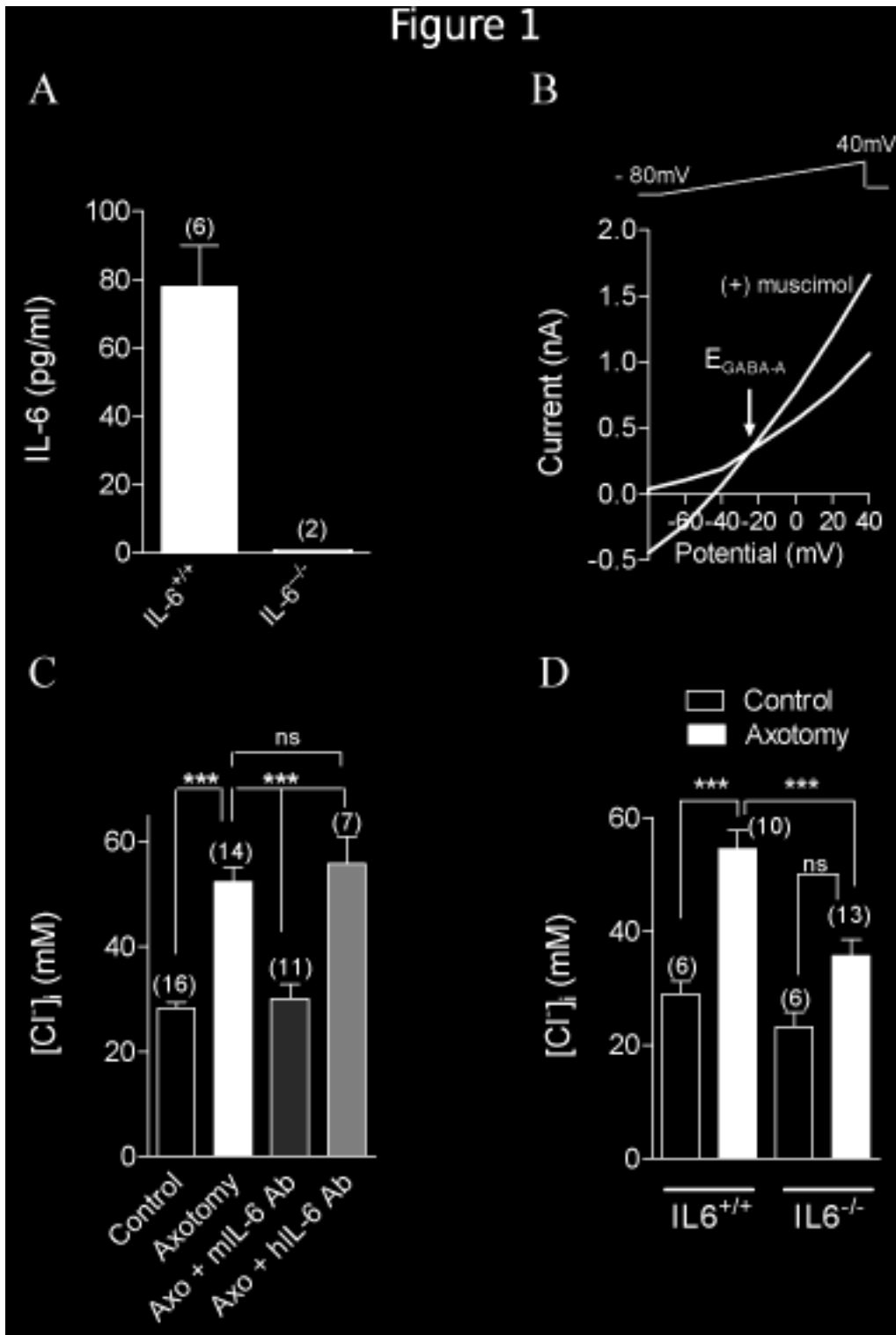


Figure 2

