

**AIX-MARSEILLE UNIVERSITE  
ECOLE DOCTORALE  
Des Sciences de la Vie et de la Santé  
IBDM – UMR 7288**

THESE

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE**  
Spécialité : **Neurosciences**

Présentée et soutenue publiquement par

**Louise Urien**

Le 10 Juillet 2015

**L'ablation des neurones GINIP+ révèle un  
rôle critique des mécanorécepteurs à bas  
seuil de type C dans la modulation des  
douleurs chimiques et mécaniques**

Directeur de thèse : Aziz MOQRICH

JURY

Pr Jean Valmier (INM – Montpellier)  
Dr Michel Barrot (INCI – Strasbourg)  
Dr Yves Le Feuvre (IINB – Bordeaux)  
Dr Marcel Crest (CRN2M – Marseille)  
Dr Aziz Moqrich (IBDM – Marseille)

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Jean Valmier, Michel Barrot, Yves Le Feuvre et Marcel Crest, d'avoir accepté de participer à cette soutenance, de lire, d'évaluer et de critiquer ce travail. Une attention particulière pour Monsieur Crest, qui fût l'enseignant m'ayant finalement fait comprendre les bases de l'électrophysiologie, merci pour cette didactique impeccable.

Membre du jury, et non des moindres, mon directeur de thèse, Aziz Moqrich. Merci d'être venu me chercher à un moment où j'avais besoin d'une main tendue et de m'avoir donné la possibilité de commencer à vivre la science. Je dois avouer que si j'avais su dans quoi je m'embarquais... et bien, j'aurai quand même dit oui, car même si « ma souris STAC1 », et LRP1 m'ont laissé tomber, toi non ! J'ai énormément appris au cours de ses 4 années que ce soit d'un point de vue scientifique ou personnel, et cette évolution, tu en es à l'origine.

Mais avant d'en arriver à cette thèse, mes premiers pas dans le monde de la recherche, je les dois à Nicolas, à Lydia et « aux Kerkerian ». Nico, tu as su faire naître en moi une passion insoupçonnée, et l'oreille attentive et bienveillante de toute cette équipe m'a conduit à me lancer dans un nouvel univers.

Ce nouvel univers s'appelle « les Moqrich ».

Pascale, « notre mère à tous », ma première interlocutrice, ma première référence, qui me fit découvrir la biologie moléculaire avec sérieux et passion. « Beating heart » pour certain, pour moi tu es la valeur sûre à laquelle il est bon de pouvoir s'accrocher.

Serge, « notre père à tous » (?), deuxième rencontre (en face à face, car jusque-là c'était Mr Radioactivité « Today before 4pm »). D'abord intimidant, j'ai découvert un super chercheur, passionné, toujours avides de nouvelles connaissances malgré son grand âge. A l'écoute des autres, il va falloir apprendre à prendre plus soin de soi !

Irène, la force tranquille, qui, sous ces airs désinvoltes, est une scientifique et une enseignante d'expérience dont le sourire égaye les journées. Cette virée à Quinson aura été pour moi l'occasion de découvrir l'artiste des quartiers nord qui ne s'exprime que trop rarement.

Stéphane, CEO ! Il m'aura fallu presque un an pour t'observer et savoir sous quel angle osé t'aborder. Mais une fois que sut été fait, quelle chance. Un scientifique rigoureux, passionné, motivé, qui ne baisse jamais les bras, mais aussi un papa, un fan de l'OM qui à toute mon admiration.

Ana, l'énergie brute, une pile sur ressorts, pour qui la science coule de source et qui je l'espère n'en est qu'à ces débuts !

Laure, ma « co-thésarde », qui m'a toujours soutenue tout au long de cette longue et parfois éprouvante expérience, la personne qui m'a aidé à tenir bon. Scientifique rigoureuse et appliquée, je te souhaite de trouver ce qui te fera vibrer dans le futur. Crois en toi, peu importe tes choix, et vis les à fond. « YOLO quoi ! »

Manon, petite thésarde (plus si petite), j'espère que tu arriveras à apprécier ta thèse autant que j'ai pu, tu es au bon endroit pour.

Une pensée pour Annabelle, Svetlana, anciennes collègues, avec qui il était très agréable de travailler, Eduardo, que je n'ai côtoyé que trop peu, et pour tous les étudiants qui sont passés par le labo et dont la personnalité a toujours dynamisé l'équipe. Bon courage au « petit scarabé » pour la suite, les manipes c'est cool !

En dehors du labo, j'ai eu une vie ! Oui, oui (enfin moins sur la fin) ; et plein de bonheur avec ce qui m'entourent.

A ceux qui ont d'abord été des collègues, croisés à un moment ou un autre sur les bancs de la fac et qui sont devenus des piliers incontournables. A Nancy, Lucille, Simon, Loic et Ludo ! A Marseille, Marie, Anne et Mélanie, Rémi, et bien sûr Véréna ! Ma vie marseillaise et de « neuroscientifique » sont indissociables de cette rencontre qui a fait de mon séjour ici la plus belle période de ma vie...

Enfin, toute cette vie marseillaise n'aurait pas été la même sans Maxime, avec qui je partage bien plus qu'une passion pour les neurosciences. Toi qui es toujours là pour moi, merci pour ton sourire et ta bonne humeur constante qui me font savourer de chaque moment. J'attends avec impatience les prochains...

Et puis, il y a ceux qui sont là depuis le début.

Coline et Marianne, 12 ans déjà, mais comme si c'était hier. Cette amitié, comme cette thèse, n'est qu'un long début !

Mes parents, qui m'ont encore et toujours supporté (dans tous les sens du terme), à qui je dois tout, de mon caractère de râleuse téméraire à l'envie de faire de chaque jour une nouvelle fête. Merci de m'avoir appris à croire en moi et en les autres, et de m'avoir transmis ces belles valeurs sans lesquelles je ne serai pas là où je suis.

Mon frère et mes sœurs, que je ne vois que trop peu, mais qui ont une place toute particulière dans ma vie et dont les visites et les messages sont toujours d'un réconfort immuable.

Et un merci à tous ceux que j'ai croisé, avec qui j'ai discuté, qui d'une manière ou d'une autre m'ont fait arriver là...

**See you in NYC everyone !**

# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b> .....	1
<b>ABREVIATIONS</b> .....	5
<b>LISTES DES FIGURES</b> .....	7
<b>PRELUDE</b> .....	9
<b>PREFACE</b> .....	15
<b>INTRODUCTION</b> .....	19
<b>Première partie : La transmission du message sensoriel douloureux</b> .....	20
<b>Les neurones primaires sensoriels</b> .....	21
1. Présentation générale.....	21
2. Les fibres à bas seuil.....	22
2.1 Les mécanorécepteurs à bas seuil.....	22
2.1.1 <i>Aβ-RA-LTMR : Mécanorécepteurs à adaptation rapide – peau glabre</i> .....	22
2.1.2 <i>Aβ-SA-LTMR : Mécanorécepteurs à adaptation lente –peau glabre</i> .....	23
2.1.3 <i>Aδ-LTMR – peau poilue</i> .....	23
2.1.4 <i>C-LTMR – peau poilue</i> .....	24
2.2 Les propriocepteurs.....	24
2.3 Les thermorécepteurs.....	25
2.3.1 <i>Les thermorécepteurs au froid</i> .....	26
2.3.2 <i>Les thermorécepteurs au chaud</i> .....	29
3. Les fibres à haut seuil : les nocicepteurs.....	30
3.1 Présentation générale.....	30
3.2 Les nocicepteurs peptidergiques.....	31
3.2.1 <i>Les neurones TRPV1+ : les « nocicepteurs du chaud »</i> .....	32
3.2.2 <i>Les neurones TRPA1+ : au croisement des classifications</i> .....	33
3.3 Les nocicepteurs non peptidergiques.....	34

3.3.1	Les neurones MrgprD + : les « nocicepteurs mécaniques » .....	34
3.3.2	Une classe particulière de neurones non-peptidergiques : Les C-Low Threshold MechanoReceptors (C-LTMRs).....	36
	<b>L'intégration du message nociceptif .....</b>	<b>38</b>
1.	Les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière.....	38
1.1	Présentation générale : l'organisation des projections des afférences sensorielles dans la moelle épinière.....	38
1.2	Les neurones de la lamina I .....	39
1.3	Les neurones de la lamina II .....	41
1.3.1	Les sous populations morphologiques .....	41
1.3.2	Apport de la neurochimie pour une classification moléculaire .....	43
1.4	Ebauche de connectique : exemple de la transmission de l'information mécanique..	45
2.	Les voies de sorties de la moelle épinière.....	47
2.1	Le tractus spino-réticulo-thalamique.....	47
2.2	Le tractus spino-thalamique.....	48
2.3	Le tractus spino-mésencéphalique ou voie spino-brachiale.....	48
3.	L'intégration centrale du message nociceptif.....	49
4.	Contrôles descendants.....	50
	Conclusion de la première partie.....	51
	<b>Deuxième partie : Paradigmes expérimentaux.....</b>	<b>52</b>
	<b>Introduction générale.....</b>	<b>53</b>
	<b>Test de douleur induite par l'injection de formaline.....</b>	<b>55</b>
1.	Principe .....	55
2.	Mécanismes et acteurs cellulaires .....	56
3.	Mécanismes et acteurs moléculaires .....	58

3.1 Inflammation périphérique .....	58
3.2 Sensibilisation centrale .....	58
4. Discussion et mise en perspective .....	59
<b>Modèle de douleur neuropathique : Constriction du nerf sciatique (CCI) .....</b>	<b>62</b>
1. Définition d'une douleur neuropathique .....	62
2. Le modèle CCI .....	62
2.1 Principes.....	62
2.2 Mise en place : Mécanismes périphériques.....	63
2.2.1 <i>Au commencement était l'inflammation</i> .....	63
2.2.2 <i>Décharge ectopique du nerf ligaturé et des nerfs adjacents</i> .....	64
2.3 Mise en place : Mécanismes spinaux.....	65
2.3.1 <i>Baisse de l'inhibition</i> .....	65
2.3.2 <i>Sensibilisation centrale</i> .....	67
2.4 Mise en place : Modifications des contrôles descendants .....	68
Conclusion de la deuxième partie .....	70
<b>RESULTATS.....</b>	<b>71</b>
Résumé de l'article.....	72
Article.....	74
Données supplémentaires.....	95
<b>PERSPECTIVES &amp; DISCUSSION.....</b>	<b>103</b>
1. Caractérisation d'un nouveau modèle murin.....	104
2. L'ablation des neurones GINIP+ entraîne une nette diminution de la seconde phase de douleur induite par une injection de formaline.....	107
2.1 Rappel sur la douleur induite par l'injection de formaline.....	107

2.2 L'apport de notre étude.....	108
2.3 Quelles populations de neurones primaires sensoriels seraient concernées ?.....	108
2.3.1 Activation lors de la première phase.....	108
2.3.2 Activation lors de la deuxième phase.....	111
2.4 Intégration spinale du message nociceptif induit par l'injection de formaline.....	112
3. Impact de l'ablation des neurones GINIP+ sur la mécano-sensation .....	113
3.1 Mécano-sensation en condition basale.....	113
3.2 Mécano-sensation en condition neuropathique.....	115
4. Perspectives : amélioration des connaissances des circuits anatomiques spinaux.....	117
4.1 Eléments spécifiques au modèle proposé.....	117
4.2 Amélioration globale des connaissances sur la circuiterie inhibitrice.....	118
<b>MATERIELS &amp; METHODES.....</b>	<b>120</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>127</b>
<b>ANNEXE 1.....</b>	<b>141</b>
<b>ANNEXE 2.....</b>	<b>145</b>
1. Présentation du projet.....	145
2. Résultats.....	147
2.1 Caractérisation des animaux.....	147
2.2 Récepteur de TFAFA4.....	149
2.3 Effets comportementaux de la surexpression de TFAFA4.....	150
3. Matériel et méthodes.....	152

## ABREVIATIONS

**ACC:** Anterior Cingular Cortex  
**AITC:** allyl isothiocyanate  
**AMC:** A fiber Mechanical Cold  
**AMH:** A fiber Mechanical Heat  
**AMPA :** AminoMethylPhosphonic Acid Receptor  
**AMY:** Amygdala  
**ARN:** RiboNucleic Acid  
**ATP :** Adenosine 5'Tri-Phosphate  
**BAM8-22:** Bovine AdrenaMedulla 8-22  
**BDNF:**Brain derived Neurotrophic Factor  
**BG:** Basal Ganglia  
**Cav:** Voltage dependant Calcium channel  
**CCI:** Chronic Constriction Injury  
**CFA:** Complete Freund Adjuvant  
**CGRP:** calcitonin gene-related peptide  
**CH:** C fiber Heat  
**CM:** C fiber Mechanical  
**CMH:** C fiber Mechanical Heat  
**DRG:** Dorsal Root Ganglia  
**DYN:** Dynorphin  
**ERK:** Extracellular signal-regulated kinase  
**FACS:** Fluorescence-activated cell sorting  
**GABA<sub>A</sub>:** Gamma-aminobutyric acid receptor A  
**GAD65 :** Glutamate Decarboxylase  
**GAL:** Galanin  
**GDNF:** Glial Derived Nerve Factor  
**GINIP:** G alpha Inhibitory Interacting Protein  
**GLT1:** Glial Vesicular glutamate transporter 1  
**GLAST:** GLutamate ASpartate Transporter  
**H:** Histamine receptor  
**HA:** Hemagglutinin  
**HCN:** Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel  
**HCR:** High threshold Cold receptor  
**IA:** Intermediatly adapting  
**IASP:** International Association for the Study of Pain  
**IB4:** Isolectin Binding 4  
**IL :** Interleukine  
**JNK:** c-Jun N-terminal kinase  
**KCC2 :** Potassium-chloride transporter member 5  
**KCNQ/M:** Potassium voltage-gated channel subfamily KQT 5 / muscarinic  
**KI:** Knock In  
**KO:** Knock Out  
**Kv:** Voltage dependant Potassium channel  
**LC:** Locus Coerelus  
**LRN :** Lateral Reticularis Nucleus  
**LRP1:** Low density lipoprotein receptor-related protein 1  
**LT:** Low threshold  
**LTMR:** Low Threshold mecano-Receptor  
**LTP:** Long Term Potentialisation



**Maf** : MusculoAponeurotic Fibrosarcoma transcrittionnal factor  
**MRGPR**: Mas-related G-protein coupled receptor member  
**Nav**: Voltage dependant Sodium channel  
**NGc** : Nucleus giganto-paragiganto cellularis  
**NGF**: Nerve Growth Factor  
**NK1**: Neurokinin 1  
**NMDA** : *N*-méthyl-D-aspartate Receptor  
**nNOS**: neuronal Nitric Oxyde Synthase  
**NPY**: Neuropeptide Y  
**PAG**: Peri Aqueducal Gray  
**PBil** : ParaBrachial Internal Lateral  
**PCR**: Polymerase Chain Reaction  
**PFC**: Pre Frontal Cortex  
**PGE2**: Prostaglandine E<sub>2</sub>  
**PKC $\gamma$**  : Protein Kinase C gamma  
**PrP GFP**: Prion Green Fluorescent Protein  
**PV**: Parvalbumine  
**P2X** : Purinergic Receptor Ionotropic  
**P2Y** : Purinergic Receptor Metabotropic  
**RA**: Rapidly Adapting  
**ROR** : Retinoid-related Orphan Receptor  
**RVLM**: Rostro Ventro Lateral Medulla  
**SA**: Slowly Adapting  
**SOM**: Somatostatine  
**SRD** : Subnucleus Reticularis Dorsalis  
**SST2A**: Somatostatine Receptor 2A  
**S1**: Somato Sensory Cortex S1  
**S2**: Somato Sensory Cortex S2  
**TASK**: TWIK-Related Acid-sensitive potassium channel  
**TH**: Tyrosine Hydroxylase  
**TNF**: tumor necrosis factor  
**TRAAK**: TWIK-Related Arachidonic Acid-stimulated potassium channel  
**TREK**: TWIK-Related potassium channel  
**Trk**: Tropomyosin Receptor Kinase  
**TRP**: Transient *receptor potential*  
**TTX** : Tetrodotoxin  
**VGLUT**: Vesicular Glutamate Transporter  
**VPL** : VentroPosterior Lateral (thalamus)  
**VPM**: VentroPosterior Medial (thalamus)  
**WDR**: Wide Dynamic Range  
**WT** : Wild Type  
**5HT** : Serotonin

# LISTE DES FIGURES

## PRELUDE

Figure 1 : Représentation schématique de la théorie du portillon

## INTRODUCTION

Figure 1 : Représentation schématique des terminaisons sensorielles des fibres LTMR au niveau de la peau glabre (A) et de la peau poilue (B). Tableau récapitulatif des données relatives sur les différentes sous populations de LTMRs (C).

Figure 2 : Représentation schématique des projections des thermorécepteurs au niveau de la peau et de la corne dorsale de la moelle épinière

Figure 3 : Représentation schématique des propriétés physiologiques des thermorécepteurs au froid

Figure 4 : Représentation schématique de la détection de stimuli froids, nocifs ou non nocifs, dépendant du type de neurones, et des canaux qu'ils expriment (combinatoire moléculaire de ces neurones)

Figure 5 : Représentation schématique des propriétés physiologiques des thermorécepteurs au chaud (Vriens et al., 2014)(Vriens et al., 2014)(Vriens et al., 2014)(Vriens et al., 2014)(Vriens et al., 2014)

Figure 6 : Représentation schématique de la classification des nocicepteurs

Figure 7 : Représentation schématique du parcours de l'information sensorielle de la périphérie vers la moelle épinière. Au niveau de la moelle épinière, les afférences primaires sensorielles projettent de manière régionalisée dans des lamina différentes.

Figure 8 : Anatomie et connectique de la lamina I de la corne dorsale de la moelle épinière

Figure 9 : Représentation schématique de la connectique entre les neurones centraux, islet et verticaux dans les lamina superficielles de la moelle épinière.

Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation anatomique des afférences primaires sensorielles et des interneurons spinaux permettant la détection des stimuli mécaniques.

Figure 11 : Représentation schématique de la transmission de l'information sensorielle douloureuse dans les différentes zones du cerveau.

Figure 12 : Schéma explicatif des différents modèles neuropathiques : ligature du nerf sciatique (SNL), Constriction du nerf sciatique (CCI) et ligature partielle du nerf sciatique (SNL)

Figure 13 : Courbe représentative des réponses non nocives ou nocives en condition normale (bleue foncée), cette courbe se déplace vers la gauche en condition pathologique (bleue claire).

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

Figure 14 : Proportion de neurones ayant répondu aux différents agents pharmacologiques selon les génotypes.

Figure 15 : Représentation schématique des protocoles de stimulation pharmacologique utilisés lors des expériences d'imagerie calcique.

Figure 16 : Effets différentiels des sens de stimulation sur les réponses des neurones.

Figure 17 : Représentation schématique de l'activation des différentes voies de signalisation suite à l'injection de formaline dans la patte de l'animal.

Figure 18 : Représentation schématique de l'action d'une injection d'une forte dose de formaline.

Figure 19 : Modèle anatomique supportant la réponse comportementale douloureuse induite par l'injection d'une forte dose de formaline décrite ci-dessus.

Figure 20 : Modèle anatomique de la transmission des informations mécaniques douloureuses ou non selon les différents modèles animaux.

Figure 21 : Modèle anatomo-fonctionnel

### ANNEXE 1

Figure 1 : Pattern d'expression du gène STAC1 dans le DRG de souris sauvages adultes.

Figure 2 : Représentation schématique du transgène.

Figure 3 : Représentation schématique des questions biologiques et du modèle murin utilisé pour y répondre.

Figure 4 : Southern blot effectué à partir de l'ARN des cellules ES injectées avec le transgène STAC1.

### ANNEXE 2

Figure 1 : Présentation de la construction transgénique insérée au locus du gène Tau par recombinaison homologe.

Figure 2 : Représentation schématique de notre modèle murin

Figure 3 : Expression de HA-tafa4 et GFP dans les neurones de DRG d'animaux adultes  $Tau^{tafa4-HA/+};Deleter^{Cre-}$  versus  $Tau^{tafa4-HA/+};Deleter^{Cre+}$

Figure 4 : Détection de la protéine tafa4 par western blot et immuno-précipitation dans les DRGs, la moelle épinière et le cerveau d'animaux  $Tau^{tafa4-HA/+};Deleter^{Cre+}$

Figure 5 : Analyses comportementales (rotarod et open field) des animaux adultes  $Tau^{Venus-tafa4-HA/+};Deleter^{Cre-}$  et  $Tau^{tafa4-HA/+};Deleter^{Cre+}$

Figure 7 : Réponse comportementale suite à l'injection de formaline (2%) des animaux  $Tau^{Venus-tafa4-HA/+};deleter^{Cre-}$  et  $Tau^{tafa4-HA/+};deleter^{Cre+}$ .

Figure 8 : Réponse comportementale suite à l'injection de formaline (2%) des animaux sauvages littermate ( $Tau^{+/+}$ ) et des animaux hétérozygotes  $Tau^{Venus-tafa4-HA/+}$

# PRELUDE

# PRELUDE

## La douleur et sa conception à travers les âges

La douleur est une notion aussi ancienne que l'Humanité. C'est un mot, un concept, une sensation chargée de références et de connotations culturelles, associé à des théories scientifiques et philosophiques les plus diverses. Comment notre vision de la douleur a-t-elle évolué au cours du temps et où en sommes-nous aujourd'hui ?

Durant des siècles, la douleur a été louée, valorisée, sublimée. Les premiers écrits remontent à l'Antiquité.

Dans l'Iliade et l'Odyssée, Homère exalte la douleur du combat militaire, une douleur aigüe ; Sophocle, dans la grande tradition des tragédies grecques, nous parle de souffrance morale et de douleur chronique. A contrario, les sages hellénistiques telles que le stoïcisme et l'épicurisme refusent d'abdiquer devant la douleur. La douleur n'est pas le salaire de la faute, ni la voie du salut.

Hippocrate sera un des premiers à associer une vision philosophique et scientifique à la douleur dans le « corpus hippocratique ». Il n'y a encore que peu de connaissances anatomiques et peu d'étiologie. La médecine repose sur l'écoute des malades et l'observation des signes : la douleur est un symptôme de la maladie, décrite en tant que **sensation**. Il faudra attendre la médecine d'Alexandrie au III<sup>ème</sup> avant JC et l'apport de la dissection pour apprendre sur **les voies sensitives, le cerveau et les nerfs**.

Galien sera celui qui proposera le système le plus abouti et dont le concept dominera les siècles à venir. La base de sa médecine repose sur l'idée que le corps humain fonctionne comme un système où toutes les parties sont liées. Il y a communication entre le cerveau et l'organe stimulé grâce au *pneuma*, un élément matériel fluide qui traverse l'organisme (« esprit animal »). La douleur est considérée comme un signe que la communication entre les organes ne se fait plus correctement. Il met en place une classification des douleurs qui persistera jusque la Renaissance : douleur pulsative (rythmée par les pulsations cardiaques), gravative (sensation de pesanteur, de corps étrangers), tensive (sensation de distension de fibres comme après une réduction de luxation), pongitive (sensation de pénétration d'un corps étranger dur, pointu, ce que l'on apparenterait à une douleur aigüe). Il est toutefois important de noter que Galien s'intéresse aussi à la douleur en tant que **sensation propre** et non plus seulement comme une aide au diagnostic. Il considère la douleur comme une sensation exacerbée, qui relève du **toucher**. Il utilisera d'ailleurs une pharmacologie spécifique pour traiter la douleur connue sous le nom de « thériaque de Galien ».

Au Moyen Âge, la conception de la douleur repose majoritairement sur la religion chrétienne. Le Christ sur sa croix est un modèle de souffrance à la fois physique et morale. Cependant, la douleur a un statut ambigu : c'est une punition des pécheurs, mais elle est également recherchée comme un moyen de se rapprocher de Dieu. « Dans un contexte culturel où l'on accorde à la souffrance une fonction de rédemption, il est logique d'attribuer la cause de cette souffrance à une faute » (Les âmes blessées, Boris Cyrulnik, 2014). En outre, les valeurs chrétiennes exhortent à la charité et à la compassion envers les miséreux.

Lors de la Renaissance, la conception spirituelle de la douleur s'éloigne et elle est entrevue dans une approche plus laïque. Les connaissances anatomiques (Vésale, Léonard de Vinci) font un incroyable bon en avant notamment grâce à la levée de l'interdiction de disséquer par le pape Jules II en 1503 ; bien que la physiologie et la connaissance des mécanismes ne soient pas encore approfondis. Le XVI<sup>ème</sup> siècle est également marqué par de nombreuses guerres ce qui conduira Ambroise Paré, chirurgien militaire, à évoquer les besoins d'analgésiques pour soulager les blessés.

Un grand bond en avant est ensuite fait avec la pensée de Descartes : la question de la douleur est posée dans un contexte mécaniste, et aussi dans un questionnement plus philosophique sur la sensation. La douleur est une perception de l'âme, qui confirme au corps son existence. Sa conception de la « physiologie » de la douleur est inspirée de Galien, selon lequel « esprits animaux » agissent d'une manière spécifique sur les nerfs. Le réceptacle des sensations et le siège de l'âme se trouvent, selon Descartes, dans la glande pinéale. La douleur est traitée comme un moyen adéquat pour connaître l'union de l'âme et du corps. Cette conception dualiste persiste toujours à l'heure actuelle.

Cette philosophie ouvrira la porte au siècle des Lumières, période marquée par la séparation de domaines qui étaient jusque-là intrinsèquement liés : l'Eglise, la métaphysique et la science. La médecine des Lumières est liée à un questionnement philosophique: la question de la sensibilité. Les philosophes des Lumières dénoncent les douleurs infligées par des hommes à d'autres hommes et l'idée de douleurs infligées par Dieu apparaît inadéquate. La douleur est reconnue comme nuisible. D'un point de vue plus physiologique, la distinction se fait entre **la douleur, signal d'alarme** d'un dysfonctionnement et la **douleur singulière sans étiologie**, non légitimé et donc sans utilité pour l'organisme. A partir de cette époque émaneront trois représentations médicales et philosophiques de la douleur : le mécanisme et l'interprétation systémique de la douleur ; l'animisme dans lequel la douleur est un signe de conflit intérieur entre le corps et l'esprit ; le vitalisme.

Le vitalisme apporte une dimension supplémentaire à la conception de douleur car il a pour objectif d'élaborer une science de l'Homme qui s'édifie sur une connaissance d'abord physique, d'élucider à partir de la physiologie, tous les phénomènes de la vie. Une attention particulière est portée à l'étude du système nerveux central, qui opère **la conversion du physique en moral**. Le cerveau

métamorphose les sensations en idées. Cabanis introduit dans sa philosophie le principe de la kinesthésie, ce qui implique l'action de concert d'une sensibilité extérieure et d'une sensibilité intérieure. Représentés par Cabanis, les vitalistes abordent la douleur comme un phénomène qui n'est pas strictement lié à une réaction, mais elle implique la participation du sujet, et son activité volontaire. Haller, distingue les diverses fibres, leurs natures, et leurs réactions. Il distingue ainsi les fibres sensibles, qui, si elles sont stimulées, occasionnent de la douleur. Des fibres insensibles qui n'en occasionnent pas. Ses travaux s'inscrivent dans le cadre d'un débat sur le rôle de la sensibilité, qui est soit le fait des fibres nerveuses (Haller), soit le fait de la vie même (vitalistes). Pour les vitalistes, la sensibilité est le fait même de l'organisme vivant, elle lie le corps à l'âme.

Le XVIIIème siècle est un siècle de débat sur l'expérience intime de la douleur et ces différentes philosophies vont permettre à la douleur de s'individualiser, d'être personnelle et non plus reliée à la spiritualité, à la métaphysique. Le rapport à la douleur va donc se transformer avec l'évolution des mentalités et des sensibilités mais aussi en s'appuyant sur les avancées scientifiques et notamment en **pharmacologie** pour soulager les patients : gaz hilarant (1799), éther (1842), morphine (découverte en 1805, injectable en 1853, prescrite par les médecins en 1914), l'anesthésie locale et générale (1847), la cocaïne (utilise en ophtalmologie en 1884), l'aspirine (découverte en 1897 et commercialisée en 1899). Cependant la douleur est encore considérée par certains comme dénuée d'intérêt : lors de la séance de l'Académie des sciences, en février 1847, Magendie s'exclamait à la suite d'un rapport fait par Velpéau nouvellement converti à l'éthérisation : "*Qu'un malade souffre plus ou moins, est-ce là une chose qui offre de l'intérêt pour l'Académie des sciences ?*". La perte de conscience dans l'anesthésie générale apparaissait alors inacceptable. "*La perte de conscience, disait Magendie, est quelque chose de dégradant et d'avilissant que tout homme un peu courageux ne saurait souffrir*".

Ce rappel historique nous permet de nous rendre compte combien, pendant des siècles, la douleur n'a pas été considérée comme relevant de la science mais bien de la philosophie.

Certes des contacts épisodiques ont eu lieu pendant ces 2500 ans entre la science et la philosophie mais fondamentalement l'âme appartient au philosophe et le corps au médecin. En ce début de 21<sup>ème</sup> siècle, les psychologues s'occupent de l'âme et les psychiatres se rapprochant de la neurologie, gèrent la neurochimie. Pourtant le dualisme est une erreur. Grâce aux découvertes des neurosciences, nous le savons désormais. L'étude de la douleur pourrait être le lien réparateur d'une césure devenue obsolète.

## Origine des conceptions actuelles : une étude replacée dans un contexte

Jusqu'au XIX<sup>ème</sup> siècle, la douleur reste liée à la médecine, bien qu'Hippocrate ait, il y a bien longtemps, voulu en faire une science. Cependant, les avancées des deux siècles suivants en feront un objet d'étude à part entière.

Les recherches se portent sur la transmission de l'information douloureuse de la périphérie vers la moelle épinière. Schiff observe que des lésions de la moelle épinière entraînent la perte de sensation tactile et douloureuse de manière indépendante : l'idée d'un système afférent spécifique pour véhiculer l'information douloureuse émerge, la douleur est une sensation propre. Cependant la majorité n'accepte pas ce modèle notamment car la douleur est due à des stimuli de nature différente (chimique, thermique, mécanique...). A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, trois concepts s'opposent :

- la douleur est une émotion ;
- la douleur est une sensation spécifique avec ses propres organes de détection, et son propre circuit anatomique : c'est la **théorie de la spécificité** (ayant conduit à la conception actuelle de **labeled lines**) ;
- la douleur est le résultat d'une activation intense du système afférent, système commun aux autres sensations : c'est la **théorie de l'intensité du stimulus** défendue par Erbs. Cette notion a été depuis abandonnée notamment suite aux découvertes de canaux ioniques activés par un stimulus sensoriel spécifique.

Avec l'arrivée de nouvelles techniques et notamment les prémisses de l'électrophysiologie (1900-1965), les travaux portent sur la caractérisation des fibres nerveuses de « gros » et « petits » diamètre, leur vitesse de conduction ; les fibres A $\bar{D}$  et C sont impliquées dans la transmission de la douleur. Des chercheurs de Cambridge observent que selon la nature des stimuli, ces fibres produisent des séries de potentiels irréguliers. De cette observation émerge la **théorie du pattern** : les neurones afférents répondent chacun de manière différente aux différents stimuli avec des intensités et des niveaux de décharge différents. La nature et la localisation du stimulus sont indiquées par le pattern global d'activité de la population de fibres d'une partie du corps.

En 1965, Melzack et Wall propose la **théorie du portillon (« gate control theory »)** expliquant comment les informations sensorielles douloureuses sont transmises au niveau de la moelle épinière. Les neurones primaires afférents sont séparés en neurones de petit et de large diamètre. L'activité de ces neurones est sous contrôle d'interneurones constituant la porte (« gate »). Lors d'activation des neurones de petit diamètre (fibres C nociceptives), ces derniers inhibent l'interneurone, la « porte est ouverte » et l'information douloureuse est transmise au neurone de sortie (T). Lorsque les fibres de gros diamètre sont secondairement activées, elles activent l'interneurone. La porte est



alors fermée, diminuant ainsi le transfert des informations nociceptives et empêchant des informations sensorielles non douloureuses d'activer le neurone T. Cette notion de « porte » modulant le transfert des informations douloureuses est un concept qui s'étoffe aujourd'hui avec la découverte de circuits spinaux spécifiques. Nous en reparlons plus en détails dans la partie DISCUSSION.

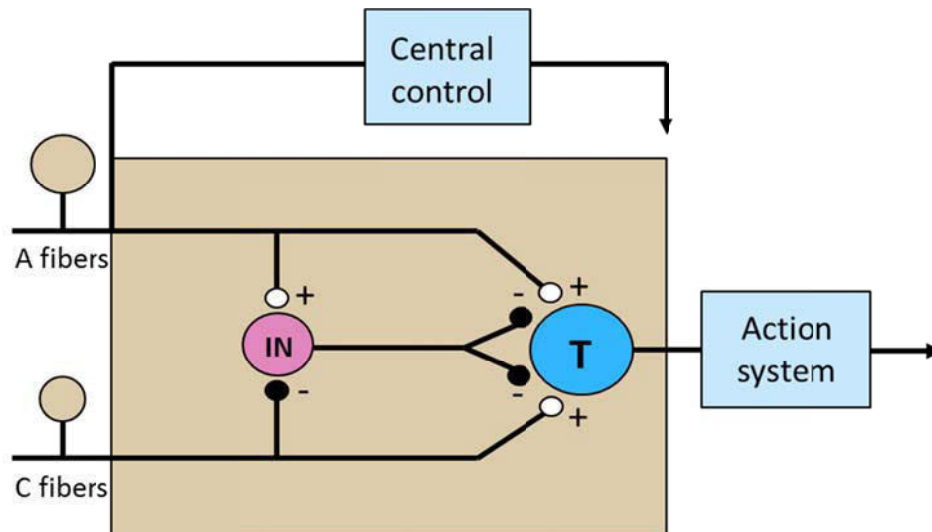


Figure 1 : Représentation schématique de la théorie du portillon (Melzack and Wall, 1965)

A l'heure actuelle, il existe un consensus sur comment une sensation, douloureuse ou non, est produite : il s'agit de l'approche du « **combinatory code** ». Les informations somato sensorielles, possèdent deux composantes. D'un côté, la douleur, la démangeaison, la température... sont transmises grâce à des neurones spécifiques (labeled lines). De l'autre, ces neurones sont connectés et « interagissent » avec d'autres neurones, codant une autre modalité sensorielle ou non, au niveau de la moelle épinière et du cerveau, ce qui permet, *in fine*, l'émergence d'une sensation.

Bien que nos connaissances des sous populations de neurones sensoriels augmentent considérablement, nous ne savons pas encore quelle population code pour quelle modalité sensorielle. En outre, il nous reste à savoir comment ses populations « communiquent » au niveau central.

Notre étude est au carrefour de ses deux notions. En effet, mon travail de thèse a eu pour but de caractériser une sous population de neurones primaires sensoriels et de définir quelles modalités sensorielles elle est en mesure de détecter et de transduire.

Cet aspect est en direct accord avec la vision « labeled lines ». Cependant, elle ouvre également la porte à des études plus « générales » pour évaluer l'intégration du message nerveux que ces neurones transmettent à la moelle épinière et comment ce message est intégré et traité.

# **PREFACE**

# PREFACE

*Une telle douleur, si j'ai pu la prévoir, je saurai la subir.*

VIRGILE L'Énéide

## **Contexte générale de notre thématique de recherche**

La douleur est un signal d'alarme nous permettant de réagir à une lésion ou toute autre attaque de notre environnement. Bien que ce phénomène physiologique soit protecteur, il peut se transformer en véritable pathologie. Selon l'Association Internationale d'étude sur la douleur (IASP), 20% de la population mondiale souffre de douleurs pathologiques, chroniques, ayant des effets plus ou moins délétères sur la vie quotidienne des patients.

Selon la définition officielle de l'Association internationale pour l'étude de la douleur (IASP), "la douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ou décrite dans ces termes". Elle est donc subjective et repose avant tout sur le ressenti du patient, ce qui la rend difficile à quantifier et à qualifier. D'autant plus que la douleur n'est pas liée systématiquement à une lésion, une caractéristique qui rend son étude complexe.

A l'heure actuelle, les traitements anti douleur sont peu spécifiques, avec parfois des effets secondaires indésirables et peu efficaces sur le long terme ; c'est pourquoi il reste primordial d'étendre et d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes permettant la transduction, la génération, l'extinction et les possibles perturbations de la sensation douloureuse.

## **Présentation de mon projet de thèse**

Les neurones du système nerveux sensoriel somatique ont pour fonctions de détecter et transmettre les informations sensorielles depuis la périphérie (peau, muscles ou viscères) vers le système nerveux central. Chez les vertébrés, la douleur est perçue par des neurones spécialisés, les nocicepteurs, dont le corps cellulaire est localisé dans les ganglions de la racine dorsale (Dorsal Root Ganglia, DRG) du tronc et dans le ganglion trijumeau de la tête. Les DRGs se répartissent par paires de chaque côté le long de la moelle épinière.

D'un point de vue morphologique, anatomique, électrophysiologique, mais également moléculaire, les neurones sensoriels présentent une grande hétérogénéité. Notre laboratoire porte un intérêt particulier aux populations de neurones sensoriels détectant la douleur : les nocicepteurs. Nous cherchons à identifier de nouveaux marqueurs, tels que des récepteurs, protéines de signalisation, facteurs de transcription qui soient spécifiques d'un sous type neuronal particulier. L'objectif est de

pouvoir attribuer des fonctions physiologiques précises à ces différentes sous-populations neuronales et disposer ainsi d'outils précieux pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin d'identifier de nouveaux marqueurs, un crible transcriptionnel basé sur un microarray a été réalisé. Aziz Moqrich a généré une lignée de souris knock-in *trkA<sup>trkC/trkC</sup>* dans laquelle le locus *trkA* dirige l'expression ectopique de *trkC* et conduit une fraction des nocicepteurs présomptifs *trkA+* à adopter un phénotype proprioceptif (Moqrich et al., 2004) Le transcriptome des DRGs de ces souris transgéniques a été comparé à celui de souris sauvages et plusieurs gènes candidats spécifiques des nocicepteurs ont été identifiés. Le gène *ginip* provient de ce crible.

GINIP code pour une protéine de 400 acides aminés dont le rôle dans la physiologie des DRGs a récemment été décrit par notre équipe (Gaillard et al., 2014). Des expériences d'hybridation *in situ* nous ont montrés que GINIP définit deux classes particulières de neurones non-peptidergiques : les neurones exprimant le récepteur couplé aux protéines G de la famille des Mas Related G-Protein Receptor D (MRGPRD) et les C-Low Threshold MecanoReceptors (C-LTMRs). Au laboratoire, un modèle murin permettant d'étudier à la fois la fonction de GINIP et la spécialisation fonctionnelle des neurones qui expriment GINIP a été généré.

Mon travail de thèse a eu pour but :

- De valider le modèle murin permettant l'ablation ciblée des neurones GINIP+ au sein du DRG
- De définir, quelles sont les modalités sensorielles que la population de neurones GINIP+ est en mesure de détecter et de transduire

Afin de mieux comprendre ma démarche scientifique, j'ai donc décidé de vous décrire dans un premier temps le **parcours de l'information douloureuse** dans l'organisme : le stimulus nocif est détecté, et transmis via des neurones spécialisés : **les nocicepteurs**. Mon introduction sera l'occasion de vous présenter l'hétérogénéité de ces neurones primaires sensoriels et de comprendre dans quel ensemble se trouve la population de neurones que j'ai étudiée. L'information sensorielle est ensuite transmise à la **moelle épinière**. Nous examinerons donc son organisation et sa diversité cellulaire. Cela permettra d'appréhender son rôle dans la modulation et l'intégration des messages nerveux nociceptifs et de comprendre les phénotypes comportementaux qui nous ont intéressés.

Enfin, j'évoquerai brièvement l'intégration et la modulation **centrale**, cérébrale, de l'information sensorielle. En effet, bien que notre étude se concentre sur les mécanismes périphériques et spinaux de transmission de la douleur, il me semble important, pour nuancer parfois l'interprétation de nos phénotypes, de nous rappeler que nous travaillons sur un organisme entier où de nombreux relais d'intégration sont mis en jeu pour contribuer à une réponse comportementale globale.

Cette première partie de mon introduction sera donc l'occasion de présenter le système anatomique ainsi que les différents acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans les phénotypes que je présenterai dans ma partie résultat.

Dans un second temps, je présenterai **les paradigmes expérimentaux** qui nous ont principalement intéressés dans cette étude : la douleur induite à la formaline et la douleur neuropathique. Je m'efforcerai de vous présenter l'implication des différents relais anatomiques dans ces modèles.

# **INTRODUCTION**

**Partie 1 :**  
**Transmission du message**  
**sensoriel douloureux**

# Les neurones primaires sensoriels

## 1. Présentation générale

D'un point de vue morphologique, anatomique, électrophysiologique, mais également moléculaire, les neurones primaires sensoriels présentent une grande hétérogénéité. Comment distingue-t-on ces neurones ?

Les premières études visant à caractériser ces neurones ont été des expériences d'électrophysiologie. Ces dernières ont notamment mis en évidence le fait que les neurones primaires sensoriels conduisent l'influx nerveux à des vitesses différentes. On distingue donc 3 types majeurs de fibres nerveuses et de neurones selon leur **vitesse de conduction et leur morphologie** :

- Les fibres A $\beta$  ont des vitesses de conduction élevées, dues à la forte myélinisation de leur axone : le diamètre de leur corps cellulaire est donc le plus gros.
- Les fibres A $\delta$  ont des vitesses de conduction un peu plus faibles, la myélinisation des axones est cependant importante, leur corps cellulaire possède un diamètre intermédiaire.
- Les fibres C ont des vitesses de conduction faible, dues à une absence de myélinisation de leur axone.

Les fibres de type A sont majoritairement activées pour de « faibles » stimulations : on parle de **fibres à bas seuil** ; tandis que les fibres C sont activées par de « fortes » stimulations, ce sont des **fibres à haut seuil**, correspondant aux **nocicepteurs**. Cette classification dichotomique n'est pas figée et je m'efforcerai pendant mon exposé de présenter les « exceptions » à cette vision, qui me servira cependant de fil conducteur. En effet, on peut également classifier les neurones primaires sensoriels soit selon le type de stimuli qu'ils détectent (**modalité sensorielle**), soit selon les **marqueurs moléculaires** qu'ils expriment. L'enjeu de ces dernières décennies est d'ailleurs bien de comprendre le lien entre la combinatoire moléculaire des neurones primaires sensoriels et la modalité sensorielle détectée. J'ai donc choisi dans cette partie de vous présenter les différents types de neurones sensoriels en les classifiant tout d'abord selon le type de fibres. Je m'efforcerai de mettre en relation, dès que faire se peut, le type de fibres, la modalité sensorielle détectée ainsi que la combinatoire moléculaire qui en est responsable.



## **2. Fibres à bas seuil**

### **2.1 Les mécanorécepteurs à bas seuil**

L'organisme est soumis à une infinité de stimuli tactiles, allant de la douce brise du vent, au coin d'une table en passant par la goutte d'eau. Afin de détecter cette « palette environnementale », nous possédons des neurones sensoriels cutanés très divers et très spécifiques, **les mécanorécepteurs à bas seuil d'activation** (appelés **Low Threshold MecanoReceptor, LTMR**).

Ces neurones peuvent exprimer différents marqueurs. Les LTMR de type A $\beta$  sont des fibres de gros diamètre et expriment le récepteur aux neurotrophines TrkC ou parfois le récepteur Ret (on parle de « gros Ret »). Les LTMR de type A $\delta$  sont des fibres de moyen diamètre et expriment le récepteur TrkB. Enfin on distingue également les C-LTMRs ainsi que les neurones MrgprB4, qui sont des neurones de petit diamètre. La détection des différents types de stimuli mécaniques (déformation, vibration...) est rendue possible grâce à **des structures anatomiques particulières** présentes à l'extrémité périphériques des neurones, que ce soit dans la **peau glabre** ou dans la **peau poilue**. La nature des stimuli est transduite de manière différente par ces neurones selon leur type de décharge : neurones à adaptation lente (Slowly adapting, **SA**), à adaptation intermédiaire (intermediate adaptation, **IA**) ou à adaptation rapide (rapidly adapting, **RA**).

#### *2.1.1 A $\beta$ -RA-LTMR : Mécanorécepteurs à adaptation rapide – peau glabre*

**Les corpuscules de Meisner** (1852) : ces structures sont situées dans le derme papillaire et se retrouvent uniquement aux terminaisons de fibres A $\beta$  innervant la peau glabre. Ces fibres détectent les mouvements rapides à la surface de la peau ainsi que les vibrations de basses fréquences (inférieures à 50Hz) (Srinivasan et al., 1990). Ces neurones projettent au niveau des lamina III et IV de la corne dorsale de la moelle épinière (cf détails dans partie 2). (Woolf, 1987)

**Les corpuscules de Pacini** : ces corpuscules sont situés dans la peau au niveau du derme, de l'hypoderme et plus profondément, dans le périoste et le mésentère (Pawson et al., 2008). Ces terminaisons sensorielles sont sensibles aux pressions, vibrations à haute fréquence. L'arborescence des fibres des corpuscules de Pacini se localisent dans la lamina III et la lamina IV dorsale et V (Semba et al., 1984).

### 2.1.2 $A\beta$ -SA-LTMR : Mécanorécepteurs à adaptation lente –peau glabre

**Les corpuscules de Ruffini** : ce récepteur se retrouve dans le derme mais également dans les articulations (participant ainsi à la proprioception). Il n'est donc pas étonnant que ces structures soient sensibles à l'étirement de la peau. Les fibres portant les organes de Ruffini forment des collatérales dans la lamina III et ont des extensions dans la lamina IV-V.

**Le complexe neurite - cellules de Merkel** : localisé à la base de l'épiderme, il est composé d'une cellule de Merkel et de la terminaison d'un neurone primaire sensoriel de type A. Il s'agit d'un récepteur du toucher léger qui encode les fins détails des objets comme la forme et la texture. (Iggo and Muir, 1969). Des jonctions de type synaptiques ont été décrites entre ces deux composants (Fagan and Cahusac, 2001; Gu et al., 1981; Halata et al., 2003; Hartschuh and Weihe, 1980) et jusque récemment, on ignorait qui de la cellule de Merkel ou de l'afférence primaire était le mécanosenseur. Une étude récente met en évidence que les cellules de Merkel codent les stimuli statiques, comme la pression alors que les neurones primaires sensoriels transduisent les stimuli dynamiques tels que le grattage (Maksimovic et al., 2014). Le canal piezo2, présent sur les cellules de Merkel joue un rôle crucial dans cette mécanotransduction (Woo et al., 2014). Ce complexe est donc une structure sensorielle unique composée des deux différents types de cellules réceptrices spécialisées dans la détection de deux éléments distincts du toucher. Ces neurones transduisent l'information sensorielle jusqu'aux lamina III et IV.

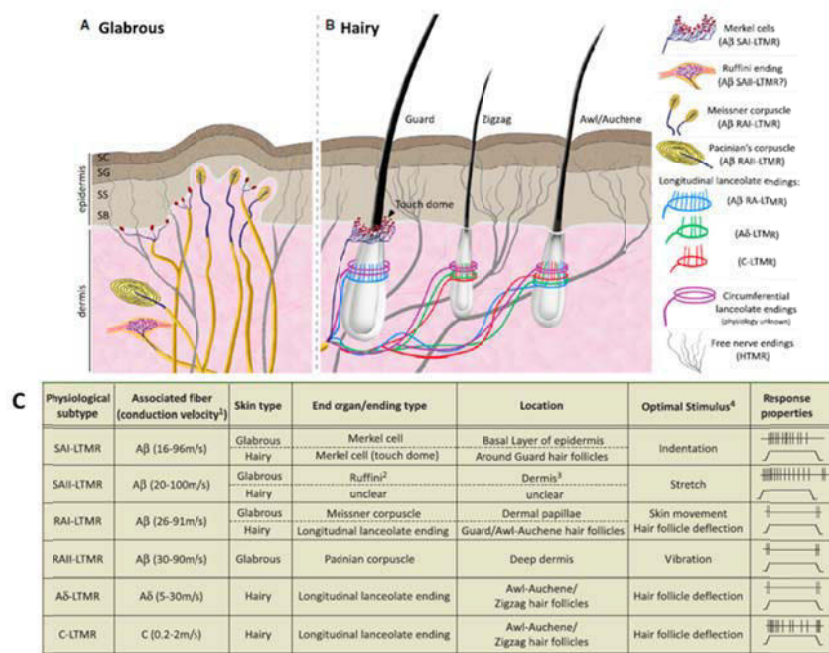
### 2.1.3 $A\delta$ -LTMR – peau poilue

Les fibres  $A\delta$ -LTMR ont été initialement étudiées chez le chat et ont, dès lors, été qualifiées de « D-hair ». Elles entourent les follicules pileux « awl/auchene » ou « zigzag » grâce à des terminaisons lancéolées (Li et al., 2011). Cette organisation anatomique leur permet de détecter les déflexions des poils, notamment dans le plan rostral (Rutlin et al., 2014). Elles présentent le plus faible seuil d'activation mécanique et sont par conséquent les fibres les plus sensibles aux stimuli mécaniques (Brown et al., 1967).

