



HAL
open science

Connexine 43 astrocytaire et antidépresseurs : une nouvelle approche thérapeutique des douleurs neuropathiques

Tiffany Jeanson

► **To cite this version:**

Tiffany Jeanson. Connexine 43 astrocytaire et antidépresseurs : une nouvelle approche thérapeutique des douleurs neuropathiques. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066259 . tel-01444551

HAL Id: tel-01444551

<https://theses.hal.science/tel-01444551>

Submitted on 24 Jan 2017

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.

Université Pierre et Marie Curie

ED3C - Ecole doctorale Cerveau Cognition Comportement

Connexine 43 astrocytaire et antidépresseurs : une nouvelle approche thérapeutique des douleurs neuropathiques

Par Tiffany Jeanson

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Christian Giaume

Présentée et soutenue publiquement le 23 septembre 2016

Devant un jury composé de :

Dr Bernard Zalc	Président du jury
Pr Marc Mesnil	Rapporteur
Dr Bruno Guiard	Rapporteur
Pr Denis Ardid	Examineur
Pr Michel Hamon	Examineur
Dr Mathieu Charvériat	Directeur scientifique de Theranexus (invité)
Dr Christian Giaume	Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier chaleureusement les membres du jury. Merci à Bernard Zalc d'avoir pu en assurer la présidence. Merci également à Marc Mesnil et Bruno Guiard d'avoir accepté d'être rapporteurs et à Denis Ardid pour sa participation à ce jury, un grand merci à vous trois d'avoir pu faire le déplacement jusque Paris.

Je remercie vivement Christian Giaume. Merci de m'avoir donnée l'opportunité de réaliser ma thèse dans ton équipe, au sein du Collège de France. Endroit qui, même au bout de 2 ans ½, m'impressionne toujours autant par la qualité des gens qu'on y trouve et la passion de la science qui se ressent si vivement. Merci donc de m'avoir permis de côtoyer un tel environnement. Merci également d'avoir compris la différence de mon profil, ingénieur parmi tous ces universitaires, et de m'avoir permis de réaliser une formation à la valorisation. Un grand merci de ta confiance et de la grande liberté que tu m'as accordée pendant cette thèse. J'en mesure la chance. Merci aussi pour cette facilité de pouvoir aborder avec toi d'autres sujets que ceux scientifiques, notamment sur le cinéma. Enfin, merci de cette ambiance chaleureuse voire familiale que tu prends soin de conserver dans ton équipe.

Mes sincères remerciements vont à aussi à Michel Hamon. J'ai eu cette chance de pouvoir débiter mes deux premières années de thèse au sein de ton équipe. Merci de m'avoir transmis dès le début ce que je pourrais appeler les « bonnes attitudes du doctorant », tant au niveau de la rigueur et clarté scientifique, que de la prise de recul et de la curiosité, toujours à conserver. Merci pour toutes tes réponses à mes questions et pour tout ce que tu as pu m'apprendre dans le domaine de la pharmacologie. Je retiens également les pointes d'humour qui animaient toujours les réunions d'équipe. Merci de ton aide et de ton soutien tout au long de ces années, jusqu'à la relecture de mon introduction de thèse, même si je n'étais plus présente physiquement dans ton équipe.

Ayant eu la grande chance de réaliser une thèse CIFRE avec Theranexus, mes remerciements émus s'adressent à Franck Mouthon et Mathieu Charvériat, avec qui je chemine depuis si longtemps. C'est le moment où ma gorge se serre un peu ... tellement de choses partagées depuis 6 ans ! Un grand merci tout d'abord à vous deux pour m'avoir fait grandir professionnellement, ainsi que pour tous ces rires et moments de détente.

Franck, un grand merci de ton exigence et de ton regard bienveillant, me poussant toujours à aller plus loin dans ma réflexion et à ne pas me sous-estimer. A tes côtés, j'ai pu

beaucoup apprendre de la sensibilité et justesse avec lesquelles tu vois les choses. Merci aussi pour les valeurs humaines qui te sont si chères et que tu sais partager à ton équipe, c'est très précieux et contribue grandement à l'ambiance sereine et soudée qu'on y trouve. Merci pour toutes nos discussions et d'avoir suivi le fil de mes réflexions qu'elles soient professionnelles ou non, depuis toutes ces années. Merci aussi de m'avoir appris à transformer un regard parfois naïf, en regard plus adulte et plus tempéré, tout en respectant ce qui m'habite.

Mathieu, j'ai beaucoup appris par ton sens toujours très positif de voir les choses et ta façon de rebondir même si les résultats ne sont pas ceux attendus. Merci pour ton entrain et dynamisme communicatifs face à tout projet scientifique. Merci de ton oreille attentive pendant ces années à tes côtés, d'avoir écouté mes états d'âme avec patience et de m'avoir aidée par nos échanges à traverser des situations parfois moins évidentes ... jusqu'en Angleterre. Merci notamment de m'avoir fait confiance en m'offrant la possibilité de revenir pour le stage de fin d'études. Enfin, à tes côtés j'ai pu découvrir le réel sens de l'humilité, merci pour ce bel exemple.

Je refais un crochet par le Collège-de-France, car il me reste plusieurs personnes à remercier ... Tout d'abord, Annette un grand merci pour nos échanges qui m'ont portée par la grande rigueur scientifique qui te correspond. Merci pour ta disponibilité et pour ton sourire chaleureux. Pascal, merci pour ton aide dans mon projet, pour tous ces déjeuners propices à des discussions variées et surtout un très grand merci pour l'exemple de bienveillance que tu m'as permis d'avoir au quotidien et qui m'a beaucoup touchée. J'ai rarement rencontré quelqu'un qui émane autant de sympathie autour de lui. La Bretagne a de la chance ! ☺ Danielle, merci pour ton côté si spontané et si franc. Merci pour tes histoires décalées et ce qu'on a pu partager à la cantine. Merci pour ton grain de folie qui fait du bien. Claire, merci pour nos échanges sur tout type de sujet. Merci de ton écoute et de ton soutien. Merci pour la confiance que nous avons tout de suite partagée et pour ton rire si génial ! I would like to also thank my chinese colleagues: Chenju, Xinhe and more recently Tao. Many thanks for your kindness and your smiling faces. So nice to meet you.

Evidemment je n'oublie pas les "Rouach"... étant donné la place qu'ils prennent à l'étage ça ne risque pas ! ☺☺☺ Un grand merci aux garçons : Glenn, Julien, Grégory, Jonathan pour votre entrain, vos blagues et votre joie de vivre. Dédicaces spéciales à mon collègue de galère, Grégory, et à Jonathan pour les discussions qu'on a pu avoir. Un grand merci aux

jeunes recrues, la team des «A» : Flora, Vanessa, Anna. Merci pour votre fraîcheur, vos délires que j'adore et votre spontanéité. Anna un grand merci pour ton affection débordante envers chacun, qui fait chaud au cœur. Martine merci pour ton côté si souriant et blagueur. Je retiens en premier lieu ce bronzage que tu gardes à l'année ! ;) Armelle, je retiendrai ton côté ouvert et spontané. Enfin, Anne-Cécile tu n'en pouvais plus d'attendre ... je remercie le bureau de l'univers ! Merci à Anne-Cécile et Elena pour votre bonne humeur, votre accueil et ... il fallait que j'en parle ... le coaching pour Adobe Illustrator ! Elena, j'attends toujours ton secret pour savoir comment tu réussis aussi bien tes gâteaux ! Anne-Cécile une mention spéciale pour ta joie de vivre au quotidien. Et un grand merci aussi à Edmond, fidèle voisin, aux multiples sujets de conversation et également toujours de bonne humeur. Merci pour les boules Quies qui ont sauvé mes nuits !! Francesca, merci pour ce qu'on a pu partager, toutes les deux dans le même bateau ;) Merci pour nos échanges et pour ta tête pas réveillée du matin, je ne m'en lasse pas ☺

Je dois maintenant retourner à la Pitié. Car j'ai là aussi du monde à remercier. Tout d'abord, un grand merci à Sylvie, merci pour toute ton aide durant ces deux années. Ta bonne humeur constante et tes anecdotes ont beaucoup contribué à l'ambiance détendue du bureau. Laurence, merci pour ton côté si chaleureux et accessible. Merci pour l'exemple de l'équilibre que tu as su conserver, même dans ce milieu dur qu'est la recherche. Un grand merci à Vincent, Cédric, Emilien pour vos blagues incessantes, pour tout ce qu'on a partagé et pour l'amitié qui s'est tissée au fil des mois et qui reste encore aujourd'hui. Vincent j'aurais une question : Pourquoi il est beau le lavabo ? Emilien, tu penseras à supprimer la photo ? Cédric ta façon d'hurler mon surnom dans le bureau résonne encore dans mes oreilles ! Je n'oublie pas Fabien, merci surtout pour les soirées, tu nous as bien fait rire et ton accent qui nous fait voyager. Saïd un très grand merci, fidèle voisin pendant 2 ans. Merci pour toutes nos discussions, pour tes conseils toujours justes et tes si belles valeurs de cœur. Merci pour ton humour et pour cette amitié conservée outre-Atlantique. Anne, qui me suit aussi depuis tout ce temps, un énorme merci pour tout ce qu'on partage. Merci pour ton côté si apaisant et ta grande écoute. Merci pour nos sorties qui m'ont permis de me détendre et de faire la folle le temps d'une soirée. Merci pour cette si belle amitié qui s'est créée.

Il me reste à faire un dernier tour par Theranexus. Adeline, merci pour ce duo qu'on a pu former pendant ce stage de fin d'études. Ces 8 mois ont été source de beaucoup

d'échanges et de soutien. Merci également pour ce qu'on a pu partager par la suite, notamment à la Pitié. Christèle, ma 3^{ème} grande sœur ☺ Merci pour ton regard avisé, ton écoute et ta bienveillance. Merci pour nos discussions sur tout sujet. Merci pour la confiance partagée. Enfin, merci à Julien. Merci pour le souffle nouveau apporté au sein de Theranexus.

Mes derniers mots vont à ma famille et à mes amis. Family Power ... Un grand merci de m'avoir toujours épaulée. Merci de toujours vous associer autant à mes difficultés qu'à mes joies. Merci pour ce partage. Une dédicace spéciale à ma Twin, fidèle alliée de tous les instants et à qui je dois beaucoup. A mes amis, un énorme merci pour tous ces moments de détente et pour votre soutien. Quand vous aurez compris que je ne fais pas que tuer des rats/souris, peut-être que vous lirez ce manuscrit ... allez soyons fous ! Last but not least ... merci à Thibault. Arrivé à la fin de cette aventure, merci pour ton écoute et ta compréhension face à mon air parfois soucieux et préoccupé. Merci pour ta bienveillance et ton côté si rassurant, qui me donnent confiance. J'espère que le dessin explicatif est encadré, ça c'est du schéma tout de même ! ;) Enfin, il me reste à remercier vivement le Body Combat, si précieux à mes yeux et sans qui je n'aurais pas pu survivre !! ☺

Liste des publications

Jeanson T, Pondaven A, Ezan P, Mouthon F, Charvériat M, Giaume C. *Antidepressants Impact Connexin 43 Channel Functions in Astrocytes*. Front Cell Neurosci. 2016 Jan 7;9:495.

Jeanson T, Duchêne A, Richard D, Bourgoïn S, Picoli C, Ezan P, Mouthon F, Giaume C, Hamon M, Charvériat M *Potentiation of amitriptyline anti-hyperalgesic action by astroglial connexin 43 inhibition in neuropathic rats*. (en révision)

Duchêne A, Perier M, Zhao Y, Liu X, Thomasson J, Chauveau F, Piérard C, Lagarde D, Picoli C, **Jeanson T**, Mouthon F, Dauvilliers Y, Giaume C, Lin JS, Charvériat M. *Impact of Astroglial Connexins on Modafinil Pharmacological Properties*. Sleep. 2016 Jun 1;39(6):1283-92.

Liu X, Gangoso E, Yi C, **Jeanson T**, Kandelman S, Mantz J, Giaume C. *General anesthetics have differential inhibitory effects on gap junction channels and hemichannels in astrocytes and neurons*. Glia. 2016 Apr;64(4):524-36.

M'Dahoma S, Barthélemy S, Tromilin C, **Jeanson T**, Viguier F, Michot B, Pezet S, Hamon M, Bourgoïn S. *Respective pharmacological features of neuropathic-like pain evoked by intrathecal BDNF versus sciatic nerve ligation in rats*. Eur Neuropsychopharmacol. 2015 Nov;25(11):2118-30.

Picoli C, Nouvel V, Aubry F, Reboul M, Duchêne A, **Jeanson T**, Thomasson J, Mouthon F, Charvériat M. *Human connexin channel specificity of classical and new gap junction inhibitors*. J Biomol Screen. 2012 Dec;17(10):1339-47.

A noter que le travail de thèse présenté ici, ne porte que sur les deux articles en premier auteur.

Table des matières

LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	11
ABREVIATION.....	12
INTRODUCTION GENERALE	13
INTRODUCTION.....	15
<i>PREMIERE PARTIE : LES DOULEURS NEUROPATHIQUES.....</i>	<i>17</i>
I. HISTORIQUE ET DEFINITION DE LA DOULEUR.....	17
II. EPIDEMIOLOGIE ET ETIOLOGIE DES DOULEURS NEUROPATHIQUES	24
III. PHYSIOPATHOLOGIE DES DOULEURS NEUROPATHIQUES.....	26
IV. DIAGNOSTIC CHEZ L'HOMME ET OFFRE THERAPEUTIQUE ACTUELLE	45
V. MODELES ET TESTS PRECLINIQUES DE DOULEURS NEUROPATHIQUES	52
<i>SECONDE PARTIE : LES ANTIDEPRESSEURS.....</i>	<i>59</i>
I. HISTORIQUE.....	59
II. CLASSIFICATION DES ANTIDEPRESSEURS.....	61
III. LE MARCHE DES ANTIDEPRESSEURS	64
IV. LIMITES DE L'UTILISATION DES ANTIDEPRESSEURS DANS LE TRAITEMENT DES DOULEURS NEUROPATHIQUES	68
<i>TROISIEME PARTIE : LES ASTROCYTES.....</i>	<i>71</i>
I. LES ASTROCYTES, CELLULES MAJORITAIRES DE LA GLIE	71
II. ASTROCYTES ET DOULEURS NEUROPATHIQUES	83
III. ASTROCYTES ET ANTIDEPRESSEURS	87
<i>QUATRIEME PARTIE : LA CONNEXINE 43 ASTROCYTAIRE</i>	<i>92</i>
I. INTRODUCTION SUR LES CONNEXINES.....	92
II. LES CONNEXINES ASTROCYTAIRES	97
III. CONNEXINE 43 ASTROCYTAIRE ET DOULEURS NEUROPATHIQUES.....	104
IV. CONNEXINE 43 ASTROCYTAIRE ET ANTIDEPRESSEURS.....	109
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS.....	113
RESULTATS.....	115
PREMIERE ETUDE : LES ANTIDEPRESSEURS MODULENT LES FONCTIONS DE LA CX43 ASTROCYTAIRE.....	117
SECONDE ETUDE : L'EFFET ANTI-HYPERALGESIQUE DE L'AMITRIPTYLINE EST POTENTIALISE PAR L'INHIBITION DE LA CONNEXINE 43 ASTROCYTAIRE.	132

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	169
<i>DISCUSSION GENERALE</i>	171
I. IMPLICATION DE LA CX43 ASTROCYTAIRE DANS LE MECANISME D’ACTION DES ANTIDEPRESSEURS	171
II. VALIDATION DE LA CX43 ASTROCYTAIRE COMME CIBLE THERAPEUTIQUE PERMETTANT D’AMELIORER L’EFFET ANTINOCICEPTIF DES ANTIDEPRESSEURS.....	177
III. COMBINAISON D’UN ACTEUR NEURONAL AVEC UN ACTEUR GLIAL, UNE APPROCHE THERAPEUTIQUE INNOVANTE.....	178
<i>PERSPECTIVES</i>	180
I. ETUDES <i>IN VITRO</i> ET <i>EX VIVO</i>	180
II. ETUDES <i>IN VIVO</i>	181
BIBLIOGRAPHIE.....	185

Liste des figures

Figure 1 : Alfred Velpeau.....	18
Figure 2 : René Descartes	19
Figure 3 : Facteurs impliqués dans la transition d'une douleur aiguë en douleur chronique.....	22
Figure 4 : Les nocicepteurs, initiateurs de l'information nociceptive.....	26
Figure 5 : Les neurones de premier ordre ont leurs corps cellulaires localisés dans les ganglions de racines dorsales.	28
Figure 6 : Organisation schématique d'un neurone sensoriel primaire (Bernard and Villanueva, 2009)..	30
Figure 7 : Les neurones de second ordre, relais de l'information nociceptive au niveau spinal.....	30
Figure 8 : Distribution en couches (selon Rexed) des neurones spinaux contactés par les fibres afférentes nociceptives A δ et C et les fibres non nociceptives A β dans la corne dorsale de la moelle épinière.....	31
Figure 9 : La neurotransmission du message nociceptif de la périphérie jusqu'au relais spinal.....	34
Figure 10 : Les neurones de troisième ordre, relais de l'information nociceptive au niveau supraspinal.....	35
Figure 11 : Les projections nociceptives supraspinales issues de la couche I.....	36
Figure 12 : Les projections nociceptives supraspinales issues de la couche V.	37
Figure 13 : Mécanismes impliqués dans la physiopathologie des douleurs neuropathiques.....	43
Figure 14 : Différentes sensations observées chez le patient atteint de douleurs neuropathiques.....	44
Figure 15 : Questionnaire DN4 utilisé pour le diagnostic des douleurs neuropathiques.....	46
Figure 16 : Sites d'actions des médicaments utilisés en première ou seconde intention pour le traitement des douleurs neuropathiques.....	49
Figure 17 : Protocole-type de traitement des douleurs neuropathiques.	50
Figure 18 : Lésions nerveuses pratiquées dans les modèles de douleurs neuropathiques.....	54
Figure 19 : Test de Randall et Selitto	56
Figure 20 : Structure chimique commune aux antidépresseurs tricycliques	60
Figure 21: Mécanisme d'action des antidépresseurs TCA, ISRS, IRSNA et IMAO, conduisant à une augmentation des monoamines dans la fente synaptique.	63
Figure 22 : Evolution des ventes (en nombre de boîtes vendues) en France, entre 2008 et 2013, des quatre classes d'antidépresseurs	65

Figure 23 : Deux morphologies d'astrocytes.....	73
Figure 24 : Les différents types de récepteurs astrocytaires.....	75
Figure 25 : Transformation du glucose sanguin en lactate au sein des astrocytes	77
Figure 26 : Synapse tripartite.....	80
Figure 27 : Schématisation de la réactivité astrocytaire.....	82
Figure 28 : Implication des astrocytes réactifs dans le mécanisme des douleurs neuropathiques.	86
Figure 29 : Structure moléculaire d'une connexine	92
Figure 30 : Cycle de vie des connexines.	95
Figure 31 : Densités relatives des Cx30 et Cx43 obtenues par immunomarquage dans différentes régions cérébrales chez le rat	98
Figure 32 : Boucle d'activation entre les hémicanaux Cx43 et les récepteurs purinergiques astrocytaires.....	100
Figure 33 : Boucle d'activation des Hc Cx43 par l'ATP et les interleukines dans la condition pathologique des douleurs neuropathiques.....	108
Figure 34 : Etude de l'effet des antidépresseurs sur l'activation microgliale et les interleukines proinflammatoires.....	131
Figure 35 : Etude du couplage dans un modèle de culture d'astrocytes corticaux chez la souris.	165
Figure 36 : Hypothèses de l'action des antidépresseurs.....	176

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différences entre les douleurs aiguë et chronique.....	22
Tableau 2 : Les différentes étiologies des douleurs neuropathiques	25
Tableau 3 : Caractéristiques des deux types de fibres nociceptives.....	29
Tableau 4 : Modèles précliniques de douleurs neuropathiques majoritairement utilisés.....	55
Tableau 5 : Tests thermiques et mécaniques de douleurs neuropathiques	57
Tableau 6 : Profil d'actions de la molécule mère et des métabolites actifs des principaux antidépresseurs tricycliques.....	62
Tableau 7 : Les trois types cellulaires de la glie au niveau du système nerveux périphérique et central	72
Tableau 8 : Principales différences entre les deux types d'astrocytes.....	74
Tableau 9 : Effet des antidépresseurs sur l'expression de GFAP <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	88
Tableau 10 : Action des antidépresseurs sur les facteurs neurotrophiques astrocytaires.....	89
Tableau 11 : Action des antidépresseurs sur des cibles astrocytaires variées	90
Tableau 12 : Distribution cellulaire des connexines au sein du système nerveux central.....	93
Tableau 13 : Modèles rapportant une surexpression de la Cx43 dans la pathologie des	105
Tableau 14 : Etude de l'inhibition de la Cx43 dans des modèles de douleurs neuropathiques.....	106
Tableau 15 : Antidépresseurs ayant démontré une augmentation de l'expression de la Cx43 dans des modèles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	109

Abréviations

5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AMPA	Acide- α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
Cx	Connexine
GABA	Acide gamma amino butyrique
GJ	Jonction Gap
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
HC	Hémicanal
IL	Interleukines
ISRNA	Inhibiteur Spécifique de la Recapture de Sérotonine et de Noradrénaline
ISRS	Inhibiteur Spécifique de la Recapture de Sérotonine
KO	Knock-Out
LPS	Lipopolysaccharide
MAO	Monoamine Oxydase
MAO-A	Monoamine Oxydase de type A
MAO-B	Monoamine Oxydase de type B
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO	Monoxyde d'azote
NOR	Noradrénaline
Px	Pannexine
TCA	Antidépresseur tricyclique
TNF- α	Facteur de Nécrose Tumorale α
TrkB	Tropomyosin-related Kinase B
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

PRESENTATION GENERALE DE LA THESE

Les douleurs neuropathiques résultent de la lésion ou compression de nerfs et sont caractérisées par une forte prévalence. Leur traitement est assuré en première intention par les antidépresseurs. Toutefois, ces derniers ne reversent que partiellement la douleur et présentent une efficacité variable d'un individu à l'autre. De plus, leurs effets indésirables affectent la qualité de vie des patients, pouvant les conduire à arrêter la thérapie. Ainsi, il y a aujourd'hui un réel besoin d'améliorer ces molécules thérapeutiques.

Récemment, la connexine 43 (Cx43) astrocytaire a été impliquée dans l'induction et le maintien des douleurs neuropathiques. Cette protéine code pour deux fonctions : celle de jonction gap et d'hémicanal. Plusieurs modèles précliniques ont décrit une augmentation de l'expression et de l'activité de cette protéine dans des modèles précliniques de douleurs neuropathiques. En outre, l'inhibition de cette protéine a permis de limiter l'apparition de symptômes spécifiques des douleurs neuropathiques, dans ces mêmes modèles. Par ailleurs, un lien a récemment été décrit entre les antidépresseurs et la Cx43. Ils semblent agir à la fois sur l'expression et sur la fonction de la Cx43, telles que le présentent des données *in vitro* et *in vivo*.

L'ensemble de ces études a donc justifié l'intérêt de s'intéresser à la Cx43, et donc de fait à une composante gliale, pour préciser le mode d'action des antidépresseurs dans une perspective thérapeutique des douleurs neuropathiques. Ceci correspond au projet de cette thèse CIFRE, impliquant une collaboration entre Theranexus et le Collège de France.

Theranexus, société en biotechnologie fondée en 2013, propose une approche thérapeutique innovante, reposant sur des combinaisons entre psychotropes et modulateurs de connexines. Cette technologie est ici plus spécifiquement étudiée dans le contexte des douleurs neuropathiques par l'association entre un antidépresseur (l'amitriptyline) et un inhibiteur de la Cx43 (la méfloquine). Au sein du Collège de France, le projet de thèse a été encadré par Christian Giaume dont les travaux portent sur les connexines astrocytaires et notamment la Cx43.

Afin de répondre à la problématique de cette thèse, des études *in vitro* ont été réalisées au Collège de France, ainsi que des études *in vivo* à la Pitié Salpêtrière dans l'équipe de Michel Hamon, travaillant sur la thématique des douleurs neuropathiques. Ces travaux ont permis de renforcer les données de la littérature, en précisant le lien entre les antidépresseurs et la Cx43, notamment en démontrant leur effet inhibiteur sur la fonction d'hémicanal jamais étudiée jusqu'à présent. De plus, la combinaison entre l'amitriptyline et la méfloquine a permis de potentialiser l'efficacité de l'antidépresseur dans un test préclinique reconnu de douleurs neuropathiques, validant la Cx43 astrocytaire comme cible thérapeutique. Ces travaux ont fait l'objet de deux publications (une acceptée, une soumise) et d'un dépôt d'une demande internationale de brevet. Des essais cliniques pourraient être envisagés au sein de Theranexus sur des patients atteints de douleurs neuropathiques, afin de poursuivre l'étude de la combinaison amitriptyline + méfloquine.

INTRODUCTION

Première partie : les douleurs neuropathiques

I. Historique et définition de la douleur

La définition de la douleur, sa perception par la société ainsi que sa compréhension au niveau médical et scientifique ont fortement évolué au cours des siècles. Les recherches scientifiques ont connu de réelles avancées dans ce domaine, notamment grâce au développement des techniques d'électrophysiologie et d'imagerie cérébrale, mais ce progrès s'est avéré lent et complexe (Perl, 2007). De plus, alors que le traitement de la douleur est de nos jours admis comme une priorité actuelle par la société, autrefois réduire la douleur semblait être une aberration et était fortement controversé.

