



HAL
open science

Système cholinergique et modulation de la transmission nociceptive spinale

Bruce Mesnage

► **To cite this version:**

Bruce Mesnage. Système cholinergique et modulation de la transmission nociceptive spinale. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ122 . tel-01151052

HAL Id: tel-01151052

<https://theses.hal.science/tel-01151052>

Submitted on 12 May 2015

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

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



THÈSE EN CO-TUTELLE



Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg et de l'Université Laval

Discipline : Sciences du Vivant
Spécialité : Neurosciences / Neurobiologie

Système cholinergique et modulation de la transmission nociceptive spinale

Soutenue publiquement le 4 Novembre 2013
par **Bruce Mesnage**

Membres du Jury

M. Yannick Bailly
Directeur de recherches au CNRS

Président du Jury

Mme Véronique Bernard
Chargée de recherches à l'INSERM

Rapporteur externe

M. Luis Villanueva
Directeur de recherches au CNRS

Rapporteur externe

M. Rémy Schlichter
Professeur, Université de Strasbourg

Directeur de thèse

M. Yves De Koninck
Professeur, Université Laval

Co-directeur de thèse

Mme Matilde Cordero-Erausquin
Chargée de recherches, Université de Strasbourg

Examineur

Table des matières

Table des figures	7
Liste des tableaux	7
Remerciements	9
Résumé	8
Introduction	11
1 Bases anatomiques et physiologiques de la nociception et de la douleur	11
1.1 Définitions, concepts et caractérisation	11
1.1.1 Aspect multi-dimensionnel de la douleur	11
1.1.2 Nociception et système nociceptif	12
1.1.3 Phénomènes de sensibilisation	13
1.2 De la nociception à la douleur	13
1.2.1 Description des neurones sensoriels et des fibres afférentes primaires	13
1.2.1.1 Propriétés des fibres afférentes primaires	14
1.2.1.2 Marqueurs neurochimiques des afférences primaires	15
1.2.1.3 Modalités sensorielles et afférences primaires	15
1.2.1.4 Détection et transduction des messages nociceptifs	17
1.2.1.5 Projections vers le système nerveux central	17
1.2.2 Corne dorsale de la moelle épinière : le premier centre intégrateur du système nociceptif	20
1.2.2.1 Organisation laminaire de la moelle	21

1.2.2.2	Morphologie des neurones	21
1.2.2.3	Neurochimie des neurones	24
1.2.2.4	Caractérisation fonctionnelle des neurones	25
1.2.2.5	Classification des neurones selon leurs réponses aux modalités sensorielles	27
1.2.3	Cellules gliales	28
1.2.3.1	La microglie	29
1.2.3.2	Les astrocytes	30
1.2.4	Voies efférentes de la nociception vers les centres supra-spinaux	30
2	Contrôle de la transmission nociceptive spinale : effets supra-spinaux	34
2.1	Contrôles descendants	34
2.1.1	Principales structures cérébrales impliquées	34
2.1.2	Types cellulaires et neurotransmission	35
2.1.3	Contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs	36
2.1.4	Effets pro- et anti-nociceptifs	40
2.2	Contrôle par les opioïdes	40
2.2.1	Opioïdes endogènes et récepteurs associés	41
2.2.2	Localisations des MORs dans le système nerveux central	41
2.2.3	Effets aigus de la morphine	42
2.3	Contrôle par la nicotine	43
2.3.1	Présence de récepteurs nicotiniques au niveau supra-spinal	44
2.3.2	Effets aigus de la nicotine	44
3	Contrôle de la transmission nociceptive spinale par le système cholinergique endogène	48
3.1	Généralités sur le système cholinergique	48
3.1.1	Synthèse et catabolisme de l'acétylcholine	48
3.1.2	Localisation des populations cholinergiques dans la moelle épinière	50
3.1.3	Les récepteurs de l'acétylcholine	51
3.1.3.1	Distribution des récepteurs nicotiniques dans la corne dorsale de la moelle épinière	51

3.1.3.2	Distribution des récepteurs muscariniques dans la corne dorsale de la moelle épinière	53
3.2	Rôle du système cholinergique spinal dans la nociception	53
3.2.1	Effets de l'activation des récepteurs muscariniques	53
3.2.1.1	Au niveau comportemental	53
3.2.1.2	Études électrophysiologiques	54
3.2.2	Effets de l'activation des récepteurs nicotiniques	56
3.2.2.1	Au niveau comportemental	56
3.2.2.2	Études électrophysiologiques	56
3.2.3	Inhibition de la signalisation cholinergique spinale	58
3.2.3.1	Au niveau comportemental	58
3.2.3.2	Études électrophysiologiques	60
3.2.4	Conséquences de la modification des niveaux d'acétylcholine endogène spinale	60
3.2.4.1	Au niveau comportemental	60
3.2.4.2	Études électrophysiologiques	62
3.2.4.3	Stimulations entraînant la libération d'acétylcholine au niveau spinal	63
3.2.5	Participation du système cholinergique aux effets aigus de la morphine	64
3.2.6	Aspects morphologiques et neurochimiques	64
	Objectifs de la thèse	66
	Matériels et méthodes	68
4	Préambule	68
4.1	Animaux	68
4.2	Injection stéréotaxique de la sous-unité B de la toxine cholérique dans la moelle épinière de souris transgénique	69
4.2.1	Chirurgie	71
4.2.2	Injection de la CTb	71

4.2.3	Dissection de la moelle	72
4.2.4	Observation du rétro-marquage des cellules	73
4.3	Injection chronique de nicotine chez le rat	75
4.3.1	Injection de nicotine et test de sensibilité mécanique	75
4.3.2	Perfusion	77
4.3.3	Extrusion de la moelle	77
4.4	Coupes de moelle épinière de rat	79
4.5	Immuno-détection	79
4.6	Acquisition et analyse des images	79
4.6.1	Création des masques	80
4.6.2	Paramètres d'analyse	82
Résultats et Interprétations		85
5	Caractérisation morphologique et fonctionnelle des interneurons cholinergiques de la corne dorsale de la moelle épinière	86
5.1	Résumé	86
5.2	Publication	90
6	Étude de l'axone des interneurons cholinergiques spinaux	111
6.1	Résultats	111
6.1.1	Site d'injection	113
6.1.2	Cellules marquées par la CTb	113
6.1.3	Neurones eGFP+ marqués rétrogradement	115
6.2	Interprétation des résultats	117
6.2.1	Considérations techniques	117
6.2.2	Cellules eGFP-positives et CTb-positives	120
6.3	Discussion des résultats	122
7	Conséquences d'un traitement chronique à la nicotine sur les seuils nociceptifs et au niveau cellulaire de la corne dorsale de la moelle épinière	126
7.1	Objectif	126

7.2	Résultats	127
7.2.1	Comportement	127
7.2.2	Conséquences au niveau cellulaire	128
7.3	Interprétation des résultats	137
7.3.1	Tests comportementaux	137
7.3.2	Au niveau cellulaire	139
7.4	Discussion des résultats	140
7.4.1	Nicotine chronique et réponses nociceptives	141
7.4.2	Nicotine chronique et cibles cellulaires au niveau spinal	142
7.4.3	Conséquences sur les récepteurs nicotiniques	145
7.4.4	Effets sur les cibles supra-spinales	146
7.4.5	Lien entre les systèmes cholinergique et opioïdérique	148

Conclusion et perspectives

153

Table des figures

1.1	Populations neuronales des ganglions dorso-rachidiens	14
1.2	Projections centrales des afférences primaires dans les différentes couches de la moelle épinière	19
1.3	Organisation laminaire de la moelle épinière de rat	22
1.4	Profil de décharge de neurones inhibiteurs de corne dorsale de la moelle épinière	26
1.5	Principales efférences et structures supra-spinales impliquées dans la douleur. .	33
2.1	Principales structures impliquées dans les contrôles descendants	37
2.2	Structure de l'acétylcholine, la nicotine et la muscarine	44
3.1	Principaux partenaires nécessaires au métabolisme de l'acétylcholine dans une terminaison de neurone cholinergique.	49
3.2	Populations cholinergiques de la moelle épinière de souris	52
4.1	Principales étapes de la laminectomie pour l'injection de la CTb	70
4.2	Extrusion de la moelle épinière	74
4.3	Évaluation de la taille du site d'injection et des distances des somas	76
4.4	Protocole d'injection chronique pour la nicotine et tests nociceptifs	77
4.5	Création des masques	81
6.1	Illustration du site d'injection	112
6.2	Organisation des cellules eGFP+ et du site d'injection	114
6.3	Exemples de cellules remplies à la CTb.	116
6.4	Expériences de remplissage de cellules cholinergiques et de clarification des tissus.	118
6.5	Prolongement axonal d'un interneurone cholinergique.	121
6.6	Étendue inter-segmentaire possible des interneurons cholinergiques spinaux. .	124

7.1	Test de sensibilité mécanique de la série 1 et 2	129
7.2	Test de sensibilité mécanique des deux séries	130
7.3	Conséquence au niveau des cellules gliales	132
7.4	Différences relatives des paramètres par lamina et condition pour Iba1	133
7.5	Conséquence au niveau des cellules astrocytaires	134
7.6	Différences relatives des paramètres par lamina et condition pour GFAP	135
7.7	Conséquence au niveau du co-transporteur KCC2	137
7.8	Différences relatives des paramètres par lamina et condition pour KCC2	138

Liste des tableaux

1.1	Les voies ascendantes actuellement connues qui transmettent l'information nociceptive	31
4.1	Liste et spécificités des anticorps primaires utilisés	78
4.2	Détails des paramètres d'analyse	83
7.1	Tableau résumé des conséquences d'un traitement chronique à la nicotine chez le rat	139

“La mort n’est pas une chose si sérieuse ; la douleur, oui.”

– André Malraux

Extrait de *L’Espoir*

Pain is a well-wisher foe.

No pain, no gain...

Remerciements

Je remercie sincèrement les membres du Jury, Mme Véronique BERNARD et MM. Luis VILLANUEVA et Yannick BAILLY pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit et pour l'intérêt porté à mes travaux. Merci pour le temps consacré et les critiques constructives qui ont permis d'améliorer ce manuscrit.

Je tiens ensuite à remercier très chaleureusement mes trois directeurs de thèse pour m'avoir initié et guidé sur le chemin de la science, toujours avec patience et d'ineestimables conseils! Merci de m'avoir transmis votre savoir et savoir-faire précieux.

Donc, par ordre "chronologique", je vous remercie Rémy de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire de la si jolie Alsace et ce, malgré un retard de train fâcheux de la SNCF pour la première entrevue... Merci également à Yves pour m'avoir ouvert les portes, cette fois-ci, du laboratoire de la (Très) Belle Province de Québec.

Enfin, cette thèse en co-tutelle ne serait rien sans vous Matilde, personne centrale sans qui je ne serais pas en train de poser ces mots sur ce manuscrit. Merci de m'avoir fait confiance.

Ce ne sont que quelques remerciements pour vous trois, mais ils viennent du cœur. Je ne serai donc pas très prolixe pour une fois dans ce manuscrit, mais c'est avec la plus simple sincérité.

Je remercie également Catherine et Chantal, Stéphane et évidemment Sylvain, pour m'avoir aidé et accompagné dans cette aventure scientifique et humaine côté Alsace. Cette thèse ne serait pas, sans vous. Merci beaucoup!

Merci INFINIMENT Fred (ainsi que Taddy) pour l'intense course contre la montre. Cette thèse n'aurait pu être reliée et déposée à temps sans toi, littéralement! Dire que, lorsque j'ai quitté le labo en Mai, tu étais encore en Master, et maintenant, tu fais parti des anciens et as accueilli les étudiants suivants, la relève a été parfaitement assurée.

Taddy, you have now the project and its continuation in your hands. The flam is yours now, i hope it'll bring you some "enlightment" as it did to me! Have faith, Science : it works :)

Je te remercie particulièrement Julie, qui, malgré ce que tu penses, tu m'as beaucoup appris et apporté aussi!

Si un côté Alsace il y a, une contre-partie Québécoise existe aussi, tout aussi importante pour moi. Merci Karine, Dino, Annie, Feng, Loulou et Antoine pour les derniers projets! Sans vous, cette thèse ne serait également pas!

Merci infiniment à Guillaume et Sophie pour m'avoir appris les joies des laminectomies et autres plaisirs électrophysiologiques *in vivo*! Merci de m'avoir transmis vos savoirs respectifs et conseils très précieux! Je remercie également Suzie et Yoan pour m'avoir dévoilé tous les secrets de la "Yoptrode", et éclairé avec vos *lumières* de physiciens!

Je remercie également Cyril pour m'avoir soutenu et aidé pour les enregistrements *in vivo*. Merci à vous tous pour vos compétences, bonne humeur, et apprentissage!

Enfin, merci à tous ceux que je n'ai pas mentionnés (pas par oubli, mais par faute de temps!). Merci à vous, qui, au détour d'une conversation de couloir, pendant l'heure du dîner, ou tout autres occasions de discussions, avez contribué à cette thèse de toute façon.

Maintenant, vient la partie plus personnelle, parfois délicate, souvent cryptique, et mettons, moins scientifique, des remerciements d'une thèse, jalonnés parfois de quelques citations, et autres *insides* en vous et moi.

En premier lieu, je remercie infiniment mes parents pour m'avoir supporté pendant ces quatre années! Malgré la distance, vous étiez à chaque instant dans mon cœur... La distance m'aura appris, même si c'était peu fréquent, à vous dire que je vous aime! Et non, je n'oublie pas Coco, ni le Petit!

Pour l'aventure humaine alsacienne, je tiens à remercier Antoine, Laeti et Joseph, pour TOUT, et aussi, mention spéciale pour le *rush* d'aujourd'hui... Je n'oublie pas non plus Alex, Romain, Michael, Dorine, et ceux que je ne cite pas (vous êtes bien trop nombreux vous autres, presque autant qu'à Québec (plus grande ville, plus de gens aussi)!

Je remercie aussi Julien, Nico et Shuja, les Trois Mousquetaires (j'aime ça être D'Artagnan! J'écris ces remerciements, je fais ce que je veux anyway!)

Pour l'aventure humaine québécoise, c'était évident que je parle de toi Lau "BME", pis toute la gang des "80" (Tous vous nommer prendrait bien trop de temps, vous savez qui vous êtes et êtes tous des amis inestimables aussi de ce bord-là de la Terre!).

(Rendu là, on peut s'apercevoir de l'avantage "humain" d'une co-direction entre deux continents, les relations sont beaucoup plus nombreuses...).

Francine, Loulou, Marc, Sylvain du CRULRG-CRIUSMQ-ISM aka Bob G, parce que il n'y a pas

que les jeunes que je compte en amis...

(On arrive bientôt au terme...)

Max et Gen, Janis pis Filou, Jimena, ma “famille” adoptive de Québec. Un petit merci, inversement proportionnel à ce que j’ai dans le cœur à votre égard!

Julie, encore une fois (tu ne pourras pas dire comme ça que tu n’es pas dans les remerciements! Merci aussi pour ton aide dans le *rush*! Merci aussi pour les aspects “hors-lab”, qui comptent autant que les “indoors” :)

Lau, i miss our little talks as roomates!

Ah, la partie que Farida attendait depuis le début, trépignant d’impatience, pognée à lire des mercis à des gens dont je t’ai souvent parlé pour la plupart, mais que tu ne connais finalement pas pantoute... (Et oui, j’ai choisi la chronologie, comme ça, m’as pas me faire chicaner!) On sait toi et moi ce qu’il en est, et l’écrire serait useless! Merci pour toutes les “Don-Quixote-ries”, pour m’avoir appris à ouvrir le robinet, et surtout surtout surtout surtout, pour ces non-dits et tous ces “dits”... Si je devais te rendre justice en terme de mots pour te signifier ma gratitude pour tout ce que tu as fait, cette partie (déjà BIEN trop longue...) serait encore plus longue que ma thèse... Je conclurai simplement par ces quelques paroles, d’un band et d’une toune que t’aimes pas pire me semble :

Plant your hope with good seeds

Don't cover yourself with thistle and weeds

Rain down, rain down on me

Et après Farida, la suite logique...

“In the short term, it would make me happy to go play outside. In the long term, it would make me happier to do well at school and become successful.

But in the VERY long term, i know which will make better memories.”

– Bill Watterson

Parfois, c’est qu’une question de timing dans vie. Parfois, même si : “*À un moment là, ça va faire les mauvais timings!*”, et malgré une pugnacité tout aussi forte que celle qu’un Fratelli pourrait avoir dans sa quête pour un certain trésor, on ne peut **P**as y changer **G**rand chose. Parfois, en tous cas. Mais par-foi-s, pour faire un choix, *you have to take a leap of faith first. The trust part comes later.*

“But, in this twilight, our choices sealed our fate.”

– Marcus Mumford

Volontairement cryptique, mais tu sais que j'aime ça après tout, "être mystérieux". Dans le fond, si t'avais qu'une chose à retenir, take care PG.

Julien, mon intendant... Peu de mots, mais, je ne te remercierai JAMAIS assez! Merci pour la dernière cigarette la plus longue *ever!!* A friend in need's a friend indeed... (Tu checkeras sur google translation HAHA!)

Marie... Si je n'avais dû ne remercier qu'une personne, ça l'aurait été toi.
Aussi, si je n'avais pas eu d'autres choix.

Cette thèse, malgré tout, on l'aura traversé tous les deux. Et je sais ce qu'il en aurait été sans toi...

C'est pour ça que c'est avec toi que j'achève ces remerciements de ce manuscrit, qui symbolise quelque part la fin de cette aventure de PhD, avec toi. Simplement, merci... Et tu sais ce qu'il y a dans ces silences.

*This is my brain and i live in it
This is my brain and it's fine
It's where i spend the vast majority of my time
It's not perfect & i'm not quite sure i've worked out how to work it
But it's mine.*

– Tim Minchin

(Merci au lecteur patient...)

*Every year is getting shorter, never seem to find the time
Plans that either come to naught or half a page of scribbled lines

The time is gone, the song is over, thought i'd have something more to say.*

– Roger Waters

Résumé

L'acétylcholine (ACh) endogène de la corne dorsale de la moelle épinière est un modulateur puissant de la transmission nociceptive. Utilisée en clinique, l'analgésie cholinergique est bien décrite, mais la source et les mécanismes de cette modulation restent à être élucidés. Cette analgésie est probablement assurée par un plexus de fibres cholinergiques situé dans les couches superficielles de la moelle épinière. La localisation des corps cellulaires alimentant ce plexus demeure mal-connue. Par ailleurs, la morphine exerce une action analgésique puissante, non sans entraîner en usage chronique des phénomènes de tolérance, de dépendance et paradoxalement, de douleur. Une partie de l'analgésie induite par la morphine sollicite les récepteurs de l'ACh. Dans ce contexte, les objectifs principaux de ce projet de thèse ont été : la caractérisation morphologique, anatomique et fonctionnelle des interneurons cholinergiques de la corne dorsale de la moelle épinière et l'étude des effets d'un traitement chronique par un agoniste cholinergique : la nicotine.

Nos travaux montrent que la rareté de cette population d'interneurones est contre-balançée par une arborisation dendritique très dense et étendue sur plusieurs centaines de microns. De plus, le prolongement axonal de ces cellules s'étend sur quelques millimètres. Ces éléments suggèrent un contrôle des informations reçues sur plusieurs segments de la moelle épinière. Par ailleurs, nous avons pu établir que ces interneurons alimentent majoritairement le plexus de fibres, où siège l'analgésie cholinergique.

Nous avons également étudié les conséquences d'une administration répétée d'un agoniste de l'ACh chez le rat. Sur le plan comportemental, nos données révèlent que les animaux présentent une hypersensibilité mécanique, associée à une activation des cellules microgliales et astrocytaires. De plus, l'intensité de marquage d'un co-transporteur des ions chlorure, le KCC2, est diminuée. Une dérégulation de l'homéostasie du chlore peut induire un phénomène de désinhibition, pouvant sous-tendre les phénomènes d'hypersensibilité. D'une part, le traitement chronique à la nicotine reproduit les effets de la morphine dans les mêmes conditions et d'autre part, l'ACh participe à une partie au moins des effets analgésiques de la morphine. Cela place l'ACh comme intermédiaire ou effecteur possible de la morphine.

Enfin, l'ensemble de ces données suggère que le système cholinergique spinal pourrait constituer une cible thérapeutique alternative pour de nouveaux traitements de la douleur.

Préambule

Les abréviations et acronymes utilisés dans ce manuscrit sont les plus usuelles *i.e.*, celles retrouvées dans la littérature scientifique. Bien que l'équivalent en français est toujours indiqué, l'usage du terme anglais a été préféré. Ceci a pour but de faciliter leur recherche au lecteur éventuellement non-familier avec certains termes ou notions.

Également, les citations apparaissant dans le texte ne sont pas ordonnées par ordre classique alphabétique, mais selon leur pertinence et leur importance pour les informations citées.

Introduction

Chapitre 1

Bases anatomiques et physiologiques de la nociception et de la douleur

1.1 Définitions, concepts et caractérisation

1.1.1 Aspect multi-dimensionnel de la douleur

La *douleur* est caractérisée par sa dimension subjective et varie d'un individu à un autre, même devant un stimulus de nature et d'intensité égales. Nous ne sommes pas égaux devant la douleur, qui se vit différemment selon divers facteurs psychologiques tels que les expériences passées, les croyances et les valeurs religieuses, l'état de peur ou encore d'anxiété, propres à chacun. Ainsi, pour un même message nociceptif, si les conséquences physiologiques immédiates sont comparables, la coloration émotionnelle que revêt l'expérience de la douleur, rend la sensation variable et l'évaluation, le diagnostic et le traitement clinique de celle-ci difficiles.

La douleur est “une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à un dommage tissulaire présent ou potentiel, ou décrite en termes d'un tel dommage”, telle que définie en 1979 par l'I.A.S.P¹, qui dérive de celle initialement donnée par Harold Merskey en 1964². Lorsque la douleur apparaît, elle est souvent biphasique. La première phase dite *aiguë* (“*sharp pain*”) est plus intense, d'assez courte durée et bien localisée. Elle est

1. *International Association for the Study of Pain*

2. “*An unpleasant experience that we primarily associate with tissue damage or describe in terms of tissue damage or both*”, in : *An Investigation of Pain in Psychological Illness*, DM Thesis, Oxford

suivie d'une seconde phase plus longue et mal localisée (“*dull pain*”). Ces deux phases sont sous-tendues par les différentes fibres véhiculant l'information nociceptive (Cf. [section 1.2.1.3](#)), qui, selon leurs propriétés, induisent une sensation différente et différée dans le temps [Basbaum & Jessel 2000, Julius & Basbaum 2001].

Au regard de ces éléments, on décrit trois aspects de la douleur. Un premier dit *sensoriel et discriminatif*, qui permet l'encodage de la modalité (mécanique, thermique), de la localisation, de l'intensité et de la durée du stimulus nociceptif. Le second aspect, *affectif et motivationnel*, rend à la fois compte du caractère désagréable et de la volonté d'arrêter cette expérience et inclut des conséquences sur le système neuro-végétatif (*e.g.* changement du rythme cardiaque et respiratoire, sudation). Enfin, le dernier aspect, dit *cognitif*, met en jeu les processus de mémorisation et est influencé par le vécu de la personne.

La douleur représente une fonction d'alerte, qui permet de signaler les dommages tissulaires (imminents ou avérés) et des changements de paramètres du milieu intérieur pouvant altérer l'homéostasie de l'organisme. Comme toutes les fonctions sensorielles, elle met en jeu un système de détection, de transduction en signaux électriques (pour la communication et le traitement de l'information par le système nerveux) et d'intégration des messages. La fonction sensorielle sous-tendant les mécanismes de détection, transduction, traitement et transmission des messages douloureux est appelée la *nociception*. La douleur est l'interprétation consciente des messages nociceptifs au niveau cortical.

1.1.2 Nociception et système nociceptif

La *nociception*³, terme introduit par Sherrington en 1906⁴, renvoie aux mécanismes neurophysiologiques qui vont éventuellement donner lieu à la perception douloureuse (qui elle, évoque le ressenti par l'individu) lorsqu'ils sont interprétés de manière consciente au niveau cortical. Le système nociceptif assure la détection, l'intégration et la transmission des informations nociceptives (*i.e.* des informations dangereuses pour l'organisme, potentielles ou avérées). Sa mise en jeu donne aussi lieu à des réactions comportementales protectrices : les réflexes spinaux (rapides) et des comportements de fuite ou de prostration (plus lentes et élaborées). On distingue les douleurs physiologiques, “utiles”, des douleurs pathologiques,

3. du latin *nocere*, nuire

4. Sherrington C. in *The Integrative Action of the Nervous System* Oxford University Press (1906)

“inutiles”.

1.1.3 Phénomènes de sensibilisation

Dans le cas où le stimulus crée un dommage tissulaire, on observe dans la plupart des cas un phénomène de sensibilisation des afférences nociceptives qui innervent la zone lésée et les zones voisines à la lésion. Ce phénomène se traduit par de l'*hyperalgésie* et de l'*allodynie*.

L'hyperalgésie se caractérise par une réponse exacerbée suite à une stimulation nociceptive, tandis que l'allodynie reflète l'existence d'une réaction nociceptive suite à un stimulus normalement non-nociceptif. Par exemple, dans le cas d'une fracture du fémur, un stimulus nociceptif d'intensité moyenne sur celui-ci va produire une expérience douloureuse plus intense. De même, une simple activité non-douloureuse, comme la marche à pied, le devient. L'hyperalgésie et l'allodynie produisent donc une augmentation de la sensibilité sensorielle post-lésionnelle et facilitent la guérison du tissu endommagé en créant une situation qui décourage le contact physique ou le mouvement. Cette sensibilisation se retrouve également au niveau central et se traduit par une augmentation de l'excitabilité des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, ainsi qu'une facilitation de la transmission synaptique entre les afférences primaires nociceptives et ces neurones.

Cette augmentation peut être déclenchée, entre autres, par les nocicepteurs (*Cf. section 1.2.1*) qui sensibilisent les cellules de la moelle épinière qu'ils contactent [Woolf 1983] (voir aussi [Woolf 2011] pour revue).

1.2 De la nociception à la douleur

1.2.1 Description des neurones sensoriels et des fibres afférentes primaires

À l'instar des autres modalités sensorielles, la nociception est sous-tendue par des neurones sensoriels primaires (ou de premier ordre, NSP), appartenant au système somato-sensoriel et appelés *nocicepteurs*. Les nocicepteurs codent les informations concernant les stimuli de

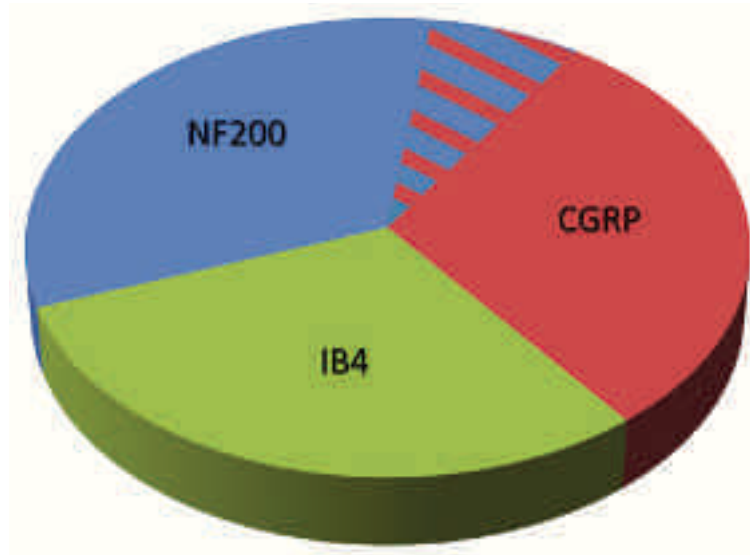


FIGURE 1.1: **Populations neuronales des ganglions dorso-rachidiens.** Les fibres myélinisées ($A\beta$ et $A\delta$) expriment le NF200 et représentent 40% des corps cellulaires présents dans les DRGs (bleu). Parmi les fibres $A\delta$, un petit contingent (environ 10%) sont également peptidergiques (hachuré bleu et rouge). Les fibres peptidergiques représentent 40% de la population totale dans les DRGs, dont 30% de fibres de type C (rouge). Enfin, les fibres C non-peptidergiques, identifiées par un marquage IB4 constituent les 30% restants (vert). **NF200** : neurofilament 200 ; **CGRP** : *calcitonin gene-related peptide* ; **IB4** : isolectine B-4. Modifiée à partir de [McMahon *et al.* 2006].

l'environnement et du milieu intérieur, préjudiciables à l'intégrité ou au bon fonctionnement de l'organisme.

D'un point de vue morphologique, ces cellules, sans dendrite, possèdent un axone qui part du soma et qui se sépare en deux branches, l'une innervant la périphérie, l'autre aboutissant dans le système nerveux central. Cette particularité leur permet de libérer les messagers chimiques à la fois au niveau central et à la périphérie. Ceux sont des neurones dits *pseudo-unipolaires*. Les corps cellulaires sont localisés dans des ganglions sensoriels. Les neurones innervant la face et la tête ont leurs corps cellulaires regroupés dans des ganglions crâniens (principalement du trijumeau V) et ceux des fibres innervant le tronc et les membres dans les ganglions rachidiens (DRGs, pour *dorsal root ganglia*). Les différentes caractéristiques des fibres afférentes primaires, associées aux NSP, sont résumées ci-dessous.

1.2.1.1 Propriétés des fibres afférentes primaires

On distingue classiquement trois catégories de fibres sensorielles périphériques : $A\alpha/\beta$, $A\delta$ et C. Cette classification repose sur leur vitesse de conduction des potentiels d'action, une propriété déterminée par le diamètre et le degré de myélinisation des axones.

Les fibres $A\alpha/\beta$ sont les plus grosses ($>10\mu\text{m}$) et sont fortement myélinisées. Ceci leur

confère une vitesse de conduction des signaux électriques très importante (30 à 72m.s⁻¹ pour les A β , 72 à 100m.s⁻¹ pour les A α [Guyton & Hall 2006]). Les fibres A δ sont, quant à elles, intermédiaires entre les types A β et C en termes de diamètre (2–6 μ m), de degré de myélinisation et donc, de vitesse de propagation des informations sous forme de potentiels d’actions (12-30m.s⁻¹). Les fibres de type C sont les plus fines (0.4–1.2 μ m). La vitesse de conduction de ces dernières est plus faible (0.5-2m.s⁻¹) et elles sont amyéliniques. De façon générale, les proportions de fibres retrouvées au niveau cutané chez le rat sont les suivantes : 70% de fibres C, 10% de fibres A δ et 20% de A β [Millan 1999].

1.2.1.2 Marqueurs neurochimiques des afférences primaires

Les fibres myélinisées de type A expriment spécifiquement une forme phosphorylée de neurofilaments ayant un poids moléculaire de 200kDa (NF200) [Lawson & Waddell 1991]. Les fibres de type C ne l’expriment pas⁵.

Pour les fibres C, on distingue classiquement deux contingents. Les fibres C peptidergiques contiennent des neuropeptides, tels que la substance P (SP), le CGRP⁶ (*calcitonin gene related peptide*) et la galanine et expriment le récepteur Trk-A du *nerve growth factor* (NGF). Les fibres C non-peptidergiques expriment un site de liaison pour l’isolectine B4 (IB4)⁷, les sous-unités de récepteurs canaux de l’ATP de type P2X₃ et le récepteur RET du GDNF (*glial cell-derived neurotrophic factor*) [Millan 1999, Julius & Basbaum 2001, Woolf & Ma 2007, Dubin & Patapoutian 2010] (voir [figure 1.1](#)).

1.2.1.3 Modalités sensorielles et afférences primaires

Classiquement, on considère que seules les afférences primaires de type C et A δ véhiculent l’information nociceptive de la périphérie vers le système nerveux central, alors que le type A β achemine des informations non-nociceptives [Millan 1999, Dubin & Patapoutian 2010]. Ce cloisonnement n’est cependant pas exclusif. En effet, certaines fibres C conduisent de l’information non-nociceptive [Millan 1999] et chez le rat, un contingent de 20% de fibres A β véhicule des messages nociceptifs [Djoughri & Lawson 2004].

5. Nous avons par ailleurs utilisé cette spécificité pour identifier, par immuno-détection dans les DRGs, les somas de ce type de fibres. Voir chapitre sur les Méthodes

6. Également utilisé dans les immuno-détections réalisées sur les sections de DRGs

7. Le dernier des marqueurs ciblés dans nos expériences

Les fibres $A\alpha$ sont responsables de l'innervation *proprioceptive*, une modalité du système somato-sensoriel qui prend naissance dans les organes tendineux de Golgi et les terminaisons des fuseaux neuromusculaires.

Les fibres $A\beta$ sont responsables de la proprioception et de la détection du tact léger, c'est-à-dire de stimulations non-nociceptives telle que la pression, ou la vibration (corpuscules de Pacini, de Ruffini, de Meissner et disque de Merkel, voir *e.g.* [Roudaut *et al.* 2012] pour revue).

Les fibres $A\delta$ induisent la première phase de réponse aiguë ("*sharp*") de la douleur. Ces fibres sont classées en deux contingents. Le type I regroupe les fibres mécano-sensibles de haut-seuil, mais deviennent capables de répondre à des stimuli nocifs thermiques chauds après sensibilisation. Le type II véhicule de l'information mécano-thermique, répondant à des températures nociceptives chaudes (45–53°C) et froides (inférieures à 15°C). Après sensibilisation, les fibres $A\delta$ -II vont également acheminer des stimuli d'ordre mécanique [Craig *et al.* 2003, Millan 1999].

Les fibres de type C sont principalement des nocicepteurs, mais un contingent véhicule des informations thermiques non nociceptives, et certaines données suggèrent également un rôle dans le prurit et la sensibilité du tact léger chez l'humain (voir [Schmelz 2011] pour revue). Les nocicepteurs de type C sont principalement polymodaux. La moitié de ces fibres répond à la fois à des stimuli nociceptifs mécaniques, thermiques et chimiques, alors que d'autres répondent uniquement à des températures nociceptives [Millan 1999, Julius & Basbaum 2001]. Enfin, une dernière sous-classe (10 à 20%) de nocicepteurs de type C, dits *silencieux* ou dormants, ne sont pas activés par des stimulations nociceptives en conditions physiologiques de base, mais se mettent à répondre dans des conditions inflammatoires [Almeida *et al.* 2004, Millan 1999]. Elles sont responsables de la seconde phase de douleur ("*dull pain*") [Millan 1999]. Les fibres C participent à l'innervation du tissu dermique profond ainsi qu'à celle d'autres tissus non-cutanés (*e.g.* comme les viscères [Bennett *et al.* 1996]). La classe de fibres C non-peptidergique innerve des zones plus superficielles du derme et l'épiderme [Todd 2010, Taylor *et al.* 2009, Basbaum *et al.* 2009]. Les fibres de type C sous-tendent également les sensibilités nociceptives articulaire et musculaire [Craig *et al.* 2003].

1.2.1.4 Détection et transduction des messages nociceptifs

La détection et la transduction des informations nociceptives sont assurées par l'extrémité périphérique des neurones primaires somato-sensoriels au niveau des *terminaisons libres* de ces neurones. Elles sont assurées par une grande variété de protéines capables de détecter des stimulations mécaniques intenses, thermiques (chaud ou froid) intenses et chimiques. On distingue deux familles principales de protéines de transduction, spécialisées chacune dans une modalité précise : les canaux TRP et notamment de type TRPV (pour *transient receptor potential vanilloid*, voir [Stucky *et al.* 2009, Caterina *et al.* 2000, Julius & Basbaum 2001] pour revue) et les protéines de transduction de la famille des ASICs (pour *acidic-sensing ionic channels* ; voir pour revue récente [Raouf *et al.* 2012, Sluka *et al.* 2009, Deval *et al.* 2010]).

Par ailleurs, des lésions tissulaires conduisent à la libération de nombreuses substances intracellulaires (potassium, protons, ATP, glutamate, acétylcholine) qui se retrouvent dans le milieu extracellulaire et vont pouvoir ainsi activer directement les nocicepteurs en se fixant sur des récepteurs spécifiques se trouvant sur les terminaisons de ces nocicepteurs. De plus, ces mêmes lésions induisent aussi la réponse inflammatoire, avec production et libération de molécules (la sérotonine, l'histamine des mastocytes et diverses cytokines et chimiokines) qui peuvent moduler l'excitabilité des nocicepteurs [Basbaum & Jessel 2000].

À la suite de la détection et de la transduction, les messages nociceptifs sont acheminés vers la corne dorsale de la moelle épinière sous forme de trains de potentiels d'action.

1.2.1.5 Projections vers le système nerveux central

Après réception des informations et conversion en influx nerveux, l'information va être acheminée le long des nerfs périphériques et des racines dorsales. Cette information va être relayée au système nerveux central grâce à des contacts synaptiques établis entre les terminaisons centrales des axones des afférences primaires et des neurones de second-ordre localisés, soit, au niveau du sous-noyau caudal trigéminal pour les informations en provenance de la tête et de la face, soit, au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière pour les informations du tronc et des membres.

La moelle présente une organisation en différentes couches ou *laminae*, définies par la taille et la densité des cellules qui les composent (qui sera détaillée dans la [section 1.2.2.1](#)).

Les afférences primaires n'aboutissent pas toutes au même niveau dans la moelle. Le type d'information qu'elles véhiculent va déterminer le site de terminaison dans la corne dorsale (voir [figure 1.2](#)).

Les fibres C de type peptidergique aboutissent dans la couche I et dans la partie externe de la couche II (LIIo) de la corne dorsale, alors que le type non-peptidergique aboutit dans la partie interne de la couche II (LIIi) [Millan 1999, Basbaum *et al.* 2009, Ribeiro-da-Silva & De Koninck 2008]. Enfin, la LX, autour du canal épendymaire, recevrait également des entrées nociceptives des fibres C cutanées [Millan 1999, Ribeiro-da-Silva & De Koninck 2008, Basbaum *et al.* 2009, Light & Perl 1979] et en provenance des viscères [Honda 1985, Miller & Seybold 1987]. Les LV à LVII peuvent aussi recevoir indirectement [Craig *et al.* 2003] des informations provenant des fibres C, grâce à des réseaux polysynaptiques spinaux [Light & Perl 1979, Millan 1999].

Les nocicepteurs $A\delta$ projettent dans les couches I et Ilo, la partie ventrale de LIV et dans LV [Millan 1999, Ribeiro-da-Silva & De Koninck 2008, Basbaum *et al.* 2009]. Les fibres $A\delta$ véhiculent des informations non-nociceptives jusqu'aux couches II et III. Parmi ces fibres $A\delta$ non-nociceptives, on trouve un sous-type particulier innervant les follicules pileux (D-Hair $A\delta$).

Les fibres $A\beta$ établissent leurs projections périphériques dans les couches III jusqu'à V. Chez le rat, le contingent de fibres $A\beta$ nociceptives projette dans la partie profonde de la LV et dans une moindre mesure vers LII [Djoughri & Lawson 2004].

Les projections axonales des afférences primaires s'organisent selon des critères stricts de somatotopie, à la fois dans l'axe latéro-médian (voir [Brown 1982] pour revue) et rostro-caudal [Swett & Woolf 1985]. L'antéro-postériorité des membres (par exemple, de la cuisse aux orteils) se traduit par la latéro-médialité dans la moelle : le bord médian recevant les messages des orteils et le bord latéral ceux de la cuisse.

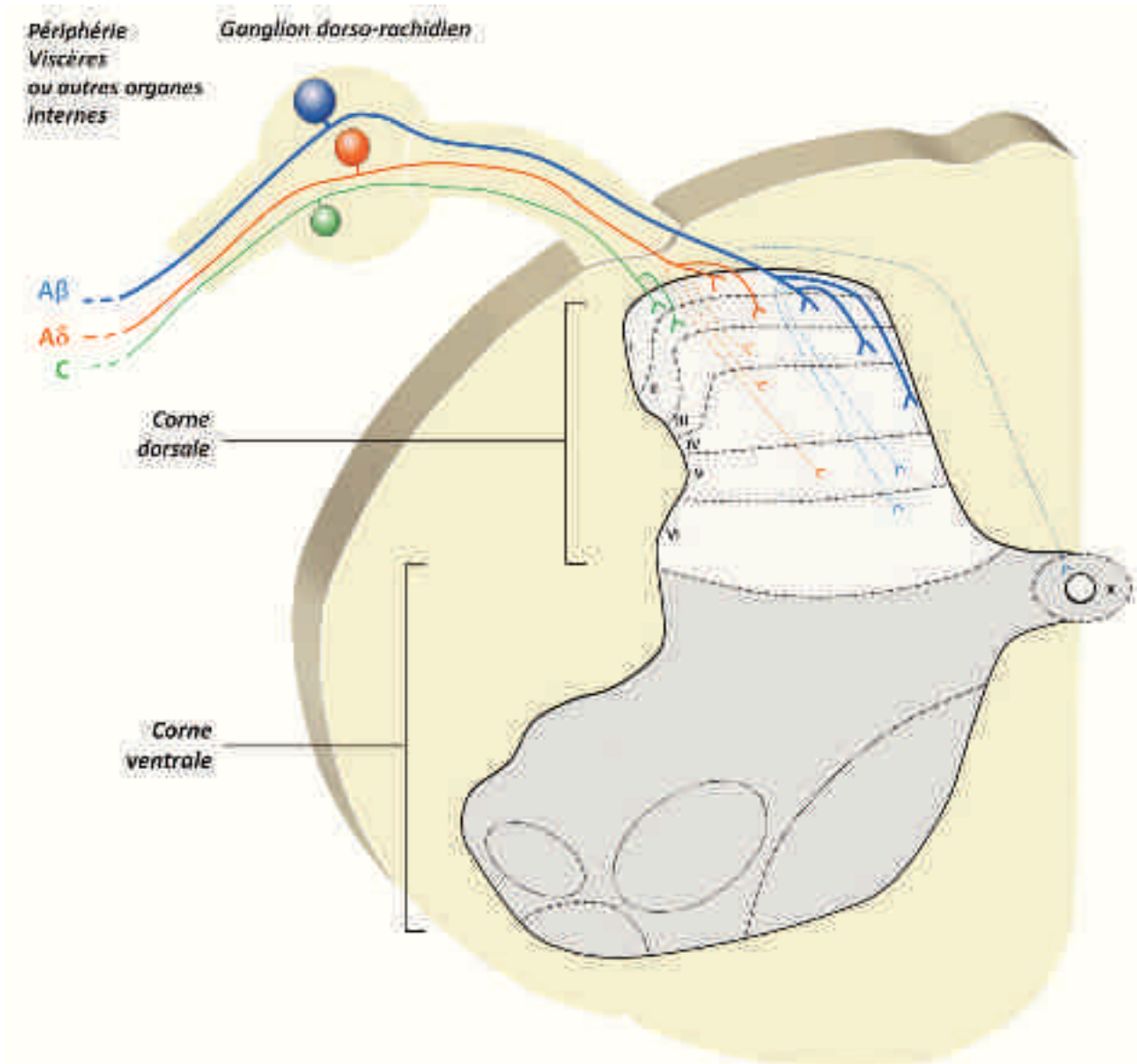


FIGURE 1.2: **Projections centrales des afférences primaires dans les différentes couches de la moelle épinière.** Les fibres de type C et A δ sont, respectivement, de petite et moyenne taille, avec une vitesse de conduction lente ou intermédiaire. Elles terminent majoritairement dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (LI et LII). Les fibres de type β , plus grosses et avec une vitesse de conduction rapide, aboutissent dans les *laminae* plus profondes de la corne dorsale. Il existe néanmoins un petit contingent de fibres A β et A δ qui aboutissent dans d'autres couches (figuré en pointillés), notamment la partie interne de la LII pour les fibres A β . Modifiée à partir [Millan 1999].

1.2.2 Corne dorsale de la moelle épinière : le premier centre intégrateur du système nociceptif

Les premières caractérisations structurales de la moelle épinière, décrivant substances blanche et grise, remontent à 1824. L'anatomiste Luigi Rolando, se basant sur les travaux précédents de Félix Vicq d'Azyr (1781), décrit notamment dans son étude⁸ une “*nouvelle substance qui diffère de celle visible au 2/3 antérieur de la demi-lune, car elle présente une caractéristique gélatineuse et plus sombre*”. Cette zone, impliquée dans la réception et le traitement de l'information nociceptive, est maintenant identifiée par le nom de *substantia gelatinosa* Rolandii. Les travaux de Bror Rexed, publiés en 1952, fournissent la première description cyto-architectonique de la moelle, utilisant le chat comme modèle animal pour sa caractérisation. Il y décrit en détail l'organisation de la substance grise.

Pour ses travaux, Rexed s'est servi de la technique de coloration de Nissl. Élaborée par le neuropathologiste Franz Nissl en 1894, elle repose notamment sur l'utilisation d'un colorant de type basique, reconnaissant les molécules chargées négativement dans une cellule, *i.e.* les acides nucléiques présents dans le noyau, mais également du cytoplasme, notamment du réticulum endoplasmique (ARN ribosomal) [Nissl 1894]. Cette technique permet d'identifier la présence et la taille des neurones dans le tissu marqué⁹.

La substance grise est classiquement séparée en deux cornes, dorsale et ventrale. Elle se compose d'éléments d'origine neuronale et non-neuronale (*e.g.* microglie et astrocytes). La partie ventrale est majoritairement dédiée aux fonctions motrices, avec la présence des motoneurones somatiques. La corne latérale contient les corps cellulaires préganglionnaires autonomes dans les parties profondes. La corne dorsale représente la partie *sensorielle* de la moelle. Au niveau des couches plus superficielles, on retrouve :

- les terminaisons des fibres afférentes primaires,
- des circuits locaux de neurones excitateurs et inhibiteurs, pouvant connecter entre eux les neurones d'une même couche, ou différentes couches entres elles,
- les corps cellulaires de neurones de projection vers les centres supra-spinaux, dont les

8. *Ricerche anatomica sulla struttura del midollo spinale*, publiée 1824

9. Nous avons nous-mêmes utilisé cette technique pour déterminer les limites des laminae dans la corne dorsale de la moelle épinière, Cf. Partie Méthodologie, section Histologie.

- fibres empruntent des voies ascendantes localisées dans la substance blanche,
- des neurones propriospinaux, qui connectent les différents niveaux rostro-caudaux (ou segments) de la moelle,
 - les cellules gliales,
 - les terminaisons axonales des voies de contrôle descendantes.

1.2.2.1 Organisation laminaire de la moelle

La corne dorsale comprend les couches I à VI, juxtaposées les unes aux autres. La couche VII, ou corne latérale, comprend, au niveau thoracique, les neurones préganglionnaires sympathiques et les préganglionnaires parasympathiques au niveau sacré. Les couches VII à IX sont localisées dans la corne ventrale et contiennent les corps cellulaires des motoneurones somatiques. Enfin, la couche X est située autour du canal épendymaire. Plusieurs données suggèrent également qu'elle serait un foyer de neurogénèse post-natale (voir *e.g.* [Danilov *et al.* 2006]).

Les couches V et VI (LV et LVI) sont également appelées le “cou” et la “base” de la corne dorsale. La couche V comprend une population hétérogène de cellules de grande taille, avec des dendrites qui s'étendent à travers toute la corne dorsale. Elle reçoit des entrées sensorielles, nociceptives et non-nociceptives. Des interneurones sont également localisés dans cette couche. La LVI est présente aux segments cervico-lombaires, mais disparaît au niveau sacré de la moelle épinière (voir [Craig *et al.* 2003] pour revue et voir [figure 1.3](#)).

1.2.2.2 Morphologie des neurones

Les techniques immuno-histochimiques et d'injection de traceurs neuronaux permettent l'étude des arborisations dendritiques des neurones et de l'organisation de leurs projections axonales, par marquage de la cellule d'intérêt et reconstruction dans l'espace de ses neurites¹⁰.

Dans la LI, quatre types d'organisation somato-dendritique différentes ont été décrits chez le rat et le singe : fusiforme, multipolaire, aplati et pyramidal [Lima & Coimbra 1986]. Les quatre types sont principalement orientés dans l'axe rostro-caudal, mais les cellules

10. Ces techniques ont été également utilisées dans ces travaux de thèse. Voir chapitre Méthodologie

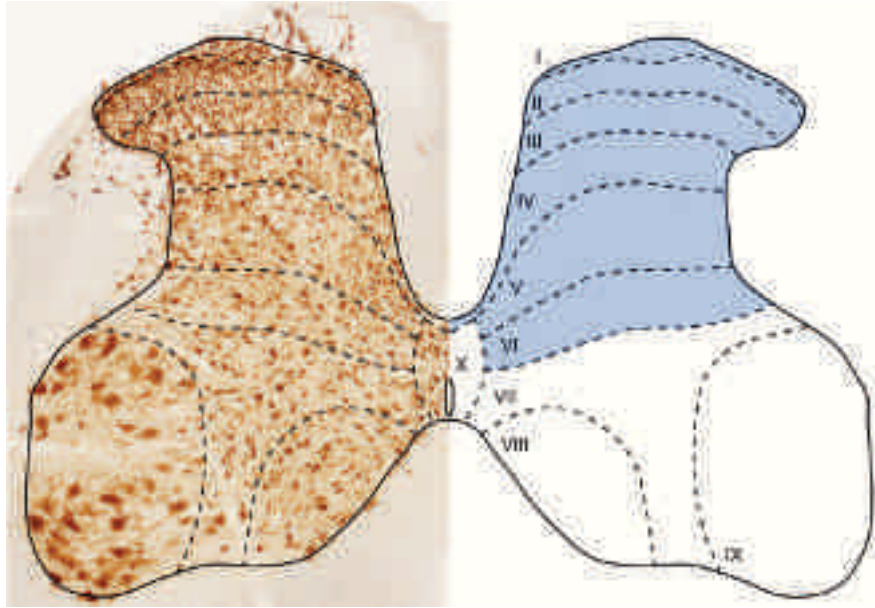


FIGURE 1.3: Organisation laminaire de la moelle épinière (niveau lombaire) de rat. Les différentes couches de la moelle épinière, telles que définies par Rexed chez le Chat, sont délimitées en fonction du nombre, de la densité et de la taille des cellules. La corne dorsale de la moelle épinière (en bleu) comprend les couches (ou *laminae*) I à VI et représente la partie *sensitive* de la moelle épinière. La corne latérale, qui comprend la couche VII, regroupe des neurones préganglionnaires ortho- (au niveau thoracique) et para-sympathiques (au niveau sacré). La corne ventrale contient les couches VIII et IX et regroupant les motoneurones somatiques constitue la partie plutôt *motrice* de la moelle épinière. Enfin, la couche X se localise autour du canal épendymaire et serait un foyer de neurogenèse post-natale (Modifiée à partir de Todd 2010). Modifiée à partir de [Todd 2010]

pyramidales peuvent également avoir des dendrites qui s'orientent dans l'axe médio-latéral. De façon générale, l'arborisation dendritique reste confinée à la LI, qu'il s'agisse des neurones de projection vers le noyau parabrachial [Cordero-Erausquin *et al.* 2009], le thalamus, ou vers la substance grise périacqueducule (PAG). Mais une extension plus ventrale des dendrites vers les LII et LIII a également été décrite [Brown 1982, Millan 1999, Lima & Coimbra 1986, Ribeiro-da-Silva & De Koninck 2008]. Un contingent des interneurones de cette couche ont leur axone qui émet des collatérales vers les couches III/IV, dans l'axe rostro-caudal et médio-latéral [Szucs *et al.* 2013].

Une bonne corrélation entre les caractéristiques morphologiques et la fonction des neurones est suggérée par des données obtenues chez le chat. Au regard des entrées sensorielles reçues activant ces neurones, trois classes fonctionnelles ont pu être établies. La première classe, nociceptive-spécifique, regroupe les neurones répondant seulement aux stimuli nociceptifs chauds et mécaniques (pincement) et qui présentent une morphologie de type fusiforme ou multipolaire. Les stimuli froids non-nociceptifs activent des cellules de type pyramidal. Enfin, les neurones de la troisième classe sont

capables de répondre à des messages mécano- et thermo-nociceptifs et au froid non-nociceptif. Ils sont donc polymodaux et de morphologie multipolaire (voir pour revue [Han *et al.* 1998, Szucs *et al.* 2013, Brown 1982, Ribeiro-da-Silva & De Koninck 2008]).

Dans la couche II, quatre classes de neurones sont décrites : les cellules centrales, les cellules en îlots (*islet cells*), les cellules radiales (*stellate cells*), toutes trois ayant leurs corps cellulaires localisés dans la LII interne, ainsi que les cellules verticales (*stalked cells*). Ces dernières sont restreintes à la bordure LI/LII dans la LIIo [Grudt & Perl 2002, Yasaka *et al.* 2007].

On distingue deux types d'orientation préférentielle de l'arborisation dendritique : dorso-ventrale pour les cellules verticales et radiales (de l'ordre de la centaine de microns) et rostro-caudale pour celles en îlots et centrales (sur plusieurs centaines de microns). Ces dernières ont également une extension dorso-ventrale, mais inférieure à $70 \mu\text{m}$ [Yasaka *et al.* 2007]. Les axones des interneurons de la LII peuvent innerver les laminae plus profondes (LIII/IV [Light & Kavookjian 1988] et LV [Bráz *et al.* 2005]), mais pour la majorité, les axones restent confinés aux couches superficielles et notamment à la couche I [Cordero-Erausquin *et al.* 2009, Lu & Perl 2005]. Enfin, cette couche reçoit des entrées sensorielles nociceptives et non-nociceptives.

Les cellules des LIII/IV ont plusieurs types d'organisation de leurs dendrites. Pour certains neurones, les dendrites s'étendent dorsalement vers des couches supérieures puis dans le plan latéro-médian, innervant ainsi les couches I et II [Maxwell *et al.* 1983, De Koninck *et al.* 1992, Brown *et al.* 1995]. Ces cellules, de forme pyramidale, ont un soma de $30\mu\text{m}$ en moyenne et une localisation préférentielle, mais pas exclusive, dans la LIII [Brown *et al.* 1995, Todd *et al.* 2000]. On retrouve aussi des neurones multipolaires, avec des dendrites qui s'arborisent dans tous les plans, avec une extension dans l'axe médio-latéral jusqu'à $400\mu\text{m}$, mais aussi dorsal vers la LII, voire la LI [Brown *et al.* 1995].

D'autres cellules ont une arborisation dendritique dirigée vers des couches plus ventrales (couches IV et V) [Brown 1982]. Les neurones du tractus spinocervical (voie ascendante) ont une organisation dendritique généralement rostro-caudale. Les neurones de la voie post-synaptique des cordons dorsaux présentent une orientation préférentielle latéro-médiale

[Brown 1982]. Enfin, les cellules limitrophes LIV/LV ont un soma plus petit (*ca.* 20 μ m) et de type fusiforme. Les dendrites s'arborisent dorsalement et ventralement et certaines populations neuronales ont leur arborisation dendritique qui reste confinée au niveau de leur soma [Maxwell *et al.* 1983, Brown *et al.* 1995].

Les neurones présents dans la couche V ont une arborisation dendritique sous forme de disques aplatis, avec une étendue importante dans les directions dorso-ventrale et médio-latérale [Brown 1982]. Certains neurones, en particulier ceux recevant des entrées nociceptives, ont des dendrites qui s'étendent aussi de façon rostro-caudale [Ritz & Greenspan 1985].

1.2.2.3 Neurochimie des neurones

Les neurones de projection sont principalement localisés dans la LI. On retrouve aussi des neurones de projection dans les laminae III à VI. Ce type de neurones ont pour la plupart un axone qui chemine dans la substance blanche contralatérale (ventrale ou dorso-latérale) [Al-Khater *et al.* 2008, Spike *et al.* 2003]. Ils assurent donc le transfert de l'information, qui a été intégrée au niveau de la corne dorsale, vers les centres supra-spinaux (*Cf.* [section 1.2.4](#)). Les neurones de projection sont principalement glutamatergique et une grande majorité (80%) des neurones de projection de la LI exprime le récepteur NK1 [Polgár *et al.* 2010, Spike *et al.* 2003] de la substance P, un des nombreux neuropeptides des afférences primaires nociceptives [Todd *et al.* 2000].

Les neurones de projection constituent un faible contingent en comparaison de la seconde classe de neurones spinaux, les interneurones locaux.

Les interneurones locaux constituent la majeure population de neurones des couches I à III (voir [Spike *et al.* 2003, Polgár *et al.* 2004]). On les retrouve également dispersés dans les autres couches de la moelle épinière. Ils assurent le contrôle de l'activité du réseau au sein de chaque lamina, mais également en connectant entre eux les différentes laminae et les différents segments de la moelle épinière.

Les interneurones peuvent être classés selon l'effet qu'ils exercent sur les autres neurones. On distingue ainsi les interneurones excitateurs et les interneurones inhibiteurs [Millan 1999, Todd 2010]. La neurotransmission excitatrice utilise classiquement le glutamate, alors que le GABA et la glycine sont les deux principaux neurotransmetteurs inhibiteurs dans la corne

dorsale de la moelle épinière (voir pour revue [Todd & Spike 1993]).

1.2.2.4 Caractérisation fonctionnelle des neurones

Les propriétés de décharge des cellules nerveuses ont été étudiées par des techniques électrophysiologiques classiques d'enregistrement intra-cellulaire et par la technique du *patch-clamp*. On note ainsi la présence de quatre types de décharge de potentiels d'action : tonique, à potentiel d'action unique, à bouffée initiale (phasique) et à décharge retardée. Ces propriétés sont les mêmes dans des préparations de cultures neuronales ou en tranches aiguës de moelle épinière [Yoshimura & Jessel 1989b, Yoshimura & Jessel 1989a, Jo *et al.* 1998, Lopez-Garcia *et al.* 1994, Schneider 2005] (voir [figure 1.4](#)).

Dans la couche I, les neurones qui déchargent de façon tonique sont typiquement fusiformes, les cellules phasiques sont de type pyramidal et enfin, les neurones multipolaires présentent des patrons de décharge retardée ou unique (voir pour revue et références [Ruscheweyh & Sandkühler 2002, Prescott & De Koninck 2002]). Ce type de corrélation entre les propriétés d'excitabilité et les caractéristiques morphologiques n'ont été retrouvées que dans la LI.

Dans la couche II, les neurones à décharge tonique englobent les neurones inhibiteurs contenant du GABA et/ou de la glycine. Les cellules en îlots et les cellules centrales à patron de décharge tonique chez le rat seraient donc plutôt de type inhibiteur [Maxwell *et al.* 2007]. Les cellules verticales apparaissent quant à elles majoritairement excitatrices glutamatergiques [Lu & Perl 2005, Maxwell *et al.* 2007] et présentent un patron de décharge généralement phasique [Lu & Perl 2005].

Dans les couche III/IV, les interneurones locaux semblent présenter un profil de décharge plutôt phasique, tandis que les interneurones inter-segmentaires ont un profil de décharge plutôt retardé [Schneider 2003, Schneider 2005].

En résumé, des quatre catégories de patrons de décharge observées dans la corne dorsale de la moelle, les cellules de type phasique sont généralement des interneurones glutamatergiques excitateurs et celles de type tonique sont majoritairement inhibitrices [Lu & Perl 2005, Maxwell *et al.* 2007, Yasaka *et al.* 2007]. On trouve néanmoins des cellules

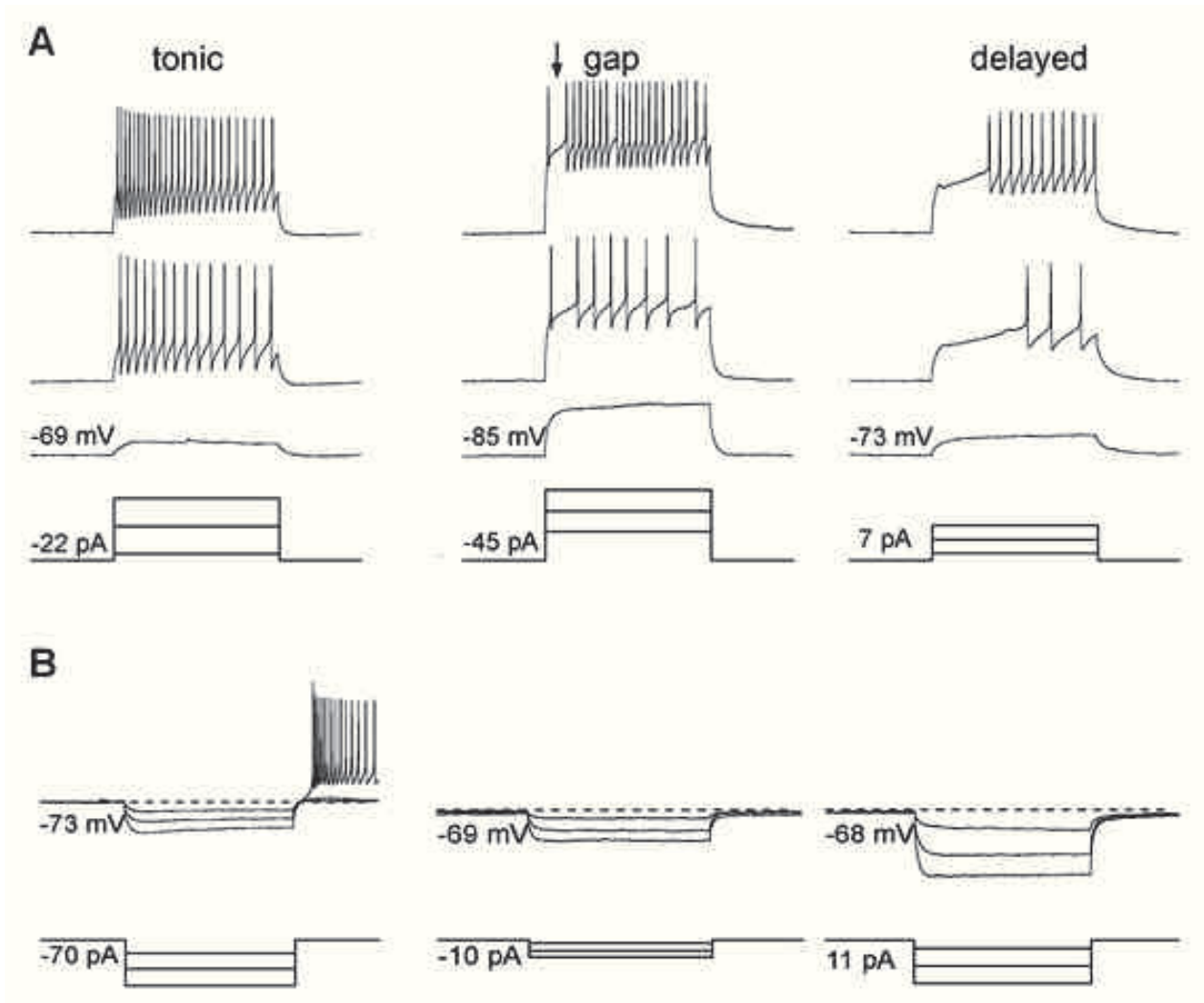


FIGURE 1.4: Profil de décharge de neurones inhibiteurs de corne dorsale de la moelle épinière. **A** : Patrons de décharge en réponse à un courant dépolarisant, injecté pendant 1 seconde dans trois différents neurones. La plupart des interneurons inhibiteurs de la corne dorsale de la moelle épinière présente une décharge de type tonique. La majorité des neurones excitateurs présentent un patron de décharge avec un “gap” après le premier potentiel d’action (milieu), ou à décharge retardée (*delayed*). **B** : Dans les neurones à décharge tonique, on note également souvent une bouffée de décharge de potentiels d’action à l’arrêt d’une injection de courant hyperpolarisant. Ces neurones ont une activité de décharge dite “en rebond”, absente chez les neurones dont le profil présente un “gap” ou est à décharge retardée. Adaptée à partir de [Todd 2010, Yasaka *et al.* 2010].

GABAergiques, qui colocalisent avec la Met-enképhaline présentant un patron de décharge phasique [Jo *et al.* 1998].

1.2.2.5 Classification des neurones selon leurs réponses aux modalités sensorielles

En considérant le type des informations somato-sensorielles que reçoivent les cellules de la corne dorsale, on peut distinguer trois classes de neurones : les nociceptif-spécifiques (NS), les neurones à convergence (WDR, pour *wide dynamic range*) qui répondent à des stimuli non-nociceptifs et nociceptifs et les non-nociceptifs (NON-N) [Millan 1999]. Cette classification a été obtenue par enregistrements des décharges de potentiels d'action dans des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière en réponse à des stimulations nociceptives et non-nociceptives appliquées dans les champs récepteurs périphériques¹¹.

La première classe de neurones, dit nociceptif-spécifique (NS) répond exclusivement à des stimuli de forte intensité, à caractère nociceptif. Ils sont localisés principalement dans la couche I, où ils représentent 80% des neurones de projection [Price *et al.* 2003] et Ilo. Ils sont aussi retrouvés, dans une moindre mesure, dans les laminae plus profondes LV et VI. Au niveau des couches superficielles, ils sont activés de manière mono-synaptique par les fibres C et A δ en provenance des tissus cutanés, viscéraux et articulaires, véhiculant des messages thermiques, mécaniques et chimiques (voir pour revue [Millan 1999]). Ils peuvent répondre de façon spécifique à l'une de ces trois modalités et certains neurones NS sont polymodaux et détectent à la fois des stimuli nocifs chauds, froids et mécaniques (de type pincement), mais n'encodent pas l'intensité du stimulus. Ils peuvent être vus comme des détecteurs de présence d'un stimulus nociceptif, sans toutefois renseigner sur la modalité de ce stimulus. Le codage de l'intensité semble principalement se faire par les neurones WDR.