Cette organisation anatomique des LTMs suggère que des modalités mécaniques différentes sont transmises et intégrées par des cellules différentes dans la moelle épinière.

### 2.1.4 C-LTMR – peau poilue

Les C-LTMRs forment une population de neurones primaires sensoriels particulière. Ce sont des mécanorécepteurs à bas seuil en condition physiologique. Cependant on peut les classer comme nocicepteurs pour deux raisons : l'expression de certains marqueurs moléculaires spécifiques aux nocicepteurs et leur contribution aux phénomènes de douleur inflammatoire et neuropathique. J'ai donc choisi de vous présenter cette sous population de neurones dans ma partie [3.3.2 Une classe particulière de neurones non-peptidergiques : Les C-Low Threshold MechanoReceptors \(C-LTMRs\)](#).



**Figure 1** : Représentation schématique des terminaisons sensorielles des fibres LTMR au niveau de la peau glabre (A) et de la peau poilue (B). Tableau récapitulatif des données relatives sur les différentes sous populations de LTMRs (C). (Abraira and Ginty, 2013)

## 2.2 Les propriocepteurs

Les propriocepteurs fournissent des informations sur les forces mécaniques qui ont pour origine le corps lui-même et particulièrement le système musculo-squelettique. Leur fonction première est de renseigner de façon permanente sur le degré de contraction des muscles et/ou de tension des tendons, la position des articulations et l'orientation de la tête par rapport au sol. Ils permettent ainsi le maintien de l'équilibre et de l'intégrité du corps lors d'un mouvement. Des mécanorécepteurs de

bas seuil, comprenant les **fuseaux neuromusculaires**, les **organes tendineux de Golgi** et les **récepteurs articulaires**, fournissent ce genre d'informations indispensables à l'exécution précise des mouvements (Macefield, 2005). Les fuseaux neuromusculaires se trouvent dans la quasi-totalité des muscles striés, ils consistent en quatre à huit fibres musculaires, les fibres intrafusales, qu'entoure une capsule de tissu conjonctif. Ils sont innervés par des fibres sensibles myélinisées. Les récepteurs tendineux de Golgi sont situés à la jonction d'un tendon et d'un muscle. Ils sont formés d'une mince capsule de tissu conjonctif entourant quelques fibres de collagène et sont innervés par des fibres sensibles. Enfin, les récepteurs situés dans les articulations ou autour d'elles recueillent des informations sur la position des membres et les mouvements des articulations. Tous les neurones proprioceptifs expriment le récepteur à la neurotrophine 3 (NT3) **TrkC** et projettent en central au niveau des couches profondes de la corne dorsale de la moelle épinière.

### 2.3 Les thermorécepteurs

Ces populations de neurones sont spécialisées dans la détection de **stimuli non nocifs chauds ou froids** au niveau de la peau mais également des viscères. Ce sont des **fibres A $\delta$  ou C** avec une terminaison libre en périphérie et innervant les couches superficielles (lamina I et II) et profondes (lamina V) de la corne dorsale de la moelle épinière. Ces neurones déchargent de manière transitoire et adaptative, représentative de notre capacité à nous acclimater rapidement à des changements de température (comme plonger dans un bain chaud ou froid) (Vriens et al., 2014)

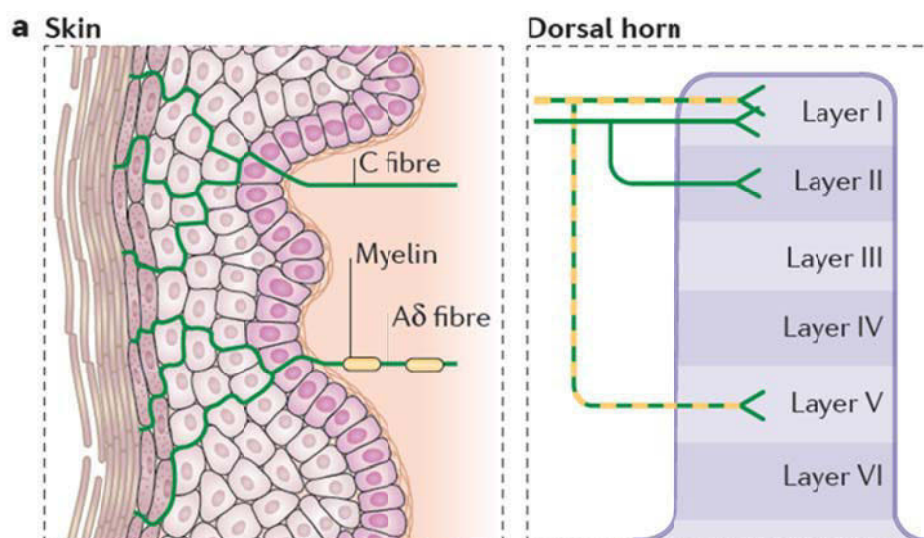
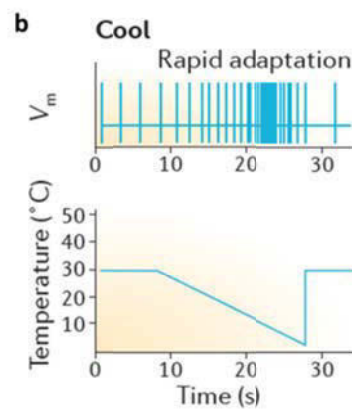


Figure 2 : Représentation schématique des projections des thermorécepteurs au niveau de la peau (gauche) et de la corne dorsale de la moelle épinière (droite) (Vriens et al., 2014)

### 2.3.1 Les thermorécepteurs au froid

Les neurones répondant au froid non nocif sont très majoritairement des **fibres A $\delta$**  (Darian-Smith et al., 1973); également appelées Low Threshold (LT). Elles détectent les stimuli froids grâce à des champs récepteurs consistant en un ou plusieurs spots, insensibles à la stimulation mécanique (Kenshalo and Gallegos, 1967). Ces fibres sont légèrement activées par des températures neutres (34°C), répondent vigoureusement aux températures comprises entre 20°C et 30°C (une température est considérée comme froide nocive en dessous de 15°C), et sont inhibées quand la peau est chauffée.



**Figure 3** : Représentation schématique des propriétés physiologiques des thermorécepteurs au froid (Vriens et al., 2014)

Cependant il est important de noter qu'il existe également des fibres C sensibles au froid appelées **HCR** (High Threshold Cold Receptor) (LaMotte and Thalhammer, 1982). Ces fibres sont inactives à température ambiante, activées par le froid en dessous de 27°C, s'adaptent rapidement et cessent de décharger pour des températures ambiantes. Ces fibres répondent plus tardivement au stimulus donc il est suggéré qu'elles contribuent à détecter les températures les plus froides que les autres fibres « cold A $\delta$ » détectent moins. La classification de ces fibres est assez compliquée : elles détectent des stimuli froids non nocifs et nocifs ; ce sont des fibres nociceptives *High Threshold*.

Enfin, d'après l'étude de (Kumazawa and Perl, 1977), il apparaît que les **C-LTMRs** répondent au **refroidissement** (2°C/s), les températures froides statiques ne les activant pas. Cahusac et Noyce, suggèrent que certaines fibres A $\beta$  de type slowly adapting (Merkel et Rufini) répondent également au froid. Cependant vu la réponse engendrée par ces mêmes fibres lors de stimulation mécanique, leur rôle dans la transmission des stimuli froids semble négligeable (Cahusac and Noyce, 2007).

D'un point de vue pharmacologique, ces fibres sont activées par le menthol (Hensel and Zotterman, 1951) et son application sur des fibres déjà activées augmente fortement leur fréquence de décharge

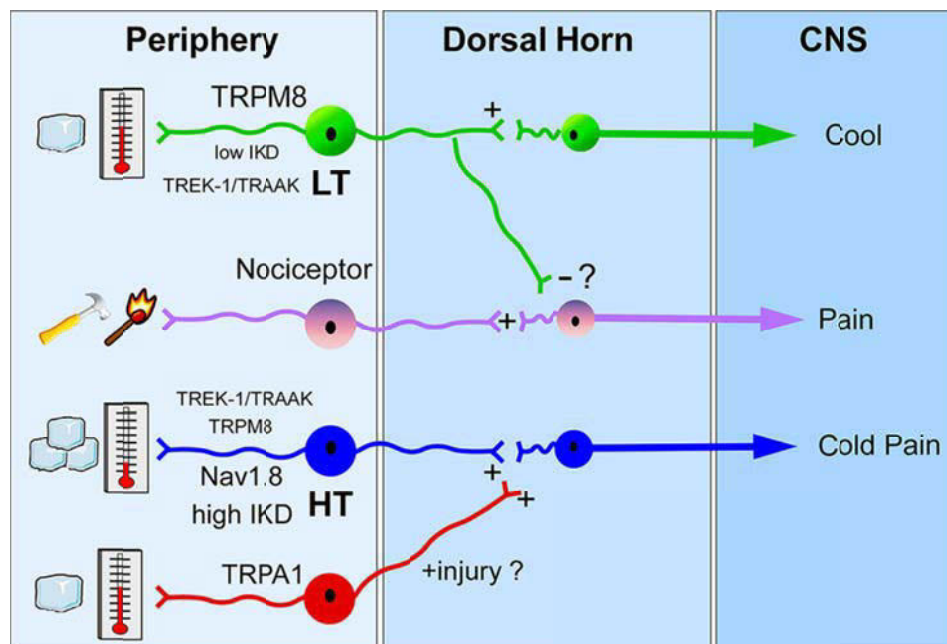
(sensibilisation). Cette action du menthol est médiée via le récepteur Transient Receptor Potential M8 (**TRPM8**) (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). A l'heure actuelle, le rôle de ce canal dans la **transduction des stimuli froids** est clairement défini mais son rôle dans les phénomènes **nociceptifs dus au froid** reste **controversé**. En effet, trois études sur des animaux distincts TRPM8<sup>-/-</sup> (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2008) concluent que ces animaux ne sont plus capables de discerner la différence entre une surface à 30°C et des surfaces maintenues à des températures inférieures à 15°C (nocif) ; suggérant qu'ils ne peuvent plus faire la différence entre le chaud et le froid non nocif. Cependant dans l'étude de Colburn, lorsque les animaux ont le choix entre des températures de 25°C et 5°C (nocif), ces derniers présentent une forte préférence pour la température chaude, alors que les animaux sauvages n'ont pas de préférences. Pourquoi ces animaux préfèrent ils le chaud ? Ne peuvent-ils plus détecter les températures froides nocives ? L'hypothèse qu'un autre récepteur, agissant de concert avec le canal TRPM8, permet de détecter les stimuli froids nocifs a donc émergé, avec comme principal candidat le récepteur **TRPA1**. Deux études, menées sur deux lignées de souris TRPA1<sup>-/-</sup> différentes ont cependant conclu que ces animaux ne présentaient pas de déficit quant à la détection du froid (Bautista et al., 2006; del Camino et al., 2010) Néanmoins, le canal TRPA1 semble avoir une place importante dans les mécanismes **d'hypersensibilité au froid après une lésion** (da Costa et al., 2010; Obata et al., 2005). Il est alors suggéré qu'en cas de lésion, le canal TRPA1 est activé par des agonistes endogènes et que le froid peut potentialiser sa réponse, entraînant des sensations douloureuses au froid. Cependant l'action du canal TRPA1 comme modulateur du canal TRPM8 n'a pas été directement démontrée.

La possibilité que l'activité du canal TRPM8 soit modulée par d'autres récepteurs ou canaux a cependant été mise en évidence dans différents cas. En effet, d'après l'étude de (Noel et al., 2009), les canaux **TREK1 et TRAAK, senseurs locaux de températures**, pourraient induire une variation locale du potentiel de membrane, au niveau des terminaisons périphériques. Cette variation serait en mesure d'**activer** ou non les différents **canaux TRP** présents sur ces mêmes terminaisons et de détecter les stimuli thermiques. Le **canal TRPC5** serait également un modulateur de TRPM8 (Zimmermann et al., 2011) tout comme le **canal TASK-3**, fortement enrichi dans les neurones TRPM8 positifs (Morenilla-Palao et al., 2014).

Enfin les différents canaux ioniques voltages dépendants, responsable du déclenchement du potentiel d'action peuvent également avoir un rôle fonctionnel spécifique dans ces thermorécepteurs au froid. Le **canal sodique Nav<sub>1.8</sub>** est un canal essentiel pour maintenir l'excitabilité des nocicepteurs quand la peau est refroidie : un refroidissement de la membrane augmente l'inactivation lente des canaux sensibles à la tétrodotoxine (TTX) (dont Nav<sub>1.8</sub>) et les températures basses diminuent le seuil d'activation des courants sodiques. Les animaux KO Nav<sub>1.8</sub> présentent

d'ailleurs une faible réponse aux stimuli froids (Zimmermann et al., 2007). D'autre part, **les conductances potassiques** modulent le potentiel de repos des neurones. Le refroidissement ferme les canaux potassiques (HCN1-2, (Orío et al., 2009)) responsables du **courant  $I_h$**  permettant la dépolarisation des neurones sensibles au froid (Viana et al., 2002). Chose intéressante, dans les neurones insensibles au froid, les **courants  $I_{KD}$**  prédominent et freinent la dépolarisation. En bloquant ces conductances, les neurones deviennent sensibles au froid. Enfin, **les courants de type  $I_M$** , une fois bloqués, modulent l'activité des canaux TRPM8, et induisent l'apparition de sensation froide (Vetter et al., 2013).

En conclusion, les neurones détectant les stimuli froids, non nocifs, présentent une forte hétérogénéité moléculaire. La présence du canal TRPM8 semble primordiale pour la détection des stimuli froids non nocifs mais la combinaison d'autres acteurs, canaux transducteurs ou canaux ioniques voltages dépendants, serait la clé pour comprendre comment au sein même d'une population de neurones TRPM8 positifs, certains répondent au froid non nocifs, nocifs et aux phénomènes d'hyperalgésie thermique après une lésion. Une ébauche de combinatoire est présentée ici.



**Figure 4** : Représentation schématique de la détection de stimuli froids, nocifs ou non nocifs, dépendant du type de neurones, et des canaux qu'ils expriment (combinatoire moléculaire de ces neurones) (McKemy, 2013).

Bien que notre étude ne présente pas de phénotype lié au froid, les données relatives aux thermorécepteurs présentées précédemment sont un parfait exemple illustrant la notion de combinatoire moléculaire, liée à la détection d'une modalité sensorielle spécifique.

### 2.3.2 Les thermorécepteurs au chaud

Il s'agit de **fibres C** (Darian-Smith et al, 1979), insensible aux stimuli mécaniques et dont le champ récepteur est peu large. Ces fibres ont une activité constitutive pour des températures statiques de 30°C ou plus, activité qui disparaît lors du refroidissement. Elles atteignent un maximum de décharge pour des températures de 40-43°C et un minimum pour des températures de 50°C (Darian-Smith et al, 1979 ; Hensel et Iggo, 1971 ; LaMotte et Campbell, 1978).

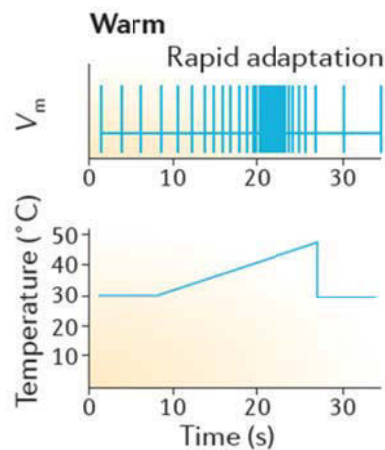


Figure 5 : Représentation schématique des propriétés physiologiques des thermorécepteurs au chaud (Vriens et al., 2014)

Il n'y a à l'heure actuelle pas de population neuronale du DRG spécifiquement définie comme détectant les températures chaudes. Cependant, certains canaux de type TRP sont activés spécifiquement par les températures chaudes, non nocives.

Le **canal TRPV4** est activé par des températures de 24°C (Watanabe et al., 2002) et 34°C (Guler et al., 2002). Cependant, cette activation par les températures chaudes semble indirecte. En effet, alors que lors des expériences d'électrophysiologie *in vitro* en configuration cell attached, la stimulation chaude active le canal, en configuration patch clamp inside out, ce n'est plus le cas. Il semblerait que le cytochrome P450, élément en aval de la voie activée par l'acide arachidonique, soit un activateur de ce canal (Watanabe et al., 2003). D'après différentes études menées sur des animaux KO TRPV4, il apparaît que ce canal joue un rôle dans la perception des températures chaudes, non nocives, et soit impliqué dans l'hyperalgésie thermique après inflammation. Cependant, son rôle dans la détection des températures chaudes nocives n'est pas clairement établi (Lee et al., 2005; Liedtke and Friedman, 2003; Suzuki et al., 2003). Sa localisation au niveau des kératinocytes, mais également au niveau des cellules endothéliales, des glandes sudoripares et des afférences sympathiques, suggèrent un rôle dans la thermorégulation périphérique (Guler et al., 2002). Le **canal TRPV3** est activé autour



des 33°C et des stimulations chaudes répétées accroissent son activité, on parle alors de sensibilisation (Moqrich et al., 2005). Le fait que ce récepteur soit majoritairement exprimé dans les **kératinocytes** plutôt que dans les neurones du DRGs suggère fortement que les cellules de la peau soient capables de détecter les stimuli chauds et de libérer ensuite des médiateurs activant les neurones primaires sensoriels. Les animaux KO TRPV3 détectent moins les températures chaudes et perdent leur préférence initiale pour les températures avoisinant les 35°C (Moqrich et al., 2005) Cependant, la perte de détection des températures chaudes n'étant pas totalement abolie, il est fort probable que d'autres canaux soient des senseurs du chaud. Notons pour conclure que les différents canaux TRPV (TRPV1-2-3-4) sont activés dans des gammes de température différente, graduelle ; cela suggère qu'ils sont recrutés successivement afin de médier la thermosensation non nocive et nocive lorsque la température augmente et qu'une communication a lieu entre les neurones et les kératinocytes, les cellules endothéliales... afin de transduire cette information sensorielle.

### **3. Les fibres à haut seuil : les nocicepteurs**

#### **3.1 Présentation générale**

Les fibres à haut seuil d'activation sont les neurones primaires sensoriels détectant les stimuli douloureux, également appelés les nocicepteurs. Il peut s'agir **de fibres A ou de fibres C**.

**Les fibres A** nociceptives peuvent être des fibres A $\beta$  (bien que souvent oubliées) ou A $\delta$  en regard de leur vitesse de conduction (Djouhri and Lawson, 2004). Ces neurones sont à même de détecter des stimuli nociceptifs de différents types.

Les **AMH** (A-fibers **M**echano **H**eat nociceptors) détectent les stimuli nociceptifs de nature mécanique et également thermique (chaude). Chez le primate, cette population de neurone peut être subdivisée en 2 sous-populations :

- Les **AMH de type I**, innervant la peau glabre et poilue, ont un seuil d'activation élevé pour les stimuli thermiques et bas pour les stimuli mécaniques (Treede et al., 1998; Treede et al., 1995).
- Les **AMH de type II**, innervant uniquement la peau poilue, sont activés pour des stimuli thermiques plus faible (46°C) et de forts stimuli mécaniques. Ces neurones seraient à l'origine de la première réponse douloureuse, rapide, ressentie suite à une stimulation nocive chaude. Les AMH de type I contribueraient eux au développement plus lent de la douleur thermique (Treede et al., 1998; Treede et al., 1995).

Les **AMC** (A-fibers **M**echano **C**old nociceptors) détectent les stimuli mécaniques et froids nociceptifs (Zimmermann et al., 2009).

Néanmoins, la grande majorité des neurones détectant les stimuli douloureux sont **des fibres C**. On distingue des fibres C sensibles aux stimuli mécaniques (C-Mechanical fibers - **CM**), sensibles aux stimuli chauds nocifs (C-Heat fibers – **CH**), aux deux types de stimuli (C-Mechanical Heat fibers – **CMH**), et des fibres détectant tous types de stimuli (C-Mechanical-Heat-Chemical fibers – **CMHC** – neurones polymodaux).

De manière complémentaire, on peut classifier les nocicepteurs en deux grandes catégories selon leur dépendance aux récepteurs aux neurotrophines (distinction moléculaire). Les neurones exprimant le récepteur au NGF (Nerve growth factor) **TrkA** sont des **nocicepteurs dits peptidergiques** et les neurones exprimant le récepteur au GDNF (Glial derived nerve factor) **Ret** sont des **nocicepteurs dits non peptidergiques**.

Je vais décrire ces deux grandes catégories en essayant, dès que faire se peut, de relier identité moléculaire et spécialisation fonctionnelle.

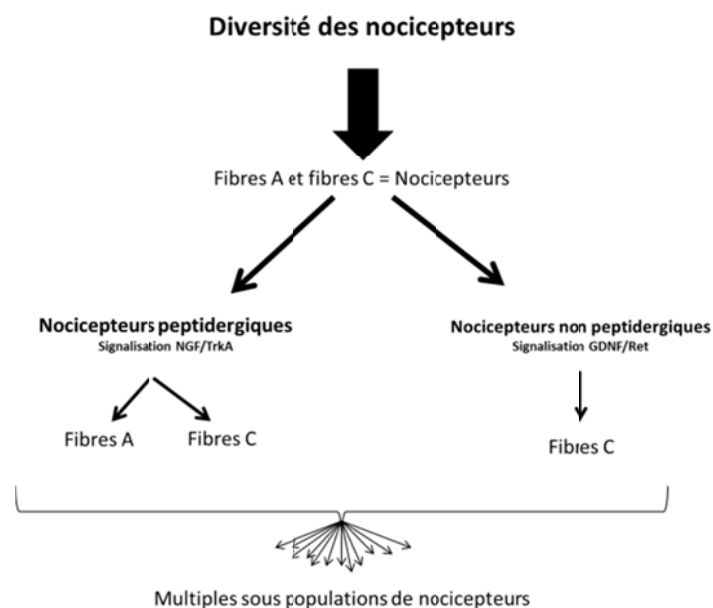


Figure 6 : Représentation schématique de la classification des nocicepteurs

### 3.2 Les nocicepteurs peptidergiques

Les nocicepteurs peptidergiques sont des neurones de petit (fibre C) ou de moyen diamètre (fibre A $\bar{D}$ ) exprimant le **récepteur TrkA**. Ces neurones projettent au niveau de la couche laminaire I et II de

la corne dorsale de la moelle épinière (voir partie présentation générale des neurones de la Moelle Epinière). A ce niveau, ils libèrent du glutamate, principal neurotransmetteur excitateur des neurones primaires sensoriels, mais également des neuropeptides tels que la **substance P**, et le peptide Relié au Gène Calcitonine (**Calcitonin Gene Related Peptide, CGRP**). Ces peptides sont exprimés par 50% des nocicepteurs cutanés de type C et par 20% des fibres A $\delta$  (représentant en tout, 40% des neurones du DRG, (Djouhri and Lawson, 2004)). Ces neurones peuvent exprimer différents marqueurs moléculaires.

J'ai décidé de vous présenter deux sous populations de neurones nociceptifs qui ont une contribution importante dans les modalités sensorielles que j'ai étudié pendant ma thèse : les neurones exprimant le canal TRPV1 et les neurones exprimant le canal TRPA1.

### *3.2.1 Les neurones TRPV1+ : les « nocicepteurs du chaud »*

Le canal TRPV1 a été le premier canal de la famille des Transient Receptor Potential Cation Channels (TRP) à avoir été découvert (Caterina et al., 1997). Il s'agit d'un **canal cationique** perméable au calcium et au magnésium activé par la **température à partir de 42°C** (considérée comme nocive) et par de nombreux agents chimiques dont la **capsaïcine**. Le canal TRPV1 est exprimé par des **fibres C et A $\delta$** , très majoritairement par des nocicepteurs **peptidergiques, TrKA+, CGRP+** (Cavanaugh et al., 2011; Zwick et al., 2002). Cependant il a été décrit pour être exprimé dans des nocicepteurs non peptidergiques (Hjerling-Leffler et al., 2007), et 6% des neurones TRPV1+ expriment le marqueur IB4+ (spécifique des nocicepteurs non peptidergiques, cf paragraphe suivant) (Zwick et al., 2002). Les neurones peuvent également exprimer le canal **TRPA1** (Bautista et al., 2005) le canal **TRPM8**, mais pas le récepteur MrgprD (Cavanaugh et al., 2009).

L'analyse de la souris TRPV1 KO a permis d'attribuer à ce canal un rôle dans la détection et transmission des **températures chaudes nocives** et le développement d'une **hyperalgésie thermique après inflammation** (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). De manière consistante, il est exprimé sur les fibres C sensibles uniquement à la chaleur (C-H) mais peu sur les fibres C polymodales (CPM) (Lawson et al., 2008). L'ablation pharmacologique des afférences centrales des neurones TRPV1<sup>+</sup> a confirmé ces observations en démontrant que les neurones TRPV1<sup>+</sup> jouaient un rôle primordial dans la détection des températures chaudes nocives (statiques ou graduelles) ainsi que dans les phénomènes d'hyperalgésie thermique suite à une inflammation (Cavanaugh et al., 2009). Enfin, l'ablation génétique développementale, chez la souris, des neurones du DRG exprimant le canal TRPV1<sup>+</sup> cause une perte de la sensibilité à la chaleur (Mishra et al., 2011). Ces données sont néanmoins à nuancer car l'ablation neuronale observée dans ce modèle n'est pas restreinte aux

neurones adultes TRPV1<sup>+</sup>, en effet l'expression du canal TRPV1<sup>+</sup> est dynamique au cours du développement et plus restreinte chez l'adulte ; il se peut donc que la mort d'autres neurones soit impliquée dans le phénotype observé.

Pour conclure, il est important de noter que c'est le seul exemple décrit, où le rôle physiologique du canal dans le neurone, correspond exactement au rôle physiologique de la population de neurones exprimant ce canal, c'est à dire transduire les stimuli chauds nocifs.

### 3.2.2 Les neurones TRPA1<sup>+</sup> : au croisement des classifications

Le canal TRPA1, appartenant également à la famille de TRP, a été décrit en 2003, comme étant un nouveau senseur des températures froides, spécifiquement exprimé dans une sous population de neurones nociceptifs peptidergiques, pouvant exprimer le récepteur **TRPV1** mais exclus de la population TRPM8<sup>+</sup> (Story et al., 2003). On sait désormais que son expression est plus étendue, notamment à des populations de neurones nociceptifs non peptidergiques (Barabas et al., 2012).

Il est notamment exprimé sur des fibres **Aδ et C mécano-nociceptives** et de manière plus surprenante sur des fibres **Aβ – LTM** (Kwan et al., 2009). En outre, ce canal serait également présent à la surface des kératinocytes et des follicules pileux (Kwan et al., 2009).

Une partie des neurones TRPA1<sup>+</sup> peuvent connecter des **interneurones inhibiteurs** de la corne dorsale de la moelle épinière (Kosugi et al., 2007) ; tandis que d'autres semblent connecter des neurones **excitateurs** (Kosugi et al., 2007; Uta et al., 2010). Ce pattern d'expression très large ne fait que complexifier ses possibles fonctions physiologiques.

Comme il a été évoqué précédemment (*paragraphe 2.3.1*), son rôle dans **l'hypersensibilité au froid après une lésion** a été clairement établie mais plusieurs études débattent de son rôle dans la détection et la transmission des températures froides nocives ainsi que de son rôle dans la mécano-transduction (Bautista et al., 2006; Kerstein et al., 2009; Kwan et al., 2006). Cependant, l'étude de (Kwan et al., 2009) présente des enregistrements d'électrophysiologie *in vivo* impliquant indubitablement sa contribution comme **modulateur (et non générateur) de la décharge des neurones mécano-sensibles**. Son absence des neurones mécano-sensibles à adaptation lente (Aβ LTM, Aδ et C mécano-nocicepteur) entraîne une diminution du nombre de décharge du neurone suite à une stimulation mécanique ; tandis que son absence au sein de neurones mécano-sensibles à adaptation rapide (Aβ LTM, Aδ-D-Hair) tend à augmenter leur nombre de décharge (Kwan et al., 2009). Les auteurs suggèrent que cette dualité d'effet reposerait sur la combinatoire moléculaire (présence ou non de tel ou tel type de canaux ioniques) de ses sous types de neurones. Par exemple, l'activation du canal TRPA1 sur des fibres à adaptation rapide pourrait conduire à une seconde

activation de canaux potassique dépendant du calcium qui hyperpolariseraient le neurone, limitant ainsi l'apparition de potentiel d'action.

Enfin, il a été mis en évidence que le canal TRPA1 serait impliqué dans la douleur induite suite à l'injection de faible dose de **formaline** (Macpherson et al., 2007; McNamara et al., 2007).

Il apparaît ici que le canal TRPA1 est assez largement exprimé au niveau des fibres primaires sensorielles, sur des fibres C, des fibres A, TRPV1<sup>+</sup> ou non. Ceci pourrait en fait révéler l'existence de 2 sous populations de neurones TRPA1<sup>+</sup> : une population peptidergique ou A $\delta$ , exprimant fortement TRPA1 et co-exprimant TRPV1 ; une seconde population, probablement non peptidergique, exprimant faiblement TRPA1. De plus, ce pattern d'expression se retrouve au niveau des connexions synaptiques que les afférences TRPA1<sup>+</sup> exercent dans la moelle : des neurones TRPA1<sup>+</sup> connectant des synapses excitatrices mais également inhibitrices. Il peut être proposé comme modèle que des fibres A $\delta$ /TRPV1<sup>+</sup>/TRPA1<sup>+</sup> connecteraient des neurones excitateurs tandis que les neurones exprimant faiblement TRPA1<sup>+</sup> uniquement, connecteraient des neurones inhibiteurs.

Nous étayerons cette idée dans la partie DISCUSSION après avoir apporté nos résultats supplémentaires.

### **3.3 Les nocicepteurs non peptidergiques**

Par opposition à la catégorie précédemment décrites, les nocicepteurs non peptidergiques ne contiennent pas de neuropeptides. Ils expriment le récepteur **Ret** et ont été initialement décrit pour exprimer de manière spécifique l'Isolectin Binding 4 (**IB4**). Nous savons cependant désormais que certains de ces neurones ne lient pas cette protéine (cf paragraphe suivant).

Ils appartiennent uniquement aux fibres C et projettent au niveau des lamina II<sub>externe</sub> et lamina II<sub>interne</sub> de la corne dorsale de la moelle épinière.

#### *3.3.1 Les neurones MrgprD + : les « mécano-nocicepteurs »*

Dans l'optique d'accroître le répertoire de marqueurs des sous populations de neurones nociceptifs du DRG, une étude a comparé les ADN de souris nouveaux nées Ngn1<sup>-/-</sup>, ne possédant plus de neurones TrkA, donc de nocicepteurs, aux ADN de souris nouveaux nées WT (Dong et al., 2001). Les auteurs ont pu mettre en évidence une nouvelle famille de gènes, Mas Related Gene family (Mrg A – G), codant pour des récepteurs couplés aux protéines G.

Parmi eux, le récepteur MrgprD est exprimé dans les neurones primaires sensoriels **nociceptifs non peptidergiques**, Ret<sup>+</sup> et IB4<sup>+</sup>, exprimant notamment le récepteur purinergique P<sub>2</sub>X<sub>3</sub>. Son expression définit une nouvelle sous classe de neurones nociceptifs. Ces neurones possèdent des terminaisons libres périphériques au niveau de **l'épiderme**, plus précisément au niveau du stratum granulosum, à la fois de la peau glabre et poilue (Zylka et al., 2005). Au niveau spinal, les neurones MRGRPD+ projettent de manière monosynaptique sur tous les types connus de neurones de la **lamina II**, à l'exception notable des neurones Islet (Wang and Zylka, 2009; Zylka et al., 2005). Cette organisation anatomique, périphérique et centrale, très précise, suggère un fort degré de spécialisation des informations détectées et transmises par cette population neuronale.

Du point de vue électrophysiologique, ces neurones exhibent un potentiel d'action plus long, plus ample, avec une overshoot plus importante que les autres neurones du DRG, des caractéristiques propres aux nocicepteurs. Ce potentiel d'action particulier est rendu possible par la présence accrue à la membrane de ces neurones de canaux sodiques voltages dépendants résistants à la TTX de type Nav<sub>1.8</sub> et Nav<sub>1.9</sub>). La présence du récepteur P<sub>2</sub>X<sub>3</sub> les rend également sensibles à l'ATP, possiblement libéré par les kératinocytes au niveau de l'épiderme (Dussor et al., 2008).

D'autre part, le récepteur MrgprD, activé par la **β alanine**, est couplé aux protéines G<sub>i/o</sub> ainsi que G<sub>q</sub> (Shinohara et al., 2004). L'activation du récepteur par son ligand peut conduire à l'inhibition de courant potassique KCNQ/M, augmentant ainsi la décharge du neurone (Crozier et al., 2007). Récemment, dans un système hétérologue, il a été également démontré que l'activation de la voie G<sub>q</sub> entrainerait l'activation de canaux calciques chlorure pouvant également moduler l'excitabilité du neurone (Zhuo et al., 2014).

D'un point de vue fonctionnel, ces neurones sont considérés comme **polymodaux** : les souris MrgprD<sup>-/-</sup> ont de légers déficits (mais significatifs) dans la détection des stimuli mécaniques, chauds, froids et la perte du récepteur provoque une diminution de l'excitabilité des neurones (Rau et al., 2009). Cependant il est ici intéressant de noter que l'ablation des neurones MRGRPD+ au sein du DRG chez la souris, entraîne une diminution de **la sensibilité mécanique aigue ainsi qu'en condition inflammatoire**, mais n'a pas d'impact sur la sensibilité thermique et chimique inflammatoire (test de la formaline) (Cavanaugh et al., 2009; Shields et al., 2010). De la même manière au niveau central, l'ablation des afférences MRGRPD+ n'altère pas la réponse aux stimuli douloureux chauds, mais **diminue la décharge des neurones** superficiels de la corne dorsale de la moelle épinière en réponse à des stimulations mécaniques graduelles et également **diminue le nombre de neurones** répondant exclusivement aux stimuli mécaniques (Zhang et al., 2013). La sensibilité mécanique est donc diminuée mais pas abolie.

A l'heure actuelle, il est donc postulé d'après ces données, que « les neurones MRGRPD+ contribuent au moins à une des deux composantes de la réponse mécanique des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière ; avec d'autres neurones afférents, encore non identifiés, ils transmettent l'information douloureuse mécanique aux neurones de la couche superficielle et profonde de la moelle épinière » (Zhang et al., 2013).

Bien qu'impliqué dans la sensibilité mécanique, le récepteur MrgprD est également nécessaire dans la détection de la **sensation prurigineuse**. En effet, une injection de  $\beta$  alanine à des souris MrgprD<sup>-/-</sup> ne provoque pas de comportement de grattage, contrairement à celui observé chez des souris WT (Liu et al., 2012). Cependant, seulement 40% des neurones MRGRPD+ sont impliqués dans la réponse prurigineuse induite par la  $\beta$  alanine. De manière forte intéressante, il apparaît que ces mêmes neurones répondent aux stimuli chauds alors que les 60% de neurones restants sont eux activés par les stimuli mécaniques. Cette étude révèle l'**hétérogénéité moléculaire** de cette population de neurones MRGRPD+. Une explication serait que certains neurones MRGRPD+ coexpriment à leur surface un canal de type TRP (Lawson et al., 2008), détectant les stimuli chauds (autre que TRPV1, exclu). Une modulation de l'activité de ce(s) canal TRP par le récepteur MrgprD est également une hypothèse intéressante.

### 3.3.2 Une classe particulière de neurones non-peptidergiques : Les C-Low Threshold MechanoReceptors (C-LTMRs)

Les stimuli tactiles sont détectés au niveau de la peau grâce à des neurones sensoriels appelés mécanorecepteurs à bas seuil (**Low Threshold MechanoReceptors, LTMR**). Ces neurones peuvent être classés en 3 sous types A $\beta$ , A $\delta$  et C, selon la taille de leur corps cellulaire, le diamètre et le degré de myélinisation de leur axone, leur vitesse de conduction de l'influx nerveux.

Les **C-LTMRs** sont des neurones de petit diamètre, faiblement myélinisés. Ce sont des neurones **Ret+**, **non peptidergiques, IB4-**. Ils expriment également d'autres marqueurs moléculaires, permettant de les distinguer des autres neurones sensoriels : le transporteur vésiculaire **VGLUT3** (Seal et al., 2009), la Tyrosine Hydroxylase (**TH**, (Li et al., 2011)), ou encore la protéine **Tafa4** (Delfini et al., 2013). Ils possèdent une extrémité périphérique innervant uniquement la **peau poilue**, et plus particulièrement des structures anatomiques spécifiques : les follicules pileux de type **zigzag ou awl/auchene** appelées « **longitudinal lanceolate endings** » (Li et al., 2011). Leur axone pénètre dans la corne dorsale de la moelle épinière, au niveau de la **lamina II<sub>i</sub>**, (délimitée par la présence des interneurons **PKC $\gamma$** ) où ils connectent des interneurons **Islet**, GABAergiques (Li et al., 2011; Lu and Perl, 2003).

D'un point de vue électrophysiologique, ces neurones sont dits « à **adaptation intermédiaire** » (LTMR-IA) : pendant toute la durée de la stimulation, ils déchargent de manière modeste mais soutenue ; ils sont également capables de maintenir leur décharge après cette stimulation. Enfin, leur potentiel d'action possède les caractéristiques des nocicepteurs (court potentiel d'action avec inflexion dans la phase d'hyperpolarisation). A noter cependant que les C-LTMRs ont un seuil d'activation bien inférieur au seuil d'activation des nocicepteurs.

Ils présentent une **dualité fonctionnelle**. D'un côté, ces neurones sont activés par des stimuli mécaniques bougeant lentement de type **caresse**. On fait référence à eux en tant que neurones du toucher léger. Cependant, la majorité des fibres C sont considérés comme étant des fibres nociceptives à cause de leurs réponses aux stimuli mécaniques et thermiques douloureux. De plus, les C-LTMRs sont impliqués dans **l'hypersensibilité mécanique en condition pathologique** et **dans la douleur induite à la formaline** (Delfini et al., 2013).



# L'intégration du message nociceptif

*Nous voyons la douleur apparaître en même temps que la sensibilité,  
et grandir à mesure que celle-ci devient intelligente.*

SHOPENHAUER, Pensées et Fragments

## **1. Les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière**

### **1.1 Présentation générale : l'organisation des projections des afférences sensorielles dans la moelle épinière**

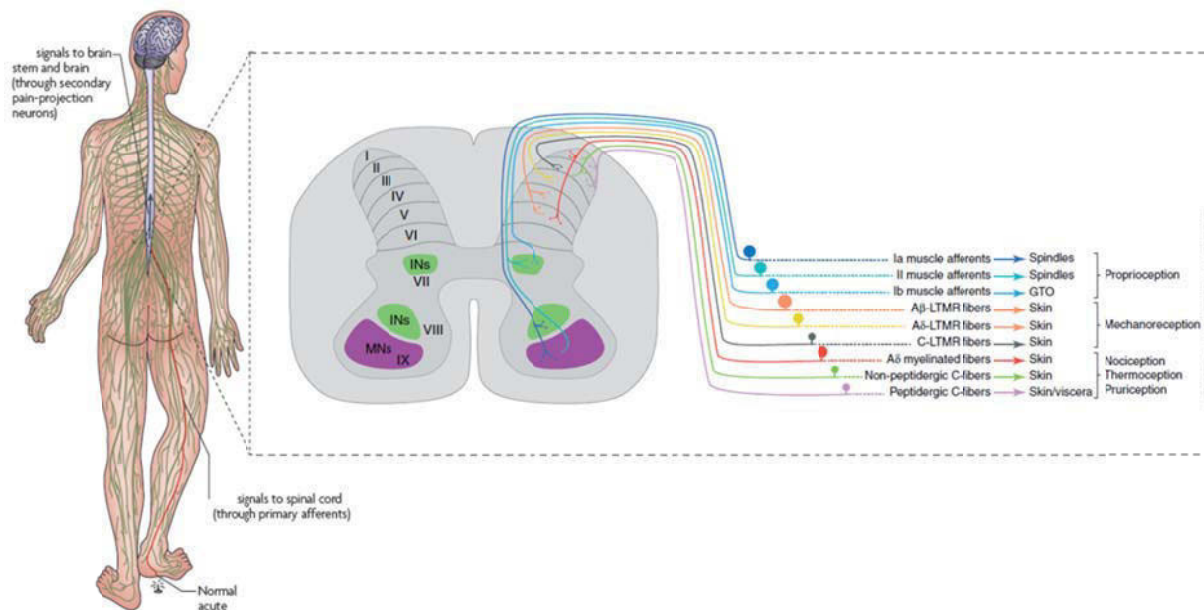
Les fibres primaires sensorielles vont aller connecter les neurones de la substance grise de la corne dorsale de la moelle épinière. La substance grise de la moelle épinière est classiquement divisée en **dix lamina**, sur la base des différences de densité et de la taille des neurones (Rexed, 1952). Le réseau de la corne dorsale s'étend de la lamina I, fine et superficielle, à la lamina VI profonde.

La **lamina I**, appelée zone marginale et comprise entre la substance blanche et la lamina II, est une couche très fine de neurones (30 à 40  $\mu\text{m}$ ). C'est la voie de sortie principale des informations intégrées par les neurones de la lamina II. Elle contient des **neurones de projection** vers diverses structures supramédullaires (cerveau, cervelet). Notons cependant que la grande majorité des neurones de cette lamina sont des neurones à terminaisons locales et que seulement 5% sont des neurones de projection vers les centres supérieurs (étude menée sur le ganglion dorsal rachidien L4, chez le rat (Spike et al., 2003)).

La **lamina II**, quant à elle, est appelée **substance gélatineuse** à cause de son apparence translucide lorsqu'elle est observée sur des tissus frais. Elle est habituellement divisée en lamina II externe (IIo) et lamina II interne (Ili).

Les lamina I, II, V et VI sont principalement impliquées dans le traitement de l'**information nociceptive** : en effet, les **fibres afférentes primaires nociceptives**, **A $\delta$**  et **C**, se terminent majoritairement dans les couches superficielles I et II de la corne dorsale de la moelle épinière.

En revanche, les **lamina III-IV** concernent principalement, bien que non exclusivement, le traitement des **informations** somato-sensorielles **non-nociceptives**. les études anatomiques ont démontré que la plupart des fibres A $\alpha$  et A $\beta$  non nociceptives envoient leurs terminaisons vers les couches III à V de la moelle épinière (D'Mello and Dickenson, 2008).



**Figure 7 :** Représentation schématique du parcours de l'information sensorielle de la périphérie vers la moelle épinière. Au niveau de la moelle épinière, les afférences primaires sensorielles projettent de manière régionalisée dans des lamina différentes.

## 1.2 Les neurones de la lamina I

Ces neurones ont un rôle crucial dans l'**intégration** et la **transmission** de l'information sensorielle. En effet, ils reçoivent des informations sensorielles provenant des **fibres à haut seuil Aδ et des fibres C**, aussi bien des **neurones peptidergiques** sécrétant de la substance P ou du CGRP (Todd et al., 2002) que des **neurones non peptidergiques** (Baseer et al., 2014; Dhaka et al., 2008). Ces neurones peuvent également être modulés par des **neurones glutamatergiques verticaux issus de la lamina II** (cf paragraphe suivant), eux même activés par des afférences primaires de type Aδ (Lu and Perl, 2005). Ils vont donc intégrer ces différents messages sensoriels et certains, appelés « neurones de projection », vont les transmettre aux « centres supérieurs » (tronc cérébral et cerveau). La lamina I est donc une voie de sortie importante des informations sensorielles. On estime que plus de 50% des projections spinales vers le thalamus proviennent de neurones de la lamina I, neurones qui reçoivent les « inputs » des nocicepteurs, des récepteurs thermiques, des afférents viscéraux ou des récepteurs prurigineux.

D'un point de vue morphologique, ces neurones présentent une certaine hétérogénéité. On distingue des neurones fusiformes, multipolaires, pyramidaux et aplanis (« flattened ») (Lima and Coimbra, 1983, 1986). Nous allons voir que des relations précises existent entre cette morphologie,

leurs propriétés électrophysiologiques (Prescott and De Koninck, 2002) et leur fonctionnalité (Craig and Kniffki, 1985; Han et al., 1998).

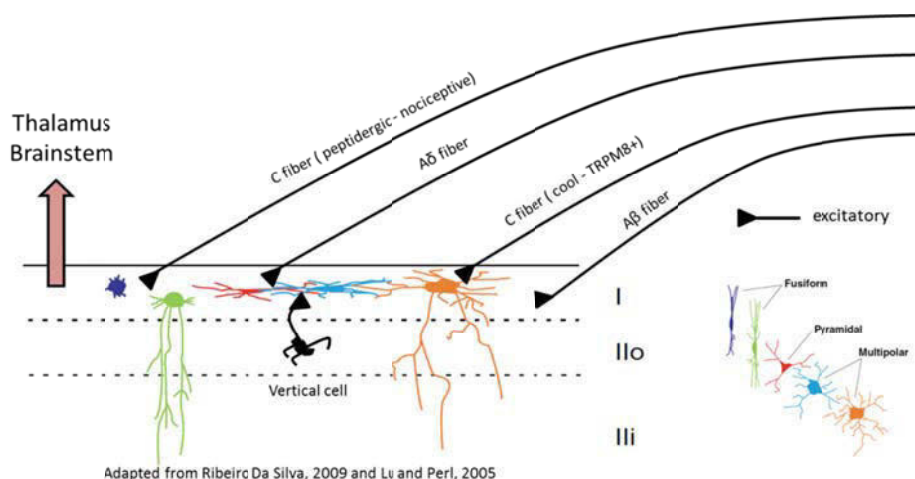
Les neurones **fusiformes** expriment le récepteur NK1 à la substance P, les récepteurs GABA, somatostatine 2A ainsi que la dynorphine, calbindine et la synthase d'oxyde nitrique. Ils répondent aux **stimuli nociceptifs** tels que le pincement et les températures chaudes nocives, en déchargeant de **manière tonique**.

Les neurones **multipolaires** expriment les mêmes récepteurs mais répondent à des stimulations **nociceptives** polymodales avec un **délai suivi d'une décharge unique**.

Ces deux types neuronaux sont les seuls de la lamina I décrits comme répondant à des stimuli douloureux et exprimant le récepteur NK1. Ils reçoivent des afférences nociceptives peptidergiques, libérant donc de la substance P, se fixant sur leur récepteur NK1. Sachant que les données actuelles chez le rat démontrent qu'environ 60 à 80% des neurones de la lamina I expriment le récepteur NK1 (Marshall et al., 1996; Yu et al., 2005; Yu et al., 1999), il est probable qu'il s'agisse de ces deux types neuronaux. Il semble donc que les neurones de la lamina I répondant aux stimuli nociceptifs expriment le récepteur NK1.

Cependant, certains neurones NK1 positifs de la lamina I sont également modulés par des connexions polysynaptiques provenant de fibres afférences A $\beta$  (Torsney and MacDermott, 2006). En effet, il est aujourd'hui bien établi que les fibres A $\beta$  projetant dans la lamina III sont soumises en condition physiologique à un fort contrôle inhibiteur provenant de différents interneurons, et de ce fait l'information tactile ne « remonte » pas vers les neurones nociceptifs de projection de la lamina I, les neurones NK1+. Cependant, en condition pathologique, la levée de l'inhibition sur les afférences A $\beta$  permet à l'information tactile d'être transmise aux neurones NK1+ et elle est alors considérée comme nocive : ce circuit anatomique constitue la base des phénomènes d'allodynie mécanique, dans lequel un stimulus mécanique non douloureux en condition physiologique peut être perçu comme douloureux. Je reviendrai sur cette notion d'allodynie mécanique plus en détail dans ma partie 1.4.

Les neurones **pyramidaux** expriment la calbindine et la synthase d'oxyde nitrique mais seulement 6% d'entre eux, possèdent le récepteur NK1. Ils répondent aux stimulations froides **non nocives par une décharge phasique**. Or il a été décrit que des afférences non peptidergiques TRPM8 positives projettent vers la lamina I (Dhaka et al., 2008). On peut donc suggérer que les neurones primaires sensoriels détectant le froid non nocif connectent ses neurones pyramidaux.



**Figure 8 :** Anatomie et connectique de la lamina I de la corne dorsale de la moelle épinière

Les neurones de la lamina I projettent majoritairement vers deux grandes régions cérébrales : le tronc cérébral et le thalamus. Nous détaillerons cet aspect dans la partie suivante.

### 1.3 Les neurones de la lamina II

#### 1.3.1 Les sous populations morphologiques

Contrairement aux neurones de la lamina I, les neurones de la lamina II sont exclusivement des interneurones, aux connexions restreintes à la corne dorsale de la moelle épinière. Ils reçoivent des afférences provenant des **fibres A et des fibres C**.

Actuellement, on distingue 5 sous catégories de neurones en regard de la taille de leur corps cellulaire, de l'orientation et de l'arborisation de leurs dendrites au sein de la lamina (Grudt and Perl, 2002).