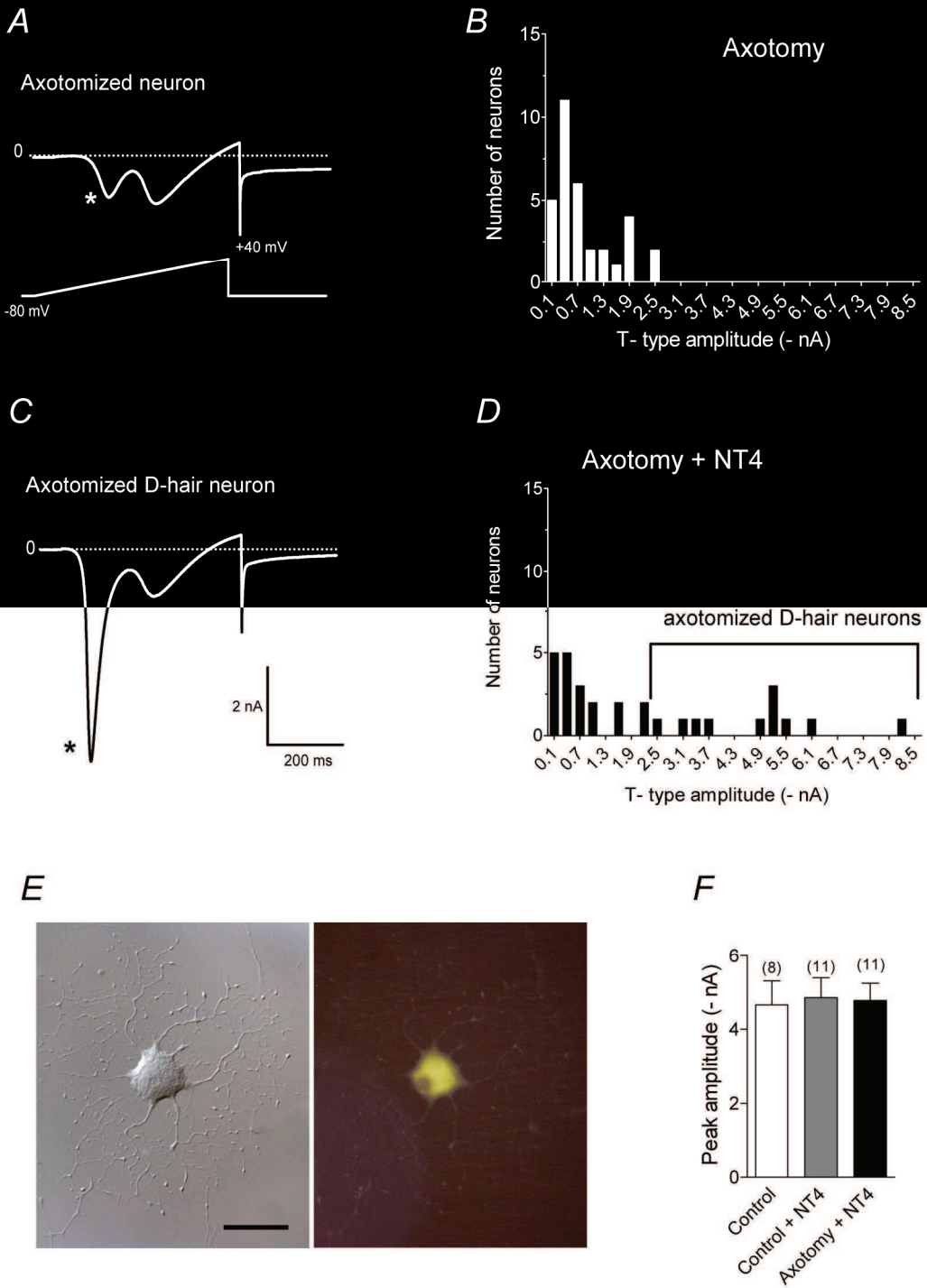