I.1. Evolution de la perception de la douleur par la société

Pendant longtemps, la perception de la douleur par les civilisations a été **fortement marquée par les croyances religieuses**. Au sein des sociétés primitives, la douleur représente le signe d'un démon ou d'un mauvais esprit. Au moyen-âge, médecine et religion entrent en concurrence, l'église catholique va jusqu'à interdire toute recherche scientifique. La douleur a alors deux significations bien distinctes : c'est une punition, un châtiment de Dieu ou au contraire le signe d'une élection particulière pouvant apporter une récompense après la mort. Il y a ainsi une valorisation de la douleur, perçue comme **don divin**. Cette douleur est donc à respecter et à accepter (Claverie, 1992) (Rey, 2011).

A ces époques, deux types de douleurs sont fréquemment rencontrés au niveau médical : la douleur obstétricale chez les femmes et la douleur de guerre chez les hommes. Lors des accouchements, la douleur ressentie par la mère est qualifiée de positive puisque synonyme de naissance, d'apparition. Au contraire, chez les soldats, la douleur est négative puisque synonyme de disparition, de mort ou encore d'amputation donc de pertes de membres vitaux (Cousin, 2005). Au XVIème siècle, le chirurgien **Ambroise Paré** évoque pour la première fois le fait de réduire la douleur chez le malade : «La première intention d'un chirurgien doit être d'apaiser la douleur». Il est l'un des premiers à décrire les atteintes de nerfs (névralgies), encore méconnues (Laurent et al., 2004).

Au XVIIème siècle, la douleur est considérée comme essentielle par sa fonction d'alerte mais aussi de stimulant permettant de ranimer le patient. Cette douleur est également

estimée comme un symptôme précieux tant pour le diagnostic que pour le suivi de la maladie. Les poètes de cette époque insistent sur la notion «vitale» de la douleur, comme Alfred de Musset qui s'exprime ainsi : « L'homme est un apprenti, la douleur est son maître, et nul ne se connaît tant qu'il n'a pas souffert » (Nisard and Chotard, 1995).

C'est le médecin et chirurgien **Alfred Velpeau** (1795-1867 ; Figure 1) qui devient le

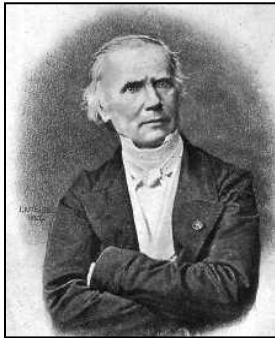


Figure 1 : Alfred Velpeau

www.general-anaesthesia.com/people/velpeau.html

premier défenseur de l'anesthésie chirurgicale. Il doit cependant faire face à ses contemporains qui perçoivent la douleur comme utile et inévitable. On peut ainsi prendre pour exemple la séance de l'Académie des sciences de 1847 au cours de laquelle le physiologiste François Magendie ne comprend pas l'intérêt de soulager la douleur : «Qu'un malade souffre plus ou moins, est-ce là une chose qui offre de l'intérêt pour l'Académie des sciences ?» (Clarac and Ternaux, 2008). Toutefois, **le soulagement de la douleur s'impose peu à peu** en dépit de débats houleux au sein des académies. Ainsi, les premières méthodes d'anesthésie avec le

chloroforme et l'éther se mettent en place (Perl, 2007).

Par la suite, la prise en charge de la douleur est pleinement acceptée par la société. Loin de l'idée des premiers siècles, basée sur le respect de la douleur, celle-ci est alors jugée comme essentielle à combattre et soulager. En 1993, une réflexion est initiée par le ministère de la santé sur la lutte de la douleur comme une **priorité de santé publique**. Deux programmes nationaux se mettent en place en 1994 et 1998 pour la prise en charge de la douleur chronique. En 2002, le soulagement de la douleur est reconnu comme **droit fondamental** à toute personne.

Ainsi, alors qu'autrefois la dignité de la personne était associée au fait qu'elle supporte la douleur, c'est finalement l'inverse qui voit le jour au XXème siècle avec comme objectif premier de santé publique : combattre la douleur, selon les termes de la loi de 2004. Dans ce contexte, le pharmacien et neurobiologiste **Jean-Marie Besson** (1938-2014) a joué un rôle déterminant pour le développement des recherches sur la douleur en France ; il a notamment créé et validé de nombreux modèles expérimentaux de grand intérêt pour la recherche préclinique et ses applications en clinique humaine (Besson, 1992).

Au même titre que la perception de la douleur par la société, sa définition a également évolué au cours des siècles.

I.2. Vers une définition de la douleur communément admise

Il faut attendre le XVII^{ème} siècle pour qu'une définition scientifique de la douleur commence à émerger. **René Descartes** (1596-1650 ; Figure 2) évoque en effet pour la première fois la douleur comme résultant de la «tension de nerf». Cette notion est ensuite reprise par Herman Boerhaave (1668-1738) puis par son élève Gerhard van Swieten (1700-1772) qui déclare que la douleur entraîne «un certain changement mécanique aux houpes nerveuses [...]. Le nerf est dans une telle situation qu'il est prêt à se rompre [...], à l'occasion de ce changement naît l'idée de douleur» (Descartes and Bridoux, 1999).



Figure 2 : René Descartes
(Rodis-Lewis and Oliveira, 1996)

Suite à ces premières réflexions scientifiques, on trouve dans le Larousse Médical, en 1929, la définition suivante de la douleur : «une sensation pénible due à une excitation violente et destructrice des terminaisons nerveuses sensitives ou centripètes» (Claverie, 1992). Cependant, en dépit de la tentative de certains scientifiques d'apporter une définition plus précise, la douleur s'est longtemps avérée peu ou mal comprise et n'a été définie que partiellement jusqu'à ces dernières années (Cousin, 2005).

En plus des processus physiologiques communs à chaque individu, la douleur inclut une **composante émotionnelle** personnelle. Cette dernière n'a été introduite que tardivement, en 1979, avec la définition de l'Association Internationale d'Etude de la Douleur (IASP) qui décrit la douleur comme «une sensation et une expérience émotionnelle désagréables en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle, ou décrites en ces termes». Cette définition est celle actuellement retenue par le corps scientifique (Laurent et al., 2004).

Si la prise en compte des émotions était absente au cours des premiers siècles, il est aujourd'hui prouvé et communément admis qu'elles peuvent moduler la douleur.

I.3. La composante émotionnelle de la douleur

I.3.1. Douleur et émotions

La composante émotionnelle de la douleur est un élément essentiel à prendre en compte dans sa prise en charge. L'état psychique de la personne a en effet une influence directe sur l'intensité de la douleur ressentie. **Le stress** notamment accentue la douleur (Demyttenaere et al., 2006). Un exemple du quotidien est celui de la vaccination chez

l'enfant. Plus l'enfant anticipera la piqûre et se focalisera sur la peur de l'aiguille, plus il aura une douleur prononcée. Alors que pour une même piqûre, un enfant détendu ou distrait par autre chose ne ressentira qu'une très légère pression sur son bras. Cet exemple illustre le concept «d'anxiété liée à la douleur» qui est fréquemment rencontré. L'anxiété, sous différentes formes, est une comorbidité importante à la douleur et aurait une prévalence de 50% chez les patients douloureux vivant à domicile (Kroenke et al., 2013).

Par ailleurs, **la comorbidité avec la dépression** est aussi à considérer. En effet, il a été observé dans les études cliniques que 20 à 50% des patients souffrant de douleurs chroniques présentent une comorbidité dépressive. Réciproquement, 75% des patients dépressifs souffrent de douleurs incluant notamment des douleurs de type neuropathique (Bouhassira et al., 2008). Cette comorbidité souligne l'importance des facteurs émotionnels dans la douleur (Bair et al., 2008).

Ainsi, il faut distinguer deux termes : la douleur, qui inclut la composante émotionnelle et la nociception, correspondant essentiellement à la composante sensori-motrice.

I.3.2. Nociception et douleur

Le terme de **nociception** recouvre "une sensibilité résultant d'une altération tissulaire, projetée vers des structures centrales, avant toute intégration dans les circuits de l'émotion ou de la mémoire". Par définition, la nociception est déclenchée par un stimulus nociceptif et met en jeu un processus neuronal de transmission du message sensoriel correspondant, jusqu'aux structures centrales cibles (Kroenke et al., 2013).

Le terme de **douleur** revêt, quant à lui, un caractère unique et subjectif dépendant du vécu de la personne, de sa situation ou encore de son état émotionnel (Kroenke et al., 2013). Pour Paul Pionchon, de la Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur (SFETD) : "Il s'agit d'une expérience personnelle qui engage la totalité du sujet et de son système d'intégration dans lequel préexistent expériences, éducation, culture, états attentionnels et émotionnels, circonstances d'apparition". Ceci explique notamment la complexité de la douleur et de son diagnostic (Laurent et al., 2004).

La douleur est ainsi l'intégration de la nociception, d'un point de vue émotionnel et personnel.

La perception de la douleur par la société a fortement évolué au cours des siècles. Son soulagement est aujourd'hui accepté et défini comme un droit fondamental par le ministère de la santé. La composante émotionnelle de la douleur, élément clef à prendre en compte dans sa définition, la rend unique, subjective et d'autant plus complexe à diagnostiquer.

Alors qu'on parlait autrefois de «la» douleur, aujourd'hui différents types de douleurs sont définis, incluant notamment les douleurs neuropathiques.

I.4. Douleur aiguë et douleur chronique

Deux grands types de douleur peuvent être définis selon leur profil évolutif : la douleur aiguë et la douleur chronique.

I.4.1. Des différences majeures

La douleur aiguë est liée à une atteinte brutale d'un tissu (traumatisme ou lésion inflammatoire). Elle se caractérise par une courte durée, inférieure à trois mois, et est le plus souvent unifactorielle c'est-à-dire qu'elle résulte d'une seule cause, identifiée ou non. De plus, une douleur aiguë peut être considérée comme «utile», puisqu'elle alerte l'organisme d'une situation potentiellement dangereuse pour son intégrité, ce qui déclenche une réponse adaptée pour y mettre fin (Merskey and Bogduk N., 1994).

Par ailleurs, **la prise en charge rapide et efficace d'une douleur aiguë est essentielle.** En effet, si la douleur n'est pas rapidement traitée, différents facteurs notamment psychologiques pourront entrer en jeu et la complexifier comme l'illustre la figure de la page suivante (Figure 3). La douleur aiguë devient alors chronique.

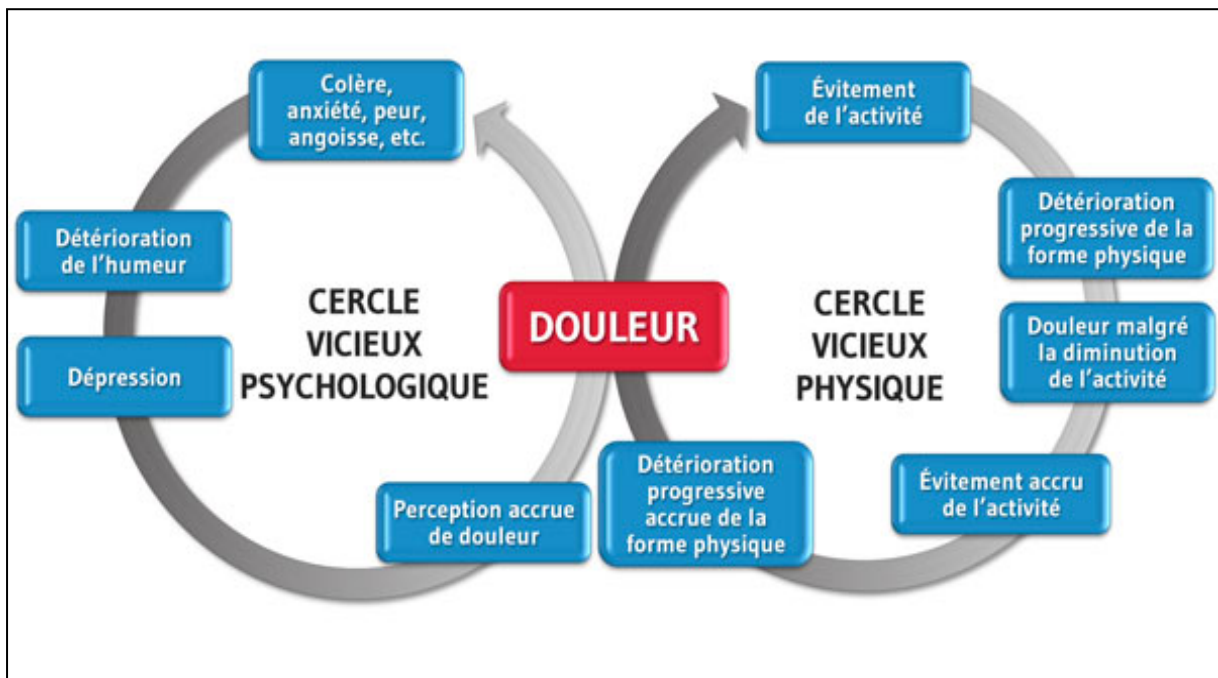


Figure 3 : Facteurs impliqués dans la transition d'une douleur aiguë en douleur chronique. Plusieurs facteurs sont à l'origine du renforcement de la douleur tant en intensité qu'en durée. Ils sont à la fois physiques, comme une perte d'activité régulière, et psychologiques telles l'anxiété, la peur, ou l'angoisse qui entraînent des troubles de l'humeur voire même une dépression à l'origine d'une perception plus forte de la douleur. <http://www.backrelief.ca/fr/understanding-back-pain/types-back-pain/chronic/chronic-pain-cycle>

La douleur chronique est, quant à elle, une douleur évolutive, de longue durée, persistante ou récurrente. On parle ici de maladie et non pas de « signal d'alarme », terme utilisé pour qualifier la douleur aiguë. Cette douleur n'est pas utile mais destructrice pour l'organisme (Merskey, 1986). Le Tableau 1 résume les différences entre la douleur aiguë et la douleur chronique.

DOULEUR AIGUE	DOULEUR CHRONIQUE
Durée inférieure à trois mois	Durée supérieure à trois mois
«Utile», protectrice	Inutile, destructrice
Signal d'alarme	Maladie
Monofactorielle	Multifactorielle
Auto réparation	Auto entretien

Tableau 1 : Différences entre les douleurs aiguë et chronique. En plus de leur durée qui diffère, la douleur aiguë et la douleur chronique ne jouent pas le même rôle pour l'organisme. Alors que la première est un signal d'alarme, la seconde est une pathologie impliquant différents facteurs dans la vie de l'individu.

I.4.2. Les différents types de douleur chronique

Plusieurs types de douleur chronique sont distingués aujourd'hui, en fonction des mécanismes physiopathologiques qui les sous-tendent (Besson and Chaouch, 1987).

- **La douleur par excès de nociception ou douleur inflammatoire**

Cette douleur fait suite à une stimulation persistante et excessive des nocicepteurs, ces derniers étant les récepteurs périphériques de la douleur. Ce type de douleur est le plus fréquemment rencontré, notamment lors de la progression d'un cancer. Cette douleur est localisée et généralement traitée par des antalgiques (Merskey, 1986).

- **La douleur dysfonctionnelle ou douleur psychogène**

Cette douleur résulte d'un dysfonctionnement des systèmes de contrôle de la douleur mais sans la présence de lésion. La fibromyalgie et la cystite interstitielle relèvent de ce type de douleur, qui fait toujours intervenir une composante psychologique. La prise en charge d'une telle douleur peut donc nécessiter un suivi psychiatrique ou psychologique (Stoudemire and Sandhu, 1987).

- **La douleur neuropathique ou douleur neurogène**

Le IASP définit cette douleur comme «la conséquence d'une lésion ou d'une maladie du système somatosensoriel» (Merskey, 2007). Elle apparaît lorsque le système nerveux est endommagé, à la suite d'une lésion ou de la compression de nerfs. Son traitement reste un challenge (comme cela est présenté ci-dessous), en rapport avec la complexité des processus étiopathologiques qui la sous-tendent.

Deux grands types de douleurs sont référencés : la douleur aiguë et la douleur chronique. Ces douleurs diffèrent entre autres par leur temporalité, les facteurs mis en jeu ainsi que par leur rôle pour l'organisme. Plusieurs douleurs chroniques sont définies et diffèrent selon le mécanisme associé : inflammatoire, psychogène, neuropathique.

Les douleurs neuropathiques, pathologie ayant un fort besoin thérapeutique auquel on souhaite répondre dans cette thèse, se caractérisent par une prévalence élevée.

II. Epidémiologie et étiologie des douleurs neuropathiques

II.1. Une épidémiologie liée à l'étiologie

Les études épidémiologiques des douleurs chroniques restent complexes étant donné l'absence d'outils de diagnostic fiables, consensuels et faciles à utiliser (Roy et al., 2011). Toutefois, un certain nombre d'études sont référencées dans le cas des douleurs neuropathiques et permettent d'estimer **que 63 millions de personnes** dans le monde sont actuellement touchées par cette pathologie (NeuroPerspective, 2012). Leur prévalence serait de 10% sur les sept marchés majeurs (Etats-Unis, Japon, France, Allemagne, Italie, Espagne et Royaume-Uni) (de Moraes Vieira et al., 2012).

Les douleurs lombaires chroniques, particulièrement fréquentes, représentent à elles seules 29 millions de personnes sur les sept marchés majeurs. Cependant, leur appartenance aux douleurs neuropathiques reste controversé. Elles restent difficiles à diagnostiquer et leur étiologie est à la fois hétérogène et complexe (NeuroPerspective, 2012).

Les douleurs neuropathiques surviennent principalement à la suite de maladies. **Le diabète, le SIDA** (virus de l'immunodéficience humaine, VIH) **et le zona** (virus Herpès zoster) sont aujourd'hui les trois pathologies les plus communes à l'origine de douleurs neuropathiques. Au sein des sept marchés majeurs, 1,3 million de personnes sont concernées par des douleurs neuropathiques diabétiques, post-herpétiques ou liées au VIH. Aux Etats-Unis, fin 2011, les douleurs neuropathiques affectaient plus de la moitié (50-70%) des personnes diabétiques et 200 000 patients post herpétiques souffraient de ce type de douleur (NeuroPerspective, 2012).

En plus de celles décrites ci-dessus, les douleurs neuropathiques associées à une sclérose en plaques, une hernie discale, ou celles liées au cancer sont également à prendre en compte. En particulier, elles affectent au moins 10% des patients cancéreux (Datamonitor, 2011). Toutefois, les douleurs neuropathiques ne concernent pas que ces pathologies. Elles peuvent survenir aussi à la suite d'un accident vasculaire cérébral (AVC) et être déclenchées par une chimiothérapie anti-cancéreuse ou anti-virale (Campbell and Meyer, 2006). Les douleurs neuropathiques post-opératoires représentent quant à elles 12% des cas identifiés (Datamonitor, 2011) et à celles-ci s'ajoutent également les douleurs neuropathiques post-traumatiques (Pasero, 2004).

On distingue deux types de douleurs neuropathiques selon leur origine, périphérique ou centrale.

II.2. Douleurs neuropathiques périphériques et centrales

La lésion ou la compression de voies nerveuses peut impliquer le système nerveux périphérique ou central. On distingue ainsi les douleurs neuropathiques **périphériques** versus **centrales**. Le Tableau 2 rappelle les causes majeures des douleurs neuropathiques ainsi que le type de douleurs neuropathiques, périphériques ou centrales, qui en résulte (Attal, 2008).

Origine des douleurs neuropathiques	Type de douleurs neuropathiques
Diabète	Périphériques
Zona	
Sida (VIH)	
Hernie	
Cancer	
Traumatique	
Chimiothérapie	
Opératoire	
AVC	Centrales
Cancer	
Sclérose en plaques	
Traumatique	

Tableau 2 : Les différentes étiologies des douleurs neuropathiques conduisent à des douleurs neuropathiques périphériques ou centrales.

Les douleurs neuropathiques sont caractérisées par une prévalence élevée. Ces douleurs interviennent principalement à la suite de maladies et mettent en jeu une lésion du système nerveux périphérique ou central.

Quelle que soit leur étiologie, les douleurs neuropathiques sont caractérisées par une hyperexcitabilité de voies neuronales périphériques et/ou centrales. Comprendre leur physiopathologie est un préalable au développement de traitements innovants appropriés.

III. Physiopathologie des douleurs neuropathiques

Il est important de comprendre la **physiologie de la nociception et de la douleur** et d'autre part **sa modulation chez le sujet sain** avant d'aborder les dysrégulations qui caractérisent la douleur neuropathique.

III.1. Physiologie de la nociception/douleur, des nocicepteurs au cortex cérébral

La transmission d'une information nociceptive implique successivement plusieurs éléments clés : les nocicepteurs, les fibres A δ et C, les neurones de second ordre de la moelle épinière et les structures supraspinales dont le thalamus et le cortex cérébral.

III.1.1. Les nocicepteurs

III.1.1.1. Définition

Les récepteurs de la douleur au niveau périphérique sont appelés «nocicepteurs» (Figure 4), ils correspondent aux **terminaisons libres de neurones sensoriels primaires**. Ces nocicepteurs sont localisés au niveau des tissus cutanés, musculaires striés, musculaires lisses (viscères, vaisseaux), articulaires et osseux. Ils peuvent être mécaniques, thermiques ou polymodaux. Alors que les deux premiers sont excités par un seul type de stimulus, les nocicepteurs polymodaux peuvent répondre à trois types de stimuli : mécaniques, thermiques ou chimiques (Calvino, 2006).

Trois caractéristiques sont communes à tous les nocicepteurs. La première est le seuil d'excitation élevé pour leur activation. Les nocicepteurs prennent le relais des autres récepteurs sensoriels (tels que les mécanorécepteurs) lorsque le stimulus est répété ou de forte intensité, c'est-à-dire lorsqu'il devient potentiellement nocif. Les deux autres caractéristiques sont d'une part leur capacité à s'activer proportionnellement à l'intensité du stimulus, et d'autre part leur sensibilisation, qui se traduit par une réduction de leur seuil d'activation au fur et à mesure de la répétition du stimulus potentiellement nocif (Purves and Williams, 2001).

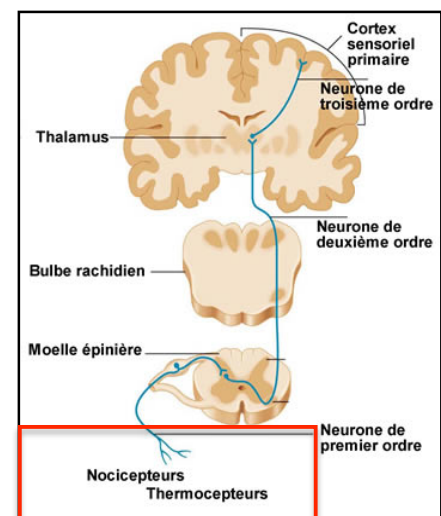


Figure 4 : Les nocicepteurs, initiateurs de l'information nociceptive.

(Purves et William, 2001)

Différentes molécules participent à l'activation et à la sensibilisation des nocicepteurs.

III.1.1.2. Activation des nocicepteurs

Les nocicepteurs possèdent des canaux ioniques transmembranaires permettant la transduction des stimuli nociceptifs en messages nerveux. Ainsi, les TRP (Transient Receptor Potential) sont des canaux sensibles à différents types de stimuli (tels que des chocs chimiques et thermiques) dont l'activation déclenche l'entrée de Na^+ et de Ca^{2+} dans le cytoplasme du nocicepteur. Les récepteurs ASIC (Acid Sensing Ion Channels) sont également présents au niveau des nocicepteurs, ils ne répondent quant à eux qu'à un seul type de stimulus : les protons extracellulaires, libérés lors de lésions cellulaires (Calvino, 2006; Caterina and Julius, 1999).

Plus précisément à la suite d'une lésion tissulaire, une réaction inflammatoire se développe localement avec la libération de différentes substances pronociceptives au sein du tissu endommagé, appelées substances algogènes. On parle de «soupe inflammatoire». Les substances algogènes participent directement à l'activation des nocicepteurs. Elles proviennent d'au moins 4 sources distinctes (Caterina and Julius, 1999; Bouhassira, 2009):

- **Les cellules lésées** elles-mêmes, qui libèrent des protons et de l'ATP, activant différents récepteurs : le récepteur-canal ASIC et le récepteur vanilloïde TRPV1 en ce qui concerne les ions H^+ et les récepteurs purinergiques P2X pour l'ATP.
- **Les cellules immunitaires** : macrophages, lymphocytes T, mastocytes. Les macrophages libèrent des cytokines proinflammatoires (IL-6, IL-1 β , TNF α) et le Nerve Growth Factor (NGF). La dégranulation des mastocytes conduit quant à elle à la libération de sérotonine, d'histamine et à l'activation de la phospholipase A2. Enfin, la bradykinine, autre composant majeur de la «soupe inflammatoire», est également libérée par les cellules immunitaires.
- **Les neurones sensoriels** libèrent des acides aminés excitateurs (glutamate, aspartate) ainsi que la substance P, le peptide lié au gène de la calcitonine (calcitonin gene-related peptide, CGRP) et la neurokinine A. Ces peptides sont responsables d'une vasodilatation et de la dégranulation des mastocytes.

- **Le plasma** est le lieu de cascades inflammatoires notamment induites par la bradykinine et entraînant la synthèse de différents médiateurs algogènes.

Suite à l'activation des nocicepteurs, les fibres dont ils sont les terminaisons périphériques conduisent l'information nociceptive sous forme de potentiels d'action, jusqu'à leurs terminaisons centrales dans la corne dorsale de la moelle épinière (Snider and McMahon, 1998) (Figure 5).