- Les **neurones « radiaux »** (radial cells) sont excitateurs
- Les **neurones médiaux/latéraux** sont pour leur part peu décrits.
- Les **neurones « islet »** sont des **cellules inhibitrices** exprimant invariablement le **GABA** (et/ou la glycine et/ou la parvalbumine (Todd and Sullivan, 1990)). Il a été suggéré qu'ils sont connectés à des fibres C nociceptives lorsqu'ils sont localisés dans la lamina II interne et à des fibres C non nociceptives dans la lamina II externe (Bennett et al., 1980; Gobel et al., 1980; Lu and Perl, 2003; Zheng et al., 2010). Ces neurones ont un faible potentiel de repos, des courants de type  $I_A$ , présentent des dépolarisations excitatrices postsynaptiques spontanées (sEPSCs) ainsi que des inhibitions (IPSCs). Ces propriétés électrophysiologiques spécifiques n'ont pas encore été reliées à une fonctionnalité précise.

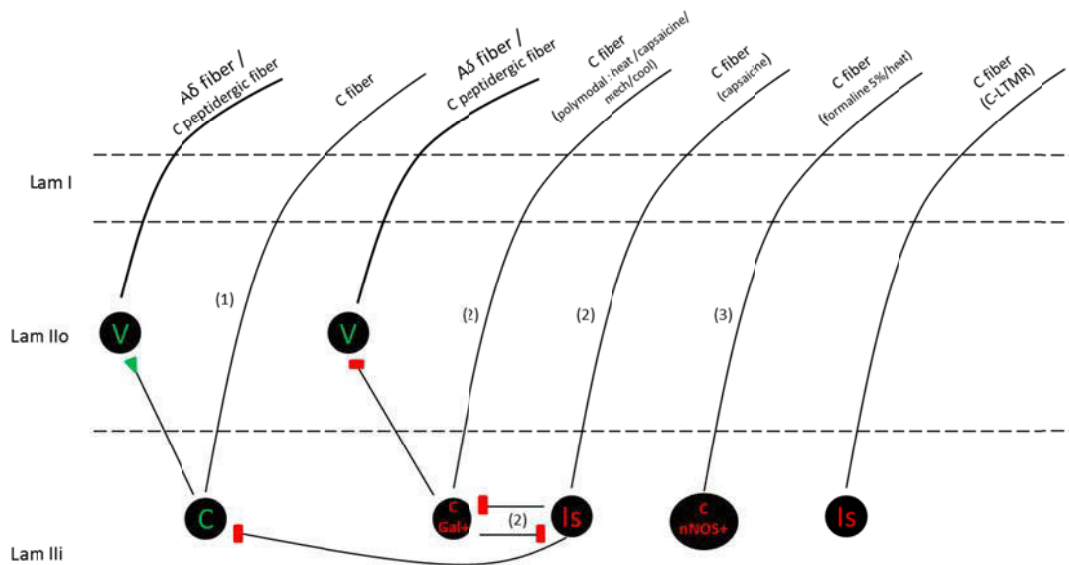
- Les **neurones « centraux »** (central cells – small islet) sont une catégorie hétérogène regroupant des interneurons excitateurs et inhibiteurs. Ils sont localisés dans la lamina II interne et reçoivent des afférences de fibres C. On distingue 3 groupes de neurones centraux selon le type de courant  $I_A$  qu'ils possèdent : tonique,  $I_A$  transitoire, transitoire sans  $I_A$ .

Une sous population de neurones centraux a été caractérisée chez la souris. Il s'agit des neurones PrP-GFP, des **neurones centraux GABAergiques** exprimant le récepteur à la somatostatine  $sst_{2A}$  (Hantman et al., 2004). Cette sous population peut être encore divisée en 2 sous populations selon qu'ils expriment le nNOS et/ou la galanine (Iwagaki et al., 2013). Ils reçoivent des afférences nociceptives de type C, notamment des fibres TRPV1+, ainsi que des afférences de type C, TRPM8+ (Zheng et al., 2010). Enfin, ils exercent une inhibition réciproque sur les neurones islet de la lamina III (Zheng et al., 2010).

Les **neurones centraux glutamatergiques** connectent, eux des cellules verticales (Lu and Perl, 2005).

- Les **neurones « verticaux »** peuvent également être excitateurs ou inhibiteurs (Maxwell et al., 2007; Yasaka et al., 2010). Il est néanmoins possible de différencier ces deux sous populations par rapport à leurs propriétés électrophysiologiques : les neurones excitateurs ont un potentiel d'action retardé alors que les neurones inhibiteurs déchargent de manière tonique. Ces neurones reçoivent des **afférences nociceptives A $\delta$  et C** (neurones MrgD+ (Wang and Zylka, 2009), neurones TRPV1+ et neurones TRPA1+ (Uta et al., 2010)) ainsi que des afférences mécaniques à bas seuil **A $\delta$ -LTM**, et possiblement **A $\beta$ -LTM**, grâce à leur large champ dendritique s'étendant jusque dans la lamina III (Yasaka et al., 2014). En plus de ces afférences primaires, il a été démontré que les cellules centrales excitatrices (Lu and Perl, 2005), et des cellules centrales inhibitrices (PrP-GFP (Zheng et al., 2010)) connectent de manière présynaptique ces neurones verticaux. De manière intéressante, il apparaît que les neurones verticaux peuvent libérer de la somatostatine (Yasaka et al., 2010) pouvant agir sur les interneurons inhibiteurs environnants, notamment les cellules centrales exprimant le récepteur  $sst_{2A}$  (Polgar et al., 2013). Le relargage de **somatostatine** par les cellules verticales pourrait donc leur permettre de supprimer l'action inhibitrice de cette classe d'interneurones.

Enfin, ils représentent une population très importante et stratégique ; en effet, ils sont les seuls à avoir été décrits comme pouvant connecter de manière directe des neurones de projection de la lamina I (Lu and Perl, 2005). Dans la théorie du portillon, ces neurones sont supposés être ceux transmettant l'influx nociceptif, via les neurones de la lamina I, vers les structures supra-médullaires (Melzack and Wall, 1965).



**Figure 9 :** Représentation schématique de la connectique entre les neurones centraux, islet et verticaux dans les lamina superficielles de la moelle épinière.

(1) Mise en évidence d’une connexion directe entre les neurones centraux glutamatergiques (C) recevant des entrées sensorielles de fibres C nociceptives, vers les neurones verticaux (V) recevant des entrées sensorielles des fibres A $\delta$  et C (Lu and Perl, 2005).

(2) Circuiterie reliant des afférences sensorielles nociceptives polymodales de type C sur des neurones centraux inhibiteurs Galanine+ (C Gal+) et Islet (Is). Les afférences non nociceptives sur (C) vont inhiber (V) et (Is) bloquant l’influx nociceptif (Hantman et al., 2004) ; (Lu and Perl, 2003) ; (Zheng et al., 2010) ; (Polgar et al., 2013).

(3) Afférences sensorielles nociceptives de type C sur les neurones centraux inhibiteurs nNOS+ (C nNOS+) (Hantman et al., 2004) ; (Lu and Perl, 2003) ; (Polgar et al., 2013).

### 1.3.2 Apport de la neurochimie pour une classification moléculaire

Différentes études ont récemment permis de compléter cette circuiterie, et la classification de ces neurones s’est complexifiée notamment suite à l’identification des marqueurs exprimés par ces derniers. Je vais en détailler ici certains qui me permettront de compléter et de définir un modèle anatomique d’intégration spinale des informations sensorielles.

Tout d’abord, les interneurons inhibiteurs de la corne dorsale de la moelle épinière représentent de manière générale, une population neuronale hétérogène en regard des molécules qu’ils peuvent exprimer : le neuropeptide Y, **NPY**, la **galanine**, la synthase d’oxyde nitrique **nNOS** et la parvalbumine

**PV** (Hantman et al., 2004; Iwagaki et al., 2013; Polgar et al., 2013; Yasaka et al., 2010). Chez le rat, les **neurones nNOS+** semblent être activés suite à l'injection de **formaline** (5%) et suite à des stimulations chaudes nocives mais ne répondent pas à la capsaïcine (agoniste TRPV1). Les **neurones galanine+** répondent eux à **tous types de stimuli douloureux** (mécanique, thermique) ainsi qu'à la **capsaïcine** (Polgar et al., 2013). Cependant, cette dernière étude ayant été menée chez le rat où l'expression du canal TRPV1 est plus vaste que chez la souris, le lien fonctionnel entre ces études est donc à nuancer. Le rôle spécifique de ces sous populations n'a pas encore été formellement établi d'une part car les études ont été menées chez le rat ou chez la souris et que les différences d'expression entre ces deux espèces compliquent l'interprétation des données et qu'aucune étude visant spécifiquement ces sous populations (ablation, KO conditionnels) n'a jusqu'à ce jour été effectuée.

L'isoforme gamma de la protéine kinase C (PKC $\gamma$ ) est, par exemple, exprimé dans une sous population de neurones de la lamina Iii (Malmberg et al., 1997). **Ces neurones PKC $\gamma$**  reçoivent des stimuli non douloureux provenant de fibres myélinisées (Neumann et al., 2008), notamment des fibres A $\beta$ . Cette connexion A $\beta$ -PKC $\gamma$  peut être directe ou passer par des neurones glycinergiques inhibiteurs (Lu et al., 2013). Les **interneurones glycinergiques**, localisés préférentiellement dans les lamina II<sub>interne</sub> et III (Todd and Spike, 1993) ont un rôle crucial dans la transmission des afférences sensorielles mécaniques, thermiques et prurigineuses (Foster et al., 2015).

Récemment, une étude a caractérisé, grâce à un modèle génétique les neurones exprimant la somatostatine, (SOM+) et la dynorphine (DYN+). **Les neurones SOM+** peuvent être des neurones verticaux (lamina Ilo), centraux (lamina Ilo), et radiaux (lamina Ili), très majoritairement excitateurs (94%). Ils sont connectés à des neurones mécanorécepteurs à bas seuil A $\beta$  LTMR. **Les neurones DYN+** sont quant à eux, inhibiteurs, localisés majoritairement dans les lamina I et II. Ces neurones auraient un rôle clé dans l'intégration des stimuli mécaniques nocifs, et notamment lors des mécanismes d'allodynie mécanique (Duan et al., 2014).

Les **interneurones ROR $\alpha$** , localisés dans la lamina Ili et III sont hétérogènes d'un point de vue morphologique (cellules verticales, centrales, et radiales) et moléculaire (excitateur, très majoritairement, et inhibiteur). Ils sont innervés par de multiples sous types de mécanorécepteurs à bas seuil mais il apparait que, dans la plupart des cas, un type d'interneurone soit connecté par un type de LTM (exception de certains intégrant des informations sensorielles provenant des A-LTM et C-LTM). Les interneurones ROR+/PKC $\gamma$ + de la lamina Ili sont innervés par des fibres A $\delta$ , les interneurones ROR+/mafA+/c-Maf+ de la lamina III sont activés par des fibres A $\beta$ . Les interneurones ROR transmettent les stimuli mécaniques non douloureux provenant de la peau glabre et de la peau poilue. Cependant il est plus que probable que d'autres interneurones contribuent à la transmission des sensations mécaniques « délicates » émanant de la peau poilue car les interneurones ROR ne

sont pas directement connectés au C-LTMRs. La sensation mécanique « délicate » (« light touch ») est intégrée par les neurones ROR dans les laminae II et III tandis que les douleurs mécaniques sont, elles, traitées par les neurones SOM+ de la lamina II (Bourane et al., 2015)

#### **1.4 Ebauche de connectique : exemple de la transmission de l'information mécanique**

La mécanosensation est une des modalités sensorielle la plus étudiée et la plus décrite. Notre étude est basée sur la caractérisation d'une population de neurones englobant deux sous populations de neurones primaires sensoriels ayant été décrit notamment pour leur implication dans la mécanosensation : les neurones MRGRPD+ étant des nocicepteurs mécaniques et les C-LTMRs transmettant eux le toucher délicat. J'ai donc décidé de proposer une ébauche de la connectique spinale, conjuguant les données concernant les afférences périphériques et les données sur l'organisation de la corne dorsale de la moelle épinière que je viens de décrire. Ce schéma sera la base pour l'interprétation de nos résultats.

Lors d'une stimulation mécanique, les mécanorécepteurs à bas seuil, **A $\beta$  et A $\delta$  –LTMR**, sont activés (voie 1). Ces neurones vont connecter une cellule centrale excitatrice, exprimant la PKC $\gamma$  et la somatostatine (PKC $\gamma$  /SOM+). L'information sensorielle sera alors transmise à un neurone central excitateur (C) puis à une cellule verticale (V) connectant un neurone de projection dans la lamina I. Cette voie anatomique est sous le contrôle de voies inhibitrices afin qu'une stimulation mécanique non douloureuse ne soit pas perçue comme nocive. Des interneurons inhibiteurs glycinergiques (Gly+) peuvent ainsi inhiber les neurones (PKC $\gamma$  /SOM+) et les neurones Islet (Is) (voie 4) peuvent également agir à ce niveau (Bourane et al., 2015; Duan et al., 2014; Foster et al., 2015; Hughes et al., 2012; Torsney and MacDermott, 2006).

D'autre part, les neurones **A $\beta$  et A $\delta$  –LTMR** peuvent également directement activer des cellules verticales glutamatergiques (voie 2) exprimant la somatostatine (V SOM+) qui possèdent une ramification dendritique s'étendant jusque dans la lamina III (Yasaka et al., 2014). Cette voie anatomique est elle aussi sous un contrôle inhibiteur effectué par un interneurone vertical inhibiteur exprimant la dynorphine (V Dyn+) (Duan et al., 2014).

Ces 2 voies anatomiques sont décrites pour constituer la base de la mécano transduction. Le rôle des populations neuronales spinales y est crucial. L'ablation des neurones SOM+, DYN+ ou des interneurons glycinergiques provoque les phénomènes d'allodynie et d'hyperalgésie mécanique (Duan et al., 2014). Ces phénomènes sont généralement observés lors des douleurs neuropathiques



et inflammatoires et par conséquent, le challenge des études à venir sera de comprendre comment ces populations de neurones sont affectées dans ces pathologies pour produire une allodynie et/ou une hyperalgésie.

Néanmoins, d'autres voies anatomiques transmettent les informations sensorielles mécaniques. Des neurones mécanorécepteurs de type **C** (neurones MRGPRD+ et C-LTMRs, notamment) peuvent être activés. Les neurones MRGPRD+ projettent sur tous les types de neurones de la lamina Iii (plutôt dorsalement), à l'exclusion notable des neurones Islet (Wang and Zylka, 2009). Bien qu'il soit encore difficile de relier un type morphologique de neurones de la lamina II à une neurochimie précise (glutamatergique ou GABAergique), il est fort probable que les afférences MRGPRD+ connectent majoritairement des cellules excitatrices. En effet, l'ablation des neurones MRGPRD+ diminue la décharge des neurones superficiels de la corne dorsale de la moelle épinière en réponse à des stimulations mécaniques graduelles et diminue également le nombre de neurones répondant exclusivement aux stimuli mécaniques (Zhang et al., 2013). Ces phénomènes entraîne une hyposensibilité mécanique chez les animaux ablatés (Cavanaugh et al., 2009).

Les C-LTMRs projettent quant à eux sur des interneurones Islet, connectés à des interneurones centraux inhibiteurs, eux même reliés à une cellule verticale excitatrice (Zheng et al., 2010). D'autre part, ces mêmes interneurones Islet peuvent également connecter une cellule centrale excitatrice. Ils semblent donc qu'ils puissent moduler la transmission des informations sensorielles au niveau de la moelle épinière. Je détaillerai plus en détail cette notion de « C-LTMR modulateurs » par ailleurs.

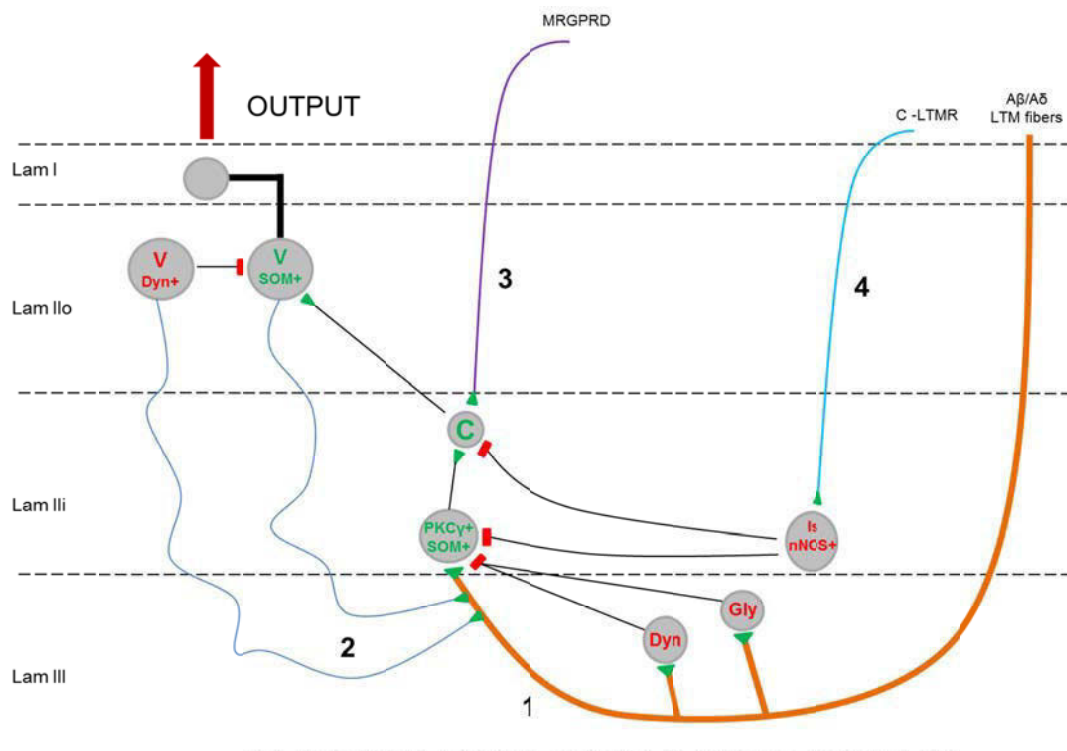


Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation anatomique des afférences primaires sensorielles et des interneurons spinaux permettant la détection des stimuli mécaniques.

La connaissance de ces voies anatomiques a été notamment permise par l'étude de l'hétérogénéité des afférences primaires sensorielles et il reste important de continuer d'accroître nos connaissances sur ces neurones, comment et quelles modalités sensorielles ils détectent, ainsi que leur cible spinale pour parfaire notre vision intégrée de la transmission des informations sensorielles.

En conclusion, le message mécanique peut donc atteindre la moelle épinière via différentes voies. Différents freins sont présents à chaque niveau de l'intégration du message nerveux notamment grâce à différentes populations d'interneurones inhibiteurs. Nous étudierons leur implication dans la partie DISCUSSION de cette étude, après avoir pu les mettre en relation avec nos données expérimentales.

## **2. Les voies de sorties de la moelle épinière**

Une fois l'intégration faite au niveau de la moelle épinière, l'information sensorielle est transmise vers le cerveau grâce aux neurones de projection localisés notamment dans la lamina I.

Les neurones de projections des lamina I ou des lamina profondes (lamina V) traversent la ligne médiane et cheminent rostralement dans la matière blanche controlatérale (certains projettent bilatéralement (Spike et al., 2003) pour terminer principalement dans le tronc cérébral et les noyaux thalamiques.

Je vais à présent décrire succinctement les 3 voies anatomiques principalement décrites comme voies majeures de sortie de la moelle épinière.

### **2.1 Le tractus spino-réticulo-thalamique**

Les neurones de projection originaires des lamina profondes VI et VII projettent en grand nombre vers la **formation réticulée**. Cette région anatomique est située sur toute la longueur du tronc cérébral entre les grands faisceaux ascendants et descendants. Elle occupe les espaces laissés libres par les formations spécifiques (pédoncules cérébraux, protubérance annulaire ou pont, bulbe rachidien). Les neurones ascendants vont donc connecter 3 zones du **noyau caudal réticulaire** (le noyau réticulaire latéral (LRN), le subnucleus reticularis dorsalis (SRD), le noyau réticulaire giganto-paragiganto-cellulaire (NGc)) ainsi que vers le sous noyau interne latéral **parabrachial** (PBil).

Ce circuit termine dans les zones médianes du thalamus qui sont anatomiquement liées au compartiment striato-cortico-préfrontal. C'est pourquoi ce système pourrait être engagé dans les **réponses motrices** faisant suite à un stimulus douloureux.

## **2.2 Le tractus spino-thalamique**

Le tractus spinothalamique est composé de 3 types de neurones de projection. Un premier groupe de neurones provient de la lamina I et répond aux stimulations nociceptives ; un deuxième groupe provient des lamina IV et VI et répond aux stimuli non nocifs et nocifs ; un dernier groupe dont les corps cellulaires sont localisés dans les lamina VII et X et qui répondent à une grande variété de stimuli cutanés.

Ces neurones projettent vers différentes zones du thalamus : les neurones de la lamina I et VI projettent vers le thalamus latéral (ventral postero-latéral thalamus, **VPL**) alors que ceux provenant des lamina plus profondes projettent vers le thalamus médial (ventral postero-médial thalamus, **VPM**). Cette organisation anatomique laisse à supposer que les neurones de projections issus des lamina profondes auraient un rôle dans l'aspect aversif de la douleur, tandis que ceux issus de la lamina I seraient impliqués dans les aspects « plus sensoriels » de la douleur (Hodge and Apkarian, 1990)

## **2.3 Le tractus spino-mésencéphalique ou voie spino-brachiale**

Une forte proportion des neurones de projection de la lamina I connecte **l'aire parabrachiale** (latérale ou médiale, LPb ou MPb (Almarestani et al., 2007; Bernard et al., 1995)). Les neurones de la Pb répondent à la stimulation de fibres A $\delta$  et C, thermiques et mécaniques, et une sous population d'entre eux répondent au refroidissement (Menendez et al., 1996).

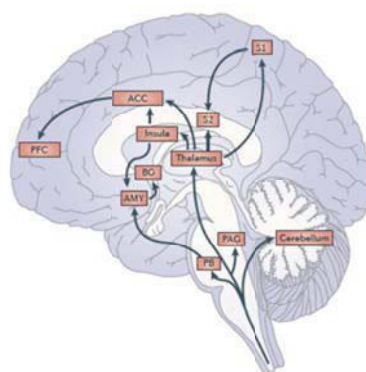
Les neurones « nociceptifs » de la Pb projettent vers **médulla rostro-ventro-latérale (RVLM)**, la **substance grise périaqueducule (PAG)**, ainsi que **l'amygdale** et **l'hypothalamus** (Bernard and Besson, 1990; Bernard et al., 1995). Étant donné que certains noyaux de l'hypothalamus et le PAG sont des zones cérébrales décrites pour être des centres des comportements d'agression, cette voie anatomique pourrait donc jouer un rôle important dans les **comportements de défense, d'agression ou de fuite**. Le relai vers l'amygdale contribuerait, lui, à la **composante aversive de la douleur**. Enfin, les projections nociceptives de la Pb, et celles directes, moins nombreuses provenant du tractus spino thalamique, vers la VLM, seraient importantes pour initier **les changements cardio-vasculaires** qui ont lieu après un stimulus nocif (Gauriau and Bernard, 2002).

Il est cependant important de noter que les données de la littérature ne s'entendent pas sur les proportions de neurones, notamment de la lamina I, projetant vers ces différentes aires (Spike et al., 2003). Les différences observées entre les études proviennent de 3 facteurs. Premièrement, l'utilisation d'espèces d'animaux différentes (hamster, rat, chat, singe) pour effectuer ces traçages neuroanatomiques ; deuxièmement, les neurones de projections peuvent connecter plusieurs régions successivement (Al-Khater et al., 2008) ; troisièmement, les neurones de projections peuvent projeter de manière bilatérale, de ce fait, lors d'injection de traceurs antérogrades, un neurone thalamique peut ne pas être marqué uniquement car le traceur a été capté par l'autre collatérale.

### **3. L'intégration centrale du message nociceptif**

L'intégration corticale de la douleur est un processus important de l'expérience douloureuse. En effet, un stimulus peut être douloureux en soit car il active des fibres primaires sensorielles nociceptives, mais les réponses comportementales de l'individu peuvent être multiples : fuite, « freezing », vocalisation... Ces réponses sont le résultat de l'addition de plusieurs facteurs, émotionnels (dépression, stress...), attentionnels et subjectifs (expérience).

Pour que cette intégration soit possible, de nombreuses zones cérébrales sont activées lors de stimulations douloureuses. Le **thalamus** reçoit de très nombreux inputs périphériques, et va relayer l'information sensorielle vers différentes régions : le cortex **somato-sensoriel S1 et S2** va coder la localisation et la durée du stimulus (Kenshalo and Isensee, 1983). Les projections vont également activer le **système de récompense/limbique** : noyau accumbens, aire ventrale tegmentale, insula, cortex cingulaire antérieur, cortex orbitofrontal et cortex préfrontal. Ce circuit anatomique est notamment responsable du traitement des aspects motivationnels et émotionnels de la douleur (Bushnell et al., 2013; Navratilova and Porreca, 2014).



**Figure 11** : Représentation schématique de la transmission de l'information sensorielle douloureuse dans les différentes zones du cerveau. Les afférences provenant de la moelle épinière vont traverser

le tronc cérébral (PB : aire parabrachiale ; PAG : substance grise périaqueducale) et vont ensuite projeter vers différentes aires cérébrales (AMY : amygdale ; BG : ganglion de la base ; S2 et S1 : cortex somato-sensoriel 1 et 2 ; ACC : cortex cingulaire antérieur ; PFC : cortex pré-frontal) (Bushnell et al., 2013)

Au niveau « cérébral », il n'y aurait pas de « labelled » line, et pas de lien direct entre l'input périphérique nociceptif et la représentation corticale de cette information sensorielle.

#### **4. Contrôles descendants**

Une fois l'information traitée au niveau central, un contrôle régulateur va aller moduler l'activité des neurones de la moelle épinière. En effet, depuis l'apparition de la théorie du portillon émise par Melzack et Wall en 1965, il est considéré que toutes les informations sensorielles arrivant dans la moelle épinière ne sont pas transmises vers les centres supérieurs, et que ces centres supérieurs peuvent également influencer sur la moelle épinière. Ce contrôle descendant repose sur une incroyable diversité des circuits anatomiques, des neurones, et des mécanismes pouvant filtrer et moduler la transmission nociceptive au niveau de la moelle épinière.

Il existe plusieurs voies anatomiques effectuant de contrôle descendant du cerveau vers la moelle épinière. La voie la plus étudiée est la voie **PAG-RVM**. La PAG est fortement connectée à l'hypothalamus et aux structures cérébrales limbiques et elle projette vers la RVM, carrefour des influx nociceptifs descendants (Gebahrt, 2004). Cette voie anatomique peut être **noradrénergique, ou sérotoninergique**. Une autre voie descendante est constituée des cellules **noradrénergiques du raphé, locus coeruleus** (groupe cellulaires A5-A6-A7) (Pertovaara, 2006), et enfin des neurones issus du noyau réticulaire dorsal et de la medulla ventro latérale (Tavares and Lima, 2002; Tavares et al., 1997).

Ce contrôle descendant est complexifiée par le fait qu'un même circuit anatomique descendant peut **faciliter** ou **inhiber** le passage d'information sensorielle. Les neurones des voies descendantes peuvent libérer différents types de neurotransmetteurs, un même neurotransmetteur pouvant activer différents sous types de récepteurs, ayant des effets différents sur le neurone cible (exemple : la 5HT et ses nombreux récepteurs). Je détaillerai un peu plus le rôle de ces contrôles descendants dans les phénomènes de douleurs neuropathiques (partie 2).

## Conclusion de la première partie

Grâce à cette première partie de l'introduction, nous venons de parcourir le cheminement anatomique de l'information sensorielle douloureuse ; à chaque niveau, le message peut être modulé.

En périphérie, les neurones ont une certaine spécialisation, qui leur est rendue possible grâce aux canaux et aux marqueurs spécifiques qui vont leur permettre de détecter des stimuli précis. Cet aspect est en direct accord avec la vision « labelled lines ». Cependant, au niveau spinal, nous avons pu observer, notamment avec l'exemple de la mécano-sensation, que l'information sensorielle va être traitée par différents types de neurones, via différentes voies anatomiques. Nous ignorons encore grandement comment la spécificité de la modalité sensorielle est intégrée et traitée. Il est important de rappeler que la théorie du portillon est contre cette vision de spécialisation des afférences primaires sensorielles ; elle propose que la sensation douloureuse est le résultat de la **somme** de diverses afférences primaires sensorielles mais également qu'elle est bien sujette à une modulation par les contrôles descendants au niveau spinal. Les deux concepts ne sont pas nécessairement à opposer : il ne fait plus de doute que les neurones primaires sensoriels possèdent une spécialisation fonctionnel (même si beaucoup sont polymodaux) mais c'est l'interconnection de ces afférences au niveau de la moelle épinière qui construit la sensation : c'est le codage de la somato sensation par les neurones primaires sensoriels (« population coding of somatic sensation »). Cette notion développée aujourd'hui ne prend néanmoins pas encore assez en compte le rôle des voies descendantes ainsi que l'intégration « cérébrale » de la douleur.

**Partie 2 :**

**Paradigmes expérimentaux**

# Introduction générale

« Toute douleur qui n'aide personne est absurde. »

André MALRAUX (La Condition humaine ).

La douleur est un mécanisme protecteur pour l'organisme, qui tend à nous éviter des dommages corporels. L'expérience de la douleur nous pousse à éviter les comportements mettant en danger notre intégrité physique, voire mentale. Cette définition comprend la notion de **douleur physiologique aigue** qui survient lorsque notre corps est en contact avec un stimulus nocif et qui va activer un réflexe de retrait (exemple: la douleur qui nous fait enlever notre main du feu pour éviter une brûlure).

Cependant, lorsque la lésion n'a pas pu être évitée, la douleur va être amplifiée afin de protéger la partie lésée de tout autre trauma. Il se met alors en place différents mécanismes conduisant à la perception de stimuli jusque-là non nocifs comme nocifs (phénomène d'allodynie) ou de stimuli précédemment perçus comme nocif en stimuli extrêmement douloureux (phénomène d'hyperalgésie).

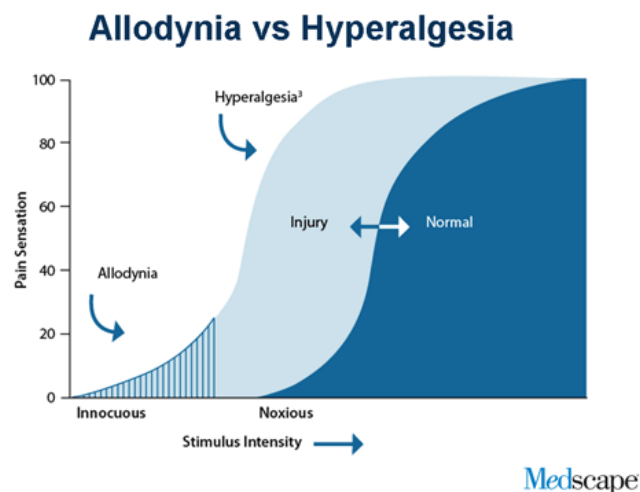


Figure 12 : Courbe représentative des réponses non nocives ou nocives en condition normale (bleue foncée), cette courbe se déplace vers la gauche en condition pathologique (bleue claire). L'intensité du stimulus nécessaire pour provoquer une réponse douloureuse est diminuée. Ces mécanismes vont permettre de protéger le site de lésion par exemple, et permettre une guérison plus rapide.

Les lésions peuvent être de **nature** différente et provoquent différents types de douleurs :

- La douleur dite par « excès de nociception » : elles résultent de **lésions des tissus périphériques**, qui provoquent une stimulation excessive des neurones primaires sensoriels. Ces douleurs sont continues ou intermittentes et varient en intensité. Les lésions tissulaires



peuvent être de type mécanique, chimique, thermique. Elles sont souvent accompagnées de phénomènes **inflammatoires** locaux qui visent à protéger la partie lésée.

- La douleur neuropathique ou neurogène: elle est causée par **une lésion** d'une partie du **système nerveux** périphérique ou central. Elle peut également s'accompagner de phénomènes **inflammatoires**.
- Les douleurs psychogènes : ce sont toutes les douleurs qui ne rentrent pas dans ses catégories. L'examen clinique de ces patients ne permet pas de trouver une origine somatique à ces douleurs que l'on attribue de fait à une origine psychologique. Ces douleurs ne sont cependant pas à minimiser car elles sont extrêmement invalidantes pour les personnes en souffrant.

Ces différents types de douleur sont étudiés via différents tests comportementaux qui vont nous permettre de mieux appréhender les mécanismes de mise en place de ces douleurs.

Dans mon étude, nous avons voulu savoir si la population de neurones GINIP+ joue un rôle dans le développement ou la maintenance de ces douleurs. Nous avons donc soumis nos animaux à une batterie de tests comportementaux. Je vais donc à présent vous présenter deux paradigmes expérimentaux qui nous ont particulièrement intéressés : le test de douleur induite par **l'injection de formaline** et un **modèle chronique de lésion neuropathique**, le modèle de constriction du nerf sciatique (CCI).

# Test de douleur induite par l'injection de formaline

## 1. Principe

Dans les années 1970-1980, les études sur la douleur se concentraient sur la recherche de nouvelles molécules analgésiques et/ou anesthésiantes. Cependant les modèles animaux supportant ces travaux étaient peu fiables car contraignants pour les animaux, et sans réponse comportementale facilement appréhendable. Le test à la formaline a alors été mis au point afin de palier à ses problèmes, en 1977 chez le rat et le chat (Dubuisson and Dennis, 1977) et en 1985 chez la souris (Hunskar and Hole, 1987).

Ce test consiste en l'injection sous cutanée dans la patte arrière de l'animal d'une solution de formaline de 1 à 5% (la formaline est préparée à partir de formaldéhyde à 37% d'où son nom). Le composé injecté va produire une inflammation locale, et de manière très intéressante, il va générer un comportement de douleur spontanée visible et mesurable chez l'animal (ce qui n'est pas le cas lors de l'injection d'autres composés pro-inflammatoires tel que la carragénine). Cela permet à l'expérimentateur d'appréhender directement le comportement de l'animal en douleur. Cette douleur se manifeste par deux phases d'activité, entrecoupées d'une période d'inactivité appelée interphase, durant lesquelles il va se lécher et agiter la patte ayant subi l'injection de formaline. La première phase s'étend de 0 à 5min et la deuxième de 10 à 60min.

Il est généralement admis que la première phase de douleur est due à l'activation des fibres primaires sensorielles; la deuxième phase de douleur est liée à la sensibilisation centrale des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière suite à l'inflammation périphérique.

Nous apporterons cependant de nouveaux éléments de compréhension et des nuances à cette vision dans cette partie.

Cependant, il est important de souligner que ce test représentait à l'époque une grande avancée pour plusieurs raisons. Premièrement, l'injection de formaline est facile à réaliser et donc facilement reproductible par les expérimentateurs. Deuxièmement, il s'agit d'un test comportemental où l'animal est libre de ses mouvements et ne ressent donc pas de stress ou d'anxiété lié à la prostration, paramètre pouvant influencer sa réponse comportementale à la douleur. Troisièmement, les deux phases de réponses nociceptives induites par la formaline peuvent être modulées par l'utilisation de différents types d'analgésiques (morphiniques, opioïdes, antagonistes de canaux...) ce qui a permis de mieux connaître leurs sites d'action (périphériques ou centraux selon qu'ils agissent sur la première ou la deuxième phase de douleur).

Actuellement, ce test est encore beaucoup utilisé dans des paradigmes de douleur aiguë et tonique, parfois d'hyperalgésie, et sert à appréhender les mécanismes de sensibilisation des neurones de la moelle épinière suite à une inflammation périphérique.

Néanmoins, les acteurs moléculaires et cellulaires de cette réponse ne sont pas encore clairement établis. **Identifier quelles populations cellulaires, quels réseaux neuronaux** et quelles molécules entrent en jeu dans ce phénomène comportemental est un enjeu majeur dans la recherche actuelle. C'est le but de cette partie qui nous permettra de mettre nos résultats en perspective.

Je présenterai tout d'abord les populations cellulaires périphériques puis centrales décrites comme impliquées dans la réponse à la formaline afin que nous ayons un aperçu du circuit anatomique mis en jeu. Ceci nous permettra de comprendre en quoi l'ablation d'une population de neurones (comme c'est le cas dans notre étude), causant une perturbation du circuit peut impacter sur ce comportement. Je présenterai ensuite les différents mécanismes moléculaires mis en jeu dans ce comportement qui apporteront des éléments pour discuter les résultats de notre étude. Je conclurai par une synthèse qui nous servira de base autour de laquelle nous pourrions articuler nos résultats.

## **2. Mécanismes et acteurs cellulaires**

**Lors de la phase I**, différentes études ont décrit l'activation des fibres A $\beta$  mécano-sensibles **A $\beta$ -LTM** (de type rapidly adapting et slowly adapting ; cf partie I), des fibres A $\delta$  à bas seuil mécano-sensibles **A $\delta$ -LTM**, des fibres A $\delta$  à haut seuil (nociceptives) mécano-sensibles **A $\delta$ -HTM** (de type slowly adapting), des fibres C nociceptives mécano-sensibles **C-M**, toutes localisées dans la peau glabre et poilue (McCall et al., 1996; Puig and Sorkin, 1996). A l'époque, les auteurs suggéraient que l'activation des fibres C lors de cette phase serait due à une action directe du formol sur son récepteur. En 2007, il a été démontré que des faibles doses de formaline (0.5%) chez la souris activaient le récepteur **TRPA1** (Macpherson et al., 2007; McNamara et al., 2007).

Le récepteur TRPA1 a d'abord été décrit comme étant spécifiquement exprimé dans une sous population de neurones nociceptifs peptidergiques, pouvant exprimer le récepteur **TRPV1** mais exclus de la population TRPM8+ (Story et al., 2003). On sait désormais que son expression est plus étendue, notamment à des populations de neurones nociceptifs non peptidergiques (Barabas et al., 2012). Il est notamment exprimé sur des fibres **A $\delta$  et C mécano-nociceptives** et de manière plus surprenante sur des fibres **A $\beta$  – LTM** (Kwan et al., 2009). En outre, ce canal est également présent à la surface des kératinocytes et des follicules pileux (Kwan et al., 2009). Son pattern d'expression très large ne fait que complexifier ses possibles fonctions physiologiques.

Lors de la phase II, les fibres **A $\beta$ -LTM** ne déchargent plus, il a été suggéré que ces fibres sont désensibilisées suite à l'injection de la formaline (Puig and Sorkin, 1996). Les fibres **A $\delta$ -HTM** et les fibres **C-M** continuent de décharger.

Au niveau de la moelle épinière différentes études ont cherché à identifier quelles populations de neurones spinaux étaient activées lors d'une douleur induite par la formaline (Abbadie et al., 1997; Presley et al., 1990). Il apparaît que chez le rat, au niveau L3-L5, **les neurones médians de la lamina I et II**, recevant les projections des neurones nociceptifs, soient activés. L'activation est préférentiellement médiane dans ces lamina superficielles car les afférences qui innervent les extrémités les plus distales des membres projettent en médian et les afférences qui innervent les extrémités les plus proximales projettent de manière latérale dans la moelle (Light and Perl, 1979; Rohde et al., 1997). On observe également une activation des **neurones de la lamina III et IV et de la partie latérale de la lamina V** (neck), sûrement due au comportement de mordillage et d'agitation de la patte des animaux, car les neurones de ces lamina répondent à des stimuli non nocifs. Enfin, les **neurones Wide Dynamic Range (WDR) contenus dans les lamina VI et VII**, voies de sorties de la moelle épinière (Menetrey et al., 1980; Nahin et al., 1983) sont également activées. Cette activation peut même devenir bilatérale.

**Les neurones des lamina profondes** seraient principalement activés lors de la **2<sup>ème</sup> phase** de réponse alors que les neurones des lamina superficielles sont activés de manière équivalente lors des 2 phases. Les différents patterns d'activité des fibres entre la phase I et II (Puig and Sorkin, 1996) pourraient contribuer à la dominance d'activité dans les lamina profondes lors de la deuxième phase (Abbadie et al., 1997).

Pour ce qui est des neurones des lamina I et II activés, ils peuvent être excitateurs mais également **inhibiteurs** (Hantman et al., 2004; Todd et al., 1994) et plus précisément exprimer et sécréter le **nNOS** (Herdegen et al., 1994; Polgar et al., 2013).

Nous venons ici d'apercevoir le **réseau neuronal** mis en jeu dans la transmission et l'intégration du message nociceptif induit par la formaline. Les cellules gliales spinales (**microglie** notamment) ont également été décrites pour jouer un rôle important dans cette réponse (Fu et al., 2009; Li et al., 2010; Li et al., 2013). Je ne m'étendrai pas sur leur rôle dans cette partie mais ajouterai leur contribution à la compréhension du phénotype lors de la partie DISCUSSION.

Je vais à présent vous présenter les différents mécanismes moléculaires agissant lors de la réponse formaline.

### **3. Mécanismes et acteurs moléculaires**

#### **3.1 Inflammation périphérique**

Suite à l'injection périphérique de formaline (peu importe la dose), des neurones primaires sensoriels sont activés et une inflammation locale se met en place. Cette inflammation, particulière, est appelée **inflammation neurogénique**. Les neurones primaires sensoriels transmettent les informations de la périphérie (lieu de l'inflammation) vers le central (sens orthodromique de propagation) mais également du central vers la périphérie (sens antidromique de propagation). Les neurones primaires sensoriels sont en mesure de libérer en périphérie des neuropeptides tels que CGRP, la substance P, les neurokinines A et B, le nNOS, la neuropeptide Y..., qui vont alimenter le processus inflammatoire local, indépendamment de la réponse des cellules immunitaires. Une étude a proposé un modèle expliquant la mise en place de l'inflammation périphérique (Andrade et al., 2008): les récepteurs TRPA1, présents sur les fibres TRPV1, sont activés par la formaline à l'extrémité des neurones primaires sensoriels. L'activation de la terminaison nerveuse va entraîner le relargage de substance P qui va à son tour activer les mastocytes. Ces derniers vont alors dégranuler en libérant de l'histamine et de la sérotonine (Fischer et al., 2008; Reeh, 2008). Ce processus constitue un mécanisme important de la réponse à la formaline car bloquer la dégranulation des mastocytes diminue le comportement douloureux (Okayama and Church, 1983). De plus, plusieurs études ont démontré que bloquer les récepteurs à l'histamine (H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub>) ou à la sérotonine (5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>3</sub>) influait sur les réponses formaline (Cannon and Hough, 2005; Cannon et al., 2007; Parada et al., 2001).

Les acteurs périphériques de la réponse à la formaline ne sont pas encore clairement établis mais nous disposons de deux notions intéressantes dont nous débattons en DISCUSSION : **l'implication du canal TRPA1** et la communication système nerveux/système immunitaire liée à **l'inflammation**.

#### **3.2 Sensibilisation centrale**

Au niveau spinal, des études ont mis en évidence une augmentation de l'excitabilité des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (phénomène de sensibilisation) (Kenshalo et al., 1979; Perl et al., 1976), une augmentation du champ récepteur des neurones (Hylden et al., 1989), et une accumulation de potentiels post synaptiques conduisant à des dépolarisations successives et à **des décharges prolongées** (« windup »). Ce phénomène de « **windup** » serait dû à une potentialisation de la transmission synaptique glutamatergique : les neurones primaires sensoriels activés lors de la première phase de douleur libèrent du glutamate qui active les **récepteurs AMPA** (Hunter and Singh, 1994). Ceci permet une entrée de calcium soutenue dans le neurone, qui conduit à la levée du

blocage par le magnésium et l'activation secondaire des **récepteurs NMDA**, contributeurs importants de la mise en place de la seconde phase de douleur (Coderre and Melzack, 1992a, b; McRoberts et al., 2011).

Cependant, des potentialisations de synapses inhibitrices, notamment glycinergiques ont également été décrites. La synapse glycinergique comprend un **neurone présynaptique inhibiteur**, libérant de la glycine, un **neurone postsynaptique inhibiteur GABAergique** exprimant des récepteurs glycinergiques et est entouré de **cellules gliales** (microglie et astrocytes). Le neurone GABAergique est également connecté à un **neurone postsynaptique exciteur glutamatergique** transmettant l'information sensorielle douloureuse. En condition physiologique, le neurone GABAergique est activé et inhibe le neurone exciteur, bloquant ainsi le transfert de l'information douloureuse. Après injection de formaline, la microglie et les astrocytes spinaux sont activés et libèrent de **l'IL-1 $\beta$** . Celui-ci va se lier à son récepteur post synaptique présent sur l'interneurone GABAergique. Cela aura pour effet de potentialiser la synapse glycinergique. Cette potentialisation va avoir pour effet d'augmenter l'effet de la glycine sur le neurone GABAergique et donc d'inhiber cet inhibiteur, c'est un phénomène de désinhibition. Le neurone GABAergique ne peut plus inhiber le neurone exciteur, ce qui va permettre le transfert de l'information douloureuse (Chirila et al., 2014).

#### **4. Discussion et mise en perspective**

Comme je l'ai précédemment énoncé, l'idée actuelle est que la première phase de la douleur en réponse à la formaline est générée par l'activation des fibres primaires sensorielles et que la deuxième phase puise son origine dans des mécanismes spinaux voire cérébraux. Cependant, il n'y a pas de consensus sur les « responsables » de cette deuxième phase. Des études ont démontré qu'une injection de différents composés (antalgiques, anesthésiques locaux...) agissant en périphérie, bloquait la phase I ainsi que la phase II (Abbadie et al., 1997; Fu et al., 2000; Pitcher and Henry, 2000; Yashpal et al., 1996); alors que d'autres montrent que l'utilisation d'anesthésiques lors de la première phase ne diminue pas la phase II mais la retarde (Coderre et al., 1990; Taylor and Basbaum, 2000). Cependant, il a été démontré que les fibres primaires sensorielles déchargent durant les deux phases de douleur comme nous venons de le présenter (McCall et al., 1996; Puig and Sorkin, 1996).

Un nouveau modèle portant sur les mécanismes mis en jeu après une injection de formaline, a été récemment émis (Fischer et al., 2014). Pour l'apprécier au mieux, il est important de prendre en considération deux paramètres que nous avons peu évoqués : la **concentration de formaline** utilisée dans le test (0.5%, faible dose, à 5%, forte dose) et la **diffusion du composé** dans la patte de l'animal.

Les fibres se trouvant dans le champ récepteur de l'injection de formaline répondent moins bien aux stimuli mécaniques après l'injection (McCall et al., 1996; Puig and Sorkin, 1996). Les auteurs avaient alors suggéré que les fibres se trouvant dans le champ récepteur reçoivent une forte dose de formaline ce qui les inactive et les désensibilise. A contrario, les fibres éloignées du champ récepteur reçoivent une dose plus faible de formaline ce qui les protège de la « destruction » et donc leur permet d'avoir une contribution, un rôle plus important dans la réponse comportementale.

Dans l'étude de Fischer et coll., cette idée est reprise et complétée. Les auteurs ont démontré qu'une mise en contact prolongée des neurones primaires sensoriels avec une haute concentration de formaldéhyde (récrétant une situation *in vivo*) entraînait une hyperpolarisation des cellules. Cette hyperpolarisation serait due à l'inhibition d'un courant sodique persistant, TTX résistant, participant au maintien du potentiel de repos du neurone (Nav1.8, Nav1.7... (Bregman et al., 2011; Nassar et al., 2004)). Notons néanmoins que le blocage de l'inactivation de courant sodiques par la formaldéhyde a déjà été décrit (Nonner et al., 1980; Reeh, 2008). Grâce à un modèle bio-informatique, prenant en compte, à la fois cette hyperpolarisation, les capacités biophysiques du canal TRPA1 (notamment lors de l'exposition à une faible ou forte dose de formaldéhyde), les propriétés biophysiques et moléculaires de la formaldéhyde (poids moléculaire...), et la diffusion dans les tissus, les auteurs argumentent en faveur d'une réponse formale entièrement médiée par les fibres primaires sensorielles.

« Après une activation initiale forte, la zone directement injectée ne contribue plus à la réponse car elle est sujette à une hyperpolarisation puis à une inactivation. Cela correspond à l'interphase. Au plus loin de l'injection, une plus faible dose de formaldéhyde, mais suffisante, génère une deuxième phase d'activation qui atteint un maximum à 30 minutes et qui diminue ensuite, suite à la baisse de concentration en formaldéhyde, due aux mécanismes de diffusion, convection, dilution, clairance... ». Ils concluent que l'activation des fibres primaires est nécessaire et suffisante pour expliquer les réponses biphasiques chez le rongeur (à noter que, l'injection de formaline induit une réponse monophasique chez le chat, et biphasique chez l'Homme...). En accord avec ce modèle, l'ablation de la quasi-totalité des neurones nociceptifs du DRG entraîne une disparition totale de la seconde phase après une injection de 5% de formaline (Abrahamsen et al., 2008). Ce dernier point appuie une fois de plus l'importance des neurones primaires sensoriels dans la réponse globale à l'injection de formaline.

L'interprétation du phénotype lié à la formaline n'est pourtant pas aussi triviale. Premièrement, le fait d'avoir attribué, pendant des années, un rôle aux fibres primaires sensorielles lors de la première phase et un rôle aux neurones de la moelle épinière lors de la deuxième phase, a mené les recherches à se focaliser sur un des deux aspects et rarement les deux ; ceci nous empêche d'avoir

une vision intégrée de la réponse douloureuse. Malgré tout, l'étude des mécanismes de sensibilisation centrale suite à une inflammation périphérique, permise par le test à la formaline et menée depuis des années, nous apprend beaucoup sur les réseaux spinaux mis en jeu lors de stimulation nociceptive.