Figure 3

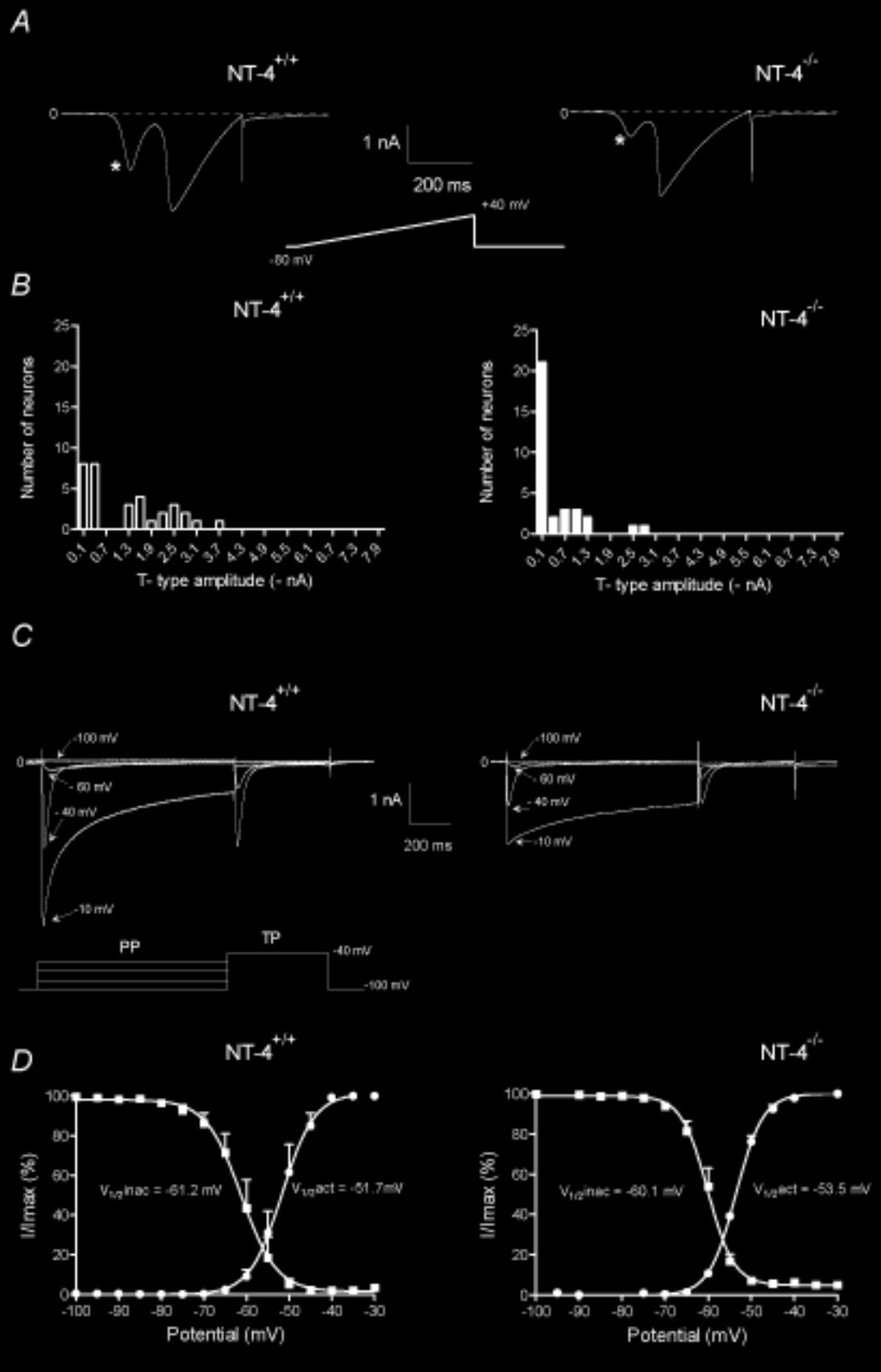