Les neurones WDR sont de façon prédominante trouvés dans les couches V et plus profondes. Des neurones de ce type peuvent aussi être retrouvés dans la LX et même dans la corne ventrale. Au niveau de la couche I, ils représentent 20% des neurones de projection [Price *et al.* 2003]. Leur nom rend compte de leur capacité à détecter toute la gamme (*range*)

11. Le champ récepteur d'un neurone sensoriel est la zone de l'espace (ou cutanée pour un neurone sensoriel de la moelle épinière) qui, lorsqu'on y présente un stimulus approprié, modifie la réponse de ce neurone.

de stimuli, allant du non-nociceptif au nociceptif (*wide*) et répondent de façon incrémentielle avec l'intensité croissante du stimulus (autrement dit, dynamiques) [Dubner *et al.* 1989].

Ils reçoivent des afférences des fibres C, $A\delta$ et $A\beta$ qui convergent depuis les viscères, le derme, les muscles et les articulations et représentent très probablement le substrat cellulaire de la douleur projetée (un infarctus du myocarde ressenti dans la poitrine, mais également dans le bras gauche) [Basbaum & Jessel 2000]. Par ailleurs, des conditions inflammatoires peuvent révéler des WDR dans les couches superficielles, notamment dans la LII, en diminuant les seuils d'activation de fibres $A\beta$ [Baba *et al.* 1999].

La dernière classe de neurones, non-spécifique de la nociception, reçoit des informations à partir d'afférences $A\beta$ et assure le traitement et le relai des informations mécaniques non-nociceptives en modifiant la transmission inhibitrice. Ils sont présents dans les couches III à V principalement.

Les connexions entre les interneurones et les fibres de la corne dorsale créent des modules de connectivité. Ces modules intègrent l'information sensorielle avant transmission aux centres supra-spinaux *via* leurs contacts aux neurones de projection (voir *e.g.* [Lu & Perl 2005] pour revue). Ces connexions concernent non seulement des neurones au sein d'une même couche, mais également des neurones situés dans différentes laminae, créant ainsi une communication réciproque entre couches superficielles/profondes dans la corne dorsale (*e.g.* [Petitjean *et al.* 2012]).

1.2.3 Cellules gliales

Lorsque des informations nociceptives arrivent au niveau de la corne dorsale, une population de cellules non-neuronales, les cellules gliales, participe aussi à l'intégration et la modulation de ces informations.

Parmi ces cellules gliales, les astrocytes et les cellules microgliales sont des partenaires importants pour la modulation des informations nociceptives. Dans des situations pathologiques, ces cellules participent à l'installation de douleurs chroniques et de phénomènes d'hypersensibilité douloureuse telle que l'hyperalgésie ou l'allodynie [Watkins *et al.* 1995, Moss *et al.* 2007, Ren & Dubner 2008, Milligan & Watkins 2009].

1.2.3.1 La microglie

Les cellules microgliales sont dans le système nerveux central les homologues des macrophages périphériques. Suite à une lésion ou à une infection, les cellules microgliales s'activent, libèrent divers acteurs de la réponse immunitaire et adoptent une morphologie différente. Ceci leur permet de se déplacer plus facilement pour répondre à un besoin de protection [Beggs & Salter 2007, Watkins *et al.* 1995] et pour agir sur l'activité des neurones [Keller *et al.* 2007].

L'ATP est une des nombreuses molécules activatrices des cellules microgliales, qui agit sur divers récepteurs purinergiques, notamment P2X4 (voir pour revue [Jarvis 2010]). Cette activation par l'ATP produit une libération de BDNF (pour *brain-derived neurotrophic factor*) par la microglie, qui active les récepteurs tyrosine kinase de type B (TrkB), en particulier sur les neurones, ce qui peut entraîner leur désinhibition. En effet, l'homéostasie des ions chlorures (Cl^-) est régulée entre autre par le co-transporteur des ions potassium et chlorure de type 2 (KCC2) [Rivera *et al.* 2002], qui extrude les ions chlorure de la cellule. La signalisation TrkB peut provoquer une diminution de l'expression de KCC2 dans les neurones de la LI, entraînant une accumulation des ions Cl^- et donc, une modification du gradient Cl^- transmembranaire dans la cellule [Coull *et al.* 2005]. Ceci entraîne la diminution du pouvoir inhibiteur du GABA et de la glycine, induisant une augmentation de la sensibilité des neurones spinaux. Cette diminution de l'effet hyperpolarisant serait, avec d'autres dysfonctionnements réduisant l'inhibition synaptique [Cronin *et al.* 2004], le substrat majeur d'un phénomène de désinhibition contribuant à l'hypersensibilité douloureuse.

Le recrutement de la microglie spinale peut passer par d'autres voies de signalisation que celle de l'ATP/P2X4, comme par exemple la chimiokine fractalkine et son récepteur CX3R1 (voir pour revue [Gao *et al.* 2010]). Les activateurs de la microglie et les facteurs de la réaction inflammatoire induisent également l'activation d'une autre catégorie de cellules gliales, les astrocytes.

1.2.3.2 Les astrocytes

La contribution astrocytaire dans les processus nociceptifs et de douleur est également importante [Ren & Dubner 2008]. L'activation des astrocytes est retardée par rapport à celle des cellules microgliales, progresse plus lentement et perdure jusqu'à plusieurs mois après [Zhang & De Koninck 2006]. Cet effet retardé et persistant suggère que les astrocytes sont plus importants pour le maintien que pour l'induction de l'hypersensibilité. Lorsqu'ils sont activés, les astrocytes sécrètent, comme la microglie, des facteurs pro-inflammatoires (notamment CCL2, pour *chemokine (C-C motif) ligand 2*, voir [Wieseler *et al.* 2005] pour revue sur les chimiokines astrocytaires), qui peuvent instaurer et maintenir l'hypersensibilité douloureuse. Les mécanismes astrocytaires de modulation de la nociception au niveau spinal ne sont pas bien connus, mais des études suggèrent une dérégulation de la signalisation calcique astrocytaire, de la recapture du lactate neuronal et de l'équilibre ion/eau (voir également [Chiang *et al.* 2012] pour revue sur la fonction des astrocytes et l'implication dans la nociception).

L'implication de l'interaction glie-neurone dans le contrôle de la nociception a également été montrée au niveau du bulbe rostro-ventro-médian (RVM, pour *rostro-ventral medulla*) [Wei *et al.* 2008]). Le RVM est une des structures majeures impliquées dans les contrôles descendants supra-spinaux.

1.2.4 Voies efférentes de la nociception vers les centres supra-spinaux

Les neurones de projection assurent le transfert des informations par leur axone qui quitte la substance grise pour rejoindre des faisceaux ascendants dans la substance blanche. Ces tractus transmettent l'information sensorielle (nociceptive et non-nociceptive) à diverses structures de l'encéphale. Les corps cellulaires des principaux neurones de projection nociceptifs sont, comme nous l'avons vu précédemment, localisés dans la corne dorsale de la moelle épinière. Il existe de nombreux faisceaux ascendants, parmi lesquels plusieurs véhiculent des informations nociceptives [Millan 1999]. Ces voies, ainsi que les structures vers lesquelles elles projettent, ont été largement décrites ailleurs (voir pour revue [Bernard & Villanueva 2009]

pour les structures notamment, ainsi que [Almeida *et al.* 2004] pour l'organisation détaillée de ces voies et voir [table 1.1](#)).

Voie	Lamina d'origine	Types d'axones	Types cellulaires	Composantes
Spino-thalamique	I, II (quelques), IV, V-VII, NLS	C, A δ , A β	NS, WDR, NON-N (quelques)	Sensorielle et discriminative, motivationnelle et affective, contrôles descendants inhibiteurs
Spino-réticulaire	I, V-VII, X (quelques)	A δ , A β	NS, WDR, NON-N	Motivationnelle et affective ? Contrôles descendants inhibiteurs
Spino-mésencéphalique	I-II, IV/V, VII, X, LSN	C, A δ , A β	NS (LI), WDR, NON-N	Motivationnelle et affective système autonome et moteur
Spino-parabrachio-amygdaloïde	I, II (quelques)	C, A δ , A β	NS	Motivationnelle et affective, système autonome
Spino-parabrachio-hypothalamique	I, II (quelques)	C, A δ , A β	NS	Motivationnelle et affective, système endocrinien
Spino-hypothalamique	I, V, X, LSN	C, A δ , A β	NS, WDR, NON-N (quelques)	Sommeil, thermorégulation, fonctions endocriniennes et autonomes
Spino-cervicale	I (quelques), III-V	A δ , A β	NON-N, WDR	Sensorielle et discriminative, motivationnelle et affective, autonome ?
Cordon dorsal post-synaptique	III-VII	A δ	NS, WDR, NON-N	Sensorielle et discriminative, motivationnelle et affective

TABLE 1.1: **Les voies ascendantes actuellement connues qui transmettent l'information nociceptive.** Les voies portent le nom de leur origine (spinale) et de leur(s) cible(s) supra-spinale(s). **NS** : Nociceptif spécifique; **WDR** : *Wide dynamic range*, neurone à convergence; **NON-N** : Non-nociceptif; **LSN** : noyau latéral spinal. Tableau adapté de [Millan 1999].

Dans cette introduction, nous nous limiterons à l'organisation schématique très simple des projections issues des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (notamment de LI).

Les axones des neurones de projections de la couche I (et V) décussent, pour la plupart, au niveau de leur segment spinal. Ils cheminent ensuite dans le quadrant ventrolatéral de la substance blanche de la moelle épinière. Au niveau du bulbe rachidien, les axones de la LI (d'origine spinale) rejoignent ceux de la couche I du noyau caudal du complexe trigéminal. Ils forment le faisceau extra-lemniscal, qui projette vers trois structures. La première est

l'aire parabrachiale latérale (PBl) du tronc cérébral, qui reçoit la majorité des neurones de la LI. L'aire PBl intervient dans l'homéostasie neurovégétative et émotionnelle. La seconde structure cible est la partie ventro-basale du thalamus latéral, impliquée dans la discrimination somatosensorielle. Les projections vers les noyaux intralaminaires du thalamus vont être responsables de la composante affective. Enfin, la troisième structure est la substance périacqueducale grise (PAG), qui joue un rôle important dans les comportements aversifs et les réactions de défense [Bernard & Villanueva 2009]. Les informations nociceptives parvenant à l'aire PBl vont être transférées vers l'hypothalamus et l'amygdale. Les noyaux ventro-basaux thalamiques projettent vers les aires corticales somatosensorielles (primaires, secondaires et insulaires) ainsi que vers l'amygdale. Les informations arrivant à la PAG vont notamment moduler les contrôles descendants du système nociceptif spinal (voir [figure 1.5](#)).

Lorsque les informations nociceptives de la périphérie aboutissent au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, elles vont y subir un premier traitement. Cette première intégration va être fonction des couches dans lesquelles les fibres qui véhiculent ces informations projettent et des populations neuronales et non-neuronales présentes à ce niveau. Les informations sont ensuite transmises aux centres supra-spinaux. Elles y subissent une seconde intégration, au sein des noyaux thalamiques notamment. Le message est enfin projeté au niveau néo-cortical, où il est intégré à nouveau : la douleur est "ressentie". Un contrôle va être aussi exercé par les différentes structures supra-spinales décrites et, dans le même temps, le système descendant, activé pendant la transmission dans les voies ascendantes, va pouvoir exercer un contrôle sur la moelle épinière.

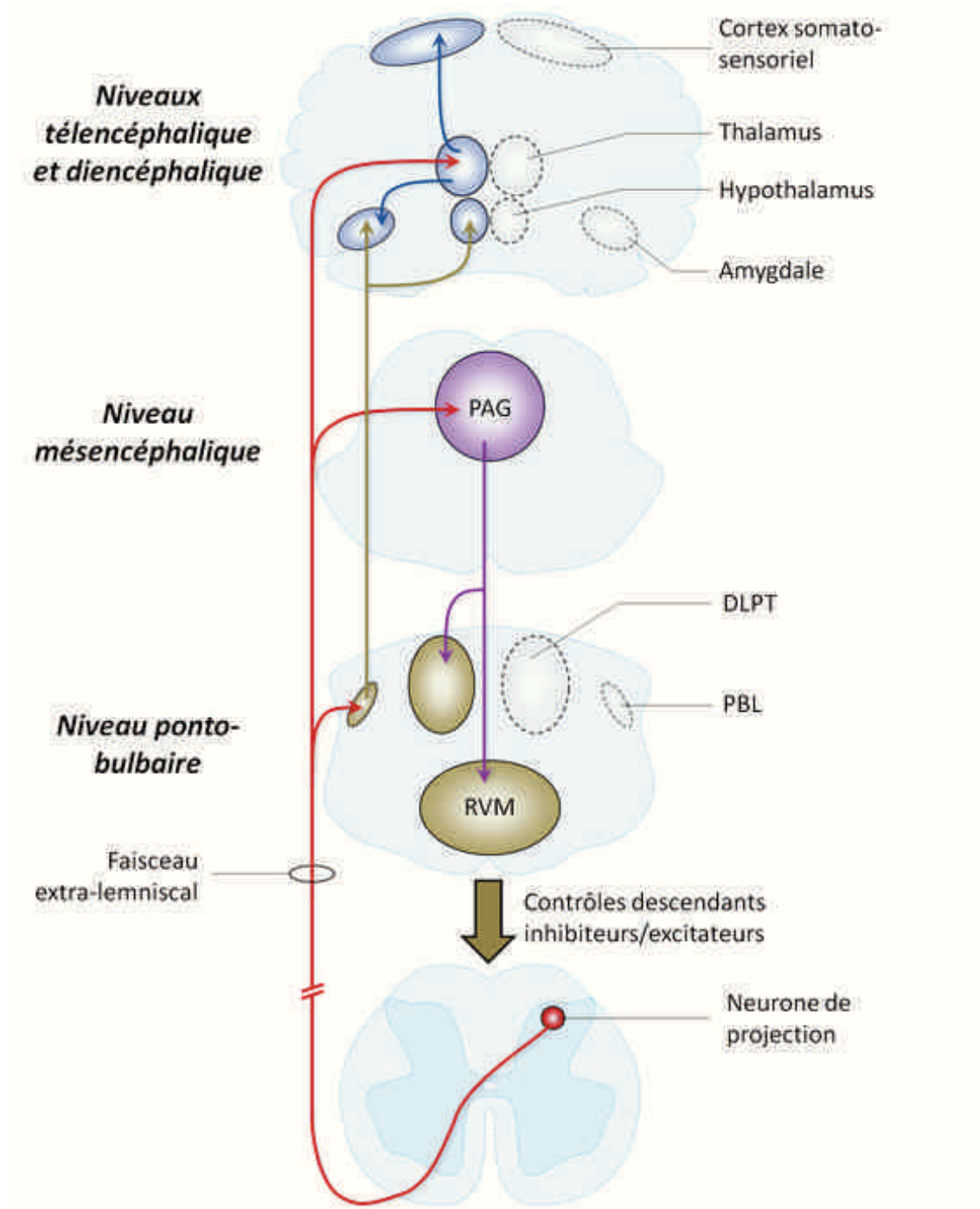


FIGURE 1.5: **Principales efférences et structures supra-spinales impliquées dans la douleur.** Suite à l'activation du système nociceptif au niveau spinal (ou trigéminal, non-représenté ici), les axones des neurones de la LI (d'origine spinale) rejoignant ceux de la couche I du noyau caudal du complexe trigéminal (et formant le **faisceau extra-lemniscal**) transmettent les informations nociceptives vers trois structures : l'aire parabrachiale latérale (**PBL**, au niveau pontique), la substance grise périacqueducale (**PAG**, au niveau du tronc) et le thalamus latéral (partie ventro-basale, au niveau cortical). L'amygdale reçoit à la fois les informations provenant de l'aire PBL et des noyaux thalamiques. Le thalamus transfère également les messages nociceptives au niveau du cortex cingulé antérieur (non-représenté ici) et des **cortex somato-sensoriels** primaire et secondaire. Enfin, la PAG, qui projette vers le tegmentum pontique dorso-latéral (**DLPT**) et la partie rostro-ventromédiane du bulbe rachidien (**RVM**), active les contrôles descendants. La DLPT, qui contient entre autres le locus coeruleus (non-représenté, voir [figure 1.2.1](#)), et la RVM, qui contient notamment le noyau raphé (non-représenté), vont ainsi moduler (négativement et positivement) la transmission nociceptive (les contrôles descendants sont détaillés sur la [figure 1.2.1](#)). Modifiée à partir de [Millan 2002]

Chapitre 2

Contrôle de la transmission nociceptive spinale : effets supra-spinaux

2.1 Contrôles descendants

2.1.1 Principales structures cérébrales impliquées

Les centres supra-spinaux peuvent moduler l'activité des réseaux de neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. Les contrôles descendants sont principalement issus de la formation réticulée bulbaire, du locus cœruleus et des noyaux du Raphé. Ils peuvent avoir une action facilitatrice ou inhibitrice sur l'intégration et la transmission de l'information nociceptive [Millan 2002]. Les axones des neurones descendants cheminent dans les faisceaux dorso- et ventro-latéraux et vont contacter les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière.

Les stimuli nociceptifs activent, par l'intermédiaire des voies ascendantes, les neurones de la substance grise périacqueducale (PAG, *Cf.* [section 1.2.4](#)). En retour, la PAG contacte la partie rostro-ventro-médiane (RVM) du bulbe rachidien et le tegmentum pontique dorso-latéral (DLPT). Le RVM et le DLPT projettent directement sur la corne dorsale de la moelle épinière. Ces projections sont inhibitrices ou facilitatrices de la transmission nociceptive spinale. Le RVM et le DLPT sont ainsi les effecteurs de la PAG (voir pour revue [Villanueva & Bourgeois 2009, Fields 2004]; et voir [figure 2.1](#)).

2.1.2 Types cellulaires et neurotransmission

La RVM contient divers types de neurones (GABAergiques, glycinergiques, sérotoninergiques et noradrénergiques) qui projettent directement au niveau de la corne dorsale et produisent une inhibition de la transmission nociceptive, *via* les faisceaux dorso-latéraux [Antal *et al.* 1996, Kato *et al.* 2006]. D'un point de vue électrophysiologique, on distingue trois types de neurones, en fonction de leur activité de décharge lors du réflexe de retrait induit par stimulation nociceptive.

Les cellules de type “off” arrêtent leur activité de décharge de potentiels d'action juste avant le réflexe de retrait nociceptif. Elles inhibent les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. Les cellules de type “on” s'activent juste avant le réflexe et facilitent la transmission nociceptive. Ces deux premiers types de neurones projettent dans les couches superficielles et profondes de la corne dorsale de la moelle épinière. Enfin, les cellules de type “neutre” ne présentent aucune modification d'activité électrique liée au réflexe de retrait nociceptif [Villanueva & Bourgeois 2009].

Les contrôles descendants de la RVM peuvent être de type glutamatergique et GABAergique ou glycinergique [Kato *et al.* 2006]. Outre ces systèmes de neurotransmission, la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) [Cordero-Erausquin & Changeux 2001] et la noradrénaline (NA) [Naguib & Yaksh 1994] contribuent également au contrôle de la transmission nociceptive spinale. Les neurones sérotoninergiques constituent 20% de la population neuronale de la RVM, dont la plupart projettent vers la corne dorsale de la moelle épinière, *via* le funiculus dorso-latéral. Le DLPT comprend entre autre les locus cœruleus et subcœruleus, formés de neurones noradrénergiques contactés par des neurones de la PAG. Ces noyaux projettent dans la corne dorsale de la moelle épinière et la NA qu'ils libèrent module la nociception à ce niveau [Naguib & Yaksh 1994, Yoshimura & Furue 2006].

Ces contrôles exercent sur les neurones nociceptifs spinaux une action facilitatrice ou inhibitrice. Cette dualité dans les effets est due :

- au type de récepteur de la 5-HT ou de la NA activé, qui peut augmenter ou diminuer l'activité neuronale,
- à la nature des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière qui sont ciblés par les contrôles (voir pour revue et références [Fields 2004, Millan 2002,

Zhuo & Gebhart 1997]).

2.1.3 Contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs

Généralités

À la suite d'un traumatisme, tel qu'un choc mécanique ou une inflammation locale causée par une piqûre de moustique par exemple, une des premières réactions est souvent de frotter la zone douloureuse. Ceci supprime momentanément la sensation de douleur. Ce stimulus non-nociceptif, que l'on peut qualifier de *homotopique*, active les fibres $A\beta$ et inhibe les entrées nociceptives sur les neurones spinaux, induisant ainsi une analgésie. Cette analgésie, dite "segmentaire", s'explique sur la base de la "théorie du portillon" (ou *gate control theory*, voir [Melzack & Wall 1965]; et voir également [Mancini *et al.* 2014] pour revue récente sur l'analgésie par le toucher).

En revanche, une stimulation forte et nociceptive appliquée sur une zone plutôt large et à distance du site douloureux (dite *hétérotopique*) va également induire une analgésie, cette fois-ci "extra-segmentaire". Cette dernière est appelée contrôle inhibiteur diffus activé par une stimulation nociceptive (DNIC dans la littérature, pour *diffuse noxious inhibitory control*) [Le Bars *et al.* 1979a, Le Bars *et al.* 1979b].

Expérimentalement, on enregistre l'augmentation de fréquence de décharge d'un neurone WDR suite à des stimulations nociceptives, appliquées au niveau de la patte postérieure de l'animal. Ces réponses sont très largement inhibées (à plus de 85%) par des stimulations nociceptives concomitantes appliquées dans différentes parties du corps (*e.g.* au niveau du museau, de la patte contra-latéral ou antérieure, ou encore de l'oreille). Ce phénomène de douleur inhibant la douleur est induite par des stimuli de type mécanique, thermique et chimique appliqués dans des zones éloignées du champ récepteur auquel répond le neurone enregistré [Le Bars *et al.* 1979a, Dickenson *et al.* 1980, Dickenson & Le Bars 1983, Morton *et al.* 1987].

Cependant, seule l'activité, spontanée et évoquée, des neurones de convergence (ou WDR) spinaux et trigéminaux semble concernée par les DNIC. En effet, la décharge des neurones nociceptifs-spécifiques (NS) et celle des neurones non-nociceptifs (NON-NS) ne sont pas modifiées par les stimuli hétérotopiques [Le Bars *et al.* 1979a, Le Bars *et al.* 1979b].

Les DNIC sont également décrits chez l'humain, chez lequel les stimula-

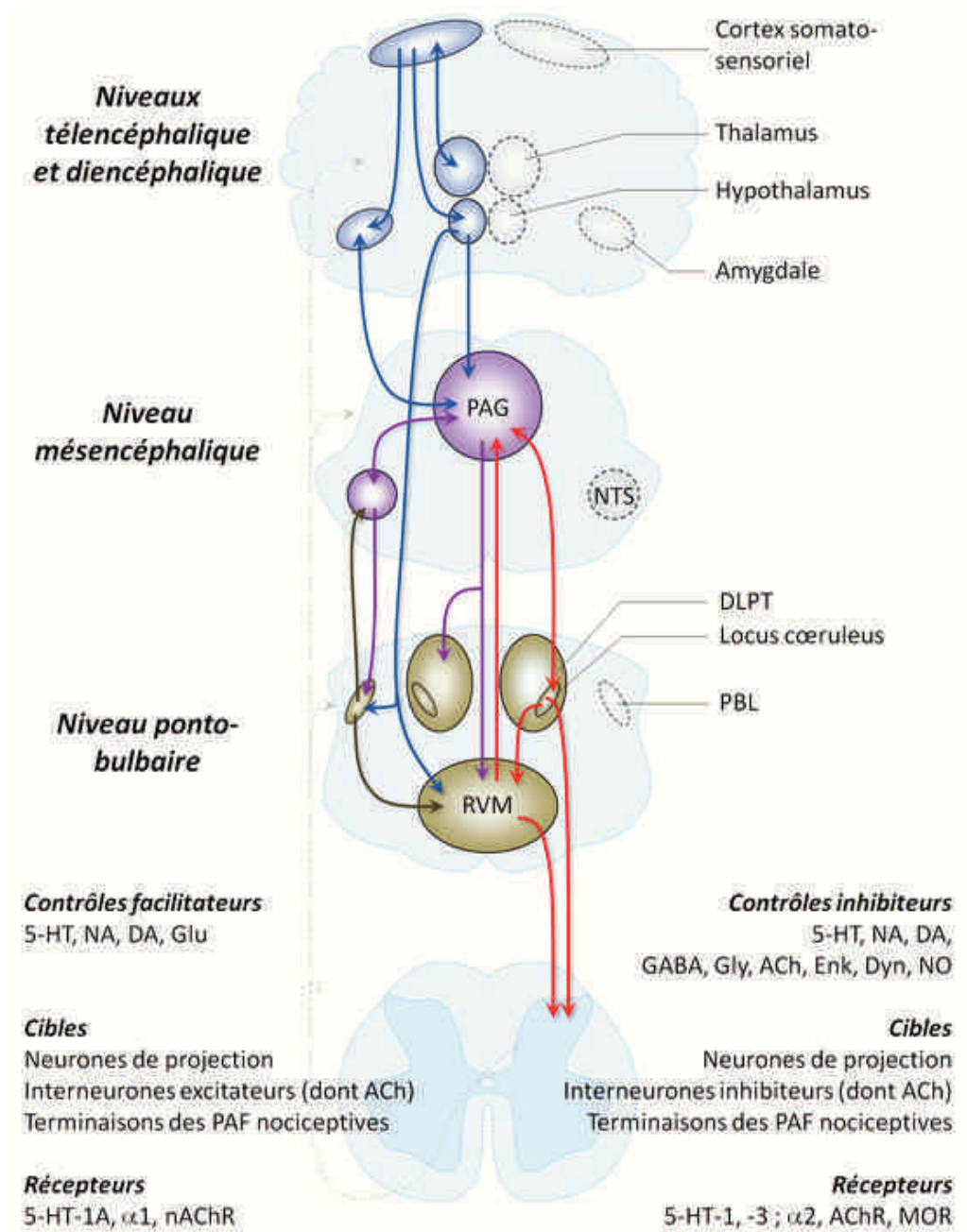


FIGURE 2.1: Principales structures supra-spinales, et leurs interconnexions réciproques, impliquées dans les contrôles descendants. La mise en jeu du système nociceptif au niveau spinal induit l'activation de l'aire parabrachiale latérale (PBL, au niveau pontique), de la substance grise périaqueducale (PAG, au niveau du tronc) et du thalamus latéral (partie ventro-basale, au niveau du diencéphale). Le noyau du tractus solitaire (NTS) reçoit des projections de l'amygdale, contactée par la PAG. L'amygdale, l'hypothalamus et le thalamus, sous contrôle cortical, modulent l'activité des neurones de la PAG. Bien que des projections directes vers la corne dorsale de la moelle épinière à partir du cortex, de l'hypothalamus, de la PBL et du NTS existent, leurs effets modulateurs sont médiés principalement *via* la RVM. Ces différentes structures projettent directement sur la RVM, ou indirectement par l'intermédiaire d'autres structures cérébrales. Chacune de ces structures est ainsi sous l'influence des niveaux supérieurs. Au niveau spinal, la distinction des effets excitateurs ou inhibiteurs de la sérotonine (5-HT) et la noradrénaline (NA) est due à la fois selon le type de récepteurs (excitateurs ou inhibiteurs) et la nature des cibles (neurones de projection, interneurones et terminaisons centrales des afférences primaires nociceptive (PAF) qui les portent). Les contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs (DNIC) sont principalement sous-tendus par des connexions réciproques entre la corne dorsale de la moelle épinière et le sous-noyau réticulé dorsal (localisé dans la portion la plus caudale du bulbe rachidien, non-représenté ici). La PAG serait susceptible de moduler les DNIC, par projections directes vers la RVM, ou *via* le tegmentum pontique dorso-latéral (DLPT) au niveau des locus coeruleus et sub-coeruleus (non-représenté ici) et impliquant le système opioïdergique supra-spinal. Modifiée à partir de [Millan 2002, Fields 2004]

tions hétérotopiques douloureuses diminuent des douleurs telles que musculaires [Graven *et al.* 1998] et dentaire [Motohashi *et al.* 2001], ou encore le réflexe de flexion nociceptif (RIII) [Roby-Brami *et al.* 1987]. Les mécanismes sous-tendant les DNIC feraient intervenir une boucle d'inhibition mettant en jeu les structures spinales et supra-spinales [Le Bars *et al.* 1979a, Villanueva *et al.* 1996], ce contrôle disparaissant chez l'animal ayant subi une section complète de la moelle épinière au niveau cervical, ou dans des préparations de moelle épinière isolée.

Structures cérébrales impliquées dans les DNIC

Les expériences de lésions dans le cerveau de rats renseignent sur les structures impliquées dans les DNIC. Les centres supra-spinaux liés aux contrôles descendants, tels que la PAG, le noyau cunéiforme, l'aire parabrachiale, le locus cœruleus (dont les noyaux Raphe Magnus, Gigantocellularis et Paragigantocellularis) et la RVM ne semblent pas participer au DNIC. En effet, des lésions de ces sites n'affectent pas les DNIC. En revanche, une lésion dans une région spécifique du bulbe rachidien caudal, le sous-noyau réticulé dorsal (subnucleus reticularis dorsalis, ou SRD) diminue très fortement (près de 40%) les DNIC (voir [figure 2.1](#)) et voir [Le Bars *et al.* 1992, Bouhassira *et al.* 1990, Bouhassira *et al.* 1992, Bouhassira *et al.* 1993, Roby-Brami *et al.* 1987, Villanueva *et al.* 1996, Ellrich *et al.* 1998]).

L'implication des SRD est également suggérée par des données électrophysiologiques et anatomiques, montrant des connexions réciproques entre des neurones du SRD et ceux de la corne dorsale de la moelle épinière, formant ainsi des boucles de régulation spino-bulbo-spinale [Bernard *et al.* 1990, Villanueva *et al.* 1996]. Le fait que seulement 40% des DNIC soient supprimés après lésion du SRD suggère l'implication d'autres structures supra-spinales. Enfin, des données récentes suggèrent que les structures du bulbe rachidien sont sous l'influence des cortex préfrontal et cingulaire antérieur, ce qui pourrait expliquer que des facteurs psychologiques puissent influencer les réponses liées aux DNIC [Goffaux *et al.* 2007, Wilder-Smith *et al.* 2004]. Cependant, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour clarifier cette implication.

Neurotransmission

Le système opioïdérique participe aux DNIC, à la fois chez l'animal [Bouhassira *et al.* 1988] et chez l'homme [Willer *et al.* 1990]. Par ailleurs, une lésion de la PAG n'affecte pas les DNIC. L'injection systémique de morphine bloque les DNIC chez les rats contrôles, mais pas chez les animaux dont la PAG a été lésée. Ainsi, il semble que la PAG ne participe pas directement dans les boucles spino-bulbo-spinales des DNIC, mais peut néanmoins moduler ce contrôle [Bouhassira *et al.* 1992] *via* un système opioïdérique présent dans les centres supra-spinaux [Le Bars *et al.* 1981a, Le Bars *et al.* 1981b].

De plus, les niveaux de Met-enkephaline spinaux sont augmentés suite au recrutement des DNIC et ce un phénomène est abolit par la naloxone [Le Bars *et al.* 1987]. L'activation des récepteurs MOR and DOR conduit à une diminution des effets des DNIC, ainsi qu'à l'internalisation des récepteurs de la substance P de type neurokinine 1 (NK1) au niveau spinal [Normandin *et al.* 2013].

Les récepteurs NK1 ont également été impliqués dans l'établissement des DNIC [Lapirot *et al.* 2009]. Chez des animaux dont les neurones des couches I-III de la moelle épinière exprimant ces récepteurs ont été sélectivement détruits [Suzuki *et al.* 2002] ou des souris KO pour le récepteur NK1 [Bester *et al.* 2001], les DNIC ne sont plus présents. En revanche, les récepteurs GABAergiques ne semblent pas impliqués dans l'établissement des DNIC, car l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs GABAA n'entraîne aucune modification des DNIC [Kunz *et al.* 2006].

Enfin, certaines études suggèrent l'implication de la sérotonine et de la noradrénaline (NA) libérées dans la moelle épinière [Belcher *et al.* 1978, Chitour *et al.* 1982, Sanada *et al.* 2009]. Les voies descendantes sérotoninergiques et adrénergiques, inhibitrices de la transmission nociceptive au niveau spinal, potentialisent l'établissement des DNIC [Chitour *et al.* 1982, Sanada *et al.* 2009].

Rôles possibles des DNIC

Les systèmes de neurotransmission opioïdérique, adrénergique et sérotoninergique sont tous impliqués dans les contrôles descendants inhibiteurs de la transmission nociceptive au niveau spinal. Ces systèmes neurochimiques potentialisent les effets des DNIC, ou, lorsqu'ils

sont supprimés, les DNIC ne s'établissent plus. Ceci suggère que les DNIC pourraient utiliser ces voies pour exercer leur contrôle inhibiteur sur la transmission nociceptive spinale.

Les DNIC fonctionneraient comme des filtres. En effet, un stimulus nociceptif intense induit l'activation des contrôles descendants et la mise en jeu des DNIC. Ceci va entraîner l'inhibition des neurones à convergence spinaux n'ayant pas été activés par cette stimulation nociceptive intense. Ceci pourrait permettre au système de ne recevoir que l'information nociceptive intense, qui contraste nettement avec les informations reçues des autres neurones à convergence, dont l'activité est réduite voire abolie [Le Bars *et al.* 1981b]. Les mécanismes sous-tendant l'acupuncture notamment pourraient faire intervenir les DNIC [Le Bars *et al.* 1981b, Fleckenstein 2013].

Enfin, un fonctionnement altéré des DNIC pourrait servir à dépister un éventuel problème du système nociceptif. En effet, l'inhibition induite par les DNIC est amoindrie chez les patients souffrant de douleur chronique, comme par exemple la fibromyalgie et la migraine (Voir pour revue [Villanueva 2009] et références dans [King *et al.* 2009]), ou encore, de douleurs idiopathiques [Yarnitsky *et al.* 2010].

2.1.4 Effets pro- et anti-nociceptifs

La modulation négative de la nociception est principalement médiée par les récepteurs de type $\alpha 2$. Les récepteurs $\alpha 1$ exercent principalement une facilitation de la nociception (voir pour revue [Millan 2002]). La 5-HT peut exercer un effet pro-nociceptif au niveau de la moelle épinière, *via* une action sur les récepteurs de type 5-HT₂. La NA peut également induire des effets algésiques, impliquant les adrénorécepteurs de type $\alpha 1$ au niveau spinal [Holden & Naleway 2001], mais aussi au niveau de la RVM [Fields *et al.* 1991] (voir aussi [Wei *et al.* 1999a, Wei *et al.* 1999b] et pour revue [Millan 2002]).

Les opioïdes semblent recruter ces voies dans leur action modulatrice de la nociception.

2.2 Contrôle par les opioïdes

Dans une partie de nos travaux de thèse, nous avons voulu comparer les effets induits par un agoniste des récepteurs cholinergiques de type nicotinique à ceux de la morphine. Dans

cette optique, nous allons présenter brièvement dans les paragraphes suivants le contexte et les notions nécessaires à la présentation de ces travaux.

2.2.1 Opiïdes endogènes et récepteurs associés

Les opioïdes sont des peptides qui proviennent du clivage de protéines précurseurs, traduites à partir de trois gènes codant respectivement pour : la préproenképhaline, la préprodynorphine et la préproopiomelanocortine. Les principaux opioïdes sont la Met- et la Leu-enképhaline, divers types de dynorphines (incluant les types A et B, ainsi que la néo-dynorphine), la β -endorphine et les endomorphines [Kieffer 2009a]. Ces peptides partagent tous la même séquence N-terminale de quatre résidus Tyr-Gly-Gly-Phe, qui interagit avec les récepteurs opioïdes, de trois types : μ , δ et κ (ou MOR, DOR et KOR, respectivement). Un quatrième récepteur, incapable de lier de façon fonctionnelle les peptides opioïdes, a été identifié (ORL-1, pour *opioid-receptor like-1*). Son ligand, la FQ/nociceptine, n'a pas d'affinité pour les récepteurs MOR, DOR et KOR. Cependant, une forte homologie structurale existe entre ce récepteur et les autres récepteurs opioïdergiques (pour revue voir [Kieffer 2009a, Dooley & Houghten 2000]).

Les récepteurs des opioïdes sont à sept domaines transmembranaires, couplés à des protéines G inhibitrices (*i.e.* Go/Gi). Ils contrôlent les réponses nociceptives, hédoniques, émotionnelles, autonomes, neuroendocriniennes et immunitaires, et sont retrouvés dans tout l'organisme (voir pour revue [Bodnar 2011, Kieffer & Evans 2009b]).

2.2.2 Localisations des MORs dans le système nerveux central

Les opioïdes endogènes ne sont pas les seuls à pouvoir se lier sur ces récepteurs et induire un effet. Un alcaloïde¹ exogène, la morphine, peut également induire des effets analgésiques² en activant les MORs³ centraux et périphériques (voir pour revue [Bodnar 2011]).

Des études de profils d'expression des ARNm révèlent que les MORs sont retrouvés dans la RVM et la PAG [Halladay & Blair 2012, Gutstein *et al.* 1998, Pedersen *et al.* 2011,

1. molécule organique hétérocyclique azotée basique
 2. Non pas sans causer de nombreux effets secondaires, dont la somnolence. Ceci lui a valu son nom, dérivé de la déité Morphée
 3. La morphine peut se lier également sur les DORs et KORs

Wang H & Wessendorf 1999].

Ils sont également présents au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière [Kemp *et al.* 1996, Kline & Wiley 2008]. A ce niveau, ils peuvent être présents sur les fibres afférentes primaires et les neurones des circuits impliqués dans la transmission nociceptive, et inhibent directement cette transmission [Fields 2004]. Enfin dans des cultures de cellules corticales, des MORs fonctionnels sont exprimés par les cellules astrocytaires [Hansson *et al.* 1998] et microgliales [Turchan-Cholewo *et al.* 2008, Calvo *et al.* 2000].

2.2.3 Effets aigus de la morphine

La micro-injection d'agonistes des récepteurs MORs, dont la morphine, au niveau des structures des contrôles descendants inhibe les réponses comportementales à des stimuli nociceptifs. Par exemple, ces agonistes vont entraîner l'activation des cellules "off" de la RVM (*Cf.* [section 2.1](#)), produisant l'inhibition de la transmission nociceptive spinale. Les cellules "on", en revanche, vont être inhibées par l'injection locale ou systémique d'agonistes opioïdiques [Villanueva & Bourgeois 2009]. De plus, la suppression des effets de la RVM, par inactivation ou par section des axones qui projettent vers la corne dorsale de la moelle épinière, réduit l'analgésie produite par la morphine. Enfin, la micro-injection d'antagonistes des récepteurs MORs (*e.g.* la naloxone) dans la RVM supprime les effets analgésiques initiés par stimulation de la PAG [Fields 2004].

L'analgésie produite par les agonistes du récepteur MOR passe par des effets à la fois pré- et post-synaptiques. Les études *in vitro* montrent que l'activation des MORs n'induit jamais d'effet excitateur. Ainsi, l'activation des cellules "off" de la RVM passerait par une levée d'inhibition exercée par des interneurones GABAergiques de la PAG ou de la RVM projetant sur les cellules "off".

Par ailleurs, des expériences d'iontophorèse de morphine ont montré une inhibition directe de neurones de la RVM. Cette application de morphine bloque également l'augmentation de la fréquence de décharge de potentiels d'action de ces mêmes cellules, normalement induite par application de glutamate. Cette inhibition post-synaptique cible donc les cellules "on" de la RVM [Fields 2004].

Bien que l'action d'une administration aiguë de morphine est analgésique, un traite-

ment chronique peut induire l'apparition de phénomènes d'hypersensibilité [Bekhit 2010, Lee *et al.* 2011, Ferrini *et al.* 2013]. Ce point sera détaillé dans la partie Résultats et Discussion de ce manuscrit.

2.3 Contrôle par la nicotine

Le système cholinergique endogène sera présenté plus en détail dans la [section 3](#). Nous nous contenterons surtout ici d'introduire les récepteurs nicotiques de l'ACh, cible des effets comportementaux de la nicotine.

L'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur⁴ qui gouverne plusieurs processus biologiques majeurs (*e.g.* motricité, rythme cardiaque, cycle veille/sommeil, voir pour revue *e.g.* [Miwa *et al.* 2011, Schliebs & Arendt 2011]) des systèmes nerveux central et périphérique. Parmi les nombreuses fonctions qu'elle exerce, l'ACh est également un modulateur puissant du système nociceptif (*Cf.* [section 3.2](#)).

La nicotine et la muscarine sont deux agonistes exogènes des récepteurs de l'ACh (*Cf.* [figure 2.2](#)). Chacun de ces agonistes lie préférentiellement une des deux classes de récepteurs de l'ACh.

On distingue ainsi les récepteurs de type nicotinique et muscarinique. Les récepteurs muscariniques (mAChRs) sont des récepteurs métabotropiques. Il y a cinq sous-types (M1-M5) et deux catégories de mAChRs : ceux qui lient préférentiellement les protéines G de la famille $G_q/11$ (*i.e.* M1, M3 et M5) et ceux couplés aux protéines G de la famille G_i/Go (M2 et M4) (voir pour revue *e.g.* [Fiorino & Garcia-Guzman 2012]).

Les récepteurs de type nicotinique (nAChRs) appartiennent à la classe des récepteurs ionotropiques. Les nAChRs sont composés de 5 sous-unités, qui s'agencent selon une combinaison homo- ou hétéromérique de sous-unités α (2-10) et β (2-4) (voir pour revue [Hurst *et al.* 2013], voir également [Miwa *et al.* 2011, Ofek & Soreq 2013] pour les mAChRs et nAChRs).

4. L'ACh a été d'abord identifiée par Henry Dale en 1914 en tant que substance chimique du nerf vague contrôlant le rythme cardiaque. En 1921, les travaux de Otto Loewy démontrent pour la première fois l'existence d'une transmission synaptique de type chimique. L'ACh, alors nommée le *vagusstoff*, (traduit littéralement de l'allemand, *vagus substance*, ou *the vagus (nerve) "stuff"*), est le premier neurotransmetteur mis en évidence.



FIGURE 2.2: Structure de l'acétylcholine, la nicotine et la muscarine.

2.3.1 Présence de récepteurs nicotiniques au niveau supra-spinal

Les études par hybridation *in situ* de l'expression d'ARNm révèlent une expression généralisée, dans le système nerveux central des rongeurs, des sous-unités $\alpha 4$, $\beta 2$ et $\alpha 7$ des nAChRs (voir pour revue [Umana *et al.* 2013, Drago *et al.* 2003]).

De plus, la distribution de $\alpha 4$ recouvre quasi totalement celle de $\beta 2$ [Wada *et al.* 1989]. Au niveau des centres supra-spinaux, on les retrouve notamment dans la PAG, les noyaux ventraux i) postéro-latéral (vPL) et ii) postéro-médian (vPM) du thalamus (relais de la voie spino-thalamique), dans le locus cœruleus, le NRM, ainsi que dans le parabrachial latéral (PBL) [Wada *et al.* 1989, Wada *et al.* 1990, Dineley-Miller & Patrick 1992, Le Novère *et al.* 1996, Léna *et al.* 1999]. D'autres types de nAChRs ($\alpha 2-6$, $\beta 3-4$) sont retrouvés dans ces structures, mais dans une plus faible mesure [Umana *et al.* 2013, Drago *et al.* 2003].

La sous-unité $\alpha 7$ est aussi majoritairement retrouvée dans les centres supra-spinaux chez le rat [Séguéla *et al.* 1993] et la souris [Drago *et al.* 2003] (voir aussi pour revue [Umana *et al.* 2013]).

Les études de profils d'expression des nAChRs dans la moelle sont assez rares. En revanche, la présence de nAChRs peut être étudiée par d'autres techniques. Les approches immunohistochimiques peuvent constituer un bon moyen pour localiser ces récepteurs, malgré de possibles problèmes de spécificité [Moser *et al.* 2007]. Les études *in vivo* ou *in vitro* utilisant des agonistes ou antagonistes spécifiques des nAChRs seront donc préférées pour identifier les sous-unités intervenant dans la modulation de la nociception et de la douleur.

2.3.2 Effets aigus de la nicotine

L'injection systémique aiguë de nicotine induit des phénomènes d'analgésie chez la souris [Aceto *et al.* 1983]. Afin d'identifier le(s) site(s) d'action, des injections locales de nico-

tine ou d'agonistes nicotiniques ne passant pas la barrière hémato-encéphalique (BBB, pour *blood-brain barrier*) ont été effectuées. En effet, la nicotine peut pénétrer dans le système nerveux central (SNC) par diffusion [Sershen *et al.* 1979, Chen *et al.* 1995]. Cette diffusion peut entraîner une modification des caractéristiques de la BBB sans, toutefois, en altérer son fonctionnement. En effet, la vitesse de passage de solutés perméables peut être augmentée [Hawkins *et al.* 2004], sans permettre le passage de solutés imperméables en conditions physiologiques [Chen *et al.* 1995]. Ce phénomène semble être régi par une modification des protéines de jonctions par la nicotine [Hawkins *et al.* 2004]. De façon intéressante, la morphine et la nicotine semblent inhiber le passage respectif de l'une par rapport à l'autre à travers la BBB [Sershen *et al.* 1979].

Des dérivés de la nicotine ne traversant pas la BBB sont analgésiques lorsqu'ils sont injectés par voie intra-cérébro-ventriculaire et n'ont pas d'effet sur la nociception après administration périphérique [Aceto *et al.* 1983]. De plus, l'injection périphérique d'héxamethonium, un antagoniste des nAChRs qui ne traverse pas la BBB, ne modifie pas les effets analgésiques de la nicotine administrée par voie i.v. [Tripathi *et al.* 1982]. Cela suggère donc que l'analgésie nicotinique passe principalement par des effets centraux.

Les effets aigus de l'injection de nicotine dans différents sites des contrôles descendants supra-spinaux sont principalement de nature analgésique. Ces sites sont localisés notamment dans la RVM, l'hypothalamus et le noyau parabrachial.

La nicotine et d'autres agonistes cholinergiques des n- et m-AChR (tel que la carbamylcholine, aussi nommée carbachol, un cholinomimétique activant les récepteurs nicotiniques et muscariniques), exercent une action anti-nociceptive lorsqu'ils sont injectés dans la RVM. Une microinjection ($0.5\mu\text{L}$) de carbachol dans la VMM (trois différents sites) induit un effet anti-nociceptif, qui se traduit par une augmentation des seuils de retrait de la queue en réponse à des stimuli nociceptifs chauds (*tail-flick*) pendant au moins 1 heure après l'injection [Nuseir *et al.* 1999] et une diminution des vocalisations (signe traduisant une manifestation de la douleur) [da Silva & Menescal-de-Oliveira 2006]. Ces deux phénomènes montrent l'action analgésique du carbachol.

Chez le rat (femelle), l'injection de carbachol dans l'hypothalamus latéral (LH) produit de l'analgésie, en augmentant les seuils de retrait de la queue et la patte des animaux à des

stimuli thermiques nociceptifs [Holden & Naleway 2001]. L'effet analgésique du carbachol dans le LH implique le système noradrénergique du noyau A7 pontique [Nuseir *et al.* 1999, Decker & Meyer 1999], projetant sur la corne dorsale de la moelle épinière et agissant sur les récepteurs $\alpha 2$ spinaux [Holden & Naleway 2001], ainsi que le système sérotoninergique du NRM, projetant également au niveau spinal [Damaj *et al.* 1994, Holden *et al.* 2005].

Par ailleurs, une injection de nicotine, ou d'épibatidine [Cucchiario *et al.* 2005], dans le NRM et dans le noyau tegmental pédonculopontique (PPTg) [Iwamoto 1991, Iwamoto & Marion 1993b, Cucchiario *et al.* 2005], produit de l'analgésie se traduisant par une augmentation des seuils de sensibilité thermique au chaud nociceptif. Les voies 5-HT et NA issues de la RVM sont également sollicitées pour l'inhibition descendante (DI) exercée au niveau spinal [Iwamoto & Marion 1993a]. La lésion du NRM prévient l'action analgésique de la nicotine injectée au niveau du PPTg [Iwamoto 1991]. Cette structure contient par ailleurs des neurones cholinergiques, dont certains peuvent être des cellules de type "on" et "off", qui projettent vers la RVM [Carlson *et al.* 1995].

L'application de nicotine dans le PBN, par microinjection, produit aussi de l'analgésie, en augmentant les seuils de sensibilité thermique (test du *tail-flick*), mécanique (tests de la pince calibrée), ou en inhibant les comportements spontanés induits par l'injection sous-cutanée de formaline [Katayama *et al.* 1984].

L'analgésie nicotinique impliquant le NRM met en jeu des nAChRs renfermant la sous-unité $\alpha 4$ [Cucchiario *et al.* 2005], tels que les récepteurs $\alpha 4\beta 2$. Ces derniers jouent un rôle majeur dans le contrôle d'origine supra-spinale de la transmission nociceptive, *via* la mise en jeu du système sérotoninergique descendant [Iwamoto 1991, Marubio *et al.* 1999, Decker & Meyer 1999]. Les récepteurs nicotiques contenant $\alpha 4$, mais aussi $\alpha 7$, seraient exprimés par des interneurons GABAergiques⁵ de la RVM [Dehkordi *et al.* 2007]. De plus, des interneurons locaux GABAergiques peuvent inhiber une large population des neurones de la RVM projetant vers la corne dorsale de la moelle épinière, incluant des cellules de type "off" [Gilbert & Franklin 2001, Reichling & Basbaum 1990a, Reichling & Basbaum 1990b].

5. Ces neurones GABAergiques seraient localisés dans une zone de la RVM contrôlant la respiration. Néanmoins, tel que discuté par les auteurs, les marqueurs utilisés pour les immuno-détections ne cibleraient pas toutes les populations GABAergiques à ce niveau

La sollicitation des nAChRs localisés dans les centres supra-spinaux induit une action principalement analgésique. Cependant, une étude menée chez le rat adulte (utilisant des animaux femelles) montre que, à ce niveau, elle peut également induire un effet hyperalgésique. En effet, une microinjection de nicotine dans des régions situées plus caudalement au DLPT (*i.e.* des régions dorsales du mésencéphale et du tronc cérébral ponto-médullaire) produit une hypersensibilité thermique au chaud [Hamann & Martin 1992].

On retrouve ainsi des récepteurs opioïdes et cholinergiques au niveau des structures cérébrales impliquées dans les contrôles descendants, permettant ainsi une modulation de ces deux systèmes sur la transmission nociceptive.

L'activation de ces récepteurs produit un effet majoritairement analgésique. Cependant, il existe certaines zones cérébrales dans lesquelles la mise en jeu de ces systèmes, notamment du système cholinergique, induit une action pro-nociceptive.

Les récepteurs opioïdiques ont une action exclusivement inhibitrice sur l'activité neuronale. Les effets pro-nociceptifs pourraient alors s'expliquer par l'inhibition de structures anti-nociceptives.

L'activation des récepteurs cholinergiques peut, quant à elle, produire une excitation ou une inhibition du neurone exprimant de tels récepteurs. Ainsi, les effets pro- ou anti-nociceptifs résultants peuvent s'expliquer par le type de neurones, selon les sous-types de récepteur qu'il exprime, ainsi que par la cible et la localisation de ce neurone. Ainsi, deux populations neuronales exprimant les mêmes sous-types de récepteurs peuvent avoir une action différente sur la transmission nociceptive, selon qu'elles soient localisées au niveau supra-spinal ou dans la moelle épinière.

Chapitre 3

Contrôle de la transmission nociceptive spinale par le système cholinergique endogène

3.1 Généralités sur le système cholinergique

3.1.1 Synthèse et catabolisme de l'acétylcholine

La synthèse d'ACh est réalisée par la choline acetyl transférase (ChAT). La ChAT permet la liaison entre une molécule d'acétyl co-enzyme A (CoA, un métabolite d'origine mitochondriale), et la choline, pouvant provenir de plusieurs sources dont le recyclage de l'ACh libérée et dégradée par l'acétylcholine esterase (AChE). La méthylation de la phosphatidylethanolamine suivie de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine résultante peut également fournir de la choline [Blusztajn 1983]. Enfin, la choline circulante plasmatique constitue la dernière source (voir [Taylor & Brown 1999] pour revue).

Les terminaisons des neurones cholinergiques expriment à leur membrane un transporteur sodium-dépendant de choline dit “de haute affinité” (HACHT, pour *high-affinity choline transporter*)¹, qui permet l'entrée de choline. Le transporteur HACHT est la cible de bloqueurs, parmi lesquels l'hémicolinium-3 (HC-3, Cf. [section 3.2](#)) [Okuda & Haga 2003]).

Après sa synthèse par la ChAT dans les terminaisons, l'ACh est chargée dans les

1. par opposition au transporteur de basse affinité, présent dans tous les tissus

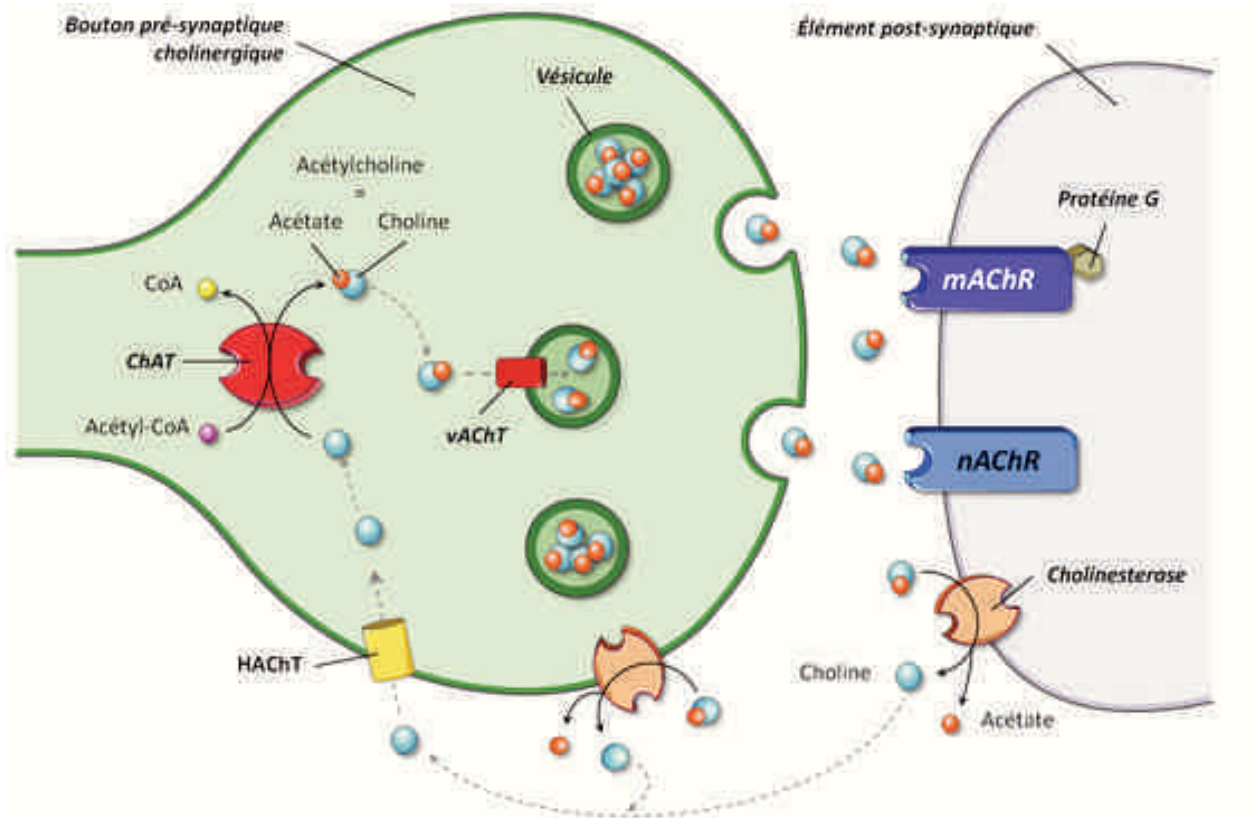


FIGURE 3.1: Principaux partenaires nécessaires au métabolisme de l'acétylcholine dans une terminaison de neurone cholinergique. La formation d'acétylcholine (ACh) résulte de l'association d'une molécule de choline et d'un radical acétyl-CoA qui provient du pyruvate, issu de la glycolyse mitochondriale. Cette formation nécessite la choline acétyl-transferase (**ChAT**). Le transporteur vésiculaire de l'ACh (**vAChT**) permet l'entrée de l'ACh ainsi synthétisée dans la vésicule. Après libération, l'ACh active les récepteurs-canaux de type nicotinique (**nAChR**) et/ou muscarinique (**mAChR**) couplés aux protéines G, qui induisent une signalisation cholinergique. L'ACh est ensuite rapidement dégradée par la l'acétylcholine esterase en choline + acétate. Les molécules de choline sont transportées au niveau de la synapse par un transporteur sodium-dépendant de choline dit "à haute affinité" (**HACHT**). Alors que l'acétylcholine esterase est présente à la membrane des cellules cholinergiques et leurs cibles, la ChAT est exprimée seulement dans les cellules cholinergiques. La ChAT est donc ciblée lorsque l'identification spécifique des populations cholinergiques est nécessaire. Le modèle de souris transgéniques que nous avons utilisé est basé sur cette spécificité. Modifiée à partir de [Purves *et al.* 2001].

vésicules synaptiques par le VAcHT (pour *vesicular ACh transporter*; voir pour revue [Taylor & Brown 1999] et voir [figure 3.1](#)).

L'AChE, qui permet la dégradation rapide de l'ACh après son action, est présente au niveau de toutes les cellules répondant à une stimulation cholinergique. Elle présente une distribution très large dans le SNC. La ChAT n'est présente qu'au niveau des cellules qui synthétisent l'ACh. C'est pour cette raison que cette dernière est considérée comme le marqueur idéal des cellules cholinergiques [Wu & Hersh 1994].

3.1.2 Localisation des populations cholinergiques dans la moelle épinière

Au niveau des centres supra-spinaux, les neurones cholinergiques se retrouvent au niveau du tronc cérébral, du striatum et principalement, à la base de l'encéphale (voir pour revue [Oda 1999, Perry *et al.* 1999]). Le striatum et le cortex contiennent des interneurons, alors que les neurones à la base de l'encéphale contenus dans le noyau basal et le noyau médial septal projettent dans tout l'encéphale et constituent la source majeure d'ACh de l'encéphale [von Engelhardt *et al.* 2007, Perry *et al.* 1999]. On retrouve enfin les neurones cholinergiques au niveau du DLPT [von Engelhardt *et al.* 2007], qui projettent vers le thalamus et la moelle épinière [Perry *et al.* 1999].

Au niveau spinal, les neurones cholinergiques se situent dans cinq régions distinctes, aussi bien au niveau dorsal que ventral (*Cf.* [figure 3.2](#) et voir [Barber *et al.* 1984]).

Dans la corne ventrale, on retrouve les motoneurons somatiques, situés dans les couches VII à IX. Les cellules de partition² sont dispersées depuis la colonne intermedio-latérale jusqu'à la LX dans les lamina V-VII.

Dans la moelle latérale, on retrouve les neurones préganglionnaires sympathiques au niveau thoracique et les neurones préganglionnaires parasympathiques au niveau sacré. Des neurones cholinergiques entourent également le canal central, dans la couche X.

2. Les cellules de partitions sont des interneurons impliqués dans les processus de motricité. Elles connectent de façon mono-synaptique les motoneurons spinaux. Un contingent de cellules de partitions ont leur axone qui traverse la commissure centrale et participent donc à la coordination réciproque motrice entre les côtés gauche et droit de la moelle épinière. Ces dernières sont donc impliquées dans la génération central du patron de locomotion (CPG, pour *central pattern generator*) [Huang *et al.* 2000, Stepien *et al.* 2010].

Enfin, une petite population, rare et dispersée, se localise dans les couches III/IV de la corne dorsale de la moelle épinière. Ces interneurons cholinergiques sont le sujet de la présente étude.

3.1.3 Les récepteurs de l'acétylcholine

Les récepteurs cholinergiques ont déjà été introduits dans la [section 2.3](#). Dans les paragraphes suivants, nous traiterons les effets des agonistes muscariniques et nicotiques au niveau spinal. L'action des antagonistes sera abordée dans la [section 3.2](#).

3.1.3.1 Distribution des récepteurs nicotiques dans la corne dorsale de la moelle épinière

Chez le rat, les sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 2$ sont virtuellement présentes dans des neurones de toutes les couches de la moelle épinière [Wada *et al.* 1989]. Dans la LII, les ARNm des sous-unités $\alpha 2$ [Wada *et al.* 1989], $\alpha 5$ [Wada *et al.* 1990] et $\alpha 7$ [Séguéla *et al.* 1993] sont également retrouvés, mais ils ne sont pas détectés dans la couche I.

Les ARNm des sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 2$ sont exprimés dans des interneurons inhibiteurs (GABAergiques et glycinergiques) de la corne dorsale de la moelle épinière de souris [Cordero-Erausquin *et al.* 2004]. On retrouve par ailleurs les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 7$ et $\beta 2$ dans des interneurons excitateurs, ainsi que dans des neurones de projection exprimant le récepteurs NK1 [Cordero-Erausquin *et al.* 2004].

Les transcrits de la sous-unité $\alpha 7$ sont également détectés au niveau somatique de neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (voir également pour revue [Umana *et al.* 2013, Drago *et al.* 2003]).

Les nAChRs sont localisés sur des neurones spinaux, sur les terminaisons centrales des afférences primaires, ainsi que sur des éléments pré-synaptiques contactant les afférences primaires [Khan *et al.* 2003]. On retrouve également des transcrits de différentes sous-unités au niveau des cellules microgliales [Shytle *et al.* 2004, Khan *et al.* 2003]. Ces récepteurs sont fonctionnels, tel que le suggèrent des études sur cultures cellulaires astrocytaires [Höslí *et al.* 1988] et microgliales [Shytle *et al.* 2004, Khan *et al.* 2003] issues de tranches de moelle épinière de souris .

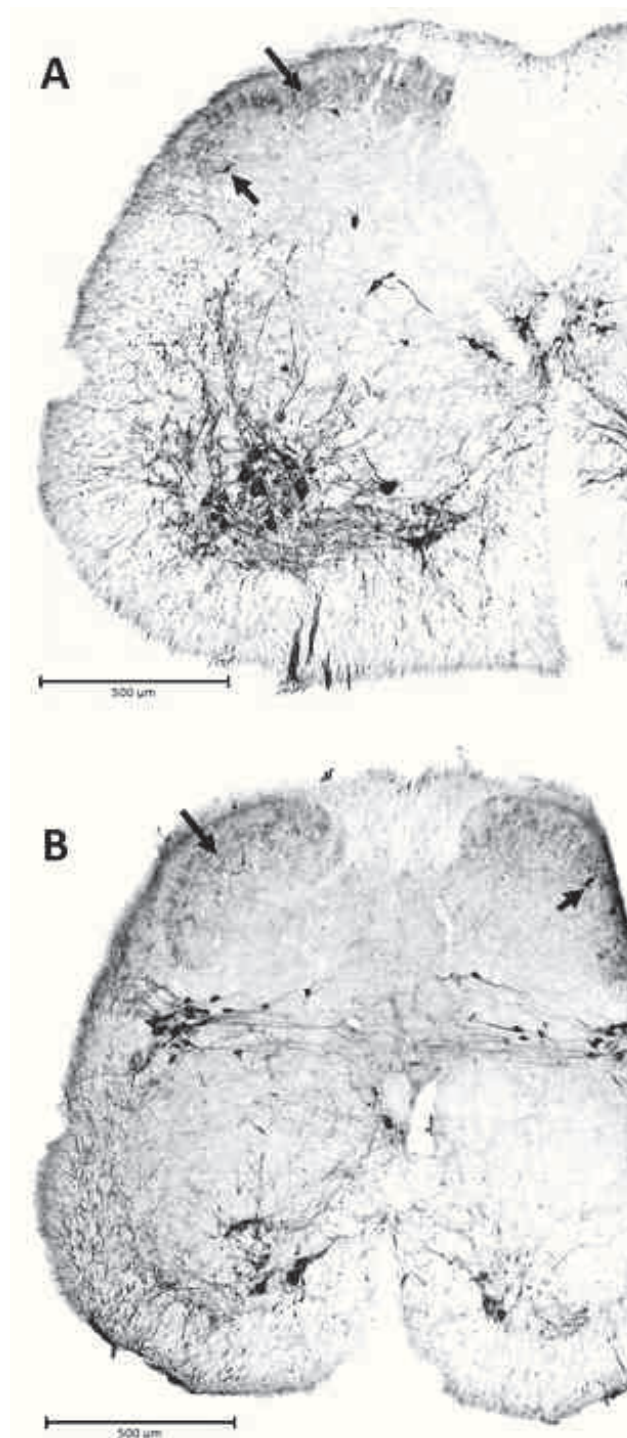


FIGURE 3.2: **Populations cholinergiques de la moelle épinière de souris.** Immuno-détection de la choline acétyl transferase (ChAT) dans des sections transverses ($50\mu\text{m}$) de moelle épinière de souris adulte. En **A** : Section effectuée au niveau L3. La flèche du haut indique le plexus de fibres cholinergiques, localisé dans les couches II/III. La flèche du bas indique les interneurons cholinergiques étudiés dans nos travaux. En **B** : Section effectuée au niveau de S1. Noter la présence du plexus également au niveau sacré (flèche du haut). La flèche en bas à droite indique la présence d'un interneurone cholinergique (les neurones préganglionnaires autonomes sont absents dans la partie cervicale de la moelle, voir texte pour le détail des populations cholinergiques de la moelle épinière). Figure : [Watson *et al.* 2009].