# Modèle de douleur neuropathique :

## Constriction du nerf sciatique (CCI)

### 1. Définition d'une douleur neuropathique

Une douleur neuropathique est causée par **une lésion** d'une partie du **système nerveux** périphérique ou central. Une des particularités des douleurs neuropathiques est qu'elles peuvent persister bien après que le déclencheur initial ait disparu, et devenir chroniques. Chez l'humain, on parle de **douleur chronique** lorsque celle-ci excède 3 mois. Généralement, la douleur est plutôt cyclique : elle s'atténue voire disparaît puis réapparaît. Néanmoins, tous les patients atteints de douleur neuropathique ne deviennent pas des douloureux chroniques. Il y a un équilibre entre les mécanismes mis en place suite à une atteinte nerveuse, le contexte psycho-social et le fond génétique de l'individu qui peut soit favoriser soit protéger d'une chronicisation de la douleur.

### 2. Le modèle CCI

#### 2.1 Principes

Le modèle de constriction du nerf sciatique (CCI) est un modèle de douleur neuropathique qui a été développé par Xie et Bennett en 1988 chez le rat. Quatre nœuds (3 chez la souris), lâches et légèrement espacés, sont réalisés unilatéralement autour du nerf sciatique de l'animal avant sa trifurcation.

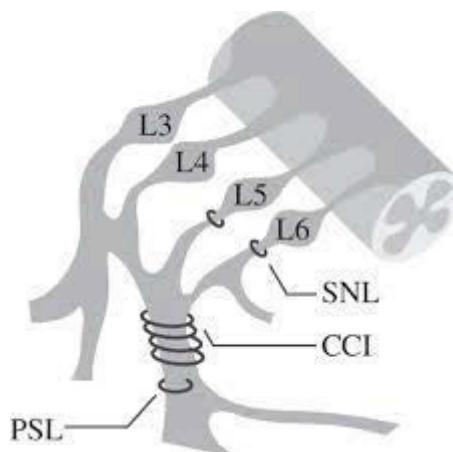


Figure 13 : Schéma explicatif des différents modèles neuropathiques : ligature du nerf sciatique (SNL), Constriction du nerf sciatique (CCI) et ligature partielle du nerf sciatique (PSL)

Cette chirurgie entraîne un gonflement et une compression du nerf, puis une axotomie « réversible » de certaines fibres primaires sensorielles. En effet, les pourcentages d'axones ne conduisant plus l'influx électrique 1 jour après la CCI sont de 85% pour les fibres A $\beta$ , 55% pour les fibres A $\delta$  mais seulement 9% pour les fibres C. Au 3<sup>ème</sup> jour, ces pourcentages montent à 89% pour les fibres A $\beta$ , 87% pour les fibres A $\delta$  et 32% pour les fibres C (Kajander and Bennett, 1992). La CCI entrainerait donc préférentiellement une axotomie des neurones de large et moyen diamètre en épargnant un peu plus les fibres C. Nous disposons donc d'un modèle de neuropathie où des fibres sont lésées et d'autres non, ce qui n'implique pas les mêmes mécanismes.

D'un point de vue comportemental, les animaux opérés développent une **hyperalgésie thermique** (un stimulus chaud ou froid nocif devient extrêmement douloureux) ainsi qu'une **allodynie mécanique** (un stimulus mécanique jusque lors non douloureux le devient).

Ces phénomènes sont détectables dès 1 jour et cela jusque 30-60 jours après la chirurgie. Il s'agit donc d'un modèle de **neuropathie, réversible**, permettant d'étudier les mécanismes de mise en place, de maintien, de récupération voire de persistance de la douleur neuropathique si celle-ci se chronicise.

A l'heure actuelle, plusieurs mécanismes de **mise en place** ont été décrits ; ils peuvent se produire en périphérie, au niveau de la lésion, mais également au niveau central. Cependant, peu de données sont disponibles sur les mécanismes de **maintenance** des neuropathies et on ignore très largement comment celles-ci se chronicisent. Je m'attacherai ici à présenter majoritairement des données obtenues dans des études basées sur la CCI, et quelques données sur le modèle SNL, assez proche dans la mesure où il consiste en la ligature de 2 branches du nerf sciatique en amont de celle effectué dans la CCI.

## **2.2 Mise en place : Mécanismes périphériques**

### *2.2.1 Au commencement était l'inflammation...*

Comme présenté en introduction, lors d'une CCI, les fibres C de petit diamètre sont relativement épargnées ; elles se rétractent, notamment les fibres IB4+ (Bailey and Ribeiro-da-Silva, 2006), puis vont se régénérer pour re-contacter leurs cibles périphériques et centrales, mais ne dégènèrent pas. A contrario, les fibres A $\beta$  et A $\delta$  subissent une **axotomie** (Kajander and Bennett, 1992). Cela entraîne, au niveau de la lésion, une **dégénérescence wallérienne** de ces fibres par les cellules de Schwann. Les **macrophages** vont être alors recrutés pour permettre le nettoyage des débris cellulaires et présenter des antigènes **aux lymphocytes T**. Les macrophages vont former un anneau autour des cellules lésés

et la densité des lymphocytes T va augmenter (Hu et al., 2007; Kleinschnitz et al., 2006; Moalem et al., 2004). De manière intéressante, il a été démontré que ce processus de dégénérescence wallérienne/recrutement des macrophages lié aux fibres A conduisait au phénomène d'hyperalgésie thermique observée suite à la neuropathie ; l'allodynie mécanique, elle, serait dépendante de la régénération axonale des fibres A et C (Sommer and Schafers, 1998). Ces données paraissent compatibles avec le fait que les neurones thermo-nociceptifs, vraisemblablement impliqués dans les phénomènes d'hyperalgésie thermiques, peuvent être des fibres A $\delta$ , dont l'axotomie est importante lors de CCI.

Les macrophages et lymphocytes T présents au niveau de la lésion, vont sécréter des **cytokines et chimiokines, pro et anti-inflammatoires** qui vont participer à la sensibilisation des nerfs, ainsi que du NGF (Brown et al., 1991; Heumann et al., 1987). Le **NGF** produit va se lier à son récepteur TrkA sur les fibres environnantes et va être transporté de manière rétrograde. L'activation de la voie p38 au sein de ces neurones va enfin permettre la production et le relargage de nombreux neuro-peptides ainsi que le **BDNF** au niveau de la moelle épinière (Obata et al., 2004).

### *2.2.2 Décharge ectopique du nerf ligaturé et des nerfs adjacents*

Ces phénomènes inflammatoires vont participer à rendre les fibres, lésées ou non, **hyperexcitables** et parfois même à avoir une décharge spontanée. Cette hyperexcitabilité provient de la **modification du potentiel de membrane** des neurones qui est augmentée et permet donc une activation plus « facile » du neurone primaire sensoriel. Le potentiel de repos d'un neurone dépend de l'équilibre entre les courants potassiques, sodiques et calciques. Dans le modèle de CCI, on observe une diminution de la quantité de **canaux potassiques voltages dépendants** (Kim et al., 2002), des modifications des sous unités des **canaux calciques voltages dépendants** conduisant à une augmentation des courants calciques (Kim et al., 2001). Il a également été décrit une variation du niveau d'expression des **canaux sodiques voltage dépendants** (Dib-Hajj et al., 2010; Dib-Hajj et al., 1999), une modification de leur cinétique d'inactivation due à des phosphorylations (Stamboulian et al., 2010), et enfin une modification de la distribution des canaux le long de l'axone et non plus seulement au niveau du nœud de Ranvier (Tseng et al., 2014). Ce dernier point pourrait expliquer comment les décharges ectopiques peuvent être générées au niveau du soma, et de la lésion après CCI (Tal and Eliav, 1996).

D'autre part, des **afférences noradrénergiques sympathiques** vont innerver les neurones du DRG suite à la lésion (Ramer and Bisby, 1999), ce qui peut moduler l'activité des canaux calciques voltages dépendants et des canaux potassiques activés par le calcium (Honma et al., 1999).

Ces différents éléments vont participer au phénomène de **sensibilisation périphérique** : les médiateurs inflammatoires libérés suite à la lésion activent des voies de signalisation intracellulaire qui vont augmenter la production, le transport et l'insertion à la membrane de récepteurs et de canaux voltages dépendants. Toutes ces modifications vont concourir à activer les neurones primaires sensoriels plus facilement.

Il est par ailleurs important de souligner que suite à la lésion, des fibres non nociceptives en condition normale, vont être sensibilisées par ces facteurs inflammatoires, être plus facilement activées et transmettre une information sensorielle douloureuse ; c'est notamment le cas des fibres A $\beta$  –LTMR.

## **2.3 Mise en place : Mécanismes spinaux**

### *2.3.1 Baisse de l'inhibition*

Depuis la théorie du portillon (Melzack and Wall, 1965), il est considéré qu'une inflammation, une neuropathie, ou tous types de douleurs non physiologiques, sont dus à une **diminution de l'inhibition** au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (perte du « gate »). Cette baisse d'inhibition peut avoir différentes origines.

De nombreux neurotransmetteurs peuvent être relargués au niveau de la moelle épinière. Par exemple, la lésion des fibres A $\beta$  et A $\delta$  entraîne la production accrue de **NPY** par ces neurones via phospho –ERK (Obata et al., 2004) ou encore d'**ATP** qui va se lier aux récepteurs P2X4 exprimés par la **microglie** (Tsuda et al., 2003). Les cellules microgliales voient d'ailleurs leur densité et leur morphologie modifiées notamment dans la partie médiane des lamina I et IV (Hu et al., 2007). L'activation de la microglie par l'ATP va entraîner la libération de **BDNF**, qui va avoir plusieurs effets sur la transmission synaptique. Tout d'abord, il va produire une **inversion du potentiel d'équilibre du chlore** dans les neurones inhibiteurs via son action sur **le transporteur KCC2** (Coull et al., 2005). De ce fait, l'activation des récepteurs GABA des neurones inhibiteurs, perméables au chlore, entrainera une dépolarisation du neurone et non plus une hyperpolarisation (Coull et al., 2003). Cependant une récente étude démontre que l'activation d'interneurones inhibiteurs glycinergiques spinaux diminue l'hypersensibilité mécanique lors d'une CCI ; ces neurones garderaient leur effet inhibiteur (Foster et al., 2015).

Cependant, le **BDNF** induit d'autres modifications de la transmission synaptique : on peut observer une diminution de l'amplitude et de la fréquence de décharge des neurones inhibiteurs toniquement

actifs (présumément des neurones Islet) et une augmentation de l'activité des neurones verticaux (Balasubramanyan et al., 2006; Biggs et al., 2010; Lu et al., 2009a; Lu et al., 2009b, 2012). Le **TNF** lui va se lier sur son récepteur, activer la voie de signalisation p38, bloquer le courant de type Ih sur les neurones inhibiteurs ce qui va diminuer l'excitabilité des neurones GABAergiques (Zhang and Dougherty, 2011, 2013).

De manière « globale », différentes études ont mis en évidence dans le modèle de CCI, une diminution des forces synaptiques des afférences primaires sensorielles sur les interneurones GABAergiques conduisant à une **diminution** de la fréquence de décharge de ces **neurones GABAergiques**. Ces études tendent à prouver que l'inhibition spinale lors de neuropathie est diminuée suite à une diminution de l'excitabilité ou des inputs sur les interneurones inhibiteurs, islet. (Balasubramanyan et al., 2006; Leitner et al., 2013).

Cependant, d'autres études soutiennent que cette baisse d'inhibition est due à **la mort de ces neurones inhibiteurs**. Le débat n'est pas encore tranché (Moore et al., 2002; Polgar et al., 2004; Polgar et al., 2003; Scholz et al., 2005). Récemment, une étude a démontré la corrélation entre la perte de l'immuno-réactivité de la GAD65, marqueur des interneurones inhibiteurs avec la rétractation des fibres non peptidergiques IB4, survenant dans les modèles de CCI (Bailey and Ribeiro-da-Silva, 2006). Les auteurs suggèrent que la perte des afférences non-peptidergiques survenant au début de la neuropathie, suivie de la baisse de connectivité avec les interneurones inhibiteurs seraient la cause de la maladie et qu'au fur et à mesure que les afférences non-peptidergiques retrouveraient leurs cibles spinales inhibitrices, les symptômes douloureux diminueraient (Lorenzo et al., 2014). Nous développerons cette hypothèse lors de notre discussion.

Cependant, trois récentes études dans lesquelles différentes populations d'interneurones inhibiteurs ont été génétiquement éliminées, ont permis de mettre en évidence le rôle prépondérant de ces neurones dans les mécanismes d'allodynie mécanique (Bourane et al., 2015; Duan et al., 2014; Foster et al., 2015), suggérant que la perte d'inhibition est bien un élément important des neuropathies.

Enfin, les **astrocytes** spinaux jouent également un rôle important : ils possèdent des récepteurs aux neurotransmetteurs (NMDA, m-GluR, prurinerigiques, NK1R), qui une fois activés, stimulent des voies intracellulaires ERK, JNK, pour permettre la synthèse d'agents inflammatoires tels que IL1b, IL6, TNF, PGE2, NO. Leur implication dans les douleurs neuropathiques n'a pas encore été bien décrite, mais ils sont suspectés d'être responsables de la **maintenance de la neuropathie**. En effet, tandis que la microglie présente une activation rapide et « transitoire » suite à une lésion périphérique, les astrocytes sont activés plus tardivement et plus longtemps.

### 2.3.2 Sensibilisation centrale

Bien qu'il soit à l'heure actuelle indéniable que les neuropathies soient dues à une certaine forme de désinhibition des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, il existe également des phénomènes augmentant l'excitabilité de ces mêmes neurones, on parle de phénomène de sensibilisation centrale. La sensibilisation centrale correspond à une transmission facilitée des stimuli douloureux. Elle peut avoir plusieurs origines.

L'activité répétitive générée par les fibres lésées (ou non) entraîne rapidement une **facilitation homo et hétéro-synaptique** au niveau des neurones de la moelle épinière. Une facilitation homosynaptique consiste en un renforcement de la connexion entre le nocicepteur et son interneurone cible de la moelle épinière grâce au relargage prolongé de neurotransmetteurs (phénomène de Long Term Potentiation LTP). Lors d'une facilitation hétéro-synaptique, la connexion entre le nocicepteur et le neurone de la moelle épinière est renforcée par l'activité d'un autre neurone primaire sensoriel, qui habituellement ne transmet pas d'informations nocives (classiquement les fibres A $\beta$  LTMR). Ces deux phénomènes sont accompagnés d'effets pré et post synaptiques. En pré-synaptique, on peut observer une augmentation de la densité de canaux calciques (Melrose et al., 2007), une modification des récepteurs GABA<sub>A</sub>, une augmentation de la synthèse de BDNF (Obata et al., 2003), une augmentation de l'éphrine B et de son récepteur (Song et al., 2008)... En post synaptique, on observe une augmentation globale du calcium intracellulaire dû à l'augmentation de la densité, de la phosphorylation et de l'ouverture des canaux NMDA, l'activation des canaux calciques de type T, et enfin le relargage du calcium du réticulum endoplasmique (Sandkuhler and Gruber-Schoffnegger, 2012). Enfin, il a été constaté une down régulation des transporteurs du glutamate GLT1 et GLAST, ce qui entraîne une diminution de la recapture du glutamate et augmente la transmission synaptique excitatrice (Sung et al., 2003).

Ces deux types de facilitations vont donc renforcer les connexions synaptiques. L'augmentation de la force synaptique permet à des stimuli jusque-là sous liminaires d'activer les neurones de la moelle épinière qui ont désormais un seuil d'activation abaissé et un champ récepteur élargi.

L'activité microgliale est également nécessaire à l'installation de la LTP. Le récepteur purinergique P2X7R, présent uniquement sur la microglie, va activer et permettre à la microglie de proliférer. L'activation des voies de signalisation SFK, p38 va alors entraîner la production d'IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$ , acteurs importants de la LTP spinale (Chu et al., 2010; He et al., 2012). De plus, la libération d'IL-1 $\beta$  va avoir pour effet de phosphoryler les récepteurs NMDA (Gruber-Schoffnegger et al., 2013) mais les cytokines IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$  peuvent également agir sur des récepteurs présents sur les cellules gliales.

L'activation de ces cellules va permettre la libération d'autres molécules, ce qui va auto-alimenter cette boucle de signalisation « neurone/glie ».

## **2.4 Mise en place : Modifications des contrôles descendants**

Les neurones de la moelle épinière reçoivent les afférences primaires sensorielles mais leur activité est également régulée par des contrôles descendants : des projections neuronales facilitatrices ou inhibitrices provenant majoritairement du tronc cérébral. Deux systèmes anatomiques peuvent moduler les douleurs neuropathiques.

Le premier comporte les **projections sérotoninergiques et adrénnergiques provenant du locus coeruleus (LC) et du raphé**. A l'heure actuelle, de nombreux médicaments visant à lutter contre les neuropathies ciblent d'ailleurs ces différents types de récepteurs. On peut observer une hyperactivité sérotoninergique globale suite à une CCI (Palazzo et al., 2006), bien que l'activité électrophysiologique du LC ne semble pas être affectée une semaine après l'installation de la CCI (Alba-Delgado et al., 2012). Ce noyau reçoit des afférences excitatrices provenant du noyau paragigantocellulaire et des afférences inhibitrices provenant du noyau dorsal du raphé. Les auteurs proposent qu'en condition neuropathique, ces deux afférences s'autocompenseraient avec comme net effet, une activité stable des neurones du LC. De manière intéressante, la même équipe a conduit les mêmes types d'enregistrements mais en stressant les animaux ; le LC ayant un rôle connu dans les réactions au stress. Dans un paradigme où les animaux ayant subi une CCI sont isolés (ce qui représente un stress pour eux), l'activité du LC est dans ce cas modifiée (Bravo et al., 2013; Bravo et al., 2014).

Le deuxième met en jeu les projections du PAG et **de la RVM**. Au niveau de la RVM, il a été décrit des neurones dit « OFF », « ON » et « NEUTRES » (Fields et al., 1983). Les neurones « OFF », activés par certains opioïdes, voient leur décharge s'arrêter peu avant la réponse réflexe à un stimulus douloureux ; ils appartiennent à la voie descendante inhibitrice. Les neurones « ON » sont inhibés par les agonistes des récepteurs  $\mu$  opioïdes, et activés lors de stimuli douloureux ; ils participent à la voie descendante facilitatrice. Il a été démontré que lors de neuropathies (modèle SNL notamment), il y a une diminution du système descendant inhibiteur et une augmentation du système descendant facilitateur (De Felice et al., 2011; Porreca et al., 2001; Wang et al., 2013). Enfin l'activation répétée de neurones sérotoninergiques de la RVM déclenche une sensibilisation aux douleurs thermique et mécanique proche de celle observée dans les modèles de CCI (Cai et al., 2014).

Il est clairement établi que les systèmes descendants jouent un rôle primordial dans la douleur neuropathique et ces pathologies sont fréquemment traitées par des antagonistes sérotoninergiques

(qui au passage peuvent également influencer sur les états dépressifs liés à cette condition), noradrénergiques, morphiniques... Cependant, les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore élucidés bien que les études électrophysiologiques, anatomiques et pharmacologiques aient beaucoup apporté. Un des challenges à venir sera de décrypter la complexité moléculaire de ces réseaux supra-spinaux.

Enfin, la composante « cérébrale » de la douleur est de plus en plus investiguée ; il apparaît que des changements à ce niveau d'intégration jouent un rôle prépondérant dans notre perception de la douleur ainsi que dans la mise en place et la persistance de la douleur (**chronicisation**). Par exemple, une **diminution de la connectivité** entre les cortex préfrontal et le noyau accumbens serait un élément prédictif d'une chronicisation de la douleur (Baliki et al., 2012), des **changements synaptiques** dans le cortex cingulaire antérieur contribuent aux douleurs neuropathiques (Blom et al., 2014) et l'on observe, lors de douleur chronique, des **altérations anatomiques et neurochimiques** du cortex préfrontal, de l'insula et du cortex cingulaire antérieur (Navratilova and Porreca, 2014) notamment **une diminution de la matière grise** (Apkarian et al., 2004; Geha et al., 2008).



## Conclusion de la deuxième partie

Différents types de douleur sont étudiés grâce à des modèles animaux reproduisant certains aspects de ses pathologies. Grâce à ses paradigmes expérimentaux, il nous est possible d'appréhender les mécanismes de mise en place de la douleur. De manière intéressante, nous pouvons relever que des processus inflammatoires et de plasticité (modification synaptique, sensibilisation) sont toujours impliqués. La différence entre ces types de douleur peut peut-être résider dans le recrutement de différents réseaux anatomiques et/ ou de molécules différentes. Cependant, nos connaissances paraissent encore limitées par le manque d'une vision intégrée du processus douloureux. Il semble nécessaire de prendre davantage en compte le rôle de chaque relai anatomique (périphérique, spinal, central) mais également le rôle crucial des cellules non neuronales telles que les astrocytes, et les cellules immunitaires dans le développement des pathologies douloureuses.

Mon introduction vous a présenté l'organisation anatomo-fonctionnelle du système nerveux somato sensoriel, avec une emphase sur deux phénotypes douloureux particuliers de douleur « inflammatoire » et neuropathique.

Mon étude a pour but de compléter nos connaissances sur les modalités de détection et les mécanismes de ces phénomènes douloureux grâce à l'étude d'une sous population de neurones non peptidergiques : les neurones GINIP+. Grâce au modèle murin permettant d'étudier à la fois la fonction de GINIP et la spécialisation fonctionnelle des neurones qui expriment GINIP, j'ai pu durant ma thèse :

- Valider le modèle murin permettant l'ablation ciblée des neurones GINIP+ au sein du DRG
- Définir quelles sont les modalités sensorielles que la population de neurones GINIP+ est en mesure de détecter et de transduire

# RESULTATS

## RESUME DE L'ARTICLE

Le système sensoriel est une partie du système nerveux nous permettant de percevoir et de transmettre les stimuli internes ou provenant de notre environnement. Un stimulus est détecté par les neurones primaires sensoriels, est transmis aux interneurons de la corne dorsale de la moelle épinière où il subit une première intégration et modulation. Le signal est ensuite transmis vers différentes aires du cerveau via le tronc cérébral. Après avoir été intégré et traité, une activation de voies spinales descendantes va réguler ce message sensoriel.

Dans notre laboratoire, nous nous intéressons au premier relai de ce système nerveux somato sensoriel, les neurones primaires sensoriels (encore appelés neurones du DRG). Ces neurones présentent une extrême hétérogénéité afin de répondre finement à la multitude de stimuli que nous sommes en mesure de détecter (chimiques, thermiques, mécaniques...). Nous étudions principalement les neurones impliqués dans les phénomènes douloureux, les nocicepteurs. Cependant, nous ignorons encore beaucoup sur l'identité de ces neurones que ce soit d'un point de vue moléculaire ou physiologique.

Une récente étude de l'équipe a mis en évidence un nouveau gène, *ginip*, au sein des neurones du DRG. Ce gène code pour une petite protéine dont la perte induit une diminution de l'inhibition synaptique spinale et une prolongation de l'hypersensibilité mécanique en condition inflammatoire et neuropathique (Gaillard et al., 2014).

De manière intéressante, le gène *ginip* est exprimé dans une sous population de nocicepteurs non peptidergiques. Le but de ma thèse a été de savoir quelle modalité sensorielle la population de neurones GINIP+ est en mesure de détecter.

Pour répondre à cette question, un nouveau modèle murin de souris KI a été généré au laboratoire. Un transgène a été inséré au locus du gène *ginip* par recombinaison homologe. Il est composé de deux cassettes. La première cassette contient un codon STOP flanqué de deux sites lox P. La seconde contient la séquence du récepteur humain à la toxine diphtérique (hDTR) suivi de la séquence protéique d'une protéine fluorescente mcherry. L'expression de la deuxième cassette nécessite l'excision de la première. Cette excision est rendue possible grâce au croisement des animaux GINIP<sup>fllox/+</sup> avec une souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du gène *Nav1.8* spécifiquement exprimé dans les neurones du DRG (Cre nav1.8). Nous avons donc généré des animaux GINIP<sup>fllox/+</sup>:Nav1.8<sup>cre+</sup> (GINIP-DTR par la suite) auxquels nous avons injectés de la toxine diphtérique entre 4 et 5 semaines afin de sélectivement tuer les neurones GINIP+ dans le DRG. Grâce

à ce modèle murin, nous sommes en mesure d'étudier le rôle fonctionnel des neurones GINIP+ du DRG dans la détection et transmission de la douleur.

Les souris KI GINIP sont viables, fertiles, et naissent dans les conditions mendéliennes.

Nous avons donc effectués une caractérisation moléculaire et comportementale de ces animaux.

Dans un premier temps, des expériences d'immunomarquage et d'hybridation *in situ* nous ont permis de démontrer que le récepteur à la toxine diphtérique est bien exprimé dans les neurones GINIP+ chez les animaux GINIP-DTR mais que son expression est absente chez les animaux sauvages GINIP<sup>+/+</sup> et les animaux GINIP<sup>flox/+</sup> littermate. Grâce aux comptages du nombre de neurones du DRG, nous avons pu constater que l'injection de toxine diphtérique supprime sélectivement les neurones GINIP+ en épargnant les autres populations neuronales. Nous disposons donc d'un modèle valide afin de répondre à notre question scientifique.

Dans un second temps, nous avons soumis nos animaux à un large panel de tests comportementaux afin de définir quelles modalités sensorielles pouvaient être altérées en l'absence des neurones GINIP+. Nous n'avons détecté aucun déficit lors des tests de l'open field et du rotarod, suggérant que nos animaux ne souffrent d'aucun déficit moteur ou d'anxiété. Nous avons ensuite effectué des tests de sensibilité thermique (plaques chaude et froide, gradient thermique). Aucune différence n'est apparue entre les animaux GINIP-DTR et les animaux WT littermate. Ces résultats indiquent que la sensibilité thermique de ces animaux n'est pas affectée par la perte des neurones GINIP+.

Nous avons ensuite évalué la sensibilité mécanique des souris en effectuant des tests de Von Frey en condition basale, inflammatoire et neuropathique. Les animaux GINIP-DTR ne présentent apparemment aucune modification de sensibilité mécanique en condition basale et inflammatoire mais ils développent une hypersensibilité mécanique prolongée en condition neuropathique.

Enfin, nous avons effectué des injections de formaline (2%) dans la patte des animaux afin d'observer leur réponse à une inflammation aigue causée par un agent chimique. Nous avons pu observer une diminution de la première phase de réponse douloureuse à la formaline et une disparition presque totale de la deuxième phase de réponse.

Ces résultats comportementaux corrélés à de précédentes études menées dans le domaine nous ont permis de proposer un modèle anatomo-fonctionnel de la transmission de l'information sensorielle mécanique ainsi que des mécanismes mis en jeu lors de l'injection de formaline, au niveau spinal.

Les résultats de ces travaux fait l'objet d'une soumission d'article au journal Cell Report.

## **Genetic ablation of GINIP neurons reveals a critical role of C-LTMRs in modulation of Mechanical and Formalin-evoked pain**

*Louise Urien<sup>1,4</sup>, Stéphane Gaillard<sup>1,2,4</sup>, Laure Lo Re<sup>1</sup>, Pascale Malapert<sup>1</sup>, Chiara Salio<sup>3</sup> and Aziz Moqrich<sup>1,\*</sup>*

<sup>1</sup>Aix-Marseille-Université, CNRS, Institut de Biologie du Développement de Marseille, UMR 7288, case 907, 13288 Marseille Cedex 09, France.

<sup>2</sup>Phenotype Expertise, 5 Boulevard du Maréchal Koenig, 13009 Marseille, France

<sup>3</sup>University of Turin, Department of Veterinary Sciences, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco, Italy

<sup>4</sup>Co-first authors

\*Correspondence should be addressed to Aziz Moqrich at [aziz.moqrich@univ-amu.fr](mailto:aziz.moqrich@univ-amu.fr)

## SUMMARY

Primary sensory neurons are heterogeneous by myriad of molecular criteria. However, the functional significance of this remarkable heterogeneity is just emerging. Here we used our recently generated *ginip* mouse model to selectively ablate the cutaneous MRGPRD<sup>+</sup> neurons and C-LTMRs. Ablation of GINIP-expressing neurons had no effect on acute and inflammation-induced thermal and mechanical sensitivity but led to prolonged nerve injury-induced mechanical pain. Importantly, loss of GINIP<sup>+</sup> neurons altered formalin-evoked first pain and drastically suppressed the second pain response. Knowing that MRGPRD<sup>+</sup> neurons are dispensable for formalin-evoked pain and that these neurons play a critical role in acute and injury-induced mechanical pain, our data demonstrate that formalin-induced pain hypersensitivity is primarily transduced via C-LTMRs, and suggest that C-LTMRs and MRGPRD<sup>+</sup> neurons play antagonistic roles in transduction of acute and injury-induced mechanical pain. Therefore, our results suggest that C-LTMRs act as strong modulators of chemical and mechanical pain signals.

## INTRODUCTION

Deciphering the functional specialization of molecularly defined subpopulations of neurons is one of the most challenging issues in today's neurobiology. Dorsal Root Ganglia (DRG) neurons represent a powerful model system to address this fundamental question. These neurons are highly heterogeneous by myriad of morphological, anatomical and molecular criteria. However, the functional significance of this remarkable diversity is under intense investigation within the sensory biology community. For example, genetic ablation of MRGPRD<sup>+</sup> neurons led to a selective deficit in noxious mechanical pain sensitivity with no interference on noxious heat or cold sensation (Cavanaugh et al., 2009). Pharmacological ablation of TRPV1 central projections selectively abolished noxious heat but not cold or mechanical sensitivity (Cavanaugh et al., 2009). Interestingly, combined ablation of both subsets of neurons yielded an additive phenotype with no additional behavioral deficit (Cavanaugh et al., 2009). In line with these findings, developmental ablation of Nav1.8-expressing neurons altered multiple sensory modalities, including an almost complete absence of the second phase of formalin-evoked pain, demonstrating, for the first time, that primary sensory neurons play an important role in sensing and transducing formalin-evoked pain (Abrahamsen et al., 2008). Following this study, attempts to identify the subpopulations of neurons specialized in sensing and transducing formalin-evoked pain has been unsuccessful. Indeed, it has been shown that ablation of MRGPRD<sup>-</sup> and TRPV1-expressing neurons, both of which represent the vast majority of nociceptors, had no effect on formalin-evoked pain (Shields et al., 2010), suggesting that formalin-evoked pain can be triggered by a small subset of neurons ablated in the Abrahamsen et al. study (Abrahamsen et al., 2008). We and others have shown that low threshold mechanoreceptors A $\delta$ , A $\beta$ , C-LTMRs and the MRGPRB<sup>+</sup> neurons, express neither MRGPRD nor TRPV1 (Gaillard et al., 2014; Li et al., 2011; Liu et al., 2007; Reynders et al., 2015), implying that these populations of neurons are likely involved in sensing and transducing formalin-evoked pain. Here we used our recently engineered *ginip* versatile mouse model that allows an inducible and tissue specific ablation of GINIP-expressing neurons. We show that injection of diphtheria toxin selectively ablates MRGPRD<sup>+</sup> neurons and C-LTMRs with no effect on A $\delta$  and A $\beta$ -LTMRs or MRGPRB<sup>+</sup> neurons. Very interestingly, ablation of GINIP<sup>+</sup> neurons significantly affected formalin-evoked first pain and strongly altered the second pain. Surprisingly, in contrast to MRGPRD-DTR mice, dual ablation of C-LTMRs and MRGPRD<sup>+</sup> neurons had no effect on acute and inflammation-induced mechanical sensitivity, whereas it led to a prolonged nerve injury-induced mechanical hypersensitivity. As our genetic ablation approach selectively targets MRGPRD<sup>+</sup> neurons and C-LTMRs, and knowing that MRGPRD<sup>+</sup> neurons are dispensable for formalin-evoked pain, our results strongly suggest that C-LTMRs play a prominent role in formalin-evoked pain. Our data also highlight another important potential role of C-LTMRs. MRGPRD<sup>+</sup> neurons

have been shown to play a critical role in acute and injury-induced mechanical pain (Cavanaugh et al., 2009). In our study we show that concomitant ablation of C-LTMRs and MRGPRD<sup>+</sup> neurons reverses the mechanical hyposensitivity due to the selective ablation of MRGPRD<sup>+</sup> neurons, suggesting that C-LTMRs' activity antagonizes that of MRGPRD<sup>+</sup> neurons at the spinal level.

## RESULTS

### Tissue specific and inducible ablation of GINIP-expressing neurons

In a recent study (Gaillard et al., 2014), we generated a versatile mouse model where *ginip* locus has been manipulated, using homologous recombination technology, to trigger global inactivation of *ginip* gene and an inducible and tissue-specific ablation of GINIP-expressing neurons (Figure 1A). To gain insights into the functional specialization of GINIP-expressing neurons, we crossed GINIP<sup>flx/+</sup> mice with mice expressing the CRE recombinase from Nav1.8 locus (Abrahamsen et al., 2008; Stirling et al., 2005). GINIP<sup>flx/+</sup>;Nav1.8<sup>cre/+</sup> mice (hereafter GINIP-DTR mice) were undistinguishable from their WT littermates. Double labeling experiments using anti-GINIP and anti-hDTR antibodies showed the expression overlap between GINIP and hDTR only in GINIP-DTR but not in wild type (hereafter GINIP<sup>+/+</sup> mice) or in GINIP<sup>flx/+</sup> mice (Figures 1B and S1A). This data demonstrates that CRE recombination occurs in a high fidelity manner and specifically targets neurons that drive expression of hDTR from *ginip* locus.

Diphtheria toxin (DT) injection had no effect on GINIP<sup>+</sup> neurons in GINIP<sup>+/+</sup> mice and led to a selective and specific ablation of all GINIP<sup>+</sup> neurons in GINIP-DTR mice without affecting the neighboring neurons expressing TrkA (Figure 1C). To further characterize the selective ablation of GINIP-expressing neurons in GINIP-DTR mice, we performed a thorough quantitative and qualitative analysis of L4 DRGs using SCG10 as a pan-neuronal marker in combination with a variety of DRG neuronal markers (Figure 1D). Consistent with the previously described percentage of GINIP-expressing neurons in L4 ganglia, we found a 36% decrease in the total number of DRG neurons in GINIP-DTR mice (8367 ± 541 for the GINIP<sup>+/+</sup> mice and 5360 ± 784 for GINIP-DTR mice, n = 3) (Figure 1D). Quantification of TrkA<sup>+</sup> neurons showed no difference between GINIP-DTR and GINIP<sup>+/+</sup> control mice (Figure 1D). However, we found a 60% decrease in the total number of Ret<sup>+</sup> neurons (3316 ± 446 for the GINIP<sup>+/+</sup> mice and 1326 ± 192 for GINIP-DTR mice, n = 3) (Figure 1D). Knowing that GINIP marks a subset of Ret-expressing neurons (Gaillard et al., 2014), the neuronal counting data demonstrate that our ablation protocol specifically targets GINIP-expressing neurons. Consistently, molecular markers that are co-expressed with GINIP, such as *MrgprD*, *Tafa4*, and *TH*, were completely absent in DT-injected GINIP-DTR mice (figure 1E), whereas those that are excluded from GINIP<sup>+</sup> neurons, such as



TrkA, TrkB, TrkC, CGRP and MrgprB4, were unaffected (Figures 1C, 2A and S1B). In line with these data, dorsal horn spinal projection of CGRP afferents, most of which express TrkA, occurs normally in DT-injected GINIP-DTR mice, whereas there was a massive decrease of IB4 afferents projection in laminae II of the dorsal horn spinal cord (Figure 2B). Interestingly, IB4 afferents innervating the most lateral part of the spinal cord are present in both animals. These afferents are known to express MRGPRB4 (Liu et al., 2007), and they are not affected by the ablation of GINIP<sup>+</sup> neurons (Figures 2A and 2B). Finally, laminar organization of the dorsal horn appears normal as the PKC $\gamma$ <sup>+</sup> interneurons distribution remains intact in the GINIP-DTR mice (Figure 2B). Very importantly, GINIP<sup>+</sup> neurons in the brain were not affected by DT injection in GINIP-DTR mice as *ginip* transcripts are detected in GINIP<sup>+/+</sup> as well as in GINIP-DTR brain slices (Figure S2A). Altogether, these data show that our mouse model allows a highly controlled tissue specific and inducible neuronal ablation of GINIP<sup>+</sup> neurons and opens the possibility to unravel their functional specialization in adult mice.

#### **Ablation of GINIP-expressing neurons alters nerve-injury but not acute or inflammation-induced mechanical sensitivity.**

To gain insights into the functional role of the GINIP<sup>+</sup> neurons in somatosensation, we subjected GINIP-DTR mice to a large battery of somatosensory tests under acute and tissue or nerve injury conditions. GINIP-DTR mice have a normal body weight, and behave normally during the open field or rotarod tests, demonstrating that loss of GINIP<sup>+</sup> neurons has no impact on motor activity or anxiety-like behaviors (Figures S3A and S3B). We then subjected both genotypes to a variety of thermal tests including hot and cold plates and the thermal gradient tests. In these paradigms, GINIP-DTR mice behaved the same way as their GINIP<sup>+/+</sup> littermates, suggesting that GINIP<sup>+</sup> neurons are dispensable for the detection of temperature (Figures S3C-E).

We recently showed that GINIP<sup>+</sup> neurons encompass MRGPRD<sup>+</sup> neurons and C-LTMRs (Gaillard et al., 2014). Knowing that MRGPRD<sup>+</sup> neurons play a critical role in acute and inflammation-induced mechanical pain, we sought to analyze the mechanical sensitivity of GINIP-DTR mice in response to acute, inflammatory and nerve injury-induced mechanical stimuli using the Von Frey test. To our surprise, acute and CFA-induced mechanical sensitivity of GINIP-DTR mice was similar to that of their control littermates (Figures 3A-B). This data demonstrates that dual ablation of C-LTMRs and MRGPRD<sup>+</sup> neurons reverses the acute and CFA-induced mechanical hyposensitivity due to the selective ablation of MRGPRD<sup>+</sup> neurons alone (Cavanaugh et al., 2009), and suggests that C-LTMRs and MRGPRD<sup>+</sup> neurons play antagonistic roles in the modulation of acute and inflammation-induced mechanical sensitivity. To test the role of GINIP<sup>+</sup> neurons in nerve injury-induced mechanical pain, we used the chronic constriction injury (CCI) model (Bennett and Xie, 1988). In this paradigm, both

genotypes developed a clear CCI-induced mechanical hypersensitivity during the first two weeks post injury, and both genotypes showed an almost similar kinetic of recovery during the following weeks (Figure 3C1). Interestingly, comparison of the mechanical responses of the contralateral and the ipsilateral paws within each genotype showed that GINIP<sup>+/+</sup> mice recover normal mechanical sensitivity at day 21 post-surgery (Figure 3C2) whereas CCI-induced mechanical hypersensitivity is prolonged in GINIP-DTR mice (Figure 3C3), suggesting that GINIP<sup>+</sup> neurons play a critical role in neuropathic pain.

### **GINIP-expressing neurons are required for formalin-evoked pain hypersensitivity**

The formalin test is a widely used chemical test in pain research. However, the molecular mechanisms and the neuronal subpopulations underlying the nocifensive behavior triggered by formalin are largely unknown. In mice, injection of high dose of formalin (2 to 5%) induces a biphasic pain-like response characterized by flinching, licking and biting behaviors. In GINIP-DTR mice, intraplantar injection of 10  $\mu$ l of 2% formalin triggered a significant decrease in the formalin-evoked pain response during the first phase and a nearly complete absence of the second phase pain response (Figure 3D). Of note, ablation of MRGPRD<sup>+</sup> neurons alone or together with TRPV1<sup>+</sup> neurons had no effect on formalin-evoked pain (Shields et al., 2010). Combined ablation of both MRGPRD<sup>+</sup> and C-LTMRs led to a drastic deficit in formalin-evoked second phase pain hypersensitivity, indicating that GINIP-expressing neurons, most likely the C-LTMRs, are required for this pain process.

### **C-LTMRs' role in mechanical and formalin-evoked pain likely occurs through modulation of lamina III inhibitory interneurons.**

Little is known about the types of interneurons that are contacted by C-LTMRs in mice. To address this issue, we took advantage of TAF4<sup>Venus</sup> knock-in mice (Delfini et al., 2013) and performed ultrastructural studies. We found that Venus is expressed in a population of non-peptidergic primary afferent fibers (PAFs), projecting to the inner part of lamina II (Ili) of the dorsal horn (Figure 4A). The central terminal of these fibers form typical multisynaptic complexes referred to as glomeruli. In particular, Venus-expressing glomeruli are of the type Ia or non-peptidergic, having an electron-dense C bouton filled by small agranular synaptic vesicles, and being surrounded by numerous dendrites and one presynaptic vesicle-containing dendrite (V1) (Ribeiro da Silva, 2004).

To further characterize the TAF4-expressing terminals we performed a series of dual/multiple-immunolabeling experiments using GFP and VGLUT3 as markers of C-LTMRs and IB4 as a marker of non-peptidergic PAFs. Venus was specifically co-expressed with VGLUT3 in a subpopulation of type Ia

glomeruli, different from that immunopositive for IB4 (Figure 4B). Moreover, GFP and VGLUT3 colloidal gold particles were scattered over small, agranular vesicles of type Ia non-peptidergic glomeruli whereas IB4 was localized over the plasma membrane.

Given that non-peptidergic PAFs project to lamina III (Bailey and Ribeiro-da-Silva, 2006) and that excitatory PKC $\gamma$ <sup>+</sup> and inhibitory GABA<sup>+</sup> interneurons are localized in the same lamina (Magoul et al., 1987; Neumann et al., 2008), we evaluated the synaptic connections between Venus-expressing PAFs and lamina III interneurons. Venus<sup>+</sup> fibers form contacts onto GABA immunoreactive presynaptic vesicle-containing dendrites (V1; Figure 4C), whereas they never contact PKC $\gamma$  immunoreactive dendrites receiving synaptic contacts from myelinated PAFs, organized in glomeruli of the type II (Figure 4D). Given that Wang and Zylka have shown that MRGPRD<sup>+</sup> neurons innervate most known classes of substantia gelatinosa neurons except islet cells (Wang and Zylka, 2009), and based on the fact that Lu and Perl postulated that islet cells are connected by C-fibers that have features of C-LTMRs, our data strongly suggest that the GABA<sup>+</sup> interneurons connected by C-LTMRs likely correspond to islet inhibitory interneurons, and further support the idea that C-LTMRs activity antagonizes MRGPRD<sup>+</sup> neurons inputs at the spinal level.

## DISCUSSION

In this study, we used a genetic approach to selectively ablate two distinct subpopulations of cutaneous primary sensory neurons: MRGPRD<sup>+</sup> neurons and C-LTMRs. MRGPRD<sup>+</sup> neurons have been described to play a critical role in mechanical pain (Cavanaugh et al., 2009; Shields et al., 2010), whereas C-LTMRs ensure a dual function: they sense gentle touch under normal conditions (Loken et al., 2009) and contribute to mechanical pain under pathological conditions (Delfini et al., 2013). GINIP-DTR mice exhibited a drastic alteration of formalin-evoked pain, and in contrast to MRGPRD-DTR mice; they had normal acute and CFA-induced mechanical sensitivity, but exhibited prolonged CCI-induced mechanical pain.

The formalin test is a valid, reliable and tonic model of continuous pain. However, the neuronal subpopulations underlying the nocifensive behavior triggered by formalin are largely unknown. Genetic ablation of Nav1.8-expressing neurons alters a wide range of sensory modalities including formalin-evoked pain (Abrahamsen et al., 2008), demonstrating that DRG neurons largely contribute to the prototypical biphasic pain response evoked by formalin injection. A follow up study from Shield and colleagues shows that MRGPRD<sup>+</sup> and TRPV1<sup>+</sup> neurons, both of which largely eliminated in Nav1.8-DTA mice, were dispensable for formalin-evoked pain (Shields et al., 2010), demonstrating that formalin-evoked nocifensive behavior requires a relatively small population of primary sensory neurons. Here, we show that ablation of GINIP<sup>+</sup> neurons led to a severe deficit in the second phase of

formalin-evoked pain. Given that GINIP is expressed in MRGPRD<sup>+</sup> neurons and in C-LTMRs and that this protein is totally excluded from TRPV1<sup>+</sup>, MRGPRB4<sup>+</sup>, A $\beta$ , and A $\delta$  low threshold mechanoreceptors (Gaillard et al., 2014), our results strongly suggest that C-LTMRs represent the subpopulation of neurons that modulates the second phase of formalin-evoked pain. In line with this, we showed that lack of C-LTMRs-derived TFAFA4 leads to enhanced formalin-evoked second phase pain response (Delfini et al., 2013). Moreover, previous reports have shown that pharmacological ablation of TRPV1 central afferents during postnatal stages or in adult rats leads to a clear deficit in formalin-evoked pain (Peterson et al., 1997; Yaksh et al., 1979). However, when used in mice, this same ablation strategy had no effect (Shields et al., 2010). This species difference could certainly be explained by the fact that GINIP is totally excluded from TRPV1-expressing neurons in mice whereas it massively overlaps with TRPV1<sup>+</sup> neurons in rats (Figure S2B). Thus, it is conceivable that capsaicin-induced ablation of TRPV1<sup>+</sup> afferents in rats, leads to ablation of GINIP<sup>+</sup> neurons and alteration of formalin-evoked pain sensation.

How such a small population of neurons could play such an important role in modulating the second phase of formalin-evoked pain? In a recent study, Fischer and colleagues suggested that formalin-evoked first pain requires the activation of fibers at the site of injection, whereas the second pain response requires the centrifugal spread of formalin that will activate fibers located at a relatively long distance from the injected site (Fischer et al., 2014). Following this scenario, it is tempting to postulate that after injection of a high dose of formalin (2% or 5%), fibers located at the site of injection and exposed to high doses of formalin will be activated leading to the first pain response, and then desensitized leading to the interphase. During the interphase, the formalin will diffuse and its concentration will decrease, leading to activation of distant fibers, including C-LTMRs, therefore triggering the second phase of formalin-evoked pain.

How would activation of C-LTMRs modulate formalin-evoked second pain response? We and others have shown that central projections of C-LTMRs target the inner part of lamina II of the dorsal horn of the spinal cord (Delfini et al., 2013; Li et al., 2011; Seal et al., 2009). Using TFAFA4<sup>Venus</sup> mice, we show that C-LTMRs preferentially connect a subpopulation of inhibitory interneurons located in lamina II, likely the islet cells. Interestingly, Lu and Perl reported that islet cells are connected by a subset of C-fibers that have all the features of C-LTRMs (Lu and Perl, 2003). Furthermore, it has been shown that activation of islet cells exerts a strong inhibitory tone on central inhibitory neurons (Zheng et al., 2010) which themselves inhibit the excitatory vertical cells that connect projection neurons in the lamina I (Figure 4E, circuit 1). In the formalin paradigm, we propose a model in which, during the interphase, low doses of formalin will reach C-LTMRs fibers and activate the subset that expresses TRPA1 (Delfini et al., 2013). Activated C-LTMRs will lead to activation of islet cells which will inhibit central inhibitory neurons. Inhibition of central inhibitory neurons will lead to disinhibition

of excitatory vertical cells and the onset of the second phase of formalin-evoked pain. In line with this model, loss of C-LTMRs will fail to activate islet cells, freeing the central inhibitory neurons to exert their strong inhibitory tone on the excitatory vertical cells, thus preventing the onset of the second phase of formalin-evoked pain.

GINIP-DTR mice also exhibited another intriguing phenotype. They had normal acute and injury-induced mechanical sensitivity and exhibit a prolonged nerve injury-induced mechanical hypersensitivity. The first phenotype is opposite to that recently described by Cavanaugh and colleagues showing that selective ablation of MRGPRD<sup>+</sup> neurons caused strong mechanical hyposensitivity under acute and CFA-induced inflammation (Cavanaugh et al., 2009). In our study we show that dual ablation of MRGPRD<sup>+</sup> neurons and C-LTMRs totally abolished this phenotype, suggesting that C-LTMRs and MRGPRD<sup>+</sup> neurons play opposite roles in transducing mechanical stimuli. In line with this hypothesis, Zhang and colleagues have shown that ablation of MRGPRD<sup>+</sup> neurons reduced the firing of superficial dorsal horn nociceptive-specific neurons in response to graded mechanical stimulation (Zhang et al., 2013), and Lu and Perl identified a neural circuitry in the substantia gelatinosa in which innocuous impulses activating C-LTMRs suppress nociceptive inputs (Lu and Perl, 2003) (Figure 4E, circuit 2). Furthermore, compilation of a number of studies dealing with the role of islet cells in modulation of pain transmission allowed us to build up a model in which activation of islet cells by C-LTMRs will control several circuit modules: 1- inhibition of Galanin<sup>+</sup> inhibitory central cells that exert tonic inhibition on vertical cells (circuit 1), 2- inhibition of the excitatory central cells connecting vertical cells (circuit 2), 3- inhibition of PKC $\gamma$ <sup>+</sup> excitatory interneurons that connect Somatostatin<sup>+</sup> interneurons via excitatory central cells (circuit 3). Following this model, under normal conditions, a graded mechanical stimulation will activate low and high threshold mechanoreceptors. According to the gate control theory (Melzack and Wall, 1965), impulses from innocuous mechanoreceptive afferent fibers (LTMRs) will negatively modulate the noxious inputs involving afferent C-fibers. In MRGPRD-DTR mice, high threshold mechanical inputs from MRGPRD<sup>+</sup> neurons are decreased and the impulses emanating from LTMRs' activation will exert their inhibitory tone, further decreasing the firing of dorsal horn neurons to noxious mechanical stimulation. As a consequence, MRGPRD-DTR mice respond to much higher mechanical stimuli in comparison to their control littermates (Cavanaugh et al., 2009). In GINIP-DTR mice, ablation of C-LTMRs will release the brake imposed by C-LTMRs-mediated activation of islet cells (circuits 2 and 3), opening the gate for innocuous stimuli to reach spinal cord nociceptive neurons, thus reversing the hyposensitive phenotype due to ablation of MRGPRD<sup>+</sup> neurons alone.