Figure 4

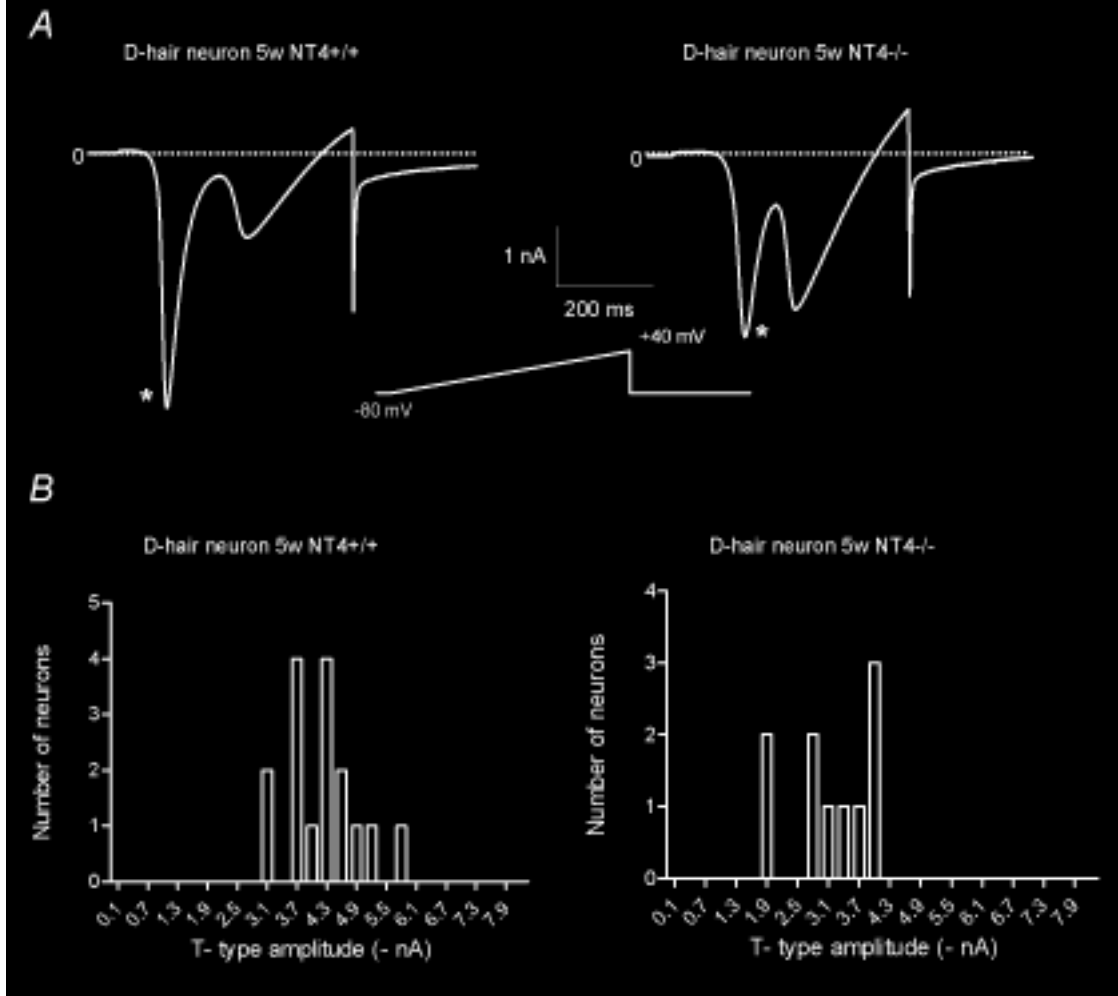