III.1.2. Activation des neurones de premier ordre

III.1.2.1. Fibres A δ et C

L'information provenant des nocicepteurs périphériques est conduite par **deux types de fibres : A δ et C**. Elles se distinguent des fibres sensorielles non-nociceptives : les fibres A β et A α , responsables respectivement du toucher et de la proprioception (perception, consciente ou non, de la position des différentes parties du corps). Les nocicepteurs mécaniques et thermiques correspondent aux fibres afférentes primaires A δ , les nocicepteurs polymodaux aux fibres C.

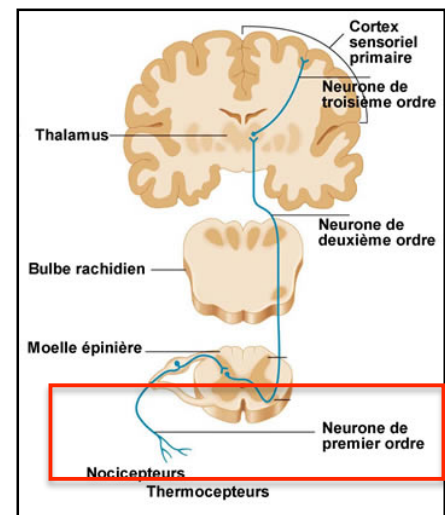


Figure 5 : Les neurones de premier ordre ont leurs corps cellulaires localisés dans les ganglions de racines dorsales.

Alors que les fibres A δ sont myélinisées, les fibres C ne le sont pas et ont un diamètre plus petit, ce qui entraîne une conduction lente du message nociceptif (Mann, 2006). **Les vitesses de conduction différentes** dans ces deux types de fibres sont à l'origine d'un décalage dans la réception d'un même message nociceptif par les structures supraspinales. Ainsi, on distingue la « douleur rapide » véhiculée par les fibres A δ , correspondant à la douleur vive et immédiate ressentie lorsqu'on se blesse, de la « douleur lente » plus diffuse et persistante transmise par les fibres C (Basbaum et al., 2009).

Par ailleurs, ces fibres A δ et C jouent aussi le rôle de thermorécepteurs, les sensations thermiques froides étant générées par des fibres A δ , les sensations chaudes par des fibres C. Selon Snider et McMahon (1998), près de 10% des fibres C ne serait pas concerné par la nociception. Le Tableau 3 résume les propriétés des deux types de fibres, A δ et C.

Type de fibre	Fibres Aδ	Fibres C
Information conduite par les fibres	Nociceptive (stimuli mécaniques et thermiques) et non-nociceptive (thermique froid)	Nociceptive (stimuli mécaniques, thermiques, chimiques) et non-nociceptive (thermique chaud)
Diamètre (µm)	2 – 5	0,5 – 1,2
Gaine de myéline	Oui	Non
Vitesse de conduction (m/s)	12 – 30	1 – 3
Type de douleur	Douleur rapide	Douleur lente

Tableau 3 : Caractéristiques des deux types de fibres nociceptives. Les fibres Aδ et C diffèrent par leur diamètre, leur myélinisation et leur vitesse de conduction. Elles peuvent véhiculer non seulement une information nociceptive mais aussi un message non nociceptif, en particulier en réponse à une stimulation thermique (Clarac and Ternaux, 2008).

III.1.2.2. Corps cellulaires

Les fibres Aδ et C conduisent l'information des nocicepteurs jusqu'au noyau spinal du trijumeau ou au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Ces deux voies impliquent chacune les neurones de premier ordre dont les corps cellulaires sont localisés respectivement dans le **ganglion trigéminal** ou dans les **ganglions des racines dorsales de la moelle épinière** (Willis and Westlund, 1997).

Ainsi, comme le présente la Figure 6 de la page suivante, quatre éléments des neurones primaires sont importants dans le transport du message nociceptif depuis la périphérie jusqu'à la moelle épinière (Clarac and Ternaux, 2008) :

- Les terminaisons nerveuses libres, localisées dans les tissus périphériques: les nocicepteurs.
- La fibre afférente qui conduit l'information depuis ces terminaisons jusqu'au niveau central.
- Le corps cellulaire, situé dans un ganglion sensoriel (racine dorsale ou trijumeau).
- La fibre efférente et ses terminaisons centrales, localisées dans la moelle épinière (corne dorsale ou noyau spinal).

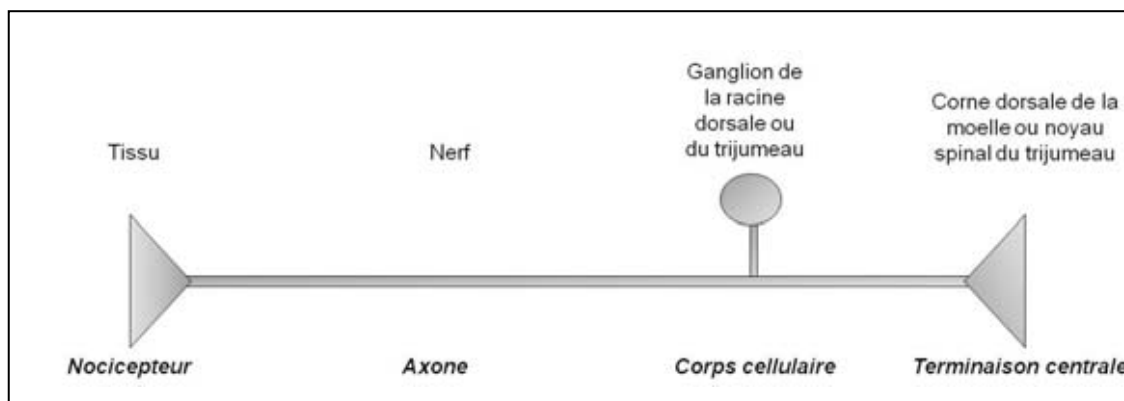


Figure 6: Organisation schématique d'un neurone sensoriel primaire (Bernard and Villanueva, 2009). Les neurones sensoriels primaires sont le premier relais de l'information nociceptive. Ils assurent son transport depuis la périphérie jusque dans la moelle épinière et ont leurs corps cellulaires localisés dans les ganglions.

L'information nociceptive étant parvenue dans la moelle épinière, ce sont ensuite les **neurones de second ordre** qui assurent son relais jusqu'aux centres supraspinaux (Figure 7).

III.1.3. Contacts synaptiques avec les neurones de second ordre dans la moelle épinière

Le relais de l'information nociceptive, entre les neurones de premier et de second ordre, a lieu au niveau de contacts synaptiques dans la corne dorsale (ou le noyau spinal du trijumeau) de la moelle épinière. Les neurones de premier ordre (c'est-à-dire les neurones sensoriels primaires) établissent des contacts avec deux types de neurones de second ordre: les neurones nociceptifs spécifiques et les neurones nociceptifs non spécifiques, encore appelés neurones convergents.

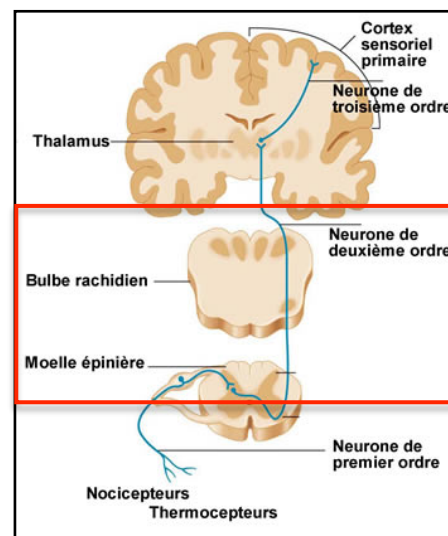


Figure 7 : Les neurones de second ordre, relais de l'information nociceptive au niveau spinal.

III.1.3.1. Les neurones de second ordre

Les neurones contactés par les fibres afférentes primaires sont répartis dans différentes couches de la corne dorsale de la moelle épinière. De fait, des critères cytoarchitectoniques ont permis de diviser la substance grise de la moelle épinière en dix couches, appelées couches de Rexed et notées de I à X.

Les fibres A δ et C de petit calibre projettent majoritairement dans les couches superficielles I et II de la corne dorsale (Figure 8). A leur niveau, les fibres afférentes primaires contactent **des neurones nociceptifs dits "spécifiques"**. Ces neurones sont exclusivement activés par des stimulations nociceptives, qu'elles soient mécaniques ou thermiques (Woolf and Mannion, 1999).

De plus, les fibres A δ et C ont également quelques projections qui se retrouvent dans la couche V, couche plus profonde de la corne dorsale. Elles y excitent des **neurones nociceptifs "non spécifiques" ou neurones convergents**. Ces neurones répondent de façon préférentielle mais non exclusive aux stimulations nociceptives (Biella et al., 1997).

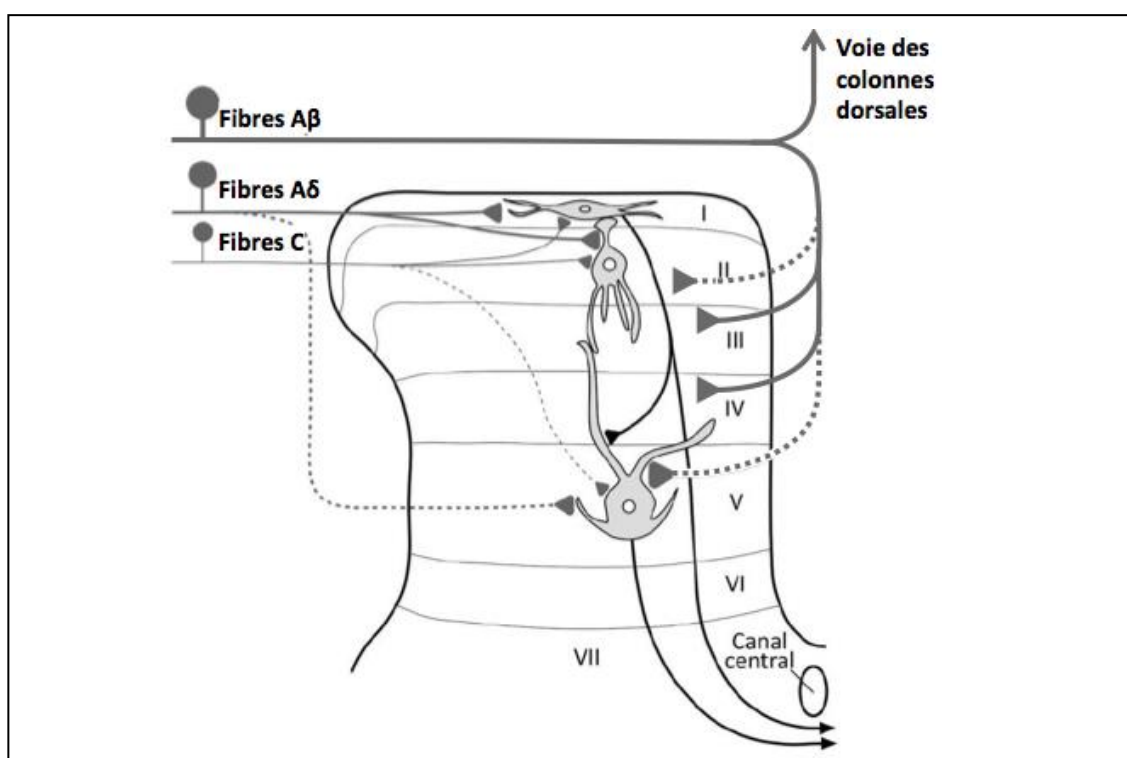


Figure 8 : Distribution en couches (selon Rexed) des neurones spinaux contactés par les fibres afférentes nociceptives A δ et C et les fibres non nociceptives A β dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les fibres nociceptives projettent dans les couches superficielles I et II ainsi que dans la couche V, les fibres A β , quant à elles, projettent majoritairement dans les couches III et IV et, pour une part plus faible, dans les couches II et V (Bernard and Villanueva, 2009).

III.1.3.2. Neuromédiateurs et neuropeptides libérés au niveau des synapses entre neurones de premier et second ordre

Différentes molécules neuroactives libérées par les fibres afférentes primaires nociceptives viennent exciter les neurones de second ordre, assurant ainsi le transfert de l'information nociceptive au niveau du relais spinal.

- **Acides aminés excitateurs**

Le glutamate, et à un degré moindre l'aspartate, sont les neurotransmetteurs principalement responsables de l'activation des neurones de second ordre (Larsson and Broman, 2011). Le glutamate peut se fixer à trois types de récepteurs-canaux cationiques: les récepteurs AMPA, kaïnate et NMDA, perméables aux ions Na^+ et Ca^{2+} . Cette fixation sur l'un ou l'autre des récepteurs dépend du niveau d'excitation postsynaptique par les fibres afférentes primaires. Une excitation modérée, «physiologique», entraîne l'activation des récepteurs AMPA. Ceci conduit à une entrée de Na^+ responsable d'une dépolarisation locale et de l'initiation d'un potentiel postsynaptique excitateur. Dans cette condition, le glutamate ne peut activer les récepteurs NMDA car ces derniers sont bloqués par les ions Mg^{2+} . Toutefois, lors d'une excitation intense et/ou répétée par les fibres afférentes primaires, la forte dépolarisation des neurones de second ordre provoque la dissociation du Mg^{2+} , rendant le canal ionique du récepteur NMDA libre d'accès pour l'influx de Ca^{2+} dans ces cellules (Kolb and Wishaw, 2002).

- **Neuropeptides**

Deux neuropeptides (au moins) libérés par les fibres afférentes primaires viennent potentialiser les effets excitateurs du glutamate sur les neurones de second ordre: le peptide lié au gène de la calcitonine (calcitonin gene-related peptide, CGRP) et la substance P. En plus de contribuer à la sensibilisation des nocicepteurs en périphérie, le CGRP renforce l'excitation postsynaptique due au glutamate dans la corne dorsale de la moelle épinière, via ses récepteurs, CGRP_1 et CGRP_2 , tous deux couplés aux protéines G activant l'adénylate cyclase (Basbaum, 1999).

Découverte en 1930 par Von Euler et Gaddum, la substance P est, quant à elle, directement impliquée dans l'activation des neurones de second ordre via sa fixation aux

récepteurs postsynaptiques NK1. En plus du glutamate, elle s'avère être un neuromédiateur clé de la douleur au niveau spinal (Pélissier and Viel, 2000).

- **Le facteur neurotrophique BDNF**

Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau ou BDNF (Brain derived neurotrophic factor) joue aussi un rôle de neurotransmetteur par l'activation de son récepteur TrkB au niveau postsynaptique. Ce dernier fait partie des récepteurs à activité tyrosine kinase (Trks) sur lesquels agissent les neurotrophines dont également le NGF libéré par les cellules immunitaires (Basbaum, 1999). Ainsi, le NGF (Nerve Growth Factor) libéré dans les tissus douloureux est transporté de façon rétrograde par les fibres afférentes primaires jusque dans les ganglions des racines dorsales où il induit l'expression du BDNF. Libéré par les projections centrales des ganglions, le BDNF participe directement à l'excitation des neurones de second ordre.

Toutes ces molécules neuroactives contribuent à **l'activation des neurones postsynaptiques**, notamment via une élévation du Ca^{2+} intracellulaire. L'augmentation de la synthèse de monoxyde d'azote (NO) et de prostaglandines (PGE) qui en résulte favorise de manière rétrograde l'excitabilité des fibres présynaptique, contribuant ainsi à la sensibilisation du relais spinal des voies nociceptives (Pélissier and Viel, 2000).

La figure 9 résume les différentes étapes de la neurotransmission du message nociceptif de la périphérie jusqu'au relais spinal.

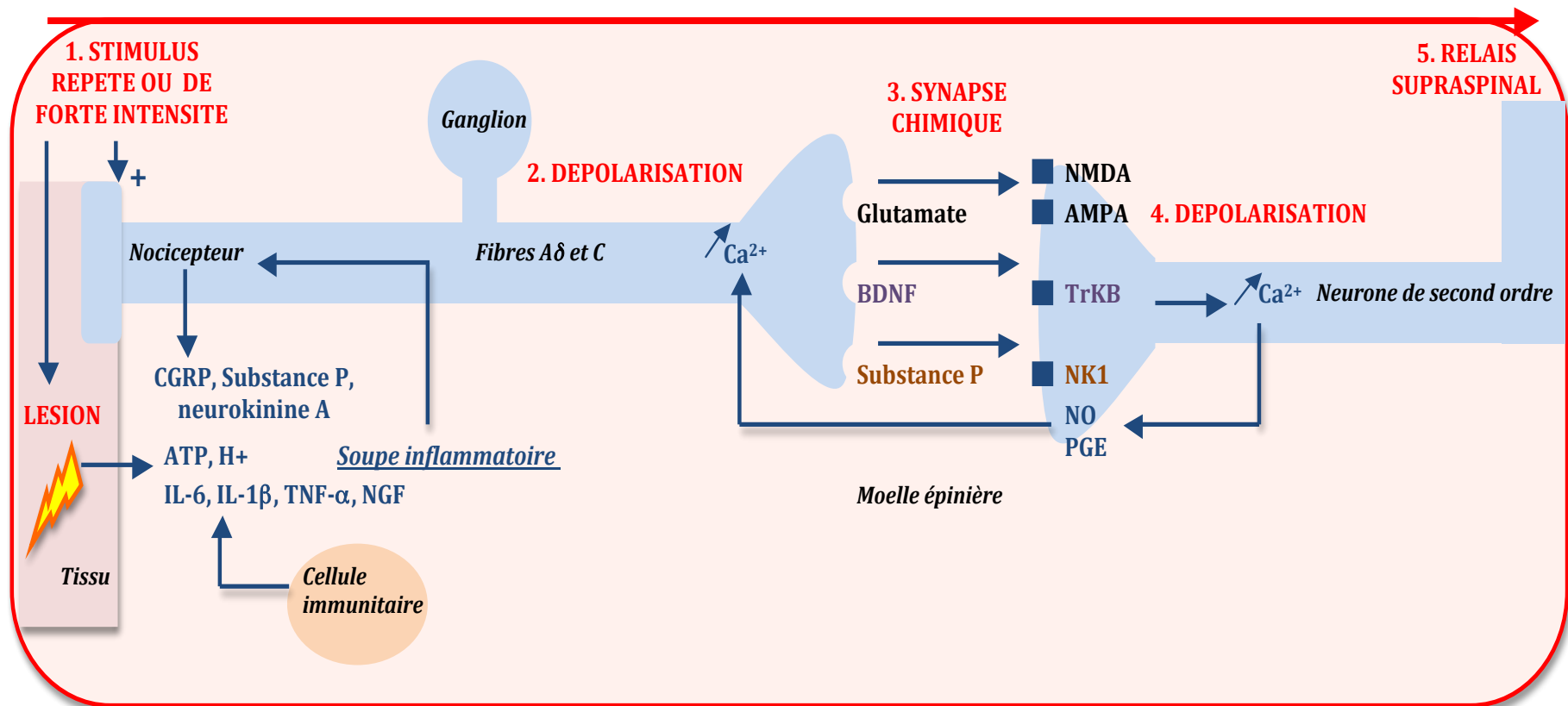


Figure 9 : La neurotransmission du message nociceptif de la périphérie jusqu'au relais spinal. Les nocicepteurs sont activés par un stimulus (thermique, mécanique, chimique) répété et/ou d'intensité plus importante qu'un stimulus sensoriel non nocif. L'inflammation, consécutive à la lésion tissulaire associée à cette stimulation prononcée, conduit à l'activation des nocicepteurs sous l'action des composants de la «soupe inflammatoire». L'activation des nocicepteurs entraîne l'excitation des fibres nociceptives Aδ et C, ce qui déclenche entre autres la libération de glutamate, BDNF et substance P dans la corne dorsale de la moelle épinière. En se fixant sur leurs récepteurs postsynaptiques, ces molécules activent les neurones de second ordre qui véhiculent *in fine* l'information nociceptive jusqu'au niveau supraspinal. (+ : activation)

Une fois activés, les neurones postsynaptiques assurent le transfert de l'information nociceptive au niveau des **structures supraspinales** (Figure 10). Différentes voies neuronales y participent.

III.1.4. Les voies spino-thalamiques

La voie ascendante de la douleur, appelée voie extra-lemnisciale, doit être distinguée de la voie lemnisciale qui concerne le toucher et la proprioception. Chacune de ces voies implique trois neurones successifs pour le transport de l'information neuronale, mais dans le cas de la voie lemnisciale le second neurone est situé dans le bulbe rachidien (alors qu'il est situé dans la moelle épinière dans le cas de la voie extra-lemnisciale).

Au sein du système extra-lemniscal, plusieurs voies sont à distinguer selon les structures supraspinales qu'elles impactent pour le transport de l'information nociceptive : le thalamus, le bulbe rachidien, le mésencéphale, l'amygdale ou encore l'hypothalamus. Il n'y a ainsi pas de « centre de la douleur » unique mais plusieurs relais. Bien que regroupées dans la partie dorsale du quadrant ventrolatéral (QVL), ces voies se distinguent aussi selon leur origine, dans la couche superficielle I ou dans la couche profonde V de la corne dorsale (Bernard and Villanueva, 2009).

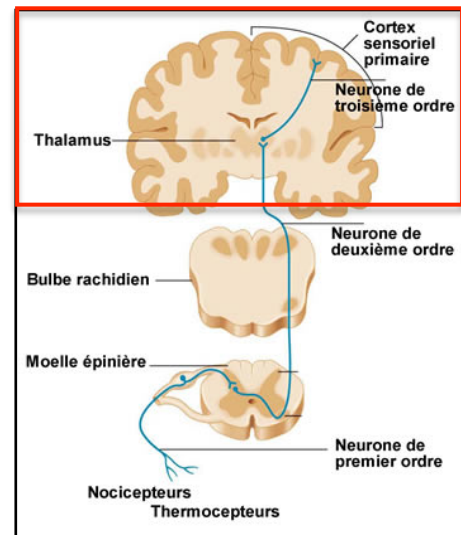


Figure 10 : Les neurones de troisième ordre, relais de l'information nociceptive au niveau supraspinal

III.1.4.1. Voies ascendantes issues de la couche I de la moelle épinière

Les axones des neurones de la couche I projettent au niveau de deux structures supraspinales (Campbell and Meyer, 2006; Mann, 2006) (Figure 11) :

- Tout d'abord le thalamus. Cette voie correspond au **faisceau néospino-thalamique**, impliquant des projections directes depuis la corne dorsale de la moelle épinière jusqu'à différents noyaux thalamiques.
- Ensuite, le mésencéphale au niveau duquel parviennent deux faisceaux ascendants. D'une part le faisceau **spino-parabrachial**, qui regroupe les projections depuis la couche I jusqu'au complexe parabrachial. D'autre part, le **faisceau spino-**

mésencéphalique qui véhicule l'information nociceptive depuis la couche I de la corne dorsale jusqu'à la substance grise périaqueducale (PAG).

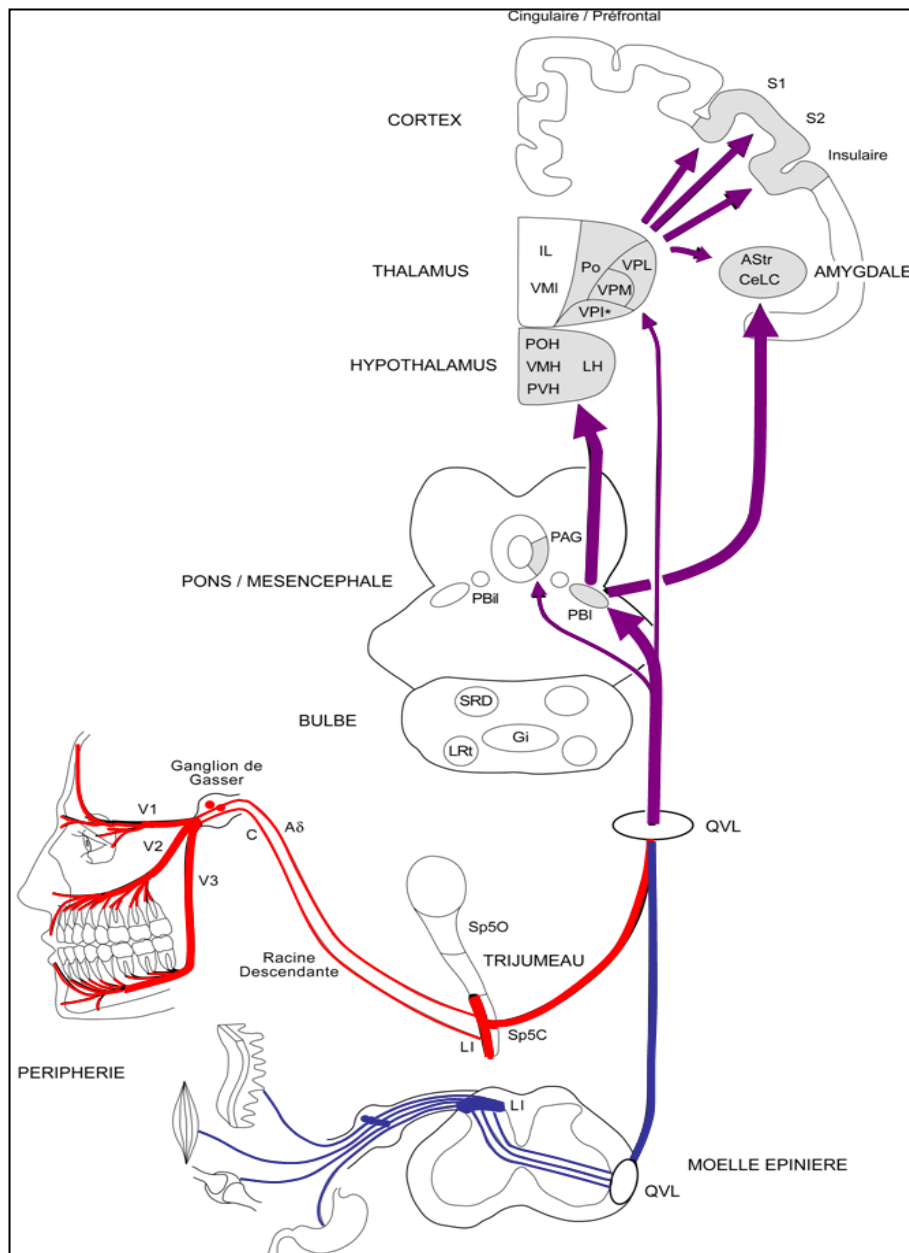


Figure 11 : Les projections nociceptives supraspinales issues de la couche I. AStr/CeLC : Amygdale (strie terminale et noyau central) ; Gi : noyau réticulaire gigantocellulaire ; IL : Noyaux intralaminaires (thalamus médian) ; LH : Région latérale de l'hypothalamus ; LI : couche I de la corne dorsale ; LV : couche V de la corne dorsale ; LRt : noyau réticulaire latéral ; PAG : substance grise périaqueducale ; PBl : noyau parabrachial latéral ; PO : complexe postérieur du thalamus ; POH : région préoptique de l'hypothalamus ; sp5C : noyau spinal caudal du trijumeau ; Sp5O : noyau spinal oral du trijumeau ; SRD : sous-noyau réticulaire dorsal du bulbe ; VMH : noyau ventromédian de l'hypothalamus ; VMI : noyau ventromédial du thalamus médian ; VMpo : noyau ventromédian postérieur ; VPI : noyau ventro- postéro-inférieur du thalamus latéral (très proche du VMpo) ; VPL : Noyau ventro-postéro-latéral du thalamus latéral ; VPM : noyau ventro-postéro-médian du thalamus. QVL : quadrant ventro-latéral de la moelle épinière. (Bernard and Villanueva, 2009)

III.1.4.2. Voies ascendantes issues de la couche V de la moelle épinière

Cinq voies peuvent être distinguées pour le transport de l'information nociceptive depuis la couche V (Campbell and Meyer, 2006; Mann, 2006) (Figure 12) :

- La voie **paléo-spino-thalamique**, identifiée chez les mammifères «inférieurs».
- La voie projetant sur le **sous-noyau parabrachial interne**, dans le mésencéphale.
- Enfin, les trois autres voies atteignant respectivement **les noyaux réticulaire latéral (LRt), gigantocellulaire (Gi) et dorsal (SRD)** dans le bulbe rachidien.