In conclusion, our study identifies a major role for C-LTMRs in modulation of mechanical pain as well as formalin-evoked pain. Although these neurons have been described almost a century ago

(Zotterman, 1939), it's only recently that the functional role of C-LTMRs is getting enlightened. To definitely prove that our findings could be attributed to C-LTMRs alone, generation of a mouse model in which this particular population of neurons is ablated is warranted.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **Mice**

Mice were maintained under standard housing conditions (23°C, 40% humidity, 12 h light cycles, and free access to food and water). GINIP<sup>flx/+</sup> mice were previously generated in the laboratory (Gaillard et al., 2014). Special efforts were made to minimize the number as well as the stress and suffering of mice used in this study. All protocols are in agreement with European Union and national recommendations for animal experimentation.

### **In situ hybridization and immunostaining**

*In situ* hybridization and immunofluorescence were carried out following standard protocols (Moqrich et al., 2004). Briefly, animals were anesthetized and then transcardially perfused with 4% paraformaldehyde in PBS. Then, DRGs and spinal cord were dissected, post-fixed ON in the same fixative and cryoprotected into a sucrose solution. Samples were sectioned at 12µm (DRG section) or 16µm (spinal cord section). Probes were hybridized overnight at 55°C and the slides incubated with the horseradish peroxidase anti-digoxigenin/fluorescein/biotin antibodies (Roche). Final detection was achieved using fluorescein/cy3/cy5 TSA plus kit (Perkin Elmer). For double fluorescent *in situ* experiments, the first antibody was inactivated using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. For immunofluorescence, tissue sections were incubated in blocking solution for 1hr at RT, primary overnight at 4°C, and secondary antibody for 2hr at RT. Acquisition of images was performed on AxioImager Z1 (Zeiss). See Supplemental Experimental Procedures for further details.

### **Behavioral essays**

All behavior analyses (open field, rotarod, hot plate, cold plate, thermal gradient, Von Frey, and formalin test) were conducted on littermate males 8–12 weeks old. A detailed description of all these tests as well as Complete Freund's adjuvant (CFA) hindpaw injection and CCI is provided in Supplemental Experimental Procedures.

### **Tissue preparation for ultrastructural morphology**

Electron microscopic experiments were carried out on adult male TFAA4<sup>Venus</sup> heterozygous (+/-) mice (n=3). A standard protocol for ultrastructure tissue preparation was followed (Salio et al., 2005). In order to preserve GFP antigenicity and perform post-embedding immunogold labeling, sections were embedded with LR White acrylic resin. Details are available in Supplemental Experimental Procedures.

### **Post-Embedding Immunostaining protocol**

Sections were single, double and/or triple stained for GFP, IB4, VGLUT3, PKC $\gamma$  and GABA following a conventional post-embedding protocol (Merighi and Polak, 1993). Protocol and primary antibodies are described in Supplemental Experimental Procedures.

### **SUPPLEMENTAL INFORMATION**

Supplemental information includes Supplemental Experimental procedures, 3 figures and can be found with this article online at

### **Author contributions**

A.M conceived the project, L.U, S.G, L.L and P.M, performed all the experiments related to the molecular and functional characterization of the mouse model. C.S performed the EM experiments. L.U and S.G mounted all the figures, wrote the figure legends and the materials and methods, A.M and L.U wrote the paper.

### **Acknowledgments**

We are grateful to Serge Alonso for his comments on the manuscript. Thanks to J. Wood for providing Nav1.8 cre mice and L. F. Reichardt for providing anti TrkA antibodies. We would like to thank members of the laboratory for scientific discussions and IBDM imaging and animal facilities for assistance. L.U was funded by la Fondation pour la Recherche Médicale. This work has been funded by the ERC-Starting grant Paineurons 260435.

## Competing interests' statement

The authors declare that they have no competing financial interests.

## REFERENCES

- Abrahamsen, B., Zhao, J., Asante, C.O., Cendan, C.M., Marsh, S., Martinez-Barbera, J.P., Nassar, M.A., Dickenson, A.H., and Wood, J.N. (2008). The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain. *Science* 321, 702-705.
- Altier, C., Khosravani, H., Evans, R.M., Hameed, S., Peloquin, J.B., Vartian, B.A., Chen, L., Beedle, A.M., Ferguson, S.S., Mezghrani, A., *et al.* (2006). ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. *Nat Neurosci* 9, 31-40.
- Bailey, A.L., and Ribeiro-da-Silva, A. (2006). Transient loss of terminals from non-peptidergic nociceptive fibers in the substantia gelatinosa of spinal cord following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Neuroscience* 138, 675-690.
- Bennett, G.J., and Xie, Y.K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87-107.
- Cavanaugh, D.J., Lee, H., Lo, L., Shields, S.D., Zylka, M.J., Basbaum, A.I., and Anderson, D.J. (2009). Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9075-9080.
- Delfini, M.C., Mantilleri, A., Gaillard, S., Hao, J., Reynders, A., Malapert, P., Alonso, S., Francois, A., Barrere, C., Seal, R., *et al.* (2013). TFAFA4, a chemokine-like protein, modulates injury-induced mechanical and chemical pain hypersensitivity in mice. *Cell reports* 5, 378-388.
- Fischer, M., Carli, G., Raboisson, P., and Reeh, P. (2014). The interphase of the formalin test. *Pain* 155, 511-521.
- Gaillard, S., Lo Re, L., Mantilleri, A., Hepp, R., Urien, L., Malapert, P., Alonso, S., Deage, M., Kambrun, C., Landry, M., *et al.* (2014). GINIP, a Galphai-Interacting Protein, Functions as a Key Modulator of Peripheral GABAB Receptor-Mediated Analgesia. *Neuron* 84, 123-136.
- Li, L., Rutlin, M., Abaira, V.E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, M.P., Luo, W., Heintz, N., Koerber, H.R., *et al.* (2011). The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* 147, 1615-1627.
- Liu, Q., Vrontou, S., Rice, F.L., Zylka, M.J., Dong, X., and Anderson, D.J. (2007). Molecular genetic visualization of a rare subset of unmyelinated sensory neurons that may detect gentle touch. *Nat Neurosci* 10, 946-948.



Loken, L.S., Wessberg, J., Morrison, I., McGlone, F., and Olausson, H. (2009). Coding of pleasant touch by unmyelinated afferents in humans. *Nat Neurosci* 12, 547-548.

Lu, Y., and Perl, E.R. (2003). A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci* 23, 8752-8758.

Magoul, R., Onteniente, B., Geffard, M., and Calas, A. (1987). Anatomical distribution and ultrastructural organization of the GABAergic system in the rat spinal cord. An immunocytochemical study using anti-GABA antibodies. *Neuroscience* 20, 1001-1009.

Melzack, R., and Wall, P.D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150, 971-979.

Moqrich, A., Earley, T.J., Watson, J., Andahazy, M., Backus, C., Martin-Zanca, D., Wright, D.E., Reichardt, L.F., and Patapoutian, A. (2004). Expressing TrkC from the TrkA locus causes a subset of dorsal root ganglia neurons to switch fate. *Nat Neurosci* 7, 812-818.

Neumann, S., Braz, J.M., Skinner, K., Llewellyn-Smith, I.J., and Basbaum, A.I. (2008). Innocuous, not noxious, input activates PKC $\gamma$  interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J Neurosci* 28, 7936-7944.

Peterson, M.A., Basbaum, A.I., Abbadie, C., Rohde, D.S., McKay, W.R., and Taylor, B.K. (1997). The differential contribution of capsaicin-sensitive afferents to behavioral and cardiovascular measures of brief and persistent nociception and to Fos expression in the formalin test. *Brain Res* 755, 9-16.

Reynders, A., Mantilleri, A., Malapert, P., Rialle, S., Nidelet, S., Laffray, S., Beurrier, C., Bourinet, E., and Moqrich, A. (2015). Transcriptional Profiling of Cutaneous MRGPRD Free Nerve Endings and C-LTMRs. *Cell reports*.

Salio, C., Lossi, L., Ferrini, F., and Merighi, A. (2005). Ultrastructural evidence for a pre- and postsynaptic localization of full-length trkB receptors in substantia gelatinosa (lamina II) of rat and mouse spinal cord. *Eur J Neurosci* 22, 1951-1966.

Seal, R.P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S.N., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I., and Edwards, R.H. (2009). Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462, 651-655.

Shields, S.D., Cavanaugh, D.J., Lee, H., Anderson, D.J., and Basbaum, A.I. (2010). Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *Pain* 151, 422-429.

Stirling, L.C., Forlani, G., Baker, M.D., Wood, J.N., Matthews, E.A., Dickenson, A.H., and Nassar, M.A. (2005). Nociceptor-specific gene deletion using heterozygous Nav1.8-Cre recombinase mice. *Pain* 113, 27-36.

Wang, H., and Zylka, M.J. (2009). Mrgprd-expressing polymodal nociceptive neurons innervate most known classes of substantia gelatinosa neurons. *J Neurosci* 29, 13202-13209.

Yaksh, T.L., Farb, D.H., Leeman, S.E., and Jessell, T.M. (1979). Intrathecal capsaicin depletes substance P in the rat spinal cord and produces prolonged thermal analgesia. *Science* 206, 481-483.

Zhang, J., Cavanaugh, D.J., Nemenov, M.I., and Basbaum, A.I. (2013). The modality-specific contribution of peptidergic and non-peptidergic nociceptors is manifest at the level of dorsal horn nociresponsive neurons. *J Physiol* 591, 1097-1110.

Zheng, J., Lu, Y., and Perl, E.R. (2010). Inhibitory neurones of the spinal substantia gelatinosa mediate interaction of signals from primary afferents. *J Physiol* 588, 2065-2075.

Zotterman, Y. (1939). Touch, pain and tickling: an electro-physiological investigation on cutaneous sensory nerves. *J Physiol* 95, 1-28.

## FIGURE LEGENDS:

### Figure 1: Selective ablation of GINIP+ neurons in adult DRGs.

**A.** Schematic representation of the construct used to target the *ginip* locus. GINIP-DTR mice were obtained by crossing GINIPflx line with Nav1.8<sup>cre</sup> mice.

**B.** Expression of hDTR is restricted to GINIP positive neurons. Double immunostaining using goat anti-hDTR (red) and rat anti-GINIP (green) antibodies on DRG sections from GINIP-DTR and GINIP<sup>+/+</sup> littermate. hDTR expression is restricted to GINIP<sup>+</sup> neurons, only in GINIP-DTR mice. Scale bar: 100µm.

**C.** Injection of DT induced selective ablation of GINIP<sup>+</sup> neurons in GINIP-DTR mice. Double immunostaining using rabbit anti-TrkA (red) and rat anti-GINIP (green) antibodies shows a selective loss of GINIP<sup>+</sup> in GINIP-DTR mice without affecting TrkA<sup>+</sup> neurons.

**D.** Quantification of the total number of L4 DRGs neurons as well as the total number of neurons expressing the main markers of DRGs (n= 3 for each genotype).

**E.** Markers known to be expressed in GINIP<sup>+</sup> neurons such as *mrgprD*, *TH* or *tafa4* are lost in GINIP-DTR mice. Also see Figure S1.

### Figure 2: GINIP-expressing neurons ablation occurs in a cell specific manner.

**A.** *In-situ* hybridization using *cgrp* and *mrgprB4* antisense probes and IB4 staining on DRG section from GINIP-DTR and WT injected with diphtheria toxin. Neuronal populations which do not express GINIP in the adult are not affected by DT injection in GINIP-DTR. Scale bar: 100µm.

**B.** Double immunostaining using rat anti-GINIP, goat anti-CGRP and rabbit anti-PKCγ antibodies on spinal cord section from DT-injected GINIP-DTR and control mice. GINIP innervation (green) is completely gone in GINIP-DTR, whereas CGRP<sup>+</sup> afferents (red) and PKCγ<sup>+</sup> interneurons (red) are not affected. Note that IB4 residual neurons (green) in DRG are all *mrgprB4*<sup>+</sup> and correspond to the residual IB4 staining in the lateral part of the spinal cord. Scale bar: 200µm. Also see Figures S1 and S2.

**Figure 3: GINIP neurons transduce mechanical and formalin-evoked pain hypersensitivity.**

- A.** No difference in mechanical threshold between GINIP-DTR mice and WT littermate before ( $0.749 \pm 0.09$  and  $0.759 \pm 0.05$  /  $n=10$  and  $10$ ) or after DTX injection ( $0.631 \pm 0.06$  and  $0.501 \pm 0.05$  /  $n=10$  and  $8$ , respectively)
- B.** No difference in CFA induced mechanical hypersensitivity between GINIP-DTR mice and WT littermate ( $n=10$  and  $11$ , respectively)
- C1.** GINIP-DTR and WT littermate developed a clear CCI-induced mechanical hypersensitivity during the first two weeks post injury with no significant difference between genotypes ( $n=9$  and  $8$ , respectively).
- C2.** Comparison of mechanical responses of the contralateral and the ipsilateral paws in GINIP<sup>+/+</sup> mice. GINIP<sup>+/+</sup> mice recover normal mechanical sensitivity at day 21 post-surgery.
- C3.** Comparison of mechanical responses of the contralateral and the ipsilateral paws in GINIP-DTR mice shows that GINIP-DTR mice exhibit a prolonged CCI-induced mechanical hypersensitivity up to 60 days post injury.
- D.** Impaired formalin-evoked pain in DT-injected GINIP-DTR and WT littermate mice ( $n=11$  and  $12$  respectively). GINIP-DTR mice response to formalin-evoked pain is drastically altered with a moderate first phase ( $p=0.008$ ) and an almost complete abolition of the second phase ( $p<0.001$ ) compared to biphasic WT response. Also see Figure S3.

**Figure 4: C-LTMRs contact inhibitory GABAergic interneurons in the TAF4<sup>venus/+</sup> spinal cord (electron microscopy) - An integrated model**

- A.** A GFP-immunoreactive type Ia glomerular terminal (Gla) is surrounded by five unlabelled dendrites (d) and one vesicle-containing dendrite (V1). GFP-labeling is characterized by 10 nm-colloidal gold particles, as a result of post-embedding immunogold staining, and is scattered over small, agranular vesicles (insert). Scale bar, 300 nm; insert, 10 nm.
- B.** Two immunoreactive type Ia non-peptidergic glomeruli (Gla) are surrounded by several unlabeled dendrites (d) and one vesicle-containing dendrite (V1). The Gla at the top is double labeled for GFP and VGLUT3 (top right insert), while the Gla at the bottom is only immunopositive for IB4 (bottom left insert). GFP (10-nm gold particles) and VGLUT3 (30-nm gold particles) are scattered over small agranular vesicles of the Gla terminal, while IB4 (20-nm gold particles) is exclusively localized over the plasma membrane.
- Scale bar, 300 nm; inserts, 30 nm.

**C.** A unique GFP + VGLUT3-immunoreactive type Ia terminal (Gla) is surrounded by three unlabelled dendrites, one GABA-immunolabelled vesicle-containing dendrite (V1) and one unlabeled V1. GFP (10-nm gold particles) and VGLUT3 (30-nm gold particles) dots are scattered over small agranular vesicles of the Gla terminal (top insert). GABA (20-nm gold particles) dots are distributed in the intracellular aspect of the V1 (bottom insert). Scale bar, 300 nm; insert, 30 nm.

**D.** A PKC $\gamma$ -immunolabelled dendrite (d) is post-synaptic (arrowheads) to an unlabelled type II glomerular terminal (GII) originating from a myelinated fiber. The GII terminal is also surrounded by five unlabelled dendrites (d) and two peripheral axons (V2). PKC $\gamma$  (20 nm-gold particles) dots are distributed in the intracellular aspect of the dendrite (insert). Scale bar, 300 nm; insert, 20 nm

Figure 1

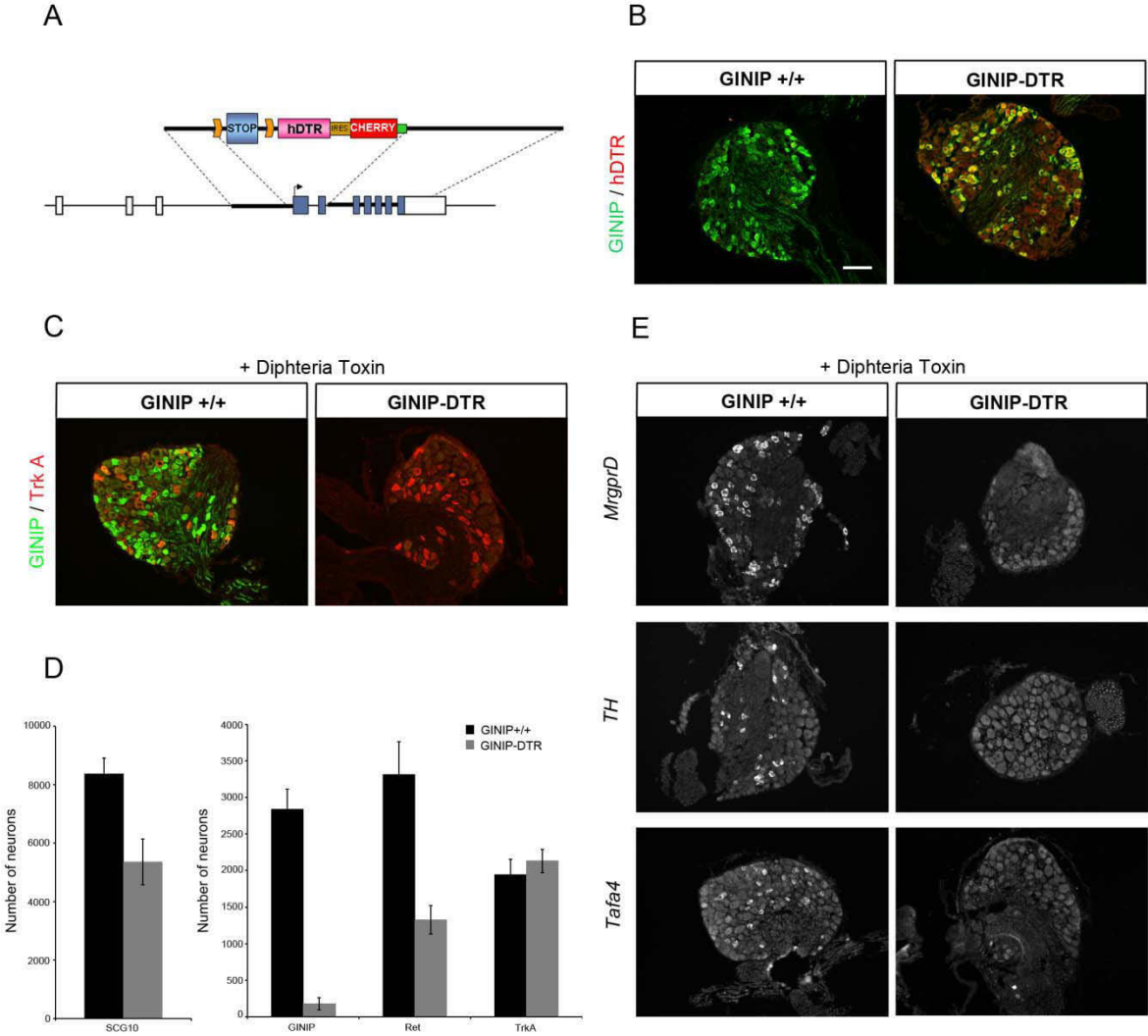
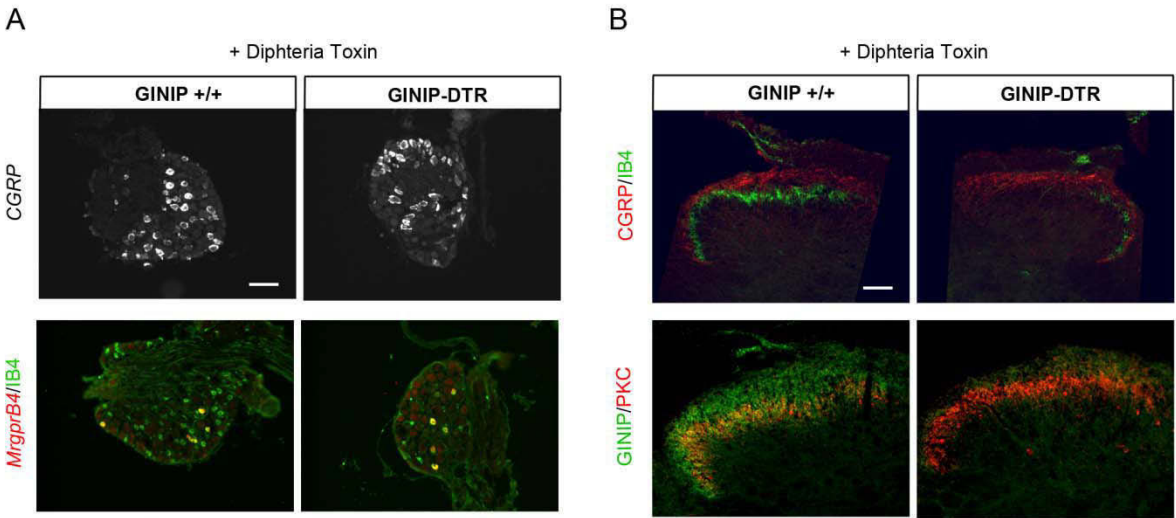


Figure 2



**Figure 3**

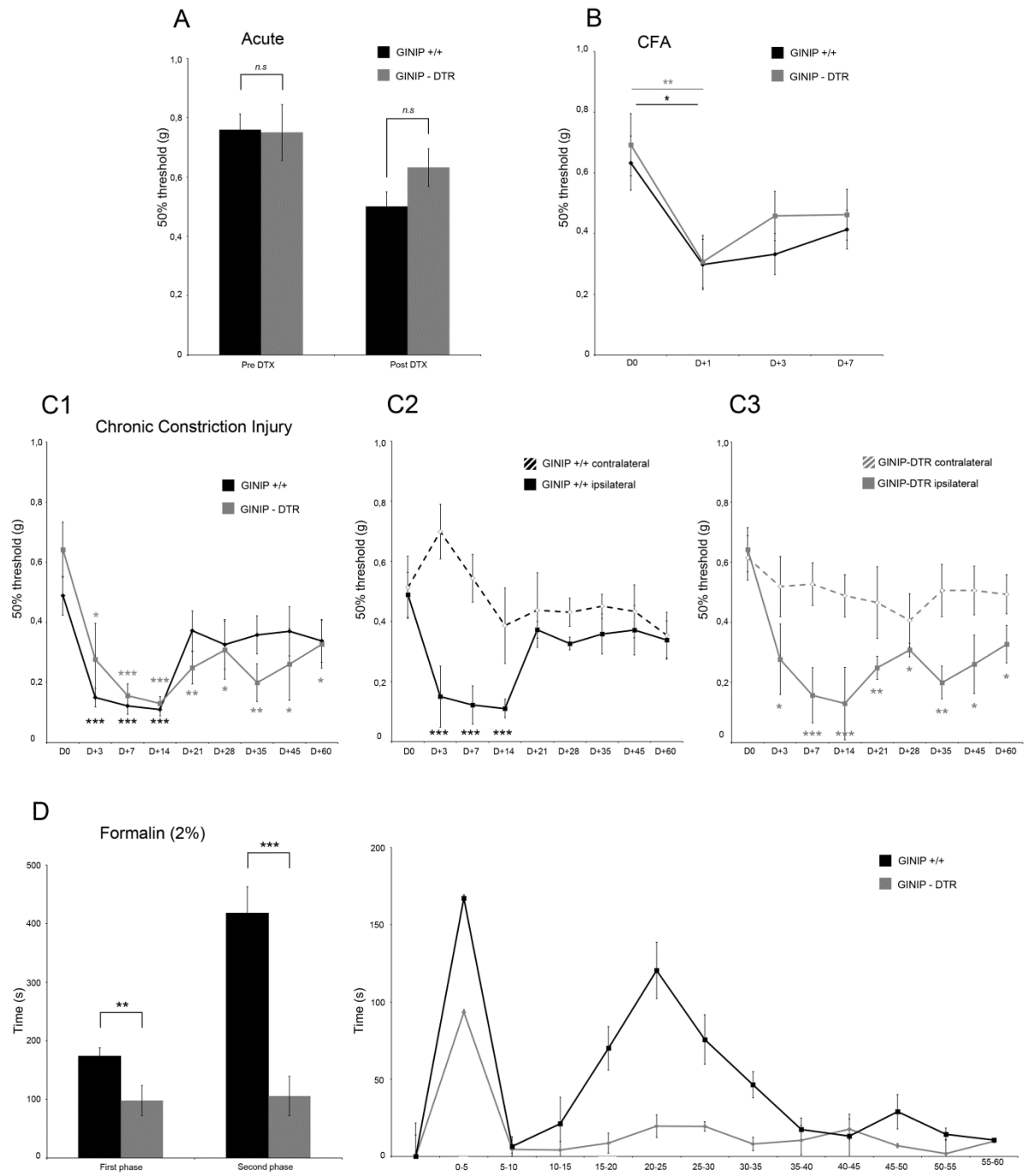
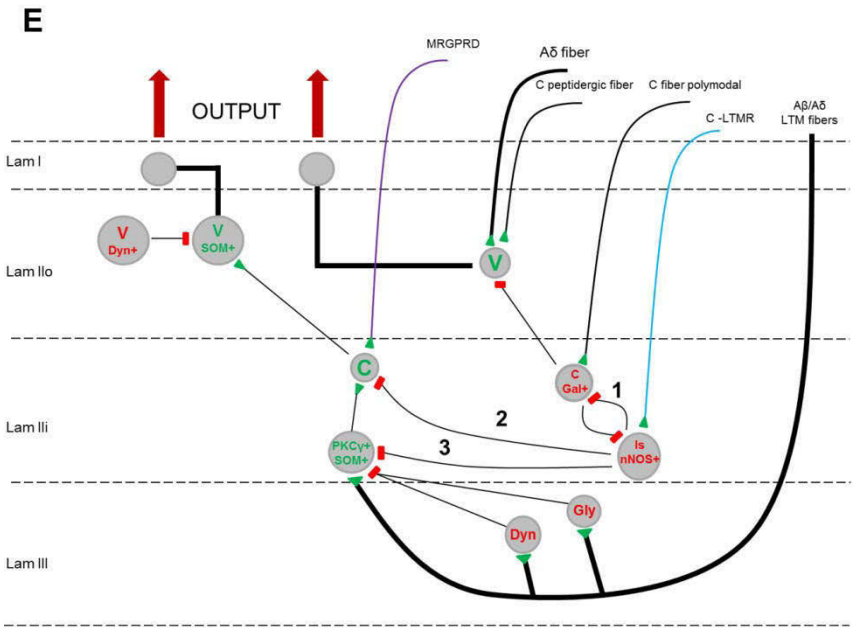
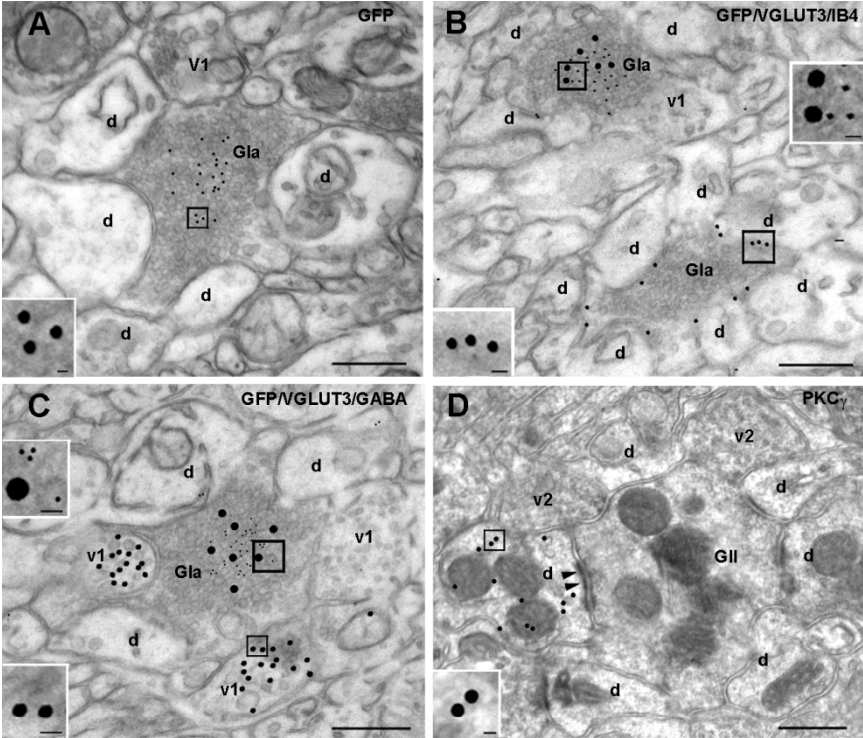


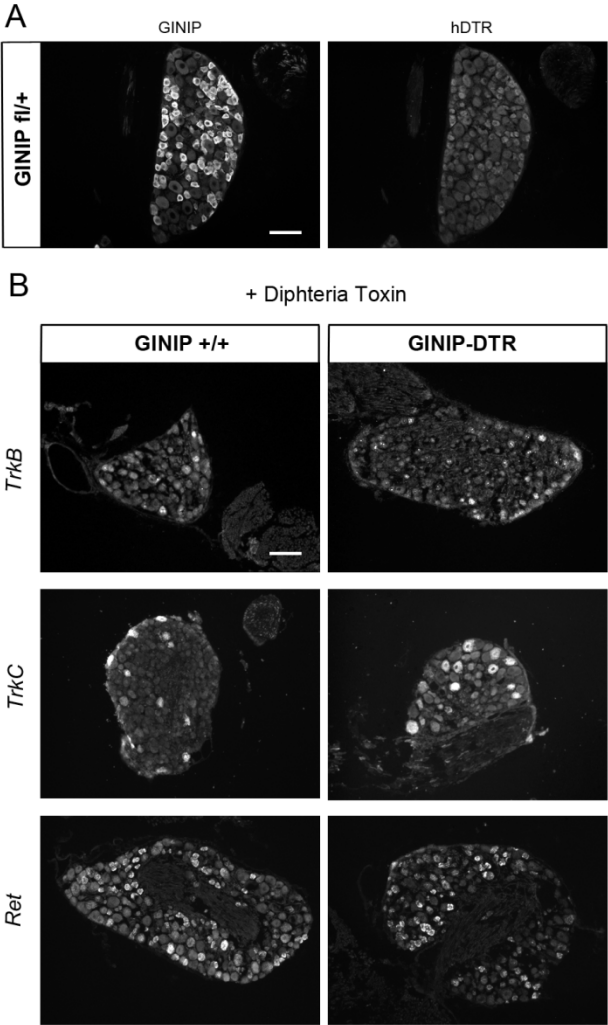


Figure 4

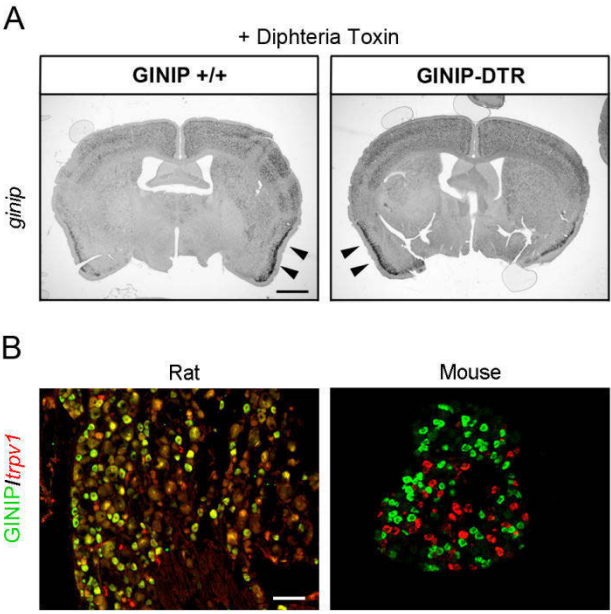


SUPPLEMENTARY FIGURES

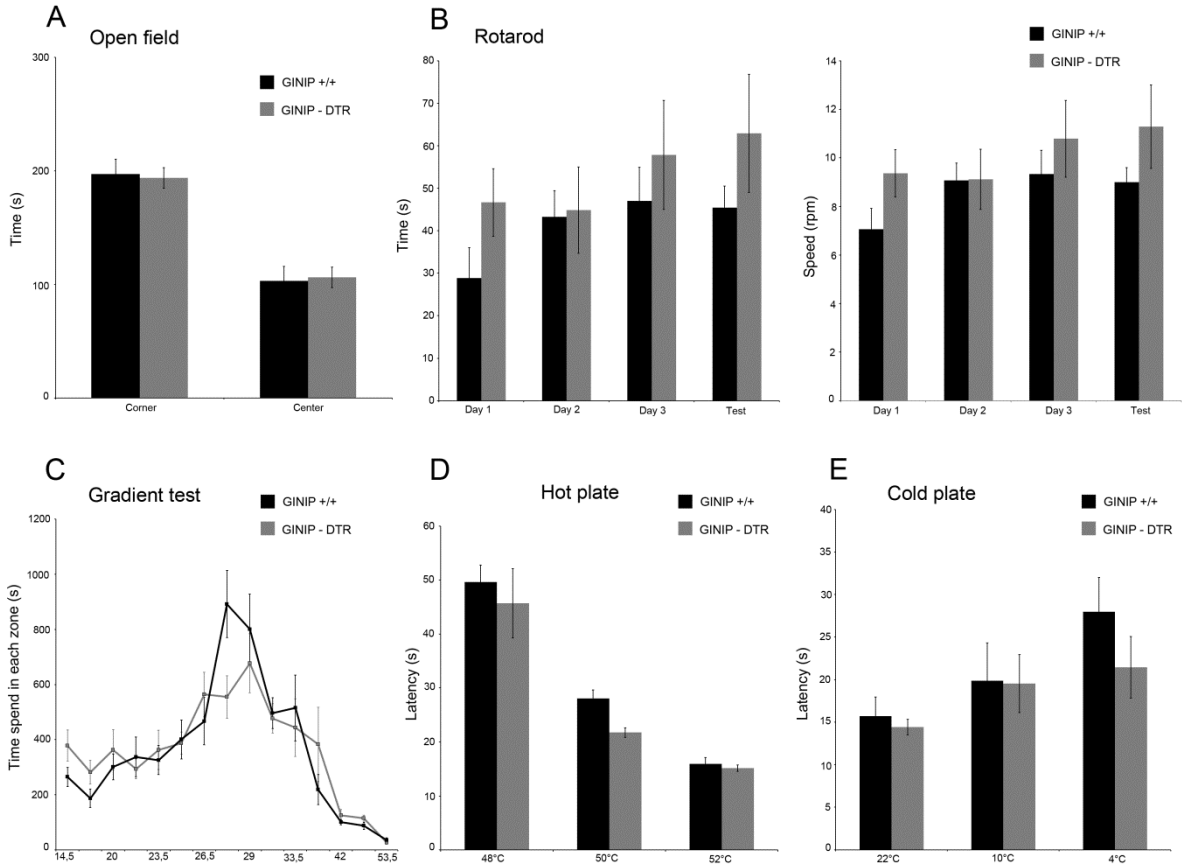
Figure S1



**Figure S2**



**Figure S3**



## SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

### Figure S1: GINIP-expressing neuron ablation occurs in a cell specific manner.

A. Immunostaining using rat anti-GINIP and goat anti-hDTR antibodies in GINIP<sup>fl/+</sup> DRG validates no expression of hDTR in GINIP neurons before DRG specific cre recombination.

B. *In-situ* hybridization on DRG sections using antisense probes for, *trkB*, *trkC* and *Ret*

Scale bar: 100µm.

### Figure S2: Characterization of GINIP-DTR mice

A. *In-situ* hybridization using *ginip* antisense probe on brain coronal sections from GINIP-DTR and WT injected with DT. GINIP+ neurons are not ablated in the brain. Strong staining in the cortex and in the piriform cortex (arrowhead) is still present in DT-injected GINIP-DTR mice. Scale bar: 1mm.

B. GINIP+ and TRPV1+ neurons are massively overlapping in rat DRG, whereas these two subsets of neurons are completely excluded from each other in mouse DRG. *In-situ* hybridization using antisense *trpv1* probe (red) followed by immunostaining for GINIP (green) on a rat DRG section or double *in situ* hybridization using antisense probes for *trpv1* (red) and *ginip* (green) on a mouse DRG section. Scale bar: 100µm.

### Figure S3: DT-injected GINIP-DTR mice display normal temperature and exploratory

DT-injected GINIP-DTR and wild-type mice behave in the same way in open field (A, n= 8 and 10, respectively), rotarod (B, n=14 and 6, respectively), acute thermal gradient test (C, n=10 and 9, respectively), hot plate (D, n=7 and 6, respectively) and in cold test (E, n=9 and 7, respectively).

## SUPPLEMENTARY EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Mice*

Mice were maintained under standard housing conditions (23°C, 40% humidity, 12h light cycles, and free access to food and water). Special effort was made to minimize the number as well as the stress and suffering of mice used in this study. All protocols are in agreement with European Union recommendations for animal experimentation.

### *In situ hybridization and immunofluorescence*

*In situ* hybridization and immunofluorescence were carried out following standard protocols (Moqrich et al., 2004). To obtain adult tissues, animals were deeply anesthetized with a mix of ketamine/xylazine and then transcardially perfused with an ice-cold solution of 4% paraformaldehyde in PBS. After dissection, they were post-fixed ON in the same fixative at 4°C. Tissues were then transferred into a 30% (w/v) sucrose solution for cryoprotection before being frozen 24h later and stored at -80°C. Samples were sectioned at 12µm (DRG section) or 16µm (spinal cord section) using a standard cryostat (Leica).

RNA probes were synthesized using gene-specific PCR primers and cDNA templates from mouse DRG. Double fluorescent *in situ* hybridization was carried out using a combination of digoxigenin and fluorescein/biotin labeled probes. Probes were hybridized overnight at 55°C and the slides incubated with the horseradish peroxidase anti-digoxigenin/fluorescein/biotin antibodies (Roche). Final detection was achieved using fluorescein/cy3/cy5 TSA plus kit (Perkin Elmer). For double fluorescent *in situ* experiments, the first antibody was inactivated using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.

The following oligonucleotides were used for the nested PCRs for probe synthesis:

*GINIP-F1*: CAGGATAGGTGGGACAGAGAAG,  
*GINIP-R1*: ATGTATCTCCTGCCTGCTTCAT,  
*GINIP-F2*: TACCTGCTATGGATC,  
*GINIP-R2+T7*: TAATACGACTCACTATAGGGTTCTCCTGAAACCAT,  
*MrgprD-F1*: GGGCATCAACTGGTTCTTACTC,  
*MrgprD-R1*: AGGGATTGTCTTGACTGTCTG,  
*MrgprD-F2*: AACGGGATGTGAGGCTACTTTA,

*MrgprB4-F1: GGACCTGTGCCAGATATTCC,*  
*MrgprB4-R1: GGACCCCTCTCTCCACTCTC,*  
*MrgprB4-F2: CAGGAATGCCAGTGGAAAAT*  
*MrgprB4-R2+T7 : TAATACGACTCACTATAGGGCATCGCAACCTGTGTTGTCT,*  
*TrkB-F1: CTGAGAGGGCCAGTCACTTC,*  
*TrkB-R1: CATGGCAGGTCAACAAGCTA,*  
*TrkB-F2: CAGTGGGTCTCAGCACAGAA,*  
*TrkB-R2+T7: TAATACGACTCACTATAGGGCTAGGACCAGGATGGCTCTG,*  
*SCG10-F1: GCAATGGCCTACAAGGAAAA,*  
*SCG10-R1: GGCAGGAAGCAGATTACGAG,*  
*SCG10-F2: AGCAGTTGGCAGAGAAGAGG,*  
*SCG10R2+T7: TAATACGACTCACTATAGGGGGCAGGAAGCAGATTACGAG.*

For immunofluorescence, primary antibodies were diluted in PBS-10% donkey serum (Sigma)-3% bovine albumin (Sigma)-0.4% triton-X100 and incubated overnight at 4°C. Primary antibodies used in this study are as follows: rabbit anti-TrkA 1:1000 (generous gift from Dr. L. Reichardt, University of California), goat anti-TrkC 1:500 (R&D systems), goat anti-Ret 1:500 (R&D systems), goat anti-CGRP 1:1000 (Acris antibodies), rabbit anti-PKC $\alpha$  1:1000 (Santa Cruz Biotechnology). Corresponding donkey or goat anti-rabbit, anti-rat and anti-goat Alexa 488, 555, or 647 (Invitrogen or Molecular probe antibodies) were used for secondary detection. Isolectin B4 conjugates with AlexaFluorR 488, 568 or 647 dye was used at 1:200 (Invitrogen). Acquisition of images was performed on Axiolmager Z1 (Zeiss).

### ***Cell counts and statistical analysis***

We adopted a strategy that has been previously validated for DRG cell counts (Chen et al., 2006). Briefly, 12  $\mu$ m serial sections of thoracic DRG were distributed on 6 slides which were subjected to different markers including the pan-neuronal marker *SCG10*. This approach allowed us to refer all countings to the total number of neurons (*SCG10*<sup>+</sup>). For each genotype, both lumbar (L4) DRG were counted in three independent animals. All cell counts were conducted by an individual who was blind to mice genotypes. Statistical significance was set to  $p < 0.05$  and assessed using one way ANOVA analysis followed by unpaired t-test

### ***Production of rat anti-GINIP antibody***

Full length recombinant GINIP protein was expressed in *E.coli* as a GST fusion protein using pGEX-6P vector. Glutathione-sepharose beads coated with GST-GINIP were incubated overnight at 4°C in TBS containing 1mM DTT, 1mM EDTA and 10U of PreScission Protease (GE Healthcare) per 250ml of culture. Supernatant contained only GINIP fragment and was injected intraperitoneally into rats (200µg per injection) four times at two weeks intervals. Rats were sacrificed one week after the last injection and sera were harvested. Serum can be directly used at dilution 1:1000 to 1:5000.

### ***Behavioral essays***

All behaviour analyses were conducted on littermate males 8–12 weeks old. Animals were acclimated for one hour to their testing environment prior to all experiments that are done at room temperature (~22°C). Experimenters were blind to the genotype of the mice during testing. The number of tested animals is indicated in the figure legends section. Statistical significance was set to  $p < 0.05$  and assessed using one way ANOVA analysis followed by unpaired t-test. All error bars represent standard error of the mean (SEM). Gradient, Thermal plates, open-field, and Von Frey apparatus were from Bioseb instruments.

#### ***Open-field test***

The Open-field test is commonly used to assess locomotor, exploratory and anxiety-like behavior. It consists of an empty and bright square arena (40x40x35cm), surrounded by walls to prevent animal from escaping. The animals were individually placed in the center of the arena and their behavior recorded with a video camera over a 5 min period and the time spent in the corner versus the center of the arena is recorded.

#### ***Rotarod test***

A rotarod apparatus (LSI Letica Scientific Instruments) was used to explore coordinated locomotor and balance function in mice. Mice were placed on a rod that slowly accelerated from 4 rpm to 44 rpm with a constant speed of rotation over 5min and the latency to fall off during this period was

recorded. The test was done 4 consecutive days. Each day, the animals were tested three times separated by at least 5 min resting period.

#### *Temperature gradient arena*

Response to temperature Gradient assay was performed as described previously (Moqrich et al., 2005). Briefly, mice were individually video tracked for 90 min in four separate arenas of the thermal gradient apparatus (Bioseb). A controlled and stable temperature gradient of 14°C to 55°C was maintained using two Peltier heating/cooling devices positioned at each end of the aluminium floor. Each arena was virtually divided into 15 zones of equal size (8 cm) with a distinct and stable temperature. Floor temperature was measured with an infrared thermometer (Bioseb). The tracking was performed using a video camera controlled by the software provided by the manufacturer.

#### *Hot plate test*

To assess heat sensitivity, mice were placed individually on a metal surface maintained at 48°, 50° or 52°C and the latency to nociceptive responses are measured (licking, shaking of hind paws or jumping). To prevent tissue damage, mice were removed from the plate immediately after a nociceptive response or a cut-off 90s, 60s and 45s was applied respectively. Each mouse has been tested three times with a 5 min interval between each test. The withdrawal time corresponds to the mean of the three measures.

#### *Cold plate*

To test cold sensitivity, mice were placed individually into a plexiglass chamber maintained at 22°, 10°, 4°C or 0°C. The Rearing time of the mice is monitored for one minute. Each mouse is exposed three times to each temperature with a minimum of 5 min resting period between trials and one hour separating periods between temperatures.

#### *Formalin test*

Mice were housed individually into Plexiglass chambers 20 min before injection. Following intraplantar injection of 10µl of a 2% formalin solution (Fischer Scientific) into left hindpaw, time



spent to shaking, licking or lifting the injected paw was monitored for 60min and analysed at 5 min intervals.

#### *Von Frey test of mechanical threshold*

Mice were placed in plastic chambers on a wire mesh grid and stimulated with von Frey filaments (Bioseb) using the up-down method (Chaplan et al., 1994) starting with 1g and ending with 2.0g filament as cutoff value.

#### *Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced mechanical allodynia*

We made an intraplantar injection of 10µl of a 1:1 saline/CFA (Sigma, St. Louis, MO, USA) emulsion with a 30 gauge needle and measured mechanical thresholds one, three and seven days after the injection using the Von Frey hair filaments using the up-down method.

#### *Unilateral peripheral mononeuropathy*

For the chronic constriction of the sciatic nerve (CCI) model, unilateral peripheral mononeuropathy was induced in mice anaesthetized with Ketamine (40mg/kg ip) and Xylazine (5mg/kg ip) with three chromic gut (4\_0) ligatures tied loosely (with about 1mm spacing) around the common sciatic nerve (Bennett and Xie, 1988). The nerve was constricted to a barely discernable degree, so that circulation through the epineurial vasculature was not interrupted (Descoeur et al., 2011). For the chronic constriction model, mechanical allodynia was assessed before the surgery and three, seven and once a week post-surgery using the Von Frey hair filaments using the up-down method.

Bennett, G.J., and Xie, Y.K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87-107.

Chen, C.L., Broom, D.C., Liu, Y., de Nooij, J.C., Li, Z., Cen, C., Samad, O.A., Jessell, T.M., Woolf, C.J., and Ma, Q. (2006). Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neuron* 49, 365-377.

Descoeur, J., Pereira, V., Pizzoccaro, A., Francois, A., Ling, B., Maffre, V., Couette, B., Busserolles, J., Courteix, C., Noel, J., et al. (2011). Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO molecular medicine* 3, 266-278.

Moqrich, A., Earley, T.J., Watson, J., Andahazy, M., Backus, C., Martin-Zanca, D., Wright, D.E., Reichardt, L.F., and Patapoutian, A. (2004). Expressing TrkC from the TrkA locus causes a subset of dorsal root ganglia neurons to switch fate. *Nat Neurosci* 7, 812-818.

Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S., Andahazy, M., Story, G.M., and Patapoutian, A. (2005). Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307, 1468-1472.

**DISCUSSION**

**&**

**PERSPECTIVES**

Notre organisme est constamment soumis à des stimuli externes que nous sommes capables d'assimiler grâce à notre système nerveux somato-sensoriel. Un stimulus, par exemple douloureux, est détecté au niveau périphérique grâce aux neurones primaires sensoriels spécialisés appelés nocicepteurs. L'information est ensuite transmise aux neurones de moelle épinière puis au cerveau afin d'y être traitée.

Les stimuli nociceptifs peuvent être de nature différente (thermique, chimique, mécanique), et cette variété peut être discriminée et détectée par différents types de nocicepteurs. Le but de mon projet de thèse a été d'étudier quelle modalité sensorielle était en mesure d'être détectée par une population de neurones sensoriels nouvellement découverte, les neurones GINIP+. Pour cela, j'ai tiré avantage de la génération dans notre laboratoire d'un modèle murin permettant l'ablation génétiquement ciblée de cette population au niveau des ganglions dorsaux rachidiens.

## **1. Caractérisation d'un nouveau modèle murin**

Dans un premier temps, nous avons validé notre modèle murin d'un point de vue moléculaire et cellulaire. L'expression du récepteur humain à la toxine diphtérique, spécifiquement dans les neurones GINIP+ du DRG, permet l'ablation de ces neurones après injection de la toxine. Cette ablation est spécifique aux neurones GINIP+, et ne modifie pas la proportion des autres populations neuronales à l'âge adulte.