Figure 5

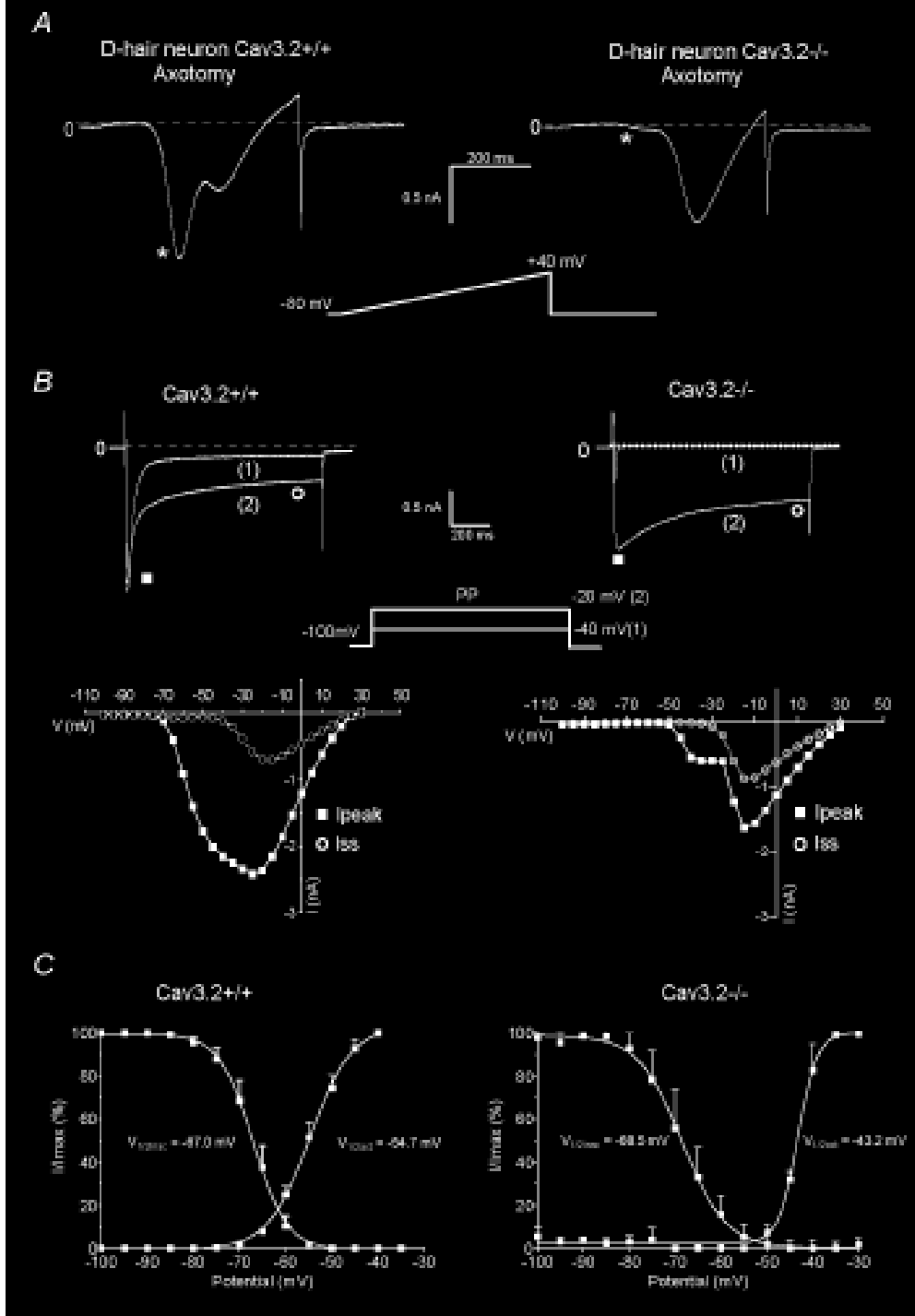