3.1.3.2 Distribution des récepteurs muscariniques dans la corne dorsale de la moelle épinière

Chez le rongeur, les types M2, M3 et M4 sont les plus exprimés, notamment au sein des couches superficielles de la moelle épinière, tel que le montre des études de liaisons de radioligands [Höglund & Baghdoyan 1997, Mulugeta *et al.* 2003] et de RT-PCR [Wei J *et al.* 1994, Cai *et al.* 2009]. La présence de M2 a également été étudiée par immunodétection [Duttaroy *et al.* 2002, Li *et al.* 2002]. L'immuno-réactivité pour M2 est plus intense dans la couche II et très faible voire absente chez des souris KO pour M2 ou M2/M4 [Duttaroy *et al.* 2002] (voir également pour revue [Fiorino & Garcia-Guzman 2012]).

Les effets produits par l'injection d'agonistes ou d'antagonistes muscariniques en *in vivo* et *in vitro* suggèrent également que des mAChRs fonctionnels sont présents au niveau spinal. Ceci constitue le sujet traité dans la section suivante.

3.2 Rôle du système cholinergique spinal dans la nociception

3.2.1 Effets de l'activation des récepteurs muscariniques

3.2.1.1 Au niveau comportemental

L'administration systémique ou intrathécale (i.t.) dans la moelle épinière *in vivo* de carbachol au niveau lombaire de la moelle épinière augmente les latences de réponses lors de tests d'immersion de la queue³ et de plaque chaude chez le rat [Yaksh *et al.* 1985, Gillberg *et al.* 1989, Hartvig *et al.* 1989] et le chat [Yaksh *et al.* 1985]. Cela suggère une implication d'au moins un des types de récepteurs cholinergiques dans le contrôle de la nociception au niveau spinal.

Deux agonistes des récepteurs de type muscarinique, l'oxotremorine et le McN-A-343 (agoniste partiel [Mitchelson *et al.* 2012]) produisent un effet analgésique chez le rat [Iwamoto & Marion 1993b, Naguib & Yaksh 1997] et la souris [Duttaroy *et al.* 2002], en augmentant les latences de réponses lors de test nociceptifs thermiques (plaque chaude et *tail-*

3. Test nociceptif thermique à la chaleur ou au froid, dans lequel la queue du rongeur est placée dans un récipient contenant de l'eau à une température fixée induisant une réponse nociceptive

flick, voir également pour revue [Eisenach 2009]). L'effet analgésique observé chez le rat après injection d'oxotremorine est aboli en présence d'atropine, inhibiteur des récepteurs muscariniques [Iwamoto & Marion 1993b, Naguib & Yaksh 1997].

L'injection de formaline dans la patte postérieure de rongeurs induit une réaction inflammatoire périphérique et provoque des comportement de léchages et de morsures de la patte, traduisant l'effet nociceptif de cette substance. Les effets nociceptifs sont diminués par l'administration i.t. (entre la partie L5 et L6 de moelle épinière) d'agonistes sélectifs des sous-types de mAChRs chez la souris. Notamment, les effets analgésiques passeraient par l'activation des récepteurs de type M3, mais pas M1 ni M2 [Honda *et al.* 2000].

De même, un agoniste sélectif de M1, la xanomeline, n'a pas d'effet lors de tests de stimuli nociceptifs thermiques ou chimiques (induits par l'acide acétique) [Sheardown *et al.* 1997]. Des études montrent par contre des effets analgésiques suite à l'activation des sous-types M2 et M4 lors de tests nociceptifs à la chaleur. Chez des souris dont l'expression de ces trois sous-types a été compromise (par injection i.t. de siRNA⁴ pour un sous-type spécifique), l'analgésie produite par l'administration de muscarine est abolie lorsque les expressions de M2 et/ou M4 sont diminuées, mais pas lorsqu'on inhibe celle de M3 [Cai *et al.* 2009]. Des résultats similaires sont obtenus par utilisation de souris KO, ou double-KO pour ces récepteurs [Duttaroy *et al.* 2002].

3.2.1.2 Études électrophysiologiques

Dans des tranches aiguës de moelle épinière de rat, l'enregistrement par la technique de *patch-clamp* de neurones de la couche II montre que l'application dans le bain d'agonistes muscariniques (notamment la muscarine et l'oxotremorine) induit une augmentation de fréquence des courants post-synaptiques inhibiteurs spontanés (IPSCs) [Baba *et al.* 1998]. Les récepteurs M2 et M4 semblent responsables de cette facilitation des courants inhibiteurs GABAergiques [Baba *et al.* 1998, Zhang *et al.* 2005]. Le sous-type M3 serait quant à lui impliqué dans la facilitation de l'inhibition glycinergique [Baba *et al.* 1998, Wang XL *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2005].

Cependant, chez la souris, des enregistrements électrophysiologiques montrent une

4. *Silencer RNA*, des brins d'ARNm complémentaires d'un gène cible qui s'y lie, inhibant ainsi l'expression de la protéine codée par ce gène

implication de M3 dans la facilitation GABAergique au niveau des couches superficielles de la moelle épinière [Zhang *et al.* 2006]. Ces résultats ont été obtenus à la fois par application dans le bain d'un antagoniste spécifique, ou par l'utilisation d'un modèle de souris KO pour le gène codant le sous-type M3, ce qui traduit une différence inter-espèce avec le rat. D'autres modèles de souris KO suggèrent un rôle pour M2 et M4 dans la facilitation des courants inhibiteurs, mais aussi, dans l'inhibition des EPSCs [Chen *et al.* 2010], notamment de leur amplitude [Bleazard & Morris 1993, Li *et al.* 2002, Jeong *et al.* 2013]. Cela permet donc d'augmenter le pouvoir inhibiteur exercé par M2 et M4 au sein de la corne dorsale de la moelle épinière, en stimulant la transmission inhibitrice et en inhibant la transmission excitatrice.

L'application d'oxotremorine diminue au niveau spinal l'amplitude des EPSCs glutamatergiques évoqués par la stimulation des afférences primaires [Zhang *et al.* 2007].

Le sous-type M5 aurait un rôle plutôt facilitateur sur les EPSCs spontanés, un phénomène observé dans 25% de neurones enregistrés dans la couche II [Chen *et al.* 2010]. Ce dernier sous-type pourrait alors servir pour équilibrer les effets de M2 et M4, en contre-balançant leur action sur la transmission excitatrice.

Des études d'enregistrements électrophysiologiques *in vivo* de neurones de la moelle épinière ont été réalisées chez le rat. Dans ces expériences, les fréquences de décharge de potentiels d'action de neurones de projection ont été enregistrées suite à des stimulations, nociceptives et non-nociceptives, appliquées dans leur champ récepteur périphérique au niveau de la patte postérieure de l'animal. La muscarine, appliquée au niveau de la moelle épinière, diminue les fréquences de l'activité évoquée par des stimuli nociceptifs ou non-nociceptifs [Chen & Pan 2004]. Cela suggère que la muscarine peut atténuer la transmission synaptique des afférences primaires au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. La co-administration d'un antagoniste des récepteurs GABAergiques de type B ($GABA_B$) réduit l'effet inhibiteur de la muscarine, ce qui suggère une implication de ces récepteurs dans les effets de la muscarine [Chen & Pan 2004].

Par ailleurs, l'injection systémique de morphine induit également une diminution de l'activité de neurones de projection spinaux dans les mêmes conditions expérimentales, un effet

qui est réduit à la suite de l'application d'atropine (un antagoniste des mAChRs) au niveau spinal [Chen *et al.* 2005].

3.2.2 Effets de l'activation des récepteurs nicotiques

3.2.2.1 Au niveau comportemental

L'injection par voie i.t. d'agonistes des récepteurs nicotiques (nicotine ou épibatidine) produit chez la souris une augmentation des latences de réponse dans les tests de "tail flick". Ceci traduit un effet analgésique de ces agonistes, qui est antagonisé par la mécamylamine (MCA, antagoniste non-spécifique des nAChRs) [Damaj *et al.* 1998].

Des tests de "tail-flick" chez le rat ont montré que la nicotine exerce un effet analgésique plus important lorsqu'elle est injectée par voie i.t. qu'après injection intra-cérébro-ventriculaire (i.c.v.) [Aceto *et al.* 1986], un effet bloqué par la MCA [Christensen & Smith 1990]. L'action analgésique de la nicotine chez le rat n'a cependant pas été reproduite dans d'autres études [Yaksh *et al.* 1985, Gillberg *et al.* 1990, Khan *et al.* 1998], où les concentrations étaient plus élevées (10 fois plus) et le volume de solution injectée plus faible (2 à 4 fois moins). Néanmoins, des effets analgésiques d'autres agonistes ont été montrés dans ces mêmes études. Lorsque les nAChRs sont activés par des agonistes tels que l'épibatidine ou la cytisine, des comportements associés à la nociception⁵ sont diminués, ainsi que les latences de réponse suite à des stimuli thermiques chauds nociceptifs [Khan *et al.* 1998, Qian *et al.* 1993].

L'administration d'épibatidine par microdialyse au niveau dorsal de la moelle épinière produit, chez le rat, une diminution de l'inflammation et de l'allodynie mécanique induite par l'injection de carragénine dans l'articulation de la patte [Lawand *et al.* 1999].

3.2.2.2 Études électrophysiologiques

La nicotine et l'épibatidine augmentent la fréquence des courants inhibiteurs post-synaptiques spontanés (sIPSCs) enregistrés dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière [Genzen & McGehee 2005]. De même, l'application du TC-2559, un agoniste partiel des nAChRs de type $\alpha 4\beta 2$, augmente la fréquence des IPSCs spontanés de neurones

5. vocalisation, nervosité au toucher

de la LII de tranches de moelle épinière de rats jeunes (P14-21) [Cheng *et al.* 2011]. Cet effet est complètement aboli en présence de di-hydro beta érythroïdine (DH β E), un inhibiteur spécifique des nAChRs de type $\alpha 4\beta 2$. Dans les neurones de la couche V, on observe également une augmentation de la fréquence des IPSCs, spontanés et miniatures, suite à l'application dans le bain de nicotine ou de RJR-2403, un agoniste spécifique des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ [Takeda *et al.* 2007].

Au niveau des couches III/IV de tranches de moelle épinière de rats jeunes (P11-25), la majorité des neurones sont dépolarisés par l'application de nicotine dans le bain de perfusion, phénomène également inhibé par la DH β E [Urban *et al.* 1989]. La nicotine induit également un courant dépolarisant au niveau de neurones inhibiteurs de la LII chez le rat nouveau-né [Kiyosawa *et al.* 2001] et adulte [Takeda *et al.* 2003].

Les terminaisons centrales des afférences pourraient aussi exprimer des récepteurs nicotiques [Roberts *et al.* 1995, Genzen *et al.* 2001, Khan *et al.* 2004]. Des données électrophysiologiques suggèrent que la nicotine exercerait une action excitatrice sur ces afférences [Genzen & McGehee 2003].

Toutefois, une étude réalisée sur des cultures cellulaires de neurones sensoriels primaires de rats adultes suggère que la nicotine pourrait inhiber les neurones à l'origine des fibres afférentes nociceptives. En effet, l'application de nicotine induit une diminution du nombre de potentiels évoqués de neurones de ganglion trigéminal sensibles à la capsaïcine. Ce phénomène passerait par une inhibition des canaux sodium voltage-dépendants [Liu *et al.* 2004].

Sur des tranches de moelle épinière de rats nouveaux-nés et en présence d'antagonistes de la transmission inhibitrice, la nicotine augmente l'amplitude des EPSCs évoqués par stimulation de fibres afférentes [Genzen & McGehee 2003, McGehee *et al.* 1995]. Chez le rat, dans une préparation de nerf isolé, un petit contingent de fibres C sensibles au carbachol est stimulé par l'application de nicotine [Steen & Reeh 1993]. On retrouve cet effet également chez l'humain, dans une préparation de nerf isolé similaire, où la nicotine augmente l'excitabilité de fibres nociceptives amyéliniques [Lang *et al.* 2003]. Cet effet est bloqué par la mécamylamine (MCA) [Lang *et al.* 2003] (voir également pour revue [Umana *et al.* 2013]). Ces données suggèrent donc que les nAChRs portés par des neurones périphériques exercent un effet plutôt pro-nociceptif. La présence de ces nAChRs au niveau périphérique explique

comment la libération d'acétylcholine à la suite d'une lésion périphérique peut activer les nocicepteurs (tel que mentionné au début de cette Introduction). Enfin, la nicotine entraîne également une augmentation de fréquence des mEPSCs chez 59% des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière en tranche [Genzen & McGehee 2003].

3.2.3 Inhibition de la signalisation cholinergique spinale

3.2.3.1 Au niveau comportemental

Effet cholinergique direct

Les antagonistes des récepteurs à l'ACh ont également des effets sur les réponses nociceptives. L'injection de MCA et de DH β E produit chez la souris une hypersensibilité mécanique et thermique [Rashid & Ueda 2002, Rashid *et al.* 2006]. Chez le rat, la DH β E et la methyllycaconitine (ou MLA, inhibiteur spécifique des récepteurs de type $\alpha 7$) diminuent les seuils de retrait de la patte lors de tests de sensibilité mécanique [Young *et al.* 2008a], de même que l' α -conotoxine MIII (antagoniste des nAChRs contenant les sous-unités $\alpha 3$ et de type $\alpha 6\beta 6$) [Young *et al.* 2008b]. En revanche, les seuils de sensibilité thermique ne sont pas modifiés chez le rat injecté avec de la MCA et la DH β E [Rueter *et al.* 2000, Khan *et al.* 1998], ni la MLA [Khan *et al.* 1998]. Par voie i.v., la MCA augmente chez le rat les comportements associés à la douleur⁶ lors d'injection de formaline dans la patte [Hama & Menzaghi 2012].

De même, l'atropine et la scopolamine, antagonistes des mAChRs, diminuent les seuils de sensibilité mécanique, mais pas thermique [Zhuo & Gebhart 1991, Paqueron *et al.* 2003] (voir aussi [section 3.2.1](#)). Par ailleurs, une absence d'effet sur la sensibilité mécanique de l'atropine a été décrite chez la souris [Honda *et al.* 2002]. Cependant, des expériences dans notre laboratoire, menées chez la souris, montrent l'effet pro-allodynique de l'atropine lors de tests de von Frey [Dhanasobhon *et al.*, non-publié]. Dans nos expériences, les concentrations utilisées étaient plus élevées, ce qui pourrait expliquer la disparité observée dans les effets de l'atropine.

L'application d'antagonistes modifie ainsi les seuils nociceptifs. Ces données suggèrent donc l'existence d'un tonus cholinergique sur les récepteurs nicotiniques et muscariniques

6. vocalisation et léchage de la patte

spinaux et contrôlant les réponses nociceptives chez la souris. La source d'ACh responsable de ce tonus demeure néanmoins malconnue.

Interaction acétylcholine/molécules analgésiantes

Les antagonistes muscariniques abolissent une partie des effets analgésiques d'une injection systémique de morphine [Zhuo & Gebhart 1991]. Cet effet inhibiteur est exacerbé lorsque des antagonistes des récepteurs nAChRs (comme la MCA) sont co-administrés avec l'atropine ou la scopolamine. Cela suggère que les effets de la morphine passent en partie par les m- et les n-AChRs, avec une action de ces deux voies de signalisation possiblement additive.

Les effets analgésiques de la morphine sont aussi compromis lorsque les neurones cholinergiques de la corne dorsale de la moelle épinière sont sélectivement détruits. L'administration par voie i.t. de cholino-toxines, telles que l'AF-64A ou l'hémicholinium, réduit significativement l'action analgésique de la morphine injectée de façon systémique [Chen & Pan 2001]. Ces données suggèrent donc que l'ACh présente au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière contribue aux effets analgésiques d'une administration aiguë de morphine.

De même, la clonidine (agoniste des récepteurs adrénergique α_2) injectée par voie i.v. est analgésique, un effet contre-carré par l'administration i.t. d'antagonistes cholinergiques [Hama & Menzaghi 2012, Honda *et al.* 2003]. En revanche, l'analgésie induite par la clonidine est accentuée lorsque les niveaux d'ACh endogène de la moelle épinière sont élevés [Eisenach 2009]. L'action anti-allodynique de la clonidine chez les rats neuropathiques est inhibée lorsque le système cholinergique spinal est court-circuité [Paqueron *et al.* 2001]. Or, une série d'études pharmacologiques a suggéré qu'un blocage pharmacologique de la signalisation cholinergique spinale est sans effet chez des animaux neuropathiques, sur la sensibilité mécanique [Lavand'homme & Eisenach 1999, Paqueron *et al.* 2003, Young *et al.* 2008b, Young *et al.* 2008a] et thermique [Paqueron *et al.* 2003, Rashid & Ueda 2002]. Cependant, des expériences réalisées au sein de notre laboratoire suggèrent qu'à des doses de MCA plus élevées, une accentuation de l'allodynie est effectivement observée chez les rats neuropathiques (Dhanasobhon *et al.*, non-publié).

3.2.3.2 Études électrophysiologiques

L'oxotremorine, antagoniste des mAChRs, diminue la libération de glutamate induite par la stimulation des afférences primaires [Zhang *et al.* 2007]. L'amplitude des EPSCs dans la LIIo n'est cependant pas affectée par l'application d'antagonistes des mAChRs M2 et/ou M4 chez le rat [Zhang *et al.* 2007, Jeong *et al.* 2013].

L'application d'himbacine, un antagoniste des mAChRs de type M2 et M4, sur des tranches de moelle épinière de souris, ne modifie pas la fréquence des sIPSCs de la couche II [Zhang & De Koninck 2006]. En revanche, des antagonistes des nAChRs ont des effets sur les courants synaptiques enregistrés dans les couches superficielles. La MCA (inhibiteur générique des nAChRs) produit une diminution de fréquence des courants miniatures inhibiteurs (mIPSCs) dans une partie des neurones enregistrés (un neurone sur trois) et pour une faible proportion (5%) de neurones, une augmentation de la fréquence [Rashid *et al.* 2006]. La DH β E, antagoniste des nAChRs de type $\alpha 4\beta 2$, reproduit cette diminution de fréquence des IPSCs. La MLA (antagoniste des types $\alpha 7$) n'a diminué la fréquence des IPSCs que pour un neurone sensible à la MCA sur les six enregistrés dans l'étude [Rashid *et al.* 2006]. Cela suggère que les sous-unités $\alpha 7$ sont peu impliquées et que les effets sont surtout dus aux nAChRs de type $\alpha 4\beta 2$.

Tel que mentionné plus haut, l'injection i.t. de siRNA visant la ChAT abaisse les seuils de base nociceptifs, une réduction abolie par l'injection de nicotine [Matsumoto *et al.* 2007]. De plus, nous venons de voir que des antagonistes des nAChRs provoquaient une diminution des fréquences des sIPSCs. Cela suggère qu'un tonus cholinergique, médié par les nAChRs, contrôlerait de façon continue la transmission nociceptive [Rashid & Ueda 2002]. Par ailleurs, les neuropathies d'origine périphérique semblent associées à une diminution de ce tonus [Rashid & Ueda 2002].

3.2.4 Conséquences de la modification des niveaux d'acétylcholine endogène spinale

3.2.4.1 Au niveau comportemental

Augmentation de la concentration locale d'acétylcholine

L'utilisation d'inhibiteurs de l'ACh esterase (AChE, qui dégrade l'ACh) injectés locale-

ment permet d'augmenter les concentrations d'ACh. Parmi ces inhibiteurs, la néostigmine (NSTG), la physostigmine (PSTG) et l'édrophonium (EDP) sont les plus utilisés.

Chez le rat neuropathique, l'injection i.t. ou sous-cutanée (s.c.) d'EDP ou de PSTG produit de l'analgésie dans des tests nociceptifs mécaniques et au froid (par l'acétone) [Hwang *et al.* 1999, Hartvig *et al.* 1989, Pöyhia *et al.* 1999]. De même, l'administration i.t. de NSTG produit également de l'analgésie [Lavand'homme *et al.* 1998, Hwang *et al.* 2000]. Enfin, l'administration *per os* [Clayton *et al.* 2007] ou *per iv* [Kimura *et al.* 2013] du Donepezil⁷ soulage l'hyperalgésie chez les animaux neuropathiques.

Des antagonistes des récepteurs GABA et la toxine pertussique abolissent les effets des inhibiteurs de l'AChE [Pöyhia *et al.* 1999, Kimura *et al.* 2013]. L'administration d'atropine supprime totalement l'analgésie produite par ces inhibiteurs chez les rats mâles et femelles et en partie par la MCA seulement chez les femelles [Lavand'homme & Eisenach 1999].

Chez le rat non-neuropathique, l'administration de NSTG ou d'EDP augmente les seuils de retrait de la patte lors de tests de sensibilité thermique [Naguib & Yaksh 1994]. L'analgésie induite par la NSTG est bloquée par l'atropine et la MCA chez les animaux femelles et par l'atropine seulement chez les mâles [Chiari *et al.* 1999]. Les effets de la NSTG pourraient également faire intervenir les récepteurs GABA_B, comme le suggère l'administration de toxine pertussique qui atténue ces effets analgésiques [Chen & Pan 2003].

Les inhibiteurs de l'AChE soulagent également les phénomènes inflammatoires, induits chez le rat ou la souris par la formaline ou le zymosan⁸ [Yoon *et al.* 2003, Yoon *et al.* 2005]. La NSTG est par ailleurs utilisée en clinique comme analgésie en obstétrique et en post-opératoire (administration par voie périurale [Yang *et al.* 1998, Buerkle *et al.* 1996]; voir aussi pour revue [Eisenach 2009, Habib & Gan 2006]).

L'ensemble de ces données montre donc l'implication du système cholinergique spinal dans le contrôle de la transmission nociceptive à ce niveau.

7. Un médicament dont le principe actif est la NSTG.

8. Un glycanes, présent sur la membrane de levures et champignons, qui induit une inflammation généralisée [Volman *et al.* 2005].

Inhibition du système cholinergique spinal

Au contraire, l'inhibition du système cholinergique au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière induit des phénomènes pro-nociceptifs. Par exemple, chez la souris, un traitement i.t. de siRNA diminue les seuils de bases et de retrait de la patte lors de tests nociceptifs thermiques et mécaniques⁹ lorsqu'il cible la choline acétyl transférase (ChAT) [Matsumoto *et al.* 2007] ou la sous-unité $\alpha 4$ des nAChRs [Rashid *et al.* 2006]. L'abolissement de l'expression des nAChRs contenant la sous-unité $\alpha 5$ diminue l'allodynie mécanique dans un modèle de rats neuropathiques [Vincler & Eisenach 2005].

Des souris KO pour la sous-unité $\beta 2$ présentent une hypersensibilité mécanique [Yalcin *et al.* 2011]. En condition neuropathique, ces animaux ont une allodynie exacerbée par rapport à celle observée chez des souris sauvages. Ces souris sont également plus sensibles à des stimuli mécaniques et thermiques après injection de capsaïcine ou en conditions inflammatoires, par rapport à des souris de type sauvage [Yalcin *et al.* 2011].

Une modification des niveaux d'ACh endogène spinale se traduit par des changements des seuils nociceptifs. Ceci suggère donc l'existence d'un tonus cholinergique contrôlant ces seuils nociceptifs en condition basale.

3.2.4.2 Études électrophysiologiques

Quelques études sur les effets d'inhibiteurs de l'AChE ont été menées *in vitro*. Chez le rat jeune (P7 à P14), la methamidophos, couplée à l'atropine, ainsi que la NSTG (10 μM), induisent une augmentation de la fréquence des EPSCs dans la plupart des neurones enregistrés dans les couches superficielles de la moelle épinière, un effet renversé par la MLA [Genzen & McGehee 2003]. Dans 25% des neurones du noyau trigéminal de rat (P11 à P16), la PSTG (50 μM) réduit légèrement l'amplitude des EPSCs évoqués par la stimulation des afférences primaires [Jeong *et al.* 2013].

La NSTG (10 μM) induit chez le rat adulte une augmentation de la fréquences des IPSCs spontanés de type GABAergiques, mais pas des miniatures, un effet contre-balancé par l'atropine [Baba *et al.* 1998]. Ce phénomène est également observé avec la même concentration de NSTG dans la couche II de moelle épinière de souris adulte et l'effet est aboli par

9. Ces seuils sont restaurés par injection de nicotine.

des antagonistes des nAChRs (MCA et DH β E, suggérant l'implication des sous-type $\alpha 4\beta 2$ [Rashid *et al.* 2006]).

Ainsi, l'augmentation de la fréquence des courants inhibiteurs spontanés et la diminution des courants excitateurs au sein de la corne dorsale de la moelle épinière semblent être à l'origine de l'action analgésique de ces substances décrite précédemment dans les études *in vivo* et suggère également l'existence du tonus cholinergique au niveau des couches superficielles de la moelle épinière.

3.2.4.3 Stimulations entraînant la libération d'acétylcholine au niveau spinal

Les techniques de microdialyse *in vivo* dans la corne dorsale de la moelle épinière de rat ont permis d'étudier la libération endogène d'ACh. Ainsi, une augmentation de l'ACh spinale est mesurée suite à l'application d'agonistes des nAChRs (épibatidine) et des mAChRs (oxotremorine) [Höglund *et al.* 2000, Abelson & Höglund 2002]. Une augmentation de la concentration d'ACh dans le complexe trigéminal est également observée suite à la perfusion à ce niveau d'agonistes des mAChRs [Zhu *et al.* 2008]. Le Donepezil (avec la NSTG pour principe actif) produit une diminution de la sensibilité mécanique, associée à une augmentation des concentrations d'ACh spinale. Cette augmentation n'a été observée que chez des animaux neuropathiques et pas dans le groupe contrôle [Kimura *et al.* 2013]. Cela suggère que la libération d'ACh peut elle-même être contrôlée par une innervation cholinergique.

D'autre part, des antagonistes des récepteurs GABA_A (bicuculline), ou GABA_B (saclophen) induisent une libération d'ACh au niveau spinal [Kommalage & Höglund 2005a] et au niveau du complexe trigéminal. Une perfusion de morphine reproduit les mêmes effets [Zhu *et al.* 2008].

Des agonistes noradrénergiques, telles que la clonidine et la dexmedetomidine, administrés par voie i.t., induisent aussi une libération d'ACh au niveau spinal chez le rat [De Kock & Meert 1997, Abelson & Höglund 2004, Kimura *et al.* 2012] et chez l'homme [Detweiler *et al.* 1993, De Kock *et al.* 1997]. Enfin, des antagonistes des récepteurs de la sérotonine peuvent également produire une augmentation d'ACh au niveau spinal [Kommalage & Höglund 2005b].

L'ensemble des données obtenues par inhibition du système cholinergique endogène spinal

suggèrent donc que l'ACh module de façon tonique la transmission nociceptive en condition physiologique. Ce tonus contrôle les seuils nociceptifs et implique la mise en jeu des récepteurs nicotiniques et muscariniques. L'action exercée par le système cholinergique spinal est principalement de nature analgésique.

3.2.5 Participation du système cholinergique aux effets aigus de la morphine

Des phénomènes de tolérance-croisée entre les système opioïdérique et cholinergique ont été montrés chez la souris [Zarrindast *et al.* 1999]. Par exemple, l'injection par voie i.v. de naloxone¹⁰ n'a aucun effet sur l'analgésie induite par la nicotine chez le rat, mais la diminue chez la souris [Tripathi *et al.* 1982, Aceto *et al.* 1993]. Les effets aigus de la morphine font également intervenir le système cholinergique spinal.

Chez le rat, l'administration par voie i.v. de morphine entraîne une augmentation de libération de l'ACh (et de NO) au niveau spinal [Xu *et al.* 2007] et dans les noyaux trigéminaux [Zhu *et al.* 2008]. Cette augmentation des niveaux d'ACh, couplée à celle de noradrénaline (NA) est également décrite chez le mouton [Bouaziz *et al.* 1996].

L'injection i.t. d'antagoniste des récepteurs nicotiniques (mécamylamine) et muscarinique (atropine) ou de cholino-toxines (AF64-A et hémicholinium-3) réduit les effets analgésiques de la morphine administrée par voie i.v. lors de tests d'hypersensibilité mécanique [Chen & Pan 2001].

Ainsi, l'injection de morphine i.v. produit une libération d'ACh au niveau de la moelle épinière. De plus, l'analgésie induite par la morphine est diminuée lorsque la signalisation cholinergique à ce même niveau est perturbée. Cela suggère que l'ACh médie en partie au moins les effets aigus de la morphine et que l'analgésie induite par la morphine et la nicotine pourrait possiblement emprunter la (ou les) même(s) voie(s) d'action.

3.2.6 Aspects morphologiques et neurochimiques

Les paragraphes précédents rendent compte d'une modulation de la transmission nociceptive par un système cholinergique présent dans la moelle épinière. Alors que ces effets sont

10. Un antagoniste des récepteurs opioïdériques.

assez bien décrits, l'origine de l'ACh endogène à ce niveau demeure non élucidée.

Sur un plan morphologique, un plexus dense de fibres cholinergiques a été décrit chez le rat [Barber *et al.* 1984, Olave *et al.* 2002] et plus récemment, il a été caractérisé chez le singe [Pawlowski *et al.* 2013]. Ce plexus est localisé dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (LII-III), où les afférences primaires véhiculant des informations nociceptives projettent [Todd 2010].

Le plexus cholinergique se compose à la fois de dendrites, contactés par les terminaisons centrales des afférences primaires et de boutons cholinergiques formant des contacts axo-axoniques avec les afférences primaires [Ribeiro-da-Silva & Cuello 1990]. La relation réciproque entre les afférences primaires et les fibres du plexus cholinergiques suggère un contrôle cholinergique, *via* les boutons cholinergiques, des informations reçues au niveau spinal. Ce plexus de fibres est le substrat très probable de l'analgésie cholinergique décrite précédemment. L'origine du plexus de fibres reste mal connue, mais l'existence de dendrites en son sein suggère qu'une partie au moins est alimentée par des interneurons locaux.

Des corps cellulaires immuno-réactifs pour la ChAT sont localisés dans les couches III/IV [Barber *et al.* 1984, Todd 1991]. Ils sont suspectés de participer à la formation, au moins en partie, du plexus de fibres cholinergiques de la corne dorsale de la moelle épinière [Ribeiro-da-Silva & Cuello 1990]. Chez le rat, ces interneurons ont été décrits comme une sous-population des neurones GABAergiques. Ils expriment également la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH)-diaphorase, cofacteur essentiel à l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote [Laing *et al.* 1994, Todd 1991].

Objectifs de la thèse

La transmission nociceptive au sein de la corne dorsale de la moelle épinière est soumise à un contrôle extrêmement fin et précis. Au niveau spinal, l'ACh endogène est un modulateur important de la nociception tel que le montrent les données de la littérature. La source de cette ACh et son mode d'action dans le contrôle de la nociception demeurent mal connus. Sur un plan morphologique, un plexus de fibres cholinergiques, situé dans les couches superficielles de la moelle épinière, est considéré comme le substrat probable de l'analgésie cholinergique décrite dans la littérature. La localisation des corps cellulaires dont sont issues les fibres formant ce plexus reste cependant à être déterminée.

Par ailleurs, la morphine exerce une action analgésique puissante, qui implique en partie le système cholinergique de la corne dorsale de la moelle épinière. En usage chronique, la morphine produit des phénomènes de tolérance, de dépendance et de douleur.

Dans ce contexte, les objectifs principaux de ce projet de thèse ont été 1) la caractérisation morphologique, anatomique et fonctionnelle des interneurons cholinergiques de la corne dorsale de la moelle épinière, que nous pensons être les parfaits candidats responsables de la formation du plexus de fibres et donc possiblement de l'analgésie cholinergique; et 2) l'étude des effets d'un traitement chronique par un agoniste cholinergique, afin de déterminer si le système cholinergique spinal et opioïdérique partagent tout ou partie de leurs mécanismes d'action et donc, de déchiffrer le mode d'action général de l'ACh spinale.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre d'une co-tutelle entre l'Université de Strasbourg et l'Université Laval de Québec.

Matériels et méthodes

Chapitre 4

Préambule

Une partie de ces travaux a fait l'objet d'une publication dans le *Journal of comparative neurology*. Le lecteur trouvera le détail des méthodes neuro-anatomiques et électrophysiologiques employées pour la caractérisation des interneurons cholinergiques de la corne dorsale de la moelle épinière dans l'article (voir [section 5.2](#)).

Les matériels et les méthodes concernant les travaux non-publiés sont détaillés ci-dessous.

4.1 Animaux

Afin d'étudier spécifiquement les interneurons cholinergiques de la corne dorsale de la moelle épinière, nous avons tiré profit de souris transgéniques exprimant la *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) en aval du promoteur de l'enzyme synthétisant l'acétylcholine (ACh), la Choline Acetyl Transferase (ChAT). Les souris transgéniques ChAT::eGFP ont été produites dans le laboratoire du Dr Monyer selon la procédure suivante [[von Engelhardt et al. 2007](#)] : la séquence codant la eGFP, suivie d'un signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine, a été transfectée *via* un vecteur de clonage bactérien (*Bacterial Artificial Chromosome*, ou BAC) dans la région promotrice du gène codant la ChAT (exon 4).

Nous avons utilisé des souris adultes mâles, croisées avec des souris de fond CD1 sur 6 à 9 générations. Les mâles d'élevage et les souris utilisées dans les expériences sont hétérozygotes pour le transgène. Ces animaux sont nés et élevés dans l'animalerie des deux laboratoires, nourris *ad libitum* et soumis à un cycle jour/nuit de 12h. Les femelles utilisées pour l'élevage

sont de type sauvage CD1 (Charles River, France). Le signal eGFP est très visible au niveau des muscles sphinctériens de la face des souris (notamment ceux entourant les paupières, ainsi que ceux à la base des vibrisses) car ils sont localisés dans des zones où la peau est plus fine et les poils moins abondants. Les souris ont ainsi été phénotypées à l'aide d'un microscope à épifluorescence ou d'une lampe (émettant une lumière de longueur d'onde $\lambda=488\text{nm}$) et d'une paire de lunettes (permettant la visualisation du signal eGFP) pendant la deuxième semaine post-natale, en observant le signal eGFP autour des yeux et à la base des vibrisses.

Des rats de souche Sprague-Dawley et âgés de 3 mois (Charles River, Canada) ont été utilisés pour l'étude des effets de l'injection chronique de nicotine. Ces animaux ont également été nourris *ad libitum* et soumis à un cycle jour/nuit de 12h.

4.2 Injection stéréotaxique de la sous-unité B de la toxine cholérique dans la moelle épinière de souris transgénique

Afin d'évaluer la longueur de l'axone des cellules eGFP-positives, la sous-unité B de la toxine cholérique (CTb), couplée à un fluorophore rouge (Alexa 555) a été injectée *in vivo* chez des souris transgéniques ChAT::eGFP adultes.

La CTb est utilisée comme marqueur rétrograde de neurones. La stratégie a été de rechercher les corps cellulaires des neurones présentant à la fois un marquage eGFP-positif (donc, cholinergiques) et Alexa 555 rouge. N'étant pas trans-synaptique, la CTb ne va ainsi marquer que le neurone l'ayant captée au niveau des terminaisons de l'axone et des dendrites, en s'accumulant au niveau du corps cellulaire avec le temps. Cela assure donc que 1) si un tel neurone présente le double-marquage, c'est effectivement celui-ci qui a capté la CTb et 2) que le marquage n'est pas issu de la migration à partir d'un autre neurone contactant une cellule eGFP-positive. Les mesures de distances ayant été réalisées à partir du centre du site d'injection vers les neurones doublement marqués, cette propriété de la CTb évite ainsi une sur-estimation des mesures.

Le protocole expérimental des expériences d'injection de CTb est décrit dans les paragraphes suivants.

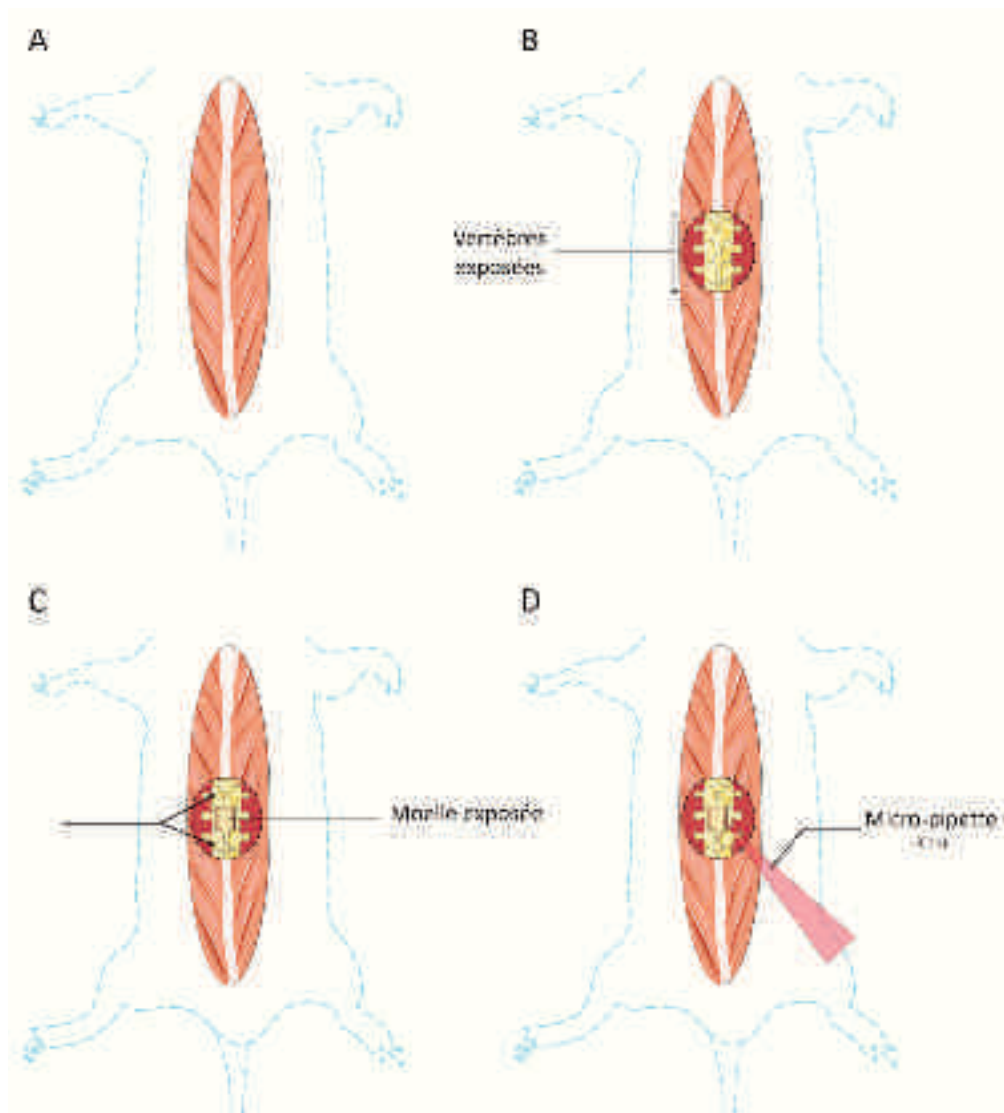


FIGURE 4.1: Schéma représentant les principales étapes de la laminectomie permettant l'injection de la CTb dans la moelle épinière de souris ChAT::eGFP. (A) La peau de l'animal anesthésié est dégagée, dévoilant les muscles du dos. Une section des deux bords des épines dorsales, où s'insèrent les muscles dorsaux, est effectuée à l'aide d'un scalpel afin de délimiter les vertèbres d'intérêt et de dégager les muscles. **(B)** Une fois les muscles retirés, trois vertèbres, correspondant au niveau des lombaires L4 à L6, sont exposées. Les épines latérales sont ensuite enlevées, puis, à l'aide d'une paire de ciseaux et d'une pince gouge, **(C)** la partie dorsale de la vertèbre d'intérêt (au milieu sur le schéma) est délicatement retirée. La précédente vertèbre (rostrale) ainsi que la caudale, également libérées des muscles, vont servir de support pour les pinces à vertèbres (deux flèches à gauche) et permettre le maintien de l'animal, lorsque celui-ci sera finalement placé dans le cadre stéréotaxique. **(D)** Une fois en place, de l'ACSF est appliqué sur la moelle, puis, une micropipette contenant la CTb est centrée. La micropipette est positionnée 150 à 200 μm vers la droite, puis appliquée à la surface de la moelle épinière. La micropipette sera ensuite descendue puis l'injection réalisée.

4.2.1 Chirurgie

L'animal est anesthésié par isoflurane 1 à 2%. L'animal endormi est ensuite placé sur le ventre et sa température est maintenue constante grâce à un tapis chauffant. À l'aide d'un scalpel, la peau est incisée et écartée sur 2 cm. Au niveau de la courbure lombaire, les muscles sont soigneusement dégagés. La vertèbre au sommet de cette courbure correspond au segment lombaire 4-5 (L4-L5) spinal. Cette vertèbre, ainsi que la précédente (rostrale) et la suivante (caudale) sont repérées et les épines latérales de ces vertèbres sont enlevées à l'aide d'une pince gouge. Une paire de ciseaux à angle droit est soigneusement insérée dans l'orifice laissé au niveau de l'épine latérale d'un côté de la vertèbre centrale, puis la vertèbre est découpée sur un bord, pour faciliter son extraction à l'aide de la pince gouge sans dommage pour la moelle.

L'animal laminectomisé est ensuite fixé dans le cadre stéréotaxique pour moelle épinière à l'aide de pinces à vertèbres, chacune maintenant une des vertèbres rostrale ou caudale, par rapport à celle extraite. Une solution d'ACSF [(en mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ et 10 glucose] est appliquée sur la moelle ainsi exposée de l'animal.

4.2.2 Injection de la CTb

Une pipette de borosilicate a été étirée et remplie par de l'huile minérale. Une fois placée sur le dispositif d'injection, la pointe celle-ci a été remplie par aspiration avec une solution contenant la CTb (0,5 mg.mL⁻¹) diluée dans du PBS (0,1mM). La pipette a ensuite été approchée de la surface de la moelle, au niveau du canal central, à l'aide d'un micro-manipulateur (Stoelting Co., USA) et d'un suivi sous une loupe binoculaire.

Le site d'injection a été défini par les coordonnées dans l'espace y (écart latéral de 150-200 μ m par rapport au vaisseau central) et z (180-250 μ m en profondeur), à l'aide du micro-manipulateur. La zone qui a été ciblée est la *lamina* II, où se trouve un plexus de fibres cholinergiques, supposées provenir des interneurons cholinergiques de notre étude. Une fois la pipette placée au dessus de la zone d'intérêt, elle est descendue dans la moelle.

Dans un premier temps, la dure-mère est percée par une première descente de 50 μ m. La pipette est ensuite remontée à sa position initiale et redescendue à la profondeur de

150-200 μm , au niveau de la lamina II de la corne dorsale. L'injection est alors déclenchée.

La CTb est injectée à une vitesse constante de 60 nL.s⁻¹ pendant 10 minutes à l'aide d'un contrôleur comprenant un système de micro-seringue reliée à une pompe (World Precision Instrument, USA). Cette injection se fait dans un tissu solide, *i.e.* la moelle épinière, qui peut développer une pression s'opposant à la force d'injection. Une partie du faible volume injecté (35nL au total) peut ainsi rester dans la pipette. Afin d'éviter cet éventuel liquide résiduel dans la pipette, celle-ci est maintenue en place pendant 2 minutes à la fin du temps d'injection, avant d'être retirée.

L'animal, toujours endormi, est libéré des pinces et sorti du cadre stéréotaxique. Il est rapidement placé dans un autre masque pour anesthésie, où il y est maintenu pendant l'étape de sutures. Ces sutures sont réalisées entre les muscles latéraux d'un même bord, de chaque côté des vertèbres (voir [figure 4.1](#)), ce qui a pour résultat un rapprochement des muscles et un recouvrement de la moelle exposée. Ce recouvrement est ensuite solidifié par des sutures entre les muscles latéraux opposés de part et d'autre des vertèbres. La peau est agrafée, puis, l'animal encore endormi est remis dans sa cage. De la buprénorphine (0,5 mg.kg⁻¹ ; 0,3mL) est administrée pendant quatre jours, puis l'animal est placé sous observation jusqu'au sacrifice, 7 à 13 jours après l'injection.

Le principal critère utilisé pour maintenir les animaux dans l'expérience a été l'absence de troubles moteurs à la suite de l'opération et ce, pour le bien-être de l'animal. De plus, un trouble moteur aurait été synonyme d'une injection trop profonde ou d'une éventuelle lésion spinale provoquée par la chirurgie.

Enfin, après sacrifice, les moelles épinières présentant un site d'injection localisé trop ventralement ont été écartées de l'analyse.

4.2.3 Dissection de la moelle

Les souris sont sacrifiées par anesthésie à la kétamine (Imalgène) 50mg.ml⁻¹ (0.15mL en i.p) et perfusées *via* le ventricule gauche avec du tampon phosphate (PB) [(en mM) 80 Na₂HPO₄, 19 NaH₂PO₄, pH 7.4, pour une concentration d'utilisation finale de 0.1M] pendant 2 minutes, puis avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% diluée dans du PB 0.1M pendant 10 minutes pour la fixation des tissus. Les moelles épinières sont récupérées par

extrusion hydraulique.

Pour ce faire, l'animal est placé sur le ventre et la peau est dégagée à l'aide d'une paire de ciseaux. Une portion du dos est isolée par section au niveau caudal et rostral, perpendiculairement à l'axe antéro-postérieur de l'animal (Voir [figure 4.2.A](#)), dévoilant ainsi le canal rachidien. Une seringue de 10 mL contenant une solution de PFA 4%/ sucrose 30%/tampon salin phosphaté (PBS) [(en mM) 154 NaCl, 13 Na₂HPO₄, 2.5 NaH₂PO₄] à 4°C, sur l'extrémité de laquelle a été préalablement équipé un cône de pipetteman de 200 µL sectionné pour une ouverture de 1.5 mm à la pointe, est insérée dans le canal rachidien (Voir [figure 4.2.B](#)). L'injection de la solution permet l'extrusion hydraulique de la moelle épinière, depuis la colonne vertébrale vers une boîte de Pétri contenant cette même solution et gardée sur de la glace. Un biseau du côté sacrale de la moelle ainsi extrudée est réalisé pour conserver l'orientation de la tranche (Voir [figure 4.2.C](#)).

Les moelles ont été ensuite immergées dans une solution de PFA 4%/ sucrose 30%/PBS à 4°C pour l'étape de post-fixation et cryoprotection d'une durée de 10-12h, puis ont été tranchées en section parasagittale de 50 µm à l'aide d'un microtome à congélation (Leica microsystems, Germany) et montées entre lame et lamelle pour l'observation au microscope.

4.2.4 Observation du rétro-marquage des cellules

Dans une tranche, les corps cellulaires présentant à la fois un marquage eGFP et Alexa 555 ont été recherchés du niveau thoracique au niveau sacré de la moelle et des images ont ensuite été réalisées à l'aide d'un microscope confocal (Zeiss, LSM 510). La longueur des axones a été déterminée par la mesure de la distance entre le site d'injection et les corps cellulaires présentant à la fois le signal eGFP et le marquage CTb, visualisé par l'Alexa 555 (voir [figure 4.3](#)).

À partir des images, l'utilisation de l'outil "Ligne droite" du logiciel ImageJ (1.40e; W. Rasband, NIH) permet de mesurer le nombre de pixels d'une ligne établie entre le centre du site d'injection et le centre du somas eGFP+/CTb+. Ces mesures en pixels sont ensuite converties en distance grâce à une calibration préalable de l'outil par équivalence (x pixels = y µm).

La taille du site dans l'axe dorso-ventral et rostro-caudal a été mesurée. La distance des cellules par rapport au centre d'injection ainsi que la profondeur des cellules eGFP+/CTb+

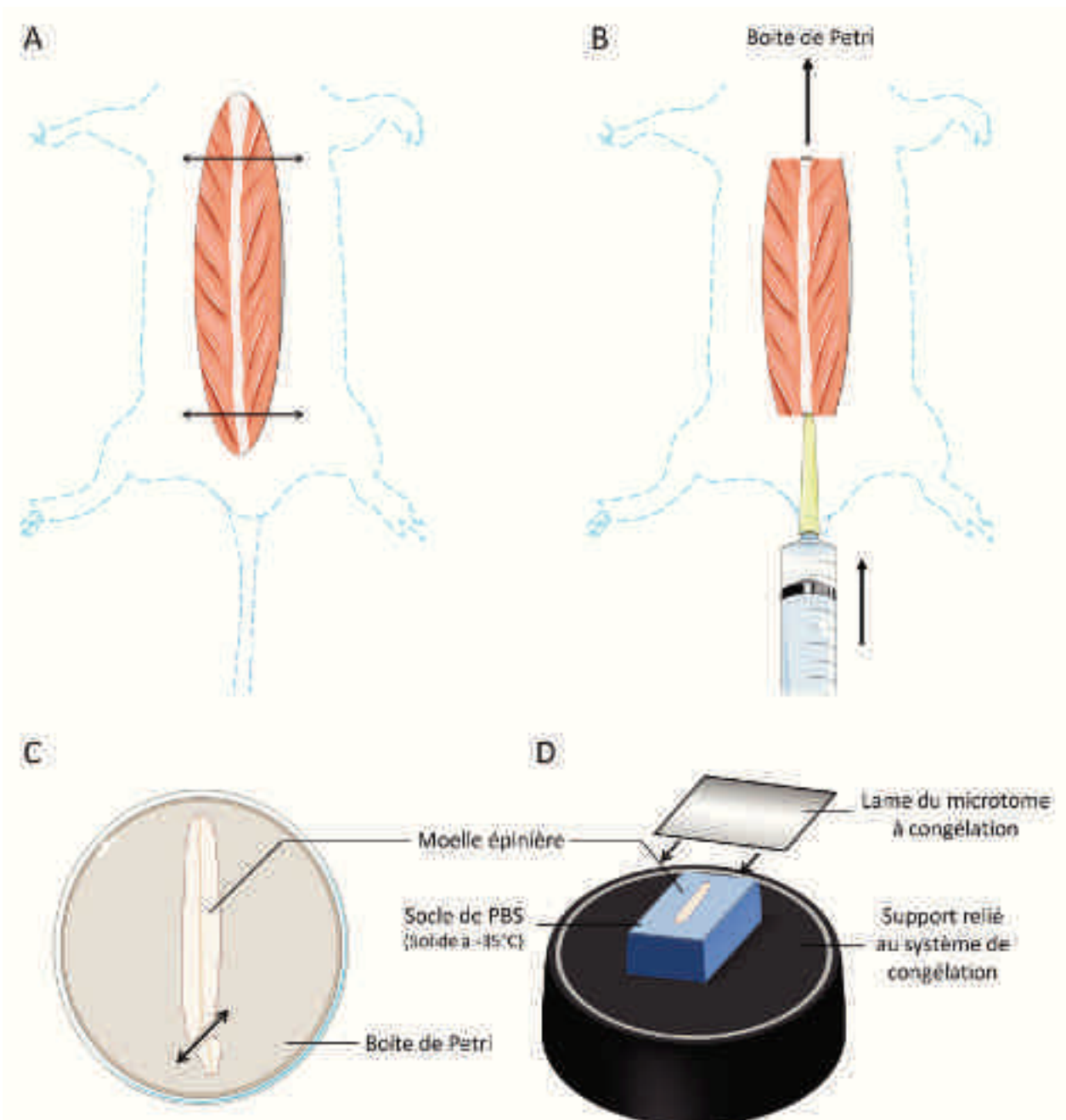


FIGURE 4.2: Schéma représentant les principales étapes de l'extraction de la moelle épinière de souris ChAT:eGFP. (A) Une fois la peau dégagée, deux incisions sont effectuées (représentées par les doubles-flèches) à l'aide d'une paire de ciseaux. Le canal rachidien devient ainsi visible et (B) une seringue y est insérée. La pression appliquée fait sortir la solution de PFA 4%/PBS ainsi que la moelle. Celle-ci est rapidement transférée (C) dans une boîte de Pétri déposée sur glace et contenant du PFA 4%/PBS. La double-flèche indique la section effectuée au niveau caudal de la moelle pour conserver l'orientation de la tranche. (D) Après l'étape de cryprotection (avec une solution de PFA 4%/ sucrose 30%/PBS pendant 10-12H à -80°C), du PBS est appliqué sur le support du microtome relié à un système de refroidissement (réglé à -35°C) afin de créer un socle solide pour la section des tranches de moelle épinière. La moelle épinière est ensuite déposée sur le socle et recouverte de PBS. Après congélation, des tranches parasagittales 50 μ m sont réalisées et montées entre lame et lamelle pour l'observation du rétro-marquage des cellules eGFP par la CTb.

ont également été évaluées de cette façon. Les données ont ensuite été consignées dans un tableau.

4.3 Injection chronique de nicotine chez le rat

4.3.1 Injection de nicotine et test de sensibilité mécanique

De la nicotine (1mg.kg^{-1} , Sigma, N5260) a été injectée dans la cavité intra-péritonéale (i.p.) des rats 2 fois par jour, à intervalle de 8 à 10h, pendant 10 jours. Les tests de sensibilité mécanique ont été réalisés à l'aide de douze filaments de von Frey calibrés. Les rats ont été placés chacun dans une enceinte en plexiglas surélevée, reposant sur une grille de métal. Les filaments ont été appliqués cinq fois de façon successive et par ordre de force croissant (de 0,04 à 60g) à la surface plantaire de la patte postérieure des animaux. Le seuil de retrait de la patte (en grammes) a été déterminé comme la valeur la plus petite de filaments pour laquelle l'animal a retiré sa patte, au moins trois fois sur les cinq applications réalisées. Lorsqu'un filament supérieur on observe également au moins trois réponses sur cinq, le seuil de retrait a été considéré comme correspondant au grammage du filament précédent.

Afin de déterminer une valeur de seuil basal pour chacun des animaux, ils ont été testés pendant les trois jours précédant la première injection de nicotine (à J-3, J-2, J-1). À partir du jour de l'injection (J0), les rats ont été testés tous les deux jours pendant 6 jours (à J0, J2, J4 et J6) pour évaluer l'établissement d'un changement dans les seuils. Finalement, les tests ont été réalisés tous les jours pendant 4 jours (à J7, J8, J9 et J10) pour tester la robustesse du changement dans les seuils. Suite à l'injection ou l'application d'une substance, une augmentation des seuils par rapport à la valeur basale traduit une action analgésique de la substance considérée. Au contraire, une réduction de la valeur du seuil est interprétée comme la mise en place d'une hyperalgésie, ou d'une allodynie, mécanique. Les tests ont été réalisés le matin, avant la première injection journalière de nicotine.

Les animaux du groupe contrôle ont été injectés avec l'excipient (saline) et ont été testés selon le même protocole, en aveugle (voir [figure 4.4](#)).

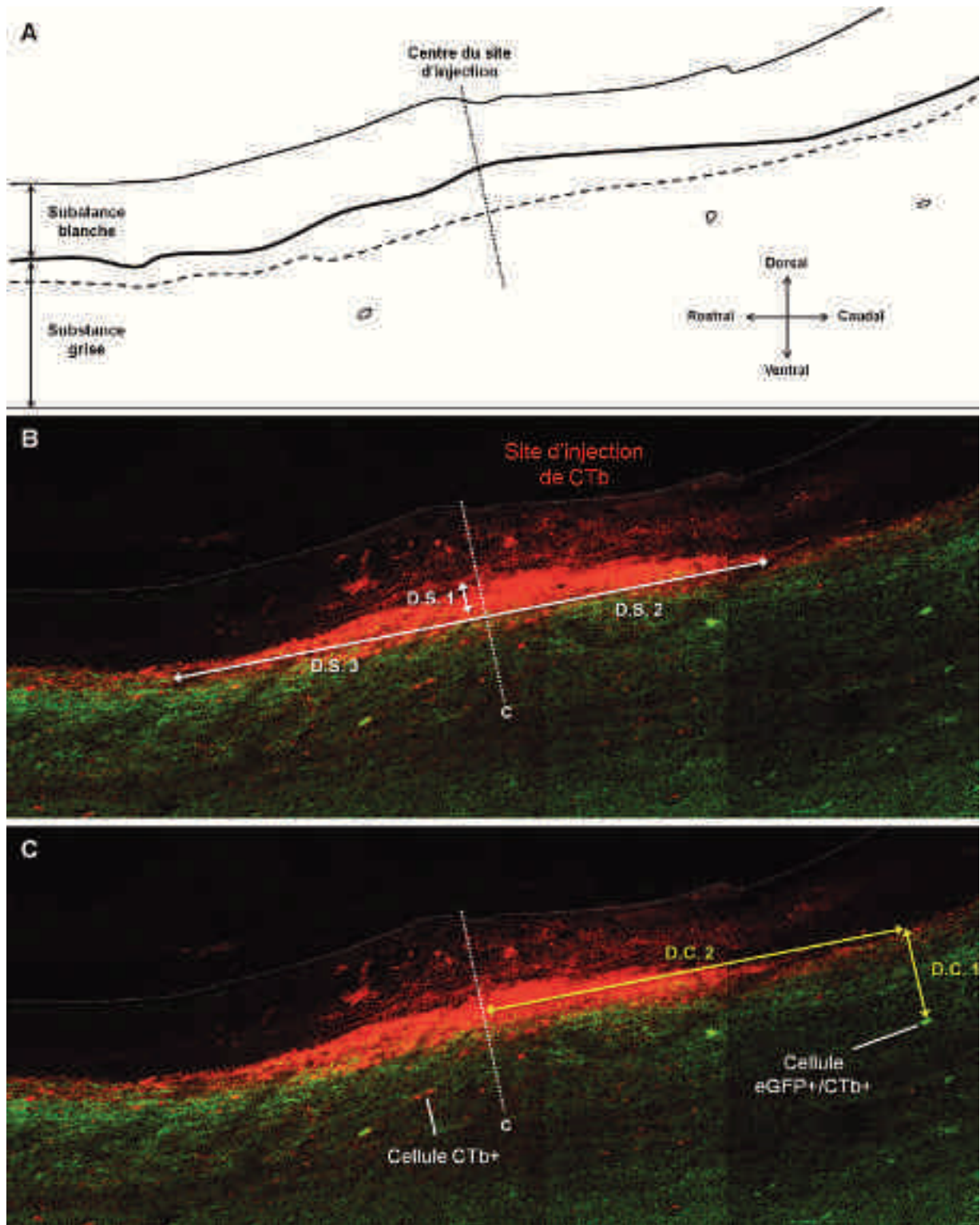


FIGURE 4.3: Évaluation de la taille du site d'injection de la CTb et des distances des corps cellulaires ChAT:eGFP/CTb+. **A** Les mesures ont été effectuées sur des tranches parasagittales depuis le centre du site d'injection (côté rostral à gauche, et côté dorsal en haut de l'image). Les deux traits pleins délimitent la substance blanche. **B** La taille du site est d'abord évaluée, selon l'axe dorso-ventral, depuis la limite ventrale du site vers celle de la substance grise. L'expansion rostro-caudale du site est également mesurée. **C** Des cellules eGFP+/CTb+ peuvent être localisées dans la partie rostrale et caudale par rapport au centre du site d'injection. Leur profondeur par rapport à la substance grise de la moelle épinière est également mesurée. (C : Centre du site; D.S.1: Distance du centre du site vers son extrémité rostrale; D.S.2 : Distance du centre du site vers son extrémité caudale; D.S.3 : Taille du site en orientation dorso-ventrale; D.C.1 : Distance de la cellule au bord de la substance grise; D.C.2 : Distance de la cellule au centre du site.)

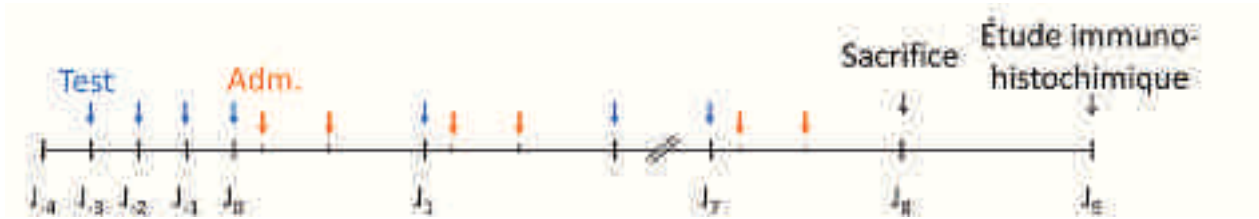


FIGURE 4.4: **Protocole d'injection chronique pour la nicotine et tests nociceptifs.** De J_{-4} à J_0 , les seuils de base ont été établis. A partir de J_0 , un test nociceptif est réalisé une heure avant la première injection du jour. La seconde administration est faite 12 heures après. Ce protocole est répété jusqu'à J_7 inclus. A J_8 , les animaux sont sacrifiés, perfusés puis une étude immuno-histochimique est réalisée sur des sections de moelle épinière. Le protocole est pratiqué sur deux groupes d'animaux, un groupe recevant des injections de nicotine, l'autre des injections de solution saline. **Test** : test nociceptif avec filaments de von Frey. **Adm.** : administration de nicotine (1mg.kg^{-1}) ou de solution saline (0,9%).

4.3.2 Perfusion

Au matin de la dernière injection (*i.e.* à J_{11}), les animaux sont anesthésiés par injection intra-péritonéale (i.p.) de kétamine ($0,4\text{mL}$ à $100\text{mg.ml}^{-1}\text{R}$, Imalgene). Lorsque l'animal est endormi, celui-ci est placé sur le dos et une ouverture est réalisée à l'aide d'une paire de ciseau au centre de l'abdomen et la peau de la partie antérieure dégagée. À l'aide d'une pince, le sternum de l'animal est maintenu et le diaphragme est ôté.

4.3.3 Extrusion de la moelle

La peau de l'animal est dégagée à l'aide d'une paire de ciseaux. Une portion du dos est isolée par deux sections de la colonne vertébrale au niveau caudal et rostral, perpendiculairement à l'axe antéro-postérieur de l'animal, dévoilant ainsi le canal rachidien. Une aiguille de calibre 1,6mm montée sur une seringue de 50 mL contenant une solution de PB 0,1 mM est insérée dans le canal rachidien. L'injection de la solution permet l'extrusion hydraulique de la moelle épinière (Voir [figure 4.2.B](#)).

La moelle épinière ainsi récupérée est placée dans un tube Falcon de 15 mL contenant une solution de sucrose à 30% diluée avec une solution de PFA4%/PB 0,1 mM. Après cette étape de cryoprotection et de post-fixation, les moelles sont conservées à l'abri de la lumière à -4°C en l'attente de l'étude histologique.

Antigène	Espèces et clonalité	Immunogène	Identification	Dilution	Source
Choline acetyltransferase (ChAT)	Chèvre polyclonal	ChAT placentaire humaine	Population cholinergique	1/500	Chemicon Millipore, AB 144P
Protein kinase C isoform γ (PKC γ)	Lapin polyclonal	Résidues 679–97 (DFVHP-DARSPTSPVPVPVM) de la PKC γ de souris	Marqueur de la lamina II spinale	1/1,000	Santa Cruz Tebu, SC211
Gamma aminobutyric acid (GABA)	Lapin polyclonal	GABA conjugué au <i>bovine serum albumin</i> (GABA-BSA)	Population neuronale GABAergique	1/500	Sigma, A 2052
Neuronal nitric oxide synthase (bNOS)	Souris monoclonal	Résidues 1–181 de la <i>nitric oxide synthase</i> du cerveau chez le rat	Population neuronale sécrétant le monoxyde d'azote (NO)	1/500	Sigma, N2280
Green fluorescent protein (GFP)	Lapin polyclonal	Protéine entière recombinante de <i>Aequorea victoria</i> (rGFP)	Population de cellules fluorescentes	1/1,000	Ozyme, 632460
Neurofilament 200 (NF200)	Mouse monoclonal	Portion C-terminale de la sous-unité H dephosphorylée de neurofilament de cochon	Fibres afférentes myélinisées	1/1,000	Sigma, N0142
Calcitonin gene-related peptide (CGRP)	Chèvre polyclonal	α -CGRP conjugué au BSA chez le rat	Fibres afférentes peptidergiques	1/1,000	Enzo Life Sciences, CA 1137-0025
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Lapin polyclonal	GFAP isolée de la moelle épinière de vache	Cellules astrocytaires	1/2,000	Dako, Z0334
Ionized calcium binding adapter molecule (Iba1)	Lapin polyclonal	Séquence carboxy-terminale de Iba1, conservée chez l'humain, le rat et la souris	Cellules microgliales	1/1,000	Wako, 019-19741
Potassium-chloride cotransporter member 2 (KCC2)	Lapin polyclonal	Partie N-terminale d'une protéine de fusion His-tag correspondant aux résidus 932-1043 de la protéine KCC2 chez le rat	Co-transporteur potassium / chlorure	1/500	Upstate, 07-432

TABLE 4.1: Liste et spécificités des anticorps primaires utilisés

4.4 Coupes de moelle épinière de rat

Des sections parasagittales (50 μm) de moelle épinière lombaire de rat ont été réalisées en utilisant un microtome à congélation (Leica microsystems) et placées dans une plaque 24 puits contenant une solution antigél [(en mM) 5 NaH_2PO_4 , 19 Na_2HPO_4 , 30% éthylène glycol et 20% glycérol, pH=7.3], puis conservées à -20°C .