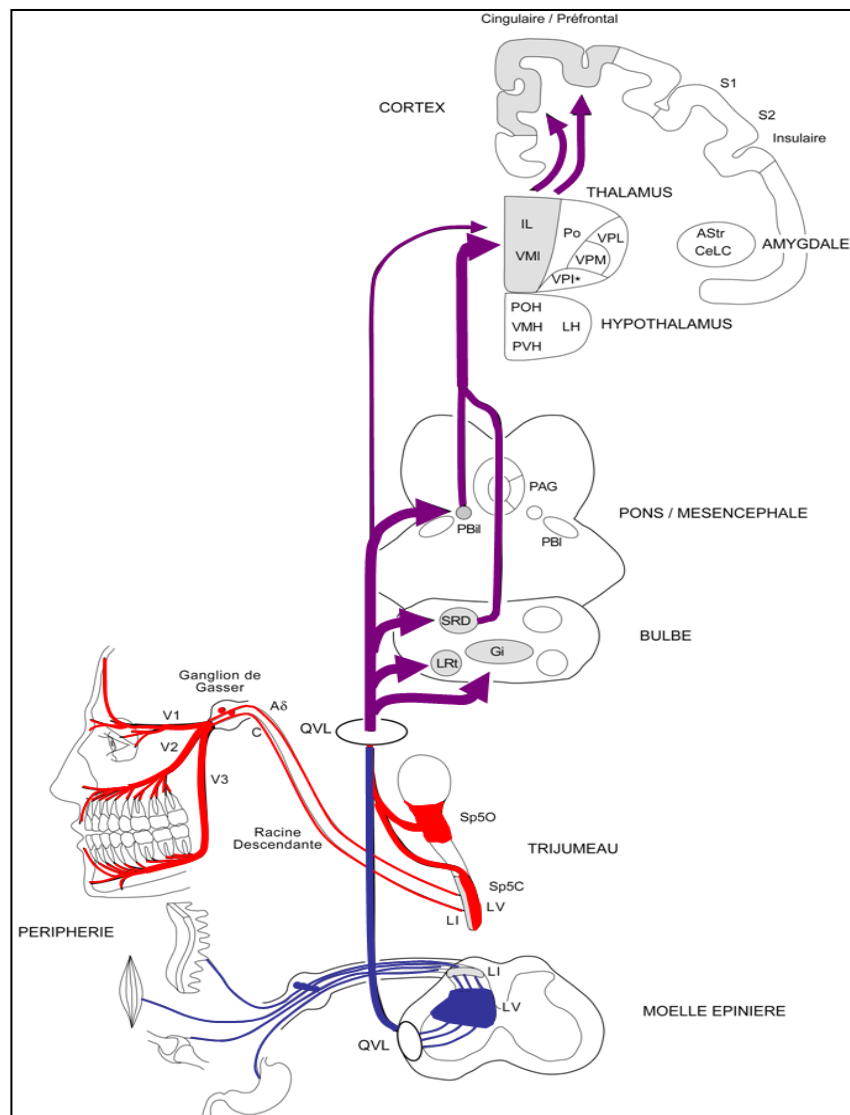


Figure 12 : Les projections nociceptives supraspinales issues de la couche V. AStr/CeLC : Amygdale (strie terminale et noyau central) ; Gi : noyau réticulaire gigantocellulaire ; IL : Noyaux intralaminaires (thalamus médian) ; LH : Région latérale de l'hypothalamus ; LI : couche I de la corne dorsale ; LV : couche V de la corne dorsale ; LRt : noyau réticulaire latéral ; PAG : substance grise périaqueducule ; PBI : noyau parabrachial latéral ; PO : complexe postérieur du thalamus ; POH : région préoptique de l'hypothalamus ; sp5C : noyau spinal caudal du trijumeau ; Sp50 : noyau spinal oral du trijumeau ; SRD : sous-noyau réticulaire dorsal du bulbe ; VMH : noyau ventromédian de l'hypothalamus ; VMI : noyau ventromédian du thalamus médian ; VMpo : noyau ventromédian postérieur ; VPI : noyau ventro- postéro-inférieur du thalamus latéral (très proche du VMpo) ; VPL : Noyau ventro-postéro-latéral du thalamus latéral ; VPM : noyau ventro-postéro-médian du thalamus. QVL : quadrant ventrolatéral de la moelle épinière (Bernard and Villanueva, 2009).

Les voies nociceptives supraspinales issues des couches I et V de la moelle, qu'elles soient directes ou relayées par le bulbe rachidien et le mésencéphale, convergent en majorité vers le thalamus. Au sein de ce dernier, un relais synaptique avec les neurones de 3^{ème} ordre assure le transfert de l'information nociceptive jusqu'au niveau du **cortex**, siège de la perception consciente de la douleur.

III.1.5. Du thalamus au cortex

Après avoir été véhiculée par les neurones de premier et de second ordres, localisés respectivement dans les ganglions des racines dorsales et dans la corne dorsale de la moelle épinière, l'information nociceptive est donc prise en charge par **un troisième neurone situé au sein du thalamus** et projetant dans le cortex cérébral (Raboisson et al., 1996). Les axones issus du noyau VPL (noyau ventro-postéro-latéral du thalamus latéral) de la voie néo-spino-thalamique atteignent le cortex somatosensoriel primaire, tandis que ceux issus du thalamus médian de la voie paléo-spino-thalamique aboutissent dans d'autres aires corticales tels le cortex frontal, le cortex cingulaire et le cortex insulaire (Dykes et al., 1995).

Avec le développement des techniques d'imagerie cérébrale, telle que l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle, plusieurs études ont pu démontrer l'activation des aires corticales en relation avec la nociception. En accord avec les données anatomiques rappelées ci-dessus, **quatre zones principales** ont ainsi été identifiées: le cortex somatosensoriel primaire (S1), le cortex somatosensoriel secondaire (S2), le cortex cingulaire antérieur (CCA) et le cortex insulaire (CI) (Dykes et al., 1995).

Des stimuli thermiques, mécaniques, chimiques répétés et/ou d'intensité élevée activent les nocicepteurs au niveau périphérique. Les fibres Aδ et C conduisent ensuite l'information jusqu'à la moelle épinière. De cette région, différentes voies transportent le message nociceptif vers les structures supraspinales dont le thalamus et plusieurs aires corticales. Il n'existe donc pas un seul centre de la douleur ni une voie unique pour la transmission de l'information nociceptive, qui implique en réalité plusieurs réseaux de connexions complexes en relation avec les valences multiples (sensorielle, affective, cognitive, ...) de la douleur.

Au cours de son trajet depuis les nocicepteurs jusqu'au cortex cérébral, le message nociceptif va subir différentes modulations inhibitrices ou facilitatrices.

La compréhension de ces modulations s'est également avérée essentielle pour mieux comprendre la physiopathologie des douleurs neuropathiques et développer les traitements associés.

III.2. Modulations inhibitrices de la nociception

III.2.1. Contrôle segmentaire spinal : théorie de la porte

La théorie de la porte ou du «gate control» a été élaborée en 1965 par Melzack et Wall. Cette théorie met en jeu les neurones de second ordre de la couche V et repose sur un équilibre entre les informations provenant des fibres nociceptives A δ et C, et celles véhiculées par les fibres non-nociceptives A β et A α (Melzack and Wall, 1965).

- Les fibres non-nociceptives activent des interneurons de la couche II de la corne dorsale, qui exercent un contrôle inhibiteur sur les neurones de second ordre (porte fermée). De fait une stimulation tactile légère dans une zone cutanée proche d'un territoire douloureux peut entraîner une diminution de la sensation douloureuse.
- Les fibres nociceptives inhibent au contraire ces interneurons tout en excitant les neurones de second ordre (porte ouverte).

Ainsi existe-t-il un contrôle spinal des fibres nociceptives afférentes primaires par les influx non nociceptifs véhiculés par les fibres de gros calibre A β et A α . Lors des douleurs chroniques, telles que les douleurs neuropathiques, cet équilibre est rompu et la porte reste toujours ouverte en raison de la forte activité des fibres nociceptives (Brasseur, 2010).

III.2.2. Contrôles descendants de la douleur

III.2.2.1. Contrôle inhibiteur diffus nociceptif

En 1970, soit quelques années après la publication de la théorie de la porte, Reynolds démontre l'implication de la **substance grise périaqueducale** (SGPA) dans l'inhibition de la nociception. A la fin des années soixante-dix, le concept du contrôle inhibiteur diffus nociceptif (CIDN) est défini pour la première fois par Le Bars, à partir d'enregistrements électrophysiologiques au niveau de la corne dorsale chez des rats soumis à des stimuli nociceptifs (Le Bars et al., 1979). Ces auteurs ont montré que l'application d'un 2^{ème} stimulus nociceptif à distance du premier entraînait une diminution des réponses électrophysiologiques normalement évoquées par celui-ci. Comme cet effet était observé

avec des stimuli appliqués dans différentes parties du corps, il a donc été qualifié de diffus.

Sur la base de ces observations, le concept du CIDN propose que, lors d'une stimulation nociceptive, les fibres impliquées dans la transmission de l'information nociceptive véhiculent le message jusqu'aux centres supraspinaux, notamment la SGPA et les noyaux du raphé, et qu'en retour ces mêmes structures supraspinales envoient des projections inhibitrices au niveau de la moelle épinière. Il y a ainsi un contrôle inhibiteur généré directement par les fibres nociceptives.

III.2.2.2. Contrôles inhibiteurs en provenance de structures cérébrales

Trois structures cérébrales envoient des projections inhibitrices: **l'amygdale, l'hypothalamus, et certaines aires corticales**, qui contactent les neurones de second ordre localisés dans la corne dorsale de la moelle épinière. Ces fibres peuvent être principalement de trois types (Zhuo and Gebhart, 1997) :

- **Les fibres opioïdiques**, qui exercent un contrôle inhibiteur en libérant des opioïdes qui activent les récepteurs opioïdiques μ sur les neurones de second ordre. Des opioïdes peuvent également être libérés localement par des interneurones spinaux.
- **Les fibres sérotoninergiques**, qui semblent impliquées à la fois dans des modulations positives et négatives de la nociception. De fait, la sérotonine libérée par ces fibres dans la corne dorsale de la moelle exerce des effets variés, inhibiteurs ou excitateurs, selon le type de récepteur activé (Bardin, 2011).
- Enfin, **les fibres noradrénergiques** jouent un rôle antinociceptif via l'activation des $\alpha 2$ -adrénorécepteurs, qui conduit notamment à une inhibition de la libération de glutamate et de substance P à partir des terminaisons des fibres afférentes primaires nociceptives dans la corne dorsale de la moelle épinière.

En plus des voies décrites ci-dessus, les voies dopaminergiques descendantes provenant majoritairement de l'hypothalamus, les cannabinoïdes (inhibiteurs de la transmission synaptique glutamatergique), l'acétylcholine et les interneurones GABAergiques de la corne dorsale peuvent contribuer à des modulations inhibitrices du message nociceptif (Campbell and Meyer, 2006).

Le contrôle inhibiteur de la nociception implique d'une part des structures supraspinales (amygdale, hypothalamus, cortex cérébral) qui activent des voies descendantes opioïdiques, sérotoninergiques, noradrénergiques, et d'autre part les fibres nociceptives elles-mêmes qui mettent en jeu, en retour, un contrôle inhibiteur diffus (CIDN) des neurones de second ordre dans la corne dorsale de la moelle épinière.

III.3. Mécanismes propres aux douleurs neuropathiques

Lors des douleurs neuropathiques, la lésion d'un nerf périphérique ou d'une voie neuronale centrale induit les mêmes mécanismes que ceux décrits ci-dessus pour la nociception. Toutefois, ces mécanismes sont renforcés. De plus, d'autres événements interviennent conduisant à accroître l'intensité du message nociceptif et à son maintien.

III.3.1. Au niveau périphérique

Trois événements majeurs se produisent suite à une lésion nerveuse périphérique (Farquhar-Smith, 2007) :

- Tout d'abord, les cellules immunitaires envahissent le territoire du nerf lésé et, de fait, sont à l'origine d'une neuro-inflammation. Ces cellules libèrent des molécules proinflammatoires telles que l'histamine, des cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF α), le NGF, la substance P, du NO ainsi que le peptide CGRP. Ces médiateurs de l'inflammation, dont **la libération est ici renforcée**, vont entraîner une **sensibilisation accrue des nocicepteurs**.
- Libérées dans l'espace extracellulaire, les molécules proinflammatoires **activent les cellules gliales** tant au niveau périphérique que central par le biais de leurs différents récepteurs. Cette activation gliale joue un rôle majeur dans la sensibilisation des neurones postsynaptiques - comme cela sera davantage développé dans les parties suivantes - et est impliquée aussi bien dans l'induction que le maintien des douleurs neuropathiques.
- Enfin, **une activation ectopique** (sans sollicitation des nocicepteurs) des fibres nociceptives A δ et C a lieu, du fait d'une surexpression de canaux calciques (N-type voltage-sensitive: VDCC) et sodiques qui les rend hyperexcitables.

Ainsi, la sensibilité accrue des nocicepteurs, l'activité ectopique des fibres nociceptives et l'activation gliale sont trois conséquences majeures d'une lésion périphérique qui contribuent au développement de douleurs neuropathiques.

III.3.2. Au niveau central

Suite à une lésion nerveuse périphérique ou centrale, plusieurs altérations entrent en jeu au niveau central, qui conduisent également au renforcement et au maintien de la douleur (Farquhar-Smith, 2007; Campbell and Meyer, 2006).

- Au sein de la corne dorsale de la moelle épinière, l'activité renforcée des fibres afférentes primaires nociceptives se traduit par une **libération plus importante de glutamate et de neuropeptides**, entraînant de fait une **forte activation des neurones de second ordre**. La synthèse accrue des récepteurs NK1 de la substance P par ces neurones contribue aussi à leur hyperexcitabilité (Inoue et al., 2008).
- **Le remaniement des terminaisons médullaires des fibres afférentes non nociceptives A β** au sein de la corne dorsale de la moelle épinière a également lieu. Ces dernières, projetant normalement au niveau des couches profondes, émettent des prolongements dans les couches I et II où elles pourraient établir des contacts synaptiques avec les neurones nociceptifs de second ordre. Ainsi, des messages générés par des stimuli non nociceptifs et véhiculés par les fibres A β pourraient donner naissance à des influx nociceptifs. Cependant, cette hypothèse reste controversée. Il semble que ce soit plutôt par l'intermédiaire d'interneurones excitateurs que les fibres A β influent *in fine* sur l'activité des neurones nociceptifs des couches superficielles I et II.
- Enfin, intervient une baisse d'efficacité **des systèmes de contrôles inhibiteurs de la douleur**, en partie liée à la dégénérescence d'interneurones inhibiteurs GABAergiques dans la corne dorsale.

La figure 13 rappelle l'ensemble des mécanismes impliqués dans la physiopathologie des douleurs neuropathiques.

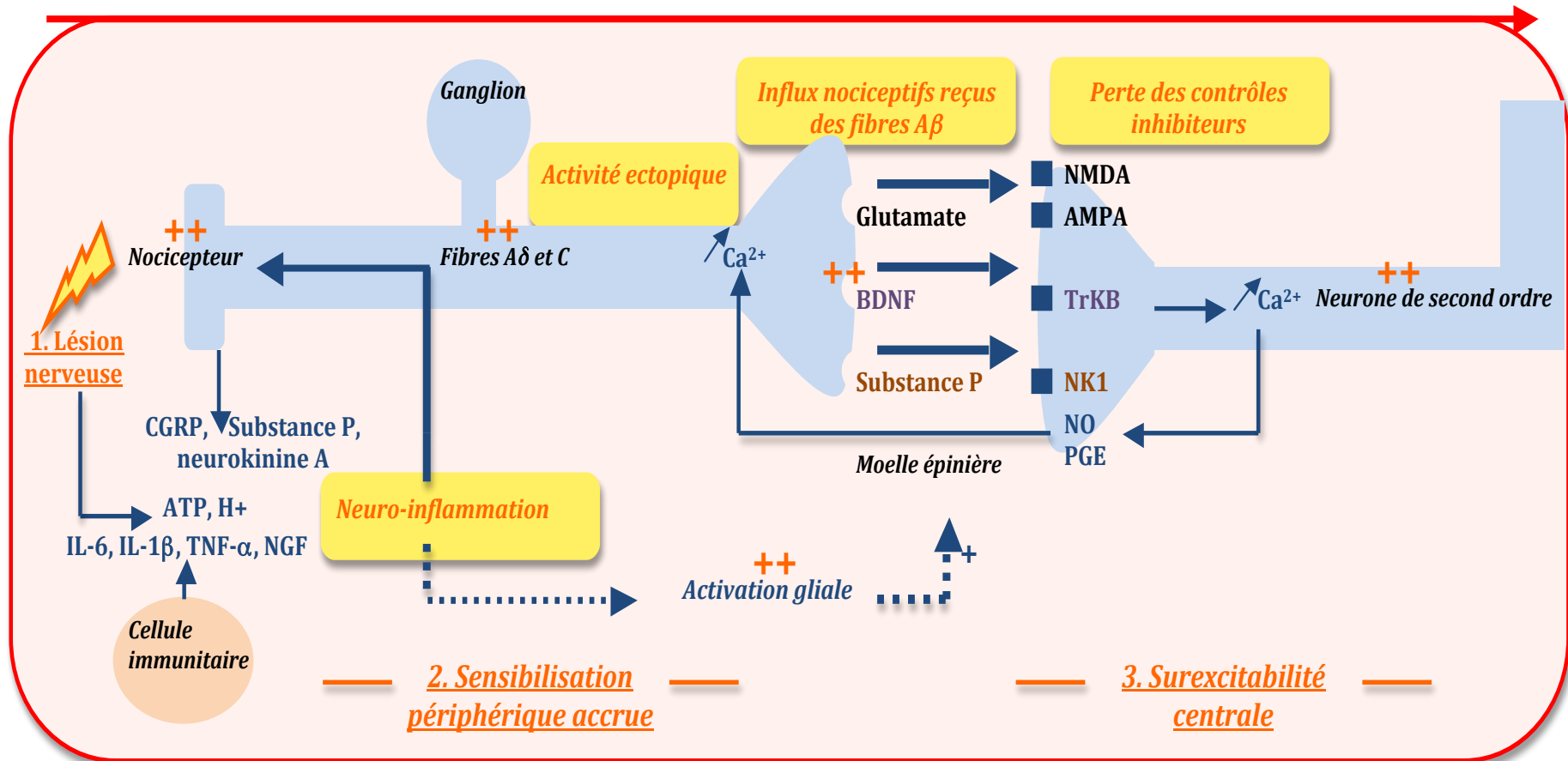


Figure 13 : Mécanismes impliqués dans la physiopathologie des douleurs neuropathiques. Suite à la lésion nerveuse, la neuroinflammation générée localement provoque l'excitation et la sensibilisation des nocicepteurs. Il en résulte une suractivation des fibres nociceptives, qui peuvent, par ailleurs, présenter une activité ectopique. La libération entre-autres de glutamate, BDNF et de substance P est de fait accrue dans la corne dorsale de la moelle épinière, ce qui conduit à une hyperexcitabilité centrale, accentuée par le déficit des contrôles inhibiteurs (GABAergiques) et l'arrivée d'influx nociceptifs provenant des fibres Aβ (++ : Activité augmentée)

Toutes ces altérations physiopathologiques multiples et convergentes sont la cause des symptômes caractéristiques des douleurs neuropathiques.

III.3.3. Symptômes des douleurs neuropathiques

Suite à une lésion neurale, le patient présente différents symptômes. Tout d'abord, des sensations anormales (Figure 14), qui sont peu voire non douloureuses lorsqu'elles correspondent à des paresthésies (picotement, fourmillement, ...) et pouvant être très douloureuses lorsqu'il s'agit de dysesthésies (décharge électrique, coup de poignard, ...). Le patient peut également présenter des douleurs spontanées, survenant en l'absence de toute stimulation (Scholten and Harden, 2015).

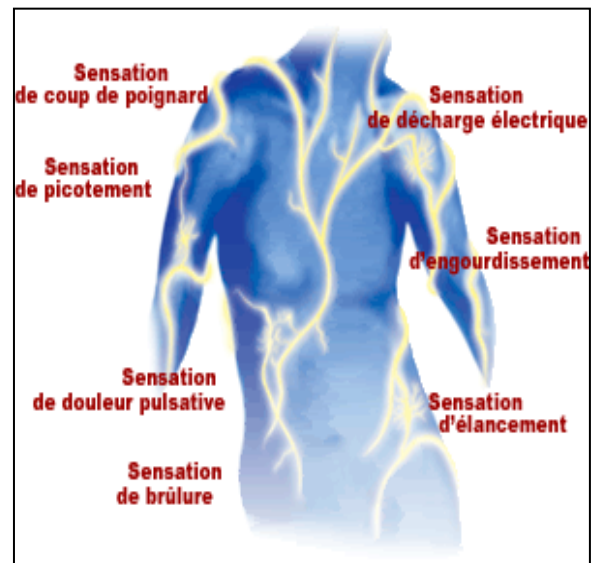


Figure 14 : Différentes sensations observées chez le patient atteint de douleurs neuropathiques www.jnlf.fr

De plus, deux symptômes correspondant à des douleurs provoquées sont retrouvés chez le patient. Tout d'abord **l'hyperalgésie**, qui est une réponse accrue à un stimulus nociceptif. Se piquer avec une aiguille devient par exemple intolérable. Ce symptôme résulte de l'hyperexcitabilité des neurones de second ordre et de la sensibilisation (baisse de leur seuil d'activation) des nocicepteurs. Le second symptôme est **l'allodynie**, une sensation de douleur en réponse à un stimulus non nociceptif chez le sujet sain. Elle résulte du remaniement des terminaisons médullaires des fibres A β . Le seul contact léger d'un vêtement peut alors suffire à déclencher une douleur (Bouhassira, 2009).

Les douleurs neuropathiques résultent d'une sensibilisation des nocicepteurs ainsi que d'une hyperexcitabilité des neurones de second ordre dans la corne dorsale de la moelle épinière. Différents symptômes caractéristiques permettent de les identifier, les plus communs étant l'hyperalgésie et l'allodynie.

L'ensemble de ces symptômes confère aux douleurs neuropathiques une sémiologie particulière, qui permet son diagnostic chez le patient.

IV. Diagnostic chez l'homme et offre thérapeutique actuelle

IV.1. Diagnostic des douleurs neuropathiques

Il est possible d'identifier, d'évaluer et de traiter les douleurs neuropathiques. Leur diagnostic repose sur deux éléments : un interrogatoire et l'examen clinique du patient (Martinez et al., 2010).

IV.1.1. Réalisation d'un diagnostic en deux étapes

L'interrogatoire permet tout d'abord de repérer des signes cliniques caractéristiques des douleurs neuropathiques, telles que les sensations de paresthésies, dysesthésies, la présence de douleurs spontanées, d'hyperalgésie et/ou d'allodynie. L'interrogatoire permet également d'évaluer l'état émotionnel du sujet, lié à l'intensité de la douleur ressentie. De plus, il est aussi possible par cet échange avec le patient de définir le «contexte de survenue», par exemple une maladie ou une lésion connue pour son potentiel neuropathique.