Figure 6

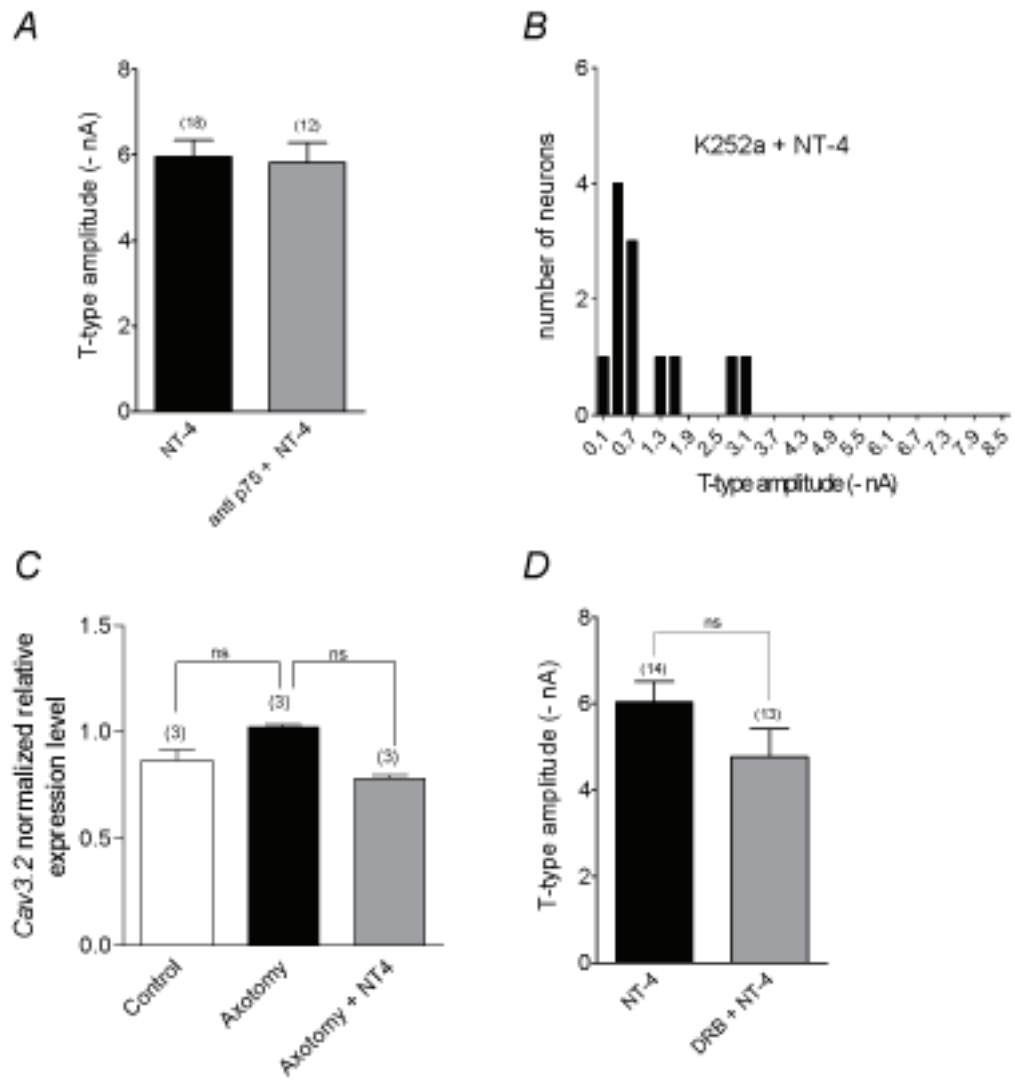