J'ai précédemment mentionné des études pratiquant des ablations de sous populations de neurones du DRG à des stades différents du développement. L'ablation des neurones Nav1.8+ s'effectue au stade embryonnaire, elle conduit à une très forte diminution des phénotypes douloureux thermiques, et joue un rôle dans les douleurs induites par l'injection de formaline (Abrahamsen et al., 2008). Cependant, l'interprétation de ces résultats doit être nuancée. Le gène Nav1.8 possède une expression dynamique au cours du développement et son expression à l'âge adulte est plus restreinte qu'au stade embryonnaire. De ce fait, les phénotypes observés pourraient être liés à la perte d'autres populations neuronales plutôt qu'uniquement dus à celle exprimant le canal Nav1.8 à l'âge adulte. Des mécanismes de plasticité pourraient compenser la perte de ces neurones au cours du développement.

Cette notion de compensation est très largement illustrée dans l'étude consistant en l'ablation des neurones MRGPRD menée par le laboratoire d'Anderson (Cavanaugh et al., 2009). Les auteurs ont utilisés deux modèles d'ablation : une ablation à l'âge adulte des neurones MRGPRD – DTX (comparable à notre stratégie) et une ablation développementale MRGPRD – DTA. De manière très intéressante, la mort des neurones à l'âge adulte entraîne une hyposensibilité mécanique chez les

animaux ablatés ; tandis que la mort développementale, n'a pas d'effet sur la sensibilité mécanique des animaux MRGPRD-DTA. La mise en place de mécanismes compensatoires est fortement suggérée.

Face à ce constat, il nous est apparu possible qu'une certaine plasticité puisse également avoir lieu à l'âge adulte après une perte neuronale, notamment au sein de la population des neurones « survivants » : vont-ils changer leur phénotype, exprimer de nouveaux canaux afin de pallier cette perte ? Pour répondre à cette question, j'ai comparé les neurones du DRG de souris GINIP<sup>flox/+</sup>; Nav1.8<sup>Cre+</sup> n'ayant pas reçu d'injection de toxine diphtérique aux neurones de souris GINIP<sup>flox/+</sup>; Nav1.8<sup>Cre+</sup> injectées (GINIP-DTR). Les animaux GINIP<sup>flox/+</sup>; Nav1.8<sup>Cre+</sup> expriment le rapporteur fluorescent mcherry dans les neurones GINIP+, la population disparaissant dans les animaux GINIP-DTR. J'ai donc effectué des expériences d'imagerie calcique sur des cultures primaires de neurones du DRG au cours desquelles j'ai utilisé des agonistes pharmacologiques différents, chacun étant spécifique d'un sous type de récepteur présent dans les neurones du DRG.

Si les neurones GINIP- changent leur réponse aux agents pharmacologiques après ablation de la population GINIP+, nous pouvons supposer que de nouveaux canaux sont exprimés dans ces neurones et qu'ils sont donc en mesure d'adapter leur phénotype pour continuer à répondre à toutes sortes de stimuli.

Les données obtenues lors de ces expériences sont malheureusement sujettes à trop d'interprétations. En effet, la protéine mcherry permettant de discriminer les neurones GINIP+ des neurones GINIP- produit énormément d'auto-fluorescence dans nos conditions d'enregistrement, il a donc été difficile de discriminer avec certitude les sous populations. Cependant, j'ai effectué un marquage IB4+ sur ces cultures de neurones, ce qui m'a permis d'observer les réponses des neurones IB4- avant et après ablation des neurones GINIP+.

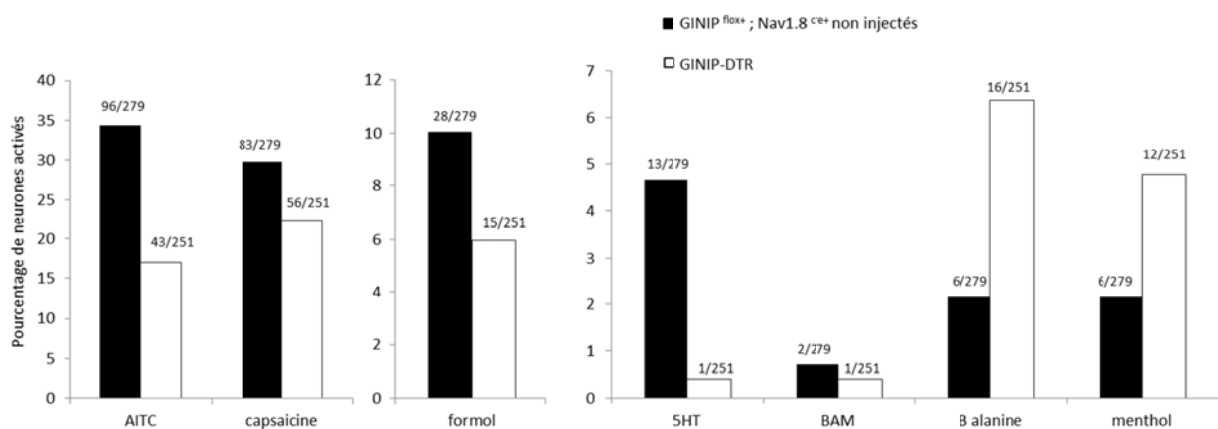


Figure 14 : Proportion de neurones IB4 - ayant répondu aux différents agents pharmacologiques selon les génotypes.

AITC : Isothiocyanate d'allyle (100µM), agoniste du canal TRPA1 ; capsaïcine (1µM), agoniste du récepteur TRPV1 ; formol (0.02%), agoniste du canal TRPA1 ; 5HT : sérotonine, agoniste des récepteurs 5HT ; BAM8-22 : Bovine Adrenal Medulla 8-22, agoniste du récepteur MRGPRC11 ; B alanine : béta alanine, agoniste du récepteur MRGPRD ; menthol, agoniste du canal TRPM8.

On peut observer une diminution des réponses à l'AITC (agoniste TRPA1), à la capsaïcine (agoniste TRPV1), au formol (faible dose, agoniste TRPA1), à la sérotonine (5HT, agoniste des récepteurs 5HT), ainsi qu'une augmentation des réponses à la β alanine (agoniste MRGPRD) et au menthol (agoniste TRPM8). Néanmoins, l'interprétation des résultats s'est révélée compliquée. Une partie des neurones GINIP exprime l'IB4, il s'agit des neurones MRGPRD+ ; une autre sous population, les C-LTMRs, ne l'expriment pas, et enfin certains neurones IB4+ n'expriment pas la protéine GINIP. Lorsque je procède à l'ablation des neurones GINIP+, des neurones IB4+ (MRGPRD+), une partie de neurones IB4- (C-LTMRs) sont donc éliminés mais et une petite partie des neurones IB4+ subsistent. Les changements observés peuvent donc être dus à différents phénomènes.

De plus, j'ai procédé à des stimulations pharmacologiques successives des différents agonistes en utilisant deux sens de stimulation.

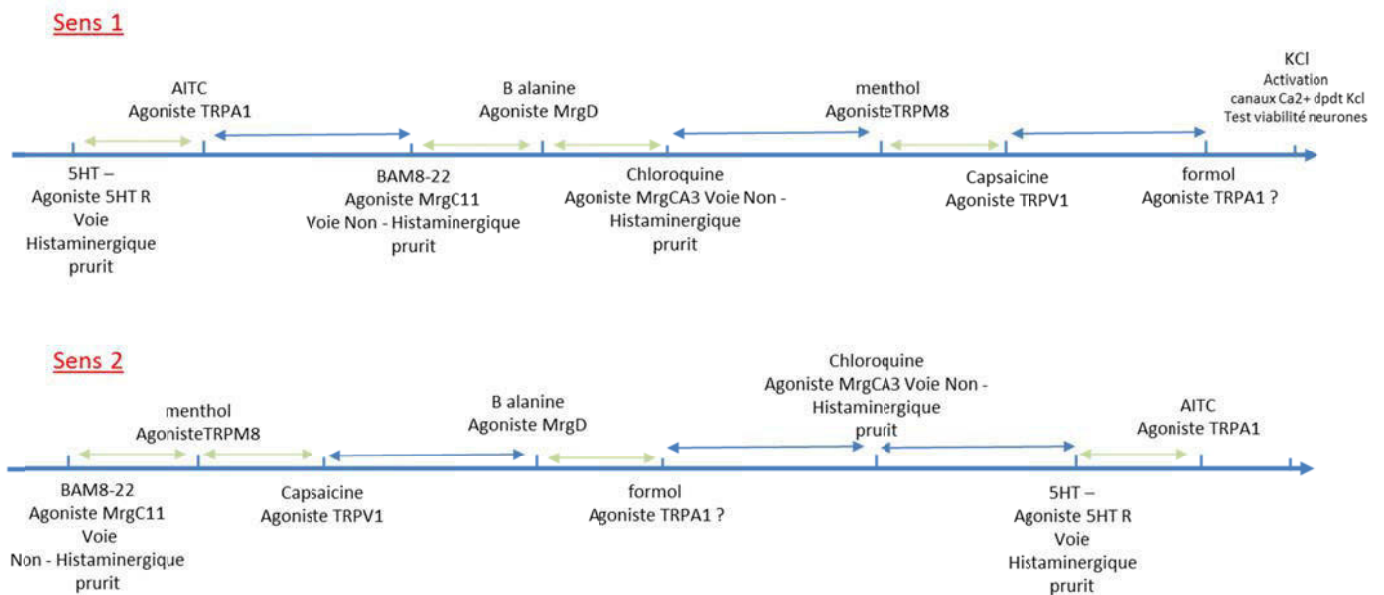
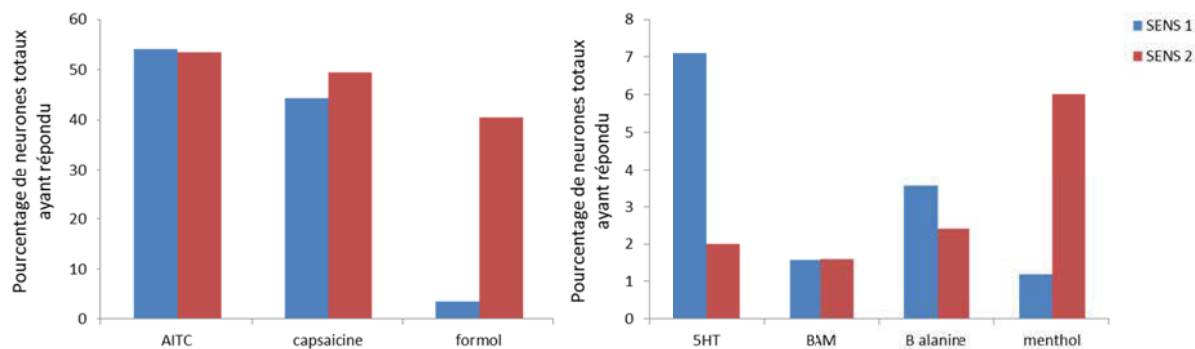


Figure 15 : Représentation schématique des protocoles de stimulation pharmacologique utilisés lors des expériences d'imagerie calcique. Deux sens de stimulation ont été utilisés dans deux sets d'expériences différentes, sur des mêmes animaux.

Il est clairement apparu que l'ordre d'utilisation des agonistes a une influence sur les réponses aux autres drogues. L'activation d'un récepteur peut bloquer ou potentialiser un autre récepteur également présent à la surface du même neurone et donc modifier la réponse.



**Figure 16 :** Effets différentiels des sens de stimulation sur les réponses des neurones totaux d'une souris contrôle GINIP<sup>flox/+</sup> ; Nav1.8<sup>cre+</sup>

Par exemple, l'application successive de formol puis d'AITC (deux agonistes de TRPA1) provoque deux réponses séparées du même neurone TRPA1+. Par contre, si je stimule d'abord avec l'AITC puis avec le formol, aucune réponse au formol n'est observée. Cela suggère que la première activation du récepteur par l'AITC masque complètement l'effet ultérieur du formol, si toutefois il peut encore agir sur TRPA1.

Notre étude n'a donc pas été conclusive et nous ne pouvons donc pas affirmer à l'heure actuelle que l'ablation des neurones GINIP+ n'a pas de conséquence fonctionnelle sur les autres populations neuronales du DRG.

## **2. L'ablation des neurones GINIP+ entraîne une nette diminution de la seconde phase de douleur induite par une injection de formaline**

### **2.1 Rappel sur la douleur induite par l'injection de formaline**

Le modèle de douleur induite par l'injection de formaline est un paradigme expérimental reproduisant une douleur aiguë inflammatoire. Il est caractérisé par deux phases de réponse nociceptive chez le rongeur. Pendant longtemps, la douleur induite durant la première phase a été attribuée à la décharge des fibres primaires sensorielles ; alors que la deuxième phase reflèterait la sensibilisation des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. Lors de l'introduction, je vous ai présenté différentes données complétant cette conception pour me focaliser sur un nouvel angle d'approche, dans lequel le phénomène de diffusion de la formaline après son injection joue un rôle primordial (Fischer et al., 2014) ; on peut alors décomposer la réponse à une forte dose en deux processus. Au niveau du site d'injection dans la paume de la patte de l'animal, il y a une forte dose de formaline ; puis la molécule diffuse et se dilue, ce qui équivaut donc à une faible dose de formaline.

Cette idée est le point de départ de ma discussion concernant les mécanismes mis en jeu lors de la réponse à la formaline.

## **2.2 L'apport de notre étude**

Les études chez la souris ont démontré que la réponse à de **fortes doses** de formaline implique les neurones Nav1.8+ (Abrahamsen et al., 2008), mais pas les neurones TRPV1<sup>+</sup> (Shields et al., 2010), ni les neurones MRGPRD+ (Cavanaugh et al., 2009; Shields et al., 2010). Notre étude a permis de démontrer que les neurones GINIP+ participent eux à cette réponse. Cette population englobant les neurones MRGPRD+ et C-LTMRs, mon hypothèse est que ce sont les neurones C-LTMRs qui sont impliqués dans la réponse à de fortes doses de formaline. Cependant, nous avons montré que la première phase de la réponse formale n'est que légèrement diminuée lors de l'ablation de la population GINIP+ ; cette observation me conduit à décomposer l'analyse en deux aspects.

## **2.3 Quelles populations de neurones primaires sensoriels seraient concernées ?**

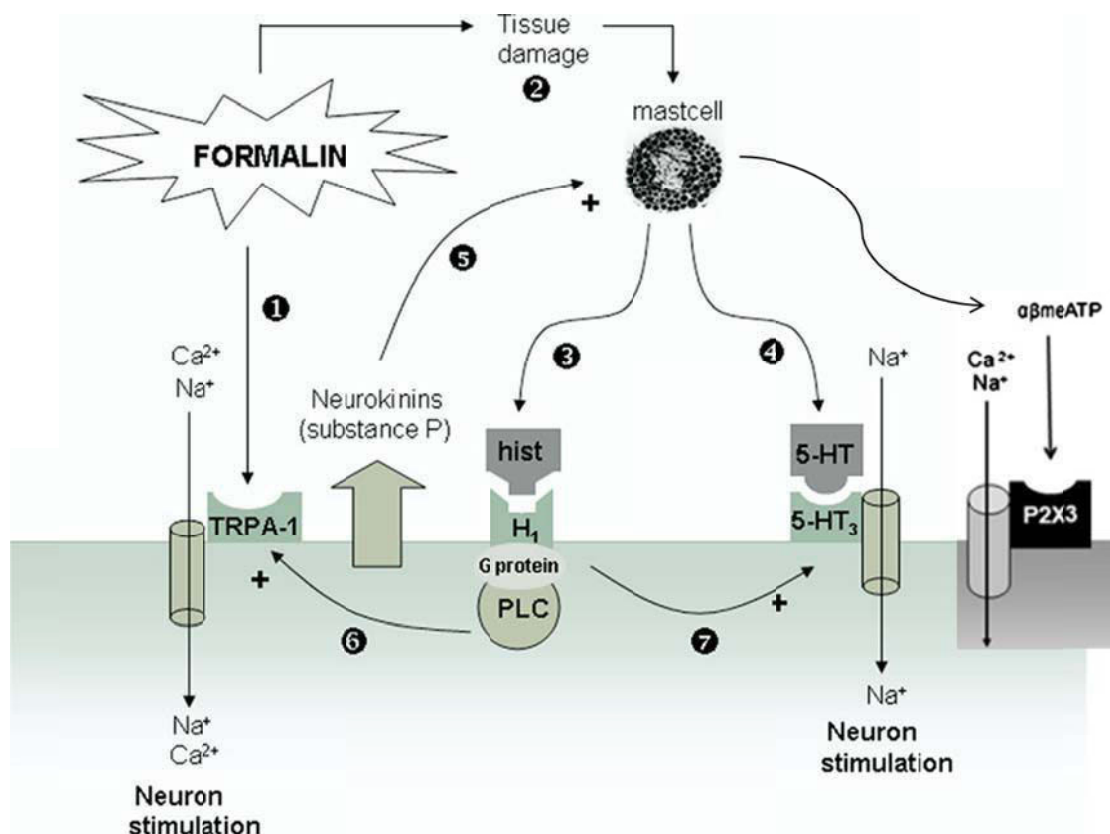
### *2.3.1 Activation lors de la première phase*

Il apparaît donc que d'autres populations de neurones primaires sensoriels doivent répondre à l'injection de formaline. Différentes études ont montré que des fibres A $\beta$  et A $\delta$  LTM, ainsi que des fibres A $\delta$  HTM et C-M étaient activées lors de l'injection de formaline (McCall et al., 1996; Puig and Sorkin, 1996). Plus précisément, des études ont porté sur le rôle des neurones TRPV1<sup>+</sup> dans ce phénotype. La mort des afférences TRPV1<sup>+</sup> à l'âge adulte (Shields et al., 2010) ne modifie pas les comportements de douleur induits par l'injection de formaline, tandis que leur ablation développementale entraîne une diminution de la deuxième phase de la réponse nociceptive (Mishra et al., 2011; Rogoz et al., 2014). Cependant, de nombreuses populations neuronales expriment le canal TRPV1 au cours du développement et répriment cette expression après la naissance. De ce fait, la réponse observée dans cette étude peut être due à la mort d'autres populations neuronales, ayant à un moment de leur développement exprimées le canal TRPV1<sup>+</sup>. Il a également été démontré que l'ablation des neurones CGRP+ diminue l'hyperalgésie thermique et mécanique liée à l'injection de CFA (Complete Freund Adjuvant) (McCoy et al., 2013). Ce composé, comme la formaline, déclenche une inflammation locale, mais qui pour la CFA, va se chroniciser. Il serait intéressant d'effectuer une injection de formaline dans ces conditions de perte des neurones CGRP+.

Les données disponibles sur les différentes populations de cellules activées au niveau du site d'injection de formaline sont encore assez ténues. Cependant connaître l'identité moléculaire de ces neurones pourrait également nous renseigner sur le recrutement de ces fibres. Nous savons que des **faibles doses** de formaline activent le canal TRPA1 exprimé sur ces neurones (Kwan et al., 2009; Macpherson et al., 2007; McNamara et al., 2007). Cependant, nous sommes dans un contexte d'utilisation d'une forte dose de formaline et nous ignorons si le canal est activé de la même manière. Une autre façon d'activer ces neurones pourrait provenir de phénomènes inflammatoires engendrés par la formaline.

La lésion engendrée par l'injection de formaline recrute des mastocytes. Il a été mis en évidence que la formaline peut activer les récepteurs TRPA1 présents à la surface des mastocytes. Cela entraîne un relargage de sérotonine, d'histamine, d'ATP, se fixant sur leurs récepteurs présents sur les terminaisons des différents neurones primaires sensoriels. L'activation de certains des neurones va secondairement contribuer à la libération de substance P et de CGRP qui entretiennent localement l'inflammation et, au niveau spinal, transmettent l'information douloureuse. En effet, au niveau périphérique, la substance P et le CGRP peuvent agir sur les kératinocytes et engendrer la production d'IL1- $\beta$ , qui favorise la sensibilisation des neurones primaires sensoriels (Shi et al., 2011). La perte de substance P et de CGRP diminue par ailleurs fortement la deuxième phase de réponse à la formaline (Rogoz et al., 2014; Zimmer et al., 1998).





**Figure 17 :** Représentation schématique de l'activation des différentes voies de signalisation suite à l'injection de formaldéhyde dans la patte de l'animal. La formaline active le canal TRPA1 présent à la surface des neurones (1), et la lésion causée par l'injection recrute des mastocytes (2). Ces derniers dégranulent et libèrent de l'histamine (hist), de la sérotonine (5-HT) et de l'ATP ( $\alpha\beta meATP$ ) qui activent le neurone et possiblement potentialisent les récepteurs avoisinants (6 et 7). L'activation des neurones conduit au relargage de substance P (5) susceptible, elle aussi, d'activer les mastocytes.

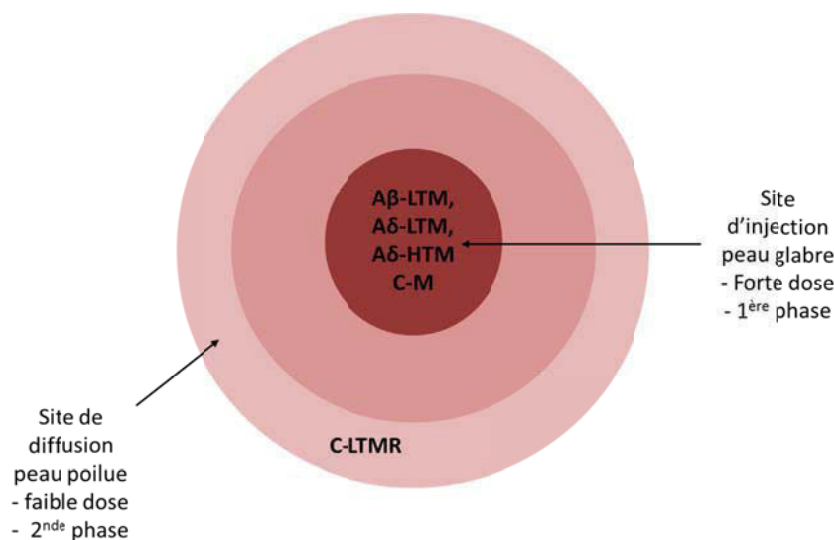
Nous disposons d'éléments intéressants pour expliquer l'activation des neurones primaires sensoriels au niveau du site d'injection de la formaline. Pourtant, plusieurs lacunes persistent. Nous ignorons précisément quelles sous-populations de neurones sont activées et par quelles voies ; aucune étude n'est encore assez spécifique. Classiquement, on rend compte du recrutement et de l'activation des neurones en révélant l'expression du proto-oncogène *c-fos*. Son expression étant détectable à partir de 30 minutes après la stimulation du neurone, cela signifie que nous ne pouvons pas sacrifier l'animal avant ce délai, durant lequel la deuxième phase de douleur a lieu, activant d'autres neurones susceptibles d'interférer avec l'interprétation des résultats.

De plus, le temps nécessaire à la mise en place des phénomènes inflammatoires consécutifs à l'injection de formaldéhyde est-il compatible avec l'apparition d'un comportement nociceptif entre 1 et 5 minutes après l'injection ? Cette fenêtre de temps très restreinte rend difficile l'observation des mécanismes mis en place. L'approche optogénétique, ayant une résolution temporelle minimale, pourrait permettre aux futures études d'appréhender de très brefs phénomènes. Cependant, nous

sommes dans un système multi-factoriel mettant en jeu différents acteurs cellulaires et moléculaires. Etudier séparément *in vivo* chaque élément apparaît réalisable mais l'intégration de tous les composants est un véritable challenge.

### 2.3.2 Activation lors de la deuxième phase

L'implication des neurones C-LTMRs semble plus importante lors de la deuxième phase de réponse, puisque leur ablation engendre la quasi disparition de cette douleur. Il a été démontré que les fibres primaires sensorielles sont actives durant les deux phases de réponse (Puig and Sorkin, 1996), cependant nous ne savons pas encore avec certitude si certains neurones ne déchargent que pendant la première phase, si certains neurones se mettent à décharger seulement lors de la deuxième phase, ou encore s'il s'agit des mêmes neurones déchargeant lors des deux phases. Nous supposons que la diffusion de la formaline permet le recrutement de nouvelles fibres au cours de l'expérience. L'injection de formaline a lieu dans la paume de la patte de l'animal au niveau de la peau glabre, le composé peut diffuser jusque dans la peau poilue sur le dos de la patte innervée notamment par les C-LTMRs. Les C-LTMRs sont alors en contact avec une faible dose de formaline, capable d'activer les récepteurs TRPA1+ présents à leur surface. Pourquoi les C-LTMRs sont-ils préférentiellement activés reste une question à part entière...



**Figure 18 :** Représentation schématique de l'action d'une injection d'une forte dose de formaline. Au centre, une forte dose de formaline injectée dans la peau glabre peut activer des mécanorécepteurs à bas seuil (A $\beta$  et A $\delta$  LTM) ainsi que des neurones à haut seuil A $\delta$ -HTM et C-M. La formaline diffuse et en périphérie active les C-LTMRs dans la peau poilue.

## 2.4 Intégration spinale du message nociceptif induit par l'injection de formaline

Lors de la première phase, beaucoup de neurones primaires sensoriels sont activés par l'injection de formaline. Nous avons vu que nous ignorions encore largement leur identité et donc leur cible spinale spécifique.

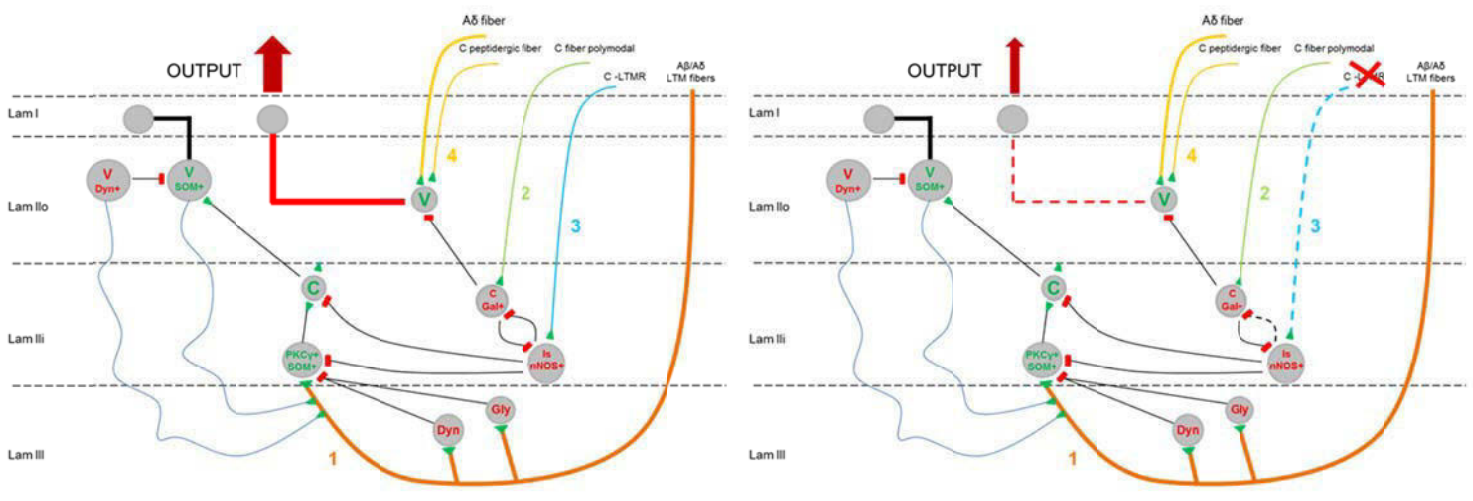
Néanmoins, une des voies anatomiques bien caractérisée est la voie de transmission des afférences A-LTM. Ils connectent des neurones PKC $\gamma$ +/SOM+ dans la corne dorsale de la moelle épinière; ce circuit anatomique étant par ailleurs sous le contrôle d'interneurones glycinergiques. Lors de l'injection de formaline, les neurones PKC $\gamma$ + ne sont pas activés (Neumann et al., 2008), tandis que de nombreux interneurones inhibiteurs glycinergiques le sont (Todd et al., 1994). Le message sensoriel douloureux semble donc être bloqué à ce niveau (voie 1).

D'autre part, nous savons que l'injection de formaline active majoritairement des interneurones excitateurs (voie 4) mais également certains inhibiteurs (voie 2), nNOS+ notamment (voie 3), des lamina II (Herdegen et al., 1994; Polgar et al., 2013; Todd et al., 1994).

Comme nous l'avons postulé précédemment, la deuxième phase serait due à l'activation des C-LTMRs. Les C-LTMRs connectent des interneurones inhibiteurs de type Islet exprimant possiblement le nNOS+ (3). Ces interneurones sont au contact d'autres interneurones inhibiteurs de type central, inhibant des cellules verticales projetant vers la lamina I et les voies de sortie de l'influx nociceptif (Zheng et al., 2010). En cas de perte des C-LTMRs, le neurone Islet n'inhibe plus le neurone vertical qui peut diminuer l'activation du neurone vertical et donc inhiber le message douloureux.

**A :** Seconde phase de réponse à la formaline - sauvage

**B :** Seconde phase de réponse à la formaline – ablation GINIP



**Figure 19 :** Modèle anatomique supportant la réponse comportementale douloureuse induite par l'injection d'une forte dose de formaline décrite ci-dessus.

### **3. Impact de l'ablation des neurones GINIP+ sur la mécano-sensation**

#### **3.1 Mécano-sensation en condition basale**

Parmi les modalités sensorielles que nous avons décidé de tester, la mécano-sensation représentait un intérêt majeur. En effet, la population GINIP+ est composée de deux sous populations, les MRGPRD+ et les C-LTMRs, qui sont impliquées dans la transduction de deux degrés de sensibilité mécanique. Les neurones MRGPRD+ sont décrits comme des nocicepteurs mécaniques car leur ablation provoque une hyposensibilité mécanique (Cavanaugh et al., 2009). Les C-LTMRs eux détectent le toucher léger et agréable en condition basale. De manière surprenante, nous avons pu observer que lors du test du Von Frey, les souris GINIP-DTR ne présentent aucun changement dans leur sensibilité mécanique aiguë. En effet, ayant éliminé la population MRGPRD+, nous nous attendions à un phénotype de douleur mécanique diminuée. Cette sensibilité normale peut s'expliquer si l'ablation des neurones C-LTMRs a un effet opposé et compensatoire à l'ablation des neurones MRGPRD+ et que ces phénomènes induisent un rééquilibrage dans la transmission de l'information mécanique notamment au niveau spinal.

Comme je l'ai présenté en introduction, au moins quatre voies anatomiques seraient activées lors de la stimulation mécanique impliquant les neurones MRGPRD+, les C-LTMRs et les A-LTM (figure 20A). Lors de l'ablation des neurones MRGPRD+, une voie de transmission de l'information mécanique douloureuse est manquante, il faut donc plus d'activation du système, pour générer une sensation de douleur mécanique. Ceci explique l'hyposensibilité observée chez les animaux MRGPRD ablatés (figure 21B). Lors de l'ablation supplémentaire des C-LTMRs, on perd un des freins du système. Le neurone Islet normalement stimulé par les C-LTMRs n'est plus activé. De ce fait le neurone central exciteur activé par la voie A-LTM peut transmettre l'information mécanique sensorielle (figure 21C). Ceci peut compenser la perte des neurones MRGPRD+.

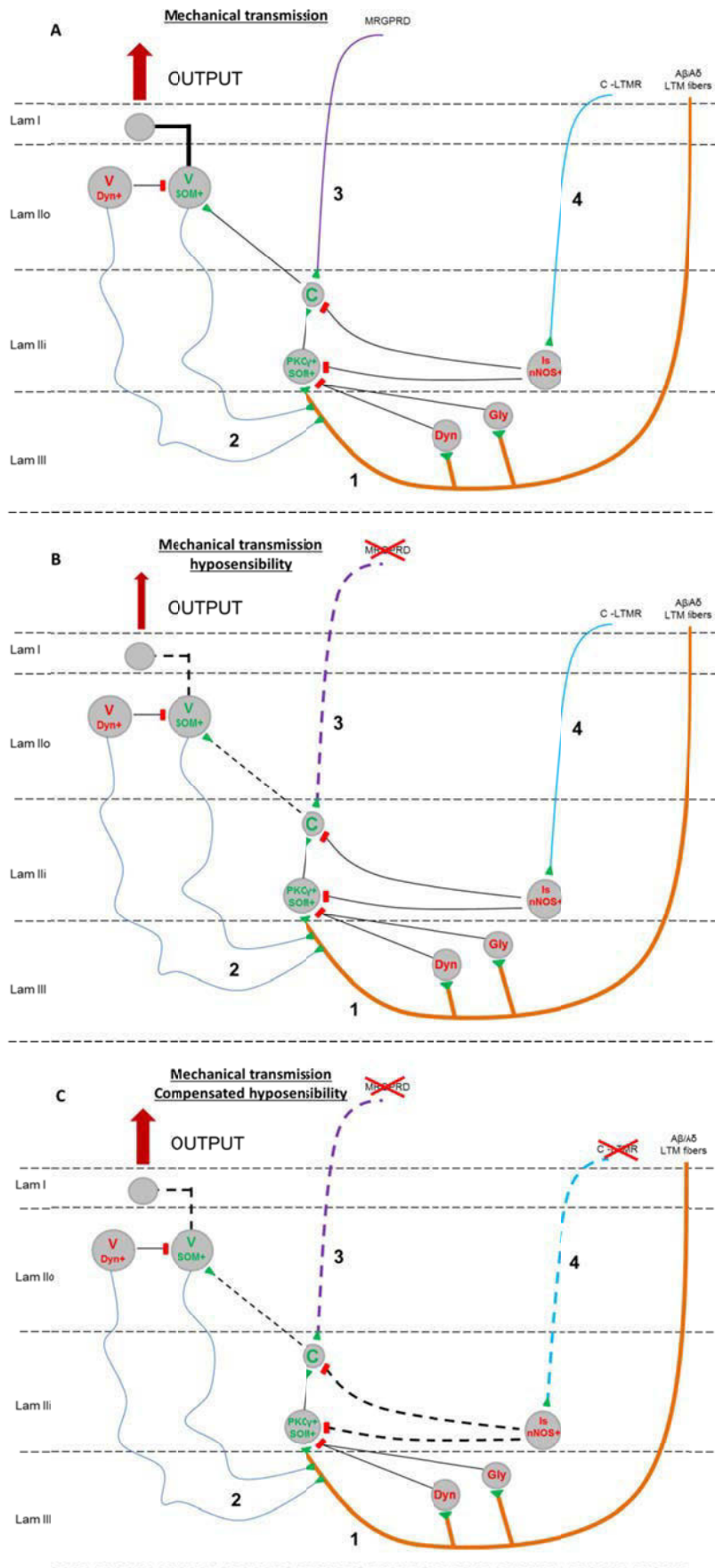


Figure 20 : Modèle anatomique de la transmission des informations mécaniques douloureuses ou non selon les différents modèles animaux.

Ce modèle plaide en la faveur d'une voie anatomique dédiée à la transmission et la modulation de l'information sensorielle mécanique, douloureuse ou non. Cette idée est transmise dans la littérature sous le terme de « module sensoriel ». Elle est en accord avec la vision « labelled lines » de neurones dédiés à une modalité sensorielle, ici mécanique. Ce module sensoriel peut néanmoins être modulé par l'activité d'autres afférences primaires sensorielles et du réseau d'interneurones qu'elles vont activer, comme ici les C-LTMRs et les Islet ainsi que du contrôle inhibiteur direct. La notion de « gate control » émise il y a maintenant 50 ans, trouve actuellement son support cellulaire et moléculaire.

### **3.2 Mécano-sensation en condition neuropathique**

De récentes données obtenues au sein de notre laboratoire, nous ont mené à penser que les neurones GINIP+ pourraient jouer un rôle dans la mise en place et surtout le maintien des douleurs chroniques neuropathiques. En effet, il a été mis en évidence que la perte de la protéine GINIP au sein des DRG chez la souris entraîne une prolongation de la douleur mécanique induite par la CCI (Gaillard et al., 2014). De plus, l'absence de la protéine Tafa4, marqueur des C-LTMRs, conduit également à une chronicisation des douleurs neuropathiques (Delfini et al., 2013).

Nous avons donc effectué des tests comportementaux visant à évaluer la sensibilité mécanique des animaux GINIP-DTR en condition neuropathique, en effectuant une constriction chronique du nerf sciatique (CCI). Les souris ablatées et les souris sauvages développent une hypersensibilité mécanique et bien que nous n'observions pas de différences de sensibilité entre les deux génotypes, nous avons pu démontrer que l'ablation des neurones GINIP+ entraîne une prolongation de l'hypersensibilité mécanique induite par la CCI. En effet, les souris sauvages récupèrent une sensibilité mécanique basale à partir de 21 jours après la chirurgie tandis que les souris GINIP-DTR sont toujours hypersensibles 60 jours après la chirurgie.

En introduction, je vous ai présenté plusieurs éléments expliquant la mise en place voire le maintien des douleurs neuropathiques chroniques, que je vais résumer très brièvement.

Une neuropathie induite par constriction chronique du nerf sciatique entraîne une axotomie des fibres A, accompagnée de phénomènes inflammatoires, rendant ces neurones hyperexcitables et les faisant relarguer de nombreux neurotransmetteurs au niveau périphérique et spinal (BDNF, NPY,...). Le relargage répété de nombreux neurotransmetteurs induit secondairement des phénomènes de facilitation de la transmission synaptique mettant en jeu les interneurones, mais également la microglie et les astrocytes. Cette sensibilisation centrale est notamment caractérisée par une

diminution d'activité des interneurons islet inhibiteurs et une augmentation de l'activité des neurones verticaux. On observe donc une diminution globale du tonus inhibiteur spinal qui sous-tend les comportements d'hyperalgésie observés suite à la chirurgie. Les fibres C sont, elles, relativement épargnées par cette lésion mais les nocicepteurs non peptidergiques vont se rétracter. Il est possible que la repousse de ces fibres permette un certain retour à l'équilibre au niveau spinal grâce à leur connexion sur les interneurons inhibiteurs qu'elles vont de nouveau pouvoir activer. Ceci permet la disparition des comportements d'hyperalgésie et une récupération fonctionnelle des animaux.

Dans notre étude, nous avons montré qu'une hypersensibilité mécanique faisant suite à une CCI se développe chez les deux génotypes, mais plus rapidement chez les animaux sauvages. Cette installation de la neuropathie est comparable, car elle serait due à l'axotomie des fibres A (et des phénomènes l'accompagnant), présentes chez les deux génotypes. Cependant, la perte des neurones GINIP+, nocicepteurs non peptidergiques, ralentirait cette apparition.

La sensibilisation centrale se met secondairement en place chez les deux génotypes. La repousse des fibres C est supposée permettre un rééquilibre du système spinal. Or dans notre modèle, une partie de ces fibres a été tuée et ne peut donc plus reconnecter les interneurons inhibiteurs pour « calmer » le système, ce qui entraînerait l'hyperalgésie prolongée.

Néanmoins, cette explication peut paraître un peu simpliste notamment car les douleurs chroniques ont une composante centrale indéniable. Le rôle des contrôles inhibiteurs descendants serait probablement à investiguer ainsi que déterminer le lien entre une perte de neurones périphériques et la modification de mécanismes supraspinaux.

## 4. Perspectives : amélioration des connaissances des circuits anatomiques spinaux

### 4.1 Éléments spécifiques au modèle proposé

Le modèle anatomique présenté en conclusion de cette étude, révèle quelques incertitudes.

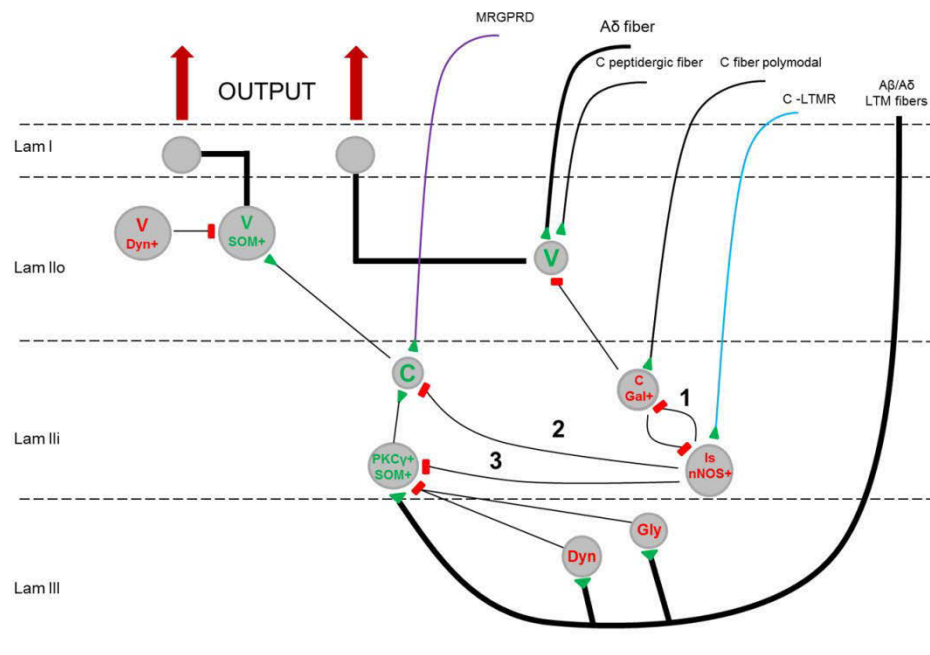


Figure 21 : Modèle anatomo-fonctionnel

Premièrement, nous ignorons encore beaucoup sur les cibles spinales des neurones MRGPRD+. Le fait qu'ils communiquent avec presque tous les sous types de neurones de la lamina II suggère que différents réseaux soient activés pour coder finement l'information mécanique douloureuse. L'étude de (Wang and Zylka, 2009) doit donc être approfondie en utilisant par exemple des marqueurs synaptiques tels que la Wheat germ Agglutinin afin de pouvoir voir les neurones cibles de premier voire de second ordre et de les analyser au niveau moléculaire. Une autre possibilité aurait été de marquer à la biocytine les interneurons spinaux connectés et enregistrés afin de réaliser des marquages immunohistochimiques à postériori. Enfin, des expériences de PCR sur cellule unique (single cell PCR) après enregistrements électrophysiologiques suivi de séquençage à haut débit permettrait de mieux connaître la signature moléculaire de ces neurones.

Deuxièmement, la preuve irréfutable de la connexion des C-LTMRs sur les neurones Islet est encore manquante bien que les données de microscopie électronique apportées dans notre étude soutiennent cette connectivité. Nous avons précédemment tiré avantage de la souris Tafa4-KO



générée au laboratoire afin d'étudier la transmission synaptique par une approche électrophysiologique. Ceci a mis en évidence que la protéine Tafa4 sécrétée par les C-LTMRs module l'excitabilité synaptique en agissant sur des courants potassiques. Cependant nous ignorons sur quels types de neurones spinaux (excitateurs/inhibiteurs ?) cet effet a lieu. Etudier par électrophysiologie les variations de tonus excitateurs et inhibiteurs au niveau des projections des C-LTMRs, en condition normale, lors de l'ablation des neurones GINIP, et suite à une CCI, nous fournirait de précieuses informations quant à la modification de la transmission synaptique en condition basale et pathologique.

Troisièmement, si cette connexion sur les neurones Islet est avérée, des cibles des neurones Islet doivent être recherchées. Il a été décrit que ces neurones connectent des cellules centrales excitatrices déchargeant de manière transitoire (Zheng et al., 2010). Nous avons supposé que ces neurones pouvaient être les mêmes que ceux activés par la voie des afférences  $A\beta$  et  $A\delta$  LTM.

Enfin, il semble important d'améliorer notre approche d'investigation comportementale. Comme je l'ai mentionnée, les C-LTMRs sont activés par des stimulations mécaniques légères. Or nous avons uniquement effectué un test de Von Frey pour évaluer la sensibilité mécanique des animaux GINIP-DTR. Ce test consiste en des stimulations de la patte arrière d'un animal avec des filaments de différents diamètres, reproduisant chacun une force mécanique différente. Il est possible que ce test ne soit pas le plus adéquat pour évaluer les variations de détection du toucher léger. De plus, les C-LTMRs chez l'Humain, sont activés par stimulations tactiles telles que les caresses. Une stimulation de Von frey, même fine, reste statique et ne reproduit donc pas les caractéristiques d'une caresse. Des études ont utilisés des stimulations à l'aide de pinceaux pour se rapprocher de la physiologie mais la calibration de ces installations nécessaire pour répondre à des critères de reproductibilité n'est pas encore établie. Enfin, l'activation des C-LTMRs est de plus en plus associée à une composante affective, probablement centrale, que nous n'avons pas du tout investiguée mais qui pourrait se révéler modifiée dans notre modèle. Un test de préférence de place associé une stimulation adéquate spécifique des C-LTMRs devrait être développé afin d'investiguer cette composante du rôle des C-LTMRs.

#### **4.2 Amélioration globale des connaissances sur la circuiterie inhibitrice**

Cependant, nos connaissances sur ces circuits demeurent fragmentaires. Les études princeps ayant permis de grandes avancées ont été menées par des approches anatomiques et électrophysiologiques ; de plus en plus, ces mêmes laboratoires ont cherché à définir

moléculairement et neurochimiquement les différents sous types de neurones avec plus ou moins de réussite et de reproductibilité. Très récemment, trois études ont tiré avantage de ces connaissances moléculaires pour procéder à des manipulations génétiques et à la génération de lignée de souris transgéniques (Bourane et al., 2015; Duan et al., 2014; Foster et al., 2015). Grâce à ces études, le circuit anatomique de « l'allodynie mécanique » proposé par Melzack et Walz et de nombreux électrophysiologistes après eux, a « enfin » trouvé sa base moléculaire et cellulaire.

Les nombreuses études physiologiques menées au cours des dernières décennies ayant décrypté ces circuits doivent à présent tirer parti des avancées biotechnologiques afin de manipuler plus précisément ces circuits.

Par exemple, les populations d'interneurones inhibiteurs des lamina superficielles contribuent fortement à la modulation de la transmission de l'information sensorielle et ce, malgré leur faible proportion (entre 20 et 30% des neurones). Deux souris transgéniques, GAD67-GFP (Heinke et al., 2004) et PrP-GFP (Foster et al., 2015; Hantman et al., 2004) avaient été générées afin d'étudier des sous populations de neurones GABAergiques. Bien que ces travaux aient permis de connaître des caractéristiques de ces neurones, ces derniers présentent une certaine hétérogénéité. Les études récentes {Duan, 2014 #6373}, combinant marquage et ablation de sous populations plus discrètes d'interneurones inhibiteurs ont contribué à affiner nos connaissances mais nous manquons encore de spécificité. Or les analyses transcriptomiques de sous populations neuronales sont de plus en plus généralisées et fournissent une multitude de données sur la spécificité et la diversité de sous types de neurones. La communauté scientifique dispose à présent de modèles de souris transgéniques dans lesquelles des sous populations de neurones sont marquées par des rapporteurs fluorescents. Des approches électrophysiologiques couplées à des PCR sur cellule unique (single cell PCR) ou de tri cellulaire (FACS sorting) conjugués à des séquençages d'ARN utilisant ces modèles nous permettraient dans les années à venir d'appréhender le profil transcriptomique de ces neurones inhibiteurs. Grâce à cela, nous pourrions générer des modèles de souris ciblant plus spécifiquement des sous populations en tuant, photostimulant... des neurones.

# **MATERIELS**

# **&**

# **METHODES**

# MATERIEL ET METHODES

## Souris

Les animaux ont été élevés et maintenus dans des conditions standards de stabulation (23°C, 40% d'humidité, cycle 12h jours / 12h nuit, accès libre à l'eau et à la nourriture). Des efforts ont été particulièrement menés afin de minimiser le stress et la souffrance de ces animaux durant notre étude. Tous les protocoles sont en accord avec les recommandations de l'Union Européenne pour l'expérimentation animale.

## Génération de la souris Knock in GINIP

La souris KI GINIP a été générée au laboratoire par Stéphane Gaillard.

La séquence d'ADN génomique du bras d'homologie 5' débute à la région -1.32kb avant l'ATG du codon de GINIP. Le bras d'homologie 3' correspond à une région du génome de 5.840 paires de bases, débutant au niveau du site de l'enzyme de restriction SpeI, localisée après le troisième exon codant (PHD zing finger), jusqu'à le site de restriction BamHI.

Ces fragments ont été amplifiés à partir d'ADN génomique de cellules souches embryonnaires CK35, en utilisant l'enzyme « haute fidélité » Taq Phusion polymerase (Finnzymes). Un site loxP avec un site de restriction additionnel BstB1 (pour vérifier l'insertion correcte du site loxP) a été inséré dans le bras d'homologie 5' à la position -300bp (site de restriction EcoRI). Le cDNA de GINIP suivi d'un second site loxP a été introduit au niveau du codon ATG (malgré la vérification de la séquence, ce cDNA n'est pas correctement transcrit dans la lignée GINIP<sup>fl/+</sup>). Une deuxième cassette contenant la séquence du récepteur humain à la toxine diphtérique suivie d'une séquence IRES2 et de la séquence codante pour la protéine fluorescente mcherry a été inséré après le second site loxP. Une cassette FRT-PGK-Neo-FRT permet la sélection positive des cellules souches recombinantes. Elle a été introduite en aval de la séquence SV40 polyA de la mcherry et en amont du bras d'homologie 3'.