L'examen clinique va, quant à lui, permettre de préciser la localisation de la douleur (dans un territoire en rapport avec la lésion nerveuse périphérique ou centrale) et évaluer son intensité. Les tests réalisés sont par exemple des stimulations thermiques ou tactiles. Les signes neurologiques peuvent être négatifs, par exemple un déficit moteur, une anomalie de réflexe voire un déficit thermique, et/ou positifs comme une allodynie au frottement, à la pression ou une allodynie thermique (Scholten and Harden, 2015).

IV.1.2. Outils de diagnostic

Plusieurs outils ont été mis en place afin d'identifier le caractère neuropathique de douleurs chroniques et d'en évaluer l'intensité. Ces outils sont en fait des questionnaires et des échelles. Ils peuvent être utilisés par le professionnel de santé ou directement par le patient.

Le questionnaire DN4 (douleur neuropathique en quatre questions, Figure 15) est communément utilisé (Martinez et al., 2010). Si le score obtenu par le patient est égal ou supérieur à quatre, cela signifie qu'il présente des douleurs neuropathiques. Le Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI) est un autre exemple de questionnaire couramment utilisé, qui permet d'évaluer de façon fiable l'intensité des symptômes douloureux.

Questionnaire DN4		
QUESTION 1 : la douleur présente-t-elle une ou plusieurs des caractéristiques suivantes ?		
	Oui	Non
1. Brûlure	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Sensation de froid douloureux	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Décharges électriques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
QUESTION 2 : la douleur est-elle associée dans la même région à un ou plusieurs des symptômes suivants ?		
	Oui	Non
4. Fourmillements	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Picotements	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Engourdissements	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Démangeaisons	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
QUESTION 3 : la douleur est-elle localisée dans un territoire où l'examen met en évidence :		
	Oui	Non
8. Hypoesthésie au tact	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Hypoesthésie à la piqûre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
QUESTION 4 : la douleur est-elle provoquée ou augmentée par :		
	Oui	Non
10. Le frottement	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
OUI = 1 point NON = 0 point Score du Patient : /10		

Figure 15 : Questionnaire DN4 utilisé pour le diagnostic des douleurs neuropathiques
(Martinez et al., 2010)

Faciles d'utilisation, les échelles peuvent, quant à elles, être numériques, visuelles ou catégorielles. La plus utilisée est une échelle catégorielle permettant le classement en cinq catégories : douleur absente, faible, modérée, forte, extrêmement forte. De plus, des échelles de qualité de vie permettent également d'évaluer le retentissement des douleurs neuropathiques (Woolf and Mannion, 1999).

IV.1.3. Limites du diagnostic

Plusieurs limites doivent être prises en compte quant au diagnostic des douleurs neuropathiques.

- Tout d'abord, si les outils mis en place sont rapides et simples à utiliser, leur **sensibilité** et leur **spécificité** ne sont pas absolues. Ainsi, ils peuvent conduire à des faux positifs et/ou des faux négatifs, et donc des diagnostics erronés (Bouhassira and Attal, 2012).
- De plus, le diagnostic des douleurs neuropathiques s'avère le plus souvent difficile en raison du caractère **subjectif et multi-dimensionnel** de la douleur, qui dépend largement de l'expérience personnelle du patient. L'évaluation de la douleur est d'autant plus difficile que les patients concernés peuvent souffrir de troubles cognitifs, voire de démence (Breivik et al., 2008).

- Une autre difficulté tient au fait que les patients ne présentent pas tous les mêmes symptômes, y compris lorsqu'ils relèvent d'une étiologie commune. De plus, les mécanismes et les symptômes qui leur sont associés évoluent au cours de la pathologie et le lien entre **mécanismes et symptômes** n'est pas encore maîtrisé. Même si les mécanismes physiopathologiques sont actuellement mieux compris, leur relation avec les types symptomatiques des patients n'est pas clairement établie. C'est donc un axe à travailler, notamment en favorisant les interactions entre chercheurs et cliniciens (Jensen et al., 2001).
- Enfin, dans la majorité des cas, le patient est pris en charge par un professionnel de santé **non spécialisé** dans la douleur. L'absence d'identification de douleurs neuropathiques en raison d'un examen clinique réalisé par des non-spécialistes (diabétologue, neurologue) est un réel problème pour l'instauration de traitements véritablement adaptés et efficaces (Harden and Cohen, 2003; Attal, 2011). Seul un faible pourcentage de patients est dirigé vers des spécialistes de la douleur, après une attente qui peut être longue. Au Royaume Uni, une étude présente par exemple que sur 703 patients atteints de douleurs neuropathiques, 79% d'entre eux ont souffert de cette pathologie pendant plus d'un an avant de consulter un spécialiste. La majorité de ces patients ont de fait reçu des traitements inappropriés pendant plus d'une année (Davies et al., 1994).

Toutefois, malgré ces limites, il est important de noter que le diagnostic des douleurs neuropathiques et les outils proposés se sont nettement améliorés au cours des dernières années (Attal, 2011). De plus, la prise en charge thérapeutique a aussi beaucoup évolué.

IV.2. Approche thérapeutique des douleurs neuropathiques

IV.2.1. Traitements actuels

Pour la majorité d'entre eux, les traitements des douleurs neuropathiques ne reposent que sur des observations empiriques qui ont été faites à l'occasion de traitements d'autres pathologies, en particulier la dépression et l'épilepsie (Attal, 2008). **Ainsi, ces traitements de première ligne** (O'Connor and Dworkin, 2009) font appel à :

- Des antidépresseurs tricycliques : amitriptyline et imipramine.
- Des antidépresseurs inhibiteurs de recapture de la sérotonine et de la noradrénaline : duloxétine et venlafaxine.
- Des antiépileptiques (anticonvulsivants) : gabapentine et prégabaline.

Le mécanisme d'action des antidépresseurs fera l'objet d'un chapitre spécifique dans la partie suivante. Les antiépileptiques sont, quant à eux, des ligands de la sous-unité $\alpha 2-\delta$ des canaux calciques voltage-dépendants exprimés au niveau présynaptique. Ils conduisent par conséquent à une réduction de la libération de glutamate et de substance P à partir des fibres afférentes primaires nociceptives dans la corne dorsale de la moelle épinière (Scholten and Harden, 2015). De plus, ils facilitent l'activité des voies noradrénergiques bulbo-spinales, contribuant ainsi à renforcer l'action inhibitrice de ces voies (via l'activation de récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques) sur la neurotransmission des messages nociceptifs.

Les traitements de seconde ligne font appel aux agonistes opioïdes en particulier le tramadol et le tapentadol qui activent les récepteurs opioïdes μ et inhibent la recapture des monoamines. Sont également recommandés, la capsaïcine (sous patch à 8%), qui exerce son effet via une désensibilisation des récepteurs-canaux TRPV1, ainsi que la lidocaïne (sous patch à 5%) et la carbamazépine qui agissent via le blocage de canaux sodiques voltage-dépendants au niveau périphérique (Vranken, 2012).

Les différentes molécules prescrites en première ou seconde intention dans le traitement des douleurs neuropathiques ont donc des sites d'actions variés, comme le résume la Figure 16.

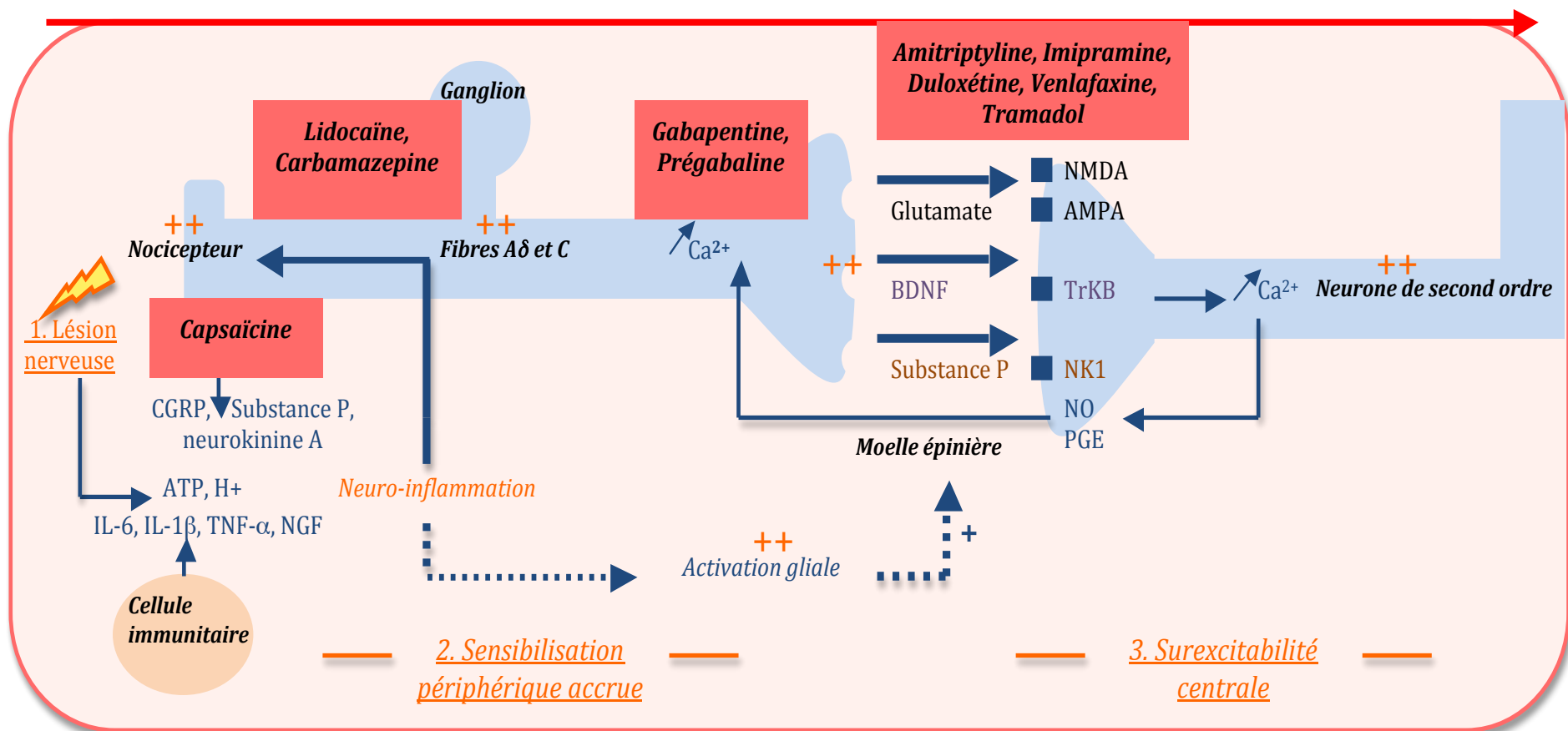


Figure 16 : Sites d’actions des médicaments utilisés en première ou seconde intention pour le traitement des douleurs neuropathiques.

La capsaiïcine exerce son action au niveau des nocicepteurs, la lidocaïne et la carbamazépine bloquent les canaux sodiques voltage-dépendants des fibres nociceptives périphériques, la gabapentine et la prégabaline agissent sur des canaux calciques régulant la libération des neurotransmetteurs au niveau présynaptique et les antidépresseurs (amitriptyline, imipramine, venlafaxine, duloxétine) ainsi que le tramadol (et le tapentadol) visent des cibles multiples qui toutes concourent à inhiber le relais synaptique spinal des voies nociceptives¹⁶.

Les traitements de troisième intention incluent, quant à eux, des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) comme la paroxétine et le citalopram (Xu et al., 2016). Dans ce cas, l'efficacité concerne surtout la dépression co-morbide.

La Figure 17 reprend les étapes suivies pour un « traitement-type » de douleurs neuropathiques. On peut notamment constater qu'il peut être fait appel à une polythérapie.

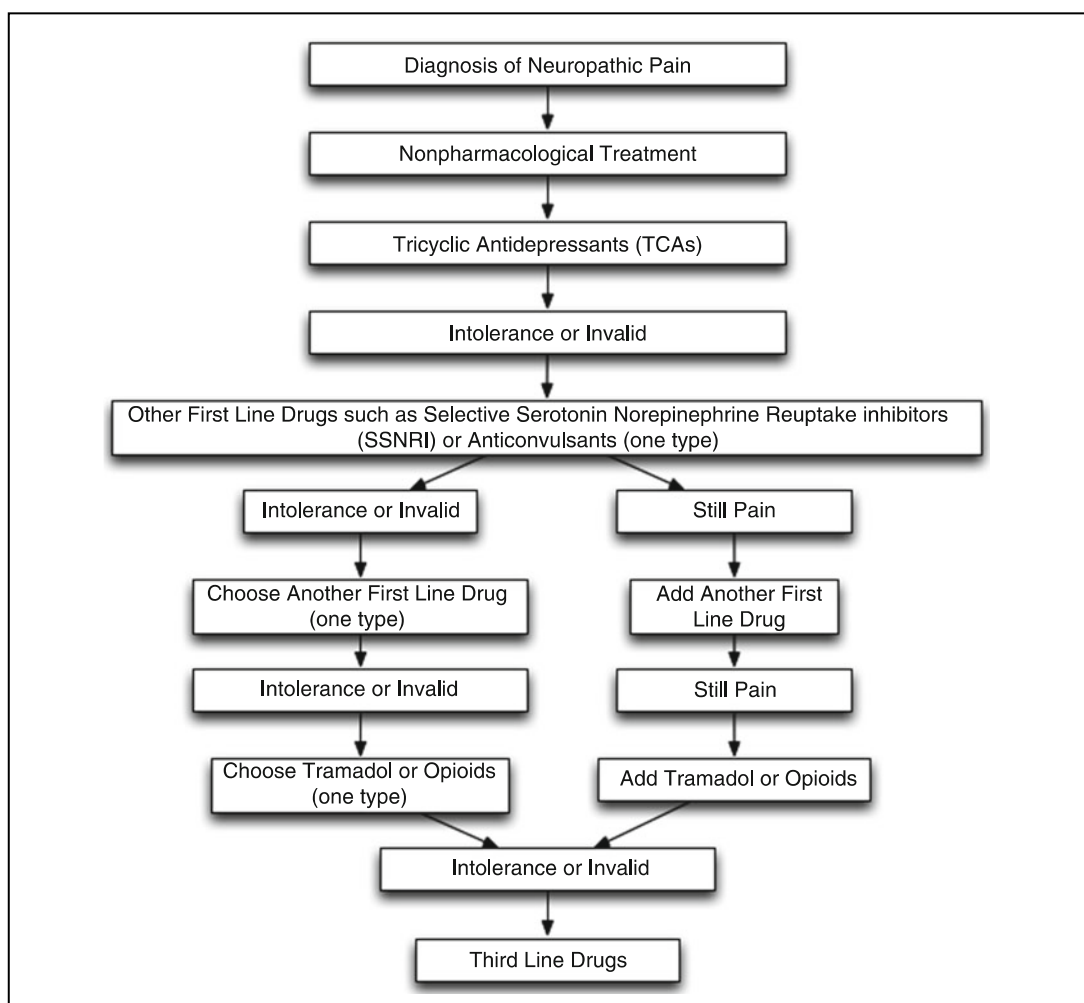


Figure 17 : Protocole-type de traitement des douleurs neuropathiques. Une fois que les douleurs neuropathiques ont été diagnostiquées chez le patient, une approche non pharmacologique est tout d'abord proposée. Mais dans la grande majorité des cas, un traitement pharmacologique est prescrit afin de réduire les douleurs. C'est un antidépresseur tricyclique qui sera proposé en première intention, puis un autre type de composés si le traitement s'avère inefficace ou mal toléré, par exemple un antiépileptique ou un antidépresseur SNRI. Une polythérapie pourra également être proposée au patient (Xu et al., 2016).

Selon les étiologies des douleurs neuropathiques, les traitements reconnus comme efficaces peuvent différer quelque peu (Attal, 2011). Ainsi, les anti-épileptiques tels que la gabapentine et la prégabaline seraient plus indiqués pour les douleurs des neuropathies

diabétiques et post zostériennes. Par ailleurs, l'amitriptyline serait aussi plus efficace pour soulager les douleurs liées au diabète que celles inhérentes au SIDA (Kieburts et al., 1998).

Enfin, plusieurs approches **non pharmacologiques** sont également préconisées pour le traitement des douleurs neuropathiques. La stimulation transcutanée (TENS) est la plus couramment utilisée. Cette technique se base sur la théorie de la porte. La fréquence de la stimulation doit permettre d'activer les contrôles inhibiteurs segmentaires, c'est à dire les fibres sensorielles A β et A α . Cette procédure produit des paresthésies légères, par exemple sous la forme d'un «fourmillement doux et agréable» (Baud and Mick, 2007).

Dans tous les cas, ces approches non pharmacologiques sont mises en œuvre en complément des traitements pharmacologiques. Leur besoin illustre les limites des traitements pharmacologiques actuels, et la nécessité de développer des stratégies thérapeutiques innovantes, à la fois plus efficaces et mieux tolérées.

IV.2.2. Besoins médicaux insatisfaits et traitements émergents

En plus des effets secondaires liés aux traitements (nausée, sédation, maux de tête, ...), le problème majeur avec les produits utilisés aujourd'hui pour réduire les douleurs neuropathiques est leur **faible efficacité**. En effet, au mieux, seul un patient traité sur 3 bénéficie d'une réduction significative de ses douleurs. De plus, les patients ne présentent que 30 à 50% de réduction de leur douleur, aucun traitement ne permet de l'éliminer totalement. Il est ainsi nécessaire de développer des traitements plus adaptés, notamment par la recherche de nouvelles cibles cellulaires (NeuroPerspective, 2012).

Actuellement, **32 molécules** sont en essais cliniques dans le cadre des douleurs neuropathiques. Parmi ces molécules en développement, 6 sont en phase I, 17 sont en phase II et 9 sont en phase III. Les indications les plus visées sont les douleurs neuropathiques diabétiques et post zostériennes (Informa - MedTrack, 2016).

Le mécanisme d'action de ces nouveaux produits est varié et concerne aussi bien la modulation des neuromédiateurs excitateurs tels que le glutamate ou les récepteurs α adrénergiques. Par ailleurs, le blocage des canaux calciques voltage-dépendants concerne une centaine de molécules en développement. Cependant aucune n'est encore en essai clinique (NeuroPerspective, 2012).

Le **tapentadol**, récemment développé par les laboratoires *Johnson & Johnson* et *Grunenthal* et possédant une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) dans les douleurs neuropathiques diabétiques (Informa - MedTrack, 2016), s'annonce comme un antalgique d'intérêt majeur dans les prochaines années pour cette indication. A la fois agoniste des récepteurs opioïdes μ et inhibiteur de la recapture de noradrénaline, le tapentadol devrait se positionner en tête sur les sept marchés majeurs pour le traitement des douleurs neuropathiques en 2020, selon les prévisions rapportées dans le Datamonitor (2011).

Le diagnostic des douleurs neuropathiques est réalisé à l'aide d'échelles et questionnaires basés sur la sémiologie de cette pathologie. Il prend également en compte l'historique du patient et son état émotionnel. Les antidépresseurs et antiépileptiques figurent parmi les molécules les plus prescrites. Aujourd'hui, un réel manque d'efficacité des traitements proposés est toujours présent, ainsi de nombreuses molécules sont en cours de développement afin de répondre à ce besoin.

Le développement de nouvelles molécules thérapeutiques repose, avant toute étude clinique, sur des essais précliniques réalisés chez l'animal. Différents modèles et tests ont ainsi été développés dans le cadre des douleurs neuropathiques afin de pouvoir réaliser des études pharmacologiques chez le rongeur (Bouhassira and Attal, 2012).

V. Modèles et tests précliniques de douleurs neuropathiques

V.1. Modèles précliniques

Pendant longtemps, l'étude de la douleur chez l'animal n'a fait appel qu'à des modèles « aigus ». Il a fallu attendre les années 1970 pour que soient développés les premiers modèles de douleur chronique, ces derniers étant bien plus proches de ce qui se passe en clinique. Afin d'être validés, les modèles précliniques doivent obligatoirement répondre à **trois critères** (Blackburn-Munro, 2004) qui sont les suivants :

- *L'homologie (ou construct validity):* le modèle doit reproduire l'apparition de la pathologie telle qu'elle se met en place chez l'homme. C'est-à-dire avec une étiologie et des mécanismes communs. A ce titre, les modèles aigus de douleur sont ici exclus puisqu'ils ne miment pas le développement des douleurs neuropathiques mais reproduisent uniquement ses symptômes.

- L'isomorphisme (*ou face validity*): le modèle animal doit entraîner l'apparition de symptômes similaires à ceux observés chez l'homme. Pour la douleur neuropathique, on va ainsi étudier l'hyperalgésie et l'allodynie.
- La valeur prédictive (*ou predictive validity*): le modèle doit répondre aux mêmes traitements pharmacologiques que ceux utilisés chez l'homme.

L'essentiel des modèles précliniques de douleurs neuropathiques a été mis en place à partir de lésions périphériques d'origine traumatique, métabolique ou toxique. Toutefois, des modèles de douleur neuropathique d'origine centrale ont également été développés. On distingue donc aujourd'hui ces deux types de modèles.

V.1.1. Modèles périphériques

L'un des modèles de douleurs neuropathiques périphériques couramment utilisé est celui de la **ligature du nerf sciatique**, développé par Bennett et Xie en 1988 (Bennett and Xie, 1988). Il consiste à pratiquer quatre ligatures lâches autour du nerf sciatique chez le rat anesthésié (trois chez la souris) (Figure 18). Ces ligatures sont réalisées avec du fil de suture chirurgicale (catgut, soie, 4.0) et espacées entre-elles de 1 mm. Les conséquences sont le gonflement du nerf sciatique, la présence d'un œdème interne, une perte axonale ainsi que le ralentissement du flux sanguin. La neuroinflammation générée localement induit les mécanismes propres à la douleur neuropathique (Jaggi et al., 2009).

En plus de la ligature du nerf sciatique, la ligature du nerf spinal et celle du nerf trigéminal sont également utilisées pour induire des douleurs neuropathiques périphériques. Par ailleurs, d'autres modèles reproduisent des étiologies plus spécifiques telles que la chimiothérapie avec l'administration de molécules anticancéreuses ou le diabète avec l'injection de streptozotocine (Garcia-Larrea and Magnin, 2008).

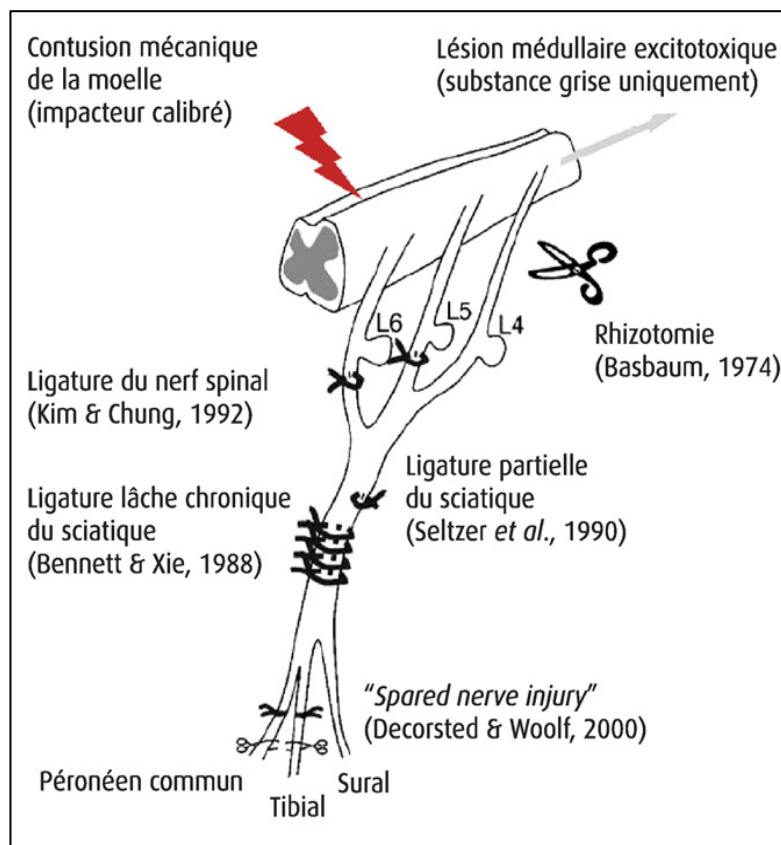


Figure 18 : Lésions nerveuses pratiquées dans les modèles de douleurs neuropathiques
(Garcia-Larrea and Magnin, 2008)

Les douleurs neuropathiques induites dans ces modèles présentent des caractéristiques «chronologiques» spécifiques. Ainsi, la ligature du nerf sciatique conduit à une allodynie et une hyperalgésie qui perdurent pendant près de deux mois tandis que le modèle de « spared nerve injury », impliquant la lésion de deux des trois branches du nerf sciatique, permet l'étude de ces mêmes symptômes sur une durée supérieure à six mois (Barrot, 2012).

V.1.2. Modèles centraux

Chez l'homme, la majorité des atteintes de la moelle épinière résulte de fractures-dislocations entraînant des **contusions compressives** (Norenberg et al., 2004). Le premier modèle de contusion a été développé en 1911 par Reginald Allen chez le chien. Il est obtenu par la chute d'un poids calibré sur la moelle épinière (Schlesinger, 1991), et c'est encore ce modèle qui est le plus utilisé aujourd'hui pour induire une lésion médullaire. Cette lésion entraîne une paraplégie sévère et une nécrose segmentaire complète. L'animal est au préalable anesthésié et une laminectomie est réalisée. Un tube vertical servant de guide pour la chute d'une masse cylindrique calibrée est ensuite

positionné, et cette masse est finalement libérée pour impacter la moelle épinière (Jaggi et al., 2009).