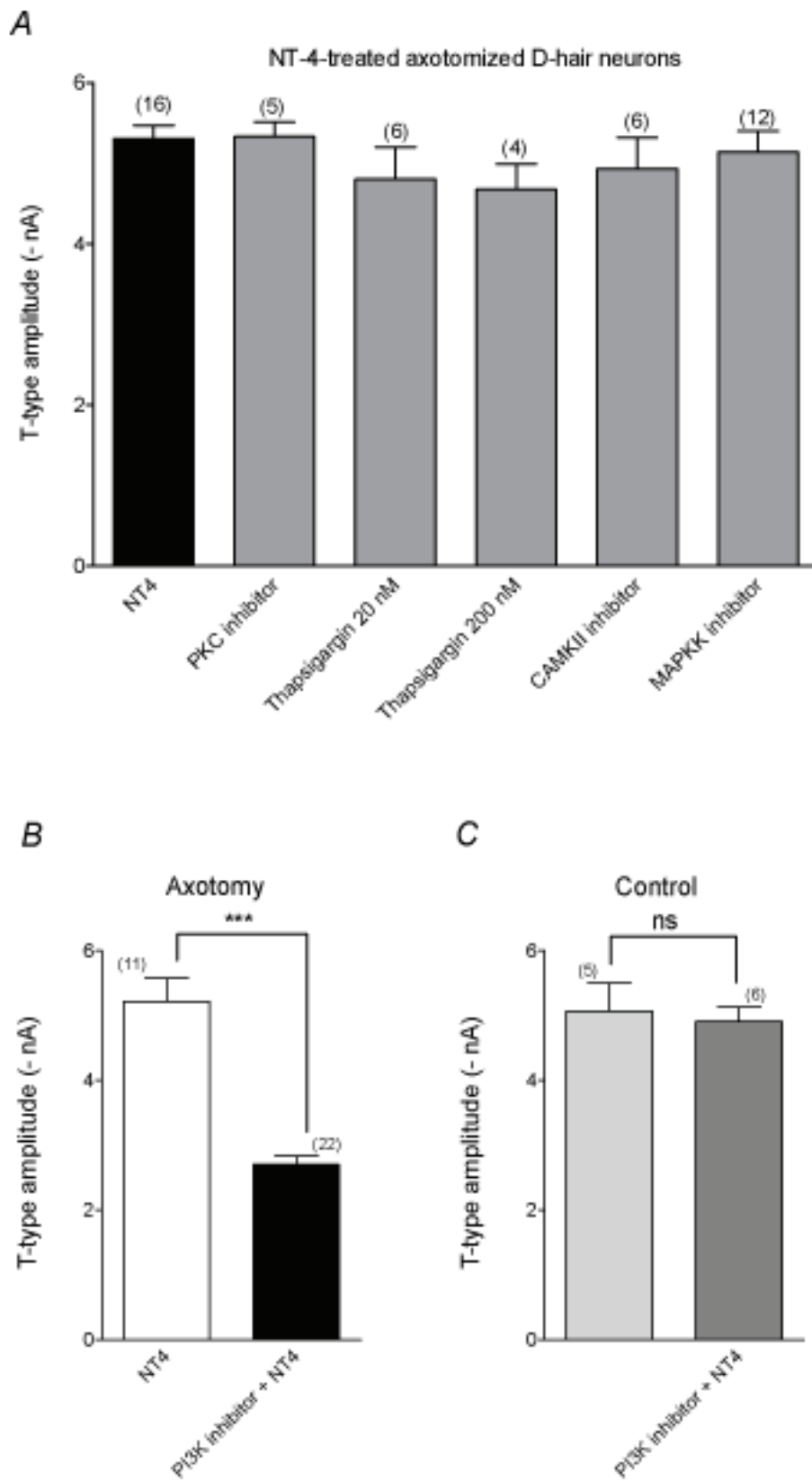