La construction finale a été linéarisée en utilisant l'enzyme de restriction Sall et a été électroporée dans des cellules souches embryonnaires CK35 provenant d'animaux 129/SV. Les clones ayant subis la recombinaison homologue ont été identifiés par PCR en utilisant un primer externe au bras d'homologie 5' (5'-TACCTTGCCTCTTACCCACTGT-3') et un primer dans le cDNA codant la protéine GINIP (5'-ACCGCTGAAAGGTCTCAGTAAG-3'). Les clones positifs par PCR ont été validés par Southern-

blot en utilisant une sonde externe au bras d'homologie 3' et une sonde dans la séquence néomycine. Le clone sélectionné a été injecté dans des blastocystes issus de souris C57Bl6/J à la plateforme transgénique SEAT (Villejuif, France). Les souris chimères générées ont été accouplées avec des femelles C57Bl6/J afin de permettre une transmission germinale de l'allèle recombinant. Des croisements successifs avec des femelles C57Bl6/J ont été effectués pour obtenir une lignée avec un pur fond génétique C57Bl6/J. Le génotypage des animaux nées a été effectué par PCR : l'allèle WT est identifié en utilisant les oligos 5'-CTTCAACCACACCTAGCTTTCC-3' (oligo reverse dans l'intron 2 éliminé) et 5'-AGCCATGGGGGTGTTGATGTCC-3' (oligo forward à l'ATG de GINIP) ; allèle floxé en utilisant l'oligo 5'-ACAACGGGGTCACGTAGAG-3' (oligo forward dans le cDNA) et 5'-GATATCCATGGCTCTGTGGACAAAATCAG-3' (oligo reverse dans le cDNA); l'allèle knock-out allèle en utilisant les oligos 5'-TATGAGATTGTGTGCCTGTGTG-3' (forward oligo forward dans le premier intron) et 5'-CTCCTTCACATATTTGCATTCTCC-3' (reverse oligo reverse dans la séquence du récepteur à la diphtérie toxine).

Les mâles hétérozygotes ont été croisés avec une lignée Actin-Flipase afin d'éliminer la cassette pgk-Neo. Les souris GINIPfl/+ mice ont été croisées avec des souris cre-deleter afin de générer une lignée knockout général (GINIP+/-) ou avec des souris Nav1.8-Cre, spécifique des nocicepteurs, afin de produire des animaux hDTR knock in (GINIP-DTR) utilisés pour une ablation spécifique des neurones GINIP+ dans les ganglions dorsaux rachidiens.

### **Injection de toxine diphtérique**

Afin d'effectuer une ablation ciblée des neurones GINIP+, les animaux GINIP fl/+ et GINIP -DTR âgés de 3 à 5 semaines ont été injectés en intrapéritonéal deux fois, à 3 jours d'intervalle, avec une solution de toxine diphtérique (Calbiochem) à une concentration de 20ng/g??. Les tests comportementaux et marquages immunohistologiques ont été réalisés 5 semaines après la première injection.

### **Hybridation in situ et immunofluorescence**

Les expériences d'hybridation in situ et d'immunofluorescence ont été réalisées selon un protocole standard (Moqrich et al, 2004). Pour obtenir les tissus, les animaux ont été anesthésiés profondément avec un mix kétamine/xylazine (100mg/kg ; 10mg/kg), et ensuite perfusés de manière intracardiaque avec une solution froide de paraformaldéhyde (4% dans PBS). Après dissection, les tissus ont été post fixés durant la nuit dans la même solution fixatrice à 4°C. Ils ont été transférés

dans une solution de sucrose 30% (poids/volume) afin de les cryoprotéger avant de les congeler et de les stocker à -80°C.

Les échantillons ont ensuite été coupés (12µM DRG ; 16µM moelle épinière) au cryostat (Leica).

Les sondes ARN ont été synthétisées en utilisant des primers PCR spécifiques aux gènes d'intérêt et des échantillons de cDNA provenant de DRG de souris.

Les doubles d'hybridation in situ ont été effectuées en utilisant une combinaison de sondes marquées avec de la digoxigénine et fluorescéine/biotine. Les sondes ont hybridé sur la nuit à 55°C et les coupes ont incubé avec un anticorps anti-digoxigénine/fluorescéine/biotine couplé à la peroxydase(Roche). La détection finale est faite en utilisant le kit TSA plus fluorescéine/cy3/cy5 (Perkin Elmer). Pour les expériences de double hybridation in situ, le premier anticorps a été inactivé avec un traitement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Pour les expériences d'immunofluorescence, l'anticorps primaire est dilué dans une solution PBS contenant 10% de sérum d'âne ou de chèvre (Sigma), 3% d'albumine bovine (Sigma), 0.4% de triton-X-100 et incubé durant la nuit à 4°C. Les anticorps primaires utilisés dans cette étude sont les suivants : lapin anti-TrkA 1 :1000 (généreusement donné par le Dr L. Reichardt, Université de Californie San Francisco), chèvre anti TrkC 1 :500 (R&D systems), chèvre anti-Ret 1:500 (R&D systems), chèvre anti-CGRP de 1:1000 (Acris antibodies), lapin anti-PKCδ 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology), chèvre anti- DTR humain (HB-EGF) 1:500 (R&D systems). Des anticorps secondaires d'âne ou de chèvre, anti lapin, anti rat et anti chèvre conjugués à l'Alexa 488, 555 ou 647 (Invitrogen or Molecular probe) ont été utilisés pour la détection secondaire. L'isolectine B4 conjuguée à un fluorophore AlexaFluorR 488, 568 ou 647 dye a été utilisée à 1:200 (Invitrogen). L'acquisition des images a été faite sur AxioImager Z1 (Zeiss).

### **Comptages cellulaires**

Pour calculer le pourcentage de neurones des DRG qui expriment les différents gènes testés, nous avons adopté une stratégie précédemment validée (Chen et al, 2006).

Les paires de DRG L4 ont été coupés respectivement en 2 ou 3 séries de 6 lames avec une épaisseur de 12 µm. Le marquage et le comptage des neurones se fait sur une lame de chaque série. Le calcul du nombre de neurones se fait sur une moyenne de 12 sections/ DRG pour 3 animaux mâles des chaque génotype provenant de la même portée, âgés entre 8 et 12 semaines. Le pourcentage

d'expression des gènes est calculé par rapport à l'expression d'un marqueur neuronal ubiquitaire : SCG10.

### **Production de l'anticorps anti-GINIP de rat**

La séquence de la protéine totale recombinante GINIP a été clonée dans un vecteur pGex-6P, fusionnée à la GST. Ce vecteur a ensuite été exprimé dans des bactéries E. Coli afin de produire la protéine. Des billes glutathione-sepharose ont été incubées sur la nuit avec la protéine GST-GINIP dans un tampon TBS contenant 1mM de DTT, 1mM d'EDTA et 10 unités de PreScission Protease (GE Healthcare), pour 250mL de culture bactérienne. Le surnageant, contenant uniquement le fragment GINIP a été injecté de manière intrapéritonéale à des rats (200ug par injection) quatre fois avec deux semaines d'intervalle. Les rats ont été sacrifiés une semaine après la dernière injection et le sérum a été récupéré. Le sérum peut être directement utilisé à une dilution de 1 :1000.

### **Tests comportementaux**

Les souris sont dans des cages de 2 à 6 souris avec libre accès à la nourriture et à l'eau. Elles sont dans des pièces maintenues à température constante (entre 20 et 22°C) et avec des cycles jour/nuit de 24h. Tous les tests comportementaux sont réalisés sur des souris mâles entre 8 et 12 semaines, l'examineur ne connaissant pas le génotype des souris testées.

Avant tout test, les animaux sont acclimatés au moins 30 min dans la pièce de comportement.

Le Student t-test est utilisé pour tous les tests statistiques.

#### **Test du Rotarod (Bioseb)**

Afin d'analyser la coordination motrice, et l'équilibre des animaux, ces derniers sont placés sur une roue qui tourne avec une accélération constante de 4 à 44 rpm en 5 min. Le temps et la vitesse auxquels la souris tombe sont notés. Les souris sont testées 4 jours consécutifs. Chaque jour, les souris sont testées 3 fois avec un intervalle d'au moins 5 min entre deux tests.

Les trois premiers jours sont considérés comme des jours d'entraînement où la souris apprend à marcher sur l'appareil, le quatrième jour est celui du test.

#### **Test de l'openfield (Bioseb)**

Le test de l'open field est classiquement utilisé afin d'évaluer la locomotion, l'exploration et le comportement anxieux des animaux.

Les souris sont placées individuellement dans une arène (40x40x35cm) avec des murs en plexiglas opaque. Le déplacement des souris est enregistré pendant 5 min grâce à une caméra. Le temps passé au centre de l'arène ou sur ses bords est analysé par un logiciel de Bioseb où la «zone centre» (20x20cm) et la «zone coin» sont définies préalablement.

#### Test de gradient thermique (Bioseb)

Pour chaque test, quatre souris avec au moins une représentante de chaque génotype (sauvage et mutante) ont été suivies individuellement dans quatre arènes différentes au même moment. Le plancher de chaque arène est divisé en 15 zones (8 cm chacune) de température stable et contrôlée grâce à un dispositif pelletier allant de 14 à 55°C. Ces zones sont établies grâce à deux unités thermiques placées de part et d'autre des arènes et qui sont allumées au moins une heure avant le début de l'expérience pour que le gradient s'installe et se stabilise. La température à la limite de chaque zone a été enregistrée. Pendant toute la durée de l'expérience (90 minutes), une caméra enregistre la position de chaque souris en mouvement le long de chaque arène et le temps passé dans chaque zone est calculé automatiquement. Les données sont exportées dans un fichier Microsoft Excel à partir duquel les analyses statistiques sont effectuées.

#### Test nociceptif de la plaque froide

Une des deux plaques métalliques ayant servi pour le test de choix de température est utilisée pour le test de la plaque froide. Une fois acclimatées, les souris sont mises sur la plaque froide entourée d'une boîte carrée (15 cm de côté) en plexiglass et soumises à une température de plaque établie à 22°C, 10°C, 4°C ou 0°C. Leur comportement (temps où la souris garde les pattes avant relevées) est suivi pendant 1 minute. Pour chaque température le test est réalisé trois fois avec au moins 5 minutes de latence entre deux tests. Les souris sont laissées au moins une heure sans test entre deux tests de températures différentes.

#### Test de stimulation mécanique : Von Frey (Bioseb).

Les souris sont placées individuellement dans des boîtes de plexiglas sur une plateforme de maille métallique élevée pendant au moins 1 heure pour s'acclimater. Les filaments de stimulation tactile (0.07 / 0.16 / 0.4 / 0.6 / 1 / 1.4 / 2 / 4 / 6 g) sont glissés sous la patte arrière de chaque souris *au centre* ou *au bord* de la zone plantaire de la patte arrière de la souris. Une réponse des animaux correspond au retrait réflexe de la patte. Le seuil de 50% de réponse est calculé selon la méthode du up/down en commençant par une stimulation avec le filament 1g. L'expérience est effectuée deux fois pour chaque patte arrière avec un minimum de 5 min entre deux stimulations pour une même patte. Le test est effectué à J-1, J0, J+7, J+14 et J+21.



#### Test de douleur chimique : injection formaline 2%

Le test de douleur à la formaline consiste à injecter 10µl d'une solution de formaline 2% diluée dans du PBS 1X en sous-cutané dans la patte arrière gauche de la souris. Notons que la formaline 100% correspond à une solution de formaldéhyde 37%. La réponse nociceptive de la souris est divisée en deux phases : la première phase dite de douleur aigue se manifeste entre 0 et 15 min après l'injection. La deuxième phase dite centrale a lieu aux alentours de 20 min après l'injection et dure en moyenne 30 min. La réponse nociceptive de la souris est calculée par tranche de 5 min sur le temps qu'elle passe à lécher, mordre, agiter ou simplement relever sa patte inflammée.

# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**

Abbadie, C., Taylor, B.K., Peterson, M.A., and Basbaum, A.I. (1997). Differential contribution of the two phases of the formalin test to the pattern of c-fos expression in the rat spinal cord: studies with remifentanyl and lidocaine. *Pain* 69, 101-110.

Abrahamsen, B., Zhao, J., Asante, C.O., Cendan, C.M., Marsh, S., Martinez-Barbera, J.P., Nassar, M.A., Dickenson, A.H., and Wood, J.N. (2008). The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain. *Science* 321, 702-705.

Abraira, V.E., and Ginty, D.D. (2013). The sensory neurons of touch. *Neuron* 79, 618-639.

Al-Khater, K.M., Kerr, R., and Todd, A.J. (2008). A quantitative study of spinothalamic neurons in laminae I, III, and IV in lumbar and cervical segments of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 511, 1-18.

Alba-Delgado, C., Borges, G., Sanchez-Blazquez, P., Ortega, J.E., Horrillo, I., Mico, J.A., Meana, J.J., Neto, F., and Berrocoso, E. (2012). The function of alpha-2-adrenoceptors in the rat locus coeruleus is preserved in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Psychopharmacology (Berl)* 221, 53-65.

Almarestani, L., Waters, S.M., Krause, J.E., Bennett, G.J., and Ribeiro-da-Silva, A. (2007). Morphological characterization of spinal cord dorsal horn lamina I neurons projecting to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 504, 287-297.

Apkarian, A.V., Sosa, Y., Sonty, S., Levy, R.M., Harden, R.N., Parrish, T.B., and Gitelman, D.R. (2004). Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. *J Neurosci* 24, 10410-10415.

Bailey, A.L., and Ribeiro-da-Silva, A. (2006). Transient loss of terminals from non-peptidergic nociceptive fibers in the substantia gelatinosa of spinal cord following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Neuroscience* 138, 675-690.

Balasubramanian, S., Stemkowski, P.L., Stebbing, M.J., and Smith, P.A. (2006). Sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons. *J Neurophysiol* 96, 579-590.

Baliki, M.N., Petre, B., Torbey, S., Herrmann, K.M., Huang, L., Schnitzer, T.J., Fields, H.L., and Apkarian, A.V. (2012). Corticostriatal functional connectivity predicts transition to chronic back pain. *Nat Neurosci* 15, 1117-1119.

Barabas, M.E., Kossyeva, E.A., and Stucky, C.L. (2012). TRPA1 is functionally expressed primarily by IB4-binding, non-peptidergic mouse and rat sensory neurons. *PLoS One* 7, e47988.

Baseer, N., Al-Baloushi, A.S., Watanabe, M., Shehab, S.A., and Todd, A.J. (2014). Selective innervation of NK1 receptor-lacking lamina I spinoparabrachial neurons by presumed nonpeptidergic Adelta nociceptors in the rat. *Pain* 155, 2291-2300.

Bautista, D.M., Jordt, S.E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124, 1269-1282.

Bautista, D.M., Movahed, P., Hinman, A., Axelsson, H.E., Sterner, O., Hogestatt, E.D., Julius, D., Jordt, S.E., and Zygmunt, P.M. (2005). Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12248-12252.

Bautista, D.M., Siemens, J., Glazer, J.M., Tsuruda, P.R., Basbaum, A.I., Stucky, C.L., Jordt, S.E., and Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448, 204-208.

Bennett, G.J., Abdelmoumene, M., Hayashi, H., and Dubner, R. (1980). Physiology and morphology of substantia gelatinosa neurons intracellularly stained with horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194, 809-827.

Bennett, G.J., and Xie, Y.K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87-107.

Bernard, J.F., and Besson, J.M. (1990). The spino(trigemino)pontoamygdaloid pathway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J Neurophysiol* 63, 473-490.

Bernard, J.F., Dallel, R., Raboisson, P., Villanueva, L., and Le Bars, D. (1995). Organization of the efferent projections from the spinal cervical enlargement to the parabrachial area and periaqueductal gray: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 353, 480-505.

Biggs, J.E., Lu, V.B., Stebbing, M.J., Balasubramanian, S., and Smith, P.A. (2010). Is BDNF sufficient for information transfer between microglia and dorsal horn neurons during the onset of central sensitization? *Mol Pain* 6, 44.

Blom, S.M., Pfister, J.P., Santello, M., Senn, W., and Nevian, T. (2014). Nerve injury-induced neuropathic pain causes disinhibition of the anterior cingulate cortex. *J Neurosci* 34, 5754-5764.

Bourane, S., Grossmann, K.S., Britz, O., Dalet, A., Del Barrio, M.G., Stam, F.J., Garcia-Campmany, L., Koch, S., and Goulding, M. (2015). Identification of a spinal circuit for light touch and fine motor control. *Cell* 160, 503-515.

Bravo, L., Alba-Delgado, C., Torres-Sanchez, S., Mico, J.A., Neto, F.L., and Berrocso, E. (2013). Social stress exacerbates the aversion to painful experiences in rats exposed to chronic pain: the role of the locus coeruleus. *Pain* 154, 2014-2023.

Bravo, L., Torres-Sanchez, S., Alba-Delgado, C., Mico, J.A., and Berrocso, E. (2014). Pain exacerbates chronic mild stress-induced changes in noradrenergic transmission in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 24, 996-1003.

Bregman, H., Berry, L., Buchanan, J.L., Chen, A., Du, B., Feric, E., Hierl, M., Huang, L., Immke, D., Janosky, B., *et al.* (2011). Identification of a potent, state-dependent inhibitor of Nav1.7 with oral efficacy in the formalin model of persistent pain. *J Med Chem* 54, 4427-4445.

Brown, A.G., Iggo, A., and Miller, S. (1967). Myelinated afferent nerve fibers from the skin of the rabbit ear. *Exp Neurol* 18, 338-349.

Brown, M.C., Perry, V.H., Lunn, E.R., Gordon, S., and Heumann, R. (1991). Macrophage dependence of peripheral sensory nerve regeneration: possible involvement of nerve growth factor. *Neuron* 6, 359-370.

Bushnell, M.C., Ceko, M., and Low, L.A. (2013). Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 14, 502-511.

Cahusac, P.M., and Noyce, R. (2007). A pharmacological study of slowly adapting mechanoreceptors responsive to cold thermal stimulation. *Neuroscience* 148, 489-500.

Cai, Y.Q., Wang, W., Hou, Y.Y., and Pan, Z.Z. (2014). Optogenetic activation of brainstem serotonergic neurons induces persistent pain sensitization. *Mol Pain* 10, 70.

Cannon, K.E., and Hough, L.B. (2005). Inhibition of chemical and low-intensity mechanical nociception by activation of histamine H3 receptors. *J Pain* 6, 193-200.

Cannon, K.E., Leurs, R., and Hough, L.B. (2007). Activation of peripheral and spinal histamine H3 receptors inhibits formalin-induced inflammation and nociception, respectively. *Pharmacol Biochem Behav* 88, 122-129.

Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.

Cavanaugh, D.J., Chesler, A.T., Braz, J.M., Shah, N.M., Julius, D., and Basbaum, A.I. (2011). Restriction of transient receptor potential vanilloid-1 to the peptidergic subset of primary afferent neurons follows its developmental downregulation in nonpeptidergic neurons. *J Neurosci* 31, 10119-10127.

Cavanaugh, D.J., Lee, H., Lo, L., Shields, S.D., Zylka, M.J., Basbaum, A.I., and Anderson, D.J. (2009). Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9075-9080.

Chen, C.L., Broom, D.C., Liu, Y., de Nooij, J.C., Li, Z., Cen, C., Samad, O.A., Jessell, T.M., Woolf, C.J., and Ma, Q. (2006). Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neuron* 49, 365-377.

Chirila, A.M., Brown, T.E., Bishop, R.A., Bellono, N.W., Pucci, F.G., and Kauer, J.A. (2014). Long-term potentiation of glycinergic synapses triggered by interleukin 1beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 8263-8268.

Chu, Y.X., Zhang, Y., Zhang, Y.Q., and Zhao, Z.Q. (2010). Involvement of microglial P2X7 receptors and downstream signaling pathways in long-term potentiation of spinal nociceptive responses. *Brain Behav Immun* 24, 1176-1189.

Coderre, T.J., and Melzack, R. (1992a). The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci* 12, 3665-3670.

Coderre, T.J., and Melzack, R. (1992b). The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci* 12, 3671-3675.

Coderre, T.J., Vaccarino, A.L., and Melzack, R. (1990). Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 535, 155-158.

Colburn, R.W., Lubin, M.L., Stone, D.J., Jr., Wang, Y., Lawrence, D., D'Andrea, M.R., Brandt, M.R., Liu, Y., Flores, C.M., and Qin, N. (2007). Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* 54, 379-386.

Coull, J.A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., and De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438, 1017-1021.

Coull, J.A., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S.A., Nault, F., Sik, A., De Koninck, P., and 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.

Craig, A.D., and Kniffki, K.D. (1985). Spinothalamic lumbosacral lamina I cells responsive to skin and muscle stimulation in the cat. *J Physiol* 365, 197-221.

Crozier, R.A., Ajit, S.K., Kaftan, E.J., and Pausch, M.H. (2007). MrgD activation inhibits KCNQ/M-currents and contributes to enhanced neuronal excitability. *J Neurosci* 27, 4492-4496.

D'Mello, R., and Dickenson, A.H. (2008). Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* 101, 8-16.

da Costa, D.S., Meotti, F.C., Andrade, E.L., Leal, P.C., Motta, E.M., and Calixto, J.B. (2010). The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain* 148, 431-437.

Darian-Smith, I., Johnson, K.O., and Dykes, R. (1973). "Cold" fiber population innervating palmar and digital skin of the monkey: responses to cooling pulses. *J Neurophysiol* 36, 325-346.

Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., Harries, M.H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., *et al.* (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405, 183-187.

De Felice, M., Sanoja, R., Wang, R., Vera-Portocarrero, L., Oyarzo, J., King, T., Ossipov, M.H., Vanderah, T.W., Lai, J., Dussor, G.O., *et al.* (2011). Engagement of descending inhibition from the rostral ventromedial medulla protects against chronic neuropathic pain. *Pain* 152, 2701-2709.

del Camino, D., Murphy, S., Heiry, M., Barrett, L.B., Earley, T.J., Cook, C.A., Petrus, M.J., Zhao, M., D'Amours, M., Deering, N., *et al.* (2010). TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. *J Neurosci* 30, 15165-15174.

Delfini, M.C., Mantilleri, A., Gaillard, S., Hao, J., Reynders, A., Malapert, P., Alonso, S., Francois, A., Barrere, C., Seal, R., *et al.* (2013). TFAA4, a chemokine-like protein, modulates injury-induced mechanical and chemical pain hypersensitivity in mice. *Cell Rep* 5, 378-388.

Descoeur, J., Pereira, V., Pizzoccaro, A., Francois, A., Ling, B., Maffre, V., Couette, B., Busserolles, J., Courteix, C., Noel, J., *et al.* (2011). Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO molecular medicine* 3, 266-278.

Dhaka, A., Earley, T.J., Watson, J., and Patapoutian, A. (2008). Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *J Neurosci* 28, 566-575.

Dib-Hajj, S.D., Cummins, T.R., Black, J.A., and Waxman, S.G. (2010). Sodium channels in normal and pathological pain. *Annu Rev Neurosci* 33, 325-347.

Dib-Hajj, S.D., Fjell, J., Cummins, T.R., Zheng, Z., Fried, K., LaMotte, R., Black, J.A., and Waxman, S.G. (1999). Plasticity of sodium channel expression in DRG neurons in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* 83, 591-600.

Djoughri, L., and Lawson, S.N. (2004). Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 46, 131-145.

Dong, X., Han, S., Zylka, M.J., Simon, M.I., and Anderson, D.J. (2001). A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* 106, 619-632.

Duan, B., Cheng, L., Bourane, S., Britz, O., Padilla, C., Garcia-Campmany, L., Krashes, M., Knowlton, W., Velasquez, T., Ren, X., *et al.* (2014). Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. *Cell* 159, 1417-1432.

Dubuisson, D., and Dennis, S.G. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4, 161-174.

Dussor, G., Zylka, M.J., Anderson, D.J., and McCleskey, E.W. (2008). Cutaneous sensory neurons expressing the Mrgprd receptor sense extracellular ATP and are putative nociceptors. *J Neurophysiol* 99, 1581-1589.

Fagan, B.M., and Cahusac, P.M. (2001). Evidence for glutamate receptor mediated transmission at mechanoreceptors in the skin. *Neuroreport* 12, 341-347.

Fields, H.L., Bry, J., Hentall, I., and Zorman, G. (1983). The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *J Neurosci* 3, 2545-2552.

Fischer, L., Tambeli, C.H., and Parada, C.A. (2008). TRPA1-mediated nociception. *Neuroscience* 155, 337-338.

Fischer, M., Carli, G., Raboisson, P., and Reeh, P. (2014). The interphase of the formalin test. *Pain* 155, 511-521.

Foster, E., Wildner, H., Tudeau, L., Haueter, S., Ralvenius, W.T., Jegen, M., Johannssen, H., Hosli, L., Haenraets, K., Ghanem, A., *et al.* (2015). Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch. *Neuron* 85, 1289-1304.

Fu, K.Y., Light, A.R., and Maixner, W. (2000). Relationship between nociceptor activity, peripheral edema, spinal microglial activation and long-term hyperalgesia induced by formalin. *Neuroscience* 101, 1127-1135.

Fu, K.Y., Tan, Y.H., Sung, B., and Mao, J. (2009). Peripheral formalin injection induces unique spinal cord microglial phenotypic changes. *Neurosci Lett* 449, 234-239.

Gaillard, S., Lo Re, L., Mantilleri, A., Hepp, R., Urien, L., Malapert, P., Alonso, S., Deage, M., Kambrun, C., Landry, M., *et al.* (2014). GINIP, a Galphai-Interacting Protein, Functions as a Key Modulator of Peripheral GABAB Receptor-Mediated Analgesia. *Neuron* 84, 123-136.

Gauriau, C., and Bernard, J.F. (2002). Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol* 87, 251-258.

Geha, P.Y., Baliki, M.N., Harden, R.N., Bauer, W.R., Parrish, T.B., and Apkarian, A.V. (2008). The brain in chronic CRPS pain: abnormal gray-white matter interactions in emotional and autonomic regions. *Neuron* 60, 570-581.

Gobel, S., Falls, W.M., Bennett, G.J., Abdelmoumene, M., Hayashi, H., and Humphrey, E. (1980). An EM analysis of the synaptic connections of horseradish peroxidase-filled stalked cells and islet cells in the substantia gelatinosa of adult cat spinal cord. *J Comp Neurol* 194, 781-807.

Gruber-Schoffnegger, D., Drdla-Schutting, R., Honigsperger, C., Wunderbaldinger, G., Gassner, M., and Sandkuhler, J. (2013). Induction of thermal hyperalgesia and synaptic long-term potentiation in the spinal cord lamina I by TNF-alpha and IL-1beta is mediated by glial cells. *J Neurosci* 33, 6540-6551.

Grudt, T.J., and Perl, E.R. (2002). Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol* 540, 189-207.

Gu, J., Polak, J.M., Tapia, F.J., Marangos, P.J., and Pearse, A.G. (1981). Neuron-specific enolase in the Merkel cells of mammalian skin. The use of specific antibody as a simple and reliable histologic marker. *Am J Pathol* 104, 63-68.

Guler, A.D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., and Caterina, M. (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* 22, 6408-6414.

Halata, Z., Grim, M., and Baumann, K.I. (2003). [The Merkel cell: morphology, developmental origin, function]. *Cas Lek Cesk* 142, 4-9.

Han, Z.S., Zhang, E.T., and Craig, A.D. (1998). Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat Neurosci* 1, 218-225.

Hantman, A.W., van den Pol, A.N., and Perl, E.R. (2004). Morphological and physiological features of a set of spinal substantia gelatinosa neurons defined by green fluorescent protein expression. *J Neurosci* 24, 836-842.

Hartschuh, W., and Weihe, E. (1980). Fine structural analysis of the synaptic junction of Merkel cell-axon-complexes. *J Invest Dermatol* 75, 159-165.

He, W.J., Cui, J., Du, L., Zhao, Y.D., Burnstock, G., Zhou, H.D., and Ruan, H.Z. (2012). Spinal P2X(7) receptor mediates microglia activation-induced neuropathic pain in the sciatic nerve injury rat model. *Behav Brain Res* 226, 163-170.

Heinke, B., Ruscheweyh, R., Forsthuber, L., Wunderbaldinger, G., and Sandkuhler, J. (2004). Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurones identified by expression of green fluorescent protein in mice. *J Physiol* 560, 249-266.

Hensel, H., and Zotterman, Y. (1951). The effect of menthol on the thermoreceptors. *Acta Physiol Scand* 24, 27-34.

Herdegen, T., Rudiger, S., Mayer, B., Bravo, R., and Zimmermann, M. (1994). Expression of nitric oxide synthase and colocalisation with Jun, Fos and Krox transcription factors in spinal cord neurons following noxious stimulation of the rat hindpaw. *Brain Res Mol Brain Res* 22, 245-258.

Heumann, R., Korsching, S., Bandtlow, C., and Thoenen, H. (1987). Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol* 104, 1623-1631.

Hjerling-Leffler, J., Alqatari, M., Ernfors, P., and Koltzenburg, M. (2007). Emergence of functional sensory subtypes as defined by transient receptor potential channel expression. *J Neurosci* 27, 2435-2443.

Honma, Y., Yamakage, M., and Ninomiya, T. (1999). Effects of adrenergic stimulus on the activities of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels of dorsal root ganglion neurons in a neuropathic pain model. *Brain Res* 832, 195-206.

Hu, P., Bembrick, A.L., Keay, K.A., and McLachlan, E.M. (2007). Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain Behav Immun* 21, 599-616.

Hughes, D.I., Sikander, S., Kinnon, C.M., Boyle, K.A., Watanabe, M., Callister, R.J., and Graham, B.A. (2012). Morphological, neurochemical and electrophysiological features of parvalbumin-expressing cells: a likely source of axo-axonic inputs in the mouse spinal dorsal horn. *J Physiol* 590, 3927-3951.

Hunnskaar, S., and Hole, K. (1987). The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103-114.

Hunter, J.C., and Singh, L. (1994). Role of excitatory amino acid receptors in the mediation of the nociceptive response to formalin in the rat. *Neurosci Lett* 174, 217-221.

Hylden, J.L., Nahin, R.L., Traub, R.J., and Dubner, R. (1989). Expansion of receptive fields of spinal lamina I projection neurons in rats with unilateral adjuvant-induced inflammation: the contribution of dorsal horn mechanisms. *Pain* 37, 229-243.

Iggo, A., and Muir, A.R. (1969). The structure and function of a slowly adapting touch corpuscle in hairy skin. *J Physiol* 200, 763-796.

Iwagaki, N., Garzillo, F., Polgar, E., Riddell, J.S., and Todd, A.J. (2013). Neurochemical characterisation of lamina II inhibitory interneurons that express GFP in the PrP-GFP mouse. *Mol Pain* 9, 56.

Kajander, K.C., and Bennett, G.J. (1992). Onset of a painful peripheral neuropathy in rat: a partial and differential deafferentation and spontaneous discharge in A beta and A delta primary afferent neurons. *J Neurophysiol* 68, 734-744.

Kenshalo, D.R., and Gallegos, E.S. (1967). Multiple temperature-sensitive spots innervated by single nerve fibers. *Science* 158, 1064-1065.

Kenshalo, D.R., Jr., and Isensee, O. (1983). Responses of primate SI cortical neurons to noxious stimuli. *J Neurophysiol* 50, 1479-1496.

Kenshalo, D.R., Jr., Leonard, R.B., Chung, J.M., and Willis, W.D. (1979). Responses of primate spinothalamic neurons to graded and to repeated noxious heat stimuli. *J Neurophysiol* *42*, 1370-1389.

Kerstein, P.C., del Camino, D., Moran, M.M., and Stucky, C.L. (2009). Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors. *Mol Pain* *5*, 19.

Kim, D.S., Choi, J.O., Rim, H.D., and Cho, H.J. (2002). Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Brain Res Mol Brain Res* *105*, 146-152.

Kim, D.S., Yoon, C.H., Lee, S.J., Park, S.Y., Yoo, H.J., and Cho, H.J. (2001). Changes in voltage-gated calcium channel alpha(1) gene expression in rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* *96*, 151-156.

Kleinschnitz, C., Hofstetter, H.H., Meuth, S.G., Braeuninger, S., Sommer, C., and Stoll, G. (2006). T cell infiltration after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve is associated with interleukin-17 expression. *Exp Neurol* *200*, 480-485.

Kosugi, M., Nakatsuka, T., Fujita, T., Kuroda, Y., and Kumamoto, E. (2007). Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* *27*, 4443-4451.

Kumazawa, T., and Perl, E.R. (1977). Primate cutaneous sensory units with unmyelinated (C) afferent fibers. *J Neurophysiol* *40*, 1325-1338.

Kwan, K.Y., Allchorne, A.J., Vollrath, M.A., Christensen, A.P., Zhang, D.S., Woolf, C.J., and Corey, D.P. (2006). TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* *50*, 277-289.

Kwan, K.Y., Glazer, J.M., Corey, D.P., Rice, F.L., and Stucky, C.L. (2009). TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci* *29*, 4808-4819.

LaMotte, R.H., and Thalhammer, J.G. (1982). Response properties of high-threshold cutaneous cold receptors in the primate. *Brain Res* *244*, 279-287.

Lawson, J.J., McIlwrath, S.L., Woodbury, C.J., Davis, B.M., and Koerber, H.R. (2008). TRPV1 unlike TRPV2 is restricted to a subset of mechanically insensitive cutaneous nociceptors responding to heat. *J Pain* *9*, 298-308.

Lee, H., Iida, T., Mizuno, A., Suzuki, M., and Caterina, M.J. (2005). Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci* *25*, 1304-1310.

Legha, W., Gaillard, S., Gascon, E., Malapert, P., Hocine, M., Alonso, S., and Moqrich, A. (2010). *stac1* and *stac2* genes define discrete and distinct subsets of dorsal root ganglia neurons. *Gene Expr Patterns* *10*, 368-375.

Leitner, J., Westerholz, S., Heinke, B., Forsthuber, L., Wunderbaldinger, G., Jager, T., Gruber-Schoffnegger, D., Braun, K., and Sandkuhler, J. (2013). Impaired excitatory drive to spinal GABAergic neurons of neuropathic mice. *PLoS One* *8*, e73370.

Li, K., Lin, T., Cao, Y., Light, A.R., and Fu, K.Y. (2010). Peripheral formalin injury induces 2 stages of microglial activation in the spinal cord. *J Pain* *11*, 1056-1065.

Li, K., Tan, Y.H., Light, A.R., and Fu, K.Y. (2013). Different peripheral tissue injury induces differential phenotypic changes of spinal activated microglia. *Clin Dev Immunol* *2013*, 901420.

Li, L., Rutlin, M., Abaira, V.E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, M.P., Luo, W., Heintz, N., Koerber, H.R., *et al.* (2011). The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* *147*, 1615-1627.

Liedtke, W., and Friedman, J.M. (2003). Abnormal osmotic regulation in *trpv4*<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13698-13703.

Light, A.R., and Perl, E.R. (1979). Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J Comp Neurol* *186*, 133-150.

Lima, D., and Coimbra, A. (1983). The neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. A study based on reconstructions of serially sectioned cells. *Anat Embryol (Berl)* *167*, 273-288.



Lima, D., and Coimbra, A. (1986). A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 244, 53-71.

Liu, Q., Sikand, P., Ma, C., Tang, Z., Han, L., Li, Z., Sun, S., LaMotte, R.H., and Dong, X. (2012). Mechanisms of itch evoked by beta-alanine. *J Neurosci* 32, 14532-14537.

Liu, Q., Vrontou, S., Rice, F.L., Zylka, M.J., Dong, X., and Anderson, D.J. (2007). Molecular genetic visualization of a rare subset of unmyelinated sensory neurons that may detect gentle touch. *Nat Neurosci* 10, 946-948.

Loken, L.S., Wessberg, J., Morrison, I., McGlone, F., and Olausson, H. (2009). Coding of pleasant touch by unmyelinated afferents in humans. *Nat Neurosci* 12, 547-548.

Lorenzo, L.E., Magnussen, C., Bailey, A.L., St Louis, M., De Koninck, Y., and Ribeiro-da-Silva, A. (2014). Spatial and temporal pattern of changes in the number of GAD65-immunoreactive inhibitory terminals in the rat superficial dorsal horn following peripheral nerve injury. *Mol Pain* 10, 57.

Lu, V.B., Biggs, J.E., Stebbing, M.J., Balasubramanian, S., Todd, K.G., Lai, A.Y., Colmers, W.F., Dawbarn, D., Ballanyi, K., and Smith, P.A. (2009a). Brain-derived neurotrophic factor drives the changes in excitatory synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn that follow sciatic nerve injury. *J Physiol* 587, 1013-1032.

Lu, V.B., Colmers, W.F., and Smith, P.A. (2009b). Long-term effects of brain-derived neurotrophic factor on the frequency of inhibitory synaptic events in the rat superficial dorsal horn. *Neuroscience* 161, 1135-1143.

Lu, V.B., Colmers, W.F., and Smith, P.A. (2012). Long-term actions of BDNF on inhibitory synaptic transmission in identified neurons of the rat substantia gelatinosa. *J Neurophysiol* 108, 441-452.

Lu, Y., Dong, H., Gao, Y., Gong, Y., Ren, Y., Gu, N., Zhou, S., Xia, N., Sun, Y.Y., Ji, R.R., *et al.* (2013). A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *J Clin Invest* 123, 4050-4062.

Lu, Y., and Perl, E.R. (2003). A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci* 23, 8752-8758.

Lu, Y., and Perl, E.R. (2005). Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J Neurosci* 25, 3900-3907.

Macefield, V.G. (2005). Physiological characteristics of low-threshold mechanoreceptors in joints, muscle and skin in human subjects. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32, 135-144.

Macpherson, L.J., Xiao, B., Kwan, K.Y., Petrus, M.J., Dubin, A.E., Hwang, S., Cravatt, B., Corey, D.P., and Patapoutian, A. (2007). An ion channel essential for sensing chemical damage. *J Neurosci* 27, 11412-11415.

Magoul, R., Onteniente, B., Geffard, M., and Calas, A. (1987). Anatomical distribution and ultrastructural organization of the GABAergic system in the rat spinal cord. An immunocytochemical study using anti-GABA antibodies. *Neuroscience* 20, 1001-1009.

Maksimovic, S., Nakatani, M., Baba, Y., Nelson, A.M., Marshall, K.L., Wellnitz, S.A., Firozi, P., Woo, S.H., Ranade, S., Patapoutian, A., *et al.* (2014). Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature* 509, 617-621.

Malmberg, A.B., Chen, C., Tonegawa, S., and Basbaum, A.I. (1997). Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC $\gamma$ . *Science* 278, 279-283.

Mantuano, E., Lam, M.S., and Gonias, S.L. (2013). LRP1 assembles unique co-receptor systems to initiate cell signaling in response to tissue-type plasminogen activator and myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem* 288, 34009-34018.

Marshall, G.E., Shehab, S.A., Spike, R.C., and Todd, A.J. (1996). Neurokinin-1 receptors on lumbar spinothalamic neurons in the rat. *Neuroscience* 72, 255-263.

Martin, A.M., Kuhlmann, C., Trossbach, S., Jaeger, S., Waldron, E., Roebroek, A., Luhmann, H.J., Laatsch, A., Weggen, S., Lessmann, V., *et al.* (2008). The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 beta-chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 283, 12004-12013.

Maxwell, D.J., Belle, M.D., Cheunsuang, O., Stewart, A., and Morris, R. (2007). Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Physiol* 584, 521-533.

May, P., Rohlmann, A., Bock, H.H., Zurhove, K., Marth, J.D., Schomburg, E.D., Noebels, J.L., Beffert, U., Sweatt, J.D., Weeber, E.J., *et al.* (2004). Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice. *Mol Cell Biol* 24, 8872-8883.

McCall, W.D., Tanner, K.D., and Levine, J.D. (1996). Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neurosci Lett* 208, 45-48.

McCoy, E.S., Taylor-Blake, B., Street, S.E., Pribisko, A.L., Zheng, J., and Zylka, M.J. (2013). Peptidergic CGRP $\alpha$  primary sensory neurons encode heat and itch and tonically suppress sensitivity to cold. *Neuron* 78, 138-151.

McKemy, D.D. (2013). The molecular and cellular basis of cold sensation. *ACS Chem Neurosci* 4, 238-247.

McKemy, D.D., Neuhausser, W.M., and Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52-58.

McNamara, C.R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D.M., Siemens, J., Deranian, K.L., Zhao, M., Hayward, N.J., Chong, J.A., Julius, D., Moran, M.M., *et al.* (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13525-13530.

McRoberts, J.A., Ennes, H.S., Marvizon, J.C., Fanselow, M.S., Mayer, E.A., and Vissel, B. (2011). Selective knockdown of NMDA receptors in primary afferent neurons decreases pain during phase 2 of the formalin test. *Neuroscience* 172, 474-482.

Melrose, H.L., Kinloch, R.A., Cox, P.J., Field, M.J., Collins, D., and Williams, D. (2007). [3H] pregabalin binding is increased in ipsilateral dorsal horn following chronic constriction injury. *Neurosci Lett* 417, 187-192.

Melzack, R., and Wall, P.D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150, 971-979.

Menendez, L., Bester, H., Besson, J.M., and Bernard, J.F. (1996). Parabrachial area: electrophysiological evidence for an involvement in cold nociception. *J Neurophysiol* 75, 2099-2116.

Mishra, S.K., Tisel, S.M., Orestes, P., Bhangoo, S.K., and Hoon, M.A. (2011). TRPV1-lineage neurons are required for thermal sensation. *EMBO J* 30, 582-593.

Moalem, G., Xu, K., and Yu, L. (2004). T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience* 129, 767-777.

Moore, K.A., Kohno, T., Karchewski, L.A., Scholz, J., Baba, H., and Woolf, C.J. (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.

Moqrich, A., Earley, T.J., Watson, J., Andahazy, M., Backus, C., Martin-Zanca, D., Wright, D.E., Reichardt, L.F., and Patapoutian, A. (2004). Expressing TrkC from the TrkA locus causes a subset of dorsal root ganglia neurons to switch fate. *Nat Neurosci* 7, 812-818.

Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S., Andahazy, M., Story, G.M., and Patapoutian, A. (2005). Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307, 1468-1472.

Morenilla-Palao, C., Luis, E., Fernandez-Pena, C., Quintero, E., Weaver, J.L., Bayliss, D.A., and Viana, F. (2014). Ion channel profile of TRPM8 cold receptors reveals a role of TASK-3 potassium channels in thermosensation. *Cell Rep* 8, 1571-1582.

Nassar, M.A., Stirling, L.C., Forlani, G., Baker, M.D., Matthews, E.A., Dickenson, A.H., and Wood, J.N. (2004). Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12706-12711.

Navratilova, E., and Porreca, F. (2014). Reward and motivation in pain and pain relief. *Nat Neurosci* 17, 1304-1312.

Neumann, S., Braz, J.M., Skinner, K., Llewellyn-Smith, I.J., and Basbaum, A.I. (2008). Innocuous, not noxious, input activates PKC $\gamma$  interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J Neurosci* 28, 7936-7944.

Noel, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschali er, A., *et al.* (2009). The mechano-activated K<sup>+</sup> channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J* 28, 1308-1318.

Nonner, W., Spalding, B.C., and Hille, B. (1980). Low intracellular pH and chemical agents slow inactivation gating in sodium channels of muscle. *Nature* 284, 360-363.

Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Tominaga, M., and Noguchi, K. (2005). TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest* 115, 2393-2401.

Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Mizushima, T., Fukuoka, T., Tokunaga, A., and Noguchi, K. (2004). Differential activation of MAPK in injured and uninjured DRG neurons following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Eur J Neurosci* 20, 2881-2895.

Obata, K., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Yi, D., Tokunaga, A., Hashimoto, N., Yoshikawa, H., and Noguchi, K. (2003). Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Pain* 101, 65-77.

Orio, P., Madrid, R., de la Pena, E., Parra, A., Meseguer, V., Bayliss, D.A., Belmonte, C., and Viana, F. (2009). Characteristics and physiological role of hyperpolarization activated currents in mouse cold thermoreceptors. *J Physiol* 587, 1961-1976.

Palazzo, E., de Novellis, V., Petrosino, S., Marabese, I., Vita, D., Giordano, C., Di Marzo, V., Mangoni, G.S., Rossi, F., and Maione, S. (2006). Neuropathic pain and the endocannabinoid system in the dorsal raphe: pharmacological treatment and interactions with the serotonergic system. *Eur J Neurosci* 24, 2011-2020.

Parada, C.A., Tambeli, C.H., Cunha, F.Q., and Ferreira, S.H. (2001). The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience* 102, 937-944.

Pawson, L., Checkosky, C.M., Pack, A.K., and Bolanowski, S.J. (2008). Mesenteric and tactile Pacinian corpuscles are anatomically and physiologically comparable. *Somatosens Mot Res* 25, 194-206.

Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., *et al.* (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108, 705-715.

Perl, E.R., Kumazawa, T., Lynn, B., and Kenins, P. (1976). Sensitization of high threshold receptors with unmyelinated (C) afferent fibers. *Prog Brain Res* 43, 263-277.

Pertovaara, A. (2006). Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol* 80, 53-83.

Peterson, M.A., Basbaum, A.I., Abbadie, C., Rohde, D.S., McKay, W.R., and Taylor, B.K. (1997). The differential contribution of capsaicin-sensitive afferents to behavioral and cardiovascular measures of brief and persistent nociception and to Fos expression in the formalin test. *Brain Res* 755, 9-16.

Pitcher, G.M., and Henry, J.L. (2000). Cellular mechanisms of hyperalgesia and spontaneous pain in a spinalized rat model of peripheral neuropathy: changes in myelinated afferent inputs implicated. *Eur J Neurosci* 12, 2006-2020.

Polgar, E., Gray, S., Riddell, J.S., and Todd, A.J. (2004). Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain* 111, 144-150.

Polgar, E., Hughes, D.I., Riddell, J.S., Maxwell, D.J., Puskar, Z., and Todd, A.J. (2003). Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* 104, 229-239.

Polgar, E., Sardella, T.C., Tiong, S.Y., Locke, S., Watanabe, M., and Todd, A.J. (2013). Functional differences between neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the rat spinal dorsal horn. *Pain* 154, 2606-2615.

Porreca, F., Burgess, S.E., Gardell, L.R., Vanderah, T.W., Malan, T.P., Jr., Ossipov, M.H., Lappi, D.A., and Lai, J. (2001). Inhibition of neuropathic pain by selective ablation of brainstem medullary cells expressing the mu-opioid receptor. *J Neurosci* 21, 5281-5288.

Prescott, S.A., and De Koninck, Y. (2002). Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. *J Physiol* 539, 817-836.

Presley, R.W., Menetrey, D., Levine, J.D., and Basbaum, A.I. (1990). Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci* 10, 323-335.

Puig, S., and Sorkin, L.S. (1996). Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* 64, 345-355.

Ramer, M.S., and Bisby, M.A. (1999). Adrenergic innervation of rat sensory ganglia following proximal or distal painful sciatic neuropathy: distinct mechanisms revealed by anti-NGF treatment. *Eur J Neurosci* 11, 837-846.

Rau, K.K., McIlwrath, S.L., Wang, H., Lawson, J.J., Jankowski, M.P., Zylka, M.J., Anderson, D.J., and Koerber, H.R. (2009). Mrgprd enhances excitability in specific populations of cutaneous murine polymodal nociceptors. *J Neurosci* 29, 8612-8619.

Reeh, P. (2008). TRPA1-mediated nociception: response to letter by Fischer et al. *Neuroscience* 155, 339; author reply 340.

Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96, 414-495.

Reynders, A., Mantilleri, A., Malapert, P., Rialle, S., Nidelet, S., Laffray, S., Beurrier, C., Bourinet, E., and Moqrich, A. (2015). Transcriptional Profiling of Cutaneous MRGPRD Free Nerve Endings and C-LTMRs. *Cell reports*.

Rogoz, K., Andersen, H.H., Lagerstrom, M.C., and Kullander, K. (2014). Multimodal use of calcitonin gene-related peptide and substance P in itch and acute pain uncovered by the elimination of vesicular glutamate transporter 2 from transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 neurons. *J Neurosci* 34, 14055-14068.

Rohde, D.S., Detweiler, D.J., and Basbaum, A.I. (1997). Formalin-evoked Fos expression in spinal cord is enhanced in morphine-tolerant rats. *Brain Res* 766, 93-100.

Rutlin, M., Ho, C.Y., Abaira, V.E., Cassidy, C., Woodbury, C.J., and Ginty, D.D. (2014). The cellular and molecular basis of direction selectivity of Adelta-LTMRs. *Cell* 159, 1640-1651.

Salio, C., Lossi, L., Ferrini, F., and Merighi, A. (2005). Ultrastructural evidence for a pre- and postsynaptic localization of full-length trkB receptors in substantia gelatinosa (lamina II) of rat and mouse spinal cord. *Eur J Neurosci* 22, 1951-1966.

Sandkuhler, J., and Gruber-Schoffnegger, D. (2012). Hyperalgesia by synaptic long-term potentiation (LTP): an update. *Curr Opin Pharmacol* 12, 18-27.