Par la suite, plus d'une quinzaine de modèles précliniques de contusion ont été développés pour étudier les douleurs neuropathiques d'origine centrale (Grill, 2005). Enfin, l'administration intrathécale (voire même intra-médullaire) de neurotoxiques (par exemple l'acide kaïnique) a également conduit à des modèles validés de douleurs neuropathiques d'origine centrale (Garcia-Larrea and Magnin, 2008).

Le Tableau 4 présente les modèles précliniques de douleurs neuropathiques les plus couramment utilisés.

Méthode employée pour induire la neuropathie	Tissu cible de la lésion ou traitement	Type de douleurs neuropathiques	
		Périphériques	Centrales
Section	Nerf sciatique	X	
	Moelle épinière (hémi-section)		X
Ligature	Nerf trigéminal	X	
	Nerf sciatique (Chronic Constriction Injury)	X	
	Nerf spinal	X	
Contusion	Nerf sciatique	X	
	Moelle épinière		X
Traitements pharmacologiques	Taxol, Oxaliplatine, Vincristine (anticancéreux)		X
	Streptozotocine (Induction du diabète)	X	
Virus et anti-viraux	Gp 120 (HIV), anti-retroviraux, varicella zoster virus	X	

Tableau 4 : Modèles précliniques de douleurs neuropathiques majoritairement utilisés. Les modèles impliquent une lésion de nerf (section, ligature, contusion) ou l'administration d'agents neurotoxiques ou de virus afin d'induire des douleurs neuropathiques périphériques ou centrales chez l'animal. (Jaggi et al., 2009; Barrot, 2012; M'Dahoma et al., 2014).

Tous ces modèles précliniques se caractérisent par le développement et le maintien dans la durée de symptômes d'hyperalgésie et d'allodynie thermiques et/ou mécaniques. En ce sens ils remplissent le critère d'isomorphisme (*face validity*). Le développement de douleurs neuropathiques stables en intensité intervient après un délai plus ou moins long

selon les modèles (par exemple deux semaines suite à la lésion du nerf sciatique chez le rat). Ce délai doit bien sûr être respecté pour l'évaluation qualitative et quantitative fiable de l'hyperalgésie et de l'allodynie à l'aide de tests validés.

V.2. Tests de douleurs neuropathiques

V.2.1. Tests mécaniques

Les deux tests couramment utilisés chez les rongeurs pour l'évaluation de l'hyperalgésie mécanique d'une part et de l'allodynie mécanique d'autre part sont respectivement le test de Randall & Selitto (chez le rat) et le test des filaments de von Frey (chez le rat et la souris).

Le test de Randall et Selitto consiste en l'application au niveau de la patte du rat d'un stylet exerçant une pression calibrée, dont la valeur dépend de la position d'une masselotte (30 g) sur une échelle graduée de 1 (pression minimale) à 24 (pression maximale). Au fur et à mesure de la progression (contrôlée) de la masselotte le long de l'échelle, la pression augmente jusqu'à atteindre deux seuils induisant des réactions de l'animal: un premier seuil pour lequel l'animal retire sa patte (seuil de retrait), et un deuxième seuil pour lequel il émet une plainte (seuil de vocalisation) lorsque sa patte est maintenue sous la masselotte. Ce deuxième seuil étant atteint, le test est immédiatement arrêté. Ce test implique le maintien du rat en position verticale entre les mains de l'expérimentateur (Figure 19). Il est nécessaire que le rat ait été familiarisé avec ce maintien vertical et que l'expérimentateur ait eu une formation préalable afin de limiter le stress pour l'animal. En effet, le stress peut par lui-même induire d'importantes variations de la nociception, et constituer un biais dans l'interprétation des résultats (Randall and Selitto, 1957).



Figure 19 : Test de Randall et Selitto

http://www.ugobasile.com/catalogue/product/37215_analgesy_meter.html

Le test des filaments de von Frey consiste, quant à lui, à appliquer perpendiculairement à la surface plantaire, durant 1-2 secondes, une série de filaments semi-rigides en nylon. Ces filaments, dits de von Frey, font cinq centimètres de long et leur diamètre varie de 0,1 à 0,6 mm (Chaplan et al., 1994). Leur calibration permet de connaître très précisément la pression exercée par chaque filament au point de contact cutané lorsque s'amorce sa courbure. Dans ces conditions, le filament le plus fin qui déclenche le retrait de la patte

permet de déterminer le seuil de pression mécanique maximale supportée par l'animal. L'allodynie mécanique chez le rat neuropathique se traduit par une diminution importante (-80%) de ce seuil, le retrait de la patte étant déclenché par un filament beaucoup plus fin que chez le rat naïf.

V.2.2. Tests thermiques

Les tests thermiques reposent sur l'application de chaleur ou de froid au niveau de la surface plantaire ou de la queue de l'animal. Dans le cas des tests à température élevée, celle-ci est en règle générale automatiquement fixée, afin de ne pas provoquer de brûlure. De plus, un temps maximum d'exposition à la source de chaleur est respecté pour éviter toute lésion. Le tail flick, le test de la plaque chaude ainsi que le Plantar® test (dit de Hargreaves) sont classiquement utilisés. Le paramètre mesuré est **la latence de réaction** de l'animal, en l'occurrence le retrait de la patte ou de la queue, une fois déclenchée la source de chaleur. Tous ces tests permettent d'évaluer l'hyperalgésie thermique. L'étude de l'allodynie thermique s'avère plus difficile à mettre en place chez des animaux éveillés et est de fait nettement moins pratiquée (Barrot, 2012; Garcia-Larrea and Magnin, 2008).

Concernant les tests au froid, l'animal est, par exemple, déposé sur une plaque à basse température et on mesure la latence du premier lever d'une patte. Toutefois, en raison d'une **forte variabilité**, ce test de la plaque froide est bien moins utilisé que celui de la plaque chaude. Le test à l'acétone est davantage utilisé. Il consiste à déposer, sur une patte ou sur le museau, une goutte d'acétone et à mesurer la latence de réaction comportementale (secousses de la patte ou de la tête) au froid dû à l'évaporation. Chez l'animal neuropathique, la latence est fortement diminuée (Barrot, 2012).

Le Tableau 5 résume les principaux tests utilisés chez le rongeur.

Symptôme étudié	Test utilisé	Espèce
Hyperalgésie mécanique	Randall & Selitto	Rat
Allodynie mécanique	Von Frey	Rat et souris
Hyperalgésie thermique	Tail flick, plaque chaude ou froide, Plantar®	Rat et souris
Allodynie thermique	Acétone, plaque chaude ou froide	Rat et souris

Tableau 5 : Tests thermiques et mécaniques de douleurs neuropathiques chez le rat et la souris. Ces tests permettent de quantifier l'allodynie et/ou l'hyperalgésie au niveau d'une patte, de la queue ou du museau de l'animal. L'expérimentateur doit être bien formé à la pratique de ces tests pour limiter le stress de l'animal.

Des modèles de douleurs neuropathiques aussi bien périphériques que centrales ont été développés. Ils mettent en jeu une ligature de nerf, une contusion médullaire ou encore l'administration de neurotoxiques ou de virus. Des tests thermiques et mécaniques permettent d'évaluer l'hyperalgésie et/ou d'allodynie induites dans ces modèles.

Grâce à ces modèles validés, les investigations précliniques ont permis de mieux connaître à la fois les processus physiopathologiques sous-tendant les douleurs neuropathiques et les mécanismes d'action des agents pharmacologiques communément prescrits pour les réduire. L'action anti-hyperalgésique et anti-allodynique des **antidépresseurs** a notamment été largement étudiée dans ces modèles précliniques de douleurs neuropathiques. Cette classe thérapeutique ayant été privilégiée pour le travail de thèse, car figurant parmi les traitements de première intention des douleurs neuropathiques, la deuxième partie de l'analyse bibliographique y est consacrée.

Seconde partie : les antidépresseurs

I. Historique

Autrefois qualifiés d'énergisants psychiques, les antidépresseurs visent à améliorer l'humeur du patient et à soulager sa souffrance morale (Pignarre, 2001). Ils ont également été appelés «psycho-analeptiques» en raison de leur action stimulante sur le psychisme ou encore «thymo-analeptiques» du fait de leur action positive sur l'humeur (Koupernik et al., 1982). Historiquement développés afin de lutter contre les états dépressifs, les antidépresseurs sont aujourd'hui prescrits dans d'autres indications, tels que les troubles obsessionnels compulsifs (TOC), les troubles anxieux, le syndrome de stress post-traumatique (SSPT), l'énurésie nocturne, certains troubles des conduites alimentaires (boulimie), la fibromyalgie et les douleurs neuropathiques (Grima, 2008).

I.1. Premières découvertes

Au début du XX^{ème} siècle, il n'existe pas de traitements spécifiques de la dépression. La chimiothérapie repose alors sur des produits sédatifs provenant d'opium et sous forme de laudanum de Sydenham®. Ce n'est qu'en 1938, qu'Ugo Cerletti propose le premier vrai traitement des troubles dépressifs avec la mise en place de l'électroconvulsivothérapie. Cette technique représente à cette époque le seul traitement utilisé dans la dépression, avant la découverte des premières molécules pharmacologiques en 1957 (Lôo et al., 2004).

Les deux premiers antidépresseurs découverts sont **l'iproniazide et l'imipramine**.

- L'iproniazide est un inhibiteur non sélectif et irréversible des deux isoformes, A et B, de la monoamine oxydase (MAO). Sa découverte est due aux psychiatres Nathan Kline et Georges Crane qui l'administrent pour la première fois à des patients déprimés, après avoir montré que ce produit induit des états d'excitation thymique. Par la suite, Nathan Kline confirme les effets antidépresseurs de l'iproniazide chez un nombre important de sujets dépressifs, et propose de substituer le traitement par cet IMAO à l'électroconvulsivothérapie (Loomer et al., 1957), (Crane, 1957).
- L'imipramine est le prototype des antidépresseurs tricycliques. Ils sont appelés ainsi en raison de leur structure chimique composée des trois cycles du noyau

iminodibenzyle (Figure 20). En 1957, les laboratoires Geigy demandent au psychiatre Roland Kuhn de tester l'imipramine, un puissant antihistaminique aux propriétés sédatives. Kuhn a l'idée d'essayer ce produit dans la dépression et, au bout de trois tests positifs sur une quarantaine de patients, il rapporte que ce composé est en réalité un antidépresseur (Kuhn, 1957).

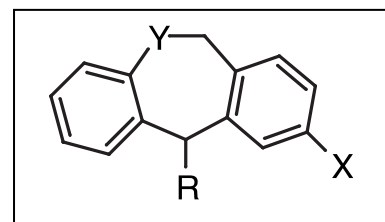


Figure 20 : Structure chimique commune aux antidépresseurs tricycliques
(Varache-lembège, 2007)

Deux autres antidépresseurs tricycliques sont ensuite découverts, l'amitriptyline en 1960 et la trimipramine en 1961.

C'est à la même époque qu'est mise en évidence l'efficacité des antidépresseurs **dans le traitement des douleurs neuropathiques**. Elle résulte en fait de la fréquente comorbidité entre douleurs neuropathiques et dépression. Ainsi, dès 1960, Paoli administre de l'imipramine à des patients déprimés, souffrant de sclérose en plaques. Outre l'amélioration de leur état dépressif, il note que les patients traités par cet antidépresseur présentent une diminution de leurs douleurs neuropathiques. L'efficacité anti-hyperalgésique des antidépresseurs tricycliques a depuis été confirmée vis-à-vis de divers types de douleurs neuropathiques, aussi bien périphériques que centrales (Attal, 2001).

I.2. Antidépresseurs de seconde génération

Dans les années 70, de nouveaux antidépresseurs apparaissent sur le marché, qui ne sont ni des tricycliques ni des IMAO. Ces antidépresseurs de seconde génération se caractérisent avant tout par leur bonne tolérance, du fait d'effets secondaires moins importants que les tricycliques (Lêo et al., 2004).

L'étude des propriétés pharmacologiques des premiers antidépresseurs a permis à Jacques Glowinski et Julius Axelrod (1964) de montrer que l'imipramine et les autres antidépresseurs tricycliques sont des inhibiteurs de la **recapture présynaptique des monoamines** (sérotonine et noradrénaline), et que leurs effets secondaires sont majoritairement dus à leurs actions (antagonistes) annexes sur les récepteurs adrénergiques, muscariniques, histaminiques. Ce constat a conduit à synthétiser des inhibiteurs sélectifs de la recapture des monoamines dépourvus de ces effets annexes dans l'espoir de disposer d'antidépresseurs toujours aussi efficaces mais mieux tolérés

(Schildkraut, 1995). De fait, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine puis les inhibiteurs sélectifs mixtes de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline se sont révélés posséder ces propriétés. Ils sont très largement utilisés aujourd'hui pour réduire les symptômes de la dépression.

Par la suite, d'autres antidépresseurs ont été développés et on assiste aujourd'hui à une multiplication des antidépresseurs proposés sur le marché pharmaceutique. Cette offre thérapeutique est assez **controversée** car les nouvelles molécules ne sont en réalité pas plus efficaces que les premiers antidépresseurs tricycliques et/ou IMAOs. Cependant, leurs effets indésirables, notamment au niveau cardiovasculaire, sont moins importants. De ce fait, la prescription simultanée de plusieurs de ces antidépresseurs de seconde génération chez le même patient a été tentée en vue d'accroître l'efficacité thérapeutique, tout en maintenant les effets indésirables dans des limites tolérables. En réalité, aucun gain d'efficacité n'a véritablement été observé avec ce type de polythérapie (Lôo et al., 2004).

Les premiers antidépresseurs, les tricycliques et les inhibiteurs de la monoamine oxydase, ont été développés au milieu du XX^{ème} siècle. Ces composés ainsi que les antidépresseurs de seconde génération développés par la suite partagent un mécanisme d'action commun, visant à augmenter les taux de monoamines dans la fente synaptique. Ceci a conduit à formuler l'«hypothèse monoaminergique» selon laquelle la dépression serait sous-tendue par une hypoactivité des systèmes monoaminergiques centraux.

Aujourd'hui, les antidépresseurs sont regroupés en différentes classes, selon leurs structures moléculaires et leurs modes d'actions.

II. Classification des antidépresseurs

L'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé a défini quatre catégories d'antidépresseurs (Afssaps, 2008).

II.1. Les antidépresseurs tricycliques

Comme cela a été décrit plus haut, les antidépresseurs tricycliques (TCA) agissent principalement en inhibant la recapture de **sérotonine et de noradrénaline** libérées dans la fente synaptique. Plus précisément, ils exercent leur action inhibitrice sur les transporteurs au niveau des neurones monoaminergiques (tel que le transporteur SERT,

pour la sérotonine). En revanche, leur capacité à inhiber le recapture de dopamine est tout à fait marginale. Ils interagissent aussi directement avec des récepteurs, en particulier les récepteurs histaminiques H1, muscariniques (acétylcholine) et α 1-adrénergiques au niveau desquels ils se comportent comme des antagonistes.

Par ailleurs, les métabolites actifs des antidépresseurs tricycliques peuvent avoir des profils pharmacologiques différents de la molécule mère comme le présente le Tableau 6. En particulier, alors que la chlorimipramine est, *in vitro*, un bloquant sélectif de la recapture de la sérotonine, son métabolite, la desméthylchlorimipramine, n'inhibe que la recapture de noradrénaline, de telle sorte que la sélectivité de la molécule mère disparaît complètement *in vivo*. Il est donc important d'identifier les métabolites des tricycliques et d'en préciser les caractéristiques pharmacologiques pour établir le lien avec l'effet clinique observé chez le patient (Grima, 2008).

<i>Molécule mère /métabolite</i>	<i>Inhibition recapture NA</i>	<i>Inhibition recapture 5 HT</i>
Imipramine	+++	++
<i>Desmethylimipramine</i>	++++	+
<i>Hydroxy-desmethylimipramine</i>	+++	-
Clomipramine	++	+++
<i>Desmethyldomipramine</i>	+++	+
Amitriptyline	++	++
<i>Nortriptyline</i>	+++	++
<i>Hydroxynortriptyline</i>	++	++

Tableau 6 : Profil d'actions de la molécule mère et des métabolites actifs des principaux antidépresseurs tricycliques. Les actions pharmacologiques exercées par la molécule mère et ses métabolites actifs peuvent être très différentes. Cela doit donc être pris en compte pour établir le lien entre l'action pharmacologique de l'antidépresseur et son effet clinique (Grima, 2008).

II.2. Les antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline

Deux classes d'antidépresseurs doivent ici être distinguées, toutes deux caractérisées par leur capacité à inhiber la recapture des monoamines libérées dans la fente synaptique (Figure 21).

Tout d'abord, la classe des **inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS)**, qui sont aujourd'hui les antidépresseurs les plus prescrits. Si l'action des ISRS sur la sérotonine reste très majoritaire, ces composés ne sont cependant pas totalement dépourvus d'effets sur d'autres neurotransmetteurs. Par exemple, la fluoxétine (Prozac®), ISRS majoritairement utilisé, interagit aussi avec le site de recapture de la noradrénaline, mais avec une affinité 10-200 fois plus faible qu'au niveau du site de recapture de la

sérotonine (Grima, 2008). Outre la fluoxétine, le citalopram (et son énantiomère escitalopram), la paroxétine, la sertraline et la fluvoxamine sont des antidépresseurs qui inhibent préférentiellement la recapture de sérotonine.

La seconde classe correspond aux **inhibiteurs mixtes de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSNA)**. Le milnacipran, la venlafaxine et la duloxétine sont des exemples d'IRSNA (Vranken, 2012). Cependant, leurs profils ne sont pas équivalents puisque le milnacipran inhibe autant la recapture de sérotonine et de noradrénaline, alors que les deux autres IRSNA sont beaucoup plus puissants sur la recapture de sérotonine. Par ailleurs, il existe également des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la noradrénaline (ISRNA) comme par exemple la réboxétine et la viloxazine. L'efficacité antidépressive de ces molécules est cependant moindre que celle des autres inhibiteurs de recapture de monoamines.

Enfin ont été développés des inhibiteurs mixtes de la recapture de sérotonine, noradrénaline et dopamine comme par exemple l'amitifadine, l'indatraline et la tésofensine. Ces composés sont en réalité des homologues de la cocaïne, et le risque de dépendance constitue une limite à leur utilisation thérapeutique pour le traitement de la dépression (Corruble, 2013).

II.3. Les antidépresseurs inhibiteurs de la monoamine oxydase

La monoamine oxydase (MAO) est une enzyme intracellulaire, localisée dans la paroi externe des mitochondries, qui convertit les monoamines en aldéhydes (qui sont ensuite oxydés en acides, finalement éliminés par voie urinaire principalement). On en distingue deux isoformes : la MAO-A, qui dégrade préférentiellement la sérotonine et la noradrénaline, et la MAO-B, qui dégrade la phényléthylamine. La dopamine, la tyramine et la tryptamine sont des substrats pour les deux isoformes. La majorité des antidépresseurs inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO) tels que l'iproniazide, la tranylcypromine, la phéniprazine, sont peu spécifiques et inhibent les deux isoformes. Cependant, leur effet

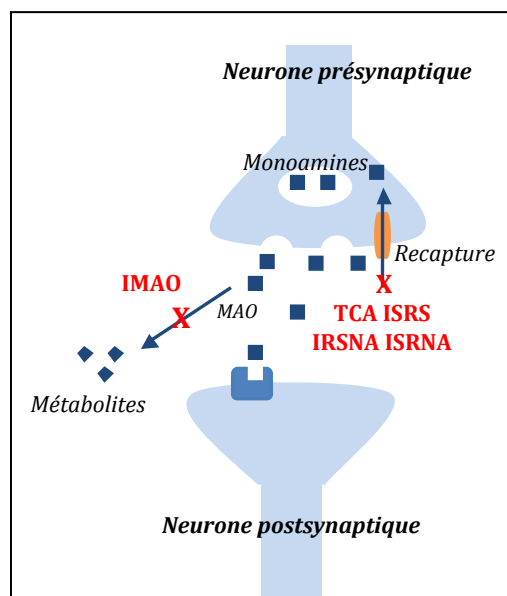


Figure 21 : Mécanisme d'action des antidépresseurs TCA, ISRS, IRSNA et IMAO, conduisant à une augmentation des monoamines dans la fente synaptique.

antidépresseur résulte uniquement de l'inhibition de la MAO-A. En outre, des inhibiteurs sélectifs de la MAO-A ont été développés, comme par exemple le moclobémide, pour constituer une autre classe d'antidépresseurs (Corruble, 2013).

II.4. Autres antidépresseurs

Des molécules dont le **mécanisme d'action diffère** des trois classes précédentes ont été identifiées comme exerçant des effets antidépresseurs d'intérêt thérapeutique. Il s'agit en particulier de la miansérine, qui est un antagoniste des récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques, histaminiques H1 et des récepteurs 5-HT_{2A/2C} de la sérotonine (Peroutka and Snyder, 1981). Un autre antidépresseur «atypique» est la mirtazapine, dont le profil pharmacologique s'apparente à celui de la miansérine, avec, en plus, une puissante action antagoniste sur les récepteurs 5-HT₃ (Croom et al., 2009). Du fait de leur action antagoniste sur les récepteurs H1, aussi bien la miansérine que la mirtazapine ont des effets sédatifs, qu'on peut mettre à profit pour le traitement de dépressifs agités.

Enfin, un dernier antidépresseur au mécanisme d'action particulièrement original, l'agomélatine, a été mis sur le marché récemment. Cette molécule est à la fois agoniste des récepteurs MT1 et MT2 de la mélatonine et antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C} de la sérotonine. Des études électrophysiologiques ont cependant montré qu'*in vivo*, l'agomélatine facilitait les neurotransmissions monoaminergiques centrales, et reproduisait ainsi, mais par d'autres voies, les effets des autres classes d'antidépresseurs. D'ailleurs, comme les antidépresseurs tricycliques en particulier, l'agomélatine réduit aussi les douleurs neuropathiques (Chenaf et al., 2014, ECNP).

Bien qu'il s'agisse dans tous les cas d'antidépresseurs avérés, les diverses molécules décrites ci-dessus n'exercent pas exactement les mêmes effets, et leur niveau de prescription présente des **variations importantes** en fonction des phénotypes des patients, et de nombreux autres facteurs culturels, économiques, etc.

III. Le marché des antidépresseurs

III.1. Profil de la «consommation» des antidépresseurs

III.1.1. Une consommation élevée mais stabilisée

Depuis 2011, la France **n'est plus en tête des pays «consommateurs»** d'antidépresseurs. Ceci résulte d'une augmentation moins rapide de sa consommation par

rapport à d'autres pays, tels que le Canada, l'Islande et l'Australie en tête de ce classement. Alors qu'en 2000 la France était le quatrième pays le plus consommateur d'antidépresseurs, elle n'occupe désormais que le 13^{ème} rang, avec une consommation quotidienne de 50 comprimés pour 1000 habitants (dernières données de l'OCDE, 2013).

Cependant, bien que stabilisée, **la consommation d'antidépresseurs reste élevée** dans notre pays. En effet, en 2013, plus de 45 millions de boîtes ont été vendues, ce chiffre étant corrélé à une prescription d'antidépresseurs à plus de 6% de la population (CPAM, 2015).

III.1.2. Une consommation dominée par les ISRS

Au moins depuis 2008, les **ISRS représentent la très grande majorité** des antidépresseurs prescrits en France (Figure 22; données de la CPAM, 2015). Développés après les tricycliques, ces antidépresseurs ont connu un fort engouement du fait de leurs plus faibles effets secondaires, permettant des prescriptions relativement sécurisées non seulement par les psychiatres mais aussi, et surtout, par les généralistes. C'est d'abord pour cette raison que la classe des ISRS est restée en tête des prescriptions au cours des dix dernières années.

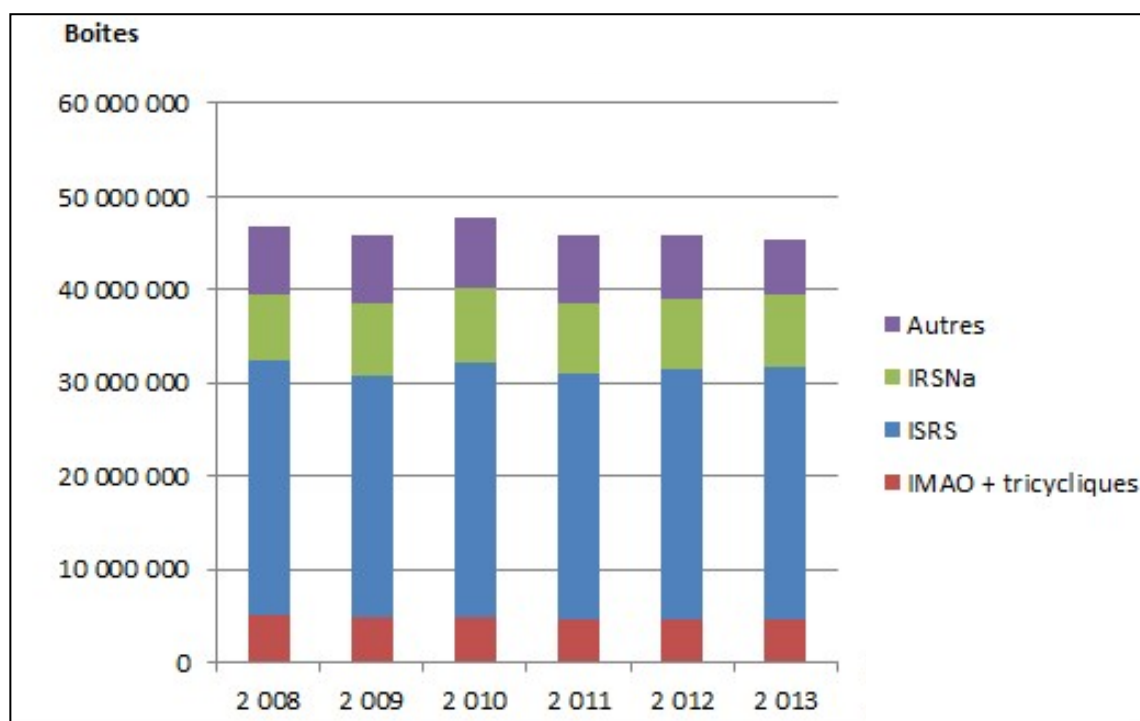


Figure 22 : Evolution des ventes (en nombre de boîtes vendues) en France, entre 2008 et 2013, des quatre classes d'antidépresseurs (CPAM 2015).