Figure 7



Résumé en français :

L'homéostasie chlorure (HC) est un acteur essentiel dans la transmission nerveuse. Le GABA, via son récepteur GABA_A, permet les mouvements d'ions chlorures en fonction de leur potentiel électrochimique. Dans les neurones sensitifs de ganglions rachidiens dorsaux (GRD), le co-transporteur cation-chlorure NKCC1 est responsable de l'accumulation intracellulaire des ions Cl⁻ et de l'effet dépolarisant du GABA. Suite à une lésion, l'augmentation de la concentration intracellulaire en ions Cl⁻ ([Cl⁻]_i) permet une amélioration des capacités régénératives neuronales. Au cours de ma thèse, je me suis en premier lieu intéressé à la régulation de l'HC par interleukine 6 (IL6) en réponse à une lésion nerveuse. L'axotomie du nerf sciatique induit l'expression de l'IL6 et son récepteur IL6-Rα dans les neurones sensitifs des GRD lombaires L4-L5. Des mesures par patch perforé sur des neurones sensitifs en culture ont montré une augmentation de la [Cl⁻]_i dépendante de l'IL6 dans une sous-population de neurones mécano- et proprioceptifs en réponse à l'axotomie. Cette régulation est permise par la phosphorylation à la membrane plasmique neuronale de NKCC1. Le co-transporteur KCC3 est impliqué dans une maladie génétique conduisant dès la naissance à une perte sensorimotrice, ce qui m'a conduit à étudier son rôle dans la régulation de l'HC des neurones sensitifs au cours du développement et chez l'adulte. Nos données ont démontré l'existence d'un « switch chlorure » développemental, diminuant la [Cl⁻]_i. Ce switch est altéré chez la souris KCC3^{-/-}, dans laquelle une partie des neurones a déjà diminué sa [Cl⁻]_i. Au stade adulte, nous avons également observé un doublement de la [Cl⁻]_i dans 30% des neurones sensitifs de souris KCC3^{-/-}, pourcentage corrélé à la proportion de neurones WT exprimant KCC3. Ces données prouvent que KCC3 est impliqué, de manière directe ou non, dans la régulation de l'HC des neurones sensitifs au cours du développement et chez l'adulte.

Titre en anglais :

Role and regulation of the cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC3 in sensory neurons

Résumé en anglais :

Chloride homeostasis (CH) is a major component of nerve transmission. Interaction between the neurotransmitter GABA and his receptor, GABA_A, allows chloride movements depending on electrochemical potential. In dorsal root ganglia (DRG) sensory neurons, the cation-chloride cotransporter NKCC1 is responsible for intracellular accumulation of chloride ions and depolarizing effects of GABA. After injury, an increase of intracellular chloride concentration ([Cl⁻]_i) allows an improvement of neuronal regenerative capacities. In a first time, I worked on regulation of CH by interleukin 6 (IL6) in response to nerve injury. Axotomy of the sciatic nerve induces expression of IL6 and his receptor IL6-Rα in sensory neurons from lumbar L4-L5 DRG. Perforated patch measurements of sensory neurons have demonstrated an increase of [Cl⁻]_i depending on IL6 in a sub-population of mechano- and proprioceptors in response to lesion. This regulation is provided by phosphorylation at the neuronal plasma membrane of NKCC1. The cation-chloride cotransporter KCC3 is implicated in a hereditary syndrome leading after birth to sensorymotor defects. This is why I have studied his role in regulation of CH in sensory neurons during development and in adulthood. Data have shown the existence of a peripheral developmental “chloride switch”. This switch is abolished in KCC3^{-/-} sensory neurons, in which a part of neurons has already decreased [Cl⁻]_i. In adulthood, we also observed an [Cl⁻]_i twice as much as WT in 30% of sensory neurons from KCC3^{-/-} mice. This percentage is correlated to the proportion of WT neurons expressing KCC3. These results demonstrate for the first time that KCC3 is implicated in regulation of CH in sensory neurons during development and in adulthood.

Discipline : Neurosciences

Mots clés :

Système somatosensoriel, ganglions rachidiens dorsaux, DRG, neurones sensoriels, lésion périphérique, axotomie, électrophysiologie, homéostasie chlorure, NKCC1, KCC3, interleukine 6, régénération, développement, GABA

Intitulé et adresse du laboratoire :

Institut des Neurosciences de Montpellier INSERM U1051
Hôpital saint Eloi,
80 rue Augustin FLICHE BP74103
34091 MONTPELLIER Cedex 5