4.5 Immuno-détection

Le protocole utilisé chez le rat est similaire à celui utilisé chez la souris et décrit dans l'article (voir [section 5.2](#)).

La détection des noyaux cellulaires a été réalisée par un marquage au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 1:3 000, Dako, D1306), pendant l'étape d'incubation des anticorps secondaires (2h à température ambiante), suivi de trois rinçages au PBS.

Le triple-marquage, réalisé par l'identification des cellules astrocytaires, GFAP-positives (pour *glial fibrillary acidic protein*), associé au marquage IB4 (Isolectine B4, voir [section 1.2.1.2](#)), et DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), a été effectué chez le rat. Le marquage IB4 confiné à la LII de la moelle épinière et le marquage DAPI permet de distinguer la taille et la densité des cellules. Ces deux marqueurs servent ainsi à séparer les différentes laminae. De même un second triple-marquage, IB4 et DAPI, avec identification des cellules microgliales (Iba1) a été réalisé. Nous avons ainsi pu étudier l'impact d'un traitement chronique de nicotine chez le rat sur les cellules astrocytaires et microgliales.

Dans le cadre de cette étude d'injection chronique de nicotine chez le rat, un dernier triple-marquage a été réalisé. Toujours couplée à celle de l'IB4 et du DAPI, la détection du *Potassium-chloride cotransporter member 2* (KCC2) nous a permis de déterminer un changement d'expression de cette protéine.

4.6 Acquisition et analyse des images

Après immuno-marquage, les coupes de moelles de rats ont été montées entre lame et lamelle, puis, des images ont été prises à l'aide d'un microscope à épifluorescence inversé (Nikon Eclipse TE2000U) et d'une caméra (Photometrics PCIO CoolSNAP HQ). Les fluorophores

ont été excités à l'aide d'une lampe Xénon/Mercure (X-Cite series 120Q) et l'acquisition des images a été réalisée grâce au logiciel Metamorph (version 6.1r2, Universal Imaging Corp., US). Pour pouvoir comparer chacun des trois triples-marquages GFAP/- ; Iba1/- ou KCC2/- IB4/DAPI, un même temps d'exposition (en ms) a été défini au moment de l'acquisition dans chacune des conditions expérimentales pour un même marquage. Seuls les marquages GFAP et Iba1 diffèrent dans leur temps d'exposition, dans le but d'obtenir une intensité similaire et non-saturée pour ces deux marquages et d'être comparables selon les deux conditions expérimentales. Les images des régions superficielles de la corne dorsale (couches ou laminae I à IV) des moelles ont été réalisées.

Grâce à un algorithme produit avec le logiciel MATLAB (7.8.0.499, MathWorks, US), chacune des images a ensuite été analysée comme suit.

4.6.1 Création des masques

La corne dorsale a été découpée en 3 régions différentes : I, II et III/IV. Les différentes couches ont été distinguées à l'aide du marquage IB4 pour la limite supérieure de la couche II et du marquage DAPI, pour la taille et la densité des cellules qui diffèrent selon la lamina considérée.

Considérons par exemple le marquage Iba1 (ce qui suit est valable pour les autres marquages). Une cellule Iba1+, localisée dans la LI, va être convertie en masque par le logiciel en fonction de réglages préalables. Ces réglages tiennent notamment compte de l'intensité et du pourcentage de recouvrement avec un noyau (donné par le marquage DAPI). Trois cas sont alors possibles.

Si l'intensité du marquage Iba1 atteint un certain seuil (défini spécifiquement pour les 3 marqueurs) et que au moins 75% d'un noyau est recouvert par le marquage Iba1, alors le masque créé correspond exactement à la cellule présente dans l'image (voir [figure 4.5](#)).

Si l'intensité est inférieure au seuil (*e.g.* pour une cellule hors du plan focal) et que au moins 75% d'un noyau est recouvert, un masque est aussi créé, différent du premier.

Enfin, il est possible que la section ne soit pas effectuée au niveau du noyau. On pourrait ainsi avoir une cellule Iba1+ avec une intensité de marquage dépassant le seuil, mais sans marquage DAPI. Un masque sera également créé pour cette cellule.

Pour pouvoir distinguer le type de masque créé, plusieurs paramètres d'analyse sont ainsi

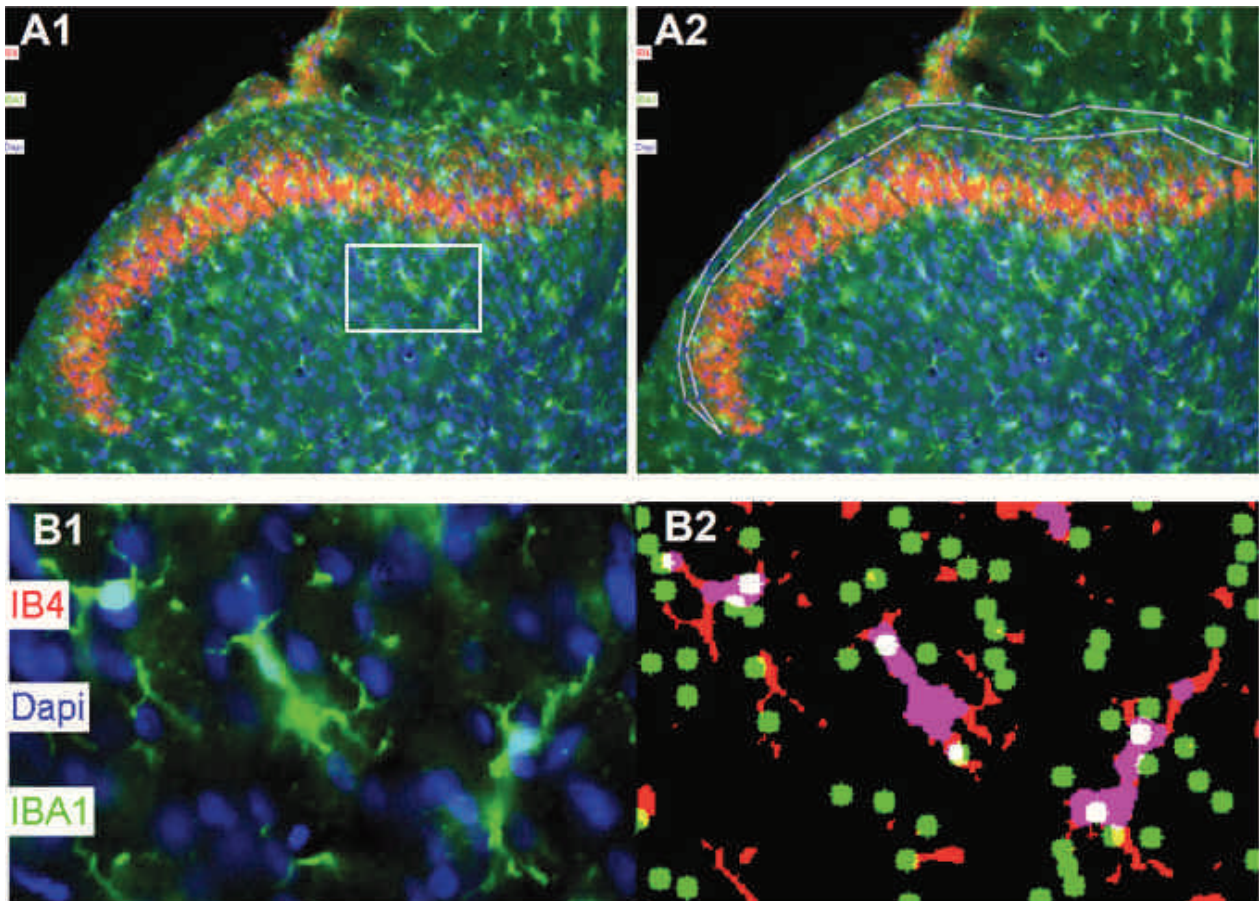


FIGURE 4.5: Création des masques pour les analyses : exemple avec Iba1/IB4/DAPI sur une corne dorsale de moelle épinière de rat (A1) Image acquise par microscopie à épifluorescence, composite des trois immuno-marquages : Iba1 (vert), IB4 (rouge) et DAPI (bleu). (A2) Exemple de la délimitation d'une lamina (ici, la LI), figuré par le liseré gris. (B1) Grossissement de la zone en A1. L'intensité du marquage des cellules microgliales Iba1+ et le recouvrement avec un marquage DAPI sont pris en compte par l'algorithme pour la création du masque. (B2) La première cellule (haut, gauche) présente deux couleurs. La couleur rouge traduit une intensité de marquage inférieure au seuil fixé, mais détectée. Lorsque l'intensité est supérieure au seuil, la couleur est violette. Le marquage DAPI permet de déterminer si une cellule est de grande taille (cellule du milieu) ou si deux cellules sont présentes (cellule de droite). Le masque créé pour cette dernière sera constitué de deux cellules Iba1+, ayant chacune un noyau DAPI.

nécessaires.

4.6.2 Paramètres d'analyse

Des masques sont créés pour chaque cellule, pour chaque marqueur d'intérêt (*i.e.* Iba1, GFAP et KCC2) et pour chaque lamina. Les masques ainsi obtenus ont servi de support pour l'analyse notamment de 29 paramètres, incluant colocalisation, intensité de marquage, nombre et morphologie des cellules d'intérêt (immuno-réactives soit pour GFAP ou Iba1) et ce, pour les deux groupes de rats (ayant reçu soit le traitement de nicotine, soit le salin).

Les 29 paramètres peuvent être regroupés en trois catégories, selon l'aspect dont ils rendent compte, *i.e.* le nombre de cellules d'intérêt, leur taille et l'intensité du marquage considéré. Ils sont consignés dans la [table 4.2](#). Un descriptif des paramètres est également précisé quand nécessaire. Les données ont ensuite été analysées avec le logiciel Prism (v5.0.4, GraphPad Software Inc.) à l'aide d'un test-t non-apparié et avec correction de Welch, entre le groupe de rats ayant reçu le traitement chronique à la nicotine et le groupe contrôle, pour chacun des marquages GFAP, Iba1 et KCC2.

Paramètres rendant compte du nombre de cellules d'intérêt	Nbre de noyau par μm^2	Nbre de noyaux (DAPI); Renseigne sur le nombre de cellules totales présentes dans l'image	
	Nbre de noyaux (DAPI) dans le masque par μm^2	Masque : Masque créé à partir du marquage immuno-histo-chimique représentant une cellule d'intérêt	
	Nbre de cellule par μm^2	"Cellules" : Cellules d'intérêt dont l'intensité de marquage est supérieure à un seuil fixé pour chacun, mais dont le marquage DAPI est absent ou ne recouvre pas au moins 75% du marquage d'intérêt	
	Nbre de cellules avec noyau par μm	Le critère "Cellule avec noyau" est appliqué à un masque lorsqu'il recouvre plus de 75% d'un noyau DAPI et dont l'intensité du marqueur dépasse le seuil fixé	
	Nbre de noyaux dans le masque total / Nbre de noyaux	"Masque total" : représente la somme de tous les masques, et renseigne donc sur le nombre total de cellules d'intérêt	
	Nbre de cellules / nbre de noyaux	"Noyau" : Nbre de noyaux DAPI, qui renseignent sur le nombre de cellules présentes dans l'image qui colocalisent ou pas avec le marqueur d'intérêt	
	Nbre de cellules d'intérêt avec noyau / nbre de noyaux		
Paramètres rendant compte de la taille des cellules d'intérêt	Aire totale du masque μm^2	Somme des surfaces de chaque masque, de chaque corps cellulaire et de chaque cellule	
	Périmètre total du masque (μm) Périmètre moyen du masque / nombre de noyaux (μm)		
	Périmètre moyen du masque / cellule μm	Moyenne de tous les périmètres des masques créés / nombre de cellules d'intérêt	
	Perimètre moyen du masque / cellule avec noyaux (μm) Aire / nombre de noyaux dans le masque (μm^2) Aire du masque / nombre de cellule (μm^2) Aire du masque / nombre de cellule avec noyau(μm^2) Aire de la région d'intérêt (<i>lamina</i>) (μm^2)	Moyenne de tous les périmètres des masques créés / nombre de cellules d'intérêt avec noyau	
	Aire totale des corps cellulaires (μm^2)	Somme des surface de chaque masque avec ou sans noyau	
	Aire des corps cellulaires (μm^2)	"Corps cellulaire" : une cellule d'intérêt ne recouvrant pas plus de 75% le marquage DAPI, et dont l'intensité du marqueur est inférieure au seuil fixé. Équivalent d'une cellule d'intérêt, mais dont l'intensité de marquage est plus faible	
	Aire des corps cellulaires avec noyau(μm^2)	Cellule d'intérêt recouvrant plus de 75% le marquage DAPI, et dont l'intensité du marqueur est inférieure au seuil fixé	
	Aire totale des corps cellulaires avec noyau (μm^2)	Somme des cellules d'intérêt à intensité de marquage plus faible	
	Paramètres rendant compte de l' intensité du marquage d'intérêt	Intensité totale dans le masque (UA/ μm) Intensité moyenne dans le masque Intensité totale / nbre de noyaux dans le masque Intensité totale / nbre de cellules Intensité totale / nbre de cellules avec noyau Intensité moyenne du marqueur d'intérêt dans la lamina d'intérêt	

TABLE 4.2: **Détails des paramètres d'analyse.** L'ensemble des 29 paramètres regroupent trois aspects : nombre et taille des cellules, intensité du marquage (première colonne). En fonction du type de masque créé (dépendant de l'intensité de marquage et de la présence d'un marquage DAPI) et pour un même aspect, plusieurs paramètres sont donc nécessaires pour permettre une analyse détaillée et plus fine. La deuxième colonne rend compte du nom du paramètre, tel que figuré dans le tableau des résultats. La dernière colonne fournit des précisions sur le paramètre concerné.

Résultats et Discussion

Préambule

Cette partie consacrée aux résultats s'organise en trois chapitres, décrivant et discutant l'ensemble des travaux de cette thèse. Les deux premiers chapitres concernent le projet de caractérisation des interneurons cholinergiques spinaux.

Le premier de ces chapitres présente la publication dont a fait l'objet la première étude, précédée d'un résumé détaillé en français.

Dans le second chapitre, nous exposerons les résultats complémentaires à cette étude, obtenus par injection *in vivo* d'un traceur rétrograde dans la moelle épinière de souris transgéniques ChAT::eGFP. À la suite de la présentation et de l'interprétation de ces résultats, nous discuterons l'ensemble des données obtenues sur les interneurons cholinergiques spinaux.

Le troisième chapitre présentera notre étude des effets de l'injection chronique de nicotine, agoniste des récepteurs de l'acétylcholine, chez des rats. L'acétylcholine semblant être impliquée dans les effets aigus, analgésiques, de la morphine, nous avons voulu déterminer si un traitement chronique à la nicotine reproduisait les conséquences d'un traitement chronique à la morphine au niveau comportemental et cellulaire.

Chapitre 5

Caractérisation morphologique et fonctionnelle des interneurones cholinergiques de la corne dorsale de la moelle épinière

5.1 Résumé

Objectif

L'objectif des travaux présentés dans ce premier article a été de caractériser, sur un plan morphologique et fonctionnel, une population d'interneurones cholinergiques localisés dans la corne dorsale de la moelle épinière (CDME), en établissant les propriétés morphologiques, neurochimiques et de décharge de ces cellules. Alors que le rôle de l'acétylcholine (ACh) à ce niveau est assez bien décrit, l'organisation de la circuiterie cholinergique locale de cette région demeure mal connue. Déchiffrer cette organisation est indispensable pour aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'analgésie cholinergique.

Contexte

Les niveaux d'ACh dans la moelle épinière exercent un contrôle critique sur les comportements nociceptifs. L'augmentation de ces niveaux, par injection locale d'antagonistes de

l'ACh esterase (l'enzyme catabolisant l'ACh), produit de l'analgésie chez le rongeur et l'humain. Au contraire, une diminution de l'action cholinergique, par antagonisme des récepteurs à l'ACh (AChR), ou en jouant sur les niveaux d'ACh par inhibition de son enzyme de synthèse (la Choline Acetyl Transferase, ou ChAT), induit de l'hyperalgésie et de l'allodynie. Ces données suggèrent également l'existence d'un tonus cholinergique (principalement décrit pour les AChRs de type nicotinique). Par ailleurs le système cholinergique spinal est essentiel pour les effets analgésiques de la morphine, puisque cette dernière n'exerce plus son pouvoir analgésique lorsque le système ACh de la CDME est inactivé.

Cependant, la source d'ACh de cette partie sensorielle de la moelle reste à établir. Un plexus de fibres cholinergiques est localisé à l'endroit où aboutissent la plupart des fibres afférentes véhiculant les informations nociceptives de la périphérie. Ce plexus est localisé, selon les études, dans les couches II ou III et comprend à la fois des dendrites et des axones. Ces fibres établissent une relation réciproque avec les terminaisons des afférences primaires nociceptives. Ce plexus est ainsi suspecté d'être à l'origine de la modulation cholinergique de la transmission nociceptive, mais la localisation des corps cellulaires dont émane l'ensemble de ces fibres est encore sujet à controverse. Les centres supra-spinaux ont été exclus pour ce qui concerne l'origine de ce plexus, par des expériences de section. Une autre origine possible est que les neurones cholinergiques alimentant ce plexus soient localisés dans les ganglions rachidiens (DRGs, pour *dorsal roots ganglia*). La présence de dendrites suggère néanmoins que ce plexus est formé, au moins en partie, par des neurones cholinergiques intrinsèques à la moelle épinière.

Grâce à l'utilisation d'une souche de souris transgéniques, exprimant la eGFP dans les cellules cholinergiques et d'approches immuno-histochimiques et électrophysiologiques, nous avons pu :

- reconstruire les interneurons cholinergiques après remplissage intra-cellulaire par de la biocytine
- étudier leurs propriétés électrophysiologiques d'excitabilité
- préciser la localisation du plexus de fibres cholinergiques

Nos résultats apportent également quelques précisions quant à l'implication controversée des DRGs dans la formation de ce plexus.

Résultats principaux

Morphologie des interneurons cholinergiques

Nos résultats montrent que les corps cellulaires des interneurons cholinergiques sont localisés dans les *laminae* III / IV de la CDME. Ces neurones présentent une morphologie assez homogène, avec une arborisation neuritique occupant un espace très important, par rapport à leur corps cellulaire relativement petit.

Cette arborisation présente une organisation particulière, avec une orientation principalement dorsale par rapport à leur soma, en direction du plexus de fibres. De plus, les prolongements s'étendent selon l'axe rostro-caudal. En utilisant simplement le signal fluorescent eGFP de ces neurones, nous n'avons pas pu reconstruire les prolongements individuels d'un neurone unique une fois que ces prolongements ont rejoint le plexus. Nous avons donc opté pour l'injection intra-cellulaire de biocytine, afin d'identifier et de caractériser sans ambiguïté les prolongements provenant de neurones individuels.

L'injection et la révélation de biocytine dans des tranches parasagittales et horizontales ont confirmé l'orientation dorsale et rostro-caudale des neurites, qui s'étendent sur plusieurs centaines de microns. L'axone de ces cellules présente également une morphologie particulière. En partant du soma, l'axone se dirige au niveau dorsal de la CDME, du côté latéral ou médial de l'hémi-moelle dans laquelle est localisé le corps cellulaire du neurone considéré. Après 350-500 μm , l'axone bifurque avec un branchement en forme de T, qui s'oriente pour une branche en direction rostrale et pour l'autre en direction caudale.

Ainsi, la morphologie et leur localisation anatomique démontrent que les interneurons cholinergiques de la CDME sont très probablement à l'origine de la formation du plexus de fibres observé. Ceci en fait de bons candidats pour la modulation cholinergique de la nociception au niveau spinal.

Propriétés des interneurons cholinergiques

Les propriétés neurochimiques et électrophysiologiques sont cohérentes avec une action tonique inhibitrice suggérée par les données comportementales (brièvement décrite précédemment). En effet, ces interneurons colocalisent avec des substances à vocation inhibitrice. Ils représentent une sous-population des neurones GABAergiques présents dans cette

région spinale et expriment également tous l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote (la NOS, pour *nitric oxide synthase*). Ces données corroborent celles décrites chez le rat. Le patron de décharge de ces interneurons, enregistré lors de leur remplissage avec de la biocytine par la technique du patch-clamp, dévoile que la majorité de ces cellules présente un type répétitif de décharge de potentiels d'action lorsqu'ils sont dépolarisés. La fréquence de décharge augmente avec le degré de dépolarisation. Une hyperpolarisation de la membrane de ces neurones induit, quant à elle, un rebond avec potentiels d'action post-hyperpolarisation. Ces paramètres, caractéristiques d'une action tonique, sont retrouvés dans d'autres populations d'interneurones inhibiteurs de la moelle épinière.

Origine du plexus de fibres cholinergiques

Les interneurons cholinergiques sont donc principalement à l'origine du plexus de fibres de la CDME. Notre étude a permis de localiser de façon plus précise ce plexus, dans la partie interne de la *lamina* II de la corne dorsale. De plus, le profil neurochimique de ce plexus diverge de celui des quelques cellules eGFP-positives présentes dans les DRGs. Notamment, une immuno-détection de la ChAT ne révèle aucun marquage des corps cellulaires présents au niveau des DRGs, alors qu'au niveau de la CDME, le signal eGFP des fibres composant le plexus colocalise à 100% avec le marquage immunochimique ChAT.

Conclusion

Nos données suggèrent ainsi que les interneurons cholinergiques de la CDME, de part leur morphologie et leur localisation anatomique, représentent la principale source d'ACh dans cette région. Ils sont à l'origine du plexus de fibres cholinergiques qui représente le substrat probable de la modulation de la nociception au niveau spinal, en lien étroit avec les fibres afférentes primaires nociceptives. Leur faible nombre est compensé par une taille très importante de l'arborisation dendritique et de leur axone, suggérant une collecte et un contrôle des informations qu'ils reçoivent sur de grandes distances (Voir la publication pour les différentes reconstructions des interneurons cholinergiques spinaux).

5.2 Publication

Morphological and functional characterization of cholinergic interneurons in the dorsal horn of the mouse spinal cord.

Journal of Comparative Neurology (2011) 1;519(16):3139-58

Mesnager B, Gaillard S, Godin AG, Rodeau JL, Hammer M, Von Engelhardt J, Wiseman PW, De Koninck Y, Schlichter R, Cordero-Erausquin M

Morphological and Functional Characterization of Cholinergic Interneurons in the Dorsal Horn of the Mouse Spinal Cord

Bruce Mesnage,^{1,2} Stéphane Gaillard,¹ Antoine G. Godin,³ Jean-Luc Rodeau,¹ Matthieu Hammer,¹ Jakob Von Engelhardt,⁴ Paul W. Wiseman,³ Yves De Koninck,² Rémy Schlichter,¹ and Matilde Cordero-Erausquin^{1*}

¹Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR3212 CNRS, Dept. Nociception et Douleur, 67084 Strasbourg, France

²Centre de Recherche Université Laval Robert-Giffard, Québec, Québec G1J 2G3, Canada

³Department of Physics and Department of Chemistry, McGill University, Montréal, Québec H3A 2T8, Canada

⁴Department of Clinical Neurobiology, University Hospital Heidelberg, 69120 Heidelberg, Germany

ABSTRACT

Endogenous acetylcholine is an important modulator of sensory processing, especially at the spinal level, where nociceptive (pain-related) stimuli enter the central nervous system and are integrated before being relayed to the brain. To decipher the organization of the local cholinergic circuitry in the spinal dorsal horn, we used transgenic mice expressing enhanced green fluorescent protein specifically in cholinergic neurons (ChAT::EGFP) and characterized the morphology, neurochemistry, and firing properties of the sparse population of cholinergic interneurons in this area. Three-dimensional reconstruction of lamina III ChAT::EGFP neurons based either on their intrinsic fluorescence or on intracellular labeling in live tissue demonstrated that these neurons have long and thin processes that grow preferentially in the dorsal direction. Their dendrites and axon are highly elongated in the rostrocaudal direction, beyond the limits of a single

spinal segment. These unique morphological features suggest that dorsal horn cholinergic interneurons are the main contributors to the plexus of cholinergic processes located in lamina II, just dorsal to their cell bodies. In addition, immunostainings demonstrated that dorsal horn cholinergic interneurons in the mouse are γ -aminobutyric acidergic and express nitric oxide synthase, as in rats. Finally, electrophysiological recordings from these neurons in spinal cord slices demonstrate that two-thirds of them have a repetitive spiking pattern with frequent rebound spikes following hyperpolarization. Altogether our results indicate that, although they are rare, the morphological and functional features of cholinergic neurons enable them to collect segmental information in superficial layers of the dorsal horn and to modulate it over several segments. *J. Comp. Neurol.* 519:3139–3158, 2011.

© 2011 Wiley-Liss, Inc.

INDEXING TERMS: acetylcholine; nociception; analgesia; ChAT-GFP; DRG; GABA; nitric oxide synthase

Acetylcholine (ACh) levels in the spinal cord critically control nociceptive behavior. Local (intrathecal, i.t.) injection of an acetylcholinesterase (AChE) inhibitor induces an increase in the level of spinal ACh that produces analgesia in rodents (Naguib and Yaksh, 1994). Such AChE inhibitors are used as analgesics in the clinic, given as coadjuvant in epidural anesthesia (neostigmine) or given orally (donazepil; Clayton et al., 2007; Eisenach, 2009). On the other hand, locally decreasing the level of ACh by invalidating its synthesizing enzyme, choline acetyltransferase (ChAT), or preventing cholinergic signaling by antagonizing nicotinic or muscarinic ACh receptors induces hyperalgesia (exacerbated reaction to a nociceptive stimulus) and/or allodynia (noci-

ceptive behavior elicited by an innocuous stimulus) in rodents (Hama and Menzaghi, 2001; Matsumoto et al., 2007; Rashid and Ueda, 2002; Zhuo and Gebhart, 1991). Interestingly, nociceptive stimulation can induce the spinal release of ACh (Eisenach et al., 1996), and chronic

Grant sponsors: International Association for the Study of Pain (to M.C.-E.); Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-NEURO-012-01 to R.S.); Institut UPSA de la Douleur (to R.S.); Canadian Institutes of Health Research (to Y.D.K.); Fonds de la recherche en santé du Québec (to Y.D.K.).

*CORRESPONDENCE TO: Matilde Cordero-Erausquin, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR3212 CNRS, Dept. Nociception et Douleur, 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France. E-mail: cordero@unistra.fr

Received March 3, 2011; Revised April 11, 2011; Accepted May 1, 2011
DOI 10.1002/cne.22668

Published online May 25, 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

© 2011 Wiley-Liss, Inc.

peripheral neuropathy is associated with a decrease in the spinal cholinergic tone (Rashid and Ueda, 2002). Finally, release of ACh in the spinal cord has also been demonstrated to occur after morphine or clonidine injection and to mediate, at least in part, the analgesic effects of these drugs (Chen and Pan, 2001; Paqueron et al., 2001). These experimental results indicate that, through its action on spinal cholinergic receptors, endogenous ACh participates in the setting of nociceptive thresholds and in the effect of clinically relevant analgesics.

The source of ACh in the sensory spinal cord has not been clearly established, however. The presence of a dense plexus of cholinergic fibers has been reported in spinal lamina II (Olave et al., 2002), where most nociceptive primary afferents terminate; another study localized the cholinergic plexus in lamina III (Barber et al., 1984). This plexus is composed of cholinergic dendrites that are contacted by primary afferents and by cholinergic boutons that have been shown to form axoaxonic contacts with incoming primary afferents (Ribeiro-da-Silva and Cuello, 1990). This intimate and reciprocal interaction between primary afferents and cholinergic fibers indicates that the lamina II–III cholinergic plexus might be the substrate of cholinergic analgesia. In principle, these cholinergic fibers could arise from intrinsic spinal neurons as well as from a descending cholinergic innervation or primary afferents.

Although there is general agreement on the absence of descending cholinergic innervation to the spinal cord (Kanzawa et al., 1979; Sherriff et al., 1991; Woolf and Butcher, 1989), the existence of cholinergic primary afferents is controversial. With different antibodies, previous studies have concluded that DRG neurons do not express ChAT (Barber et al., 1984) or that a subpopulation of DRG neurons was ChAT immunoreactive (ChAT-IR; Sann et al., 1995), or that all DRG neurons were ChAT-IR (Bellier and Kimura, 2007; Matsumoto et al., 2007). The presence of cholinergic dendrites within the spinal laminae II–III cholinergic plexus (Ribeiro-da-Silva and Cuello, 1990) suggests that it arises, at least in part, from intrinsic spinal neurons, most probably those having their cell bodies in laminae III and IV (Barber et al., 1984). These neurons are rare and dispersed along the mediolateral axis. In this study, we took advantage of transgenic mice expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP) under control of the ChAT promoter (von Engelhardt et al., 2007) and combined histochemical, quantitative morphological, and functional approaches to characterize these cholinergic neurons in more detail.

MATERIALS AND METHODS

Animals

ChAT::EGFP mice are BAC transgenics produced in the laboratory of Dr. Monyer by inserting the EGFP coding sequence (followed by a bovine growth hormone poly-

adenylation signal) into the translational start of the *ChAT* gene (fourth exon; von Engelhardt et al., 2007). We used adult, male ChAT::EGFP mice back-crossed onto the CD1 background during six to nine generations. Breeding males and experimental mice were heterozygous for the transgene, whereas breeding females were wild-type CD1 purchased from Charles River France. Mice were phenotyped during the second postnatal week, by looking for EGFP fluorescence at the basis of vibrissae under an epifluorescence microscope. Animals were housed in a semiconventional animal facility legally registered for animal experimentation under Animal House Agreement B67-482-1/C67-482-1. All procedures were performed in accordance with the local animal care and use committee as well as with European Communities Council Directive 86/6609/EEC.

Tissue preparation for histology

Mice were anesthetized with ketamine (Imalgene) 50 mg/ml (0.15 ml i.p. injection) and perfused transcardially with 0.1 M phosphate buffer (PB; [in mM] 80 Na₂HPO₄, 19 NaH₂PO₄, pH 7.4) for 2 minutes and with 4% paraformaldehyde (PFA) in PB for 10 minutes. Spinal cords were then extracted by hydraulic extrusion, postfixed, and cryoprotected overnight by immediate submersion in a 4% PFA/30% sucrose/PB saline (PBS; [in mM] 154 NaCl, 13 Na₂HPO₄, 2.5 NaH₂PO₄) solution at 4°C. The dorsal root ganglia (DRGs) were carefully dissected, and the same postfixation and cryoprotection protocol was performed.

Spinal cord and DRG sectioning

Lumbar spinal cord sections were cut using a freezing sliding microtome device (Leica Microsystems). Transverse, parasagittal, or horizontal sections (50 μm) were cut and placed in a 48-well plate containing PBS and stored at 4°C. DRGs were embedded in TissueTek OCT compound (Bayer). Transverse sections (14 μm) were cut, mounted on Superfrost Plus slides (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL), dried overnight, and stored at 4°C.

Stainings

Tissue sections were washed three times in PBS/0.5% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO), and incubated in 10% donkey serum/PBS/0.5% Triton X-100 for 45 minutes, before adding the primary antibodies overnight at 4°C in the same solution. Sections were then washed three times with PBS/0.5% Triton X-100 and incubated for 2 hours with fluorophore-conjugated secondary antibodies at room temperature. The sections were finally washed three times with PBS, dried, and mounted using Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA).

TABLE 1.
Summary of Primary Antibodies Used in the Study

Antigen	Species and clonality	Immunogen	Source	Dilution used
Choline acetyltransferase (ChAT)	Goat polyclonal	Human placental ChAT	Chemicon Millipore, AB 144P	1/500
Protein kinase C isoform γ (PKC γ)	Rabbit polyclonal	Mouse PKC γ residues 679–697 (DFVHPDARSPTSPVPVPM)	Santa Cruz Tebu, SC211	1/1,000
GABA	Rabbit polyclonal	GABA conjugated with bovine serum albumin (GABA-BSA)	Sigma, A 2052	1/500
Neuronal nitric oxide synthase (bNOS)	Mouse monoclonal	Aa 1–181 of rat brain specific nitric oxide synthase	Sigma, N2280	1/500
Green fluorescent protein (GFP)	Rabbit polyclonal	Recombinant full-length <i>Aequorea victoria</i> (rGFP)	Ozyme, 632460	1/1,000
Neurofilament 200 (NF200)	Mouse monoclonal	Carboxyterminal tail segment of enzymatically dephosphorylated pig neurofilament H-subunit	Sigma, N0142	1/1,000
Calcitonin gene-related peptide (CGRP)	Sheep polyclonal	Rat α -CGRP conjugated to BSA	Enzo Life Sciences, CA 1137-0025	1/1,000

For isolectin B4 (IB4) staining, the sections were first washed three times with PBS/0.5% Triton X-100, before incubating them overnight with IB4 conjugated to Alexa Fluor 568 (Invitrogen; I21412) at 1/500 and performing three final washes with PBS. Nissl staining consisted of washing three times with PBS/0.5% Triton X-100, incubating the sections with Neurotrace 640/660 deep red Nissl for 20 minutes at room temperature (Invitrogen; N-21483) at 1/100, and washing three times with PBS.

Primary antibody characterization

The specifications of the primary antibodies used in this study are summarized in Table 1. The goat polyclonal anti-ChAT antibody stains a single band of 68–70 kDa apparent molecular weight on Western blot analysis of mouse brain lysate (manufacturer's technical information). The specificity of this antibody for the antigen has been determined by preadsorption with the appropriate purified protein as described by others (Rico and Cavada, 1998), indicating that after preadsorption there was no staining. The staining pattern that we obtained was identical to that used in previous studies in the spinal dorsal horn (Barber et al., 1984; Olave et al., 2002).

The preparation of the anti-PKC γ antibody has been described elsewhere in detail (Hosoda et al., 1989; Mori et al., 1990; Saito et al., 1989; Starkey et al., 2009). The specificity of the antibody was confirmed by Western blot analysis using several PKC subspecies, which were separately expressed in COS-7 cells transfected with each cDNA-containing plasmid (Mori et al., 1990). Full details of the characterization of this antibody have been previously published (Hosoda et al., 1989). This antibody produced two closely spaced bands in Western blots prepared from rat cerebellum and neocortex, with an

approximate molecular weight of 80 kDa (Cardell et al., 1998). Labeling in the Western blots was eliminated by preadsorption with the immunizing peptide. The antibody has previously shown staining similar patterns to those reported here (Malmberg et al., 1997; Mori et al., 1990; Polgar et al., 1999).

The GABA antibody was shown by dot blot assay to bind to GABA. Preincubation of the antiserum with GABA abolished the immunostaining in rat superior cervical ganglion (Ito et al., 2007). The antibody has been used extensively for identifying GABAergic neurons in rodent CNS (Ito et al., 2007; Panzanelli et al., 2007; Wolansky et al., 2007).

The monoclonal anti-bNOS antibody labels a single band at 155 kDa on Western blot from rat cerebellum. It does not cross-react with NOS from macrophages (mNOS) or endothelial cells (eNOS; manufacturer's technical information).

The anti-GFP antibody recognizes native and denatured forms of recombinant EGFP as well as EGFP, EYFP, ECFP, and AcGFP fusion proteins expressed in mammalian cells. Specificity was confirmed by Western blotting on HEK cells stably expressing *Aequorea coerulea* GFP (manufacturer's information). The anti-GFP antibody did not immunolabel cells or structures in control spinal cord from wild-type mouse.

Mouse antineurofilament 200 (NF200) monoclonal antibody is derived from a hybridoma produced by the fusion of mouse myeloma cells and splenocytes from an immunized mouse. Anti-NF200 specifically recognizes the neurofilaments with a molecular weight of 200 kDa on immunoblots from rat spinal cord and does not cross-react with other intermediate filament proteins (manufacturer's technical information). Anti-NF200 has been established as a marker of DRG neurons having

myelinated axons (Hammond et al., 2004; Lawson and Waddell, 1991; Ruscheweyh et al., 2007). The pattern of staining obtained in our experiments with this antibody was similar to that previously reported for DRG from other studies (Chao et al., 2008; Keast et al., 2010; Ruscheweyh et al., 2007; Schumacher et al., 1999).

The immunostaining obtained with the anti-CGRP antibody in the rat spinal cord was abolished by preincubation of 1 ml of the diluted antiserum with 10 nmol rat α -CGRP but not with galanin or substance P (manufacturer's information). Staining in mouse DRGs and spinal cord matched the distribution of mRNA and protein reported in the literature (Fukuoka et al., 1998; Ruscheweyh et al., 2007; Tie-Jun et al., 2001).

Preparation of acute spinal cord slices

Male transgenic mice, aged P21–P30, were anesthetized with ketamine (Imalgene; 50 mg/ml, 0.15 ml i.p. injection) and briefly perfused transcardially with an ice-cold oxygenated (95%O₂, 5%CO₂) sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (S-ACSF) solution containing the following (in mM): 252 sucrose, 2.5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, and 10 glucose. The spinal cord was rapidly removed by hydraulic extrusion and immersed in ice-cold S-ACSF solution. The lumbar spinal enlargement was isolated, and 250–300- μ m parasagittal or horizontal slices were cut with a vibratome (Leica VT1000S). Slices were allowed to recover for 15–30 minutes in an immersion chamber containing ACSF at room temperature. The ACSF solution had a composition similar to that of S-ACSF except that sucrose was replaced by NaCl (126 mM).

Electrophysiology

A single slice was transferred to a recording chamber and perfused with ACSF at a rate of 1.2 ml/min at room temperature. ChAT::EGFP neurons were identified by the presence of green fluorescence at the level of the cell body after excitation with a xenon arc lamp with appropriate filters. The neurons were targeted by a glass pipette containing the following solution (in mM): potassium gluconate 136, KCl 10, MgCl₂ 4, Hepes 10, and biocytin 10 (pH 7.30 adjusted with KOH). Alexa 555 (0.5 mM; Invitrogen) was added to the pipette solution before the experiment. Whole-cell voltage- or current-clamp recordings were made from neurons as previously described (Cordero-Erausquin et al., 2005). Signals were recorded with a patch-clamp amplifier (Axopatch 200B), filtered at 5 kHz, digitized at 10 kHz, and acquired using the Strathclyde electrophysiology software WinWCP (courtesy of Dr. J. Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, United Kingdom). No correction for the liquid junction potential was made.

Discharge patterns were assessed in the current-clamp mode. Neurons were depolarized (hyperpolarized) from a

holding potential of -60 mV by depolarizing (hyperpolarizing) current injections of 700-msec duration (10-pA steps). After completion of intracellular biocytin filling, the slices were fixed overnight in 4% PFA in S-ACSF at 4°C.

Electroporation

The setup was the same as for patch-clamp recordings, and the neuron was similarly approached. However, the glass pipette contained 500 mM KCl with 2% biocytin (53 mM). It was complemented with Alexa 555 (0.5 mM) before the experiment in order to follow the diffusion of the pipette content into the recorded cell. The pipette was placed in contact with the cell body, and 1-msec rectangular pulses of 2.5 V were applied at 200 Hz during 2–10 minutes.

Biocytin revelation

Biocytin was revealed by using either the 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) method or streptavidin conjugated with Alexa-546 (StrepAl-546). The DAB protocol was as follows. Sections were washed in PBS (3 \times 10 minutes), and endogenous peroxidases were quenched with 50% ethanol/1% H₂O₂ for 30 minutes. Sections were then washed in PBS (3 \times 10 minutes), permeabilized for 20 minutes in PBS containing 10% donkey serum and 0.5% Triton X-100, and then incubated overnight in PBS containing the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC Elite; Vector, Burlingame, CA) with 0.5% Triton X-100. After washing in Tris-HCl buffer (0.05 M, pH 7.5; 3 \times 10 minutes), bound peroxidase was revealed by incubation in 0.025% DAB, 0.1% nickel ammonium sulfate, 0.025% cobalt chloride, and 0.0006% H₂O₂ (Sigma) in Tris-HCl buffer. Sections were reacted for approximately 3–6 minutes and then washed again in Tris-HCl buffer. Each step was performed at room temperature under constant agitation. Finally, sections were serially mounted on gelatin-coated slides, air dried, dehydrated in graded alcohols, cleared in xylene, and cover-slipped with Eukitt.

The StrepAl-546 procedure consisted in three washes in PBS/0.5% Triton, incubation with StrepAl-546 (1/400), and three washes with PBS. Slices were finally dried and mounted with Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen).

Image analysis

The sections were examined with a Zeiss LSM 510 or a Leica SP5 confocal laser scanning microscope equipped with an argon and two helium-neon lasers. Appropriate filters were selected for the separate detection of each fluorophore using a multitrack scanning method to separate completely the detection of the signals. Scans were performed along the Z-axis, and optical sections had approximate thicknesses between 0.4 and 4 μ m, as calculated from the pinhole sizes.

To analyze the dorsoventral distribution of EGFP-, PKC γ -, CGRP-, and IB4-labeled terminals, a 200- \times 150- μ m rectangle was placed with one of the shorter sides at the edge of the gray matter. The Plot profile function of ImageJ software (1.40e; W. Rasband, NIH) provided, for each pixel in the dorsoventral axis, the mean pixel intensity on a line parallel to the white matter. The values of the relative optical density (ROD) represent the mean pixel intensity per line on a relative scale of 0–1 (Cordero-Erausquin et al., 2009; Lorenzo et al., 2008; Ribeiro-da-Silva and Paxinos, 2004).

The analysis was performed on images presenting two signals, one of them being EGFP. The error areas on the curves represent either the SEM for four independent measures (different animals) of EGFP distribution (Fig. 8B) or the SEM for 8 to 12 different sections from the same animal (Fig. 8D4,E4,F4).

Spatial autocorrelation analysis

A longitudinal fiber will appear differently in images taken in the longitudinal or transverse plane. To quantify this point, and therefore infer the main orientation of fibers from images taken in different planes, we performed a spatial autocorrelation analysis. The spatial autocorrelation function (Eq. 1) represents an index of similitude between adjacent pixels of an image. The existence of a persistent correlation over large distances (several micrometers) directly reveals the presence of large-scale structures. Spatial autocorrelation analysis was done on confocal laser scanning fluorescence (CLSF) images. Averages of spatial lags were calculated for all possible spatial lags in x , $G(v,0)$, and y , $G(0,\xi)$. In Equation 1, $\delta I(x,y)$ is defined by $\delta I(x,y) = I(x,y) - [I(x,y)]_{x,y}$, where the brackets represent spatial averages of the intensity I at pixel (x,y) over all pixels in the region of interest.

$$G(\eta, \xi) = \frac{\langle \delta I(x, y) \cdot \delta I(x + \eta, y + \xi) \rangle_{x,y}}{\langle I(x, y) \rangle_{x,y}^2} \quad (1)$$

To measure the strength of the correlations, the autocorrelation functions in both directions were fitted to one-dimensional Gaussians (Eq. 2; Kolin and Wiseman, 2007). The distance at which the signal is reduced to e^{-2} times its peak value (e^{-2} radii) was calculated for four images for both the transverse and parasagittal sections and compared via paired t -tests.

$$F(A, x_0, \omega; x) = A \cdot e^{-\frac{2(x-x_0)^2}{\omega^2}} \quad (2)$$

Image segmentation and colocalization measurements

We studied the distribution of neuronal markers in the spinal cord by using an object-based method (Bolte and Cordelieres, 2006; Lachmanovich et al., 2003). The first step of

the quantification was to define specific regions in an image acquired with a confocal laser scanning microscope. The diameter of fine dendrites and axonal profiles in CLSM images is on the order of the point spread function (PSF). For this reason, the algorithm was made to recognize structures with a disc shape with dimensions similar to the PSF. The disc-shaped filter was applied to the images to amplify structures with similar shapes, so the resulting mask was independent of low-frequency variations of diffuse signal in different spatial regions, and the analysis was not biased by the choice of an arbitrary intensity threshold. Binary masks (M) were obtained for each acquired image: labeling of CGRP, IB4, PKC γ , and GFP signals. Because EGFP, but not the other markers (PKC γ , IB4, CGRP) can be observed in laminae I and II, the chosen region of interest (ROI) for the subsequent measurements always corresponds to the band labeled with the other markers (after analysis of the dorsoventral distribution of these markers; see above).

For each pair of masks, the overlap pixel percentage was calculated as an index of structure colocalization (Bolte and Cordelieres, 2006; Lachmanovich et al., 2003). For each pair of masks, two overlap percentages were defined as the ratio of the number of pixels included in both masks to the area of each mask in the ROI.

$$\% \text{ area of (1) containing (2)} = \frac{\text{Area}(M_1 \cap M_2)}{\text{Area}(M_1)} \quad (3)$$

To test the statistical significance of this overlap, we compared it with the overlap of two masks with the same area as M_1 and M_2 but with pixels randomly distributed in the ROI. In an ROI with N pixels, containing a subset n_G of green pixels and from which a random sample of n_R (red) pixels is drawn, the probability of obtaining n_{GR} yellow pixels is given by the hypergeometric distribution (Costes et al., 2004). In our case, $N = \text{area}(ROI)$, $n_G = \text{area}(M_1)$ and $n_R = \text{area}(M_2)$. The expected number of randomly overlapping pixels is the mean of the hypergeometric distribution, $n_G \cdot n_R / N$. To test for a significant overlap, we calculated the probability of obtaining $\text{area}(M_1 \cap M_2) \geq n_G \cdot n_R / N$.

The expected percentage area of (1) containing (2) according to this distribution therefore corresponds to:

$$\text{Expected \% area of (1) containing (2)} = \frac{\text{Area}(M_2)}{\text{Area}(ROI)} \quad (4)$$

For each marker, we obtained observed and expected overlaps from six animals (using three to five histological sections in each animal) and compared them statistically using the paired Wilcoxon signed rank test.

Morphometric analysis

Original images from the confocal microscope were saved in the Zeiss LSM format, and exported as TIFF files. Neurons were reconstructed using NeuroLucida (MBF

Bioscience) or Neuromantic (<http://www.reading.ac.uk/neuromantic/>). The images containing the reconstructed neuron as projected into the three classical planes (parasagittal, horizontal, transverse) were then saved as binary JPEG images for illustration and further analysis.

The morphometric analysis (Russ, 1999) was performed using two ImageJ plugins: Shape Descriptors (G. Chinga) and Hull and Circle (A. Karperien and T.R. Roy). The rostro-caudal spread of a neuron is the rostrocaudal dimension of a rectangle (one side parallel to the spinal cord dorsal surface) enclosing its whole dendritic tree and cell body. The solidity is the ratio between the intrinsic area of the neuron (number of black pixels in the binary image) and the area of a convex polygon encompassing the neuron and its processes. The aspect ratio is the ratio of the two axes of the smallest possible ellipse encompassing the neuron (Syverud et al., 2007). We also determined the angle between the long axis of this ellipse and the vertical axis of the image. The fractal dimension was calculated with the box counting method (Bernard et al., 2001) using Benoit software (Trusoft International, St. Petersburg, FL). This software determines the fractal dimension at very small and very large scales, by using boxes of extreme sizes. Because interneurons are objects with a finite size, we took into account only values issued from boxes between 1 and 20 μm (Takeda et al., 1992). For each neuron, the ratio between the number of occupied boxes and the size of the boxes was plotted using a logarithmic scale. The linearity of this relationship was tested for each neuron included in this study: the linear correlation factor (r) was always larger than 0.997 for boxes between 1 and 20 μm . This means that the neurons under study could be considered as fractal objects in this window, and the fractal dimension (D_b) was then defined as the opposite of the curve's slope: $\text{Log}(\text{number of occupied boxes}) = \log a - D_b \cdot \log(\text{box size})$.

Preparation of figures

All figures were prepared in Illustrator CS3 13.0.0 (Adobe Systems, San Jose, CA). Contrast and/or brightness of micrographs in some panels were adjusted for clarity.

RESULTS

Transgenic ChAT::EGFP mice express EGFP in the spinal cord

EGFP expression could be observed throughout the spinal cord (Fig. 1A1). As expected from the density and size of cholinergic neurons, the signal was stronger in the ventral horn. However, both cell bodies and fibers were clearly labeled by EGFP in the superficial dorsal horn (Fig. 1B1,C).

EGFP⁺ cell bodies were rare in the dorsal horn; on average, there were 2.8 ± 0.3 per 50- μm -thick transverse section ($n = 5$ animals, 50 sections analyzed) and thus

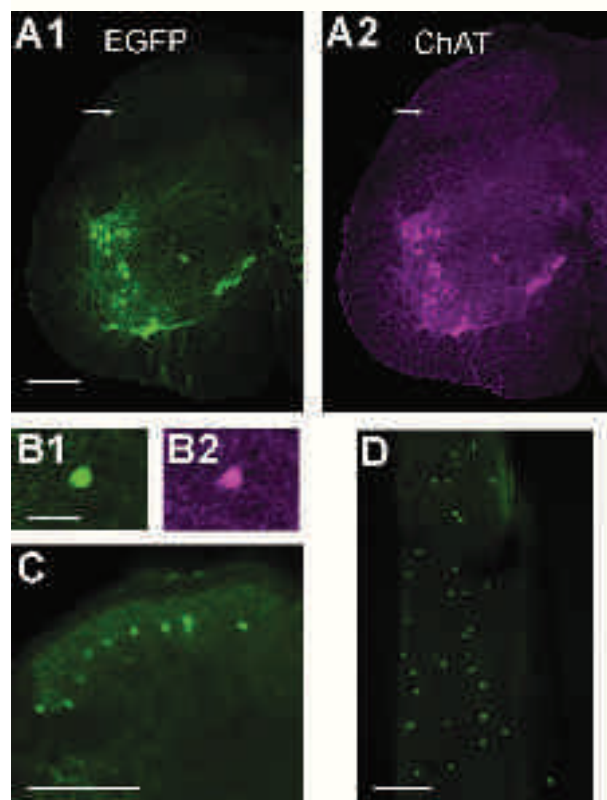


Figure 1. ChAT labeling in the spinal cord of ChAT::EGFP transgenic mice. **A:** Intrinsic EGFP signal (A1) and anti-ChAT immunolabeling (A2) in a 50- μm -thick transverse section of spinal cord from a ChAT::EGFP transgenic mouse. A single ChAT::EGFP interneuron (arrow) is observed in the dorsal horn. **B:** Higher magnification photomicrographs of the ChAT::EGFP dorsal horn neuron observed in **A:** intrinsic EGFP signal (B1) and anti-ChAT immunolabeling (B2). **C:** Intrinsic EGFP signal in the dorsal horn in a thicker section (100 μm) in which multiple ChAT::EGFP neurons can be observed as well as a plexus of ChAT::EGFP fibers dorsal to these neurons. **D:** Intrinsic EGFP signal in a horizontal section of a hemispinal cord (50 μm thick). The section was obtained at the level of the ChAT::EGFP dorsal horn interneurons observed in **C**. Scale bars = 200 μm in A,C,D; 25 μm in B.

approximately 24 per spinal segment. Immunostaining with anti-ChAT antiserum demonstrated an almost complete colocalization with EGFP. In the dorsal horn, 100% of ChAT-immunopositive neurons were EGFP⁺ ($n = 5$ animals, 474 neurons analyzed), whereas ChAT immunolabeling could be detected in $97.6\% \pm 1.6\%$ of EGFP⁺ neurons ($n = 5$ animals, 485 neurons analyzed; Fig. 1).

Morphological features of dorsal horn cholinergic neurons

ChAT::EGFP cell bodies were located on average at a distance of $87.4 \pm 2.4 \mu\text{m}$ from the dorsal edge of lamina I ($n = 3$ animals, 39 neurons analyzed). Using their intrinsic EGFP fluorescence, we reconstructed 30 of these

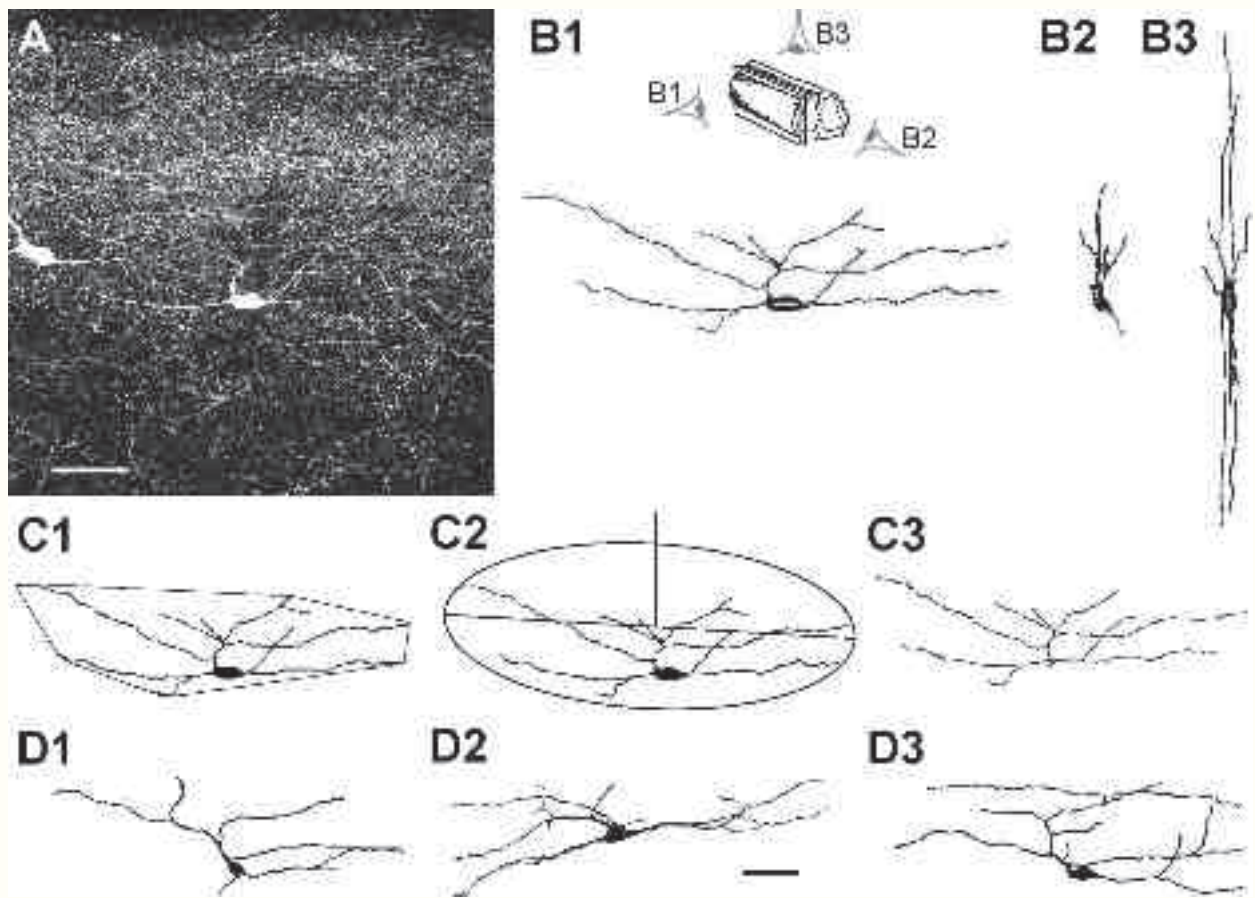


Figure 2. Intrinsic fluorescence of ChAT::EGFP dorsal horn interneurons. **A:** Intrinsic fluorescence of two ChAT::EGFP dorsal horn neurons in a parasagittal section of the spinal cord. The image was obtained from the projection of a stack of confocal images acquired at 0.22- μm intervals in Z. Dorsal side is up. **B:** Projections of the neuron shown in the middle of A after its three-dimensional reconstruction. The neuron was projected in three planes, as if viewed in the three classical section orientations (see inset in B1): parasagittal (B1), transverse (B2), and horizontal (B3). Same scale as in A. **C:** Example of lines used to describe quantitatively the morphology of the neurons: smallest polygon encompassing the neuron (C1), ellipse encompassing the neuron with the long axis giving its main orientation (angle with the vertical line of the figure; C2), and skeleton of the same neuron, used to measure the complexity of the structure (C3). **D:** Three other examples of reconstructed ChAT::EGFP neurons from parasagittal sections. Only the parasagittal view is shown. Note that all neurons have similar morphological characteristics. Scale bars = 50 μm .

neurons and analyzed their morphological properties (see Materials and Methods; Fig. 2C, Table 2). The first observation is that the reconstructed neurons form a rather homogenous population from a morphological point of view, in that the dispersion of the values was low for each of the seven parameters studied.

The low solidity value (0.087 ± 0.008) indicates that the neurons and their processes occupy an important space relative to their intrinsic area: the reason is that the cell body is relatively small, on average $23.1 \pm 0.9 \mu\text{m} \times 11.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ($n = 30$), and the processes are thin and long.

For a hypothetical neuron with processes evenly distributed around the cell body, the mean aspect ratio would be close to 1. The aspect ratio of EGFP⁺ cells is 4.25 ± 0.30 , which reflects the fact that these neurons

have an elongated shape along a preferential axis. The mean angle of $95.0^\circ \pm 3.1^\circ$ indicates that this axis is perpendicular to the vertical axis of the picture, i.e. is rostrocaudal. Along the rostrocaudal axis, the processes are evenly distributed rostrally ($51.2\% \pm 2.1\%$ of the neuron area) vs. caudally ($48.7\% \pm 2.4\%$) to the cell body ($P > 0.05$, $n = 30$). There is, however, a marked anisotropy along the dorsoventral axis: $60.9\% \pm 2.6\%$ of the neuron area is located dorsally to the soma, whereas $39.1\% \pm 2.6\%$ is located ventrally ($P < 0.001$, $n = 30$).

As concerns the organization of the dendritic tree, EGFP⁺ neurons have an average of 3.6 ± 0.1 primary dendrites and 8.3 ± 0.6 endings (a term encompassing both dendrites and axons). The complexity of the dendritic tree was quantified by the fractal dimension, as measured by the box counting method. For boxes between 1

TABLE 2.
Morphometric Features of ChAT::EGFP Dorsal Horn Neurons¹

	Solidity	Aspect ratio	Angle (°)	Fractal dimension	Number of primary dendrites	Number of endings	L Soma (µm)	I Soma (µm)	Dorsal (%)	L total (µm)
EGFP (parasag)	0.087 ± 0.008	4.25 ± 0.30	95.0 ± 3.1	1.069 ± 0.005	3.6 ± 0.1	8.3 ± 0.6	23.1 ± 0.9	11.6 ± 0.4	60.9 ± 2.6	280.1 ± 14.8
Biocytin (parasag)	0.053 ± 0.006	3.73 ± 0.41	90.1 ± 3.2	1.097 ± 0.022	4.0 ± 0.3	32.5 ± 12.4	19.0 ± 0.8	11.9 ± 0.5	78.8 ± 3.0	485.6 ± 33.3
[P vs. EGFP (parasag)]	(P < 0.01)	(P = 0.47)	(P = 0.48)	(P = 0.23)	(P = 0.28)	(P < 0.01)	(P < 0.01)	(P = 0.70)	(P < 0.01)	(P < 0.01)
Biocytin (horiz)	0.069 ± 0.006	9.27 ± 1.75	N.D.	1.133 ± 0.025	4.3 ± 0.5	20 ± 3.2	17.3 ± 3.2	N.D.	85.6 ± 0.7	539.9 ± 56.2
[P vs. biocytin (parasag)]	(P = 0.07)	(P < 0.05)		(P = 0.32)	(P = 0.39)	(P = 0.10)	(P = 0.08)		(P < 0.05)	(P = 0.48)

¹The analysis was performed on projection in the parasagittal plane of neurons reconstructed using their intrinsic fluorescence in parasagittal sections (EGFP parasag., first row, n = 30), and after intracellular biocytin labeling in living parasagittal (biocytin parasag, n = 8) or horizontal (biocytin horiz, n = 12) slices. Statistical differences were tested with a Mann-Whitney nonparametric test.

and 20 µm, all analyzed neurons were fractal objects. The low average fractal dimension of 1.069 ± 0.005 indicated a low complexity of their dendritic tree.

The low level of branching and number of endings might be biased, insofar as we reconstructed neurons from stacks of confocal images using their intrinsic EGFP fluorescence. This allowed analysis of a large population. However, because their dendrites have a preferential dorsal outgrowth, neurons sooner or later reached a dense EGFP⁺ plexus located in more superficial layers, and it became difficult to distinguish them from the background. Hence, we proceeded by reconstructing biocytin-filled EGFP⁺ neurons.

Biocytin-filled cholinergic interneurons in parasagittal spinal slices

EGFP neurons reconstructed after intracellular biocytin filling in parasagittal acute slices (n = 8) demonstrated morphological features similar to those previously described (Fig. 3). Morphometric parameters differed slightly, because thinner processes could be detected and reconstructed in biocytin-injected neurons. In particular, their average total rostrocaudal length was greater than initially estimated: $485.6 \pm 33.3 \mu\text{m}$ (n = 7) vs. $280.1 \pm 14.8 \mu\text{m}$ (n = 28). Similarly, the number of endings of biocytin-filled cells was greater (32.5 ± 12.4 , n = 8) than when quantified from reconstructions using the intrinsic fluorescence. This also had an impact on the average solidity factor, which was significantly lower (Table 2). However, the aspect ratio was not different, nor was the angle or the fractal dimension. Biocytin-filled EGFP⁺ neurons also demonstrated an elongated shape along the rostrocaudal axis, and the preferential outgrowth of processes in the dorsal direction was even more pronounced than estimated above (Fig. 3, Table 2).

We only occasionally identified the axon among reconstructed processes, but only over a very short distance. It is possible that neuron processes were severed in parasagittal slices. We therefore switched to horizontal slices to obtain a more complete view of the neuronal morphology.

Biocytin-filled cholinergic interneurons in horizontal spinal slices

Cell bodies of dorsal horn cholinergic interneurons were located in laminae III–IV, with a distance of $158.2 \pm 15.9 \mu\text{m}$ from the spinal dorsal surface (n = 3 animals, 39 neurons analyzed; see Fig. 1D). Hence, we used the most superficial 250-µm-thick acute horizontal slice and approached neurons from the ventral side.

Biocytin-filled EGFP⁺ neurons were reconstructed in 3D, and parasagittal projections of the cells were compared with data obtained in parasagittal slices. We observed similar average morphological features, with a marked rostrocaudal extension of the dendritic tree for most of the

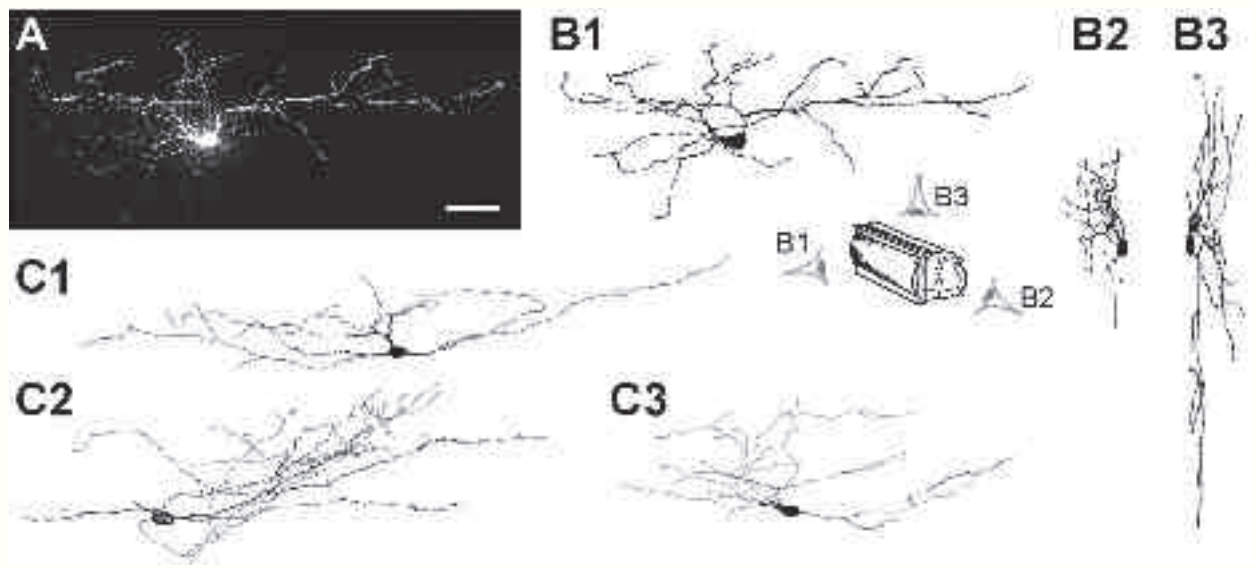


Figure 3. Biocytin-filled ChAT::EGFP dorsal horn interneurons from parasagittal slices. **A:** Image of a ChAT::EGFP dorsal horn neuron recorded in a parasagittal slice of the spinal cord, filled with biocytin, and then revealed with a fluorescent streptavidin. Dorsal side is up. **B:** Projection of the reconstructed neuron shown in A, as if viewed in the three classical section orientations (see inset): parasagittal (B1), transverse (B2), and horizontal (B3). Same scale as in A. **C:** Three other examples of reconstructed ChAT::EGFP neurons filled with biocytin in a parasagittal spinal slice. Only the parasagittal view is shown. Note that all neurons have the same morphological characteristics: long rostrocaudal extension, preferential dorsal outgrowth of dendrites. Same scale as in A. Scale bar = 50 μ m.

neurons (Fig. 4A–C). However some neurons, located farther from the lateral surface (always presented on the left of the reconstructions; Fig. 4D), appeared truncated; their proximal dendrites were oriented in the lateromedial direction. These are deeper ChAT::EGFP neurons that may display slightly different morphological characteristics.