Scholz, J., Broom, D.C., Youn, D.H., Mills, C.D., Kohno, T., Suter, M.R., Moore, K.A., Decosterd, I., Coggeshall, R.E., and Woolf, C.J. (2005). Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 25, 7317-7323.

Seal, R.P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S.N., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I., and Edwards, R.H. (2009). Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462, 651-655.

Semba, K., Masarachia, P., Malamed, S., Jacquin, M., Harris, S., and Egger, M.D. (1984). Ultrastructure of pacinian corpuscle primary afferent terminals in the cat spinal cord. *Brain Res* 302, 135-150.

Shi, X., Wang, L., Li, X., Sahbaie, P., Kingery, W.S., and Clark, J.D. (2011). Neuropeptides contribute to peripheral nociceptive sensitization by regulating interleukin-1beta production in keratinocytes. *Anesth Analg* 113, 175-183.

Shi, Y., Mantuano, E., Inoue, G., Campana, W.M., and Gonias, S.L. (2009). Ligand binding to LRP1 transactivates Trk receptors by a Src family kinase-dependent pathway. *Sci Signal* 2, ra18.

Shields, S.D., Cavanaugh, D.J., Lee, H., Anderson, D.J., and Basbaum, A.I. (2010). Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *Pain* 151, 422-429.

Shinohara, T., Harada, M., Ogi, K., Maruyama, M., Fujii, R., Tanaka, H., Fukusumi, S., Komatsu, H., Hosoya, M., Noguchi, Y., et al. (2004). Identification of a G protein-coupled receptor specifically responsive to beta-alanine. *J Biol Chem* 279, 23559-23564.

Sommer, C., and Schafers, M. (1998). Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. *Brain Res* 784, 154-162.

Song, X.J., Cao, J.L., Li, H.C., Zheng, J.H., Song, X.S., and Xiong, L.Z. (2008). Upregulation and redistribution of ephrinB and EphB receptor in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn neurons after peripheral nerve injury and dorsal rhizotomy. *Eur J Pain* 12, 1031-1039.

Spike, R.C., Puskar, Z., Andrew, D., and Todd, A.J. (2003). A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *Eur J Neurosci* 18, 2433-2448.

Srinivasan, M.A., Whitehouse, J.M., and LaMotte, R.H. (1990). Tactile detection of slip: surface microgeometry and peripheral neural codes. *J Neurophysiol* 63, 1323-1332.

Stamboulian, S., Choi, J.S., Ahn, H.S., Chang, Y.W., Tyrrell, L., Black, J.A., Waxman, S.G., and Dib-Hajj, S.D. (2010). ERK1/2 mitogen-activated protein kinase phosphorylates sodium channel Na(v)1.7 and alters its gating properties. *J Neurosci* 30, 1637-1647.

Stirling, L.C., Forlani, G., Baker, M.D., Wood, J.N., Matthews, E.A., Dickenson, A.H., and Nassar, M.A. (2005). Nociceptor-specific gene deletion using heterozygous NaV1.8-Cre recombinase mice. *Pain* 113, 27-36.

Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., *et al.* (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112, 819-829.

Sung, B., Lim, G., and Mao, J. (2003). Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 23, 2899-2910.

Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K., and Imai, M. (2003). Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem* 278, 22664-22668.

Tal, M., and Eliav, E. (1996). Abnormal discharge originates at the site of nerve injury in experimental constriction neuropathy (CCI) in the rat. *Pain* 64, 511-518.

Tavares, I., and Lima, D. (2002). The caudal ventrolateral medulla as an important inhibitory modulator of pain transmission in the spinal cord. *J Pain* 3, 337-346.

Tavares, I., Lima, D., and Coimbra, A. (1997). The pontine A5 noradrenergic cells which project to the spinal cord dorsal horn are reciprocally connected with the caudal ventrolateral medulla in the rat. *Eur J Neurosci* 9, 2452-2461.

Taylor, B.K., and Basbaum, A.I. (2000). Early antinociception delays edema but does not reduce the magnitude of persistent pain in the formalin test. *J Pain* 1, 218-228.

Todd, A.J., Puskar, Z., Spike, R.C., Hughes, C., Watt, C., and Forrest, L. (2002). Projection neurons in lamina I of rat spinal cord with the neurokinin 1 receptor are selectively innervated by substance p-containing afferents and respond to noxious stimulation. *J Neurosci* 22, 4103-4113.

Todd, A.J., and Spike, R.C. (1993). The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol* 41, 609-645.

Todd, A.J., Spike, R.C., Brodbelt, A.R., Price, R.F., and Shehab, S.A. (1994). Some inhibitory neurons in the spinal cord develop c-fos-immunoreactivity after noxious stimulation. *Neuroscience* 63, 805-816.

Todd, A.J., and Sullivan, A.C. (1990). Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 296, 496-505.

Torsney, C., and MacDermott, A.B. (2006). Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci* 26, 1833-1843.

Treede, R.D., Meyer, R.A., and Campbell, J.N. (1998). Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: heat-response properties. *J Neurophysiol* 80, 1082-1093.

Treede, R.D., Meyer, R.A., Raja, S.N., and Campbell, J.N. (1995). Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *J Physiol* 483 ( Pt 3), 747-758.

Tseng, T.J., Hsieh, Y.L., Ko, M.H., and Hsieh, S.T. (2014). Redistribution of voltage-gated sodium channels after nerve decompression contributes to relieve neuropathic pain in chronic constriction injury. *Brain Res* 1589C, 15-25.

Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., and Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 778-783.

Uta, D., Furue, H., Pickering, A.E., Rashid, M.H., Mizuguchi-Takase, H., Katafuchi, T., Imoto, K., and Yoshimura, M. (2010). TRPA1-expressing primary afferents synapse with a morphologically identified subclass of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 31, 1960-1973.

Vetter, I., Hein, A., Sattler, S., Hessler, S., Touska, F., Bressan, E., Parra, A., Hager, U., Leffler, A., Boukalova, S., *et al.* (2013). Amplified cold transduction in native nociceptors by M-channel inhibition. *J Neurosci* 33, 16627-16641.

Viana, F., de la Pena, E., and Belmonte, C. (2002). Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat Neurosci* 5, 254-260.

Vriens, J., Nilius, B., and Voets, T. (2014). Peripheral thermosensation in mammals. *Nat Rev Neurosci* 15, 573-589.

Wang, H., and Zylka, M.J. (2009). Mrgprd-expressing polymodal nociceptive neurons innervate most known classes of substantia gelatinosa neurons. *J Neurosci* 29, 13202-13209.

Wang, R., King, T., De Felice, M., Guo, W., Ossipov, M.H., and Porreca, F. (2013). Descending facilitation maintains long-term spontaneous neuropathic pain. *J Pain* 14, 845-853.

Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., and Nilius, B. (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 424, 434-438.

Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S.H., Benham, C.D., Droogmans, G., and Nilius, B. (2002). Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 277, 47044-47051.

Woo, S.H., Ranade, S., Weyer, A.D., Dubin, A.E., Baba, Y., Qiu, Z., Petrus, M., Miyamoto, T., Reddy, K., Lumpkin, E.A., *et al.* (2014). Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature* 509, 622-626.

Woolf, C.J. (1987). Central terminations of cutaneous mechanoreceptive afferents in the rat lumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 261, 105-119.

Yaksh, T.L., Farb, D.H., Leeman, S.E., and Jessell, T.M. (1979). Intrathecal capsaicin depletes substance P in the rat spinal cord and produces prolonged thermal analgesia. *Science* 206, 481-483.

Yasaka, T., Tiong, S.Y., Hughes, D.I., Riddell, J.S., and Todd, A.J. (2010). Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 151, 475-488.

Yasaka, T., Tiong, S.Y., Polgar, E., Watanabe, M., Kumamoto, E., Riddell, J.S., and Todd, A.J. (2014). A putative relay circuit providing low-threshold mechanoreceptive input to lamina I projection neurons via vertical cells in lamina II of the rat dorsal horn. *Mol Pain* 10, 3.

Yashpal, K., Katz, J., andCoderre, T.J. (1996). Effects of preemptive or postinjury intrathecal local anesthesia on persistent nociceptive responses in rats. Confounding influences of peripheral inflammation and the general anesthetic regimen. *Anesthesiology* 84, 1119-1128.

Yu, X.H., Ribeiro-da-Silva, A., and De Koninck, Y. (2005). Morphology and neurokinin 1 receptor expression of spinothalamic lamina I neurons in the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 491, 56-68.

Yu, X.H., Zhang, E.T., Craig, A.D., Shigemoto, R., Ribeiro-da-Silva, A., and De Koninck, Y. (1999). NK-1 receptor immunoreactivity in distinct morphological types of lamina I neurons of the primate spinal cord. *J Neurosci* 19, 3545-3555.

Zhang, H., and Dougherty, P.M. (2011). Acute inhibition of signalling phenotype of spinal GABAergic neurons by tumour necrosis factor-alpha. *J Physiol* 589, 4511-4526.

Zhang, H., and Dougherty, P.M. (2013). Dynamic effects of TNF-alpha on synaptic transmission in mice over time following sciatic nerve chronic constriction injury. *J Neurophysiol* 110, 1663-1671.

Zhang, J., Cavanaugh, D.J., Nemenov, M.I., and Basbaum, A.I. (2013). The modality-specific contribution of peptidergic and non-peptidergic nociceptors is manifest at the level of dorsal horn nociceptive neurons. *J Physiol* 591, 1097-1110.

Zheng, J., Lu, Y., and Perl, E.R. (2010). Inhibitory neurones of the spinal substantia gelatinosa mediate interaction of signals from primary afferents. *J Physiol* 588, 2065-2075.

Zhuo, R.G., Ma, X.Y., Zhou, P.L., Liu, X.Y., Zhang, K., Wei, X.L., Yan, H.T., Xu, J.P., and Zheng, J.Q. (2014). Mas-related G protein-coupled receptor D is coupled to endogenous calcium-activated chloride channel in *Xenopus* oocytes. *J Physiol Biochem* 70, 185-191.

Zimmer, A., Zimmer, A.M., Baffi, J., Usdin, T., Reynolds, K., Konig, M., Palkovits, M., and Mezey, E. (1998). Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the tachykinin 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2630-2635.

Zimmermann, K., Hein, A., Hager, U., Kaczmarek, J.S., Turnquist, B.P., Clapham, D.E., and Reeh, P.W. (2009). Phenotyping sensory nerve endings in vitro in the mouse. *Nat Protoc* 4, 174-196.

Zimmermann, K., Leffler, A., Babes, A., Cendan, C.M., Carr, R.W., Kobayashi, J., Nau, C., Wood, J.N., and Reeh, P.W. (2007). Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* 447, 855-858.

Zimmermann, K., Lennerz, J.K., Hein, A., Link, A.S., Kaczmarek, J.S., Delling, M., Uysal, S., Pfeifer, J.D., Riccio, A., and Clapham, D.E. (2011). Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 18114-18119.

Zotterman, Y. (1939). Touch, pain and tickling: an electro-physiological investigation on cutaneous sensory nerves. *J Physiol* 95, 1-28.

Zwick, M., Davis, B.M., Woodbury, C.J., Burkett, J.N., Koerber, H.R., Simpson, J.F., and Albers, K.M. (2002). Glial cell line-derived neurotrophic factor is a survival factor for isolectin B4-positive, but not vanilloid receptor 1-positive, neurons in the mouse. *J Neurosci* 22, 4057-4065.

Zylka, M.J., Rice, F.L., and Anderson, D.J. (2005). Topographically distinct epidermal nociceptive circuits revealed by axonal tracers targeted to Mrgprd. *Neuron* 45, 17-25.

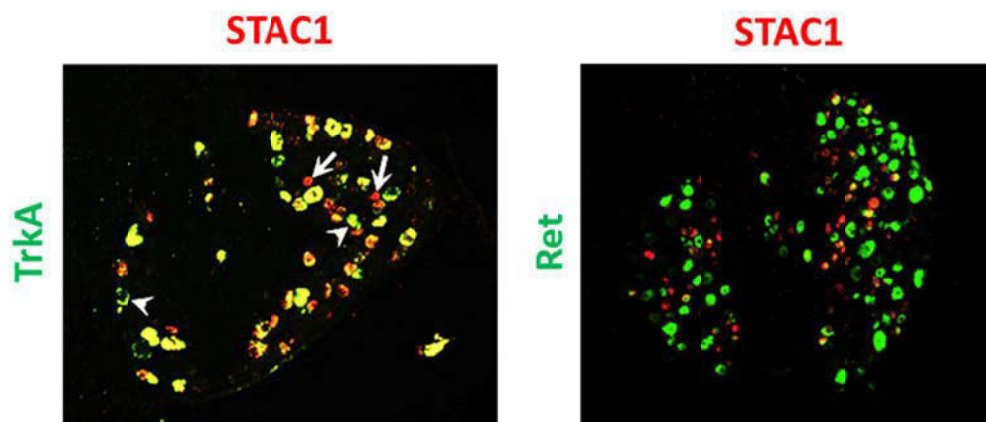
# **ANNEXE 1**



## Projet STAC1

Comme présenté en introduction, un des objectifs majeurs de l'équipe à mon arrivée était d'identifier de nouveaux marqueurs spécifiques d'une sous population de nocicepteurs. Suite à un crible transcriptionnel, l'équipe a sélectionné le gène STAC1 pour de plus amples investigations. .

A mon arrivée dans l'équipe, un précédent étudiant en thèse, Wassim Legha, avait caractérisé le pattern d'expression du gène STAC1. Ce gène est spécifiquement exprimé dans une sous population de neurones TrkA+, Ret-. Il s'agit donc d'un **nouveau marqueur d'une sous population de nocicepteurs peptidergiques**.



D'après (Legha et al., 2010)

Figure 1 : Pattern d'expression du gène STAC1 dans le DRG de souris sauvages adultes. STAC1 est exprimé dans des nocicepteurs peptidergiques. Hybridation in situ *TrkA*, *Ret*, *STAC1*

De plus, le gène STAC1 code pour une protéine adaptatrice comprenant un domaine riche en cystéine et deux domaines SH3. Cette signature protéique suggère que la protéine STAC1 jouerait un rôle clé dans la **signalisation intracellulaire** des neurones qui les expriment.

Mon projet avait donc pour but d'une part, d'étudier le rôle de la protéine STAC1 dans la physiologie des neurones qui l'expriment et d'autre part, d'appréhender le rôle de la sous population de neurones STAC1 positifs dans la détection de différentes modalités sensorielles. Pour se faire, nous avons décidé de générer un nouveau modèle murin hautement versatile, obtenu grâce à la recombinaison homologue d'un transgène au niveau du locus du gène STAC1. Ce transgène est composé de deux cassettes : la première cassette contient le cDNA de STAC1 fusionnée à la Venus, une protéine reporthrice fluorescence. Elle est entourée de deux sites Lox P ; la deuxième cassette

contient le récepteur humain à la toxine diphtérique. Une cassette FRT-PGK-Neo permet la sélection des clones ayant effectué la recombinaison homologue.



Figure 2 : Représentation schématique du transgène.

L'expression de la première cassette nécessite l'excision de la première rendue possible par la présence des deux sites lox P. Cette excision peut être ubiquitaire ou spécifique à un tissu, selon la souris CRE spécifique utilisée. En croisant nos animaux *fl*ox hétérozygotes avec une souris *Nav1.8<sup>Cre+</sup>* (spécifiquement exprimé dans les neurones du DRG), nous obtenons une inactivation spécifique du gène *STAC1* dans les neurones du DRG, ainsi que l'expression du récepteur à la toxine diphtérique dans ces neurones.

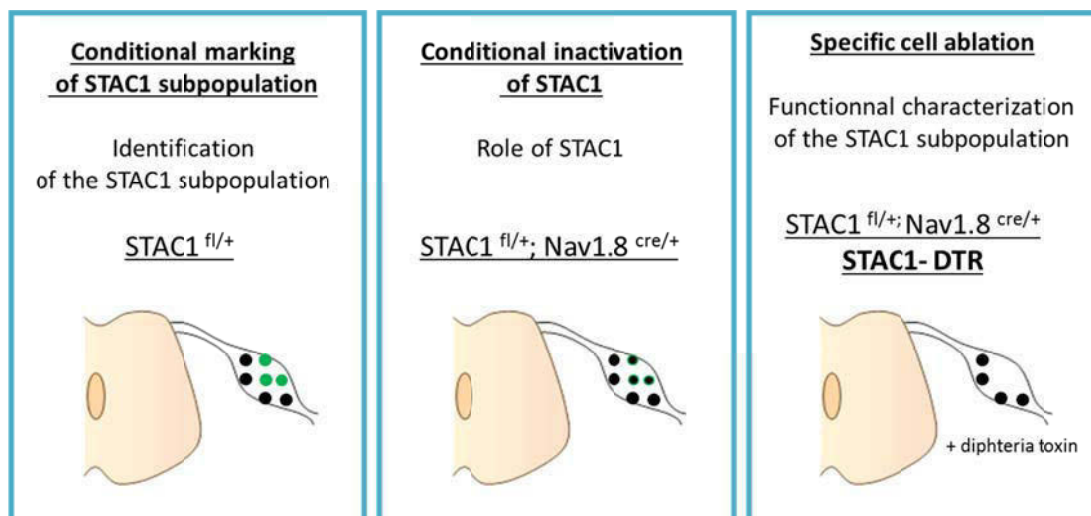
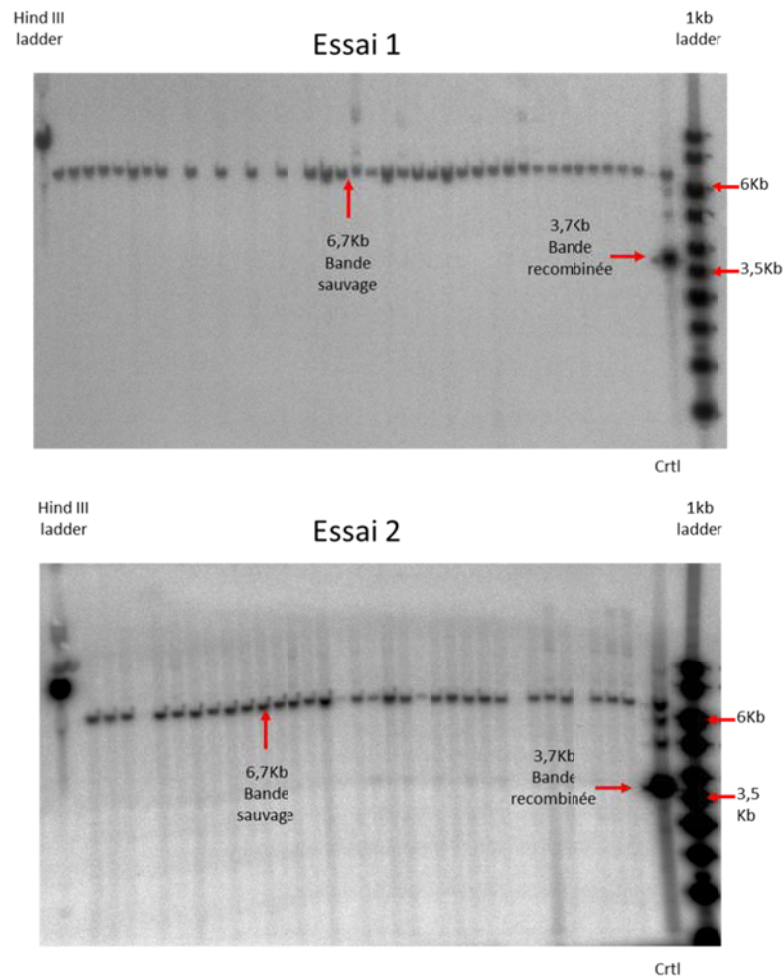


Figure 3 : Représentation schématique des questions biologiques et du modèle murin utilisé pour y répondre.

La souris KI *STAC1* permet de répondre à trois questions biologiques.

J'ai donc généré le transgène décrit en fig.1, que j'ai exprimé dans le Bacterial Artificial Chromosome (BAC) *STAC1* afin de permettre une recombinaison homologue. Cette construction a été envoyée au SEAT de Villejuif afin d'être électroporée dans des cellules ES. Nous avons reçu 2 séries de clones que

j'ai testés par PCR en utilisant des primers externes au bras d'homologie 5' et internes à la construction, puis par southern blot avec l'aide de Serge Alonso. Un clone est apparu positif par PCR mais nous n'avons pas pu confirmer ce résultat par southern blot (fig. 3). Le locus STAC1 se révélant résistant à la recombinaison homologue, nous avons décidé d'abandonner ce projet et de réorienter mes travaux de thèse sur le projet Tau Tafa.



**Figure 4 :** Southern blot effectué à partir de l'ARN des cellules ES injectées avec le transgène STAC1. Aucun clone positif n'est apparu. (S. Alonso)

# ANNEXE 2

\*

# Projet tau tafa

## 1. Présentation du projet

Avant mon implication dans ce projet, l'équipe travaillait sur un nouveau gène, Tafa4 (Delfini et al., 2013). Ce gène code pour une petite protéine sécrétée d'environ 100 acides aminés. La souris mutante KO Tafa4 est viable et développe une hypersensibilité à la douleur induite par la formaline et une hypersensibilité mécanique en conditions inflammatoire et neuropathique (Delfini et al., 2013). Tafa4 agit au niveau de la moelle épinière en modulant l'excitabilité des interneurons recevant l'information douloureuse. De manière très surprenante, le phénotype douloureux est inversé par l'injection intrathécale de la protéine recombinante Tafa4 humaine (Delfini et al., 2013). Ce résultat très encourageant suggère un rôle putatif analgésique de Tafa4 chez la souris et notre laboratoire a déposé un brevet à ce sujet.

Mon projet avait donc pour objectif d'approfondir nos connaissances sur la protéine Tafa4 et je me suis intéressée plus particulièrement à l'identification de son récepteur, ses modalités d'action, et son effet analgésique. Pour cela, Pascale Malapert a généré une souris Knock-In (KI)  $Tau^{Tafa4-HA}$ . Ce modèle nous permet de surexprimer la protéine *tafa4* taguée avec l'hémagglutinine (HA) de manière spécifique dans les neurones. Pour ce faire, un transgène a été inséré dans le locus du gène *mapt* (*Tau*), exprimé dans tous les neurones. Ce transgène est composé de deux cassettes. La première contient le gène rapporteur Venus suivi d'une séquence triple polyA arrêtant la transcription. Cette cassette est flanquée de deux sites lox P. La deuxième cassette contient le cDNA de *tafa4* fusionné à l'hémagglutinine (HA). Les deux cassettes sont suivies de la cassette néomycine qui permet la sélection des cellules souches ayant recombinées le transgène. Enfin cette construction est encadrée par deux bras d'homologie appartenant au gène *mapt* (*tau*).

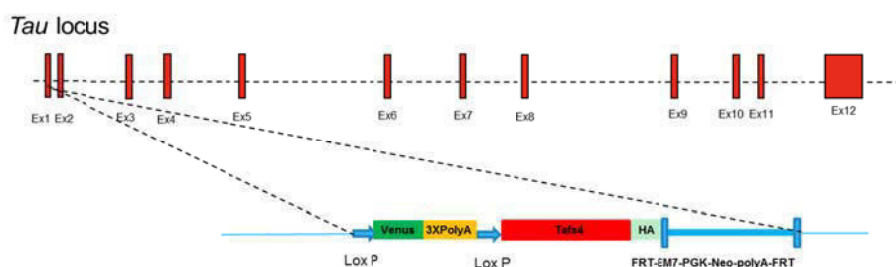
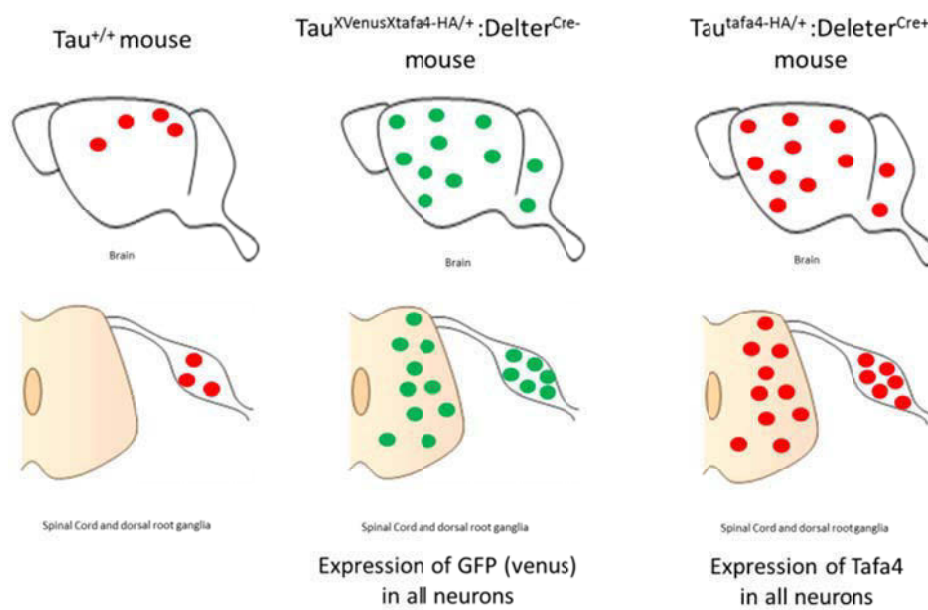


Figure 1: Présentation de la construction transgénique insérée au locus du gène *Tau* par recombinaison homologue.

Grâce à ce nouveau modèle, nous pouvons surexprimer la protéine *tafa4* de manière conditionnelle, soit dans tous les neurones (grâce à un croisement avec une souris qui exprime la Cre recombinase de façon ubiquitaire, *Deleter<sup>Cre</sup>*) ou de manière spécifique dans les neurones des DRGs (grâce à un croisement avec une souris *Nav1.8<sup>Cre</sup>*). De plus, il nous est enfin possible de détecter la protéine *tafa4*, grâce au tag HA, ce qui était jusque lors impossible car il n'existe pas d'anticorps anti *tafa4*.



**Figure 2** : Représentation schématique de notre modèle murin

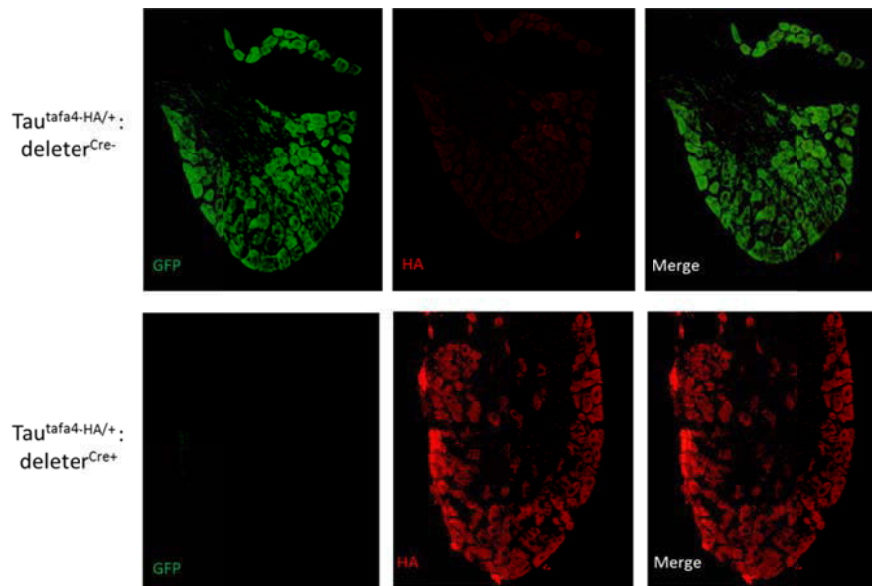
Etant en mesure de détecter la protéine, nous pouvons adresser une nouvelle question centrale : quel est son récepteur et son mode d'action ? Enfin nous cherchions à examiner quels sont les effets de cette surexpression sur la douleur induite par la formaline et douleurs mécaniques en conditions inflammatoire et neuropathique.

## 2. Résultats

### 2.1 Caractérisation des animaux

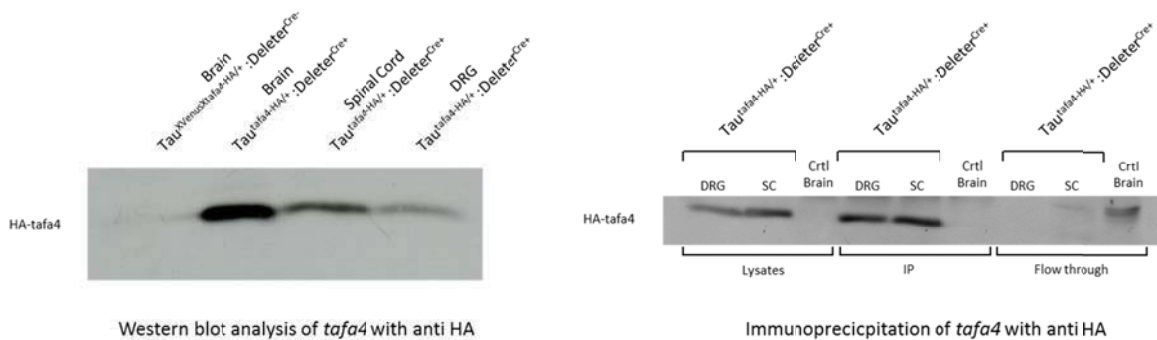
Afin de valider ce modèle murin, j'ai généré de deux lignées d'animaux:  $\text{Tau}^{\text{Venus-tafa4-HA/+}}$  et  $\text{Tau}^{\text{tafa4-HA/+};\text{deleter}^{\text{Cre+}}}$ . J'ai confirmé par immunohistochimie que les souris  $\text{Tau}^{\text{Venus-tafa4-HA/+}}$  nouveau-nées (P0) et adultes expriment bien la fluorescence Venus dans tous les neurones des DRGs et de la moelle épinière, mais pas la protéine Tafa4-HA. En revanche, après croisement de la souris  $\text{Tau}^{\text{Venus-tafa4-HA/+}}$  avec la souris cre-deleter et excision de la cassette Venus, la descendance  $\text{Tau}^{\text{tafa4-HA/+}}$

$HA^{+} :deleter^{Cre+}$  exprime Tafa4-HA dans les DRGs et la moelle de souris P0 et adultes, et pas la fluorescence Venus.



**Figure 3 :** Expression de HA-tafa4 et GFP dans les neurones de DRG d'animaux adultes  $Tau^{tafa4-HA/+} :Deleter^{Cre-}$  versus  $Tau^{tafa4-HA/+} :Deleter^{Cre+}$

Sur Western blot et par immunoprécipitation, j'ai confirmé la présence de la protéine Tafa4-HA dans les neurones du cerveau, de la moelle épinière et des DRGs de souris adultes  $Tau^{tafa4-HA/+} :Deleter^{Cre+}$ .



**Figure 4 :** Détection de la protéine tafa4 par western blot et immuno-précipitation dans les DRGs, la moelle épinière et le cerveau d'animaux  $Tau^{tafa4-HA/+} :Deleter^{Cre+}$

Enfin j'ai testé la coordination motrice des animaux adultes  $Tau^{Venus-tafa4-HA/+};Deleter^{Cre-}$  et  $Tau^{tafa4-HA/+};Deleter^{Cre+}$  en effectuant le test du rotarod : aucune différence significative n'apparaît entre les deux génotypes. Ceci est également le cas pour le test d'open field de cinq minutes mesurant l'anxiété des animaux.

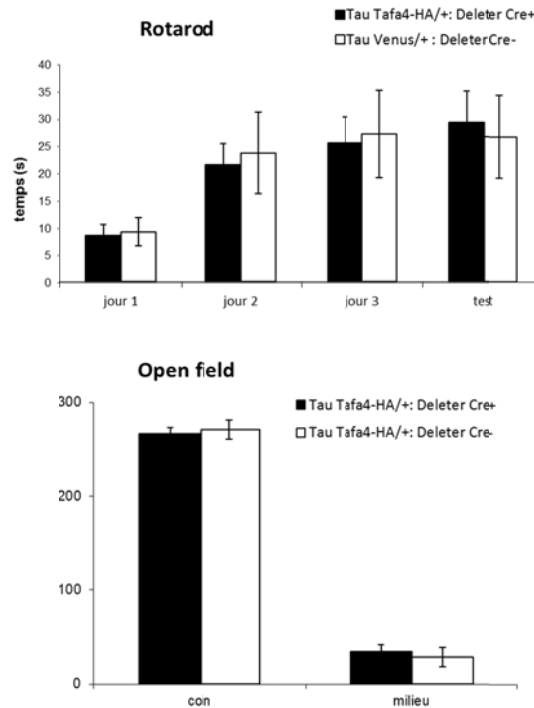


Figure 5 : Analyses comportementales (rotarod et open field) des animaux adultes  $Tau^{Venus-tafa4-HA/+};Deleter^{Cre-}$  et  $Tau^{tafa4-HA/+};Deleter^{Cre+}$

## 2.2 Récepteur de Tafa4

Grâce à un crible double-hybride utilisant Tafa4 comme appât, nous avons identifié LRP1 (Low-Density Lipoprotein Receptor Related protein-1) comme récepteur potentiel de Tafa4.

Notre hypothèse était que LRP1 était le récepteur de la protéine Tafa4. LRP1 est largement exprimé par les neurones du système nerveux central et périphérique. Dans ce système, ce récepteur a été décrit pour interagir avec le récepteur NMDA, localisé dans le compartiment post-synaptique, où il serait susceptible d'influencer la transmission synaptique en modulant la régulation et le turnover de protéines synaptiques (NMDA, PSD-95, synapsine) avec lesquelles il co-immunoprécipite (Martin et al., 2008; May et al., 2004). Ces données renforçaient l'étude de notre équipe, démontrant une modification de la transmission synaptique au niveau de la moelle épinière chez l'animal mutant pour Tafa4. D'autre part, LRP1 est connu pour transactiver les récepteurs Trk et ainsi promouvoir une

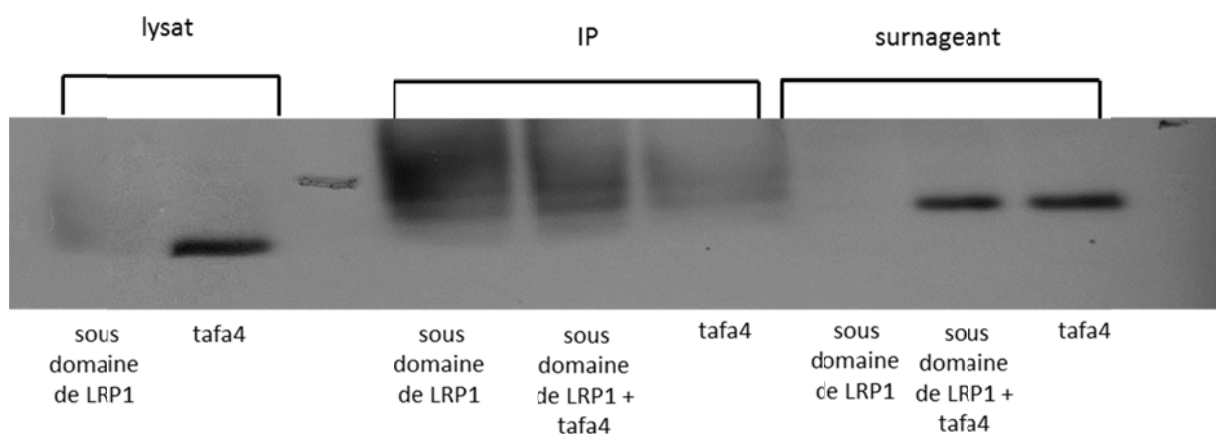


activité trophique des ligands de LRP1 (Shi et al., 2009). Enfin, une récente étude rassemble ces deux travaux en démontrant que l'activation de LRP1 implique le récepteur NMDA et secondairement la transactivation des récepteurs Trk (Mantuano et al., 2013).

En nous appuyant sur ces études, nous postulons un nouveau modèle dans lequel Tafa4, nouveau ligand de LRP1, permettrait l'activation des récepteurs NMDA modulant ainsi la transmission synaptique, et donc le transfert des informations douloureuses au niveau de la moelle épinière. L'implication des récepteurs Trk dans ce système était une piste que nous allions également investir.

J'ai donc effectué des expériences de co immunoprécipitation des sous domaines de LRP1, possiblement interacteurs, avec la protéine Tafa4.

Malheureusement, après diverses tentatives utilisant diverses sous parties du récepteur LRP1, mes expériences m'ont amené à la conclusion que le récepteur LRP1 n'était pas le récepteur de la protéine Tafa4.



**Figure 6** : Co-Immuno-Précipitation du sous domaine potentiel interacteur de LRP1 avec tafa4.

Au vue du temps qu'il me restait pour achever mes travaux de thèse, nous avons décidé que je ne disposais pas d'assez de temps pour rechercher un autre partenaire éventuel de Tafa4 et le projet a été mis à l'arrêt. En outre, les analyses comportementales de nos animaux  $Tau^{tafa4-HA/+}; deleter^{Cre+}$  se sont également révélées problématiques.

### 2.3 Effets comportementaux de la surexpression de tafa4

Les souris mutantes KO tafa4 présentent une hypersensibilité à la douleur induite par la formaline et une hypersensibilité mécanique en conditions inflammatoire et neuropathique (Delfini et al., 2013).

J'ai donc débuté par observer le comportement des animaux surexprimant la protéine Tafa4 suite à l'injection de 2% de formaline. Il est apparu que les animaux  $Tau^{Venus-tafa4-HA/+} : deleter^{Cre-}$  et  $Tau^{tafa4-HA/+} : deleter^{Cre+}$  présentaient une très forte hétérogénéité dans leur réponse et aucune différence significative de comportement n'apparaissait.

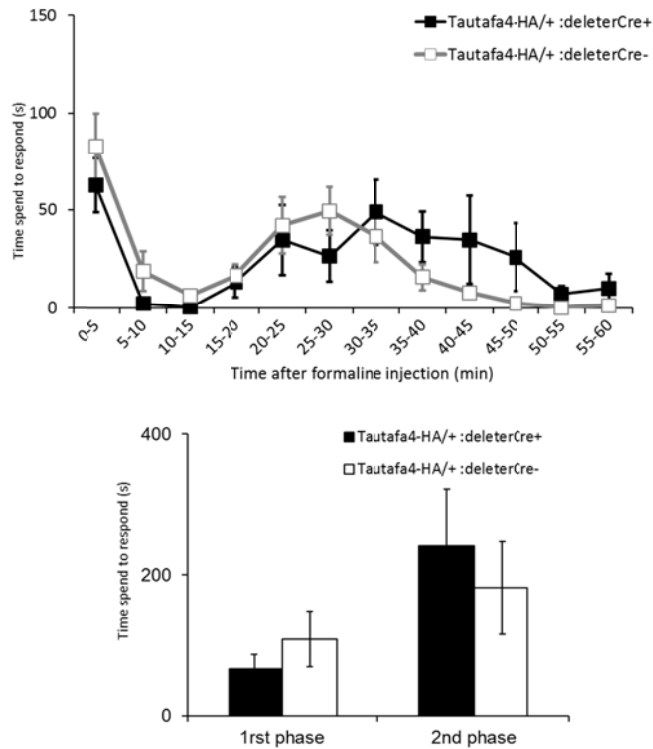


Figure 7 : Réponse comportementale suite à l'injection de formaline (2%) des animaux  $Tau^{Venus-tafa4-HA/+} : deleter^{Cre-}$  et  $Tau^{tafa4-HA/+} : deleter^{Cre+}$ .

Nous avons alors postulé que cette hétérogénéité provenait du fait que je travaillais sur des animaux F2. Il m'a donc paru nécessaire de re-tester ces animaux sur un fond génétique plus homogène. Mes lignées étaient alors sur C57BL6, G6. J'ai donc commencé par caractériser des animaux issus de même portée  $Tau^{Venus-tafa4-HA/+}$  et  $Tau^{+/+}$  (animaux sauvages). Bien que l'étude n'ait pas été achevée, j'ai pu observer une différence de phénotype entre ces deux génotypes révélant que l'insertion d'un transgène au locus Tau modifiait le phénotype de mes animaux.

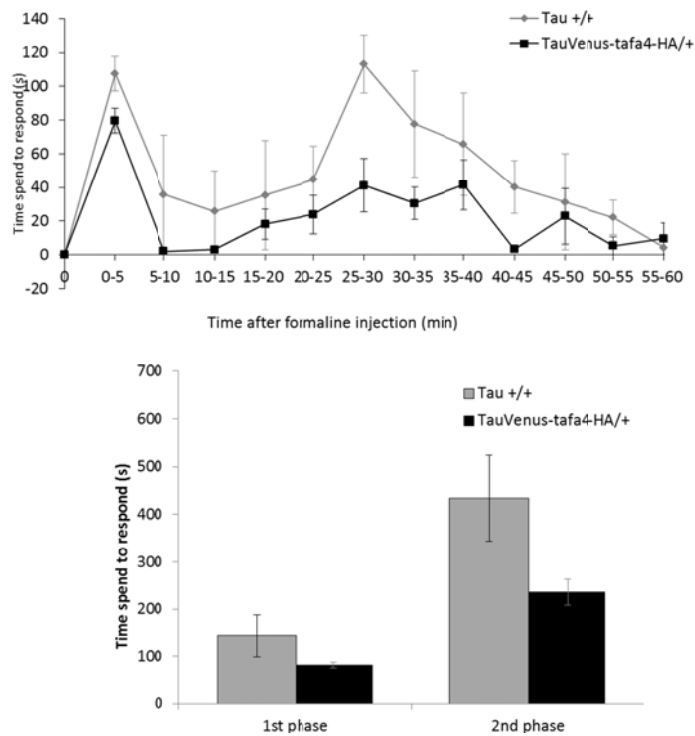


Figure 8 : Réponse comportementale suite à l'injection de formaline (2%) des animaux sauvages littermate (Tau +/+) et des animaux hétérozygotes Tau<sup>Venus-tafa4-HA/+</sup>

Le même problème est apparu lorsque, j'ai effectué des tests de douleur mécanique en condition inflammatoire (test de Von Frey après injection d'un composé inflammatoire suivie de stimulations mécaniques) sur les animaux Tau<sup>Venus-tafa4-HA/+</sup> et Tau<sup>tafa4-HA/+ :deleter<sup>Cre+</sup></sup>.

Cette lignée de souris ne sera donc pas investiguée plus en détail phénotypiquement mais servira à l'avenir à trouver le récepteur de la protéine tafa4.

### 3. Matériel et méthodes

#### 3.1 Western blot et co immunoprécipitation

Différents sous domaines de la protéine LRP1 ont été amplifiés par PCR à partir de cDNA de DRGs en utilisant les primers suivants :

Domaine interaction n° 1 LRP1-F	5' accatggaaaagccctcctactgcaact 3'
Domaine interaction n° 1 LRP1-R	5' aGAATTCTTAGTCACACGTCCAGCTCA 3'
Domaine interaction n° 2 LRP1-F	5' accatggacctgcgccagccaga 3'
Domaine interaction n° 2 LRP1-R	5' aGAATTCttagaacatgttacagcgagg 3'

Cluster Binding Ligand II - F	5' aCCATGGagcagcaagtgggtaccaacaaa 3'
Cluster Binding Ligand II - R	5' aGAATTCtagtagcaggagcacttcacact 3'
Domaine LY LRP1 - F	5' accatggatatcatctccttcacg 3'
Domaine LY LRP1 – R	5' agaattcttaccagagccatcgg 3'
Domaine intracellulaire LRP1 - F	5' accatggataagcggcgagtc 3'
Domaine intracellulaire LRP1 - R	5' gaattcctatgccaagggatctc 3'

Une fois ces séquences amplifiées, elles ont ensuite été clonées dans un vecteur pGex.

J'ai tenté d'induire l'expression des protéines fusionnées à la GST dans des bactéries E. Coli en les incubant 3h avec 1mM d'isopropyl L-D thiogalactosidase à 37°C. Malheureusement, malgré différentes stratégies, l'induction du vecteur pGex n'a pas été possible et notre stratégie de GST pull down en système hétérologue a dû être modifiée.

Nous avons donc utilisé des plasmides, généreusement fournis par Jérôme Terrand, contenant les sous domaines de la protéine LRP1 tagués HA et c-myc, clonés dans un vecteur eucaryote pcDNA3.1.

J'ai donc transfecté des cellules HEK avec différents plasmides.

- HA-tafa4-Venus
- HA - Domaine interaction n° 1 – c-myc
- HA - Domaine interaction n° 2 – c-myc
- HA - Cluster Binding Ligand II – c-myc
- HA - Domaine intracellulaire LRP1 – c-myc

Les cellules ont été lysées avec 1mL de tampon RIPA à 4°C, les lysats cellulaires récupérés ont été mis à incuber avec 20uL de billes d'agarose, pré incubées avec 1uL d'anticorps anti mouse anti-cmyc (ref). Pour les expériences de co-immunoprécipitation, les lysats contenant HA-tafa4 et des différents sous domaines de LRP1 ont été mis à incuber ensemble avec les billes d'agarose toute la nuit à 4°C. Après 3 rinçages de 5 minutes à 4°C avec du tampon RIPA, les billes ont été utilisées directement pour le western blot. Après avoir chauffé les billes 10 minutes à 95°C, les échantillons de protéines ont été séparés par électrophorèse sur un gel SDS polyacrylamide à 12% et transférés sur une membrane de nitrocellulose (GE healthcare). Les membranes ont été saturées dans une solution de lait à 5% (Santa Cruz), dilué dans du TNT 1X (50mM Tris-HCl, pH 7.4 ; 150mM NaCl, 0.05% Tween-20), pendant 1 heure à température ambiante, puis incubées avec un anticorps anti lapin anti HA (1 :1000, abcam ab 9110) sur la nuit à 4°C. Les membranes ont été rincées 3 fois 5 minutes avec du TNT, incubées avec un anticorps secondaire horseradish peroxidase conjugated HRP de chèvre anti rat (1 :5000) pendant 1heure à température ambiante, puis révélées en utilisant de ECL Plus Reagent (PerkinElmer).

### *3.2 Immunofluorescence (cf Mat. Et Meth)*

### *3.3 Comportement (cf Mat. Et Meth)*

## RESUME

Primary sensory neurons are heterogeneous by myriad of molecular criteria. However, the functional significance of this remarkable heterogeneity is just emerging. Here we used our recently generated *ginip* mouse model to selectively ablate the cutaneous free nerve endings MRGPRD<sup>+</sup> neurons and the C-Low threshold mechanoreceptors (C-LTMRs). Ablation of GINIP-expressing neurons led to a significant decrease of formalin-evoked first pain and a complete absence of the second phase pain response, without affecting thermal or mechanical sensitivity. Knowing that MRGPRD<sup>+</sup> neurons are dispensable for formalin-evoked pain and that these neurons play a critical role in acute and injury-induced mechanical pain, our data demonstrate that formalin-induced pain hypersensitivity is primarily transduced via C-LTMRs, and suggest that C-LTMRs and MRGPRD<sup>+</sup> neurons play antagonistic roles in transduction of acute and injury-induced mechanical pain. Therefore, our results suggest that C-LTMRs act as strong modulators of chemical and mechanical pain signals.

Les neurones du système nerveux sensoriel somatique ont pour fonctions de détecter et transmettre les informations sensorielles depuis la périphérie (peau, muscles ou viscères) vers le système nerveux central. Chez les vertébrés, la douleur est perçue par des neurones spécialisés, les nocicepteurs, dont le corps cellulaire est localisé dans les ganglions de la racine dorsale (Dorsal Root Ganglia, DRG) du tronc et dans le ganglion trijumeau de la tête.

D'un point de vue morphologique, anatomique, électrophysiologique, mais également moléculaire, ces nocicepteurs présentent une grande hétérogénéité. Nous cherchons donc à identifier de nouveaux marqueurs des sous populations de neurones nociceptifs afin de pouvoir comprendre cette diversité et d'attribuer des fonctions physiologiques précises à ces différentes sous-populations neuronales. Grâce à un crible transcriptionnel, nous avons identifié le gène GINIP, spécifiquement exprimé dans une sous populations de nocicepteurs non peptidergiques et définissant deux classes particulières de neurones : les neurones exprimant le récepteur couplé aux protéines G de la famille des Mas Related G-Protein Receptor D (MRGPRD) et les C-Low Threshold MecanoReceptors (C-LTMRs).

Durant ma thèse, j'ai cherché à savoir quelles modalités sensorielles sont détectées et transmises par la population GINIP+. Pour répondre à cette question, j'ai tiré avantage d'un modèle murin *ginip* généré au laboratoire, permettant d'éliminer spécifiquement la sous population de neurones GINIP+ au sein des neurones du DRG. J'ai pu démontrer que l'ablation ciblée des neurones GINIP+ entraîne une diminution de la première phase de douleur induite par l'injection de formaline et une perte quasi-totale de la seconde phase de réponse, cela sans affecter la sensibilité thermique ou mécanique. Sachant que les neurones MRGPRD positifs ne sont pas impliqués dans la réponse douloureuse induite par l'injection de formaline, mais jouent un rôle primordial dans la mécano sensibilité en condition normale et pathologique, notre étude montre que la réponse douloureuse induite par l'injection de formaline est due à l'activation des C-LTMRs. En outre, l'ablation simultanée des neurones MRGPRD+ et des C-LTMRs inverse l'hyposensibilité mécanique due à la mort des neurones MRGPRD positifs seuls. En conclusion, notre étude révèle que les C-LTMRs agissent en tant que puissants modulateurs des douleurs chimiques et mécaniques.