Il est important de noter que le profil d'évolution de la consommation des antidépresseurs varie selon **chaque molécule** et n'est pas identique pour tous les membres d'une même classe pharmacologique. Ainsi, dans le cas des IRSNA entre 2008 et 2013, la consommation de duloxétine a augmenté alors que celle de venlafaxine a baissé.

Pour tenter de comprendre les raisons de ces différences, sans doute faudrait-il prendre en compte les profils pharmacologiques respectifs des antidépresseurs d'une même classe pharmacologique. En l'occurrence, un élément clé semble être la prescription croissante de certains antidépresseurs, notamment la duloxétine et l'amitriptyline, pour le traitement des douleurs neuropathiques.

III.2. Prescription des antidépresseurs pour le traitement des douleurs neuropathiques

Les douleurs neuropathiques représentent, depuis quelques années, une des indications majeures des antidépresseurs (Bouhassira and Attal, 2012). Pourtant, les mécanismes en cause dans l'efficacité anti-hyperalgésique et/ou anti-allodynique des antidépresseurs restent encore mal compris. Si l'activation de structures cérébrales à l'origine de la modulation inhibitrice de la nociception a récemment pu être impliquée, c'est l'augmentation des concentrations extracellulaires des monoamines, actives au niveau de leurs récepteurs synaptiques, qui est le plus souvent évoquée comme raison majeure de leur efficacité (Corruble, 2013).

De plus, c'est essentiellement sur les **douleurs neuropathiques diabétiques** que l'efficacité anti-hyperalgésique et/ou anti-allodynique des antidépresseurs a été validée, du fait de la sélection plus fréquente de ce type de douleurs pour les essais cliniques. On estime qu'aujourd'hui 45% des patients souffrant de douleurs neuropathiques du diabète sont traités par des antidépresseurs (Spiller, 2012). Les trois antidépresseurs les plus prescrits chez ces patients sont la duloxétine, la venlafaxine et l'amitriptyline.

III.2.1. Les TCA: amitriptyline, imipramine, désipramine

Les antidépresseurs tricycliques sont recommandés comme traitement de première intention des douleurs neuropathiques, avant l'utilisation d'autres antidépresseurs comme les IRSNA ou d'autres classes thérapeutiques comme les anticonvulsivants (Xu et al., 2016). Une étude réalisée en 2013-2014 rapporte en effet **l'efficacité supérieure** des tricycliques par rapports aux autres traitements proposés. Cette étude évalue l'efficacité

des molécules à l'aide du NNT (*number needed to treat*), qui quantifie le nombre de patients à traiter pour qu'au moins l'un d'entre eux y réponde positivement, et soit donc soulagé. Le NNT est de 3,6 pour les TCA, alors qu'il atteint 6,4 pour les IRSNA et 7,7 pour la prégabaline (Finnerup et al., 2015). Ces données sont toutefois à nuancer, car les antidépresseurs ont été développés sur plusieurs décennies, or l'effet placebo évolue au cours du temps (pour diverses raisons, notamment liées à la qualité de la prise en charge) (Tuttle et al., 2015).

La capacité des antidépresseurs tricycliques à réduire les douleurs neuropathiques du diabète, postherpétiques, ou causées par un AVC est aujourd'hui parfaitement établie. En revanche, leur efficacité vis à vis des douleurs liées au SIDA reste controversée (Attal, 2001). D'une manière générale, si l'imipramine et la désipramine ont donné des résultats positifs dans les essais cliniques, **l'amitriptyline** domine largement par son efficacité, il s'agit donc du TCA le plus prescrit chez les patients souffrant de douleurs neuropathiques.

Du fait d'effets secondaires relativement importants, et qui peuvent être mal tolérés, l'amitriptyline n'est pas toujours l'antidépresseur le plus adapté. On lui substitue alors un IRSNA qui est souvent mieux supporté.

III.2.2. Les IRSNA: duloxétine, venlafaxine

Parmi les IRSNA, l'antidépresseur de référence pour les douleurs neuropathiques est **la duloxétine** (Cymbalta®). Les ventes de duloxétine sont estimées atteindre 80 millions de dollars US en 2019, sur les sept marchés majeurs des douleurs neuropathiques. En France, ce chiffre atteindrait 7 millions de dollars US en 2019, montrant une progression très importante depuis 2010, où les ventes pour cet antidépresseur représentaient alors 4 millions de dollars US (Datamonitor, 2011). A la différence de l'amitriptyline qui est recommandée pour plusieurs types de douleurs neuropathiques (cf ci-dessus), c'est essentiellement chez les **patients diabétiques** que la duloxétine est indiquée (NeuroPerspective, 2012).

L'autre antidépresseur IRSNA prescrit pour réduire les douleurs neuropathiques est la venlafaxine (Bouhassira and Attal, 2012). Toutefois, son efficacité semble inférieure à celle de la duloxétine et sa prescription est de fait bien plus limitée. Des essais cliniques doivent encore être réalisés pour en préciser les conditions d'utilisation optimales.

III.2.3. Les ISRS: fluoxétine, paroxétine, citalopram

Peu d'essais cliniques concernent cette classe d'antidépresseurs et ceux qui ont été réalisés démontrent une efficacité inférieure aux IRSNA et aux TCA. Pour la fluoxétine par exemple, aucune différence n'a été observée en comparaison du placebo. En revanche, la paroxétine et le citalopram ont, quant à eux, montré une certaine efficacité contre les douleurs neuropathiques du diabète (Attal, 2001).

Ainsi, pour le traitement des douleurs neuropathiques par les antidépresseurs, ce sont les **TCA** et les **IRSNA** qui sont prescrits le plus souvent, alors que les ISRS sont utilisés en priorité pour réduire une dépression. Cette distinction souligne que la comorbidité «dépression-douleurs neuropathiques» ne signifie pas nécessairement l'implication de mécanismes physiopathologiques partagés.

Essentiellement quatre classes d'antidépresseurs sont disponibles aujourd'hui, qui se distinguent selon leurs mécanismes d'actions et leurs structures moléculaires. Si les ISRS sont les plus prescrits pour réduire la dépression, ce sont le TCA amitriptyline et l'IRSNA duloxétine qui sont les antidépresseurs le plus largement utilisés pour soulager les douleurs neuropathiques.

Enfin, il convient de souligner, pour conclure cette partie, que les antidépresseurs présentent certaines limites dans le traitement des douleurs neuropathiques.

IV. Limites de l'utilisation des antidépresseurs dans le traitement des douleurs neuropathiques

Plusieurs besoins médicaux restent insatisfaits dans le traitement des douleurs neuropathiques par les antidépresseurs, qu'ils soient proposés en première ou seconde intention. Les limites portent sur l'efficacité, la sécurité et le délai d'action de ces molécules.

IV.1. Manque d'efficacité

Au mieux, **seule la moitié des patients** traités par les antidépresseurs répond au traitement et présente une réduction significative des douleurs (Duman, 2010). En outre, cette réponse n'est jamais totale et la réduction des douleurs atteint 50% dans le meilleur des cas (Grima, 2008).

De fait, l'efficacité des antidépresseurs peut être extrêmement variable d'un patient à l'autre, même lorsqu'ils souffrent du même type de douleur neuropathique (patients diabétiques par exemple). Chez les patients «mauvais répondeurs», voire résistants au traitement, la dose d'antidépresseur peut ne pas être la bonne, expliquant le résultat négatif. Mais en raison de leurs effets secondaires mal tolérés, les antidépresseurs ne peuvent pas être administrés à des doses élevées. Ainsi, beaucoup de patients ne bénéficient probablement pas de la dose «personnalisée» optimale qui entrainerait un soulagement de leurs douleurs.

IV.2. Effets secondaires indésirables

Le manque de sécurité des antidépresseurs est la seconde limite majeure à leur prescription pour soulager les douleurs neuropathiques. Parmi les quatre classes d'antidépresseurs, ce sont les TCA qui induisent le plus d'effets secondaires indésirables en raison de leurs cibles d'actions variées (Grima, 2008). Toutefois, du fait de leur efficacité supérieure aux ISRS, ils restent tout de même les plus prescrits dans la prise en charge des douleurs neuropathiques.

Les effets indésirables s'avèrent clairement dépendants de la dose. Pour les TCA, la sécheresse de la bouche est le symptôme le plus couramment observé et semble indissociable de son effet thérapeutique. Les ISRS et les IRSNA sont principalement concernés par des troubles de la digestion et des nausées. Les autres effets indésirables, communément retrouvés pour l'ensemble de ces antidépresseurs, sont une hypotension, des céphalées, une sudation excessive, la sédation, la confusion, des tremblements, des vertiges, ... (Martinez et al., 2010) (Corruble, 2013)

Ces effets indésirables altèrent la qualité de vie du patient et peuvent le conduire à **arrêter sa thérapie**. Ils représentent ainsi une réelle limite dans le traitement des douleurs neuropathiques.

IV.3. Délai d'action

Même lorsqu'ils sont efficaces et bien tolérés, les antidépresseurs ne réduisent les douleurs neuropathiques qu'au bout de plusieurs jours, voire **plusieurs semaines**, de traitement (Attal, 2001). De même que les effets indésirables, ce délai d'action peut conduire le patient à arrêter son traitement.

Le traitement des douleurs neuropathiques par les antidépresseurs souffre de limites majeures inhérentes à leur manque d'efficacité, leur faible sécurité et leur délai d'action. Dans le meilleur des cas, le soulagement des douleurs n'atteint que 50%, et les doses prescrites ne peuvent être augmentées en raison des effets indésirables.

Afin d'améliorer l'arsenal thérapeutique proposé dans le traitement des douleurs neuropathiques, le développement de nouveaux antidépresseurs est une des solutions envisagées. Toutefois, jusqu'à présent, aucune molécule ne s'est avérée plus efficace que les tricycliques, premiers antidépresseurs prescrits dans cette pathologie. Pour remédier aux limites rencontrées par les antidépresseurs, et au-delà des approches adressant classiquement les voies de neurotransmission, cette thèse s'intéresse à une autre cible cellulaire, les astrocytes, récemment impliquée dans leur action. Préciser le lien entre astrocytes, antidépresseurs et douleurs neuropathiques requiert dans un premier temps des études chez l'animal dont un «état de l'art» est présenté dans le chapitre suivant.

Troisième partie : les astrocytes

I. Les astrocytes, cellules majoritaires de la glie

I.1. Les cellules gliales

I.1.1. Une prise en compte tardive de leurs fonctions

Les cellules gliales représentent la seconde population cellulaire du système nerveux, en dehors des neurones, elles ont été découvertes il y a plus de 150 ans (Molenaar, 2003). C'est en **1838** que Robert Remark identifie pour la première fois la présence de cellules non neuronales, qui seraient à l'origine de la gaine de myéline. Ces travaux sont confirmés par Theodor Schwann puis affinés par l'historien français Louis Ranvier en 1871 qui introduit le nom de «cellules de Schwann», correspondant à un type de cellules gliales du système nerveux périphérique. Les autres types cellulaires seront identifiés plus tardivement, au début du XX^{ème} siècle. L'avènement de la microscopie électronique permettra par la suite de réaliser des progrès rapides dans la connaissance de la glie (Zalc and Rosier, 2016).

De plus, les cellules gliales ont pendant longtemps été **sous considérées** dans le domaine des neurosciences, ce qui leur doit le nom de «cellules cérébrales oubliées». En effet, seuls les neurones étaient jugés importants pour assurer le bon fonctionnement du cerveau. Toutefois, le rôle physiologique des cellules gliales au sein du système nerveux, aussi bien périphérique que central, est maintenant largement décrit et admis au sein de la communauté scientifique. De plus, c'est aujourd'hui le complexe neurone-glie qui est considéré comme unité fonctionnelle du cerveau et non uniquement les neurones (Jha et al., 2012).

Qualifiées de «glue» ou de «cellules de soutien» les cellules gliales assurent la protection, la nutrition, l'isolation des neurones et participent au maintien de l'homéostasie du système nerveux central. A la différence des neurones, ces cellules ne forment pas de potentiel d'action, toutefois elles participent au contrôle de l'environnement chimique et électrique des neurones par la synthèse et la libération de différentes molécules dont des neurotransmetteurs (Tiwari et al., 2014).

Historiquement, différents types de cellules gliales ont été définis.

I.1.2. Les trois types de cellules gliales

Les cellules gliales représentent **70% des cellules** retrouvées au niveau du cerveau et de la moelle épinière (Eroglu and Barres, 2010). Il est tout d'abord important de noter que selon leur localisation, au niveau du système périphérique ou central, les cellules d'un même type cellulaire ne portent pas le même nom (Vallejo et al., 2010). Le tableau ci-dessous résume les trois différents types de cellules gliales pouvant être rencontrés (Tableau 7).

Type cellulaire retrouvé au niveau périphérique	Type cellulaire retrouvé au niveau central		Origine des cellules
Cellules satellites	Astrocytes	Macroglie	Cellules souches neuronales mésodermiques
Cellules de Schwann	Oligodendrocytes		Cellules souches neuronales mésodermiques
Macrophages	Cellules microgliales		Système immunitaire ectodermique

Tableau 7 : Les trois types cellulaires de la glie au niveau du système nerveux périphérique et central

Parmi les cellules gliales, on retrouve tout d'abord **les macrophages et la microglie** qui représentent 5 à 10% des cellules gliales. Ce type cellulaire est impliqué principalement dans la réponse immunitaire, mise en place suite à une atteinte du système nerveux. De plus, la microglie a récemment été décrite dans la plasticité neuronale et son dysfonctionnement est impliqué dans différentes maladies neuropsychiatriques (Blank and Prinz, 2013).

Représentant 90 à 95% des cellules gliales, la macroglie est quant à elle très majoritaire. Elle regroupe deux types cellulaires : **les cellules satellites et les astrocytes** ainsi que **les cellules de Schwann et les oligodendrocytes**. Ces derniers entourent les nerfs, ils participent à la myélinisation des axones et servent de support trophique. Les cellules de Schwann et les oligodendrocytes sont ainsi responsables du maintien du transport axonal et de la conduction rapide du message nerveux. Les astrocytes, appelées cellules satellites au niveau périphérique, présentent quant à eux la particularité d'être au contact de vaisseaux sanguins ce qui leur confère des fonctions spécifiques présentées dans la partie suivante (Moalem and Tracey, 2006).

En outre, une quatrième population de cellules gliales a été découverte plus récemment au sein du système nerveux central : les cellules NG2, aujourd'hui considérées comme une classe à part entière. Ces cellules sont les précurseurs des oligodendrocytes (Hill et al., 2014).

Les cellules gliales du système nerveux central, impliquées dans l'approche Theranexus et le projet de cette thèse, sont les astrocytes. La partie suivante présente donc leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles. A noter que les cellules satellites partagent les mêmes fonctions, toutefois cela s'applique au niveau périphérique.

I.2. Les astrocytes

Représentant à eux seuls plus de 50% des cellules cérébrales, les astrocytes sont **la population gliale la plus importante** (Kettenmann and Verkhratsky, 2011). Ils ont été appelés ainsi pour la première fois en 1893, étant donné leur forme en étoile (star-like cell) (Slowik et al., 1983). Ces cellules sont les plus nombreuses mais aussi les plus diversifiées au sein du système nerveux central. Si la majorité des astrocytes ressemble à des étoiles avec des «bras» venant du soma, ils présentent toutefois une hétérogénéité morphologique importante (Jha et al., 2012).

I.2.1. Morphologie astrocytaire

I.2.1.1. Classification morphologique

Basés sur leurs différences morphologiques, deux principaux types d'astrocytes ont été définis. Ils correspondent à ceux schématisés sur la Figure 23 : les astrocytes **fibrillaires** (ou fibreux) et les astrocytes **protoplasmiques** (Sanacora and Banasr, 2013). Ces deux types astrocytaires diffèrent par leur morphologie mais également par leur localisation et leur densité (Kettenmann and Verkhratsky, 2011), comme le présente le tableau ci-dessous (Tableau 8).

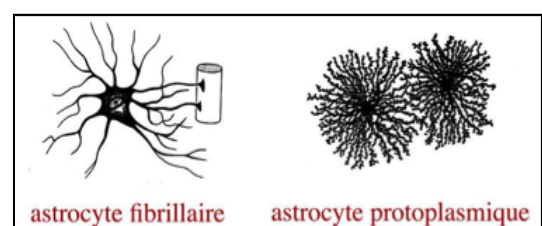


Figure 23 : Deux morphologies d'astrocytes

Type d'astrocytes	Localisation	Morphologie de leurs bras	Densité
Protoplasmique	Matière grise	<ul style="list-style-type: none"> • Bras fins • Longueur moyenne de 50 μm • Bras très complexes et élaborés. • En contact avec les vaisseaux sanguins, ils forment des pieds périvasculaires. • Multiples contacts avec les neurones. 	10 000 à 30 000 cellules par mm^3
Fibrillaire	Matière blanche	<ul style="list-style-type: none"> • Bras particulièrement longs (jusqu'à 300μm) • Bras peu élaborés. • Etablissement de pieds périvasculaires • Extensions des bras qui contactent les axones au niveau des nœuds de Ranvier. 	200 000 cellules par mm^3

Tableau 8 : Principales différences entre les deux types d'astrocytes

Il est aujourd'hui établi que le niveau d'hétérogénéité morphologique des astrocytes est plus complexe. En outre, la morphologie des astrocytes varie d'une espèce à l'autre, notamment entre la souris, le rat et l'homme. Par ailleurs, en plus de leurs différences morphologiques, ces cellules gliales diffèrent par leur localisation plus ou moins proche des vaisseaux sanguins, les canaux ioniques qu'ils contiennent ou leurs antigènes (Mika et al., 2013). De plus, un autre critère qui contribue à l'hétérogénéité des astrocytes est la différence des récepteurs qu'ils expriment.

I.2.1.2. Récepteurs astrocytaires

Les astrocytes expriment des récepteurs **ionotropes et métabotropes**. Six classes de récepteurs astrocytaires sont décrites : glutamatergique, glycinergique, gabaergique, aminergique, purinergique, peptidergique (Figure 24).

Les récepteurs astrocytaires diffèrent **selon le tissu** dans lequel sont localisés les astrocytes et sont souvent corrélés à ceux des neurones voisins (Theis and Giaume, 2012). Par exemple, les astrocytes de la moelle épinière sont les seuls à exprimer des récepteurs à la glycine, or dans ce tissu la glycine s'avère être le principal neurotransmetteur inhibiteur (Kirchhoff et al., 1996).

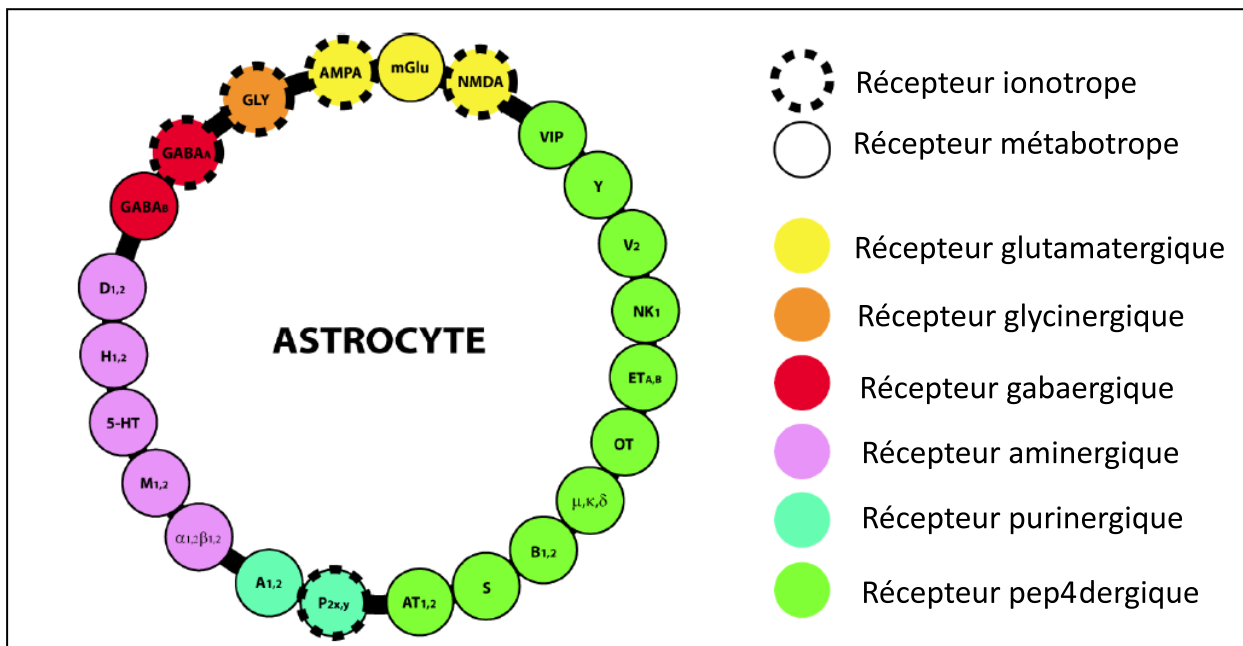


Figure 24 : Les différents types de récepteurs astrocytaires. Les astrocytes expriment des récepteurs au glutamate, à la glycine, au gaba, à l'ATP, aux monoamines incluant notamment la dopamine, la sérotonine et la noradrénaline, ainsi qu'à de nombreux peptides dont la morphine, la substance P, l'angiotensine ou encore l'endothéline. (Adapté de Verkherasky and Butt, 2007).

Par ailleurs, les protéines exprimées par les astrocytes servent de marqueurs de ces cellules gliales. Ces protéines diffèrent également entre les astrocytes.

I.2.1.3. Marqueurs morphologiques

La présence de filaments intermédiaires, constituant le cytosquelette des astrocytes, est un critère morphologique essentiel permettant de les reconnaître et de les étudier. Ces filaments sont formés des protéines dont la Glial Fibrillary Acidic Protein (**GFAP**) et la vimentin. L'expression de GFAP est communément utilisée comme **marqueur spécifique** des astrocytes. Toutefois, *in situ* les niveaux d'expression de GFAP présentent une grande variabilité et tous les astrocytes ne l'expriment pas. Au niveau du cortex par exemple, seulement 15 à 20% des astrocytes expriment ce marqueur. Par ailleurs, les astrocytes fibrillaires expriment fortement la GFAP, alors que les astrocytes protoplasmiques ne l'expriment que faiblement (Kettenmann and Verkhratsky, 2011).

Ainsi, lors de marquage immunohistochimique ou lors de marquages corticaux, un autre marqueur que la GFAP sera utilisé tel que le **S100 β** , protéine astrocytaire se fixant au calcium. Le S100 β est le plus ancien marqueur astrocytaire utilisé. Majoritairement exprimée par les astrocytes protoplasmiques au niveau de leur cytoplasme, cette protéine est également sécrétée dans l'espace extracellulaire, ce qui permet de la détecter dans le

sérum des patients (Sen and Belli, 2007). Elle est impliquée dans de nombreuses fonctions telle que la régulation calcique et joue également le rôle de facteur neurotrophiques (Sofroniew, 2014).

En plus des variabilités morphologiques, il existe également une hétérogénéité fonctionnelle entre les astrocytes. Toutefois, ils assurent tous des fonctions essentielles pour le bon fonctionnement des neurones.

I.2.2. Fonctions astrocytaires

I.2.2.1. Fonction trophique

Au cours du développement embryonnaire, les astrocytes assurent la **migration** des neurones et guident les axones grâce à des molécules de surface. Ces dernières permettent l'adhérence des neurones à la glie et sont constituées notamment par la fibronectine, l'astrotactine ou encore la laminine (Fix, 2006).

De plus, les astrocytes ont un rôle établi dans la **formation des synapses** neuronales. Il a en effet été observé lors de co-cultures que le nombre de synapses augmente lorsque les neurones sont en présence d'astrocytes (Pfrieger and Barres, 1997). Ces derniers secrètent plusieurs molécules impliqués dans la formation des synapses: thrombospondine (TSP), Hevin, SARC (Fix, 2006).

Les astrocytes, en plus de leur rôle clef dans la synaptogénèse, permettent également le bon développement et la survie des neurones ainsi que la croissance des neurites. Pour assurer ces fonctions, ils synthétisent et libèrent différents **facteurs trophiques** tel que le BDNF, le FGF-2 (fibroblast growth factor 2), l'IGF-1 (insulinlike growth factor 1) ou le GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) (Vallejo et al., 2010).

I.2.2.2. Fonction métabolique

- **Glycolyse**

Les terminaisons des bras des astrocytes, appelés pieds astrocytaires (endfeet), sont au contact des vaisseaux sanguins. De fait, les astrocytes peuvent capter le glucose sanguin. Ce dernier est dans un premier temps converti en glycogène et stocké sous cette forme pour servir de réserve énergétique au niveau du cerveau (Pellerin et al., 2007).