The axon of ChAT::EGFP neurons was only occasionally labeled, and the rate of success was higher with the electroporation technique than with patch-clamping, probably because of the voltage pulses used for electroporation. Axons usually first climbed dorsally toward one side (medial in the example shown in Fig. 5A, lateral in the examples shown in Fig. 5B; see reconstruction in the transverse plane in Fig. 5A2). After 350–500 μ m, the axon bifurcated with a T-shape (or a square angle) and traveled rostrocaudally over a distance of almost 2 mm. In all cases, the axon appeared truncated, suggesting innervation of even more distant territories.

Neurochemical and electrophysiological properties of cholinergic interneurons

In the rat, lamina III cholinergic interneurons have been described as forming a subpopulation of GABAergic neurons also expressing NADPH (Laing et al., 1994; Todd, 1991). We tested whether this was also the case in the mouse.

We performed an anti-GABA immunolabeling in spinal transverse sections from ChAT::EGFP mice (Fig. 6A). GABA-immunoreactive (IR) signal was observed in the su-

perficial dorsal horn, mainly in laminae I–III (Fig. 6A); 95.5% \pm 1.0% of ChAT::EGFP dorsal horn neurons were GABA-IR ($n = 3$ animals, 110 neurons analyzed). An anti-nNOS antibody labeled numerous neurons in spinal parasagittal histological sections from ChAT-EGFP mice (Fig. 6B). All lamina III EGFP⁺ neurons were bNOS-IR ($n = 2$ animals, 285 neurons analyzed). ChAT::EGFP neurons formed 57% of all bNOS-IR located in lamina III ($n = 2$ animals, 269 neurons analyzed).

We analyzed the firing properties of 15 ChAT::EGFP neurons recorded in whole-cell patch-clamp configuration from horizontal slices of young adult mice (P21–P30). Among these, 10 neurons presented a repetitive type of firing pattern (Fig. 7A). This firing was characterized by a linear increase in the number and frequency of spikes upon injection of depolarizing current pulses of increasing intensity (Fig. 7C,D), a defining criterion for tonic firing cells (Prescott and De Koninck, 2002). Among the 10 neurons with a repetitive firing, seven presented rebound spikes at the end of hyperpolarizing current pulses (Fig. 7B), and four fired spontaneously at resting potential. One neuron exhibited a clearly phasic firing behavior, with bursts of action potentials at the onset of the depolarization. These bursts were composed of an increasing number of spikes upon injection of current pulses of increasing intensity, characteristic of phasic firing neurons (Prescott and De Koninck, 2002); however, the interspike interval (ISI) was unchanged (Fig. 7C,D). Indeed,

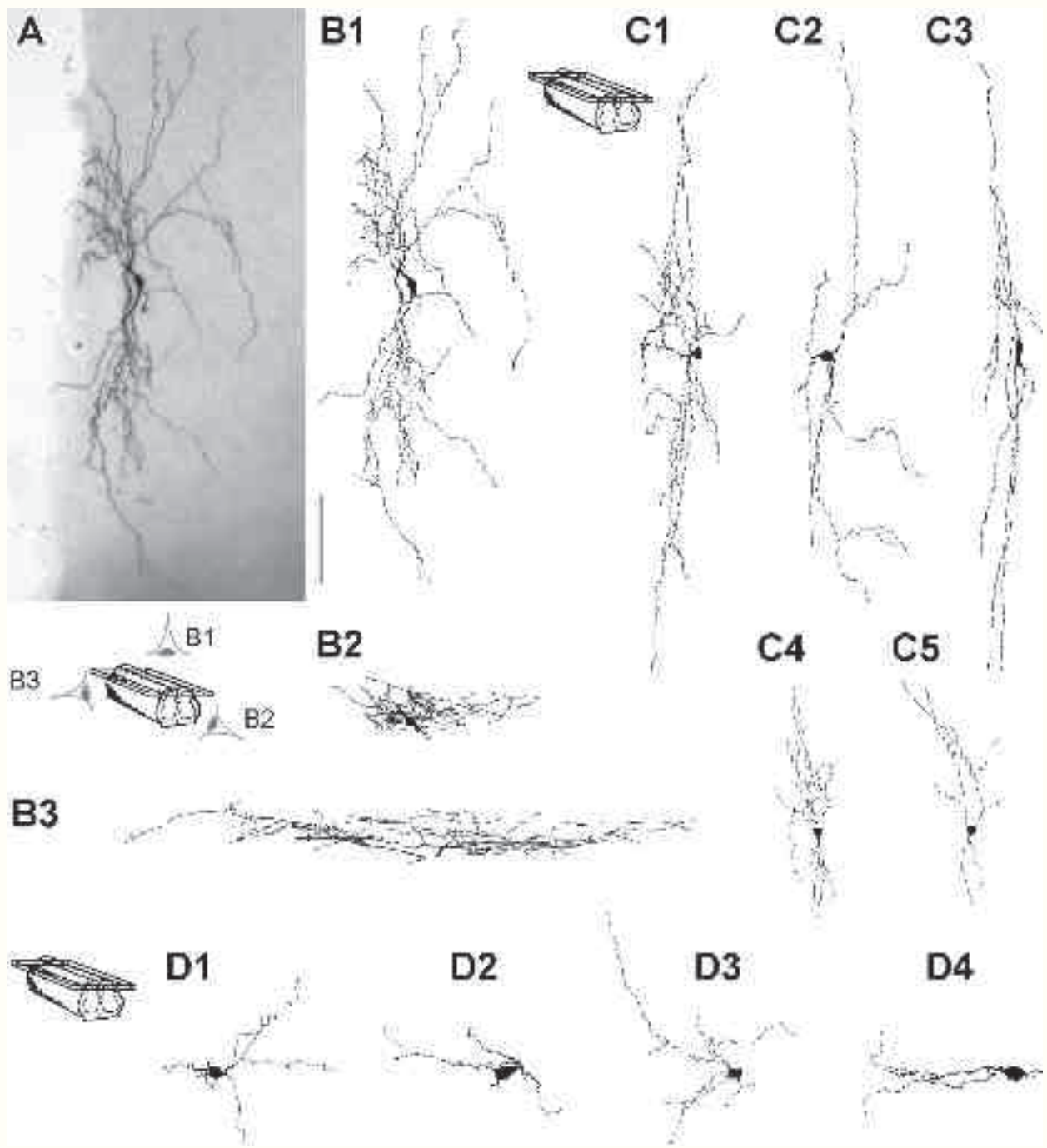


Figure 4. Biocytin-filled ChAT::EGFP dorsal horn interneurons from horizontal slices. **A:** Image of a ChAT::EGFP dorsal horn neuron recorded in a horizontal slice of the spinal cord, filled with biocytin and revealed with DAB. The lateral edge of the spinal cord is to the left. **B:** Projection of the reconstructed neuron shown in A, viewed in the same horizontal plane (B1), or in a transverse (B2) or parasagittal (B3) section (see inset). **C:** Five other examples of reconstructed ChAT::EGFP neurons filled with biocytin in a horizontal spinal slice, sharing the same morphological features as the neuron in A. Only the horizontal view is shown with the lateral edge of the spinal cord to the left. Same scale as in A. **D:** Four additional examples of reconstructed ChAT::EGFP neurons filled with biocytin in a horizontal spinal slice, with slightly different morphological features. Only the horizontal view is shown with the lateral edge of the spinal cord to the left. Same scale as in A. Scale bar = 100 μ m.

the coefficient of variation of the ISI upon injection of different current pulses in this neuron was of 0.05, whereas it was larger than 0.3 (and up to 1.6) in neurons with re-

petitive firing. The four remaining neurons discharged only one or two spikes with the largest tested depolarization (Fig. 7C).

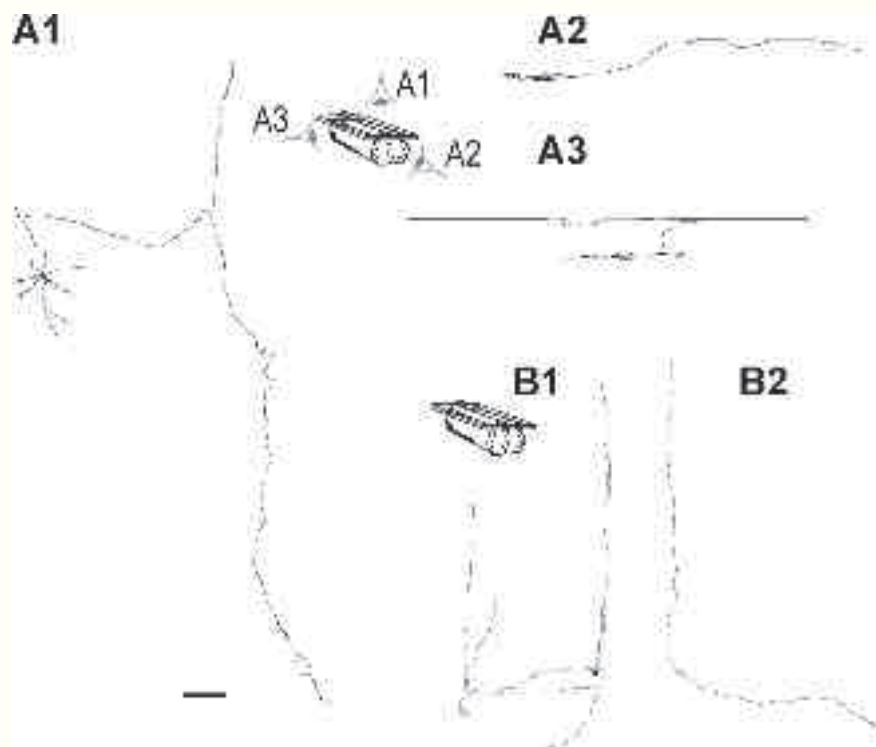


Figure 5. Axonal projections of biocytin filled ChAT::EGFP dorsal horn interneurons from horizontal slices. **A:** Reconstruction of a ChAT::EGFP dorsal horn neurons filled with biocytin in a horizontal slice of the spinal cord. Projections as if viewed in the three classical section orientations (see **inset**): horizontal with the lateral edge of the spinal cord to the left (A1), transverse (A2) and parasagittal with the dorsal to the top (A3). The dendrites are not fully presented for increased clarity. Note that the axon travels to the medial cord (slightly dorsally) before forming a T and running in the rostrocaudal direction. **B:** Two other examples of reconstructed ChAT::EGFP neurons filled with biocytin in a horizontal spinal cord slice, with the axon visible. Only the horizontal view is shown, with the lateral edge of the spinal cord to the left. The dendrites are not fully presented for increased clarity. In these two examples, the axon travels to the lateral cord before turning in the rostrocaudal direction. Same scale as in A. Scale bar = 100 μm .

Dorsal horn cholinergic fiber plexus

We took advantage of the high level of expression of EGFP not only in cell bodies but also in neuronal processes to study the distribution of ChAT::EGFP profiles in the dorsal horn of the spinal cord (Fig. 8). There were two peaks of EGFP signal along a dorsoventral axis in the superficial dorsal horn: one at the dorsal border of the gray matter, the other, larger and more intense, centered 60 μm more ventral (Fig. 8B). This second peak corresponds to what is referred to hereafter as the plexus and was composed almost exclusively of processes, insofar as EGFP⁺ cell bodies were located in deeper laminae (see above). Between these two peaks, there was consistently a dark $\sim 20\text{-}\mu\text{m}$ -wide band.

We localized more precisely the ChAT::EGFP plexus by performing a Nissl staining that allowed us to follow standard lamination criteria (Fig. 8A). Those were in particular the low density of cells in LI, in strong contrast with the high density (packing) of small cells in outer lamina II and the lower density of small cells in inner lamina II (Cordero-Erausquin et al., 2009; Lorenzo et al., 2008;

Ribeiro-da-Silva and Paxinos, 2004). The cholinergic plexus was located just ventral to the packing of cell bodies observed in outer lamina II and was therefore localized in inner lamina II (LIIi; Fig. 8A).

The overall aspect of the plexus was strikingly different depending on the sectioning plane. The signal was mainly punctiform in the transverse plane, but it appeared to be composed of individual fibers running in the rostrocaudal axis in the parasagittal plane (Fig. 8C1,2). We quantified this difference by performing an analysis of the autocorrelation of the signal along the two axes of the pictures. This analysis showed that EGFP⁺ fibers (objects defined by EGFP signal) have similar spreads in the dorsoventral and lateromedial axes (transverse sections), although they are elongated in the rostrocaudal axis (parasagittal sections; Fig. 8C3,4).

We then compared the localization of the ChAT::EGFP plexus with classical markers of the superficial dorsal horn: PKC γ , IB4, and CGRP. As reported in the literature, deep laminae were devoid of PKC γ labeling (Malmberg et al., 1997; Polgar et al., 1999), but an intense band of labeling

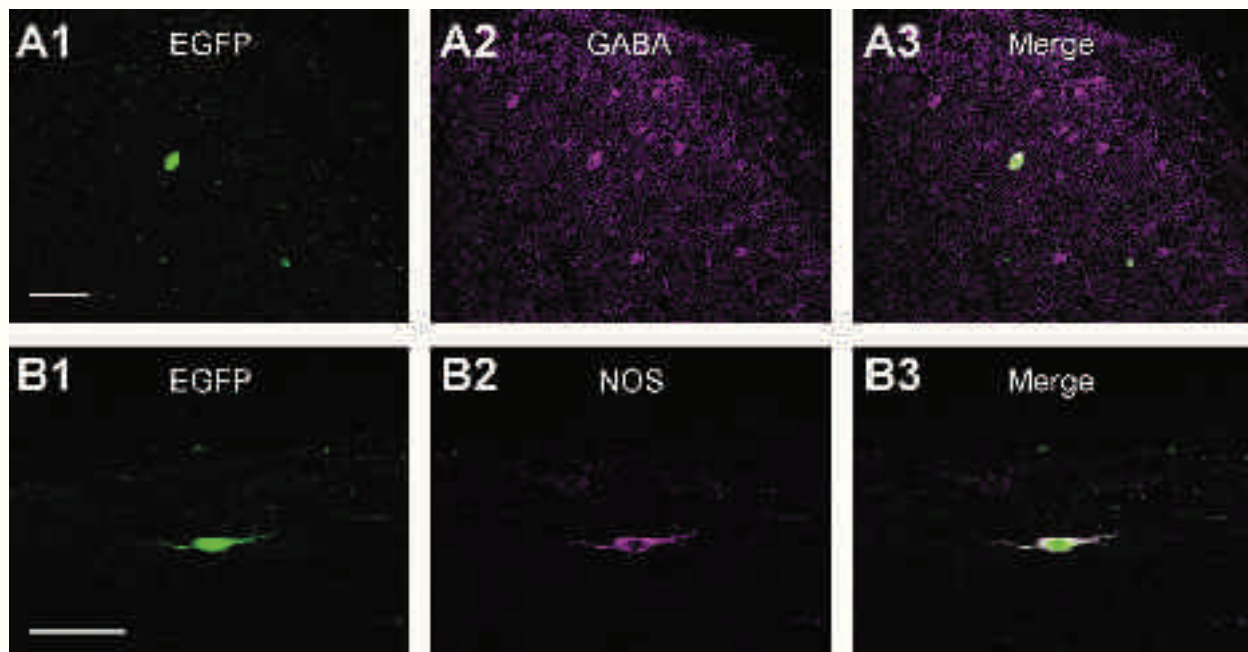


Figure 6. Neurochemical properties of ChAT::EGFP dorsal horn neurons. **A:** Comparison of GABA staining and the ChAT::EGFP signal in a transverse section of the dorsal horn (0.48- μm optical section). A ChAT::EGFP neuron is shown (A1) that colocalizes with GABA (A2,3). **B:** Comparison of bNOS staining and the ChAT::EGFP signal in the dorsal horn from a parasagittal section (0.42- μm optical section). All ChAT::EGFP neurons displayed bNOS immunoreactivity. Scale bars = 50 μm .

was centered at $\sim 60 \mu\text{m}$ and a fainter and more diffuse labeling was dorsal to this band. The IB4 labeling was concentrated in a band centered at $\sim 40 \mu\text{m}$, and the anti-CGRP antibody labeling was restricted mostly to the most superficial layers (Fig. 8D–F). At the macroscopic level, the PKC γ intense band perfectly overlapped with the aforementioned EGFP plexus, the most ventral part of the IB4 band overlapped with the EGFP plexus, and the CGRP labeling was mostly dorsal to the EGFP lamina III plexus but overlapped with the EGFP fibers observed in lamina I (Fig. 8D4,E4,F4).

A colocalization analysis was performed on thin (0.5 μm) optical sections obtained with a confocal microscope, calculating, for each animal, the probability of the overall observed overlap between EGFP and PKC γ (IB4, CGRP, respectively) signals (see Materials and Methods; Fig. 9). A paired comparison (Wilcoxon signed rank test, $n = 6$ animals) was performed for the observed and expected percentage areas of overlap. There was no significant overlap of EGFP and PKC γ signals, nor of EGFP and IB4 signals ($n = 6$, $P > 0.2$ in both cases). For two of six animals analyzed for IB4 labeling, we observed that the average percentage area of EGFP containing IB4 was slightly ($< 2\%$) but significantly more than the expected value in lamina II (Fig. 9). There was a more pronounced overlap of CGRP and EGFP signals lamina I. The average percentage area of EGFP containing CGRP was greater than the expected value by $6.9\% \pm 1.3\%$ ($n = 6$, $P <$

0.05 paired Wilcoxon signed rank test), and the difference was significant in all six animals analyzed (Fig. 9). This presence of CGRP-IR fibers in the EGFP signal suggests that some of the EGFP signal in lamina I may arise from EGFP $^{+}$ neurons located in the DRGs and expressing CGRP. This peripheral origin of spinal EGFP signal is however limited to $\sim 7\%$ in lamina I, suggesting that it is not the main source of EGFP $^{+}$ fibers.

EGFP $^{+}$ neurons in the DRGs

We indeed observed EGFP $^{+}$ neurons in DRG histological sections (Fig. 10). In L2–L5 DRGs, the average number of EGFP $^{+}$ neurons per DRG was 78.5 ± 9.8 (3.2 ± 1.0 neuron per 14- μm -thick section, $n = 2$ animals, eight DRGs). They were more numerous in L1 DRGs: 406.5 ± 66.5 neurons per DRG (10.6 ± 0.6 neuron per 14- μm -thick section, $n = 2$ animals). We analyzed the size of EGFP $^{+}$ neurons in the DRGs by measuring the surface occupied by their cell bodies in 14- μm -thick histological sections; 52.6% of EGFP $^{+}$ neurons ranged in size from 200 to 500 μm^2 , and the average surface was $489.0 \pm 57.8 \mu\text{m}^2$ ($n = 3$ animals, 154 neurons analyzed).

We used, respectively, NF200, IB4, and CGRP as markers of myelinated, nonpeptidergic, and peptidergic primary afferents to characterize EGFP $^{+}$ DRG neurons further. None of the EGFP $^{+}$ neurons was labeled with the

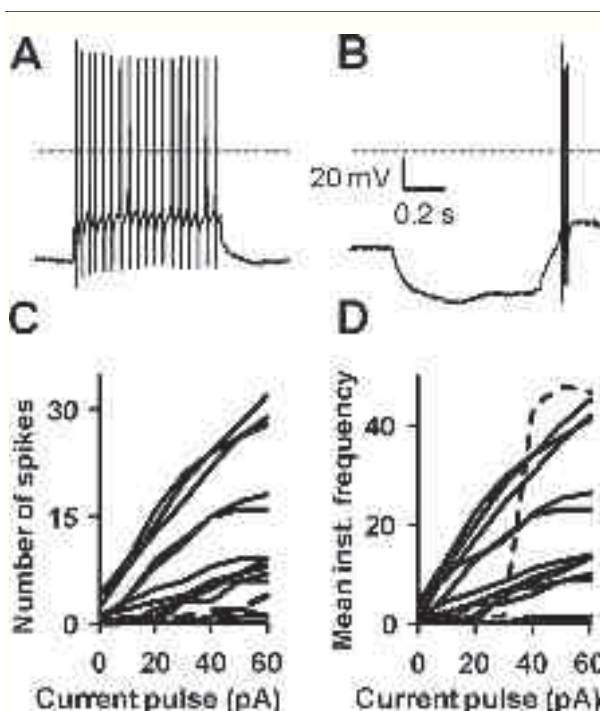


Figure 7. Firing properties of ChAT::EGFP dorsal horn neurons. **A:** Example of repetitive discharge pattern of a ChAT::EGFP neuron depolarized by current injection (+60 pA in this case). This was the most common ($n = 10/15$) type of discharge pattern encountered in this population. **B:** Among the tonic firing neurons, over two-thirds presented rebound spikes at the end of hyperpolarizing current pulses (-30 pA in this case; same neuron as in A). **C:** Number of action potential fired by ChAT::EGFP recorded neurons upon injection of depolarizing current pulses of increasing intensity. Each line represents the profile of an individual neuron. Most neurons showed a linear increase in the number of spikes. One neuron (represented with a broken line) had a phasic discharge pattern as characterized in D. **D:** Mean instantaneous spike frequency of all ChAT::EGFP recorded neurons during a depolarizing pulse of increasing intensity. Most neurons showed a linear increase in the frequency of spikes, but one neuron (represented with a broken line; same neuron outlined in C) that exhibited a fixed instantaneous spiking frequency independent of the injected current pulse (over +40 pA).

anti-NF200 antibody ($n = 2$ animals, 176 neurons analyzed; results not shown). A small proportion of EGFP⁺ neurons, $5.2\% \pm 1.6\%$, demonstrated IB4 labeling, which could explain the existence of a limited overlap between EGFP and IB4 signal in some spinal sections (Fig. 10A; $n = 3$ animals, 481 neurons analyzed). EGFP⁺ neurons represented $0.5\% \pm 0.2\%$ of IB4⁺ neurons ($n = 3$ animals, 6,469 neurons analyzed). In contrast, $92.7\% \pm 5.5\%$ of EGFP⁺ neurons in the DRGs were labeled with an anti-CGRP antibody ($n = 3$ animals, 292 neurons analyzed). Almost all EGFP⁺ neurons in the DRGs express CGRP, but only $\sim 7\%$ of EGFP⁺ fibers in lamina I are labeled with CGRP, suggesting further that the majority of lamina I

EGFP⁺ fibers do not arise from the DRGs. EGFP⁺ neurons represented $9.2\% \pm 1.5\%$ of CGRP-IR neurons in these DRG sections ($n = 3$ animals, 2,590 neurons analyzed; Fig. 10B).

When we used an anti-ChAT antibody to control for ChAT expression, we found no signal throughout the DRGs (Fig. 10C). This might be explained either by a low level of ChAT expression (below threshold for detection) in DRGs or by expression of a peripheral form of ChAT (pChAT) that would not be recognized by our antibody (Chemicon, Temecula, CA; AB144p). pChAT expression has been described in DRGs (Bellier and Kimura, 2007). EGFP should label not only neurons that express “common” (cChAT) but also its splice variant pChAT, because their transcription is regulated by the same promoter.

DISCUSSION

With ChAT::EGFP transgenic mice, we have characterized the morphological properties of ChAT::EGFP-expressing neurons in the dorsal spinal cord, to evaluate their potential contribution to the modulatory effects of ACh on nociceptive pathways. We demonstrate that spinal laminae III–IV cholinergic neurons, although in very low numbers, have unique morphological properties that enable them to collect information over a long range and to innervate the superficial dorsal horn densely. Our data also suggest that spinal cholinergic interneurons are the major source of ACh modulating nociceptive transmission at the spinal level.

Dorsal horn cholinergic interneurons: technical issues

The contribution of primary afferents to the lamina III ChAT::EGFP plexus appears minimal and our data clearly demonstrate that dorsal horn cholinergic interneurons abundantly contribute to this plexus. This was suggested by earlier work in the rat, using ChAT immunolabeling (Barber et al., 1984; Olave et al., 2002). We have characterized the morphological properties of these neurons in greater detail, taking advantage of ChAT::EGFP transgenic mice and the possibility of labeling intracellularly individual ChAT neurons. Because earlier description of these neurons mentioned a preferential rostrocaudal orientation of their dendritic arbor (Barber et al., 1984), we favored parasagittal and horizontal sections to analyze their morphological characteristics. It should be considered that the bending of the superficial layers of the spinal cord may somehow distort the interpretation of the orientation of the dendritic arbor (Cordero-Erausquin et al., 2009). If a neuron located in the lateral lamina III–IV has dendrites oriented toward the superficial layers, those dendrites might appear to be oriented “laterally” rather than “dorsally.” It is therefore important to

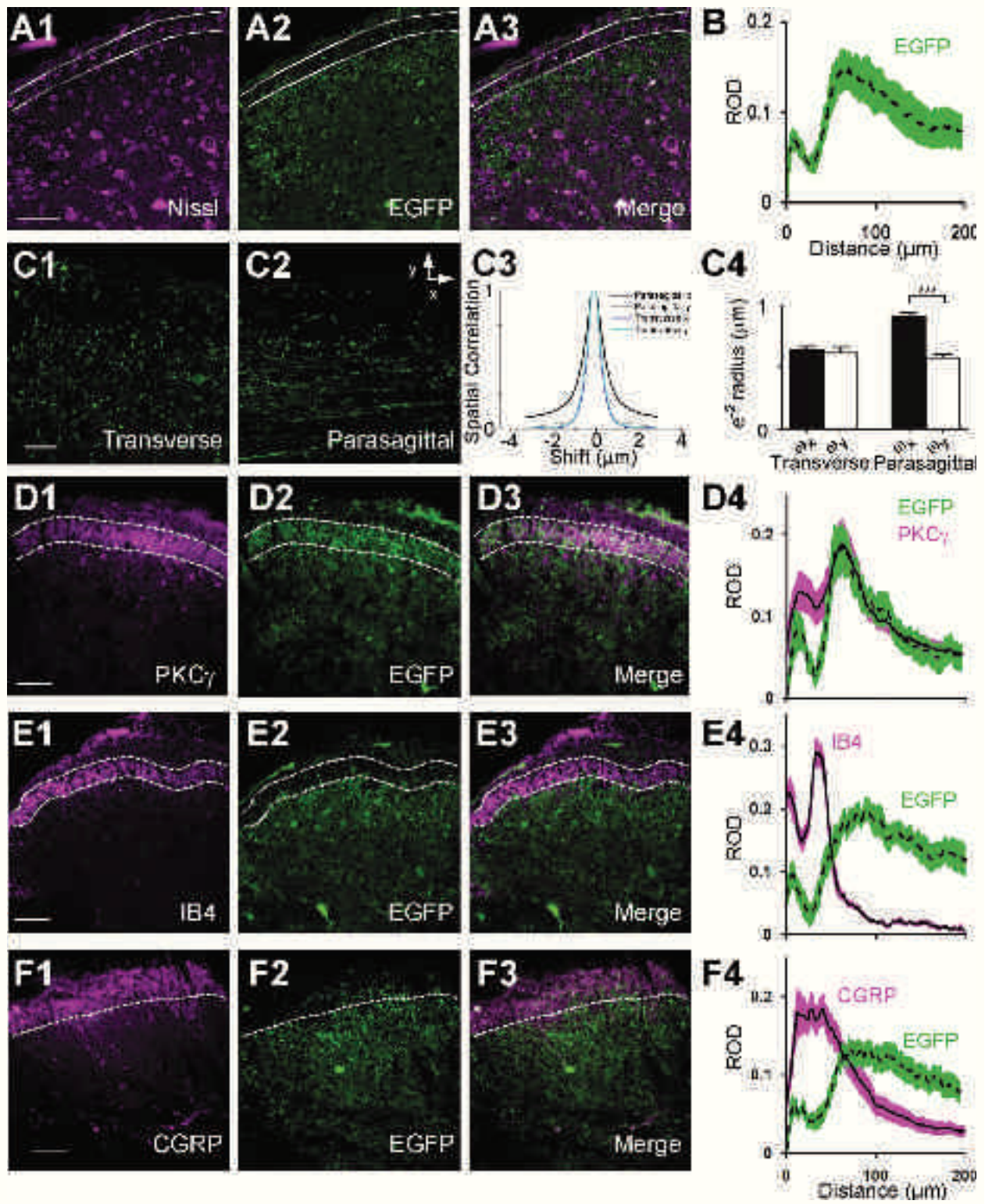


Figure 8

reconstruct the neurons in three dimensions and to preserve the information about the position of their cell bodies within the dorsal horn.

Some of the intracellular labeling of ChAT::EGFP neurons was performed in live 300- μ m-thick parasagittal spinal slices. Given the thickness of these slices, the

bending of the dorsal horn laterally clearly occurred within the slice, making it difficult to indicate precisely the laminar localization of a given neuron. Such slices also contain numerous ChAT::EGFP neurons located deeper in the spinal cord (either close to the central canal or in the lateral cord) that were beyond the scope of our study. To avoid labeling these medial ChAT::EGFP neurons, we focused on those EGFP⁺ neurons that were just ventral to the lamina III EGFP⁺ plexus that was clearly visible in parasagittal slices. This selection of the neurons could have introduced a bias, insofar as some EGFP⁺ neurons located in the middle of lamina IV are at some distance from the plexus and might have been under-sampled. However, we then proceeded to similar intracellular labeling in 250- μ m-thick horizontal slices and chose ChAT::EGFP neurons independently of their position within the slice. We therefore believe that there was no major bias in the sampling of neurons in horizontal slices.

Dorsal horn cholinergic interneurons: morphological, neurochemical, and membrane properties

We performed three-dimensional reconstructions of ChAT::EGFP neurons using different approaches, either by exploiting their intrinsic EGFP fluorescence or by intracellular biocytin filling in living slices and revealing it either by fluorescent streptavidin or by streptavidin-HRP and DAB histochemistry. The latter gave the most satisfactory labeling of distal, thin processes.

Whatever the approach, it demonstrated that ChAT::EGFP neurons had a unique morphological signature.

Their cell bodies were located in lamina III, but the dorsoventral distribution of their dendritic processes was significantly asymmetric. The preferentially dorsally directed processes displayed an extensive rostrocaudal spread in lamina II. Their rostrocaudal extension was as long as the longer lamina II interneurons, i.e., islet cells (Yasaka et al., 2007), explaining how such a sparse population of neurons can be a major contributor to the dense lamina III cholinergic plexus (Fig. 11).

To investigate further the function of these neurons, we determined their phenotype and their electrophysiological characteristics. Studies in the rat have shown that cholinergic interneurons are a subpopulation of GABAergic, nonglycinergic neurons (Todd, 1991) and are NADPH immunoreactive (Spike et al., 1993). Our results demonstrate that ChAT::EGFP dorsal horn neurons are also GABAergic and bNOS-IR (presumably corresponding to NADPH-IR) in the mouse. An electron microscopic (EM) study in the rat has shown that ChAT and GABA also coexist in synaptic terminals in lamina II (Ribeiro-da-Silva and Paxinos, 2004), further suggesting that those terminals do not arise from primary afferents but rather from ChAT/GABA intrinsic spinal interneurons. The firing properties of ChAT::EGFP neurons were also consistent with those of inhibitory interneurons (Yasaka et al., 2010).

On the peripheral origin of the cholinergic plexus and ChAT-expressing DRG neurons

The EGFP plexus in ChAT::EGFP mice was mainly of spinal origin, as shown by the very limited colabeling with markers of primary afferents. This, however, does not

Figure 8. ChAT::EGFP plexus in the spinal dorsal horn. **A:** Comparison of a Nissl labeling (A1) and the EGFP signal (A2) in a transverse section of the dorsal horn (4- μ m optical section). The EGFP plexus is ventral to the packing of cell bodies (outlined by two dashed lines) characterizing outer lamina II. **B:** Graphic representation of the relative optical density (ROD) of the EGFP intrinsic signal in the dorsal horn of ChAT::EGFP mice. RODs were measured within a rectangle measuring 200 \times 150 μ m placed with one of the shorter sides at the edge of the gray matter and centered in the mediolateral axis of the dorsal horn. The ROD values—obtained by the software along a line parallel to the shorter axis of the rectangle—were exported for every pixel along the dorsoventral axis. The mean \pm SEM is represented for four animals (6–10 sections per animal). Some signal is found in the most superficial layer (0–30 μ m), but the major plexus is centered at a distance of about 60 μ m from the dorsal surface of the spinal gray matter. **C:** Intrinsic EGFP signal in a transverse (C1) and parasagittal (C2) section of spinal cord from a ChAT::EGFP transgenic mouse (0.87- μ m optical section). Note that the EGFP plexus appears to be composed mainly of fibers oriented in the rostrocaudal axis. Spatial autocorrelation functions of the fluorescent signal in the pictures presented in C along the two axes (as indicated in the inset in C2; C3). Bar graph (C4) showing the e^{-2} radii of a one-dimensional Gaussian fit of the spatial autocorrelation functions presented in C3. These values were calculated for four images for both the transverse and parasagittal sections and compared using paired *t*-tests. **D:** Comparison of an anti-PKC γ immunolabeling (D1) and the EGFP signal (D2) in a transverse section of the dorsal horn (14- μ m optical section). The EGFP plexus has the same dorsoventral location as the PKC γ band (outlined by two dashed lines). Graphic representation (D4) of the mean \pm SEM ROD of the EGFP intrinsic signal and PKC γ staining (12 sections, one animal). **E:** Comparison of IB4 staining (E1) and the EGFP signal (E2) in a transverse section of the dorsal horn (14- μ m optical section). The EGFP plexus is ventral to the IB4 band (outlined by two dashed lines). Graphic representation (E4) of the mean \pm SEM ROD of the EGFP intrinsic signal and IB4 staining (eight sections, one animal). **F:** Comparison of anti-CGRP immunolabeling (F1) and the EGFP signal (F2) in a transverse section of the dorsal horn (14- μ m optical section). The EGFP plexus is ventral to the CGRP band (ventral limit outlined by a dashed line). Graphic representation (F4) of the mean \pm SEM ROD of the EGFP intrinsic signal and CGRP staining (eight sections, one animal). Scale bars = 50 μ m in A,D–F; 20 μ m in C.

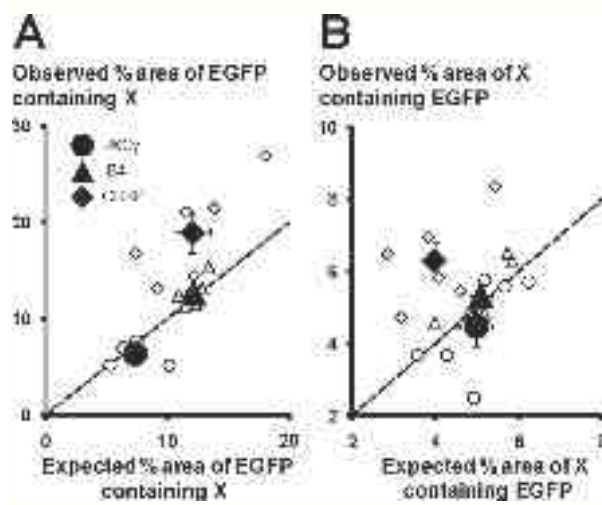


Figure 9. Quantification of the overlap of markers after image segmentation. Masks containing disc-shaped structures with similar dimensions as the PSF were obtained for confocal images from both channels. **A:** The observed percentage area of EGFP containing PKC γ , IB4, or CGRP is represented as a function of the expected percentage area of overlap if both markers were randomly distributed. **B:** The observed percentage area of PKC γ , IB4, or CGRP containing EGFP is represented as a function of the expected percentage area of overlap if both markers were randomly distributed. An observed value larger than the expected for random pixels distribution (hypergeometric) suggests a colocalization of markers. Individual values for each animal ($n = 6$, open symbols) are given as well as the average \pm SEM for each marker (solid symbols).

directly address the question of a contribution of ChAT fibers of peripheral origin to the plexus; indeed, we failed to label EGFP-expressing DRG neurons with our anti-ChAT antibody.

The existence of ChAT neurons in the DRGs has been controversial because of the use of different antibodies that recognize different parts of the protein. Indeed, it has been shown by the group of Kimura that there are two splice variants of the ChAT enzyme, one expressed in the CNS and termed “common” (cChAT) and one expressed predominantly in the PNS and termed “peripheral” (pChAT; Bellier and Kimura, 2011; Tooyama and Kimura, 2000). The main difference between the two forms of ChAT resides in the fact that pChAT lacks exons 6–9 (Tooyama and Kimura, 2000). For the rat, the same group found pChAT, but not cChAT, in the trigeminal nucleus and the DRG (Bellier and Kimura, 2007; Yasuhara et al., 2004). In contrast, a recent study with an antibody against ChAT (AB144p) thought to recognize only the cChAT form (Brehmer et al., 2004; Chiocchetti et al., 2003; Saito et al., 2009) has reported that the vast majority of DRG neurons in mouse are ChAT-IR (Matsumoto et al., 2007). The species difference is not a satisfactory

explanation for this discrepancy, in that we have performed a similar immunostaining with the same antibody and found no labeling in mouse DRGs. It cannot be excluded that, with the antigen unmasking approach used by Matsumoto et al., the AB144p antibody recognizes both ChAT isoforms. Because pChAT and cChAT are splice variants sharing the same promoter, both pChAT-IR and cChAT-IR neurons were expected to express the transgene in ChAT::EGFP mice. The EGFP⁺ neurons that we observed in the DRGs could therefore correspond to pChAT neurons, but their proportion was much lower than what had been observed with pChAT labeling in rats (Bellier and Kimura, 2007).

Most of the literature agrees on only a minor contribution of DRG neurons to the cholinergic plexus found in the spinal lamina II. We and others have demonstrated that the plexus, in contrast to DRG neurons, is labeled when using an anti-ChAT antiserum that does

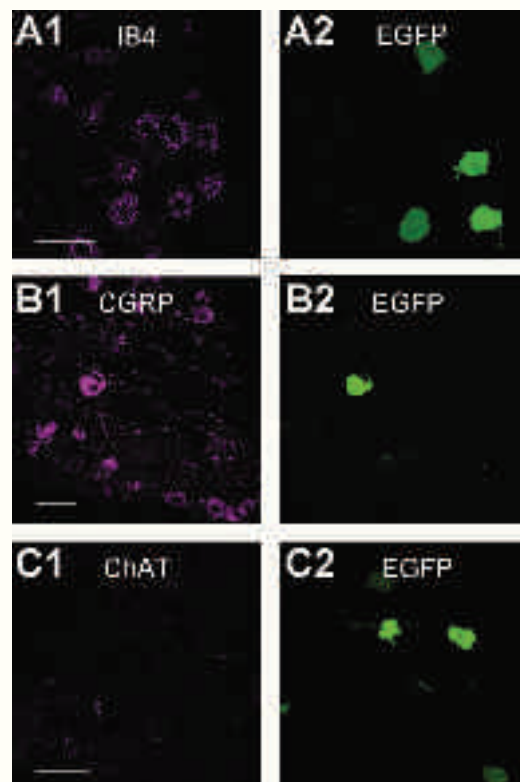


Figure 10. EGFP neurons in the DRGs and their central projection. **A:** Comparison of IB4 staining (A1) and EGFP signal (A2) in a DRG section. Only 4.8% of EGFP⁺ neurons in the DRG were also labeled with IB4. **B:** Comparison of CGRP staining (B1) and the ChAT::EGFP signal (B2) in a DRG section; 86.3% of EGFP⁺ neurons were also labeled with an anti-CGRP antibody. **C:** Comparison of the ChAT (AB144p) antibody staining (C1) and the ChAT::EGFP signal (C2) in a DRG section. Note the lack of labeling in the DRGs with this anti-ChAT antibody. Scale bars = 50 μ m.

not recognize the pChAT form. In addition, EM data from Ribeiro-da-Silva and Cuello (1990) showed that many cholinergic processes within the plexus are part of glomeruli, synaptic arrangements comprising the axon of a primary afferent, a postsynaptic dendrite, and another axon (V2 profile), arising from an intrinsic spinal neuron and presynaptic to the primary afferent terminal and to the postsynaptic dendrite. Within these glomeruli, ChAT-IR has been observed in the postsynaptic dendrite, or in the V2 axon presynaptic to the primary afferent; however, it has never been found in the primary afferent terminal.

These conclusions are in contrast to the suggestion of Matsumoto and colleagues (2007) that all dorsal horn cholinergic fibers in mice arise from DRGs. The authors did not consider spinal cholinergic interneurons as a potential source of cholinergic fibers, probably because they used transverse spinal sections and thus might have underestimated the dendritic arborization of these rare cholinergic interneurons. In addition, one would expect a broader cholinergic plexus in the dorsal horn if most DRG neurons, including IB4-positive neurons, were indeed ChAT-IR. The absence of ChAT-IR fibers in lamina Ilo and the rostrocaudal orientation of cholinergic fibers in lamina Ili are not consistent with a large proportion of ChAT⁺ DRG neurons contributing to these fibers.

Moreover, the functional role of pChAT-expressing DRG neurons is unclear. Because pChAT lacks a serial sequence corresponding to coding exons 6–9, including a sequence that is essential for ChAT activity (Govindasamy et al., 2004), its ability to produce ACh and to be a marker of cholinergic activity has been questioned. Even though data obtained from rat DRG suggest that pChAT is capable of ChAT activity and ACh synthesis (Bellier and Kimura, 2007), the ability of pChAT neurons to take up choline, package ACh into synaptic vesicles, and release ACh from their axon terminals remains to be demonstrated. In the rat, capsaicin stimulation of spinal transverse slices did not produce detectable ACh release (Dussor et al., 2005), suggesting that at least capsaicin-sensitive fibers do not release ACh centrally.

Functional role of dorsal horn ChAT interneurons

Pharmacological studies have demonstrated that ACh levels in the spinal cord critically control nociceptive behavior. Until now, the source of cholinergic innervation at the spinal level was unclear. The very low number of ChAT interneurons in the dorsal horn and the limited expansion of their dendritic tree observed in the classical transverse sections probably explain why some past reports overlooked their potential involvement in the

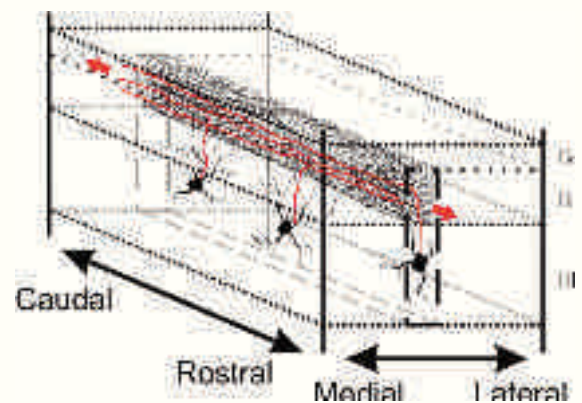


Figure 11. Schematic representation of the morphological organization of lamina III cholinergic neurons in the spinal dorsal horn. The dendrites and axon of the sparse lamina III cholinergic interneurons are the main source of the dense cholinergic plexus of fibers found in inner lamina II and oriented mainly in the rostrocaudal axis: the dendrites of these cells extend on average 540 μm rostrocaudally and their axon over 2 mm in the same axis, suggesting an involvement in intersegmental integration and modulation.

innervation of the superficial dorsal horn, favoring the hypothesis of a peripheral origin of the plexus (Matsumoto et al., 2007). However, it was reported that the dendritic arbor of cholinergic interneurons was more developed in spinal parasagittal sections in the rat (Barber et al., 1984; Olave et al., 2002), and our detailed analysis of these neurons in the mouse demonstrated that their unique morphology enables them to represent the major origin of the dense lamina Ili cholinergic plexus.

The dorsal horn cholinergic plexus has been observed in previous studies with the use of anti-ChAT immunolabeling and was described as localized in lamina III (Barber et al., 1984) or II (Olave et al., 2002). It was readily observable in ChAT::EGFP mice, as a band formed by EGFP⁺ processes oriented in the rostrocaudal direction. By using Nissl and PKC γ labeling, we could localize this plexus to the inner part of lamina II. A detailed EM study of ChAT-IR processes in this region has demonstrated that the plexus is formed by both dendrites and axons, interacting with the central terminals of primary afferents and thus possibly controlling the entry of sensory information in the central nervous system (Ribeiro-da-Silva and Cuello, 1990). The lamina Ili cholinergic plexus seems therefore to play a fundamental role in the modulatory effects of ACh on sensory transmission, and the results of our study demonstrating that dorsal horn cholinergic interneurons are major contributors to the plexus suggest that they might play an important role in cholinergic analgesia.

Dorsal horn cholinergic interneurons are indeed a rare and sparse cell population, but we demonstrate that they have extensive dendritic arbors and axonal territories. It has been shown in other regions that exceedingly rare, but intensely connected, GABAergic or cholinergic interneurons can be of major importance, serving as hubs or orchestral directors for large networks (Bonifazi et al., 2009; Case and Soltesz, 2009; Witten et al., 2010). Identifying the interactions of these neurons within the sensory spinal network should explain their *modus operandi*, but the present study already suggests that they are the major substrate of spinal cholinergic modulation of nociceptive transmission.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Mr. S. Côté for the design of Figure 11.

LITERATURE CITED

- Barber RP, Phelps PE, Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM, Vaughn JE. 1984. The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 229:329–346.
- Bellier JP, Kimura H. 2007. Acetylcholine synthesis by choline acetyltransferase of a peripheral type as demonstrated in adult rat dorsal root ganglion. *J Neurochem* 101:1607–1618.
- Bellier JP, Kimura H. 2011. Peripheral type of choline acetyltransferase: biological and evolutionary implications for novel mechanisms in cholinergic system. *J Chem Neuroanat* (in press).
- Bernard F, Bossu JL, Gaillard S. 2001. Identification of living oligodendrocyte developmental stages by fractal analysis of cell morphology. *J Neurosci Res* 65:439–445.
- Bolte S, Cordelieres FP. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224:213–232.
- Bonifazi P, Goldin M, Picardo MA, Jorquera I, Cattani A, Bianconi G, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R. 2009. GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. *Science* 326:1419–1424.
- Brehmer A, Schrodil F, Neuhuber W, Tooyama I, Kimura H. 2004. Co-expression pattern of neuronal nitric oxide synthase and two variants of choline acetyltransferase in myenteric neurons of porcine ileum. *J Chem Neuroanat* 27:33–41.
- Cardell M, Landsend AS, Eidet J, Wieloch T, Blackstad TW, Ottersen OP. 1998. High resolution immunogold analysis reveals distinct subcellular compartmentation of protein kinase C gamma and delta in rat Purkinje cells. *Neuroscience* 82:709–725.
- Case M, Soltesz I. 2009. Discreet charm of the GABAergic bourgeoisie: superconnected cells conduct developmental symphonies. *Neuron* 64:780–782.
- Chao T, Pham K, Steward O, Gupta R. 2008. Chronic nerve compression injury induces a phenotypic switch of neurons within the dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 506:180–193.
- Chen SR, Pan HL. 2001. Spinal endogenous acetylcholine contributes to the analgesic effect of systemic morphine in rats. *Anesthesiology* 95:525–530.
- Chiocchetti R, Poole DP, Kimura H, Aimi Y, Robbins HL, Castellucci P, Furness JB. 2003. Evidence that two forms of choline acetyltransferase are differentially expressed in subclasses of enteric neurons. *Cell Tissue Res* 311:11–22.
- Clayton BA, Hayashida K, Childers SR, Xiao R, Eisenach JC. 2007. Oral donepezil reduces hypersensitivity after nerve injury by a spinal muscarinic receptor mechanism. *Anesthesiology* 106:1019–1025.
- Cordero-Erausquin M, Coull JA, Boudreau D, Rolland M, De Koninck Y. 2005. Differential maturation of GABA action and anion reversal potential in spinal lamina I neurons: impact of chloride extrusion capacity. *J Neurosci* 25:9613–9623.
- Cordero-Erausquin M, Allard S, Dolique T, Bachand K, Ribeyrol-Silva A, De Koninck Y. 2009. Dorsal horn neurons presynaptic to lamina I spino-parabrachial neurons revealed by transsynaptic labelling. *J Comp Neurol* 517:601–615.
- Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S. 2004. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J* 86:3993–4003.
- Dussor GO, Jones DJ, Hulsebosch CE, Edell TA, Flores CM. 2005. The effects of chemical or surgical deafferentation on [³H]acetylcholine release from rat spinal cord. *Neuroscience* 135:1269–1276.
- Eisenach JC. 2009. Epidural neostigmine: will it replace lipid soluble opioids for postoperative and labor analgesia? *Anesth Analg* 109:293–295.
- Eisenach JC, Detweiler DJ, Tong C, D'Angelo R, Hood DD. 1996. Cerebrospinal fluid norepinephrine and acetylcholine concentrations during acute pain. *Anesth Analg* 82:621–626.
- Fukuoka T, Tokunaga A, Kondo E, Miki K, Tachibana T, Noguchi K. 1998. Change in mRNAs for neuropeptides and the GABA_A receptor in dorsal root ganglion neurons in a rat experimental neuropathic pain model. *Pain* 78:13–26.
- Govindasamy L, Pedersen B, Lian W, Kukar T, Gu Y, Jin S, Agbandje-McKenna M, Wu D, McKenna R. 2004. Structural insights and functional implications of choline acetyltransferase. *J Struct Biol* 148:226–235.
- Hama A, Menzaghi F. 2001. Antagonist of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) enhances formalin-induced nociception in rats: tonic role of nAChRs in the control of pain following injury. *Brain Res* 888:102–106.
- Hammond DL, Ackerman L, Holdsworth R, Elzey B. 2004. Effects of spinal nerve ligation on immunohistochemically identified neurons in the L4 and L5 dorsal root ganglia of the rat. *J Comp Neurol* 475:575–589.
- Hosoda K, Saito N, Kose A, Ito A, Tsujino T, Ogita K, Kikkawa U, Ono Y, Igarashi K, Nishizuka Y, et al. 1989. Immunocytochemical localization of the beta I subspecies of protein kinase C in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1393–1397.
- Ito T, Hioki H, Nakamura K, Tanaka Y, Nakade H, Kaneko T, Iino S, Nojyo Y. 2007. Gamma-aminobutyric acid-containing sympathetic preganglionic neurons in rat thoracic spinal cord send their axons to the superior cervical ganglion. *J Comp Neurol* 502:113–125.
- Kanazawa I, Sutoo D, Oshima I, Saito S. 1979. Effect of transection on choline acetyltransferase, thyrotropin releasing hormone and substance P in the cat cervical cord. *Neurosci Lett* 13:325–330.
- Keast JR, Forrest SL, Osborne PB. 2010. Sciatic nerve injury in adult rats causes distinct changes in the central projections of sensory neurons expressing different glial cell line-derived neurotrophic factor family receptors. *J Comp Neurol* 518:3024–3045.

- Kolin DL, Wiseman PW. 2007. Advances in image correlation spectroscopy: measuring number densities, aggregation states, and dynamics of fluorescently labeled macromolecules in cells. *Cell Biochem Biophys* 49:141–164.
- Lachmanovich E, Shvartsman DE, Malka Y, Botvin C, Henis YI, Weiss AM. 2003. Co-localization analysis of complex formation among membrane proteins by computerized fluorescence microscopy: application to immunofluorescence co-patching studies. *J Microsc* 212:122–131.
- Laing I, Todd AJ, Heizmann CW, Schmidt HH. 1994. Subpopulations of GABAergic neurons in laminae I–III of rat spinal dorsal horn defined by coexistence with classical transmitters, peptides, nitric oxide synthase or parvalbumin. *Neuroscience* 61:123–132.
- Lawson SN, Waddell PJ. 1991. Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *J Physiol* 435:41–63.
- Lorenzo LE, Ramien M, St Louis M, De Koninck Y, Ribeiro-da-Silva A. 2008. Postnatal changes in the Rexed lamination and markers of nociceptive afferents in the superficial dorsal horn of the rat. *J Comp Neurol* 508:592–604.
- Malmberg AB, Brandon EP, Idzerda RL, Liu H, McKnight GS, Basbaum AI. 1997. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* 17:7462–7470.
- Matsumoto M, Xie W, Inoue M, Ueda H. 2007. Evidence for the tonic inhibition of spinal pain by nicotinic cholinergic transmission through primary afferents. *Mol Pain* 3:41.
- Mori M, Kose A, Tsujino T, Tanaka C. 1990. Immunocytochemical localization of protein kinase C subspecies in the rat spinal cord: light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 299:167–177.
- Naguib M, Yaksh TL. 1994. Antinociceptive effects of spinal cholinesterase inhibition and isobolographic analysis of the interaction with mu and alpha 2 receptor systems. *Anesthesiology* 80:1338–1348.
- Olave MJ, Puri N, Kerr R, Maxwell DJ. 2002. Myelinated and unmyelinated primary afferent axons form contacts with cholinergic interneurons in the spinal dorsal horn. *Exp Brain Res* 145:448–456.
- Panzanelli P, Fritschy JM, Yanagawa Y, Obata K, Sassoe-Pognetto M. 2007. GABAergic phenotype of periglomerular cells in the rodent olfactory bulb. *J Comp Neurol* 502:990–1002.
- Paqueron X, Li X, Bantel C, Tobin JR, Voytko ML, Eisenach JC. 2001. An obligatory role for spinal cholinergic neurons in the antiallodynic effects of clonidine after peripheral nerve injury. *Anesthesiology* 94:1074–1081.
- Polgar E, Fowler JH, McGill MM, Todd AJ. 1999. The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res* 833:71–80.
- Prescott SA, 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.
- Rashid MH, Ueda H. 2002. Neuropathy-specific analgesic action of intrathecal nicotinic agonists and its spinal GABA-mediated mechanism. *Brain Res* 953:53–62.
- Ribeiro-da-Silva A, Cuellar AC. 1990. Choline acetyltransferase-immunoreactive profiles are presynaptic to primary sensory fibers in the rat superficial dorsal horn. *J Comp Neurol* 295:370–384.
- Ribeiro-da-Silva A, Paxinos G. 2004. *Substantia gelatinosa of the spinal cord. The rat nervous system*. New York: Elsevier. p 129–148.
- Rico B, Cavada C. 1998. A population of cholinergic neurons is present in the macaque monkey thalamus. *Eur J Neurosci* 10:2346–2352.
- Ruscheweyh R, Forsthuber L, Schoffnegger D, Sandkuhler J. 2007. Modification of classical neurochemical markers in identified primary afferent neurons with Abeta-, Adelta-, and C-fibers after chronic constriction injury in mice. *J Comp Neurol* 502:325–336.
- Russ JC. 1999. *The image processing handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Saito A, Sato T, Okano H, Toyoda K, Bamba H, Kimura S, Bellier JP, Matsuo A, Kimura H, Hisa Y, Tooyama I. 2009. Axotomy alters alternative splicing of choline acetyltransferase in the rat dorsal motor nucleus of the vagus nerve. *J Comp Neurol* 513:237–248.
- Saito N, Kose A, Ito A, Hosoda K, Mori M, Hirata M, Ogita K, Kikkawa U, Ono Y, Igarashi K, et al. 1989. Immunocytochemical localization of beta II subspecies of protein kinase C in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3409–3413.
- Sann H, McCarthy PW, Mader M, Schemann M. 1995. Choline acetyltransferase-like immunoreactivity in small diameter neurones of the rat dorsal root ganglion. *Neurosci Lett* 198:17–20.
- Schumacher PA, Eubanks JH, Fehlings MG. 1999. Increased calpain I-mediated proteolysis, and preferential loss of dephosphorylated NF200, following traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* 91:733–744.
- Sherriff FE, Henderson Z, Morrison JF. 1991. Further evidence for the absence of a descending cholinergic projection from the brainstem to the spinal cord in the rat. *Neurosci Lett* 128:52–56.
- Spike RC, Todd AJ, Johnston HM. 1993. Coexistence of NADPH diaphorase with GABA, glycine, and acetylcholine in rat spinal cord. *J Comp Neurol* 335:320–333.
- Starkey ML, Davies M, Yip PK, Carter LM, Wong DJ, McMahon SB, Bradbury EJ. 2009. Expression of the regeneration-associated protein SPRR1A in primary sensory neurons and spinal cord of the adult mouse following peripheral and central injury. *J Comp Neurol* 513:51–68.
- Syverud K, Chinga G, Johnsen PO, Leirset I, Wiik K. 2007. Analysis of lint particles from full-scale printing trials. *Appita J* 60:286–290.
- Takeda T, Ishikawa A, Ohtomo K, Kobayashi Y, Matsuoka T. 1992. Fractal dimension of dendritic tree of cerebellar Purkinje cell during onto- and phylogenetic development. *Neurosci Res* 13:19–31.
- Tie-Jun SS, Xu Z, Hokfelt T. 2001. The expression of calcitonin gene-related peptide in dorsal horn neurons of the mouse lumbar spinal cord. *Neuroreport* 12:739–743.
- Todd AJ. 1991. Immunohistochemical evidence that acetylcholine and glycine exist in different populations of GABAergic neurons in lamina III of rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 44:741–746.
- Tooyama I, Kimura H. 2000. A protein encoded by an alternative splice variant of choline acetyltransferase mRNA is localized preferentially in peripheral nerve cells and fibers. *J Chem Neuroanat* 17:217–226.
- von Engelhardt J, Eliava M, Meyer AH, Rozov A, Monyer H. 2007. Functional characterization of intrinsic cholinergic interneurons in the cortex. *J Neurosci* 27:5633–5642.
- Witten IB, Lin SC, Brodsky M, Prakash R, Diester I, Anikeeva P, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K. 2010. Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning. *Science* 330:1677–1681.
- Wolansky T, Pagliardini S, Greer JJ, Dickson CT. 2007. Immunohistochemical characterization of substance P receptor (NK₁R)-expressing interneurons in the entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 502:427–441.
- Woolf NJ, Butcher LL. 1989. Cholinergic systems in the rat brain: IV. Descending projections of the pontomesencephalic tegmentum. *Brain Res Bull* 23:519–540.

Yasaka T, Kato G, Furue H, Rashid MH, Sonohata M, Tamae A, Murata Y, Masuko S, Yoshimura M. 2007. Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro. *J Physiol* 581:603–618.

Yasaka T, Tiong SY, Hughes DI, Riddell JS, Todd AJ. 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.

Yasuhara O, Aimi Y, Shibano A, Matsuo A, Bellier JP, Park M, Tooyama I, Kimura H. 2004. Innervation of rat iris by trigeminal and ciliary neurons expressing pChAT, a novel splice variant of choline acetyltransferase. *J Comp Neurol* 472:232–245.

Zhuo M, Gebhart GF. 1991. Tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission. *Pain* 46:211–222.

Chapitre 6

Étude de l'axone des interneurones cholinergiques spinaux

6.1 Résultats

L'objet de cette étude a été de préciser la longueur de l'axone des interneurones cholinergiques. En effet, le faible nombre d'axones reconstruits obtenus après injection intracellulaire de biocytine (*Cf.* section précédente) ne permettait une analyse très détaillée des projections axonales des interneurones cholinergiques. Nous avons pour cela utilisé un traceur rétrograde, la sous-unité b de la toxine cholérique (CTb) injectée à un niveau donné de la moelle, et avons analysé sur quelle distance des interneurones ChAT étaient marqués. Par commodité, nous avons choisi une CTb couplée à un Alexa 555 émettant une fluorescence rouge et l'avons injectée dans des souris ChAT::eGFP, ce qui permettait de mener cette étude sans avoir à procéder à des réactions immuno-histochimiques.

Nous avons d'abord déterminé le temps de migration nécessaire pour obtenir un marquage optimal des corps cellulaires, en terme de nombre et d'intensité. Des animaux ont été sacrifiés après 1, 3, 5 ou 7 jours (4 à 5 animaux par temps d'attente) après l'injection. Bien que l'intensité du marquage des corps cellulaires était similaire pour chacun des cinq groupes d'animaux, le nombre et la distance maximale à laquelle les somas CTb+ ont été retrouvés étaient différents. Pour les animaux sacrifiés aux jours 1, 3 ou 5, le nombre de somas CTb+ étaient moins important en comparaison avec les animaux au jour 7.

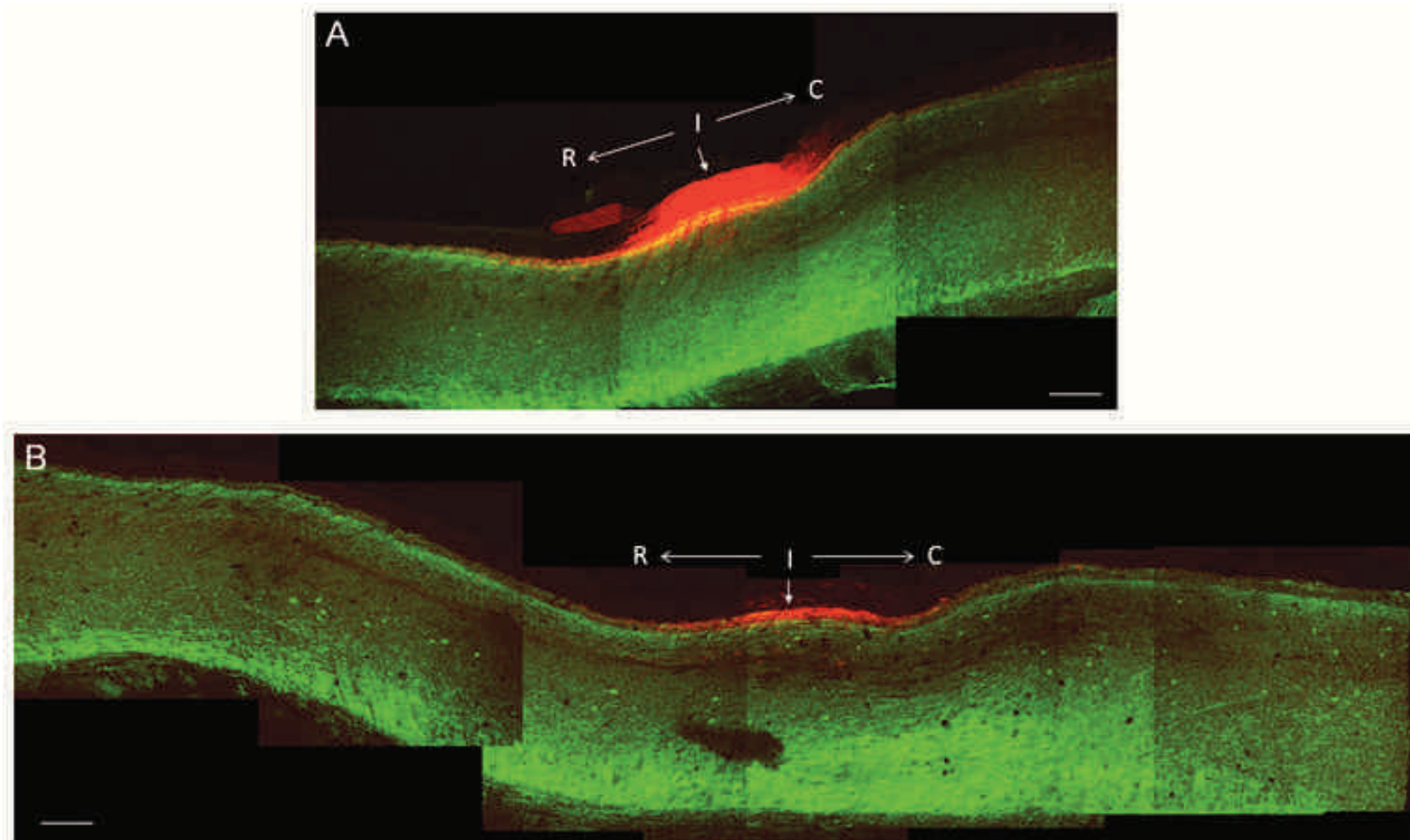


FIGURE 6.1: Illustration du site d'injection dans une section parasagittale de $50\mu\text{m}$ (microscopie confocale) de moelle épinière de deux animaux **ChAT::eGFP**. Le site d'injection de la CTb (rouge) se trouve dans la région du plexus des fibres cholinergiques (vert). Les corps cellulaires eGFP+ (vert) localisés sous le plexus sont les interneurons cholinergiques des couches III/IV. (A) Animal sacrifié 7 jours après injection de CTb. (B) Sacrifice à 13 jours. La lettre I et la flèche indiquent le milieu du site d'injection, à partir duquel la mesure des distances a été réalisée. Les lettres R et C indiquent les directions rostrale et caudale. Barre d'échelle : $200\mu\text{m}$.

De même, les distances par rapport au site d'injection étaient moins grandes pour les groupes d'animaux plus précoces. Aux jours 5 et 7, les différences entre les groupes, en terme de distance et de nombre de cellules marquées, étaient moins prononcées. Par conséquent dans la suite de cette étude, les souris utilisées ont été sacrifiées 7 ou 13 jours après l'injection de CTb. La taille des sites d'injection du traceur, la distance et l'intensité de marquage CTb des cellules étaient similaires entre les souris sacrifiées 7 jours ou 13 jours après l'injection. Le maximum de distance de marquage est obtenu 7 jours après injection.

Enfin, sur les 20 souris injectées avec la CTb, nous n'avons considéré que celles dont le site d'injection était confiné aux trois premières laminae de la corne dorsale de la moelle épinière. Ceci a permis de cibler les axones cholinergiques présents dans le plexus de fibres (voir [figure 6.1](#)).

6.1.1 Site d'injection

Le bolus d'injection était localisé au niveau du troisième segment lombaire (L3) de la moelle épinière. Nous avons observé le marquage CTb dans des sections parasagittales de moelle épinière, pour vérifier que le site d'injection se situait dans notre zone d'intérêt.

Premièrement, il s'étendait depuis la substance blanche vers une partie plus ventrale de la corne dorsale. La partie interne de la LII, où se trouve le plexus de fibres cholinergiques, présentait un signal eGFP et un marquage CTb (voir [figure 6.1](#)). La taille maximale du site était de 334 μm dans l'axe dorso-ventral pour un animal et de 405 μm pour le second. Le site d'injection s'orientait aussi selon un axe rostro-caudal. Dans cet axe, le site mesurait, respectivement par animal, 1212 μm et 1214 μm .

L'étendue latéro-médiale du site d'injection où l'on a retrouvé des cellules CTb+ a pu être estimée. Pour le premier animal, un marquage CTb somatique a été retrouvé sur 8 sections parasagittales de 50 μm , soit 400 μm d'étendue latéro-médiale. Pour le second, l'étendue a été estimée à 650 μm (13 section \times 50 μm) (voir [figure 6.2](#)).

6.1.2 Cellules marquées par la CTb

Les somas présentant un marquage positif pour la CTb (CTb+) ont été recherchés dans les sections parasagittales. Le marquage est de type punctiforme. À proximité immédiate

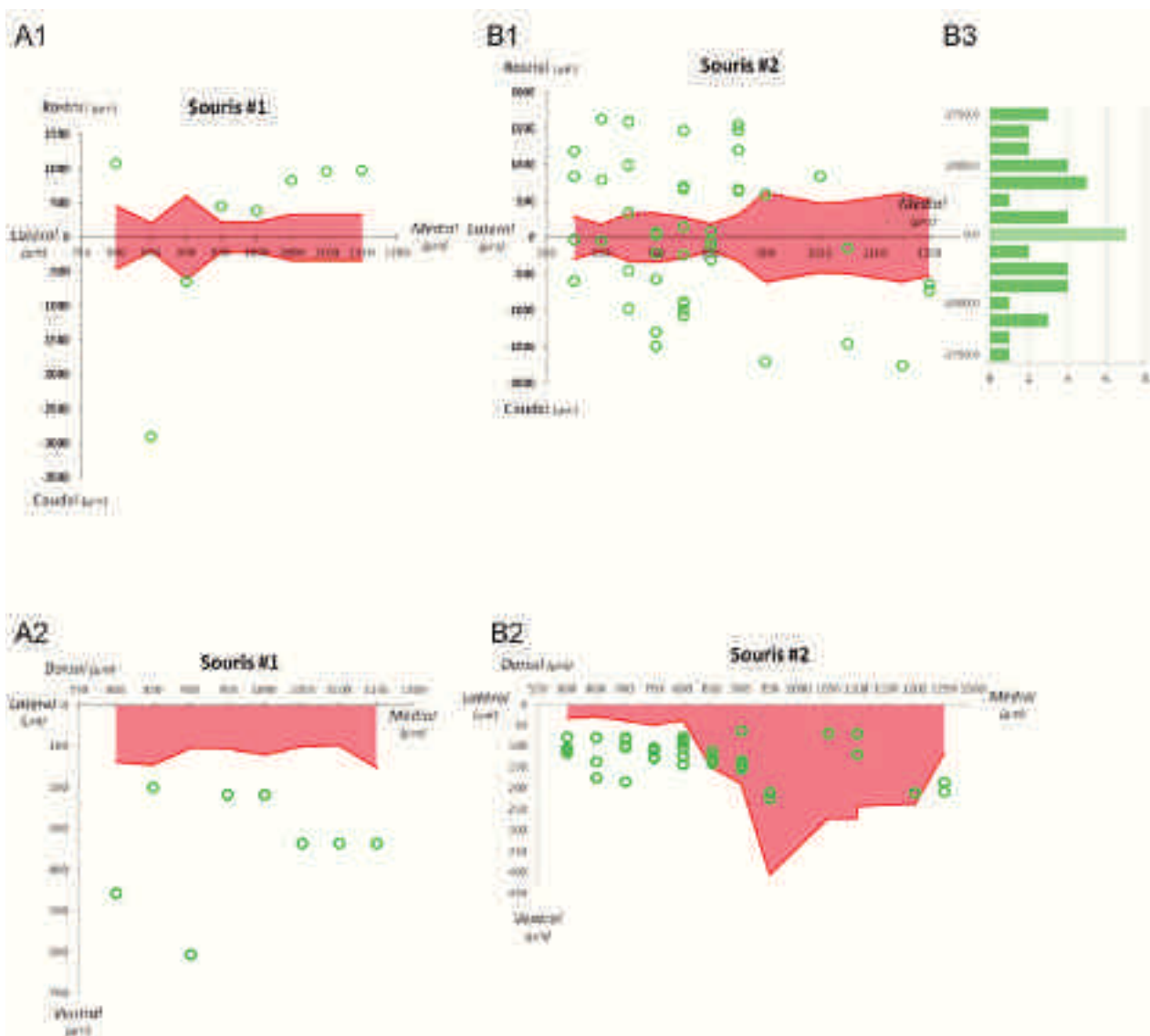


FIGURE 6.2: Organisation des cellules eGFP+/CTb+ (cercle vert) et du site d'injection (aire rouge). (A) Animal sacrifié 7 jours après injection de CTb. (A1) Orientation rostro-caudale du site en fonction de l'axe latéro-médian et localisation des cellules eGFP+/CTb+ par rapport au site d'injection. (A2) Expansion ventrale du bolus d'injection selon l'axe latéro-médian et localisation des cellules eGFP+ par rapport à la limite dorsale de la substance grise. (B) Animal sacrifié 13 jours après injection. (B1) Expansion rostro-caudale et (B2) ventrale du site d'injection. Chaque point représente une cellule. La position du point représente ses coordonnées selon deux axes rostral/caudal et latéral/médian (A1, B1) ou latéral/médian et dorsal/ventral (A2, B2). Chaque cellule représentée en A est également représentée en B. (B3) Diagramme représentant le nombre de cellules eGFP+/CTb+ (axe des abscisses) retrouvées selon la portion de distance rostrale ou caudale considérée. La majorité des cellules eGFP+/CTb+ est retrouvée près du site d'injection (7 cellules dans les 250 μm , en direction rostrale et caudale). (Voir également la figure en annexe, à la fin de ce manuscrit.)

du site, un nombre important de cellules étaient marquées par la CTb. Ce nombre décroît très rapidement dès qu'on s'éloigne du site. Néanmoins, les corps cellulaires CTb+ les plus éloignés présentaient une intensité de marquage CTb comparable aux cellules plus proches du site.

Quelques cellules CTb+ étaient très éloignées par rapport au milieu du site (au delà de 5 mm), aussi bien en direction rostrale que caudale. Les corps cellulaires étaient agencés tout le long de l'axe rostro-caudal du site d'injection, vers chacune des deux directions. Parmi les somas CTb+, certains présentaient aussi un signal eGFP (eGFP+), traduisant leur nature cholinergique.

6.1.3 Neurones eGFP+ marqués rétrogradement

Sur les 17 sections analysées, 52 cellules présentaient un marquage CTb+/eGFP+. Les cellules étaient localisées à une profondeur moyenne de $121.07 \pm 38.89 \mu\text{m}$ par rapport au bord dorsal de la substance blanche et s'étendent le long de l'axe rostro-caudal.

Les distances ont été déterminées entre le centre du site d'injection et le corps cellulaire eGFP+/CTb+, en direction rostrale et caudale (*Cf.* partie Méthodologie). On retrouve un nombre comparable de cellules du côté rostral (23 neurones) et caudal (29 neurones). Aucune zone ne présentait de marquage préférentiel à la CTb.

Parmi les cellules CTb+/eGFP+ du côté caudal, 9 cellules étaient localisées à une distance de plus de 1 mm du centre d'injection, jusqu'à 2,9 mm pour la plus éloignée. Du côté rostral du site d'injection, 6 cellules étaient marquées au delà de 1 mm, jusqu'à 1,6 mm pour la plus rostrale (voir [figure 6.2](#)).

Enfin, certaines cellules eGFP+ ne présentaient pas de marquage CTb, bien que des somas CTb+/eGFP+ pouvaient être observés de part et d'autre de ces corps cellulaires (voir [figure 6.3](#)).

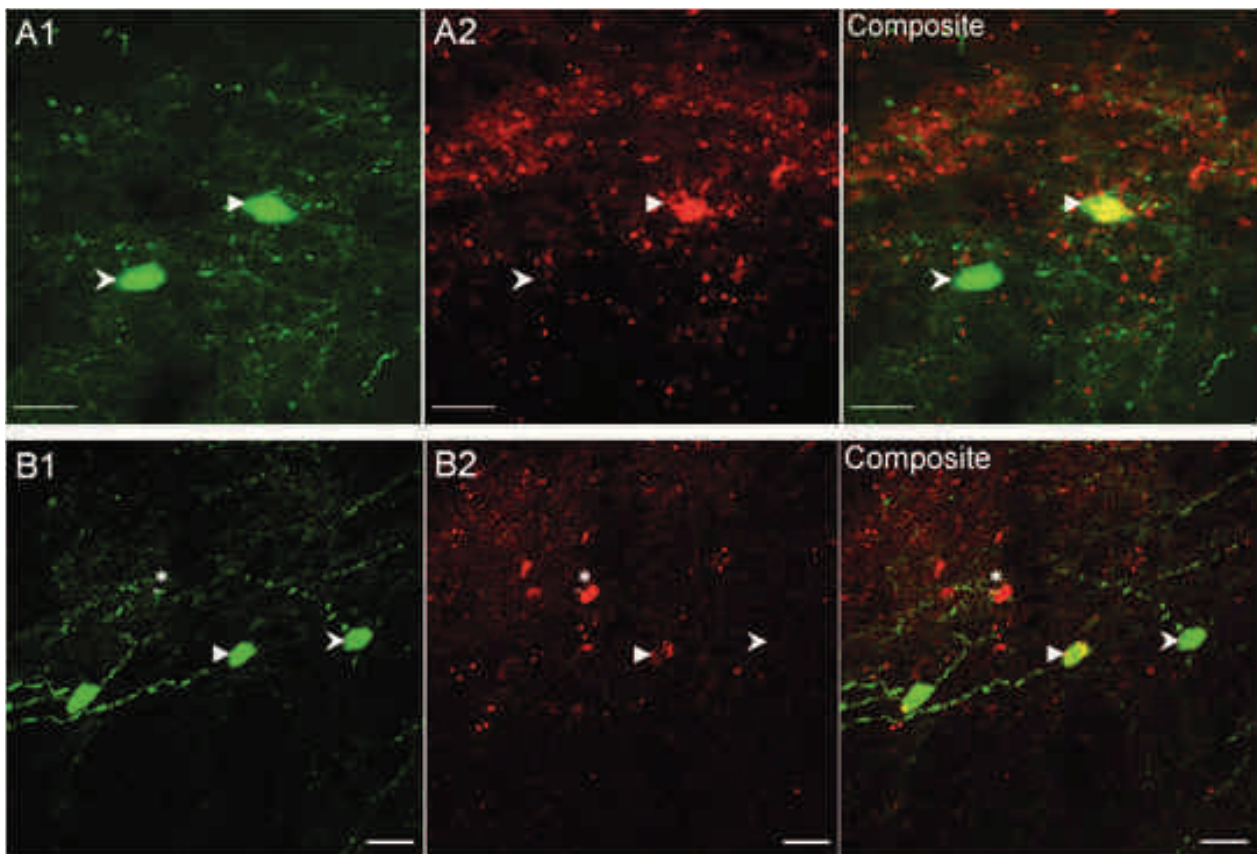


FIGURE 6.3: Exemples de cellules remplies à la CTb. (A et B) Vert : signal eGFP, Rouge : CTb. Tête de flèche pleine : cellule eGFP+/CTb+. Tête de flèche ouverte : cellule eGFP+ non CTb. (B) astérisque : cellule CTb+ non-eGFP. Barres d'échelles : 20 μ m.

6.2 Interprétation des résultats

6.2.1 Considérations techniques

L'injection de marqueurs, ou de traceurs, *in vivo* peut présenter un avantage supplémentaire par rapport à des injections réalisées *in vitro*. *In vivo*, le système biologique est intact et l'organisation des neurites sont conservés, alors qu'en tranches aiguës, certains des prolongements sont sectionnés. Cette conservation au moment de l'injection du marqueur peut être particulièrement pertinente dans le cas de l'étude de l'organisation des interneurons cholinergiques, qui présentent une étendue importante orientée dans plusieurs directions (dorsale, rostro-caudale et dans une moindre mesure, latéro-médiale) de l'espace.

Bien que les injections soient réalisées *in vivo* dans le tissu intact, les reconstructions du site et la recherche des cellules doublement-marquées sont obtenues à partir de sections, provoquant ainsi une perte de l'information tri-dimensionnelle. En section horizontale, l'information de la profondeur de la cellule remplie par rapport au site peut être perdue. En section para-sagittale, l'information de la localisation de la cellule par rapport au milieu du site d'injection peut être également perdue. Les interneurons cholinergiques de la corne dorsale de la moelle épinière présentant une orientation préférentielle dans l'axe rostro-médial, les coupes transverses ne peuvent pas être ici utilisées, bien que l'information sur la localisation ventrale de ces cellules peut être pertinente.

Pour s'affranchir de ces problèmes, les expériences d'injection spinales de CTb chez des souris ChAT::eGFP ont été reproduites¹, suivies d'expériences de clarification des tissus, par la méthode de *SeeDB* (basée sur la modification de l'indice de réfraction par bains successifs des tissus dans des solutions à fortes concentrations croissantes de fructose, voir [Ke *et al.* 2013]). Les inconvénients de chaque plan de coupe ont pu être évités, et les avantages sur le type d'informations tri-dimensionnelles conservés (voir [figure 6.4](#)).

Les résultats préliminaires de cette étude indiquent que cette méthode permet de s'affranchir à la fois des reconstructions et du problème éventuel de perte d'informations. En effet, les cellules CTb+/ChAT+ ont pu être recherchées dans la moelle épinière intacte des

1. entre le dépôt initial du manuscrit et la soutenance de thèse

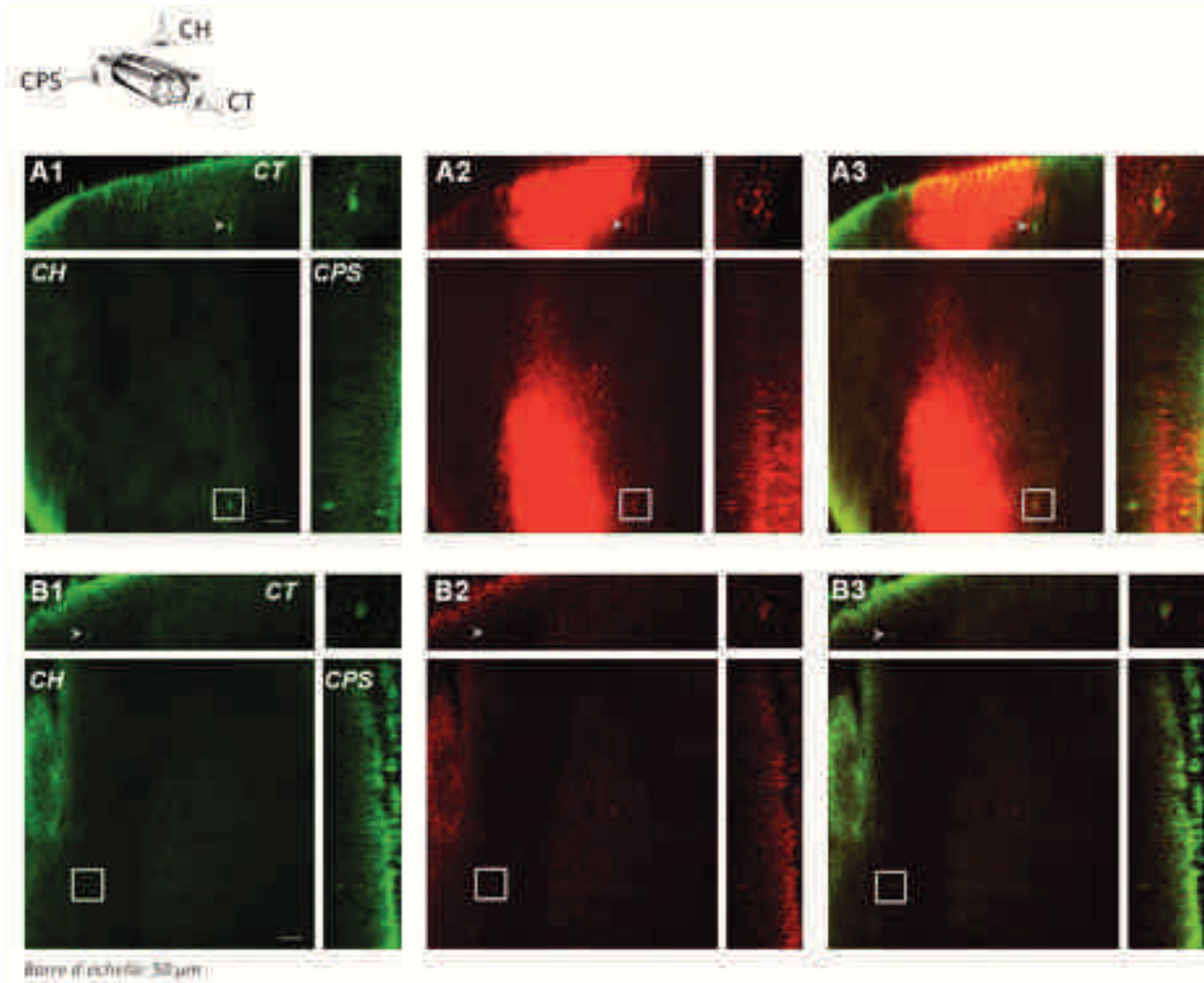


FIGURE 6.4: Expériences de remplissage de cellules cholinergiques à la CTb couplées à une clarification des tissus. Exemple de deux cellules eGFP⁺/CTb⁺ observées dans le tissu intact. La visualisation de leur organisation dans la moelle et par rapport au site d'injection est rendue possible par la méthode de clarification *SeeDB*, basée sur des bains successifs de fructose à forte concentration croissante. Les images ont été obtenues par microscopie confocale, à partir des tissus intacts, selon un plan horizontal. Le signal eGFP (**A1** et **B1**) est figuré en vert et la CTb en rouge (**A2** et **B2**). En **A3** et **B**, nous pouvons voir la superposition des deux marquages. Le premier rectangle représente la vue transverse (**CT**), le bord dorsale de la moelle épinière en haut. En dessous est figurée la vue horizontale (**CH**), l'extrémité rostrale orientée en haut de l'image et le bord caudal en bas. À droite de la CH est représentée la vue parasagittale (**CPS**), l'extrémité dorsale de la moelle épinière orientée à droite. Au dessus se trouve un grossissement de la cellule encadrée sur la CH en blanc. Les représentations en CT et CPS permettent d'apprécier la situation ventrale des cellules par rapport au site d'injection et donc, de s'assurer que la cellule eGFP⁺ est bien localisée dans les LIII/IV. De plus, les CPS, comme les CH, permettent de localiser la cellule selon l'axe rostro-médial par rapport au site d'injection. Enfin, les représentations en CH renseignent également sur l'organisation latéro-médiale des interneurons cholinergiques. Tête de flèche : cellule eGFP⁺/CTb⁺. Barre d'échelle : 50 μm .

animaux injectées à la CTb. De plus, des représentations dans les trois plans transversal, para-sagittal et horizontal à partir d'imagerie par microscopie confocale ont permis de visualiser à la fois l'étendue du site d'injection, sa profondeur, ainsi que l'organisation des cellules doublement-marquées par rapport à ce site et dans la moelle épinière.

Les remplissages *in vitro* permettent de vérifier immédiatement que l'on cible la bonne cellule. L'introduction d'un fluorophore dans la pipette de remplissage permet de s'assurer de la bonne diffusion de la biocytine dans la bonne cellule (qui par exemple, peut exprimer un gène rapporteur fluorescent, telle que la eGFP dans notre étude). L'utilisation d'une loupe binoculaire *in vivo* permet une précision au mieux de l'ordre de la centaine de microns, alors qu'*in vitro*, l'utilisation d'un microscope assure une précision de l'ordre du micron. Un biais dans la profondeur à laquelle est descendue la pipette d'injection *in vivo* peut donc être introduit lors du positionnement de celle-ci au niveau de la surface de la moelle de l'animal (repère défini comme le niveau "zéro" de la pipette). Malgré une profondeur visée identique (150 à 200 μm pour chacun des animaux), la plupart des injections étaient réalisées trop dorsalement ou trop ventralement par rapport à la zone d'intérêt (la partie interne de la LII, où se trouve le plexus cholinergique). Néanmoins, la taille dans l'axe dorso-ventral du bolus d'injection permet de couvrir au moins les deux premières laminae de la corne dorsale de la moelle épinière et plusieurs cellules dont les fibres alimentent le plexus visé ont pu être obtenues.

La taille du bolus d'injection suggère une étendue sur plus d'un segment spinal, dont la taille est de 1,7mm [Harrison *et al.* 2013]. Les cellules positives pour la CTb (CTb+) présentaient une intensité de marquage similaire, quelle que soit leur distance du site. Cependant, pour une distance donnée de part et d'autre du site, le nombre de neurones marqués est relativement comparable. Cette constance rend compte de la bonne disponibilité du marqueur. Néanmoins, un temps de migration minimum, environ 7 jours, est nécessaire afin d'obtenir un marquage optimal.

La CTb peut être recapturée par des extrémités lésées de l'axone [Shehab *et al.* 2003, Fishman & Mattu 1993]. Au moment de l'injection, la pipette peut induire des lésions de

fibres lorsque celle-ci est descendue dans le tissu et des neurones peuvent ainsi se retrouver marqués par la CTb. Ceci peut donc entraîner un biais dans la mesure des distances de l'axone des cellules eGFP+, puisqu'on suppose que le marquage d'une cellule CTb+ a été réalisé à partir de la terminaison axonale. Cependant, la lésion d'un axone d'un neurone entraîne généralement la mort de cette cellule dès les premières heures [Dumont *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2012].

Dans le cadre de notre étude, les animaux ont été sacrifiés 7 à 13 jours après l'injection de CTb. Bien que la possibilité de marquer des cellules à partir d'axones lésés demeure, le nombre de ces cellules devrait être inférieur à celui des neurones intacts, encore présents dans les sections observées. Néanmoins, la longueur de l'axone de certains neurones pourrait ainsi être sous-estimée.

6.2.2 Cellules eGFP-positives et CTb-positives

Le marquage CTb n'était pas exclusif des cellules eGFP+. Des somas CTb+, mais ne présentant pas de signal eGFP, ont été retrouvés à des distances équivalentes aux interneurones cholinergiques, voire au delà. Il existe donc d'autres populations neuronales dont l'axone s'oriente également selon un axe rostro-caudal sur de longues distances. Bien que la nature biochimique est difficile à déterminer sans approche immunohistochimique, ces cellules sont très probablement des interneurones locaux. Néanmoins, la CTb peut être également capturée par des collatérales d'axones. Certains de ces somas CTb+/eGFP- pourraient ainsi être des neurones de projection, émettant des collatérales d'axones dans la moelle épinière [Szucs *et al.* 2010] (voir [figure 6.5](#)).

Par rapport au centre du site d'injection, le nombre de neurones eGFP+ marqués à la CTb vers la direction rostrale (R-I) était légèrement inférieur à celui des cellules en partie caudale (I-C) : 23 et 29 respectivement pour les 17 sections retenues dans l'étude. Cette différence est minime et peut s'expliquer par le fait que certaines sections n'étaient pas centrées sur le site d'injection. En effet, celui-ci était plus près de l'extrémité rostrale de la section. Les distances maximales R-I et I-C sont donc différentes et cette asymétrie fait qu'une partie des cellules comptabilisées du côté rostral pourrait être éventuellement sous-estimée.



FIGURE 6.5: **Prolongement axonal et collatérales d'un interneurone cholinergique de la LIII/IV.** Du soma (à gauche) s'étend le prolongement axonal (selon un axe rostro-caudal) qui émet des collatérales. Les distances mesurées pourraient ainsi être sous-estimées de plusieurs centaines de microns si la CTb est capturée par les collatérales et non pas par la terminaison axonale.

Cependant, la CTb peut être capturée au niveau de la terminaison axonale et des collatérales. Les interneurons cholinergiques CTb+ proches du site d'injection pourraient avoir capté la CTb par une collatérale et la distance entre ces cellules et le site d'injection ne rendrait donc pas compte de la longueur totale de l'axone. En revanche, il est très probable que les neurones les plus éloignés du site d'injection aient capté la CTb par le prolongement principal de leur axone.

Si l'on retrouve d'une part autant de cellules d'une même population marquées rostralement et caudalement et d'autre part, que ce marquage se fait selon des distances semblables (au-delà du millimètre pour les neurones les plus éloignés du site d'injection), cela suggère que ces cellules ont un axone qui s'oriente dans ces deux directions à la fois (*Cf. figure 6.6*). Or, parmi les interneurons cholinergiques reconstruits dans la première étude [Mesnage *et al.* 2011], nous avons pu observer l'axone de certains. Celui-ci présentait un branchement en T à partir duquel l'axone s'orientait à la fois en direction rostrale et caudale. Une symétrie de part et d'autre du site du nombre de cellules marquées dans cet axe est donc cohérente avec l'organisation de l'axone. Par conséquent, cela suggère que la longueur totale de l'axone des interneurons cholinergiques peut s'étendre sur une distance jusqu'à théoriquement deux fois celle mesurée dans cette étude.

Par ailleurs, certaines cellules eGFP+ n'ont pas été marquées par la CTb. Les axones reconstruits dans la première étude présentaient une orientation latéro-médiale avant de s'étendre dans l'axe rostro-caudal. Cela suggère que les cellules eGFP+/CTb- ont leur terminaison axonale qui aboutit au delà du bolus d'injection. Ceci a été confirmé par l'observation des sections plus latérales et présentant un site d'injection plus petit, voire quasi absent de

la LIII, où des somas eGFP+/CTb+ étaient retrouvés. Leur axone a donc été marqué au niveau d'une section plus médiale. Enfin, sur des sections très latérales, où le site d'injection était absent, aucun corps cellulaire CTb+ n'était observable.

6.3 Discussion des résultats

Cette étude complète les données de la publication sur la caractérisation morpho-anatomiques des interneurons cholinergiques de la corne dorsale de la moelle épinière. Également, elle apporte une meilleure compréhension des connexions proprio-spinales en général. En effet, d'autres cellules non-cholinergiques, probablement des interneurons, peuvent avoir un prolongement axonal qui s'étend selon un axe rostro-caudal et sur de longues distances. Ces prolongements peuvent être localisés au niveau du plexus de fibres cholinergiques également, mais également vers des niveaux plus dorsaux. En effet, le bolus d'injection s'étendait des couches I à II/III.

Cette étude a permis d'augmenter la taille de l'échantillon concernant l'axone des interneurons cholinergiques. Nous avons ainsi pu étudier 52 cellules.

L'axone des interneurons cholinergiques se trouve dans le plexus de fibres cholinergiques de la LIII. Ce plexus est également constitué de l'arborisation dendritique de ces interneurons. Par ailleurs, la plupart des fibres du plexus font partie de glomérules, un arrangement synaptique particulier comprenant la terminaison axonale d'une afférence primaire, un dendrite immuno-réactif pour la ChAT (ChAT+) et la terminaison axonale ChAT+ d'un neurone intrinsèque de la corne dorsale de la moelle épinière (profil V2, voir [Ribeiro-da-Silva & Cuello 1990]). Les interneurons cholinergiques pourraient donc être les neurones à l'origine des axones et dendrites que l'on retrouve au contact des terminaisons des afférences primaires.

Ces cellules sont GABAergiques et susceptibles de libérer le monoxyde d'azote, deux molécules impliquées dans les processus analgésiques et d'autre part, elles présentent un patron de décharge tonique [Mesnage *et al.* 2011], une caractéristique que l'on retrouve chez d'autres interneurons inhibiteurs de la corne dorsale de la moelle épinière [Yasaka *et al.* 2010].

Ces cellules pourraient ainsi exercer une action immédiate par leur axone sur les entrées sensorielles, de nature inhibitrice.

Par ailleurs, l'axone des interneurons cholinergiques est de taille supérieure à l'étendue de leur arborisation dendritique, ce qui suggère un possible champ d'action au delà des informations inter-segmentaires² qu'ils reçoivent (Voir [figure 6.6](#)). Cela permettrait d'augmenter leur efficacité en amplifiant les niveaux d'ACh sur de longues distances. La concentration d'ACh est augmentée au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière suite à des stimulations nociceptives, tel que mesurée par microdialyse chez le mouton [[Eisenach et al. 1996](#)]. Cette augmentation pourrait ainsi résulter de l'activation par les afférences primaires des interneurons cholinergiques, qui alors libéreraient de l'ACh pour inhiber les entrées nociceptives.

De plus, on retrouve l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote, la NO synthase de type neuronale (nNOS) au niveau des colonnes intermedio-latérales et des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière [[Xu et al. 1996](#)]. À ce niveau, les interneurons cholinergiques colocalisent avec la nNOS, qui peuvent donc potentiellement libérer du monoxyde d'azote (NO) [[Mesnage et al. 2011](#)].

Or, le NO est également associé à la modulation nociceptive périphérique et centrale, au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (voir pour revue [[Meller & Gebhart 1993](#)]). Chez le rat, les niveaux de NO sont également augmentés suite à une stimulation nociceptive périphérique, provoquée par l'injection de zymosan dans la patte [[Vetter et al. 2001](#)]. Par ailleurs, le NO et l'ACh semble partager une pharmacologie croisée [[Xu et al. 1996](#)]. Par exemple, chez le rat, l'injection de prostaglandine E2 (PGE2) dans la patte, induisant de l'hyperalgésie, couplée à l'administration périphérique de L-NPA (un inhibiteur sélectif de la nNOS), supprime les effets analgésiques de l'ACh [[Romero et al. 2011](#)]. De même, l'administration i.t. de L-arginine, précurseur du NO supprime les effets pro-nociceptifs d'un traitement préalable par voie i.t. à l'atropine et au contraire, le NW-nitro-L-Arginine méthyl ester (ou L-NAME, qui inhibe la signalisation induite par le NO) en i.t. augmente

2. La taille moyenne d'un segment spinal de souris au niveau lombaire est comprise entre 1,5 et 2mm [[Harrison et al. 2013](#)].

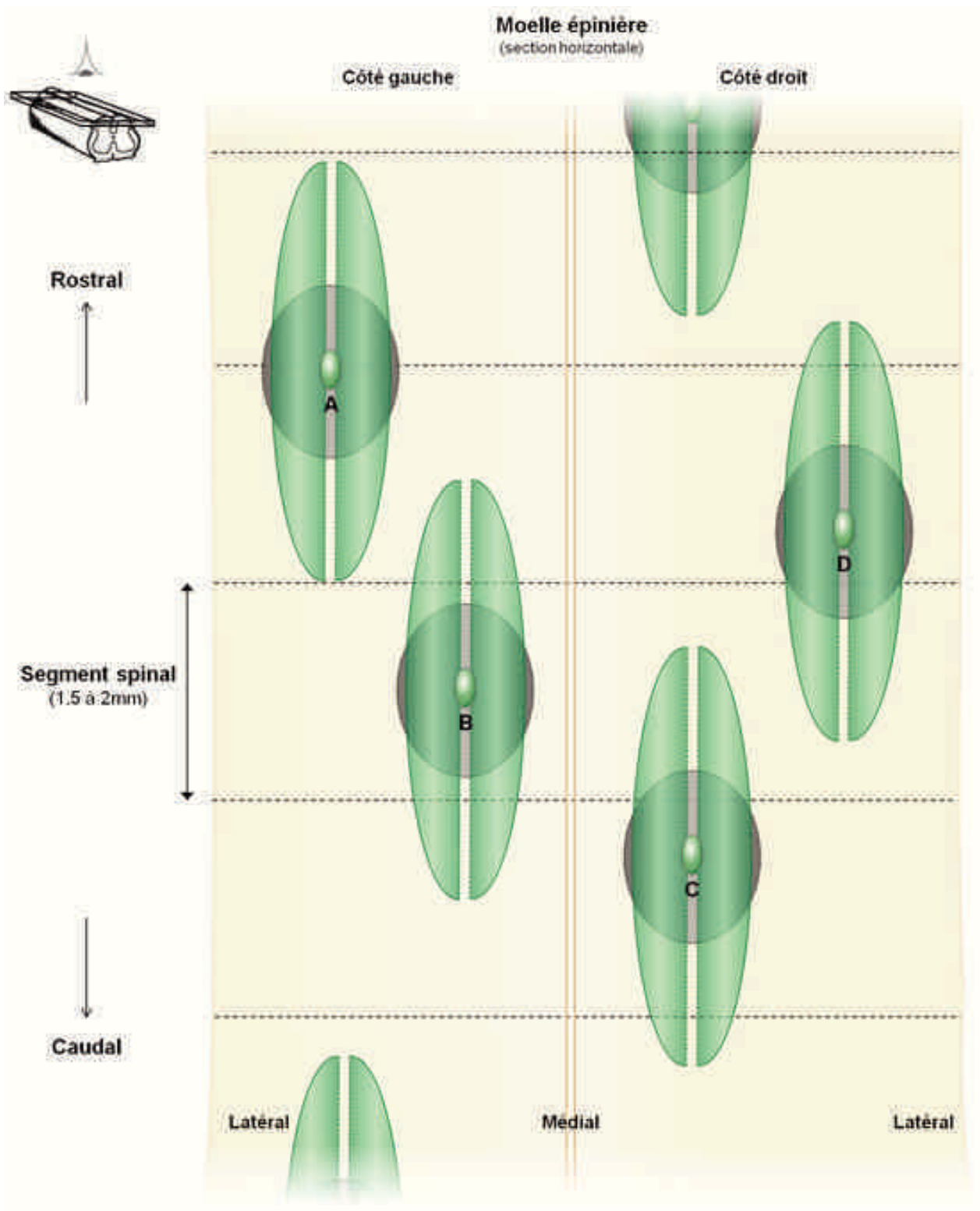


FIGURE 6.6: Étendue inter-segmentaire possible des interneurones cholinergiques spinaux. Sur une section horizontale de moelle épinière de souris, les interneurones cholinergiques de la L_{III} sont orientés selon un axe rostro-caudal (bord rostral en haut). L'axone s'étend d'abord à partir du soma soit en direction latérale (hémi-ellipse verte gauche), soit médiale (hémi-ellipse droite) et ce, indépendamment de la localisation rostro-caudale et latéro-médiale du neurone. La taille de l'axone (théoriquement jusqu'à 3mm, voir la partie *Interprétation des résultats* de ce chapitre) permet ainsi un champ d'action inter-segmentaire et au-delà des informations reçues au niveau de l'arborisation dendritique du neurone (ellipse grise). En effet, que le soma d'un interneurone cholinergique se situe (A) entre deux segments, (B), au milieu ou (C) et (D), de façon quelconque à l'intérieur d'un segment, l'axone couvre toujours une région qui s'étend au-delà d'un segment spinal (traits pointillés).

les effets du traitement à l'atropine [Zhuo *et al.* 1993]. Les interneurones cholinergiques de la moelle épinière pourrait donc libérer le NO spinal, impliqué dans la modulation négative de la transmission nociceptive à ce niveau.

Ainsi, ce système cholinergique pourrait être considéré comme un atténuateur d'une part, qui réduirait le gain des entrées sensorielles reçues. D'autre part, ce système peut également être vu comme un amplificateur, qui reçoit de l'information à un endroit donné de la corne dorsale de la moelle épinière et qui pourrait agir à plusieurs endroits. Cela permettrait donc d'augmenter la puissance de ses effets.

Chapitre 7

Conséquences d'un traitement chronique à la nicotine sur les seuils nociceptifs et au niveau cellulaire de la corne dorsale de la moelle épinière

7.1 Objectif

Tel que présenté dans la partie Introduction de ce manuscrit (Voir [section 3.2.5](#)), l'injection i.v. de morphine induit, chez la souris, une augmentation des niveau d'acétylcholine (ACh) au niveau spinal [[Xu et al. 2007](#)] et des noyaux trigéminaux [[Zhu et al. 2008](#)], un phénomène également observé chez le mouton [[Bouaziz et al. 1996](#)].

De plus, l'injection d'antagonistes des récepteurs opioïdes, tels que la naloxone, réduit les effets analgésiques de la nicotine chez la souris [[Tripathi et al. 1982](#), [Aceto et al. 1993](#)].

Enfin, l'action analgésique de la morphine administrée par voie i.v est supprimée par l'injection intra-thécale (i.t) d'antagonistes des récepteurs cholinergiques de type muscarinique et nicotine [[Chen & Pan 2001](#)].

Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent que l'acétylcholine et la morphine pourraient, d'une part, possiblement emprunter la (ou les) même(s) voie(s) d'action et, d'autre part, que les effets aigus de la morphine font intervenir le système cholinergique spinal.

Par ailleurs, dans le laboratoire d'accueil de Québec, il a été montré que l'administration

chronique de morphine entraîne chez le rat un effet paradoxalement hyperalgésique, ne dépendant pas des phénomènes de tolérance [Ferrini *et al.* 2013].

Dans ces travaux préliminaires, nous nous sommes donc proposés d'étudier les effets d'un traitement chronique de nicotine chez le rat, à la fois sur les seuils nociceptifs (au cours de tests de sensibilité mécanique) et, également, au niveau cellulaire de la corne dorsale de la moelle épinière.

7.2 Résultats

7.2.1 Comportement

Dans cette étude, la nicotine a été administrée par voie intra-péritonéale deux fois par jour chez des rats. Les rats du groupe contrôle ont reçu une solution saline à 0,9% et une solution de nicotine (1mg.kg^{-1}) a été utilisée pour les injections du second groupe. Deux séries d'expériences ont été réalisées, chacune comportant un groupe contrôle et un groupe nicotine. Pour la première série, les animaux ont été sacrifiés après 9 jours. La seconde série d'animaux a été arrêtée après 7 jours. Les tests nociceptifs ont été réalisés avant chaque injection du matin.

Les données ont été analysées par un test t non-apparié, avec correction de Welch. Les résultats sont exprimés en moyenne suivie de l'écart standard moyen ($\pm\text{SEM}$).

Série d'injection 1

Les animaux injectés à la saline ou la nicotine présentent les mêmes seuils de retrait jusqu'au jour 2 (pour le groupe saline : $11,34 \pm 1,01$ g; n=4, *versus* $11,59 \pm 1,925$ g; n=5, pour le groupe nicotine).

À partir du jour 4, les animaux du groupe nicotine présentent une diminution, qui est non-significative, des seuils de retrait : $6,69 \pm 1,78$ g; n=5, *versus* $11,15 \pm 1,578$ g; n=4 pour le groupe saline.

Au jour 5 et 7, la différence entre les deux groupes nicotine et saline est significative. Les

animaux traités à la nicotine ont des seuils inférieurs au groupe contrôle : $5,81 \pm 1,793$ g ; $n=4$, *versus* $11,15 \pm 1,578$ g ; $n=5$; $p<0,05$, pour le jour 5. Pour le jour 7 : $4,33 \pm 1,418$ g ; $n=5$, *versus* $10,91 \pm 2,096$ g ; $n=4$; $p<0,05$ (voir [figure 7.1](#)).

Série d'injection 2

Pour la seconde série, les groupes d'animaux présentaient une variabilité inter-individuelle plus importante par rapport à la première série. Néanmoins, les résultats obtenus sont très similaires. Un animal n'a pas répondu au traitement à la nicotine et a donc été exclu de l'analyse.

Le groupe de rats injectés à la nicotine présente une diminution des seuils de retrait par rapport au rats contrôles au jour 6 du traitement (groupe nicotine $7,66 \pm 3,21$ g ; $n=3$, *versus* $12,31 \pm 2,270$ g ; $n=6$ pour le groupe contrôle). Cette diminution est significative au jour 7 : $5,26 \pm 1,134$ g ; $n=3$ pour le groupe nicotine, *versus* $13,54 \pm 2,654$ g ; $n=6$ pour le groupe contrôle, $p<0,05$; voir [figure 7.1](#)).

Ensemble des données des deux séries

Malgré les différences de niveaux de base entre les deux séries d'injection, les différences entre les groupes saline et nicotine demeurent comparables.

Durant les 5 premiers jours de traitement, il n'y a pas de différence significative entre les deux conditions. À partir du 6^{ème}, les animaux des deux groupes commencent à répondre pour des filaments de von Frey exerçant une force inférieure à 10 grammes. La différence est significative entre les groupes contrôle et nicotine (2 groupes nicotine $6,583 \pm 1,476$ g ; $n=10$, *versus* $13,47 \pm 1,514$ g ; $n=9$ pour les groupes contrôle, $p < 0,005$).

Au 7^{ème} jour, les animaux des groupes nicotine se stabilisent pour des valeurs proches de 5 g ($4,991 \pm 0,8372$ g ; $n=9$, *versus* groupe saline : $12,52 \pm 1,531$ g ; $n=10$, $p < 0,001$ voir [figure 7.2](#)).

7.2.2 Conséquences au niveau cellulaire

L'utilisation d'un algorithme développé dans le laboratoire a permis de comparer les marquages immunohistochimiques menés sur des coupes provenant d'animaux des groupes

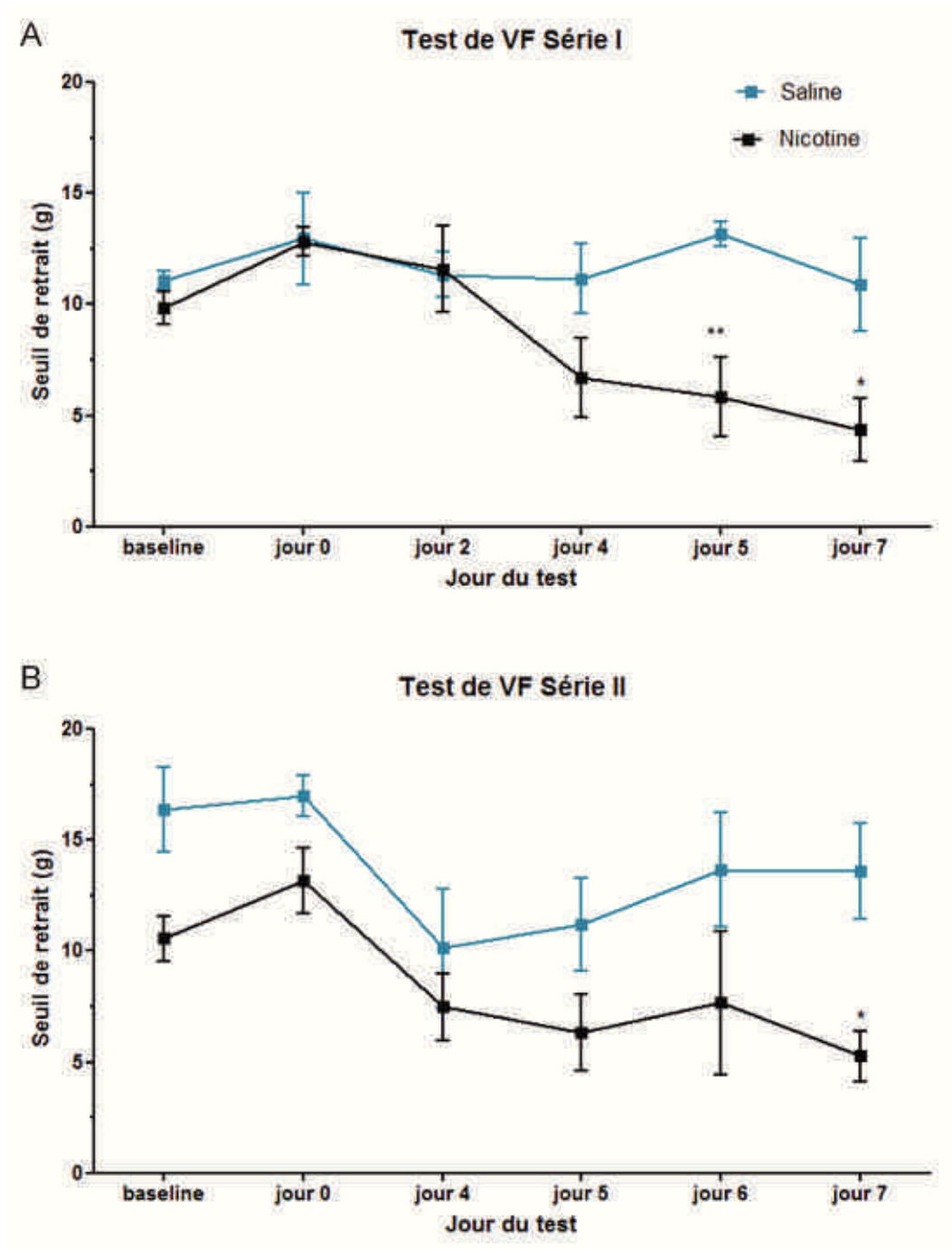


FIGURE 7.1: Test de sensibilité mécanique de la série 1 (A) et de la série 2 (B). Le jour 0 correspond au début du traitement avec une solution saline ou de nicotine par voie intra-péritonéale ($1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Chaque courbe représente la moyenne ($\pm\text{SEM}$) des réponses par jour de test avec les filaments de von Frey, des animaux des groupes contrôle (courbe bleue) et nicotine (courbe noire). (A) Série 1. Au jour 4, les seuils de retrait des rats traités à la nicotine ($n=5$) diminuent par rapport à ceux du groupe contrôle ($n=4$). Au jour 5, la différence entre les deux groupes est significative et se prolonge jusqu'au jour 7. (B) Série 2. Au jour 4, les seuils de retrait des rats traités à la nicotine ($n=4$) et à la saline ($n=6$) diminuent. Les animaux traités à la nicotine sont en dessous de 10 g, traduisant le début d'une hypersensibilité. Le groupe contrôle reste au-dessus. Au jour 7, la différence entre les deux groupes est significative (voir le texte pour le détail des tests statistiques).

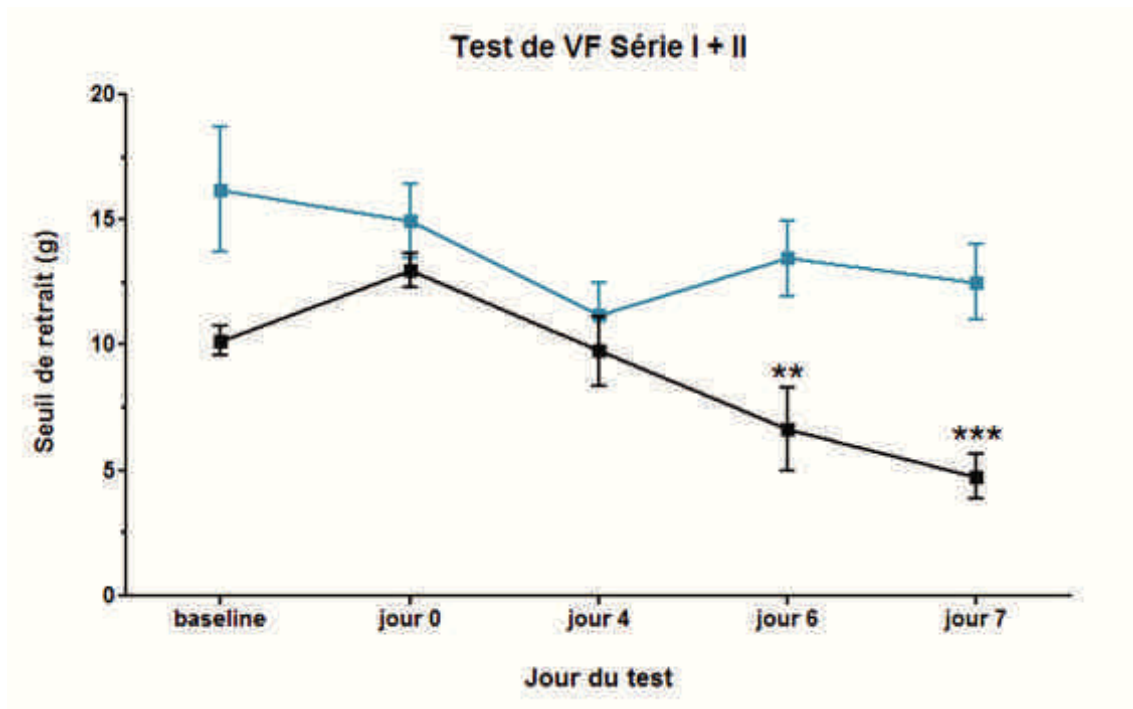


FIGURE 7.2: Test de sensibilité mécanique des deux séries. Le jour 0 correspond au début du traitement, avec une solution saline (courbe bleue) ou de nicotine ($1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, courbe noire). Chaque courbe représente la moyenne ($\pm\text{SEM}$) des réponses par jour de test avec les filaments de von Frey, des animaux des groupes contrôle et nicotine. Au jour 4, les seuils de retrait des rats traités à la nicotine sont en dessous de 10 g, traduisant le début de l'hypersensibilité. Le groupe contrôle reste au-dessus. Au jour 5, la différence entre les deux groupes est significative ($6,532258 \pm 1,180$ g; $n=9$ pour le groupe nicotine, contre $11,17 \pm 1,346$ g; $n=10$ pour le groupe contrôle; test t, $p < 0,05$). Cette diminution se prolonge jusqu'au jour 6 (Nicotine : $6,632 \pm 1,649$ g, $n=9$; Contrôle : $13,47 \pm 1,514$ g, $n=10$, test t, $p < 0,05$). Une diminution est encore observable au 7^{ème} jour : Nicotine : $4,743 \pm 0,894$ g; $n=9$; Contrôle : $12,52 \pm 1,531$ g; $n=10$, test t, $p < 0,05$.

contrôle et nicotine : selon le traitement reçu (saline ou nicotine) et par laminae (I, II et III/IV voire V). Par animal, cinq sections de moelle épinière ont été utilisées pour ces analyses.

Plusieurs paramètres ont été utilisés pour rendre compte des différences entre les deux conditions (Cf. [figure 4.6](#)). Ces paramètres sont regroupés en trois aspects : nombre de cellules, taille des cellules, intensité de marquage. Cette redondance permet de renforcer la puissance statistique pour un aspect considéré. Cela permet également d'éviter certains artefacts dans l'analyse. Les données ont ensuite été analysées par un test t non-apparié, avec correction de Welch (n=nombre d'animaux, 5 sections analysées par animal).

Microglie

Chez les animaux traités à la nicotine, les cellules microgliales (Iba1+) apparaissent de façon générale plus nombreuses et plus grosses en taille. De plus, l'intensité du marquage est également plus fort chez les rats injectés à la nicotine (voir [figure 7.3](#)).

Dans la première série d'injection, cette différence est significative dans les laminae III/IV de la corne dorsale de la moelle épinière des animaux du groupe nicotine. Notamment, la surface des cellules Iba1+ est supérieure chez les rats traités à la nicotine par rapport au groupe contrôle (*aire des corps cellulaire* : +16,67%, n=5 ; p <0,005). Le périmètre du masque Iba1 créé pour l'analyse est aussi significativement plus important (*périmètre moyen du masque par cellule* +11,57%, n=5 chez les rats injectés à la nicotine ; p <0,05.).

Pour la seconde série d'injection, les différences sont significatives pour les couches I, II et III/IV (10, 2 et 6 paramètres respectivement). Pour les rats du groupe nicotine, les cellules Iba+ apparaissent significativement plus nombreuses dans la couche I de la corne dorsale de la moelle épinière (*nombre de cellules par μm^2* : 23,64%, n=4 ; p <0,005). La couche III des rats traités à la nicotine présente également une augmentation du nombre de cellules Iba1+ (+11,11% ; p <0,005).

On retrouve un marquage Iba1 plus intense dans les trois laminae du groupe nicotine : +39,87% pour la LI, +12,49% pour la LII, +17,41% pour les LIII/IV (*nombre de cellules par μm^2* ; p<0,05 ; n=4 pour chacune des couches). Enfin, la surface des cellules microgliales est plus importante (*aire totale du corps cellulaire en μm^2* +38,11% ; p<0,05 ; n=4) pour la couche I chez les rats traités à la nicotine (voir [figure 7.4](#)).

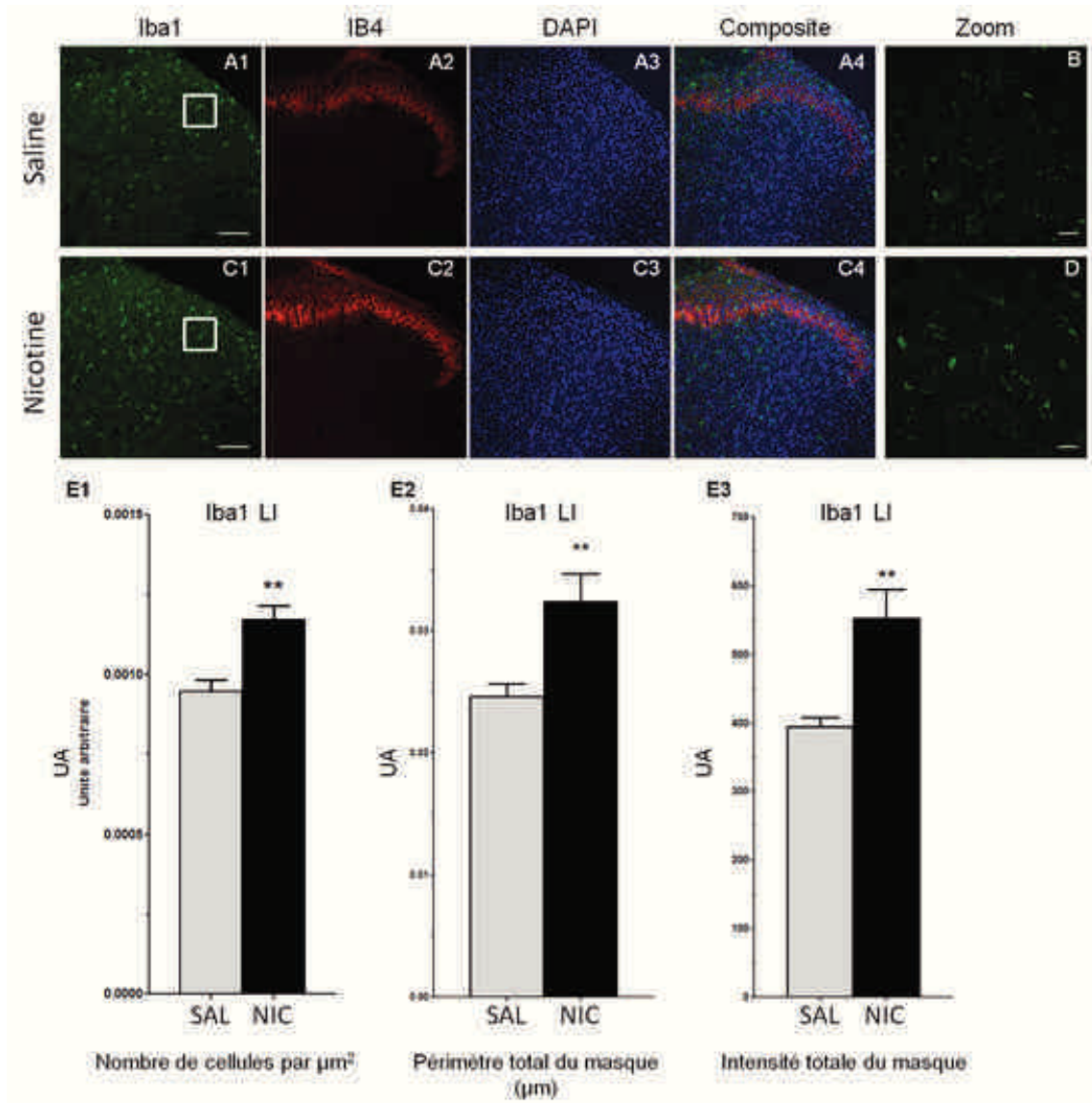


FIGURE 7.3: Conséquence d'un traitement chronique à la nicotine au niveau des cellules microgliales spinales. Immuno-marquage des cellules microgliales (Iba1, en vert) dans les laminae supérieures de moelle épinière de rats après 7 jours d'injection de solution saline (A) ou de nicotine (C). Barres d'échelles : 100 μm . (B) Grossissement de la zone figurée par le carré blanc en A1. (D) Grossissement de la zone de C1. Barres d'échelles : 20 μm . Les marquages IB4 (rouge) et DAPI (bleu) ont servi pour la distinction des couches I, II et III/IV de la corne dorsale de la moelle épinière. (E) Exemple pour la couche I de la différence entre les trois aspects décrits par les paramètres. Paramètres rendant compte (E1) du nombre et (E2) de la taille des cellules, ainsi que (E3) de l'intensité de marquage Iba1. **: $p < 0,005$.

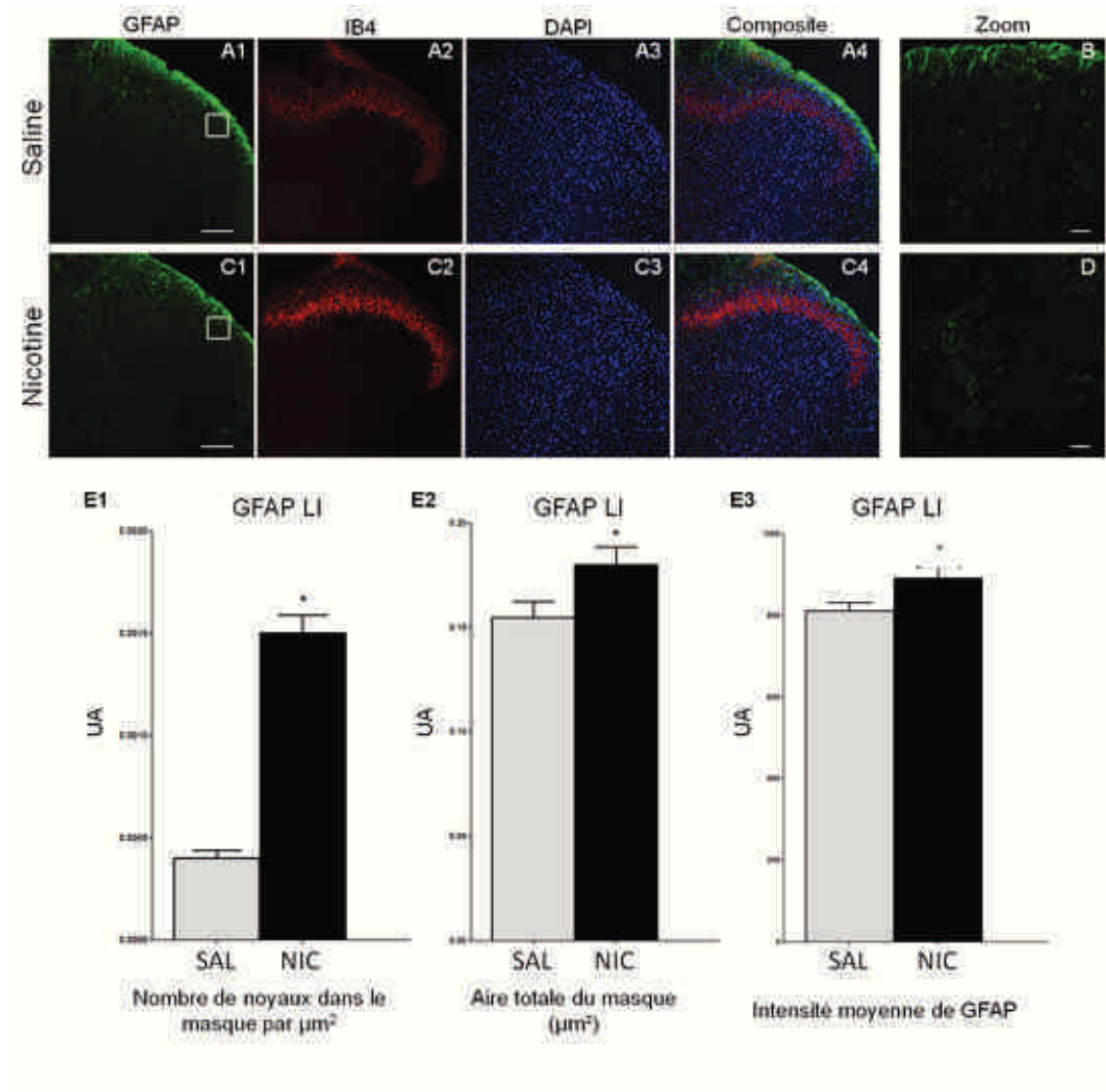


FIGURE 7.5: Conséquence d'un traitement chronique à la nicotine au niveau des cellules astrocytaires spinales. Immuno-marquage des cellules astrocytaires (GFAP, en vert) dans les laminae supérieures de moelle épinière de rats après 7 jours d'injection de solution saline (A) ou de nicotine (C). Barres d'échelles : $100 \mu\text{m}$. (B) Grossissement de la zone figurée par le carré blanc en A1. (D) Grossissement de la zone de C1. Barres d'échelles : $20 \mu\text{m}$. Les marquages IB4 (rouge) et DAPI (bleu) ont servi pour la distinction des couches I, II et III/IV de la corne dorsale de la moelle épinière. (E) Exemple pour la couche I de la différence entre les trois aspects décrits par les paramètres. Paramètres rendant compte (E1) du nombre et (E2) de la taille des cellules, ainsi que (E3) de l'intensité de marquage GFAP. * : $p < 0,05$.

Astrocytes

Les cellules astrocytaires (GFAP+) présentent également des différences significatives chez les rats traités à la nicotine par rapport au groupe contrôle. Cependant, le nombre de paramètres concernés est inférieur à celui des cellules Iba1 (voir [figure 7.5](#)).

Dans la première série d'injection, les cellules GFAP+ sont plus nombreuses dans la LI des animaux traités à la nicotine par rapport au groupe contrôle (*nombre de cellules par μm^2* : +23,52% ; $p < 0,05$ pour le groupe nicotine, $n=4$).

De plus, le périmètre des cellules de la couche I est supérieur chez les animaux ayant reçu les injections de nicotine (*périmètre total du masque par cellule en μm^2* : +25,61% ; $p < 0,05$; $n=5$).

Pour la seconde série d'injection, on retrouve, chez les animaux du groupe nicotine, une tendance à l'augmentation de taille des cellules GFAP+ dans la LI mais non significative. En revanche, dans la LIII/IV, les astrocytes sont significativement plus gros en taille (aire totale du masque par μm^2 : +11,87% ; $p < 0,05$, $n=4$).

Ils sont également plus nombreux dans la couche I (*nombre de noyau DAPI dans le masque par μm^2* : +9,66% ; $p < 0,05$, $n=4$), ainsi que dans les LIII/IV (*rapport du nombre de cellules sur le nombre de noyau DAPI* : +12,82% ; $p < 0,05$; $n=4$).

Enfin, l'ensemble des deux groupes nicotine présente dans la couche I une intensité totale de marquage pour la GFAP supérieure aux groupes contrôle (*intensité totale dans le masque* : +20,74% ; $p < 0,05$; pour les deux groupes d'animaux traités à la nicotine, $n=9$) et des cellules plus grosses (*périmètre total du masque par cellule en μm^2* : +16,28% ; $p < 0,05$, pour les deux groupes d'animaux traités à la nicotine, $n=9$) (voir [figure 7.6](#)).

Co-transporteur du potassium et du chlore 2

Le co-transporteur du potassium et du chlorure de type 2 (KCC2) est responsable de l'homéostasie neuronale du chlore. L'immuno-détection du KCC2 révèle un marquage diffus, dans toute la moelle épinière. Les corps cellulaires ne sont donc pas définissables par le masque à la résolution utilisée. Certains paramètres n'ont donc pas été considérés.

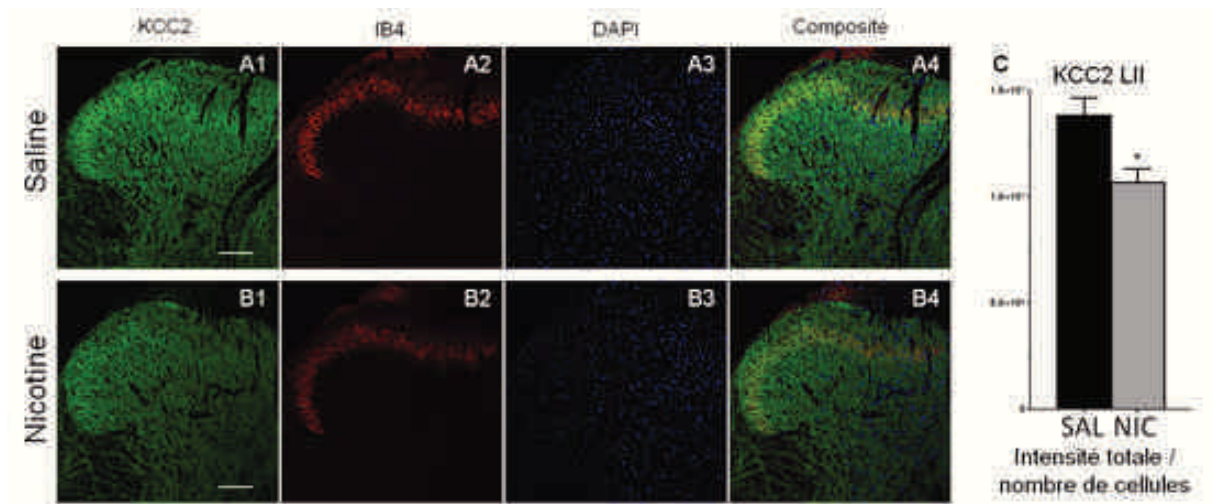


FIGURE 7.7: Conséquence d'un traitement chronique à la nicotine au niveau du co-transporteur KCC2. Immuno-marquage du co-transporteur KCC2 (en vert) dans les laminae supérieures de moelle épinière de rats après 7 jours d'injection de solution saline (A) ou de nicotine (B). Barres d'échelles : 100 μ m. Le marquages IB4 (rouge) et DAPI (bleu) ont servi pour la distinction des couches I, II et III/IV de la corne dorsale de la moelle épinière. (C) Diminution significative de l'intensité du marquage KCC2 chez les animaux traités à la nicotine. * : $p < 0,05$.

De façon générale, l'intensité du marquage apparaît globalement diminuée dans les couches II et III/IV de la moelle épinière des rats du groupe nicotine. Pour la première série d'injection, cette diminution est significative dans la LII (*intensité moyenne* : -22,94% ; $p < 0,05$; $n=5$, voir [figure 7.7](#)).

Pour la seconde série, la surface du masque est largement diminuée pour le groupe nicotine (*aire/nombre de noyaux dans le masque* : -40,30% ; $p < 0,05$; $n=5$, voir [figure 7.7](#)).

De plus, l'aire du masque KCC2 est significativement diminuée dans les LIII/LIV (*Aire du masque/nombre de cellule avec noyau (μm^2)* -33,95% ; $p < 0,005$; $n=9$).

Tous les résultats sont récapitulés dans la [table 7.1](#).

7.3 Interprétation des résultats

7.3.1 Tests comportementaux

Avant et pendant les premiers jours d'administration répétée de nicotine, les rats n'ont pas présenté de différence significative avec le groupe contrôle. Néanmoins, pendant le traitement, les seuils de retrait de la patte diminuaient progressivement, jusqu'à atteindre une différence significative à partir du jour 6, qui s'est prolongée jusqu'à la fin du traitement. Aussi, les

	Iba1			GFAP			KCC2		
	L _I	L _{II}	L _{III} / L _{IV}	L _I	L _{II}	L _{III} / L _{IV}	L _I	L _{II}	L _{III} / L _{IV}
7 paramètres rendant compte du nombre de cellules d'intérêt	+ 5/7	0	+ 2/7	+ 4/7	0	+ 1/7	-	-	-
13 paramètres rendant compte de la taille des cellules d'intérêt	+ 3/13	0	+ 4/13	+ 2/13	0	+ 1/13	0	0	- 3/13
7 paramètres rendant compte de l' intensité du marquage d'intérêt	+ 2/7	+ 2/7	+ 3/7	+ 2/7	0	0	0	- 1/7	0

TABLE 7.1: **Tableau résumé des conséquences d'un traitement chronique à la nicotine sur les cellules microgliales et astrocytaires et le co-transporteur KCC2 chez le rat.** Tous les paramètres sont regroupés selon l'aspect qu'ils recouvrent (horizontalement dans le tableau) et chaque marqueur (**Iba1** pour la microglie, **GFAP** pour les astrocytes et **KCC2** pour le co-transporteur des ions chlorure) est considéré par lamina (verticalement). Le nombre de paramètres significativement différents chez les rats traités à la nicotine pour chacun des aspects est indiqué par un chiffre, le signe + indiquant une augmentation chez les rats injectés à la nicotine et le signe - une diminution. Au total, 7 paramètres rendent compte du **nombre** de cellules d'intérêt, 13 pour la **taille** de ces cellules et 7 autres paramètres pour l'**intensité** du marquage d'intérêt (Iba1, GFAP, KCC2). Chacun des paramètres a été considéré pour chaque lamina et pour les trois marqueurs d'intérêt. De façon générale, le traitement à la nicotine a entraîné une activation des cellules microgliales et astrocytaires dans les couches I et III/IV de la moelle épinière. En effet, les cellules Iba1- et GFAP-positives sont plus nombreuses, ont une taille plus importante et présentent un marquage plus intense, un profil général caractéristique d'un état activé pour ces cellules. Cette activation est corrélée avec une diminution d'expression du co-transporteur KCC2 surtout marquée pour les laminae II et III/IV. Les mécanismes possibles pouvant expliquer comment l'activation des cellules gliales conduit à une diminution de l'expression du KCC2 sont discutés dans le texte. Tests statistiques : test *t* de Student, $p < 0,05$.

seuils ont atteint des valeurs considérées en condition normale comme non-nociceptive. Ceci traduit donc l'installation d'un phénomène d'hypersensibilité mécanique et/ou d'allodynie mécanique, chez les animaux traités.

La nicotine, administrée de façon chronique, a donc entraîné un effet pro-nociceptif. Cet effet est paradoxalement opposé à ses effets analgésiques en condition d'administration aiguë.

Le fait d'effectuer les tests nociceptifs avant les injections de nicotine permet justement de s'affranchir des effets aigus, analgésiques et d'éviter de mesurer les phénomènes de tolérance à la nicotine. Ainsi, seules les conséquences à plus long terme du traitement ont pu être étudiées et non pas les effets directs liés à une injection aiguë de la nicotine.

7.3.2 Au niveau cellulaire

L'injection chronique de nicotine a produit une augmentation du nombre et de la taille des cellules microgliales Iba1+. De plus, un marquage plus intense pour Iba1 a également été observé dans ces cellules. Ces augmentations et cette intensification traduisent un état activé des cellules Iba1+, suite au traitement par la nicotine.

Les cellules astrocytaires plus nombreuses et plus grosses en taille, présentent également une intensification du marquage GFAP. Ces conséquences traduisent aussi un profil activé des astrocytes chez les rats des groupes nicotine, principalement dans la LI.

Cette activation des cellules microgliales et astrocytaires est associée à une diminution de l'intensité globale de l'immuno-détection de KCC2, suggérant une diminution possible du transporteur. Cette baisse d'intensité est significative dans la LII.

En résumé

L'administration répétée de nicotine chez le rat induit une hypersensibilité mécanique, qui est associée au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière à une activation des cellules microgliales et astrocytaires, ainsi qu'à une diminution de l'intensité de marquage du transporteur KCC2. Cette hypersensibilité est-elle la conséquence de l'activation gliale dans la moelle épinière ? En quoi une activation gliale au niveau spinal pourrait-elle produire des phénomènes d'hypersensibilité ? Quel est le lien avec l'expression de KCC2 dans les comportements observés ? Ces questions sont abordées dans la partie suivante.

7.4 Discussion des résultats

Le traitement chronique de nicotine a induit une hyperalgésie et une allodynie mécaniques ainsi qu'une activation des cellules gliales dans la moelle épinière. La nicotine ayant été injectée par voie i.p., elle peut agir à plusieurs niveaux. L'activation des cellules gliales peut résulter d'une action directe de la nicotine sur ces cellules au niveau de la moelle épinière et/ou indirecte, sur des neurones spinaux, des afférences primaires ou encore d'une action au niveau des centres supra-spinaux responsables des contrôles descendants.

Au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, les cellules microgliales et astrocytaires présentent des signes d'activation : elles sont plus nombreuses, plus grandes en taille et l'intensité des marquages est plus importante.

Les effets aigus de la morphine sont comparables à ceux décrits pour l'ACh et la nicotine. Par ailleurs, tel que nous l'avons dans l'Introduction, des études montrent que l'ACh médie une partie de l'action analgésique aiguë d'une injection systémique de morphine, im-

pliquant entre autre les nAChRs. Par ailleurs, chez le rat, l'injection répétée de nicotine pendant 14 jours entraîne une augmentation de l'immuno-réactivité pour la prodynorphine (précurseur de la dynorphine, un opioïde endogène) au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière [Lough *et al.* 2007]. L'hypersensibilité mécanique induite par le traitement chronique de nicotine est diminuée lorsque de l'antisérum anti-dynorphine est administrée par voie i.t., suggérant que la dynorphine spinale contribue à l'hypersensibilité mécanique induite par le traitement chronique de nicotine [Lough *et al.* 2007].

Ainsi, on peut se demander si l'ACh joue également un rôle dans les effets *hyperalgésiques* induits par la morphine dans le cas d'une administration chronique.

7.4.1 Nicotine chronique et réponses nociceptives

Nous avons étudié les conséquences d'un traitement chronique à la nicotine (1mg.kg^{-1} deux fois par jour). Cette administration par voie i.p. répétée entraîne l'installation progressive d'une hypersensibilité mécanique chez le rat, significativement différente du groupe contrôle après 5 à 6 jours de traitement. Nos résultats sont cohérents avec ceux décrits dans la littérature. En effet, des rats implantés avec une mini-pompe osmotique délivrant une solution de nicotine (4 à 10 mg.kg^{-1} par jour) développent une hypersensibilité mécanique au bout de 7 jours [Brett *et al.* 2007, Josiah & Vincler 2006]. De plus, chez des animaux neuropathiques, ce traitement chronique à la nicotine exacerbe l'allodynie mécanique qui s'est développée suite à la lésion initiale [Brett *et al.* 2007, Josiah & Vincler 2006].

La plupart des études sur les effets de la nicotine chronique s'intéresse plutôt au phénomène de tolérance qui s'installe. Par exemple, suite à trois injection s.c. par jour de nicotine ($0,3\text{ mg.kg}^{-1}$ par injection), la nicotine commence à perdre son effet analgésique dès le 2^{ème} jour de traitement lors de tests de sensibilité thermique au chaud [Wewers *et al.* 1999] et l'effet analgésique de la nicotine (testé 5 minutes après l'injection) est entièrement perdu après 7 jours [Wewers *et al.* 1999, Carstens *et al.* 2001, Yang *et al.* 1992]. De même, des rats exposés de façon répétée à de la fumée de cigarettes présentent une analgésie qui s'atténue avec le temps [Anderson *et al.* 2004].

Dans ces études, la nicotine est administrée de façon répétée et les tests nociceptifs réalisés *après* l'administration. Ce qui est testé dans ces études sont les conséquences immédiates d'une administration de nicotine. Ces effets de tolérance ne sont donc pas

dissociés d'éventuels effets hyperalgésiques dus à l'injection répétée de nicotine. Dans nos expériences, nous avons testés les animaux *avant* les injections de nicotine. Les effets de tolérance n'ont donc pas été réellement mesurés. Puisque nos tests ont été effectués au moins 12h après la dernière injection de nicotine, comparable à ceux des études décrits plus haut. Il est probable que seules les conséquences du traitement chronique à la nicotine aient été mesurées dans notre étude. Idéalement, pour pouvoir d'une part dissocier et d'autre part, quantifier les effets de tolérance et d'hypersensibilité, les expériences devraient comporter deux séries de tests nociceptifs : une série avant injection de nicotine, pour tester l'hypersensibilité et une série après injection, pour tester la tolérance. Nous ne l'avons pas fait pour une raison de temps.

Les phénomènes d'hypersensibilité dus à la nicotine chronique semblent également associés à un état d'activation cellulaire dans la corne dorsale de la moelle épinière [Josiah & Vincler 2006]. Pour cette étude, les auteurs se sont intéressés aux différences d'états d'activation au niveau spinal entre animaux neuropathiques traités à la nicotine et des animaux traités avec une solution saline. Ils n'ont pas précisé le type de cellules ni les couches touchées par cette activation (*via* un marquage pCREB). Néanmoins, les LI à LIII ("outer laminae", telles que mentionnées par les auteurs) semblent être particulièrement concernées par cette activation cellulaire [Josiah & Vincler 2006].

7.4.2 Nicotine chronique et cibles cellulaires au niveau spinal

Cellules gliales

Des expériences menées *in vivo* et *in vitro* suggèrent que les agonistes nicotiniques peuvent agir de façon aiguë sur les cellules gliales. Par exemple, le potentiel de membrane d'astrocytes en culture issus de moelle épinière de rats est, dans la plupart des cas, hyperpolarisé par l'ACh, la nicotine ou la muscarine, mais un petit nombre d'astrocytes peut présenter une dépolarisation [Hösli *et al.* 1988]. Ces deux effets sont sous-tendus par différents types de nAChRs, comme le montre l'utilisation d'outils pharmacologiques [Hösli *et al.* 1988]. Les cellules microgliales et astrocytaires expriment plusieurs types de nAChRs, dont notamment $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 7$ et le sous-type $\alpha 4\beta 2$ [Shytle *et al.* 2004]. Les récepteurs $\alpha 7$ participent à la régulation des processus inflammatoires et nociceptifs générés par les

cellules gliales du SNC [Wang *et al.* 2003, Westman *et al.* 2010, Medhurst *et al.* 2008]. Des données *in vitro* montrent que la nicotine et l'épibatidine diminuent la libération de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par les cellules gliales, normalement associée au développement des phénomènes d'hypersensibilité [Shytle *et al.* 2004, Wang *et al.* 2003, Watkins *et al.* 2001, Watkins *et al.* 2005].

Nos résultats suggèrent qu'un traitement de 7 jours à la nicotine chez le rat induit une activation gliale au niveau spinal, cohérente avec les données de la littérature [Brett *et al.* 2007, Josiah & Vincler 2006]. Nous avons observé une forte activation des cellules microgliales dans les couches superficielles de la moelle épinière. Les cellules astrocytaires ont également présenté un état d'activation, mais de moindre amplitude. Soit le traitement chronique influe moins sur les astrocytes, soit la microglie et les astrocytes présentent un *timing* d'activation différent.

Une étude utilisant la technique de RT-PCR montre que les cellules microgliales expriment plus précocement les ARNm codant des facteurs d'activation tel le *cluster determinant 14* (ou CD14) comparé aux astrocytes pour l'expression de la GFAP [Tanga *et al.* 2004]. Dès 4h après l'induction de la neuropathie périphérique, les ARNm codant le CD14 sont détectables et ce, pendant 28 jours. La GFAP astrocytaire n'est détectable qu'après 4 jours post-chirurgie. Les animaux de notre étude ont été sacrifiés après 7 jours, c'est-à-dire au début de l'activation astrocytaire. Cela peut donc expliquer le nombre plus faible de paramètres d'activation significativement différents pour les cellules GFAP+ dans notre étude. On retrouve *in vivo* et en condition neuropathique ces différences dans les délais d'activation [Zhang & De Koninck 2006] (voir également pour revue [Watkins *et al.* 2001]). On peut donc spéculer que la microglie serait responsable de l'*induction* des phénomènes d'hypersensibilité, alors que les astrocytes seraient plutôt impliqués dans le *maintien* de ces phénomènes.

Le système cholinergique, en condition aiguë, a tendance à freiner la libération de facteurs pro-inflammatoires [Streit *et al.* 2000] et donc à limiter l'influence des cellules gliales. En situation aiguë, une diminution de la réponse inflammatoire est associée à une action cholinergique anti-nociceptive, périphérique (appelée la *voie cholinergique anti-inflammatoire*, médiée par le nerf vague [Wang *et al.* 2003]) et centrale [Shytle *et al.* 2004]. Cet effet du

système cholinergique est donc cohérente avec une action neuroprotectrice et anti-nociceptive [Tanga *et al.* 2005, Mudo *et al.* 2007].

Or, des auteurs ont étudié les conséquences d'un traitement chronique de 28 jours à la nicotine (8,6 mg.kg⁻¹ par jour *via* une mini-pompe osmotique) sur les niveaux de cytokines chez des rats contrôles et des rats porteur d'une neuropathie d'origine périphérique (par constriction du nerf sciatique) [Brett *et al.* 2007]. Les données montrent que le traitement chronique à la nicotine a induit une exacerbation de l'hypersensibilité mécanique et une activation microgliale spinale associée à une diminution des niveaux de cytokines pro-inflammatoires telle que l'interleukine-1 β (IL-1 β) [Brett *et al.* 2007]. En revanche, les niveaux d'IL-6 et de *tumor necrosis factor*- α (ou TNF- α) ainsi que le nombre de cellules immunitaires (macrophages et cellules T) demeurent inchangés [Brett *et al.* 2007]. Ce phénomène est reproduit par l'injection de choline, qui est plutôt sélective des nAChRs de type $\alpha 7$ [Loram *et al.* 2010, Loram *et al.* 2012].

La répression des phénomènes inflammatoires par le système cholinergique en condition aiguë semble disparaître en condition de traitement chronique. Les cellules gliales seraient donc moins soumises à ce "frein". Le traitement chronique de la nicotine semble ne plus diminuer les niveaux de IL-6 et TNF α [Brett *et al.* 2007]. Les cellules gliales peuvent donc rester activées plus longtemps. Pendant cet état, elles sécrètent donc des cytokines pro-inflammatoires plus longtemps et ainsi causer des dysfonctionnements neuronaux [Aschner *et al.* 2002, Liu & Hong 2003, Watkins *et al.* 2005]. Ceci pourrait concourir à l'installation des phénomènes d'hypersensibilité.

Cette perte de l'influence cholinergique pourrait être induite par une diminution du nombre de récepteurs présents à la surface des cellules gliales ou à une désensibilisation de ces récepteurs suite au traitement chronique (*Cf.* [section 7.4.3](#)).

Neurones et terminaisons centrales des afférences primaires

Les effets de la nicotine sur les cellules gliales peuvent aussi être indirects, faisant intervenir des neurones au niveau spinal (voir paragraphe suivant) ou au supra-spinal (*Cf.* [section 7.4.4](#)).

L'administration i.t. aiguë de nicotine et de cytosine augmente les concentrations de glutamate (et d'aspartate) au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière de rat

[Khan *et al.* 1996]. La mesure de ces concentrations étant réalisée par microdialyse, le glutamate issu des afférences primaires, qui expriment des nAChRs [Khan *et al.* 2003, Wang *et al.* 2003], ne peut être distingué de celui qui pourrait être libéré par des interneurons excitateurs.

Des astrocytes corticaux en cultures répondent au glutamate par des récepteurs NMDA et métabotropiques [Aicher *et al.* 1997, Besong *et al.* 2002]. De plus, dans des cultures mixtes de moelle épinière, l'application de glutamate (modèle d'excitotoxicité) entraîne la prolifération des cellules microgliales et la libération d'IL β -1, -6 et de NO [Tikka *et al.* 2001]. On peut donc spéculer que la libération de glutamate induite par la nicotine peut induire l'activation des cellules gliales. Un autre neurotransmetteur excitateur peut être impliqué : l'ATP.

Les cellules microgliales exacerbent les comportements douloureux suite à leur activation par l'ATP extra-cellulaire, provenant d'astrocytes voisins ou de neurones et pouvant être libéré au niveau synaptique ou extra-synaptique (sécrétion) [Davalos *et al.* 2005, Di Virgilio 2006]. L'ATP exerce son action sur les cellules microgliales *via* notamment les récepteurs P2X4 et ce phénomène pourrait être à l'origine du développement de douleurs neuropathiques [Beggs *et al.* 2012]. En effet, chez la souris, lorsque l'expression des P2X4 est diminuée par des ARN anti-sens, l'hypersensibilité mécanique est également diminuée [Beggs *et al.* 2012]. Enfin, l'injection i.t. de cellules microgliales préalablement activées *in vitro* par de l'ATP, produit une l'hypersensibilité mécanique [Tsuda *et al.* 2003]. Ce phénomène est dépendant de la sécrétion de BDNF par la microglie suite la stimulation par l'ATP [Trang *et al.* 2006]. Au niveau spinal, la libération de BDNF conduit à une diminution de la transmission inhibitrice GABAergique et glycinergique [Trang *et al.* 2006].

7.4.3 Conséquences sur les récepteurs nicotiques

Des études sur d'autres structures que la moelle épinière concernant la dépendance nicotinique montrent qu'un traitement chronique de nicotine entraîne la désensibilisation des nAChRs.

Dans des tranches d'hippocampe de souris, la perfusion de nicotine dans le bain modifie la transmission GABAergique (*via* des nAChRs $\alpha 7$ et $\alpha 4\beta 2$) et glutamatergique (*via* $\alpha 7$) [Proctor *et al.* 2011]. Lorsque les souris absorbent préalablement de la nicotine par

l'intermédiaire de l'eau de boisson, la fréquence des courants synaptiques excitateurs et inhibiteurs n'est plus modifiée par l'application aiguë de nicotine [Proctor *et al.* 2011]. Des données obtenues à partir de synaptosomes provenant du cerveau de souris montrent une diminution du fonctionnement des nAChRs [Marks *et al.* 1993], traduisant une désensibilisation de ces récepteurs suite à un traitement chronique à la nicotine [Marks *et al.* 1994]. Une telle désensibilisation des nAChRs portés par les cellules gliales pourrait expliquer la disparition du “frein” cholinergique (*Cf.* [section 7.4.2](#)) exercé sur les cellules gliales en condition aiguë.

Certaines études *in vitro* chez le rat et l'humain portant sur les phénomènes de dépendance et de tolérance montrent une sur-expression possible des nAChRs de type $\alpha 4\beta 2$ dans le SNC suite à un traitement chronique à la nicotine [Buisson & Bertrand 2001, Flores *et al.* 1997, Nguyen *et al.* 2003, Besson *et al.* 2007]. Le niveau d'expression membranaire des récepteurs peut être doublée par rapport aux niveaux existants [Benwell *et al.* 1988, Sallette *et al.* 2005]. Quelques études dans le cerveau de rat [Perry *et al.* 2007] et de singe [McCallum *et al.* 2006] montrent que cette augmentation ne concernent que certains récepteurs, notamment ceux contenant $\alpha 4$ et $\beta 2$, alors que les nAChRs de type $\alpha 3/\alpha 6\beta 2$ ne semblent pas modulés.

Chez le rat, cette sur-expression pourrait participer aux effets d'hypersensibilité induite par le traitement chronique à la nicotine. Ce phénomène semble absent chez la souris [Marks *et al.* 1992, Whiteaker *et al.* 1998, Vallejo *et al.* 2005].

7.4.4 Effets sur les cibles supra-spinales

Les contrôles descendants supra-spinaux impliquent notamment la substance grise périacqueducale (PAG) et la partie rostro-médial du bulbe rachidien (RVM). Parmi les populations neuronales présentes au niveau de la PAG, on retrouve des interneurons GABAergiques. Ceux-ci, activés de façon tonique, modifient l'excitabilité des neurones de la PAG et modulent donc le message de sortie de cette structure [Rye *et al.* 1987, Rye *et al.* 1988, Behbehani *et al.* 1990, Ogawa *et al.* 1994].

Des neurones cholinergiques, localisés dans la DLPT, projettent de façon importante vers la PAG [Behbehani 1982, Woolf *et al.* 1990], où ils modulent l'activité des interneu-

rones GABAergiques par une action sur des mAChRs [Lau *et al.* 2008] et des nAChRs [Nakamura & Jang 2010]. Les récepteurs muscariniques inhibent la transmission GABAergique dans la PAG [Lau *et al.* 2008]. De même, la microinjection de carbachol dans la PAG induit de l’analgésie [Guimarães *et al.* 1999]. Cela suggère que les neurones cholinergiques du DLPT exercent un contrôle inhibiteur tonique sur les interneurons GABAergiques. Ces interneurons projettent sur des cellules de type “off” de la RVM. L’inhibition des interneurons GABAergique permet donc une inhibition de la nociception.

Or, l’injection aiguë de nicotine dans la PAG induit une augmentation transitoire de la libération de GABA, *i.e.* une facilitation de la transmission GABAergique à ce niveau [Nakamura & Jang 2010]. Ce phénomène implique des nAChRs de type $\alpha 4\beta 2$ qui sont pré-synaptiques [Nakamura & Jang 2010]. Cela suggère que des terminaisons GABAergiques aboutissant dans la PAG et portant des nAChRs inhiberaient les interneurons GABAergique de la PAG, conduisant ainsi à l’analgésie décrite dans les études précédentes [Lau *et al.* 2008, Nakamura & Jang 2010, Guimarães *et al.* 1999].

En condition d’administration chronique de nicotine, une désensibilisation des nAChRs conduirait à une levée d’inhibition sur les interneurons GABAergiques de la PAG. Ceux ci inhiberaient alors les cellules “off” de la RVM, ce qui diminuerait leur action anti-nociceptive et pourrait conduire aux phénomènes d’hypersensibilité observés dans notre étude.

Comme nous l’avons vu dans la partie Introduction, si la plupart des zones supra-spinales injectées avec de la nicotine sous-tendent une action anti-nociceptive, certaines sont pro-nociceptives (*Cf.* [section 2.1](#)). Si des récepteurs qui ne désensibilisent pas, ou peu, sont exprimés par des neurones à effet pro-nociceptif, on peut supposer qu’en plus de l’inhibition des contrôles inhibiteurs, une facilitation des contrôles excitateurs puisse exister.

Des données concernant ce point sont manquantes dans la littérature. Cependant, une étude sur les cellules cholinergiques localisées dans le DLPT suggère qu’une proportion de ces cellules pourrait être équivalente à des cellules de type “on” de la RVM [Carlson *et al.* 1995]. Ceci est également en accord avec les injections de nicotine dans la PAG et la RVM produisant un effet facilitateur sur la nociception. Une activation persistante des contrôles facilitateurs peut, d’autre part, induire des phénomènes de sensibilisation des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière [Fields *et al.* 1992, Wei *et al.* 1999a, Wei *et al.* 1999b], qui peuvent à

leur tour sous-tendre l'apparition des phénomènes d'allodynie et d'activation gliale observés dans notre étude.

En résumé

Les conséquences de l'activation répétée de nicotine diffèrent des effets aigus de la nicotine. L'effet aigu de la nicotine est plutôt de type protecteur, en induisant une diminution des phénomènes inflammatoires et une analgésie. La chronicité de l'administration entraîne probablement une désensibilisation des effets de la nicotine. Il se pourrait notamment que les cellules gliales spinales ne soient plus (ou soient moins) sensibles à nicotine ou l'ACh endogène responsable de la modulation négative cholinergique. La seconde possibilité est que l'activation gliale suite au traitement chronique résulte d'une action au niveau supra-spinal, avec une altération de la balance contrôles descendants inhibiteurs/facilitateurs.

Des études supplémentaires sont cependant nécessaires pour clarifier les rôles respectifs de la PAG, de la RVM et de la moelle épinière, ainsi que le rôle des cellules exprimant les récepteurs cholinergiques dans les phénomènes que nous avons observés.

7.4.5 Lien entre les systèmes cholinergique et opioïdique

Les effets de la nicotine injectée de façon chronique sont similaires à ceux d'un traitement chronique à la morphine. De plus, le système cholinergique spinal semble médier une partie des effets aigus analgésiques de la morphine. On peut donc se poser les questions suivantes : Partagent-ils les mêmes voies d'actions ? Et si oui, dans quelle mesure ?

Effets aigus de la morphine au niveau spinal

La morphine exerce son action principalement en activant les récepteurs de type μ (MORs) présents au niveau de la substance grise périaqueducule grise (PAG) et du bulbe rachidien rostro-médian (RVM). La morphine active les cellules "off" et inhibe les cellules "on", ce qui produit un effet analgésique (voir [Fang & Proudfit 1998, Rossi *et al.* 1994] et également pour revue [Fields 2004]), ainsi que la partie Introduction).

La présence de MORs au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (voir [Arvidsson *et al.* 1995, Ding *et al.* 1996]), à la fois au niveau pré- et post-synaptique

[Besse *et al.* 1990], suggère également une action anti-nociceptive au niveau spinal [Kline & Wiley 2008]. À ce niveau, le système opioïdérique inhibe la libération de neurotransmetteurs excitateurs et hyperpolarise la membrane de neurones des couches superficielles de la moelle épinière [Hori *et al.* 1992]. Tel que mis en évidence par l'utilisation de DAMGO, un agoniste des récepteurs MORs, le système opioïdérique peut également inhiber la transmission inhibitrice que reçoivent des neurones de la LII, par une action pré-synaptique [Grudt *et al.* 1998].

Effets chroniques de la morphine au niveau spinal

L'utilisation de la morphine dans le traitement des douleurs chroniques, qui nécessite une prise d'analgésique fréquente, peut poser plusieurs problèmes. En effet, l'utilisation prolongée de morphine induit des phénomènes de tolérance, de dépendance et d'hyperalgésie [Bekhit 2010, Lee *et al.* 2011]. Ces phénomènes sont sous-tendus par différents mécanismes (voir [Wang Y *et al.* 2012, Ferrini *et al.* 2013]).

Un traitement chronique à la morphine induit une hypersensibilité mécanique et une dérégulation de l'homéostasie des ions chlorures. Ces effets sont médiés par le *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), libéré par la microglie et qui active les récepteur TrkB (pour *tyrosine kinase receptor B*) présents sur des neurones spinaux [Ferrini *et al.* 2013, Horvath & DeLeo 2009, Horvath *et al.* 2009]. Le BDNF induit également une diminution de l'expression de KCC2 suite à l'activation de récepteurs P2X4 des cellules par l'ATP microgliale [Ferrini *et al.* 2013, Horvath & DeLeo 2009, Horvath *et al.* 2009].

Le blocage pharmacologique ou l'utilisation d'ARNm antisens des récepteurs P2X4 réduit l'activation des cellules gliales ainsi que l'augmentation d'expression des récepteurs MORs à la membrane des cellules gliales. Les phénomènes de tolérance à la morphine sont également réduits [Horvath *et al.* 2009]. Enfin, dans un modèle de rat neuropathique [Tsuda *et al.* 2003], les phénomènes d'allodynie mécanique et d'hyperalgésie thermique disparaissent lorsque l'on bloque l'expression ou l'action de P2X4.

L'activation gliale consécutive à la liaison de la morphine sur les récepteurs MORs présents sur les cellules gliales (microglie et astrocytes) serait induite notamment par une stimulation de la voie ERK (pour *extracellular signal-regulated kinase*) 1/2 (voir pour revue

[Watkins *et al.* 2005]).

Rôle de l'acétylcholine dans les effets chroniques de la morphine

Concernant les tests d'hypersensibilité suite à l'injection chronique de nicotine, nos résultats corroborent les données de la littérature [Josiah & Vincler 2006].

Nous avons également vu dans les paragraphes précédents comment la nicotine pouvait activer les cellules gliales, de façon directe ou indirecte, en agissant soit par les centres supra-spinaux, soit au niveau de la moelle épinière. Le lien entre l'administration systémique de morphine et l'acétylcholine spinale peut être expliqué par la mise en jeu des contrôles descendants, notamment par la signalisation noradrénergique et aussi sérotoninergique [Iwamoto & Marion 1993a]. En effet, tout comme la morphine, l'analgésie produite par l'injection i.t. de clonidine (agoniste des récepteurs de la NA), qui implique le NO [Pan *et al.* 1998], est diminuée quand la signalisation cholinergique spinale est abolie [Pan *et al.* 1999, Paqueron *et al.* 2001].

Ainsi, l'administration chronique systémique de morphine pourrait activer les contrôles descendants noradrénergiques, par action sur les récepteurs MORs localisés dans la PAG et/ou la RVM. Les structures activées pourraient également être celles mises en jeu par le traitement chronique de nicotine. Cette activation va alors entraîner la libération de NA au niveau spinal, qui à son tour active le système cholinergique de la corne dorsale de la moelle épinière. La sollicitation du système cholinergique pourrait alors induire l'activation des cellules gliales.

Enfin, le co-transporteur KCC2 pourrait être également le point commun entre les deux systèmes. En effet, son expression est diminuée dans le cas d'un traitement chronique avec la morphine [Ferrini *et al.* 2013]. Cette diminution est médiée par la signalisation TRkB, initiée par le BDNF [Ferrini *et al.* 2013].

Dans notre étude, l'expression de KCC2 est également diminuée. Nous n'avons pas encore recherché si les voies de signalisation impliquées dans cette dérégulation étaient les mêmes que celles décrites pour la morphine, car nous voulions dans un premier temps, vérifier si les conséquences d'un traitement chronique à la nicotine étaient comparables à celles induites par un traitement chronique à la morphine.

Les effets de la nicotine sur KCC2 restent à élucider. Cependant, on peut supposer que l'activation gliale peut induire les mêmes mécanismes que ceux décrits pour la morphine. Il s'agit d'études préliminaires et des études supplémentaires seront nécessaires pour élucider ce point.

Les ions chlorure transitent à travers les récepteurs GABAergiques et glycinergiques et assurent ainsi l'inhibition dans le SNC. Une dérégulation de l'homéostasie des ions chlorure peut engendrer des modifications majeures de la transmission synaptique inhibitrice et donc du contrôle des messages nociceptifs notamment au niveau spinal (voir pour revue [Price *et al.* 2009]).

Le lien exact entre les différents acteurs mis en jeu et pouvant expliquer les phénomènes d'hyperalgésie qui font suite au traitement chronique à la morphine ou à la nicotine reste encore à être élucidé. On peut néanmoins supposer que si les conséquences comportementales et cellulaires d'un traitement chronique à la morphine ou à la nicotine sont les mêmes, ces deux voies partagent probablement des mécanismes d'action communs, du moins, en partie. L'ACh au niveau spinal apparaît être en *aval* de la signalisation induite par la morphine ou la NA (voir plus haut et également [Fang *et al.* 1996, Chen *et al.* 2005] pour des exemples de données pharmacologiques et [Gage *et al.* 2001] pour un exemple en imagerie). En effet, dans ces études, une perturbation du système cholinergique spinal diminue tout ou partie de l'analgésie induite par la morphine ou la clonidine. Concernant la morphine, une étude de l'injection chronique de cette dernière couplée à une perturbation pharmacologique du système cholinergique spinale serait intéressante à mener, mais il faudrait pouvoir distinguer les effets hyper-algésiques propres à chacun des deux systèmes, ce qui est problématique. L'utilisation de souris KO pour une ou plusieurs sous-unités de nAChRs par exemple pourrait représenter une bonne alternative.

Conclusion et perspectives

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une co-direction entre l'Université de Strasbourg et l'Université Laval à Québec. Dans ces travaux, nous nous sommes intéressés d'une part 1) à une population d'interneurones cholinergiques de la moelle épinière et de leur implication possible dans la modulation de la nociception et d'autre part 2) à la participation du système cholinergique dans la médiation des effets hyper-algésiques dûs à un traitement chronique à la morphine.

Dans un premier temps, nous avons pu caractériser les interneurones cholinergiques présents dans les couches superficielles de la moelle épinière. Ceci a été possible grâce à l'utilisation d'un modèle de souris transgénique dont les cellules cholinergiques expriment la eGFP. À l'aide de telles souris, nous avons pu cibler directement les interneurones cholinergiques de la corne dorsale de la moelle épinière, jusqu'alors peu étudiés. Nous avons ainsi pu montrer qu'ils pouvaient représenter cible thérapeutique potentielle car ils pourraient sous-tendre l'analgésie cholinergique décrite dans la littérature et utilisée en clinique. Il apparaît également important de connaître plus précisément et en détail un tel système du fait du large spectre d'effets de l'acétylcholine dans l'organisme.

Après avoir caractérisé les interneurones cholinergiques sur un plan morphologique et anatomique d'une part, ainsi qu'au niveau de leur identité neurochimique et de leurs propriétés de membrane d'autre part, la caractérisation sur un plan fonctionnel apparaît comme l'étape suivante logique, avec notamment : 1) l'identification des stimuli périphériques auxquels ils répondent (*i.e.* nociceptifs ou non-nociceptifs) et selon quelle(s) modalité(s) (*i.e.* mécaniques, thermiques et/ou chimique) et 2) de quelle façon ces cellules y répondent.

Dans notre modèle de souris transgénique, l'utilisation *in vivo* d'une micro-sonde développée dans le laboratoire d'accueil de Québec permettrait une telle caractérisation. En effet, cette micro-sonde, ou optrode, regroupe une partie optique, destinée à l'identification des cellules cholinergiques eGFP+ et une partie servant d'électrode permettant l'enregistrement extra-cellulaire de l'activité de ces cellules. Une fois un interneurone cholinergique identifié par son signal eGFP et dont le champ récepteur périphérique a été trouvé, l'application de divers stimuli sur ce champ récepteur permettrait l'identification des modalités sensorielles auxquelles ces interneurones cholinergiques spinaux répondent. Une partie de nos

travaux de thèse a ainsi consisté en la mise au point de cette technique. Nous avons pu adresser la question de la faisabilité d'une telle étude. Malgré leur faible nombre, quelques cellules cholinergiques des couches superficielles de la moelle épinière ont pu être identifiées.

Grâce à ces enregistrements *in vivo*, il pourrait également être possible d'étudier les effets pharmacologiques de substances, comme des agonistes (telle que la morphine) ou des antagonistes (telle que la naloxone) des récepteurs opioïdes, administrées par voie intra-veineuse ou directement par voie intra-thécale, sur le système cholinergique endogène spinal. Ainsi, nous pourrions avoir une meilleure compréhension des interactions entre les systèmes cholinergique/opioïdurgique dans le cadre de la transmission nociceptive spinale.

Par ailleurs, l'utilisation de l'optrode peut être couplée avec deux autres modèles de souris transgéniques, dont les cellules cholinergiques exprimeraient la eGFP couplée à une *channel rhodopsine* ou une halo-rhodopsine. Ainsi, après avoir caractérisé et identifié les stimuli reçus par ces cellules, une seconde étude sur les effets de la stimulation ou de l'inhibition de ces interneurons cholinergiques en réponse à une stimulation nociceptive serait envisageable. Ainsi, nous pourrions évaluer comment des stimuli périphériques nociceptifs modulent l'activité électrique de ces cellules.

Dans un second temps, nous avons voulu déterminer le degré d'implication du système cholinergique dans les effets de la morphine, en étudiant les conséquences comportementales et cellulaires d'un traitement chronique de nicotine. Nous avons pu observer que l'administration répétée de nicotine produisait les mêmes changements qu'un traitement chronique à la morphine : une hypersensibilité mécanique, associée sur le plan cellulaire à une activation des cellules microgliales et astrocytaires des couches superficielles de la moelle épinière. De plus, une baisse de l'intensité de marquage du co-transporteur des ions chlorure KCC2 suggère une diminution de l'expression de cette protéine. Ces résultats sont semblables à ceux observés à l'issue d'un traitement similaire à la morphine.

Cette étude préliminaire suggère donc que la nicotine et la morphine partagent, du moins en partie, des mécanismes d'action communs. La vérification par des approches de biologie moléculaire d'une sous-expression possible de KCC2 au niveau protéique (Western-blot notamment) reste à être réalisées. De plus, cette sous-expression devra être également confirmée

par des approches électrophysiologiques *in vitro*, comme l'enregistrement par patch-clamp des courants inhibiteurs de neurones des couches superficielles de moelle épinière de rats traités de façon chronique à la nicotine. Les voies de signalisation impliquées dans la diminution d'expression de KCC2 devront également être étudiées, notamment pour déterminer si elles sont communes avec celles que met en jeu la morphine (le BDNF et son récepteur TrkB, l'ATP et son récepteurs P2X4 glial).

Cette étude pourrait être complétée en étant reproduite chez des souris KO pour une sous-unité des récepteurs cholinergiques de type nicotinique (nAChRs), qui serait traitées de façon chronique à la morphine. Dans le laboratoire d'accueil de Strasbourg, nous disposons d'un modèle de souris KO pour la sous-unité $\beta 2$ des nAChRs, par ailleurs impliquée dans l'analgésie cholinergique. L'utilisation de telles souris permettrait de différencier les effets pro-nociceptifs purement morphiniques sur les seuils nociceptifs, des effets pro-nociceptifs suivant un traitement avec des antagonistes nicotiniques, tels que présentés dans l'Introduction de ce manuscrit.

Afin d'aller un peu plus loin pour élucider complètement l'implication du système cholinergique dans les effets de la morphine, l'étude d'un traitement chronique à la muscarine sur le plan comportemental et cellulaire devrait être également considéré.

L'ensemble de nos données nous ont donc permis d'identifier une nouvelle cible thérapeutique potentielle et un mécanisme d'action possible du système cholinergique spinal. Ces "briques" nous fournissent de nouvelles pistes à explorer afin d'élucider le mode d'action de l'acétylcholine endogène dans la modulation de la transmission nociceptive. Ces indices pourraient permettre l'amélioration de thérapies déjà existantes et l'élaboration de nouveaux outils thérapeutiques.

Bibliographie

- [Abelson & Höglund 2002] Abelson KS, Höglund AU **Intravenously administered oxotremorine and atropine, in doses known to affect pain threshold, affect the intraspinal release of acetylcholine in rats** *Pharmacol Toxicol* (2002) 90(4):187-92
- [Abelson & Höglund 2004] Abelson KS, Höglund AU **The effects of the alpha2-adrenergic receptor agonists clonidine and rilmenidine, and antagonists yohimbine and efaroxan, on the spinal cholinergic receptor system in the rat** *Basic Clin Pharmacol Toxicol* (2004) 94(4):153-60
- [Aceto *et al.* 1983] Aceto MD, Awaya H, Martin BR, May EL **Antinociceptive action of nicotine and its methiodide derivatives in mice and rats** *Br J Pharmacol* (1983) 79(4):869-76
- [Aceto *et al.* 1986] Aceto MD, Bagley RS, Dewey WL, Fu TC, Martin BR **The spinal cord as a major site for the antinociceptive action of nicotine in the rat** *Neuropharmacology* (1986) 25(9):1031-6
- [Aceto *et al.* 1993] Aceto MD, Scates SM, Ji Z, Bowman ER **Nicotine's opioid and anti-opioid interactions: proposed role in smoking behavior** *Eur J Pharmacol* (1986) 1;248(4):333-5
- [Aicher *et al.* 1997] Aicher SA, Sharma S, Cheng PY, Pickel VM **The N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor is postsynaptic to substance P-containing axon terminals in the rat superficial dorsal horn** *Brain Res* (1997) 24;772(1-2):71-81
- [Al-Khater *et al.* 2008] Al-Khater KM, Kerr R, Todd AJ **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* (2008) 1;511(1):1-18
- [Almeida *et al.* 2004] Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S **Afferent pain pathways: a neuroanatomical review** *Brain Res.* (2004) 12;1000(1-2):40-56 *Review*
- [Anderson *et al.* 2004] Anderson KL, Pinkerton KE, Uyeminami D, Simons CT, Carstens MI, Carstens E **Antinociception induced by chronic exposure of rats to cigarette smoke** *Neurosci Lett* (2004) 5;366(1):86-91
- [Antal *et al.* 1996] Antal M, Petkó M, Polgár E, Heizmann CW, Storm-Mathisen J **Direct evidence of an extensive GABAergic innervation of the spinal dorsal horn by fibres descending from the rostral ventromedial medulla** *Neuroscience* (1996) 73(2):509-18
- [Arvidsson *et al.* 1995] Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S, Lee JH, Nakano AH, Dado RJ, Loh HH, Law PY, Wessendorf MW, Elde R **Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord** *J Neurosci* (1995) 15(5 Pt 1):3328-41
- [Aschner *et al.* 2002] Aschner M, Sonnewald U, Tan KH **Astrocyte modulation of neurotoxic injury** *Brain Pathol* (2002) 12(4):475-81
- [Baba *et al.* 1998] Baba H, Kohno T, Okamoto M, Goldstein PA, Shimoji K, Yoshimura M **Muscarinic facilitation of GABA release in substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn** *J Physiol* (1998) 1;508 (Pt 1):83-93
- [Baba *et al.* 1999] Baba H, Doubell TP, Woolf CJ **Peripheral inflammation facilitates Abeta fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord** *J Neurosci* (1999) 15;19(2):859-67
- [Barber *et al.* 1984] Barber RP, Phelps PE, Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM, Vaughn JE **The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study** *J Comp Neurol* (1984) 1;229(3):329-46
- [Basbaum & Jessel 2000] Basbaum AI, Jessel TM **The perception of pain** In: Kandel E, Schwartz J, Jessell TM, eds. *Principles of Neural Science, 4th ed.* NYC, New York, USA McGraw-Hill Medical books (2000) p.472-503

- [Basbaum *et al.* 2009] Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D **Cellular and molecular mechanisms of pain** *Cell* (2009) 16;139(2):267-84 *Review*
- [Beggs & Salter 2007] Beggs S, Salter MW **Stereological and somatotopic analysis of the spinal microglial response to peripheral nerve injury** *Brain Behav Immun* (2007) 21(5):624-33
- [Beggs *et al.* 2012] Beggs S, Trang T, Salter MW **P2X4R+ microglia drive neuropathic pain** *Nat Neurosci* (2012) 26;15(8):1068-73
- [Behbehani *et al.* 1990] Behbehani MM, Jiang MR, Chandler SD, Ennis M **The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat** *Pain* (1990) 40(2):195-204
- [Behbehani 1982] Behbehani MM **The role of acetylcholine in the function of the nucleus raphe magnus and in the interaction of this nucleus with the periaqueductal gray** *Brain Res* (1982) 9;252(2):299-307
- [Bekhit 2010] Bekhit MH **Opioid-induced hyperalgesia and tolerance** *Am J Ther* (2010) 17(5):498-510
- [Belcher *et al.* 1978] Belcher G, Ryall RW, Schaffner R **The differential effects of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and raphe stimulation on nociceptive and non-nociceptive dorsal horn interneurons in the cat** *Brain Res* (1978) 4;151(2):307-21
- [Bennett *et al.* 1996] Bennett DL, Dmietrieva N, Priestley JV, Clary D, McMahon SB **TrkA, CGRP and IB4 expression in retrogradely labelled cutaneous and visceral primary sensory neurones in the rat** *Neurosci Lett* (1996) 206:33-6
- [Benwell *et al.* 1988] Benwell ME, Balfour DJ, Anderson JM **Evidence that tobacco smoking increases the density of (-)[3H]nicotine binding sites in human brain** *J Neurochem* (1988) 50:1243-7
- [Bernard & Villanueva 2009] Bernard JF, Villanueva L **Architecture fonctionnelle des systèmes nociceptifs** In: Bouhassira D, Calvino B, eds. *Douleur : physiologie, physiopathologie et pharmacologie* Rueil-Malmaison, France, Arnette, Wolters Kluwer France (2009) Chapitre I
- [Bernard *et al.* 1990] Bernard JF, Villanueva L, Carroué J, Le Bars D **Efferent projections from the subnucleus reticularis dorsalis (SRD): a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat** *Neurosci Lett* (1990) 24;116(3):257-62
- [Bernard *et al.* 2001] Bernard F, Bossu JL, Gaillard S **Identification of living oligodendrocyte developmental stages by fractal analysis of cell morphology** *J Neurosci Res* (2001) 65(5):439-45
- [Besong *et al.* 2002] Besong G, Battaglia G, D'Onofrio M, Di Marco R, Ngomba RT, Storto M, Castiglione M, Mangano K, Busceti CL, Nicoletti FR, Bacon K, Tusche M, Valenti O, Conn PJ, Bruno V, Nicoletti F **Activation of group III metabotropic glutamate receptors inhibits the production of RANTES in glial cell cultures** *J Neurosci* (2002) 1;22(13):5403-11
- [Besse *et al.* 1990] Besse D, Lombard MC, Zajac JM, Roques BP, Besson JM **Pre- and postsynaptic distribution of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord** *Brain Res* (1990) 25;521(1-2):15-22
- [Besson *et al.* 2007] Besson M, Granon S, Mameli-Engvall M, Cloëz-Tayarani I, Maubourguet N, Cormier A, Cazala P, David V, Changeux JP, Faure P **Long-term effects of chronic nicotine exposure on brain nicotinic receptors** *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) 8;104(19):8155-60
- [Bester *et al.* 2001] Bester H, De Felipe C, Hunt SP **The NK1 receptor is essential for the full expression of noxious inhibitory controls in the mouse** *J Neurosci* (2001) 1;21(3):1039-46
- [Bleazard & Morris 1993] Bleazard L, Morris R **The effects of cholinergic agonists and antagonists on C-fibre evoked responses in the substantia gelatinosa of neonatal rat spinal cord slices** *Br J Pharmacol* (1993) 110(3):1061-6
- [Blusztajn 1983] Blusztajn JK, Wurtman RJ **Choline and cholinergic neurons** *Science* (1983) 221 (4611) 614-20
- [Bodnar 2011] Bodnar RJ **Endogenous opiates and behavior: 2011** *Peptides* (2011) 38: 463-522
- [Bolte & Cordelières 2006] Bolte S, Cordelières FP **A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy** *J Microsc* (2006) 224(Pt 3):213-32
- [Bouaziz *et al.* 1996] Bouaziz H, Tong C, Yoon Y, Hood DD, Eisenach JC **Intravenous opioids stimulate norepinephrine and acetylcholine release in spinal cord dorsal horn. Systematic studies in sheep and an observation in a human** *Anesthesiology* (1996) 84(1):143-54

- [Bouhassira *et al.* 1988] Bouhassira D, Villanueva L, Le Bars D **Intracerebroventricular morphine decreases descending inhibitions acting on lumbar dorsal horn neuronal activities related to pain in the rat** *J Pharmacol Exp Ther* (1988) 247(1):332-42
- [Bouhassira *et al.* 1990] Bouhassira D, Bing Z, Le Bars D **Studies of the brain structures involved in diffuse noxious inhibitory controls: the mesencephalon** *J Neurophysiol* (1990) 64(6):1712-23
- [Bouhassira *et al.* 1992] Bouhassira D, Villanueva L, Bing Z, le Bars D **Involvement of the subnucleus reticularis dorsalis in diffuse noxious inhibitory controls in the rat** *Brain Res* (1992) 13;595(2):353-7
- [Bouhassira *et al.* 1993] Bouhassira D, Chitour D, Villanueva L, Le Bars D **Morphine and diffuse noxious inhibitory controls in the rat: effects of lesions of the rostral ventromedial medulla** *Eur J Pharmacol* (1993) 2;232(2-3):207-15
- [Bráz *et al.* 2005] Bráz JM, Nassar MA, Wood JN, Basbaum AI **Parallel “pain” pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor** *Neuron* (2005) 15;47(6):787-93
- [Brett *et al.* 2007] Brett K, Parker R, Wittenauer S, Hayashida K, Young T, Vincler M **Impact of chronic nicotine on sciatic nerve injury in the rat** *J Neuroimmunol* (2007) 186(1-2):37-44
- [Brown *et al.* 1995] Brown JL, Liu H, Maggio JE, Vigna SR, Mantyh PW, Basbaum AI **Morphological characterization of substance P receptor-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and trigeminal nucleus caudalis** *J Comp Neurol* (1995) Jun 5;356(3):327-44
- [Brown 1982] Brown AG **The dorsal horn of the spinal cord** *J Exp Physiol* (1982) 67(2):193-212
- [Buerkle *et al.* 1996] Buerkle H, Boschin M, Marcus MA, Brodner G, Wüsten R, Van Aken H **Central and peripheral analgesia mediated by the acetylcholinesterase-inhibitor neostigmine in the rat inflamed knee joint model** *Anesth Analg* (1998) 86(5):1027-32
- [Buisson & Bertrand 2001] Buisson B, Bertrand D **Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4((beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function** *J Neurosci* (2001) 15;21(6):1819-29
- [Cai *et al.* 2009] Cai YQ, Chen SR, Han HD, Sood AK, Lopez-Berestein G, Pan HL **Role of M2, M3, and M4 muscarinic receptor subtypes in the spinal cholinergic control of nociception revealed using siRNA in rats** *J Neurochem* (2009) 111(4):1000-10
- [Calvo *et al.* 2000] Calvo CF, Cesselin F, Gelman M, Glowinski J **Identification of an opioid peptide secreted by rat embryonic mixed brain cells as a promoter of macrophage migration** *Eur J Neurosci* (2000) 12(8):2676-84
- [Carlson *et al.* 1995] Carlson JD, Selden NR, Heinricher MM **Nocifensive reflex-related on- and off-cells in the pedunclopontine tegmental nucleus, cuneiform nucleus, and lateral dorsal tegmental nucleus** *Brain Res* (2005) 30;1063(2):187-94
- [Carstens *et al.* 2001] Carstens E, Anderson KA, Simons CT, Carstens MI, Jinks SL **Analgesia induced by chronic nicotine infusion in rats: differences by gender and pain test** *Psychopharmacology (Berl)* (2001) 157(1):40-5
- [Caterina *et al.* 2000] Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D **Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor** *Science* (2000) 14;288(5464):306-13
- [Chen & Pan 2001] Chen SR, Pan HL **Spinal endogenous acetylcholine contributes to the analgesic effect of systemic morphine in rats** *Anesthesiology* (2001) 95(2):525-30
- [Chen & Pan 2003] Chen SR, Pan HL **Spinal GABA_B receptors mediate antinociceptive actions of cholinergic agents in normal and diabetic rats** *Brain Res* (2003) 7;965(1-2):67-74
- [Chen & Pan 2004] Chen SR, Pan HL **Activation of muscarinic receptors inhibits spinal dorsal horn projection neurons: role of GABAB receptors** *Neuroscience* (2004) 125(1):141-8
- [Chen *et al.* 1995] Chen JL, Wei L, Bereczki D, Hans FJ, Otsuka T, Acuff V, Ghersi-Egea JF, Patlak C, Fenstermacher JD **Nicotine raises the influx of permeable solutes across the rat blood-brain barrier with little or no capillary recruitment** *J Cereb Blood Flow Metab* (1995) 15(4):687-98
- [Chen *et al.* 2005] Chen YP, Chen SR, Pan HL **Systemic morphine inhibits dorsal horn projection neurons through spinal cholinergic system independent of descending pathways** *J Pharmacol Exp Ther* (2005) 314(2):611-7

- [Chen *et al.* 2010] Chen SR, Chen H, Yuan WX, Wess J, Pan HL **Dynamic control of glutamatergic synaptic input in the spinal cord by muscarinic receptor subtypes defined using knockout mice** *J Biol Chem* (2010) 285(52):40427-37
- [Cheng *et al.* 2011] Cheng LZ, Han L, Fan J, Huang LT, Peng LC, Wang Y **Enhanced inhibitory synaptic transmission in the spinal dorsal horn mediates antinociceptive effects of TC-2559** *Mol Pain* (2011) 4;7:56
- [Chiang *et al.* 2012] Chiang CY, Sessle BJ, Dostrovsky JO **Role of astrocytes in pain** *Neurochem Res* (2012) 37(11):2419-31 *Review*
- [Chiari *et al.* 1999] Chiari A, Tobin JR, Pan HL, Hood DD, Eisenach JC **Sex differences in cholinergic analgesia I: a supplemental nicotinic mechanism in normal females** *Anesthesiology* (1999) 91(5):1447-54
- [Chitour *et al.* 1982] Chitour D, Dickenson AH, Le Bars D **Pharmacological evidence for the involvement of serotonergic mechanisms in diffuse noxious inhibitory controls (DNIC)** *Brain Res* (1982) 25;236(2):329-37
- [Christensen & Smith 1990] Christensen MK, Smith DF **Antinociceptive effects of the stereoisomers of nicotine given intrathecally in spinal rats** *J Neural Transm Gen Sect* (1990) 80(3):189-94
- [Clayton *et al.* 2007] Clayton BA, Hayashida K, Childers SR, Xiao R, Eisenach JC **Oral donepezil reduces hypersensitivity after nerve injury by a spinal muscarinic receptor mechanism** *Anesthesiology* (2007) 106(5):1019-25
- [Cordero-Erausquin & Changeux 2001] Cordero-Erausquin M, Changeux JP **Tonic nicotinic modulation of serotonergic transmission in the spinal cord** *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 27;98(5):2803-7
- [Cordero-Erausquin *et al.* 2004] Cordero-Erausquin M, Pons S, Faure P, Changeux JP **Nicotine differentially activates inhibitory and excitatory neurons in the dorsal spinal cord** *Pain* (2004) 109(3):308-18
- [Cordero-Erausquin *et al.* 2009] Cordero-Erausquin M, Allard S, Dolique T, Bachand K, Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y **Dorsal horn neurons presynaptic to lamina I spino-parabrachial neurons revealed by transynaptic labelling** *J Comp Neurol* (2009) 517(5):601-15
- [Costes *et al.* 2004] Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S **Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells** *Biophys J* (2004) 86(6):3993-4003
- [Coull *et al.* 2005] Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y **BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain** *Nature* (2005) 15;438(7070):1017-21
- [Craig *et al.* 2003] Craig AD **Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing** *Annu Rev Neurosci* (2003);26:1-30 *Review*
- [Cronin *et al.* 2004] Cronin JN, Bradbury EJ, Lidieth M **Laminar distribution of GABAA- and glycine-receptor mediated tonic inhibition in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord: effects of picrotoxin and strychnine on expression of Fos-like immunoreactivity** *Pain* (2004) 112(1-2):156-63
- [Cucchiario *et al.* 2005] Cucchiario G, Chaijale N, Commons KG **The dorsal raphe nucleus as a site of action of the antinociceptive and behavioral effects of the alpha4 nicotinic receptor agonist epibatidine** *J Pharmacol Exp Ther* (2005) 313(1):389-94
- [da Silva & Menescal-de-Oliveira 2006] da Silva LF, Menescal-de-Oliveira L **Cholinergic modulation of tonic immobility and nociception in the NRM of guinea pig** *Physiol Behav* (2006) 15;87(4):821-7
- [Damaj *et al.* 1994] Damaj MI, Glennon RA, Martin BR **Involvement of the serotonergic system in the hypoactive and antinociceptive effects of nicotine in mice** *Brain Res Bull* (1994) 33(2):199-203
- [Damaj *et al.* 1998] Damaj MI, Fei-Yin M, Dukat M, Glassco W, Glennon RA, Martin BR **Antinociceptive responses to nicotinic acetylcholine receptor ligands after systemic and intrathecal administration in mice** *J Pharmacol Exp Ther* (1998) 284(3):1058-65
- [Danilov *et al.* 2006] Danilov AI, Covacu R, Moe MC, Langmoen IA, Johansson CB, Olsson T, Brundin L **Neurogenesis in the adult spinal cord in an experimental model of multiple sclerosis** *Eur J Neurosci* (2006) 23(2):394-400

-
- [Davalos *et al.* 2005] Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB **ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*** *Nat Neurosci* (2005) 8(6):752-8
- [De Kock & Meert 1997] De Kock M, Meert TF **Alpha 2-adrenoceptor agonists and stress-induced analgesia in rats: influence of stressors and methods of analysis** *Pharmacol Biochem Behav* (1997) 58(1):109-17
- [De Kock *et al.* 1997] De Kock M, Eisenach J, Tong C, Schmitz AL, Scholtes JL **Analgesic doses of intrathecal but not intravenous clonidine increase acetylcholine in cerebrospinal fluid in humans** *Anesth Analg* (1997) 84(4):800-3
- [De Koninck *et al.* 1992] De Koninck Y, Ribeiro-da-Silva A, Henry JL, Cuello AC **Spinal neurons exhibiting a specific nociceptive response receive abundant substance P-containing synaptic contacts** *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89(11): 5073-77
- [Decker & Meyer 1999] Decker MW, Meyer MD **Therapeutic potential of neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists as novel analgesics** *Biochem Pharmacol* (1999) 58(6):917-23
- [Defrin *et al.* 2005] Defrin R, Ariel E, Peretz C **Segmental noxious versus innocuous electrical stimulation for chronic pain relief and the effect of fading sensation during treatment** *Pain* (2005) 115(1-2):152-60
- [Dehkordi *et al.* 2007] Dehkordi O, Millis RM, Dennis GC, Jazini E, Williams C, Hussain D, Jayam-Trouth A **Expression of alpha-7 and alpha-4 nicotinic acetylcholine receptors by GABAergic neurons of rostral ventral medulla and caudal pons** *Brain Res* (2007) 1141:95-102
- [Detweiler *et al.* 1993] Detweiler DJ, Eisenach JC, Tong C, Jackson C **A cholinergic interaction in alpha 2 adrenoceptor-mediated antinociception in sheep** *J Pharmacol Exp Ther* (1993) 265(2):536-42
- [Deval *et al.* 2010] Deval E, Gasull X, Noël J, Salinas M, Baron A, Diochot S, Lingueglia E **Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain** *Pharmacol Ther* (2010) 128(3):549-58 *Review*
- [Di Virgilio 2006] Di Virgilio F **Purinergic signalling between axons and microglia** *Novartis Found Symp* (2006) 276:253-8; discussion 259-62, 275-81
- [Dickenson & Le Bars 1983] Dickenson AH, Le Bars D **Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) involve trigeminothalamic and spinothalamic neurones in the rat** *Exp Brain Res* (1983) 96(2):174-80
- [Dickenson *et al.* 1980] Dickenson AH, Le Bars D, Besson JM **Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). Effects on trigeminal nucleus caudalis neurones in the rat** *Brain Res* (1980) 200(2):293-305
- [Dineley-Miller & Patrick 1992] Dineley-Miller K, Patrick J **Gene transcripts for the nicotinic acetylcholine receptor subunit, beta4, are distributed in multiple areas of the rat central nervous system** *Brain Res Mol Brain Res* (1992) 16(3-4):339-44
- [Ding *et al.* 1996] Ding YQ, Kaneko T, Nomura S, Mizuno N **Immunohistochemical localization of mu-opioid receptors in the central nervous system of the rat** *J Comp Neurol* (1996) 367(3):375-402
- [Djoughri & Lawson 2004] Djoughri L, Lawson SN **A beta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals** *Brain Res Brain Res Rev* (2004) 46(2):131-45 *Review*
- [Dooley & Houghten 2000] Dooley CT, Houghten RA **Orphanin FQ/nociceptin receptor binding studies** *Peptides* (2000) 21(7):949-60 *Review*
- [Drago *et al.* 2003] Drago J, McColl CD, Horne MK, Finkelstein DI, Ross SA **Neuronal nicotinic receptors: insights gained from gene knockout and knockin mutant mice** *Cell Mol Life Sci* (2003) 253(1):1267-80
- [Dubin & Patapoutian 2010] Dubin AE, Patapoutian A **Nociceptors: the sensors of the pain pathway** *J Clin Invest* (2010) 120(11):3760-72 *Review*
- [Dubner *et al.* 1989] Dubner R, Kenshalo DR Jr, Maixner W, Bushnell MC, Oliveras JL **The correlation of monkey medullary dorsal horn neuronal activity and the perceived intensity of noxious heat stimuli** *J Neurophysiol* (1989) 62(2):450-7

- [Dumont *et al.* 2001] Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert RJ, Boulos PT, Ellegala DB, Dumont AS **Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms** *Clin Neuropharmacol* (2001) 24(5):254-64
- [Duttaroy *et al.* 2002] Duttaroy A, Gomeza J, Gan JW, Siddiqui N, Basile AS, Harman WD, Smith PL, Felder CC, Levey AI, Wess J **Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice** *Mol Pharmacol* (2002) 62(5):1084-93
- [Eisenach *et al.* 1996] Eisenach JC, Detweiler DJ, Tong C, D'Angelo R, Hood DD **Cerebrospinal fluid norepinephrine and acetylcholine concentrations during acute pain** *Anesth Analg* (1996) 82(3):621-6
- [Eisenach 2009] Eisenach JC **Epidural neostigmine: will it replace lipid soluble opioids for postoperative and labor analgesia?** *Anesth Analg* (2009) 109(2):293-5
- [Ellrich *et al.* 1998] Ellrich J, Treede RD **Characterization of blink reflex interneurons by activation of diffuse noxious inhibitory controls in man** *Brain Res* (1998) 24;803(1-2):161-8
- [Fang & Proudfit 1998] Fang F, Proudfit HK **Antinociception produced by microinjection of morphine in the rat periaqueductal gray is enhanced in the foot, but not the tail, by intrathecal injection of alpha1-adrenoceptor antagonists** *Brain Res* (1998) 20;790(1-2):14-24
- [Fang *et al.* 1996] Fang F, Proudfit HK **Spinal cholinergic and monoamine receptors mediate the antinociceptive effect of morphine microinjected in the periaqueductal gray on the rat tail, but not the feet** *Brain Res* (1996) 25;722(1-2):95-108
- [Ferrini *et al.* 2013] Ferrini F, Trang T, Mattioli TA, Laffray S, Del'Guidice T, Lorenzo LE, Castonguay A, Doyon N, Zhang W, Godin AG, Mohr D, Beggs S, Vandal K, Beaulieu JM, Cahill CM, Salter MW, De Koninck Y **Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl(-) homeostasis** *Nat Neurosci* (2013) ;16(2):183-92
- [Fields *et al.* 1991] Fields HL, Heinricher MM, Mason P **Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits** *Annu Rev Neurosci* (1991) 14:219-45 *Review*
- [Fields *et al.* 1992] Fields HL **Is there a facilitating component to central pain modulation?** *APS Journal* (1992) 1(2): 139-41
- [Fields 2004] Fields H **State-dependent opioid control of pain** *Nat Rev Neurosci* (2004) 5(7):565-75
- [Fiorino & Garcia-Guzman 2012] Fiorino DF, Garcia-Guzman M **Muscarinic pain pharmacology: realizing the promise of novel analgesics by overcoming old challenges** *Handb Exp Pharmacol* (2012) (208):191-221
- [Fishman & Mattu 1993] Fishman PS, Mattu A **Fate of severed cortical projection axons** *J Neurotrauma* (1993) 10(4):457-70
- [Fleckenstein 2013] Fleckenstein J **Acupuncture in the context of diffuse noxious inhibitory control** *Eur J Pain* (2013) Feb;17(2):141-2
- [Flores *et al.* 1997] Flores CM, Dávila-García MI, Ulrich YM, Kellar KJ **Differential regulation of neuronal nicotinic receptor binding sites following chronic nicotine administration** *J Neurochem* (1997) 69(5):2216-9
- [Gage *et al.* 2001] Gage HD, Gage JC, Tobin JR, Chiari A, Tong C, Xu Z, Mach RH, Efanage SM, Ehrenkauf RL, Eisenach JC **Morphine-induced spinal cholinergic activation: in vivo imaging with positron emission tomography** *Pain* (2001) 91(1-2):139-45
- [Gao *et al.* 2010] Gao YJ, Ji RR **Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain** *Pharmacol Ther* (2010) 126(1):56-68 *Review*
- [Genzen & McGehee 2003] Genzen JR, McGehee DS **Short- and long-term enhancement of excitatory transmission in the spinal cord dorsal horn by nicotinic acetylcholine receptors** *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 27;100(11):6807-12
- [Genzen & McGehee 2005] Genzen JR, McGehee DS **Nicotinic modulation of GABAergic synaptic transmission in the spinal cord dorsal horn** *Brain Res* (2005) 21;1031(2):229-37
- [Genzen *et al.* 2001] Genzen JR, Van Cleve W, McGehee DS **Dorsal root ganglion neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes** *J Neurophysiol* (2001) 86:1773-82
- [Gilbert & Franklin 2001] Gilbert A-K, Franklin KBJ **GABAergic modulation of descending inhibitory systems from the rostral ventromedial medulla (RVM). Dose-response analysis of nociception and neurological deficits** *Pain* (2001) 90 25-36

- [Gillberg *et al.* 1989] Gillberg PG, Gordh T Jr, Hartvig P, Jansson I, Pettersson J, Post C **Characterization of the antinociception induced by intrathecally administered carbachol** *Pharmacol Toxicol* (1989) 64(4):340-3
- [Gillberg *et al.* 1990] Gillberg PG, Hartvig P, Gordh T, Sottile A, Jansson I, Archer T, Post C **Behavioral effects after intrathecal administration of cholinergic receptor agonists in the rat** *Psychopharmacology (Berl)* (1990) 100(4):464-9
- [Goffaux *et al.* 2007] Goffaux P, Redmond WJ, Rainville P, Marchand S **Descending analgesia: when the spine echoes what the brain expects** *Pain* (2007) 130(1-2):137-43
- [Graven *et al.* 1998] Graven-Nielsen T, Babenko V, Svensson P, Arendt-Nielsen L **Experimentally induced muscle pain induces hypoalgesia in heterotopic deep tissues, but not in homotopic deep tissues** *Brain Res* (1998) 23;787(2):203-10
- [Grudt & Perl 2002] Grudt TJ, Perl ER **Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn** *J Physiol* (2002) 1;540(Pt 1):189-207
- [Grudt *et al.* 1998] Grudt TJ, Henderson G **Glycine and GABAA receptor-mediated synaptic transmission in rat substantia gelatinosa: inhibition by mu-opioid and GABAB agonists** *J Physiol* (1998) 1;507 (Pt 2):473-83
- [Guimarães *et al.* 1999] Guimarães AP, Prado WA **Pharmacological evidence for a periaqueductal gray-nucleus raphe magnus connection mediating the antinociception induced by microinjecting carbachol into the dorsal periaqueductal gray of rats** *Brain Res* (1999) 8;827(1-2):152-9
- [Gutstein *et al.* 1998] Gutstein HB, Mansour A, Watson SJ, Akil H, Fields HL **Mu and kappa opioid receptors in periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla** *Neuroreport* (1998) 9(8):1777-81
- [Guyton & Hall 2006] Guyton AC, Hall JE **Motor Functions of the Spinal Cord; the Cord Reflexes** In: Guyton AC, Hall JE eds. *Textbook of Medical Physiology, 11th ed.* Philadelphia, Pennsylvania, USA Elsevier Inc. (2006) p.673-84
- [Höglund & Baghdoyan 1997] Höglund AU, Baghdoyan HA **M2, M3 and M4, but not M1, muscarinic receptor subtypes are present in rat spinal cord** *J Pharmacol Exp Ther* (1997) 281(1):470-7
- [Höglund *et al.* 2000] Höglund AU, Hamilton C, Lindblom L **Effects of microdialyzed oxotremorine, carbachol, epibatidine, and scopolamine on intraspinal release of acetylcholine in the rat** *J Pharmacol Exp Ther* (2000) 295(1):100-4
- [Hösli *et al.* 1988] Hösli L, Hösli E, Della Briotta G, Quadri L, Heuss L **Action of acetylcholine, muscarine, nicotine and antagonists on the membrane potential of astrocytes in cultured rat brainstem and spinal cord** *Neurosci Lett* (1988) 5;92(2):165-70
- [Habib & Gan 2006] Habib AS, Gan TJ **Use of neostigmine in the management of acute postoperative pain and labour pain: a review** *CNS Drugs* (2006) 20(10):821-39 *Review*
- [Halladay & Blair 2012] Halladay LR, Blair HT **The role of mu-opioid receptor signaling in the dorsolateral periaqueductal gray on conditional and unconditional responding to threatening and aversive stimuli** *Neuroscience* (2012) 2;216:82-93
- [Hama & Menzaghi 2012] Hama A, Menzaghi F **Antagonist of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) enhances formalin-induced nociception in rats: tonic role of nAChRs in the control of pain following injury** *Brain Res* (2001) 5;888(1):102-6
- [Hamann & Martin 1992] Hamann SR, Martin WR **Opioid and nicotinic analgesic and hyperalgesic loci in the rat brain stem** *J Pharmacol Exp Ther* (1992) 261(2):707-15
- [Han *et al.* 1998] Han ZS, Zhang ET, Craig AD **Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct** *Nat Neurosci* (1998) 1(3):218-25
- [Hansson *et al.* 1998] Hansson E, Westerlund A, Björklund U, Olsson T **mu-Opioid agonists inhibit the enhanced intracellular Ca(2+) responses in inflammatory activated astrocytes cocultured with brain endothelial cells** *Neuroscience* (2008) 9;155(4):1237-49
- [Harrison *et al.* 2013] Harrison M, O'Brien A, Adams L, Cowin G, Ruitenber MJ, Sengul G, Watson C **Vertebral landmarks for the identification of spinal cord segments in the mouse** *Neuroimage* (2013) 68:22-9
- [Hartvig *et al.* 1989] Hartvig P, Gillberg PG, Gordh T Jr, Post C **Cholinergic mechanisms in pain and analgesia** *Trends Pharmacol Sci* (1989) Suppl:75-9

- [Hawkins *et al.* 2004] Hawkins BT, Abbruscato TJ, Egleton RD, Brown RC, Huber JD, Campos CR, Davis TP **Nicotine increases in vivo blood-brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution** *Brain Res* (2004) 19;1027(1-2):48-58
- [Holden & Naleway 2001] Holden JE, Naleway E **Microinjection of carbachol in the lateral hypothalamus produces opposing actions on nociception mediated by alpha(1)- and alpha(2)-adrenoceptors** *Brain Res* (2001) 17;911(1):27-36
- [Holden *et al.* 2005] Holden JE, Farah EN, Jeong Y **Stimulation of the lateral hypothalamus produces antinociception mediated by 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT3 receptors in the rat spinal cord dorsal horn** *Neuroscience* (2005) 135(4):1255-68
- [Honda *et al.* 2000] Honda K, Harada A, Takano Y, Kamiya H **Involvement of M3 muscarinic receptors of the spinal cord in formalin-induced nociception in mice** *Brain Res* (2000) 17;859(1):38-44
- [Honda *et al.* 2002] Honda K, Koga K, Moriyama T, Koguchi M, Takano Y, Kamiya HO **Intrathecal alpha2 adrenoceptor agonist clonidine inhibits mechanical transmission in mouse spinal cord via activation of muscarinic M1 receptors** *Neurosci Lett* (2002) 12;322(3):161-4
- [Honda *et al.* 2003] Honda K, Murao N, Ibuki T, Kamiya H, Takano Y **The Role of Spinal Muscarinic Acetylcholine Receptors in Clonidine-Induced Anti-nociceptive Effects in Rats** *Biol Pharm Bull* (2003) 26(8) 1178-80
- [Honda 1985] Honda CN **Visceral and somatic afferent convergence onto neurons near the central canal in the sacral spinal cord of the cat** *J Neurophysiol* (1985) 53; 1059-1078
- [Hori *et al.* 1992] Hori Y, Endo K, Takahashi T **Presynaptic inhibitory action of enkephalin on excitatory transmission in superficial dorsal horn of rat spinal cord** *J Physiol* (1992) 450:673-85
- [Horvath & DeLeo 2009] Horvath RJ, DeLeo JA **Morphine enhances microglial migration through modulation of P2X4 receptor signaling** *J Neurosci* (2009) 28;29(4):998-1005
- [Horvath *et al.* 2009] Horvath RJ, Romero-Sandoval EA, DeLeo JA **Inhibition of microglial P2X4 receptors attenuates morphine tolerance, Iba1, GFAP and mu opioid receptor protein expression while enhancing perivascular microglial ED2** *Pain* (2010) 150(3):401-13
- [Huang *et al.* 2000] Huang A, Noga BR, Carr PA, Fedirchuk B, Jordan LM **Spinal cholinergic neurons activated during locomotion: localization and electrophysiological characterization** *J Neurophysiol* (2000) 83(6):3537-47
- [Hugel & Schlichter 2000] Hugel S, Schlichter R **Presynaptic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic transmission between cultured rat spinal cord dorsal horn neurons** *J Neurosci* (2000) 15;20(6):2121-30
- [Hurst *et al.* 2013] Hurst R, Rollema H, Bertrand D **Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics** *Pharmacol Ther* (2013) 137(1):22-54
- [Hwang *et al.* 1999] Hwang JH, Hwang KS, Leem JK, Park PH, Han SM, Lee DM **The antiallodynic effects of intrathecal cholinesterase inhibitors in a rat model of neuropathic pain** *Anesthesiology* (1999) 90(2):492-9
- [Hwang *et al.* 2000] Hwang JH, Hwang KS, Choi Y, Park PH, Han SM, Lee DM **An analysis of drug interaction between morphine and neostigmine in rats with nerve-ligation injury** *Anesth Analg* (2000) 90(2):421-6
- [Iwamoto & Marion 1993a] Iwamoto ET, Marion L **Adrenergic, serotonergic and cholinergic components of nicotinic antinociception in rats** *J Pharmacol Exp Ther* (1993) 265(2):777-89
- [Iwamoto & Marion 1993b] Iwamoto ET, Marion L **Characterization of the antinociception produced by intrathecally administered muscarinic agonists in rats** *J Pharmacol Exp Ther* (1993) 266(1):329-38
- [Iwamoto 1991] Iwamoto ET **Characterization of the antinociception induced by nicotine in the pedunculopontine tegmental nucleus and the nucleus raphe magnus** *J Pharmacol Exp Ther* (1991) 257(1):120-33
- [Jarvis 2010] Jarvis MF **The neural-glia purinergic receptor ensemble in chronic pain states** *Trends Neurosci* (2010) 33(1):48-57
- [Jeong *et al.* 2013] Jeong SG, Choi IS, Cho JH, Jang IS **Cholinergic modulation of primary afferent glutamatergic transmission in rat medullary dorsal horn neurons** *Neuropharmacology pii: S0028-3908(13)00347-X*

-
- [Jo *et al.* 1998] Jo YH, Stoeckel ME, Schlichter R **Electrophysiological properties of cultured neonatal rat dorsal horn neurons containing GABA and met-enkephalin-like immunoreactivity** *J Neurophysiol* (1998) 79(3):1583-6
- [Johnson *et al.* 1991] Johnson MI, Ashton CH, Thompson JW **An in-depth study of long-term users of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). Implications for clinical use of TENS** *Pain* (1991) 44(3):221-9
- [Josiah & Vincler 2006] Josiah DT, Vincler MA **Impact of chronic nicotine on the development and maintenance of neuropathic hypersensitivity in the rat** *Psychopharmacology (Berl)* (2006) 188(2):152-61
- [Julius & Basbaum 2001] Julius D, Basbaum AI **Molecular mechanisms of nociception** *Nature* (2001) 413(6852):203-10 *Review*
- [Katayama *et al.* 1984] Katayama Y, Watkins LR, Becker DP, Hayes RL **Non-opiate analgesia induced by carbachol microinjection into the pontine parabrachial region of the cat** *Brain Res* (1984) 296(2):263-83
- [Kato *et al.* 2006] Kato G, Yasaka T, Katafuchi T, Furue H, Mizuno M, Iwamoto Y, Yoshimura M **Direct GABAergic and glycinergic inhibition of the substantia gelatinosa from the rostral ventromedial medulla revealed by *in vivo* patch-clamp analysis in rats** *J Neurosci* (2006) 26(6):1787-94
- [Ke *et al.* 2013] Ke MT, Fujimoto S, Imai T **SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction** *Nat Neurosci* (2013) 16(8):1154-61
- [Keller *et al.* 2007] Keller AF, Beggs S, Salter MW, De Koninck Y **Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain** *Mol Pain* (2007) 27;3:27
- [Kemp *et al.* 1996] Kemp T, Spike RC, Watt C, Todd AJ **The mu-opioid receptor (MOR1) is mainly restricted to neurons that do not contain GABA or glycine in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord** *Neuroscience* (1996) 75(4):1231-8
- [Khan *et al.* 1996] Khan IM, Marsala M, Printz MP, Taylor P, Yaksh TL **Intrathecal nicotinic agonist-elicited release of excitatory amino acids as measured by *in vivo* spinal microdialysis in rats** *J Pharmacol Exp Ther* (1996) 278(1):97-106
- [Khan *et al.* 1998] Khan IM, Buerkle H, Taylor P, Yaksh TL **Nociceptive and antinociceptive responses to intrathecally administered nicotinic agonists** *Neuropharmacology* (1998) 37(12):1515-25
- [Khan *et al.* 2003] Khan I, Osaka H, Stanislaus S, Calvo RM, Deerinck T, Yaksh TL, Taylor P **Nicotinic acetylcholine receptor distribution in relation to spinal neurotransmission pathways** *J Comp Neurol* (2003) 467(1):44-59
- [Khan *et al.* 2004] Khan IM, Wennerholm M, Singletary E, Polston K, Zhang L, Deerinck T, Yaksh TL, Taylor P **Ablation of primary afferent terminals reduces nicotinic receptor expression and the nociceptive responses to nicotinic agonists in the spinal cord** *J Neurocytol* (2004) 33(5):543-56
- [Kieffer & Evans 2009b] Kieffer BL, Evans CJ **Opioid receptors: from binding sites to visible molecules *in vivo*** *Neuropharmacology* (2009) 56 Suppl 1:205-12
- [Kieffer 2009a] Kieffer BL **Opioid Peptides and Receptors** *Encyclopedia of Neuroscience* (2009) 235-40 Academic Press (Available @ Science Direct)
- [Kimura *et al.* 2012] Kimura M, Saito S, Obata H **Dexmedetomidine decreases hyperalgesia in neuropathic pain by increasing acetylcholine in the spinal cord** *Neurosci Lett* (2012) 529(1):70-4
- [Kimura *et al.* 2013] Kimura M, Hayashida K, Eisenach JC, Saito S, Obata H **Relief of hypersensitivity after nerve injury from systemic donepezil involves spinal cholinergic and γ -aminobutyric acid mechanisms** *Anesthesiology* (2013) 118(1):173-80
- [King *et al.* 2009] King CD, Wong F, Currie T, Mauderli AP, Fillingim RB, Riley JL 3rd **Deficiency in endogenous modulation of prolonged heat pain in patients with Irritable Bowel Syndrome and Temporomandibular Disorder** *Pain* (2009) 143(3):172-8
- [Kiyosawa *et al.* 2001] Kiyosawa A, Katsurabayashi S, Akaike N, Pang ZP, Akaike N **Nicotine facilitates glycine release in the rat spinal dorsal horn** *J Physiol* (2001) 536(Pt 1):101-10
- [Kline & Wiley 2008] Kline RH 4th, Wiley RG **Spinal mu-opioid receptor-expressing dorsal horn neurons: role in nociception and morphine antinociception** *J Neurosci* (2008) 28(4):904-13

- [Kolin & Wiseman 2007] Kolin DL, Wiseman PW **Advances in image correlation spectroscopy: measuring number densities, aggregation states, and dynamics of fluorescently labeled macromolecules in cells** *Cell Biochem Biophys* (2007) 49(3):141-64
- [Kommalage & Höglund 2005a] Kommalage M, Höglund AU **Involvement of spinal GABA receptors in the regulation of intraspinal acetylcholine release** *Eur J Pharmacol* (2005) 21;525(1-3):69-73
- [Kommalage & Höglund 2005b] Kommalage M, Höglund AU **Involvement of spinal serotonin receptors in the regulation of intraspinal acetylcholine release** *Eur J Pharmacol* (2005) 21;509(2-3):127-34
- [Kunz *et al.* 2006] Kunz M, Scholl KE, Schu U, Lautenbacher S **GABAergic modulation of diffuse noxious inhibitory controls (DNIC): a test by use of lorazepam** *Exp Brain Res* (2006) 175(2):363-71
- [Lachmanovich *et al.* 2003] Lachmanovich E, Shvartsman DE, Malka Y, Botvin C, Henis YI, Weiss AM **Co-localization analysis of complex formation among membrane proteins by computerized fluorescence microscopy: application to immunofluorescence co-patching studies** *J Microsc* (2003) 212(Pt 2):122-31
- [Laing *et al.* 1994] Laing I, Todd AJ, Heizmann CW, Schmidt HH **Subpopulations of GABAergic neurons in laminae I-III of rat spinal dorsal horn defined by coexistence with classical transmitters, peptides, nitric oxide synthase or parvalbumin** *Neuroscience* (1994) 61(1):123-32
- [Lang *et al.* 2003] Lang PM, Burgstahler R, Sippel W, Irnich D, Schlotter-Weigel B, Grafe P **Characterization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the membrane of unmyelinated human C-fiber axons by in vitro studies** *J Neurophysiol* (2003) 90:3295-303
- [Lapirot *et al.* 2009] Lapirot O, Chebbi R, Monconduit L, Artola A, Dallel R, Luccarini P **NK1 receptor-expressing spinoparabrachial neurons trigger diffuse noxious inhibitory controls through lateral parabrachial activation in the male rat** *Pain* (2009) Apr;142(3):245-54
- [Lau *et al.* 2008] Lau BK, Vaughan CW **Muscarinic modulation of synaptic transmission via endocannabinoid signalling in the rat midbrain periaqueductal gray** *Mol Pharmacol* (2008) 74(5):1392-8
- [Lavand'homme & Eisenach 1999] Lavand'homme PM, Eisenach JC **Sex differences in cholinergic analgesia II: differing mechanisms in two models of allodynia** *Anesthesiology* (1999) 91(5):1455-61
- [Lavand'homme *et al.* 1998] Lavand'homme P, Pan HL, Eisenach JC **Intrathecal neostigmine, but not sympathectomy, relieves mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain** *Anesthesiology* (1998) 89(2):493-9
- [Lawand *et al.* 1999] Lawand NB, Lu Y, Westlund KN **Nicotinic cholinergic receptors: potential targets for inflammatory pain relief** *Pain* (1999) 80(1-2):291-9
- [Lawson & Waddell 1991] Lawson SN, Waddell PJ **Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons** *J Physiol* (1991) 435:41-63
- [Le Bars *et al.* 1979a] Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM **Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat** *Pain* (1979a) 6(3):283-304
- [Le Bars *et al.* 1979b] Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM **Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications** *Pain* (1979b) 6(3):305-27
- [Le Bars *et al.* 1981a] Le Bars D, Chitour D, Kraus E, Clot AM, Dickenson AH, Besson JM **The effect of systemic morphine upon diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in the rat: evidence for a lifting of certain descending inhibitory controls of dorsal horn convergent neurones** *Brain Res* (1981) 29;215(1-2):257-74
- [Le Bars *et al.* 1981b] Le Bars D, Chitour D, Kraus E, Dickenson AH, Besson JM **Effect of naloxone upon diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in the rat** *Brain Res* (1981) 12;204(2):387-402
- [Le Bars *et al.* 1987] Le Bars D, Bourgoïn S, Clot AM, Hamon M, Cesselin F **Noxious mechanical stimuli increase the release of Met-enkephalin-like material heterosegmentally in the rat spinal cord** *Brain Res* (1987) 27;402(1):188-92
- [Le Bars *et al.* 1992] Le Bars D, Villanueva L, Bouhassira D, Willer JC) **Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in animals and in man** *Patol Fiziol Eksp Ter* (1992) (4):55-65

- [Le Novère *et al.* 1996] Le Novère N, Zoli M, Changeux JP **Neuronal nicotinic receptor alpha 6 subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain** *Eur J Neurosci* (1996) 8(11):2428-39
- [Lee *et al.* 2011] Lee M, Silverman SM, Hansen H, Patel VB, Manchikanti L **A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia** *Pain Physician* (2011) 14(2):145-161
- [Léna *et al.* 1999] Léna C, de Kerchove D'Exaerde A, Cordero-Erausquin M, Le Novère N, del Mar Arroyo-Jimenez M, Changeux JP **Diversity and distribution of nicotinic acetylcholine receptors in the locus ceruleus neurons** *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 12;96(21):12126-31
- [Li *et al.* 2002] Li DP, Chen SR, Pan YZ, Levey AI, Pan HL **Role of presynaptic muscarinic and GABA(B) receptors in spinal glutamate release and cholinergic analgesia in rats** *J Physiol* (2002) 15;543(Pt 3):807-18
- [Light & Kavookjian 1988] Light AR, Kavookjian AM **Morphology and ultrastructure of physiologically identified substantia gelatinosa (lamina II) neurons with axons that terminate in deeper dorsal horn laminae (III-V)** *J Comp Neurol* (1988) 8;267(2):172-89
- [Light & Perl 1979] Light AR, Perl ER **Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers** *J Comp Neurol* (1979) 15;186(2):133-50
- [Lima & Coimbra 1986] Lima D, Coimbra A **A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord** *J Comp Neurol* (1986) 244:53-71
- [Liu & Hong 2003] Liu B, Hong JS **Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention** *J Pharmacol Exp Ther* (2003) 304(1):1-7 *Review*
- [Liu *et al.* 2004] Liu L, Zhu W, Zhang ZS, Yang T, Grant A, Oxford G, Simon SA **Nicotine inhibits voltage-dependent sodium channels and sensitizes vanilloid receptors** *J Neurophysiol* (2004) 91(4):1482-91
- [Lopez-Garcia *et al.* 1994] Lopez-Garcia JA, King AE **Membrane properties of physiologically classified rat dorsal horn neurons *in vitro*: correlation with cutaneous sensory afferent input** *Eur J Neurosci* (1994) 1;6(6):998-1007
- [Loram *et al.* 2010] Loram LC, Harrison JA, Chao L, Taylor FR, Reddy A, Travis CL, Giffard R, Al-Abed Y, Tracey K, Maier SF, Watkins LR **Intrathecal injection of an alpha seven nicotinic acetylcholine receptor agonist attenuates gp120-induced mechanical allodynia and spinal pro-inflammatory cytokine profiles in rats** *Brain Behav Immun* (2010) 24(6):959-67
- [Loram *et al.* 2012] Loram LC, Taylor FR, Strand KA, Maier SF, Speake JD, Jordan KG, James JW, Wene SP, Pritchard RC, Green H, Van Dyke K, Mazarov A, Letchworth SR, Watkins LR **Systemic administration of an alpha-7 nicotinic acetylcholine agonist reverses neuropathic pain in male Sprague Dawley rats** *J Pain* (2012) 13(12):1162-71
- [Lorenzo *et al.* 2008] Lorenzo LE, Ramien M, St Louis M, De Koninck Y, Ribeiro-da-Silva A **Postnatal changes in the Rexed lamination and markers of nociceptive afferents in the superficial dorsal horn of the rat** *J Comp Neurol* (2008) 508(4):592-604
- [Lough *et al.* 2007] Lough C, Young T, Parker R, Wittenauer S, Vincler M **Increased spinal dynorphin contributes to chronic nicotine-induced mechanical hypersensitivity in the rat** *Neurosci Lett* (2007) 5;422(1):54-8
- [Lu & Perl 2005] Lu Y, Perl ER **Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II)** *J Neurosci* (2005) 13;25(15):3900-7
- [Mancini *et al.* 2014] Mancini F, Nash T, Iannetti GD, Haggard P **Pain relief by touch: A quantitative approach** *Pain* (2014) 155(3):635-42
- [Marks *et al.* 1992] Marks MJ, Pauly JR, Gross SD, Deneris ES, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann SF, Collins AC **Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment** *J Neurosci* (1992) 12(7):2765-84
- [Marks *et al.* 1993] Marks MJ, Grady SR, Collins AC **Downregulation of nicotinic receptor function after chronic nicotine infusion** *J Pharmacol Exp Ther* (1993) 266(3):1268-76
- [Marks *et al.* 1994] Marks MJ, Grady SR, Yang JM, Lippiello PM, Collins AC **Desensitization of nicotine-stimulated 86Rb+ efflux from mouse brain synaptosomes** *J Neurochem* (1994) 63(6):2125-35

- [Marubio *et al.* 1999] Marubio LM, del Mar Arroyo-Jimenez M, Cordero-Erausquin M, Léna C, Le Novère N, de Kerchove d'Exaerde A, Huchet M, Damaj MI, Changeux JP **Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits** *Nature* (1999) 29;398(6730):805-10
- [Matsumoto *et al.* 2007] Matsumoto M, Xie W, Inoue M, Ueda H **Evidence for the tonic inhibition of spinal pain by nicotinic cholinergic transmission through primary afferents** *Mol Pain* (2007) 19;3:41
- [Maxwell *et al.* 1983] Maxwell DJ, Fyffe RE, Rethelyi M **Morphological properties of physiologically characterized lamina III neurones in the cat spinal cord** *Neuroscience* (1983) 10(1):1-22
- [Maxwell *et al.* 2007] Maxwell DJ, Belle MD, Cheunsuang O, Stewart A, Morris R **Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn** *J Physiol* (2007) 15;584(Pt 2):521-33
- [McCallum *et al.* 2006] McCallum SE, Parameswaran N, Bordia T, Fan H, McIntosh JM, Quik M **Differential regulation of mesolimbic alpha 3/alpha 6 beta 2 and alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptor sites and function after long-term oral nicotine to monkeys** *J Pharmacol Exp Ther* (2006) 318(1):381-8
- [McGehee *et al.* 1995] McGehee DS, Heath MJ, Gelber S, Devay P, Role LW **Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors** *Science* (1995) 22;269(5231):1692-6
- [McMahon *et al.* 2006] Hökfelt TG, Zhang X, Villar M, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z **Central consequences of peripheral nerve damage** In: McMahon S, Koltzenburg M, Tracey I, Turk DC eds. *Wall and Melzack's Textbook of Pain, 5th ed.* Philadelphia, Pennsylvania, USA Elsevier Inc. (2006) Chapt. 63
- [Medhurst *et al.* 2008] Medhurst SJ, Hatcher JP, Hille CJ, Bingham S, Clayton NM, Billinton A, Chessell IP **Activation of the alpha7-nicotinic acetylcholine receptor reverses complete Freund adjuvant-induced mechanical hyperalgesia in the rat via a central site of action** *J Pain* (2008) 9(7):580-7
- [Meller & Gebhart 1993] Meller ST, Gebhart GF **Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord** *Pain* (1993) 52(2):127-36
- [Melzack & Wall 1965] Melzack R, Wall PD **Pain mechanisms: a new theory** *Science* (1965) 19;150(3699):971-9
- [Mesnage *et al.* 2011] Mesnage B, Gaillard S, Godin AG, Rodeau JL, Hammer M, Von Engelhardt J, Wiseman PW, De Koninck Y, Schlichter R, Cordero-Erausquin M **Morphological and functional characterization of cholinergic interneurons in the dorsal horn of the mouse spinal cord** *J Comp Neurol* (2011) 1;519(16):3139-58
- [Millan 1999] Millan MJ **The induction of pain: an integrative review** *Prog Neurobiol* (1999) 57(1):1-164 *Review*
- [Millan 2002] Millan MJ **Descending control of pain** *Prog Neurobiol* (2002) 66(6):355-4744 *Review*
- [Miller & Seybold 1987] Miller KE, Seybold VS **Ultrastructure of the central gray region (lamina X) in cat spinal cord** *Neuroscience* (1987) 22(3):1057-66
- [Milligan & Watkins 2009] Milligan ED, Watkins LR **Pathological and protective roles of glia in chronic pain** *Nat Rev Neurosci* (2009) 10(1):23-36
- [Mitchelson *et al.* 2012] Mitchelson FJ **The pharmacology of McN-A-343** *Pharmacol Ther* (2012) 135(2):216-45
- [Miwa *et al.* 2011] Miwa JM, Freedman R, and Lester HA **Neural Systems Governed by Nicotinic Acetylcholine Receptors: Emerging Hypotheses** *Neuron* (2011) 70: 20-33
- [Morton *et al.* 1987] Morton CR, Maisch B, Zimmermann M **Diffuse noxious inhibitory controls of lumbar spinal neurons involve a supraspinal loop in the cat** *Brain Res* (1987) 5;410(2):347-52
- [Moser *et al.* 2007] Moser N, Mechawar N, Jones I, Gochberg-Sarver A, Orr-Urtreger A, Plomann M, Salas R, Molles B, Marubio L, Roth U, Maskos U, Winzer-Serhan U, Bourgeois JP, Le Sourd AM, De Biasi M, Schröder H, Lindstrom J, Maelicke A, Changeux JP, Wevers A **Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures** *J Neurochem* (2007) 102(2):479-92
- [Moss *et al.* 2007] Moss A, Beggs S, Vega-Avelaira D, Costigan M, Hathway GJ, Salter MW, Fitzgerald M **Spinal microglia and neuropathic pain in young rats** *Pain* (2007) 128(3):215-24

- [Motohashi *et al.* 2001] Motohashi K, Umino M **Heterotopic painful stimulation decreases the late component of somatosensory evoked potentials induced by electrical tooth stimulation** *Brain Res Cogn Brain Res* (2001) 11(1):39-46
- [Mudo *et al.* 2007] Mudo G, Belluardo N, Fuxe K **Nicotinic receptor agonists as neuroprotective/neurotrophic drugs** Progress in molecular mechanisms *J Neural Transm* (2007) 114(1):135-47
- [Mulugeta *et al.* 2003] Mulugeta E, El-Bakri N, Karlsson E, Elhassan A, Adem A **Loss of muscarinic M4 receptors in spinal cord of arthritic rats: implications for a role of M4 receptors in pain response** *Brain Res* (2003) 29;982(2):284-7
- [Naguib & Yaksh 1994] Naguib M, Yaksh TL **Antinociceptive effects of spinal cholinesterase inhibition and isobolographic analysis of the interaction with mu and alpha 2 receptor systems** *Anesthesiology* (1994) 80(6):1338-48
- [Naguib & Yaksh 1997] Naguib M, Yaksh TL **Characterization of muscarinic receptor subtypes that mediate antinociception in the rat spinal cord** *Anesth Analg* (1997) 85(4):847-53
- [Nakamura & Jang 2010] Nakamura M, Jang IS **Presynaptic nicotinic acetylcholine receptors enhance GABAergic synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons** *Eur J Pharmacol* (2010) 25;640(1-3):178-84
- [Nguyen *et al.* 2003] Nguyen HN, Rasmussen BA, Perry D **Subtype-selective up-regulation by chronic nicotine of high-affinity nicotinic receptors in rat brain demonstrated by receptor autoradiography** *J Pharmacol Exp Ther* (2003) 307(3):1090-7
- [Nissl 1894] Nissl F **Ueber eine neue Untersuchungsmethode des Centralorgans zur Feststellung der Localisation der Nervenzellen** *Neurologisches Centralblatt, Leipzig* (1894) 13: 507-508
- [Normandin *et al.* 2013] Normandin A, Luccarini P, Molat JL, Gendron L, Dalle R **Spinal μ - and δ -opioids inhibit both thermal and mechanical pain in rats** *J Neurosci* (2013) 10;33(28):11703-14
- [Nuseir *et al.* 1999] Nuseir K, Heidenreich BA, Proudfit HK **The antinociception produced by microinjection of a cholinergic agonist in the ventromedial medulla is mediated by noradrenergic neurons in the A7 catecholamine cell group** *Brain Res* (1999) 20;822(1-2):1-7
- [Oda 1999] Oda Y **Choline acetyltransferase: The structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system** *Pathol Inter* (1999) 49: 921-37
- [Ofek & Soreq 2013] Ofek K, Soreq H **Cholinergic involvement and manipulation approaches in multiple system disorders** *Chem Biol Interact* (2013) 25;203(1):113-9
- [Ogawa *et al.* 1994] Ogawa S, Kow LM, Pfaff DW **In vitro electrophysiological characterization of midbrain periaqueductal gray neurons in female rats: responses to GABA- and Met-enkephalin-related agents** *Brain Res* (1994) 15;666(2):239-49
- [Okuda & Haga 2003] Okuda T, Haga T **High-affinity choline transporter** *Neurochem Res* (2003) 28(3-4):483-8
- [Olave *et al.* 2002] Olave MJ, Puri N, Kerr R, Maxwell DJ **Myelinated and unmyelinated primary afferent axons form contacts with cholinergic interneurons in the spinal dorsal horn** *Exp Brain Res* (2002) 145(4):448-56
- [Pöyhia *et al.* 1999] Pöyhia R, Xu M, Kontinen VK, Paananen S, Kalso E **Systemic physostigmine shows antiallodynic effects in neuropathic rats** *Anesth Analg* (1999) 89(2):428-33
- [Pan *et al.* 1998] Pan HL, Chen SR, Eisenach JC **Role of spinal NO in antiallodynic effect of intrathecal clonidine in neuropathic rats** *Anesthesiology* (1998) 89(6):1518-23
- [Pan *et al.* 1999] Pan HL, Chen SR, Eisenach JC **Intrathecal clonidine alleviates allodynia in neuropathic rats: interaction with spinal muscarinic and nicotinic receptors** *Anesthesiology* (1999) 90(2):509-14
- [Paqueron *et al.* 2001] Paqueron X, Li X, Bantel C, Tobin JR, Voytko ML, Eisenach JC **An obligatory role for spinal cholinergic neurons in the antiallodynic effects of clonidine after peripheral nerve injury** *Anesthesiology* (2001) 4(6):1074-81
- [Paqueron *et al.* 2003] Paqueron X, Conklin D, Eisenach JC **Plasticity in action of intrathecal clonidine to mechanical but not thermal nociception after peripheral nerve injury** *Anesthesiology* (2003) 99(1):199-204
- [Pawlowski *et al.* 2013] Pawlowski SA, Gaillard S, Ghorayeb I, Ribeiro-da-Silva A, Schlichter R, Cordero-Erausquin M **A novel population of cholinergic neurons in the macaque spinal dorsal horn of potential clinical relevance for pain therapy** *J Neurosci* (2013) 27;33(9):3727-37

- [Pedersen *et al.* 2011] Pedersen NP, Vaughan CW, Christie MJ **Opioid receptor modulation of GABAergic and serotonergic spinally projecting neurons of the rostral ventromedial medulla in mice** *J Neurophysiol* (2011) 106(2):731-40
- [Perry *et al.* 1999] Perry E, Walker M, Grace J and Perry R **Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness?** *Trends Neurosci* (1999) 22: 273–80
- [Perry *et al.* 2007] Perry DC, Mao D, Gold AB, McIntosh JM, Pezzullo JC, Kellar KJ **Chronic nicotine differentially regulates alpha6- and beta3-containing nicotinic cholinergic receptors in rat brain** *J Pharmacol Exp Ther* (2007) 322(1):306-15
- [Petitjean *et al.* 2012] Petitjean H, Rodeau JL, Schlichter R **Interactions between superficial and deep dorsal horn spinal cord neurons in the processing of nociceptive information** *Eur J Neurosci* (2012) 36(11):3500-8
- [Polgár *et al.* 2004] Polgár E, Gray S, Riddell JS, Todd AJ **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* (2004) 111(1-2):144-50
- [Polgár *et al.* 2010] Polgár E, Spike RC, Puskár Z, Andrew D, Todd AJ **Two populations of neurokinin 1 receptor-expressing projection neurons in lamina I of the rat spinal cord that differ in AMPA receptor subunit composition and density of excitatory synaptic input** *Neurosci* (2010) 2;167(4):1192-204
- [Prescott & De Koninck 2002] Prescott SA, De Koninck Y **Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat** *J Physiol* (2002) 15;539(Pt 3):817-36
- [Price *et al.* 2003] Price DD, Greenspan JD, Dubner R **Neurons involved in the exteroceptive function of pain** *Pain* (2003) 106(3):215-9 *Review*
- [Price *et al.* 2009] Price TJ, Cervero F, Gold MS, Hammond DL, Prescott SA **Chloride regulation in the pain pathway** *Brain Res Rev* (2009) 60(1):149-70
- [Proctor *et al.* 2011] Proctor WR, Dobelis P, Moritz AT, Wu PH **Chronic nicotine treatment differentially modifies acute nicotine and alcohol actions on GABA(A) and glutamate receptors in hippocampal brain slices** *Br J Pharmacol* (2011) 162(6):1351-63
- [Purves *et al.* 2001] Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A-S, O McNamara J, and Williams SM, eds. *Neuroscience, 2nd edition* Sunderland, Maryland, USA, Sinauer Associates (2001)
- [Qian *et al.* 1993] Qian C, Li T, Shen TY, Libertine-Garahan L, Eckman J, Biftu T, Ip S **Epibatidine is a nicotinic analgesic** *Eur J Pharmacol* (1993) 21;250(3):R13-4
- [Raouf *et al.* 2012] Raouf R, Rugiero F, Kiesewetter H, Hatch R, Hummler E, Nassar MA, Wang F, Wood JN **Sodium channels and mammalian sensory mechanotransduction** *Mol Pain* (2012) 26;8:21
- [Rashid & Ueda 2002] Rashid MH, Ueda H **Neuropathy-specific analgesic action of intrathecal nicotinic agonists and its spinal GABA-mediated mechanism** *Brain Res* (2002) 25;953(1-2):53-62
- [Rashid *et al.* 2006] Rashid MH, Furue H, Yoshimura M, Ueda H **Tonic inhibitory role of alpha4beta2 subtype of nicotinic acetylcholine receptors on nociceptive transmission in the spinal cord in mice** *Pain* (2006) 125(1-2):125-35
- [Reichling & Basbaum 1990a] Reichling DB, Basbaum AI **Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls: I. GABA-immunoreactive projection neurons in the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus** *J Comp Neurol* (1990) 8;302(2):370-7
- [Reichling & Basbaum 1990b] Reichling DB, Basbaum AI **Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls: II. Electron microscopic immunocytochemical evidence of GABAergic control over the projection from the periaqueductal gray to the nucleus raphe magnus in the rat** *J Comp Neurol* (1990) 8;302(2):378-93
- [Ren & Dubner 2008] Ren K, Dubner R **Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity** *Curr Opin Anaesthesiol* (2008) 21(5):570-9
- [Rexed 1952] Rexed B **The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat** *J Comp Neurol* (1952) 96 (3): 414–95
- [Ribeiro-da-Silva & Cuello 1990] Ribeiro-da-Silva A, Cuello AC **Choline acetyltransferase-immunoreactive profiles are presynaptic to primary sensory fibers in the rat superficial dorsal horn** *J Comp Neurol* (1990) 15;295(3):370-84

- [Ribeiro-da-Silva & De Koninck 2008] Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y **Morphological and neurochemical organization of the spinal dorsal horn** In: Basbaum AI, Bushnell MC eds. *The Science of Pain* NYC, New York, USA. Academic Press 2008 Chapt. 23, 279-310 Available @ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
- [Ribeiro-da-Silva & Paxinos 2003] Ribeiro-da-Silva A, Paxinos G **Substantia gelatinosa of the spinal cord. The rat nervous system** Ed. New York: Elsevier (2004) p 129-48
- [Ritz & Greenspan 1985] Ritz LA, Greenspan JD **Morphological features of lamina V neurons receiving nociceptive input in cat sacrocaudal spinal cord** *J Comp Neurol* (1985) 22;238(4):440-52
- [Rivera *et al.* 2002] Rivera C, Li H, Thomas-Crusells J, Lahtinen H, Viitanen T, Nanobashvili A, Kokaia Z, Airaksinen MS, Voipio J, Kaila K, Saarma M **BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion** *J Cell Biol* (2002) 9;159(5):747-52
- [Roberts *et al.* 1995] Roberts RG, Stevenson JE, Westerman RA, Pennefather J **Nicotinic acetylcholine receptors on capsaicin-sensitive nerves** *Neuroreport* (1995) 31;6(11):1578-82
- [Roby-Brami *et al.* 1987] Roby-Brami A, Bussel B, Willer JC, Le Bars D **An electrophysiological investigation into the pain-relieving effects of heterotopic nociceptive stimuli. Probable involvement of a supraspinal loop** *Brain* (1987) 110 (Pt 6):1497-508
- [Romero *et al.* 2011] Romero TR, Resende LC, Duarte ID **The neuronal NO synthase participation in the peripheral antinociception mechanism induced by several analgesic drugs** *Nitric Oxide* (2011) 30;25(4):431-5
- [Rossi *et al.* 1994] Rossi GC, Pasternak GW, Bodnar RJ **Mu and delta opioid synergy between the periaqueductal gray and the rostro-ventral medulla** *Brain Res* (1994) 28;665(1):85-93
- [Roudaut *et al.* 2012] Roudaut Y, Lonigro A, Coste B, Hao J, Delmas P, Crest M **Touch sense: functional organization and molecular determinants of mechanosensitive receptors** *Channels (Austin)* (2012) 6(4):234-45 *Review*
- [Rueter *et al.* 2000] Rueter LE, Meyer MD, Decker MW **Spinal mechanisms underlying A-85380-induced effects on acute thermal pain** *Brain Res* (2000) 8;872(1-2):93-101
- [Ruscheweyh & Sandkühler 2002] Ruscheweyh R, Sandkühler J **Lamina-specific membrane and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurones *in vitro*** *J Physiol* (2002) 15;541(Pt 1):231-44
- [Russ 1999] Russ JC **The image processing handbook** Ed. Boca Raton, FL: CRC Press (1999)
- [Rye *et al.* 1987] Rye DB, Saper CB, Lee HJ, Wainer BH **Pedunculopontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum** *J Comp Neurol* (1987) 22;259(4):483-528
- [Rye *et al.* 1988] Rye DB, Lee HJ, Saper CB, Wainer BH **Medullary and spinal efferents of the pedunculopontine tegmental nucleus and adjacent mesopontine tegmentum in the rat** *J Comp Neurol* (1988) 15;269(3):315-41
- [Sallette *et al.* 2005] Sallette J, Pons S, Devillers-Thierry A, Soudant M, Prado de Carvalho L, Changeux JP, Corringer PJ **Nicotine upregulates its own receptors through enhanced intracellular maturation** *Neuron* (2005) 19;46(4):595-607
- [Sanada *et al.* 2009] Sanada T, Kohase H, Makino K, Umino M **Effects of alpha-adrenergic agonists on pain modulation in diffuse noxious inhibitory control** *J Med Dent Sci* (2009) 56(1):17-24
- [Schliebs & Arendt 2011] Schliebs R, Arendt T **The cholinergic system in aging and neuronal degeneration** *Behavioural Brain Research* (2011) 221 555-63
- [Schmelz 2011] Schmelz M **Neuronal sensitivity of the skin** *Eur J Dermatol* (2011) 21 Suppl 2:43-7
- [Schneider 2003] Schneider SP **Spike frequency adaptation and signaling properties of identified neurons in rodent deep spinal dorsal horn** *J Neurophysiol* (2003) 90(1):245-58
- [Schneider 2005] Schneider SP **Mechanosensory afferent input and neuronal firing properties in rodent spinal laminae III-V: re-examination of relationships with analysis of responses to static and time-varying stimuli** *Brain Res* (2005) 9;1034(1-2):71-89
- [Séguéla *et al.* 1993] Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW **Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium** *J Neurosci* (1993) 13(2):596-604

- [Sershen *et al.* 1979] Sershen H, Lajtha A **Cerebral uptake of nicotine and of amino acids** *J Neurosci Res* (1979) 4(2):85-91
- [Sheardown *et al.* 1997] Sheardown MJ, Shannon HE, Swedberg MD, Suzdak PD, Bymaster FP, Olesen PH, Mitch CH, Ward JS, Sauerberg P **M1 receptor agonist activity is not a requirement for muscarinic antinociception** *J Pharmacol Exp Ther* (1997) 281(2):868-75
- [Shehab *et al.* 2003] Shehab SA, Spike RC, Todd AJ **Evidence against cholera toxin B subunit as a reliable tracer for sprouting of primary afferents following peripheral nerve injury** *Brain Res* (2003) 28;964(2):218-27
- [Shytle *et al.* 2004] Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J, Ehrhart J, Silver AA, Sanberg PR, Tan J **Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors** *J Neurochem* (2004) 89(2):337-43
- [Sluka *et al.* 2009] Sluka KA, Winter OC, Wemmie JA **Acid-sensing ion channels: A new target for pain and CNS diseases** *Curr Opin Drug Discov Devel* (2009) 12(5):693-704
- [Spike *et al.* 2003] Spike RC, Puskár Z, Andrew D, Todd AJ **A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord** *Eur J Neurosci* (2003) 18(9):2433-48
- [Steen & Reeh 1993] Steen KH, Reeh PW **Actions of cholinergic agonists and antagonists on sensory nerve endings in rat skin, *in vitro*** *J Neurophysiol* (1993) 70(1):397-405
- [Stepien *et al.* 2010] Stepien AE, Tripodi M, Arber S **Monosynaptic rabies virus reveals premotor network organization and synaptic specificity of cholinergic partition cells** *Neuron* (2010) 4;68(3):456-72
- [Streit *et al.* 2000] Streit WJ, Hurley SD, McGraw TS, Semple-Rowland SL **Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for interleukin-6 in neuroglia signaling during regeneration** *J Neurosci Res* (2000) 1;61(1):10-20
- [Stucky *et al.* 2009] Stucky CL, Dubin AE, Jeske NA, Malin SA, McKemy DD, Story GM **Roles of transient receptor potential channels in pain** *Brain Res Rev* (2009) 60(1):2-23 *Review*
- [Suzuki *et al.* 2002] Suzuki R, Morcuende S, Webber M, Hunt SP, Dickenson AH **Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways** *Nat Neurosci* (2002) 5(12):1319-26
- [Swett & Woolf 1985] Swett JE, Woolf CJ **The somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord** *J Comp Neurol* (1985) 1;231(1):66-77
- [Syverud *et al.* 2007] Syverud K, Chinga G, Johnsen PO, Leirset I, Wiik K **Analysis of lint particles from full-scale printing trials** *Appita J* (2007) 60:286-90
- [Szucs *et al.* 2010] Szucs P, Luz LL, Lima D, Safronov BV **Local axon collaterals of lamina I projection neurons in the spinal cord of young rats** *J Comp Neurol* (2010) 15;518(14):2645-65
- [Szucs *et al.* 2013] Szucs P, Luz LL, Pinho R, Aguiar P, Antal Z, Tiong SY, Todd AJ, Safronov BV **Axon diversity of lamina I local-circuit neurons in the lumbar spinal cord** *J Comp Neurol* (2013) 15;521(12):2719-41
- [Takeda *et al.* 1992] Takeda T, Ishikawa A, Ohtomo K, Kobayashi Y, Matsuoka T **Fractal dimension of dendritic tree of cerebellar Purkinje cell during onto- and phylogenetic development** *Neurosci Res* (1992) 13(1):19-31
- [Takeda *et al.* 2003] Takeda D, Nakatsuka T, Papke R, Gu JG **Modulation of inhibitory synaptic activity by a non-alpha4beta2, non-alpha7 subtype of nicotinic receptors in the substantia gelatinosa of adult rat spinal cord** *Pain* (2003) 101(1-2):13-23
- [Takeda *et al.* 2007] Takeda D, Nakatsuka T, Gu JG, Yoshida M **The activation of nicotinic acetylcholine receptors enhances the inhibitory synaptic transmission in the deep dorsal horn neurons of the adult rat spinal cord** *Mol Pain* (2007) 25;3:26
- [Tanga *et al.* 2004] Tanga FY, Raghavendra V, DeLeo JA **Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain** *Neurochem Int* (2004) 45(2-3):397-407
- [Tanga *et al.* 2005] Tanga FY, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA **The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy** *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 19;102(16):5856-61

- [Taylor & Brown 1999] Taylor P and Brown JH **Synthesis, Storage and Release of Acetylcholine** In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, eds. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects 6th edition* Philadelphia, USA, Lippincott-Raven (1999) Chapitre XI Available @ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
- [Taylor *et al.* 2009] Taylor AM, Peleshok JC, Ribeiro-da-Silva A **Distribution of P2X(3)-immunoreactive fibers in hairy and glabrous skin of the rat** *J Comp Neurol* (2009) 514:555–66
- [Tikka *et al.* 2001] Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J **Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia** *J Neurosci* (2001) 15;21(8):2580-8
- [Todd & Spike 1993] Todd AJ, Spike RC **The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn** *Prog Neurobiol* (1993) 41(5):609-45 *Review*
- [Todd *et al.* 2000] Todd AJ, McGill MM, Shehab SA **Neurokinin 1 receptor expression by neurons in laminae I, III and IV of the rat spinal dorsal horn that project to the brainstem** *Eur J Neurosci* (2000) 12(2):689-700
- [Todd 1991] Todd AJ **Immunohistochemical evidence that acetylcholine and glycine exist in different populations of GABAergic neurons in lamina III of rat spinal dorsal horn** *Neuroscience* (1991) 44(3):741-6
- [Todd 1996] Todd AJ **GABA and glycine in synaptic glomeruli of the rat spinal dorsal horn** *Eur J Neurosci* (1996) 8(12):2492-8
- [Todd 2010] Todd AJ **Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn** *Nat Rev Neurosci* (2010) 11(12):823-36 *Review*
- [Trang *et al.* 2006] Trang T, Beggs S, Salter MW **Purinoceptors in microglia and neuropathic pain** *Pflugers Arch* (2006) 452(5):645-52
- [Tripathi *et al.* 1982] Tripathi HL, Martin BR, Aceto MD **Nicotine-induced antinociception in rats and mice: correlation with nicotine brain levels** *J Pharmacol Exp Ther* (1982) 221(1):91-6
- [Tsuda *et al.* 2003] Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K **P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury** *Nature* (2003) 424(6950):778-83
- [Turchan-Cholewo *et al.* 2008] Turchan-Cholewo J, Dimayuga FO, Ding Q, Keller JN, Hauser KF, Knapp PE, Bruce-Keller AJ **Cell-specific actions of HIV-Tat and morphine on opioid receptor expression in glia** *J Neurosci Res* (2008) 86(9):2100-10
- [Umana *et al.* 2013] Umana IC, Daniele CA, McGehee DS **Neuronal nicotinic receptors as analgesic targets: It's a winding road** *Biochem Pharmacol* (2013) pii: S0006-2952(13)00487-5 [Epub ahead of print]
- [Urban *et al.* 1989] Urban L, Willetts J, Murase K, Randić M **Cholinergic effects on spinal dorsal horn neurons in vitro: an intracellular study** *Brain Res* (1989) 23;500(1-2):12-20
- [Vallejo *et al.* 2005] Vallejo YF, Buisson B, Bertrand D, Green WN **Chronic nicotine exposure upregulates nicotinic receptors by a novel mechanism** *J Neurosci* (2005) 8;25(23):5563-72
- [Vetter *et al.* 2001] Vetter G, Geisslinger G, Tegeder I **Release of glutamate, nitric oxide and prostaglandin E2 and metabolic activity in the spinal cord of rats following peripheral nociceptive stimulation** *Pain* (2001) 92(1-2):213-8
- [Villanueva & Bourgeois 2009] Villanueva L, Bourgeois L **Système de modulation de la douleur** In: Bouhassira D, Calvino B, eds. *Douleur : physiologie, physiopathologie et pharmacologie* Rueil-Malmaison, France, Arnette, Wolters Kluwer France (2009) Chapitre II
- [Villanueva & Le Bars 1983] Villanueva L, Le Bars D **The activation of bulbo-spinal controls by peripheral nociceptive inputs: diffuse noxious inhibitory controls** *Biol Res* (1995) 28(1):113-25
- [Villanueva *et al.* 1996] Villanueva L, Bouhassira D, Le Bars D **The medullary subnucleus reticularis dorsalis (SRD) as a key link in both the transmission and modulation of pain signals** *Pain* (1996) 67(2-3):231-40
- [Villanueva 2009] Villanueva L **Diffuse Noxious Inhibitory Control (DNIC) as a tool for exploring dysfunction of endogenous pain modulatory systems** *Pain* (2009) 143(3):161-2

-
- [Vincler & Eisenach 2005] Vincler MA, Eisenach JC **Knock down of the alpha 5 nicotinic acetylcholine receptor in spinal nerve-ligated rats alleviates mechanical allodynia** *Pharmacol Biochem Behav* (2005) 80(1):135-43
- [Volman *et al.* 2005] Volman TJ, Hendriks T, Goris RJ **Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome** *Shock* (2005) 23(4):291-7 *Review*
- [von Engelhardt *et al.* 2007] von Engelhardt J, Eliava M, Meyer AH, Rozov A, Monyer H **Functional characterization of intrinsic cholinergic interneurons in the cortex** *J Neurosci* (2007) 27:5633-42
- [Wada *et al.* 1989] Wada E, Wada K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrick J, Swanson LW **Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat** *J Comp Neurol* (1989) 8;284(2):314-35
- [Wada *et al.* 1990] Wada E, McKinnon D, Heinemann S, Patrick J, Swanson LW **The distribution of mRNA encoded by a new member of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene family (alpha 5) in the rat central nervous system** *Brain Res* (1990) 27;526(1):45-53
- [Wang *et al.* 2003] Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ **Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation** *Nature* (2003) 23;421(6921):384-8
- [Wang H & Wessendorf 1999] Wang H, Wessendorf MW **Mu- and delta-opioid receptor mRNAs are expressed in spinally projecting serotonergic and nonserotonergic neurons of the rostral ventromedial medulla** *J Comp Neurol* (1999) 8;404(2):183-96
- [Wang XL *et al.* 2006] Wang XL, Zhang HM, Li DP, Chen SR, Pan HL **Dynamic regulation of glycinergic input to spinal dorsal horn neurones by muscarinic receptor subtypes in rats** *J Physiol* (2006) 1;571(Pt 2):403-13
- [Wang Y *et al.* 2012] Wang Y, Barker K, Shi S, Diaz M, Mo B, Gutstein HB **Blockade of PDGFR- β activation eliminates morphine analgesic tolerance** *Nat Med* (2012) 19;18(3):385-7
- [Watkins *et al.* 1995] Watkins LR, Maier SF, Goehler L **Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states** *Pain* (1995) 63(3):289-302
- [Watkins *et al.* 2001] Watkins LR, Milligan ED, Maier SF **Spinal cord glia: new players in pain** *Pain* (2001) 93(3):201-5 *Review*
- [Watkins *et al.* 2005] Watkins LR, Hutchinson MR, Johnson IN, Maier SF **Glial: novel counter-regulators of opioid analgesia** *Trends in Neurosci* (2005) 28(12):661-9 *Review*
- [Watson *et al.* 2009] Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, Heise C **Atlas of the Mouse Spinal Cord** In: A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas eds. *The Spinal Cord* 32 Jamestown Road, London, NW1 7BY, UK. Academic Press 2009 Chapter 16 p.358 and p.366
- [Wei *et al.* 1999a] Wei F, Dubner R, Ren K **Laminar-selective noradrenergic and serotonergic modulation includes spinoparabrachial cells after inflammation** *Neuroreport* (1999) 3;10(8):1757-61
- [Wei *et al.* 1999b] Wei F, Dubner R, Ren K **Nucleus reticularis gigantocellularis and nucleus raphe magnus in the brain stem exert opposite effects on behavioral hyperalgesia and spinal Fos protein expression after peripheral inflammation** *Pain* (1999) 80(1-2):127-4 *Erratum in: Pain* (1999) 81(1-2):215-9
- [Wei *et al.* 2008] Wei F, Guo W, Zou S, Ren K, Dubner R **Supraspinal glial-neuronal interactions contribute to descending pain facilitation** *J Neurosci* (2008) 15;28(42) :10482-95
- [Wei J *et al.* 1994] Wei J, Walton EA, Milici A, Buccafusco JJ **m1-m5 muscarinic receptor distribution in rat CNS by RT-PCR and HPLC** *J Neurochem* (1994) 63(3):815-21
- [Westman *et al.* 2010] Westman M, Saha S, Morshed M, Lampa J **Lack of acetylcholine nicotine alpha 7 receptor suppresses development of collagen-induced arthritis and adaptive immunity** *Clin Exp Immunol* (2010) 162(1):62-7
- [Wetts & Vaughn 1994] Wetts R, Vaughn JE **Choline acetyltransferase and NADPH diaphorase are co-expressed in rat spinal cord neurons** *Neuroscience* (1994) 63(4):1117-24

- [Wewers *et al.* 1999] Wewers ME, Dhatt RK, Snively TA, Tejwani GA **The effect of chronic administration of nicotine on antinociception, opioid receptor binding and met-enkephalin levels in rats** *Brain Res* (1999) 20;822(1-2):107-13
- [Whiteaker *et al.* 1998] Whiteaker P, Sharples CG, Wonnacott S **Agonist-induced up-regulation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in M10 cells: pharmacological and spatial definition** *Mol Pharmacol* (1998) 53(5):950-62
- [Wieseler *et al.* 2005] Wieseler-Frank J, Maier SF, Watkins LR **Central proinflammatory cytokines and pain enhancement** *Neurosignals* (2005) 14(4):166-74
- [Wilder-Smith *et al.* 2004] Wilder-Smith CH, Schindler D, Lovblad K, Redmond SM, Nirkko A **Brain functional magnetic resonance imaging of rectal pain and activation of endogenous inhibitory mechanisms in irritable bowel syndrome patient subgroups and healthy controls** *Gut* (2004) 53(11):1595-601
- [Willer *et al.* 1990] Willer JC, Le Bars D, De Broucker T **Diffuse noxious inhibitory controls in man: involvement of an opioidergic link** *Eur J Pharmacol* (1990) 3;182(2):347-55
- [Woolf & Ma 2007] Woolf CJ, Ma Q **Nociceptors: noxious stimulus detectors** *Neuron* (2007) 2;55(3):353-64 *Review*
- [Woolf *et al.* 1990] Woolf NJ, Harrison JB, Buchwald JS **Cholinergic neurons of the feline pontomesencephalon. II. Ascending anatomical projections** *Brain Res* (1990) 18;520(1-2):55-72
- [Woolf 1983] Woolf CJ **Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity** *Nature* (1983) 15-21;306(5944):686-8
- [Woolf 2011] Woolf CJ **Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain** *Pain* (2011) 152(3 Suppl):S2-15
- [Wu & Hersh 1994] Wu D, Hersh LB **Choline acetyltransferase: Celebrating its fiftieth year** *J Neurochem* 1994 62(5):1653-63
- [Xu *et al.* 1996] Xu Z, Li P, Tong C, Figueroa J, Tobin JR, Eisenach JC **Location and characteristics of nitric oxide synthase in sheep spinal cord and its interaction with alpha(2)-adrenergic and cholinergic antinociception** *Anesthesiology* (1996) 84(4):890-9
- [Xu *et al.* 2007] Xu Z, Tong C, Pan HL, Cerda SE, Eisenach JC **Intravenous morphine increases release of nitric oxide from spinal cord by an alpha-adrenergic and cholinergic mechanism** *J Neurophysiol* (1997) 78(4):2072-8
- [Yaksh *et al.* 1985] Yaksh TL, Dirksen R, Harty GJ **Antinociceptive effects of intrathecally injected cholinomimetic drugs in the rat and cat** *Eur J Pharmacol* (1985) 29;117(1):81-8
- [Yalcin *et al.* 2011] Yalcin I, Charlet A, Cordero-Erausquin M, Tessier LH, Picciotto MR, Schlichter R, Poisbeau P, Freund-Mercier MJ, Barrot M **Nociceptive thresholds are controlled through spinal beta2-subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors** *Pain* (2011) 152(9):2131-7
- [Yang *et al.* 1992] Yang CY, Wu WH, Zbuzek VK **Antinociceptive effect of chronic nicotine and nociceptive effect of its withdrawal measured by hot-plate and tail-flick in rats** *Psychopharmacology (Berl)* (1992) 106(3):417-20
- [Yang *et al.* 1998] Yang LC, Chen LM, Wang CJ, Buerkle H **Postoperative analgesia by intra-articular neostigmine in patients undergoing knee arthroscopy** *Anesthesiology* (1998) 88(2):334-9
- [Yarnitsky *et al.* 2010] Yarnitsky D **Conditioned pain modulation (the diffuse noxious inhibitory control-like effect): its relevance for acute and chronic pain states** *Curr Op in Anaesthesiol* (2010) 23(5):611-5
- [Yasaka *et al.* 2007] Yasaka T, Kato G, Furue H, Rashid MH, Sonohata M, Tamae A, Murata Y, Masuko S, Yoshimura M **Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn *in vitro*** *J Physiol* (2007) 1;581(Pt 2):603-18
- [Yasaka *et al.* 2010] Yasaka T, Tiong SY, Hughes DI, Riddell JS, Todd AJ **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* (2010) 151(2):475-88
- [Yoon *et al.* 2003] Yoon MH, Choi JI, Jeong SW **Antinociception of intrathecal cholinesterase inhibitors and cholinergic receptors in rats** *Acta Anaesthesiol Scand* (2003) 47(9):1079-84

-
- [Yoon *et al.* 2005] Yoon SY, Kwon YB, Kim HW, Roh DH, Kang SY, Kim CY, Han HJ, Kim KW, Yang IS, Beitz AJ, Lee JH **Intrathecal neostigmine reduces the zymosan-induced inflammatory response in a mouse air pouch model via adrenomedullary activity: involvement of spinal muscarinic type 2 receptors** *Neuropharmacology* (2005) 49(3):275-82
- [Yoshimura & Furue 2006] Yoshimura M, Furue H **Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord** *J Pharmacol Sci* (2006) 101(2):107-17 *Review*
- [Yoshimura & Jessel 1989a] Yoshimura M, Jessel TM **Primary afferent-evoked synaptic responses and slow potential generation in rat substantia gelatinosa neurons *in vitro*** *J Neurophysiol* (1989) 62(1):96-108
- [Yoshimura & Jessel 1989b] Yoshimura M, Jessel TM **Membrane properties of rat substantia gelatinosa neurons *in vitro*** *J Neurophysiol* (1989) 62(1): 109-18
- [Young *et al.* 2008a] Young T, Wittenauer S, Parker R, Vincler M **Peripheral nerve injury alters spinal nicotinic acetylcholine receptor pharmacology** *Eur J Pharmacol* (2008) 20;590(1-3):163-9
- [Young *et al.* 2008b] Young T, Wittenauer S, McIntosh JM, Vincler M **Spinal alpha3beta2* nicotinic acetylcholine receptors tonically inhibit the transmission of nociceptive mechanical stimuli** *Brain Res* (2008) 10;1229:118-24
- [Zarrindast *et al.* 1999] Zarrindast MR, Khoshayand MR, Shafaghi B **The development of cross-tolerance between morphine and nicotine in mice** *Eur Neuropsychopharmacol* (1999) 9(3):227-33
- [Zhang & De Koninck 2006] Zhang J, De Koninck Y **Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury** *J Neurochem* (2006) 97(3):772-83
- [Zhang *et al.* 2005] Zhang HM, Li DP, Chen SR, Pan HL **M2, M3, and M4 receptor subtypes contribute to muscarinic potentiation of GABAergic inputs to spinal dorsal horn neurons** *J Pharmacol Exp Ther* (2005) 313(2):697-704
- [Zhang *et al.* 2006] Zhang HM, Chen SR, Matsui M, Gautam D, Wess J, Pan HL **Opposing functions of spinal M2, M3, and M4 receptor subtypes in regulation of GABAergic inputs to dorsal horn neurons revealed by muscarinic receptor knockout mice** *Mol Pharmacol* (2006) 69(3):1048-55
- [Zhang *et al.* 2007] Zhang HM, Chen SR, Pan HL **Regulation of glutamate release from primary afferents and interneurons in the spinal cord by muscarinic receptor subtypes** *J Neurophysiol* (2007) 97(1):102-9
- [Zhang *et al.* 2012] Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Wu YP, Chen WS **Inflammation and apoptosis in spinal cord injury** *Indian J Med Res* (2012) 135:287-96
- [Zhu *et al.* 2008] Zhu Z, Bowman HR, Baghdoyan HA, Lydic R **Morphine increases acetylcholine release in the trigeminal nuclear complex** *Sleep* (2012) 135:287-9631(12):1629-37
- [Zhuo & Gebhart 1991] Zhuo M, Gebhart GF **Tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission** *Pain* (1991) 46(2):211-22
- [Zhuo & Gebhart 1997] Zhuo M, Gebhart GF **Biphasic modulation of spinal nociceptive transmission from the medullary raphe nuclei in the rat** *J Neurophysiol* (1997) 18(4):651-63
- [Zhuo *et al.* 1993] Zhuo M, Meller ST, Gebhart GF **Endogenous nitric oxide is required for tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission** *Pain* (1993) 54(1):71-8

Quelques statistiques...

à but purement futile

Ce manuscrit comporte 36 142 mots (hors bibliographie et article), dont environ 4% relatifs aux termes *interneurone*, *acétycholine*, *cholinergique*, *nicotine*, *moelle épinière*, *transmission*, *nociceptif*, *douleur*, et chacun de leurs dérivés grammaticaux (*i.e.* adjectifs, accords genre et nombre).

En moyenne, chacun de ces termes apparaissent au moins une fois par page.