D'autre part, les astrocytes sont impliqués dans la **glycolyse** du glucose sanguin, impliquant sa transformation en pyruvate puis en lactate, comme l'indique la figure de la page suivante (Figure 25). Alors que le pyruvate est incorporé par les mitochondries et produira de l'énergie au niveau des astrocytes, le lactate va quant à lui être libéré dans le milieu extracellulaire et servir de substrat énergétique aux neurones. Lors d'une grande demande énergétique, le lactate est utilisé par les neurones de façon préférentielle au glucose (Bouzier-Sore and Pellerin, 2013). Par ailleurs, le fait de bloquer la production de lactate astrocytaire empêche la dépolarisation des neurones (Tiwari et al., 2014).

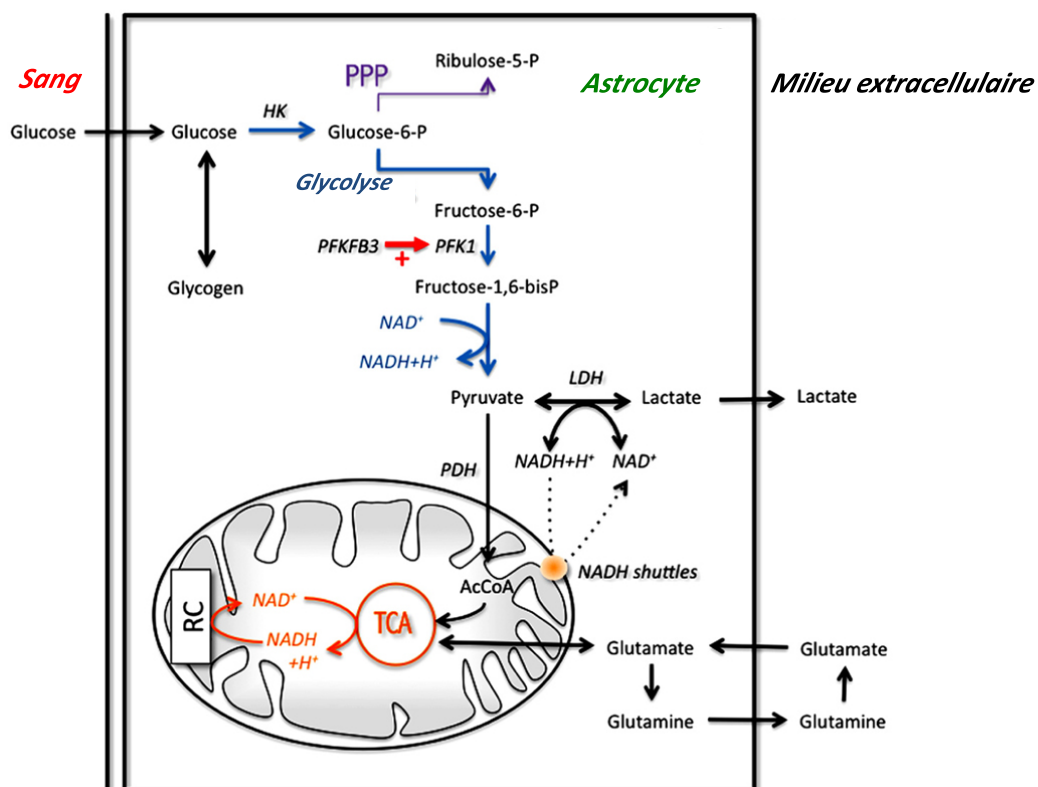


Figure 25 : Transformation du glucose sanguin en lactate au sein des astrocytes
(Bouzier-Sore and Pellerin, 2013)

- **Maintien de l'homéostasie**

Le transport de l'influx nerveux par les neurones activés conduit à des perturbations métaboliques, notamment à la libération importante **d'ions K⁺ et de glutamate** dans le milieu extracellulaire, qui vont être transportés au sein des astrocytes.

Tout d'abord, les astrocytes vont capturer les ions K⁺ ce qui permet aux neurones de se repolariser et évite des perturbations enzymatiques ou des risques d'œdème liés à une

concentration potassique trop importante. Dans un premier temps, les ions K^+ vont pénétrer au sein des astrocytes à l'aide d'un transport passif. Puis, si la concentration intracellulaire potassique augmente de façon importante, les pompes K^+/Na^+ ATPase-dépendantes et les systèmes de transport KCl et $NaCl$ vont être activés pour permettre l'entrée des ions K^+ dans les astrocytes. Une fois capturés, les ions K^+ vont diffuser d'un astrocyte à l'autre et être libérés dans le milieu extracellulaire *via* des canaux membranaires, ce qui évite une concentration intracellulaire trop importante (Walz, 1989). La diffusion entre les astrocytes est possible par leur communication intercytoplasmique assurée par des jonctions communicantes, ceci est davantage développé dans la partie suivante (Partie 4 sur les connexines).

De plus, le glutamate est également transporté au niveau astrocytaire, par des récepteurs ioniques et métabotropes. Une fois capté par l'astrocyte, le glutamate va être métabolisé en glutamine par la glutamine synthétase. La glutamine libérée par les astrocytes sera quant à elle capturée par les neurones présynaptiques. La diminution de la concentration extracellulaire de glutamate permet entre autres de réduire l'excitabilité neuronale et d'éviter le déclenchement de crises d'épilepsie (Kaneko et al., 1988).

I.2.2.3. Fonction protectrice

Les astrocytes assurent une protection aux neurones et ont ainsi une fonction de **barrière**. Ils peuvent en effet créer des barrières fonctionnelles pour restreindre l'infiltration de cellules immunitaires inflammatoires dans les tissus du système nerveux central. Ils contribuent notamment, avec les cellules endothéliales, à la mise en place de la barrière hémato-encéphalique par leur contact avec les vaisseaux sanguins (Sofroniew, 2014).

I.2.2.4. Fonction immunologique

De même que les cellules immunitaires, les astrocytes sont capables de synthétiser des **cytokines** proinflammatoires ($IL-1\beta$, $IL-6$, $TNF-\alpha$) ou anti-inflammatoires ($TGF-\beta$). De plus ils assurent la présentation d'antigènes aux lymphocytes T (Sofroniew, 2014).

I.2.2.5. Fonction synaptique

En plus de leur support trophique et métabolique, les astrocytes sont également capables d'interagir avec les neurones pré et postsynaptiques par le biais de différents

gliotransmetteurs (cités ci-dessous). Ils sont ainsi décrits comme le troisième acteur des synapses neuronales, ce qui est à l'origine de l'appellation «synapse tripartite» (Araque et al., 1999).

- **Interaction présynaptique**

Tout d'abord, les astrocytes sont à l'origine de la transformation du glutamate, provenant des neurones présynaptiques, en glutamine. Cette dernière est libérée par les astrocytes puis captée par les neurones présynaptiques où elle sera convertie en glutamate par l'enzyme glutaminase. De plus, comme cela a été mentionné ci-dessus, les astrocytes libèrent du lactate qui est capté par les neurones présynaptiques pour servir de substrat énergétique (Volterra and Meldolesi, 2005).

Par ailleurs, les neurones présynaptiques libèrent quant à eux différentes molécules qui se fixent à des récepteurs astrocytaires, telle que la substance P, l'ATP ou la CGRP, et peuvent conduire à une activation des astrocytes (Mika et al., 2013).

- **Interaction postsynaptique**

Les astrocytes libèrent du glutamate et de la D-sérine capables d'induire une activation des neurones postsynaptiques, en se fixant aux canaux NMDA (Guo et al., 2007). De plus, les neurotrophines libérées par les astrocytes, tel que le BDNF, sont un autre exemple de molécules astrocytaires capables de moduler l'activité postsynaptique (Sanacora 2013).

L'ensemble de ces échanges entre les astrocytes et les neurones, à l'origine de la synapse tripartite (Figure 26).

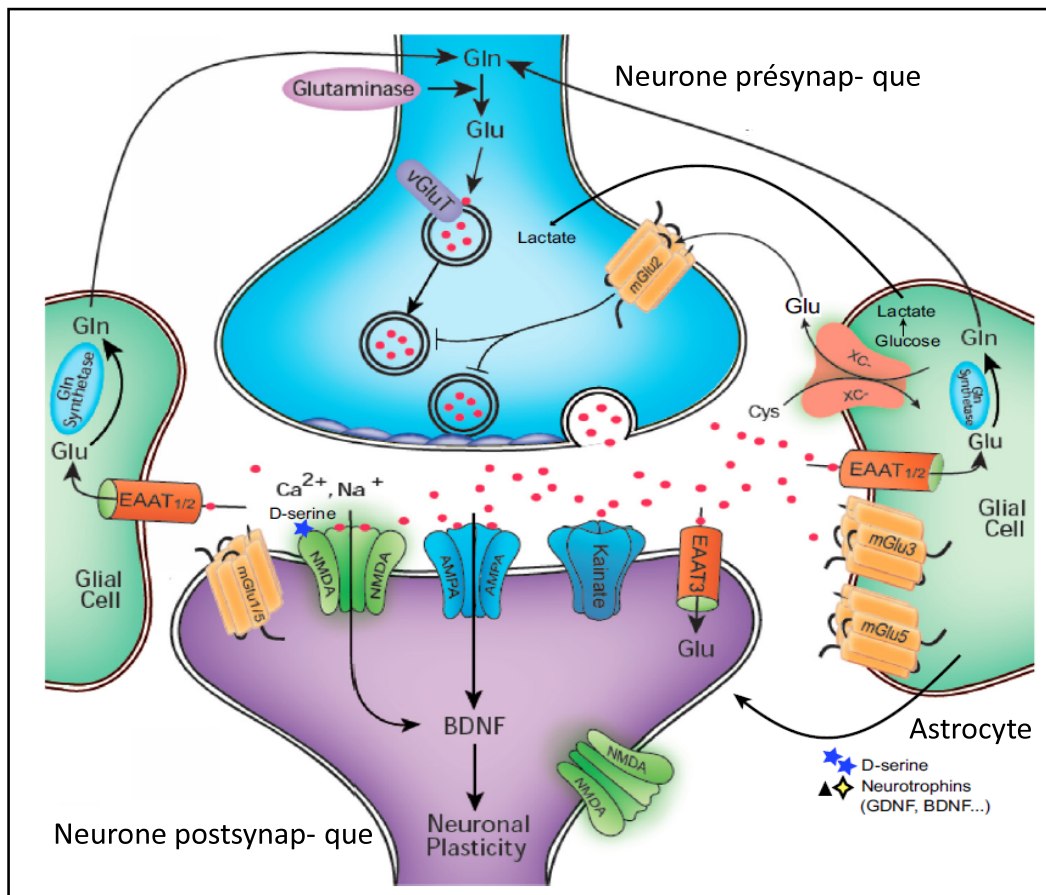


Figure 26 : Synapse tripartite. Les neurones présynaptiques libèrent du glutamate, transporté au sein des astrocytes où il sera converti en glutamine (Gln). Cette dernière sera captée par les neurones présynaptiques, pour permettre la production de glutamate, de même que le lactate astrocytaire qui sert de substrat énergétique. Les neurotrophines (BDNF, GDNF) astrocytaires participent à l'activité du neurone postsynaptique, qui sera également activé par la fixation du glutamate sur les récepteurs NMDA et AMPA (Adapté de Sanacora and Banasr, 2013).

Par ailleurs, les astrocytes ont pendant longtemps été considérés comme des cellules non-excitables. Aujourd'hui, on sait que les astrocytes, bien qu'ils ne produisent pas de potentiels d'action, sont capables d'être activés et qu'ils induisent en conséquence la libération de différentes molécules impliquées dans l'activation gliale et neuronale. On parle alors d'«astrocytes réactifs».

I.2.3. Réactivité astrocytaire

I.2.3.1. Activation des astrocytes

L'activation des astrocytes est retrouvée en conditions pathologiques. Elle est corrélée à une augmentation calcique intracellulaire, qui peut être d'origine extracellulaire ou intracellulaire (Vallejo et al., 2010).

Tout d'abord, suite à une lésion ou une infection du système nerveux central, les astrocytes peuvent être activés par différentes molécules provenant du milieu **extracellulaire**. On retrouve les cytokines proinflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF- α) libérées par les cellules immunitaires et la microglie. De plus, les astrocytes expriment des récepteurs pour la majorité des neurotransmetteurs et neuromodulateurs, ils peuvent notamment être activés par la substance P, la CGRP, l'ATP ou encore le glutamate libérés par les neurones présynaptiques. En se fixant à leurs récepteurs astrocytaires, ces molécules induisent l'activation de la phospholipase C. Cette enzyme entraîne la libération d'IP₃ (Inositol 1,4,5-triphosphate) qui, en se fixant sur ses récepteurs au niveau du réticulum endoplasmique, va conduire à la libération massive de calcium intracellulaire (Volterra and Meldolesi, 2005).

D'autre part, l'activation des astrocytes peut être **intercellulaire**. Dans ce cas, elle est induite par l'entrée de calcium et d'IP₃ provenant des astrocytes réactifs voisins et diffusés d'un astrocyte à l'autre par les jonctions communicantes. Ceci correspond aux «vagues calciques» présentes au niveau des astrocytes, processus davantage détaillé dans la partie suivante.

Une fois devenus réactifs par cette augmentation calcique intracellulaire, les astrocytes vont avoir une activité renforcée. Ceci fait partie d'un des critères permettant de les identifier.

I.2.3.2. Caractéristiques des astrocytes réactifs

Différents éléments caractérisent les astrocytes réactifs:

- **L'augmentation de leur nombre et leur hypertrophie.** Le premier critère observé en présence d'astrocytes réactifs, au-delà de leur multiplication, est une surexpression de la GFAP, reliée à ces modifications cellulaires et morphologiques (Sofroniew, 2014).
- **La libération de gliotransmetteurs.** L'augmentation calcique au sein des astrocytes réactifs induit une libération de cytokines proinflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α) et d'ATP. Ces molécules vont entraîner en retour une activation gliale, il y a ainsi une boucle d'activation des astrocytes, comme le montre la Figure 27. De plus, la libération d'IL-1 β par les astrocytes réactifs va contribuer à l'activation neuronale, par la co-localisation de son récepteur avec les canaux NMDA (Viviani

et al., 2003). La libération renforcée de D-sérine et de glutamate va également participer à l'activité des neurones postsynaptiques (Ren and Dubner, 2016).

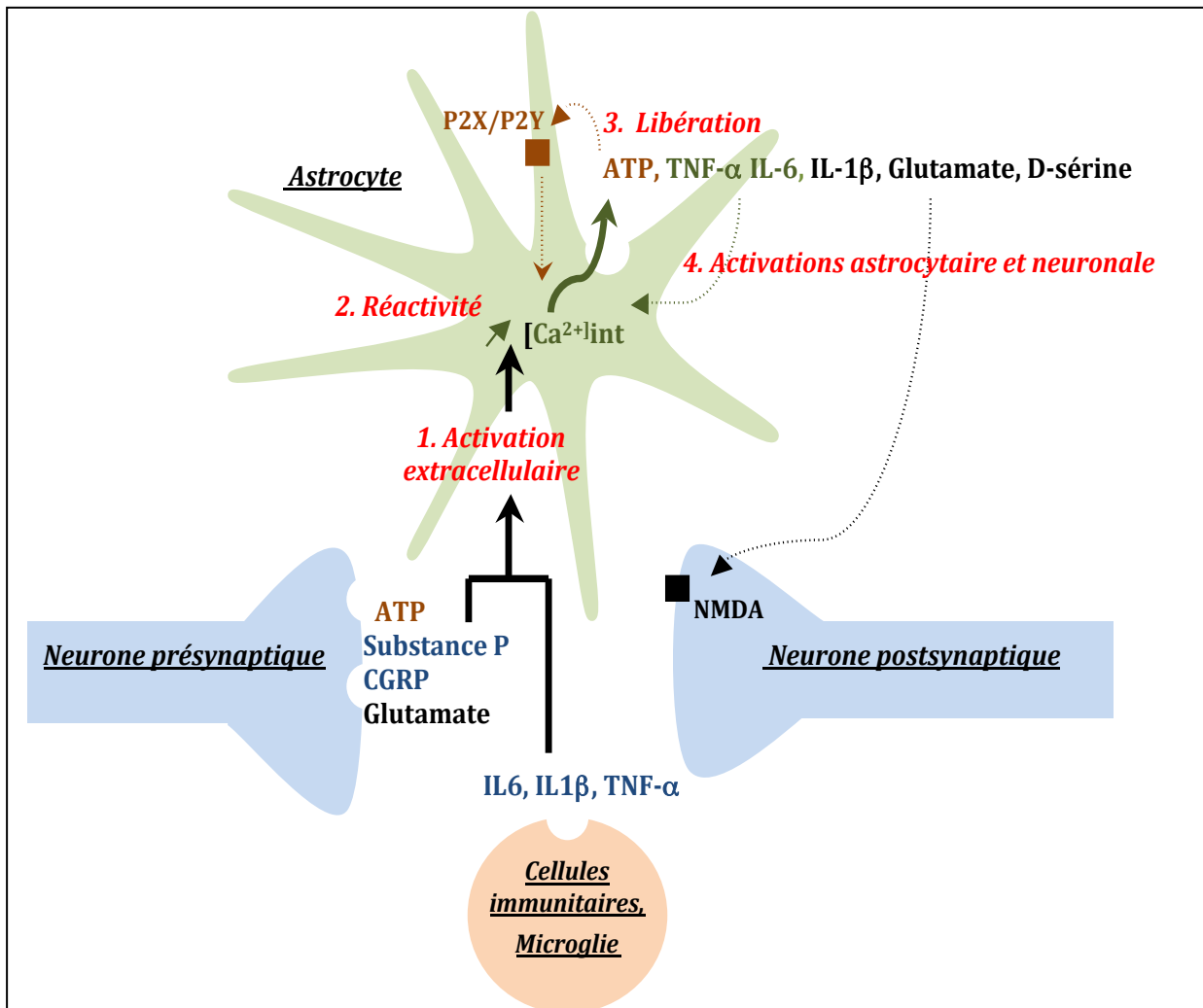


Figure 27 : Schématisation de la réactivité astrocytaire. La libération d'ATP, de CGRP, de substance P et de glutamate au niveau présynaptique, ainsi que d'interleukines par les cellules immunitaires et la microglie, contribue à l'activation des astrocytes. Celle-ci est corrélée à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, $[Ca^{2+}]_{int}$. Ceci induit la libération d'interleukines, d'ATP, de glutamate et de D-sérine par les astrocytes et renforce l'activation gliale et neuronale.

Les astrocytes représentent les cellules gliales majoritaires du système nerveux central et les plus diversifiées. Caractérisées par des fonctions trophique, protectrice, métabolique ou encore immunologique, les astrocytes interagissent également avec les neurones pré et postsynaptiques. En condition pathologique, les astrocytes deviennent réactifs et ont une activité renforcée, ce qui conduit à la libération accrue de molécules activatrices de la glie et des neurones.

Dans un premier temps, la réactivité astrocytaire est nécessaire pour la protection de l'organisme. Toutefois, lorsqu'elle est prolongée elle présente un effet délétère, notamment par la libération massive de deux substances neurotoxiques: l'ATP et le glutamate. L'implication des astrocytes réactifs dans de nombreuses maladies du système nerveux central est clairement établie, par exemple la maladie d'Huntington et la maladie d'Alzheimer (Jha et al., 2012). Par ailleurs, la réactivité astrocytaire est responsable de l'induction et du maintien de l'excitabilité des neurones nociceptifs dans la pathologie des douleurs neuropathiques.

II. Astrocytes et douleurs neuropathiques

La microglie et les astrocytes sont à ce jour les deux types de cellules gliales ayant une action identifiée dans les douleurs neuropathiques. Le rôle des oligodendrocytes n'est quant à lui pas établi (Mika et al., 2013). De plus, il est communément admis que l'activation de la microglie et des astrocytes présente une **chronologie différente** dans cette pathologie.

II.1. Une activation astrocytaire tardive mais durable

Suite à une lésion nerveuse, la libération d'ATP et de cytokines par les cellules immunitaires et les cellules lésées va tout d'abord conduire à l'activation de la microglie. Dans un second temps, la libération de molécules proinflammatoires par la microglie va participer à l'activation astrocytaire. Les cytokines IL-1 β et TNF- α sont par exemple décrites comme activatrices des astrocytes (Ji et al., 2013). Quoique plus tardive, l'activation des astrocytes est plus longue que celle de la microglie et ainsi reconnue comme impliquée à la fois dans **l'induction et le maintien** des douleurs neuropathiques (Jha et al., 2012). Au niveau de la moelle épinière, les modèles précliniques rapportent ainsi une activation microgliale dès le premier jour suivant la lésion, tandis qu'il faut attendre trois à six jours pour avoir une activation significative des astrocytes. Cependant, un mois après la lésion seule l'activation astrocytaire subsiste (Mika et al., 2013).

Toutefois, si l'activation des astrocytes est induite par la microglie, elle **ne dépend pas exclusivement** de ce type cellulaire (Vallejo et al., 2010). En effet, une étude chez la souris a démontré que l'inhibition de la microglie n'affectait pas le degré d'activation des astrocytes dans un modèle de ligature du nerf sciatique (Mika et al., 2009). En outre, si l'activation astrocytaire est toujours retrouvée dans les modèles précliniques de douleurs neuropathiques, ce n'est pas le cas de l'activation microgliale (Mika et al., 2013).

Plusieurs études chez le rongeur ont permis de démontrer la réactivité aussi bien des cellules satellites que des astrocytes dans la pathologie des douleurs neuropathiques, justifiant ainsi leur implication dans cette pathologie.

II.2. Réactivité astrocytaire aux niveaux périphérique et central dans des modèles précliniques de douleurs neuropathiques

Garrison et son équipe ont été les premiers en 1991, à démontrer une augmentation de GFAP au niveau de la moelle épinière après la lésion du nerf sciatique chez le rat (Garrison et al., 1991).

II.2.1. Modifications cellulaires et morphologiques

L'étude des cellules gliales dans les modèles de douleurs neuropathiques rapporte systématiquement une augmentation de GFAP, exprimée par les astrocytes. Cette surexpression de GFAP est observée aussi bien au niveau messager que protéique et est évaluée par les techniques de RT-PCR, western blot et d'immunohistochimie (Jha et al., 2012).

II.2.1.1. Modèles de lésion périphérique

Dans les modèles de **douleurs neuropathiques périphériques**, une augmentation de GFAP dans le ganglion trigéminal et dans les ganglions de la corne dorsale a été décrite, suite à la lésion respectivement du nerf infraorbitaire (Ohara et al., 2008; Jasmin et al., 2010) et du nerf sciatique (Latrémolière et al., 2008).

Ceci sous-entend donc la réactivité des cellules satellites dans les tissus périphériques ganglionnaires. De plus, l'augmentation de la GFAP est corrélée à une hypertrophie de ces cellules, comme le rapporte un modèle de lésion du nerf sciatique chez la souris (Ledda et al., 2009).

II.2.1.2. Modèles de lésion centrale

L'étude des astrocytes dans les **douleurs neuropathiques centrales** a été réalisée dans des modèles précliniques de contusion (Chen et al., 2012b; Roh et al., 2010) et de section (Huang et al., 2012; O'Carroll et al., 2013) de la moelle épinière. Dans ces modèles, une surexpression de GFAP a été retrouvée dans la moelle épinière, jusqu'à neuf mois après la chirurgie (Ji et al., 2013), démontrant ainsi la présence d'astrocytes réactifs dans les douleurs neuropathiques centrales. La surexpression de GFAP a aussi été observée au

niveau de la moelle dans un modèle de douleurs induites par un anticancéreux, l'oxaliplatine (Yoon et al., 2013). Toutefois, cette augmentation au niveau spinal n'a pas toujours été retrouvée dans ce modèle (Michot et al., 2014). Il faut de fait noter que son appartenance aux douleurs neuropathiques centrales reste controversée.

Si la majorité des modèles précliniques se réfère à une augmentation de la GFAP, celle-ci ne permet pas de statuer sur la fonction des astrocytes mais uniquement sur leurs modifications cellulaires et morphologiques, liées à leur réactivité. L'activité des astrocytes réactifs peut quant à elle être étudiée par la libération de molécules proinflammatoires (Tiwari et al., 2014).

II.2.2. Modification fonctionnelle

Des articles rapportent l'augmentation de la libération de **D-sérine** dans des modèles de lésion périphérique chez la souris (Moon et al., 2015) et chez le rat (Lefèvre et al., 2015). De plus, la libération de **TNF- α** au niveau des astrocytes a été observée dans des modèles de lésion du nerf spinal (DeLeo et al., 2000) de lésion du nerf sciatique (Garrison et al., 1991) ou encore dans des modèles centraux (Zhang et al., 2005). De même la libération d'**IL-1 β** par les astrocytes a été observée dans des modèles de lésion du nerf infraorbitaire (Wei et al., 2008) ou de lésion du nerf sciatique (Garrison et al., 1991).

Ces études confirment donc l'activité des astrocytes réactifs dans la pathologie des douleurs neuropathiques, qui va conduire à une libération massive de molécules responsables de l'excitabilité tant gliale que neuronale comme le présente la figure de la page suivante (Figure 28). Ceci explique le maintien des mécanismes proinflammatoires liés à l'activité des neurones nociceptifs et justifie le rôle clef des astrocytes dans cette pathologie. De plus, l'administration chez le rongeur d'agents pharmacologiques dégradant directement ces cellules gliales (comme le flurocitrato) ou inhibant leur synthèse (comme la méthionine sulfoximine) ont induit des effets antinociceptifs, confirmant l'implication des astrocytes tant dans l'induction que le maintien des douleurs neuropathiques (Ren, 2010; Ji et al., 2013).

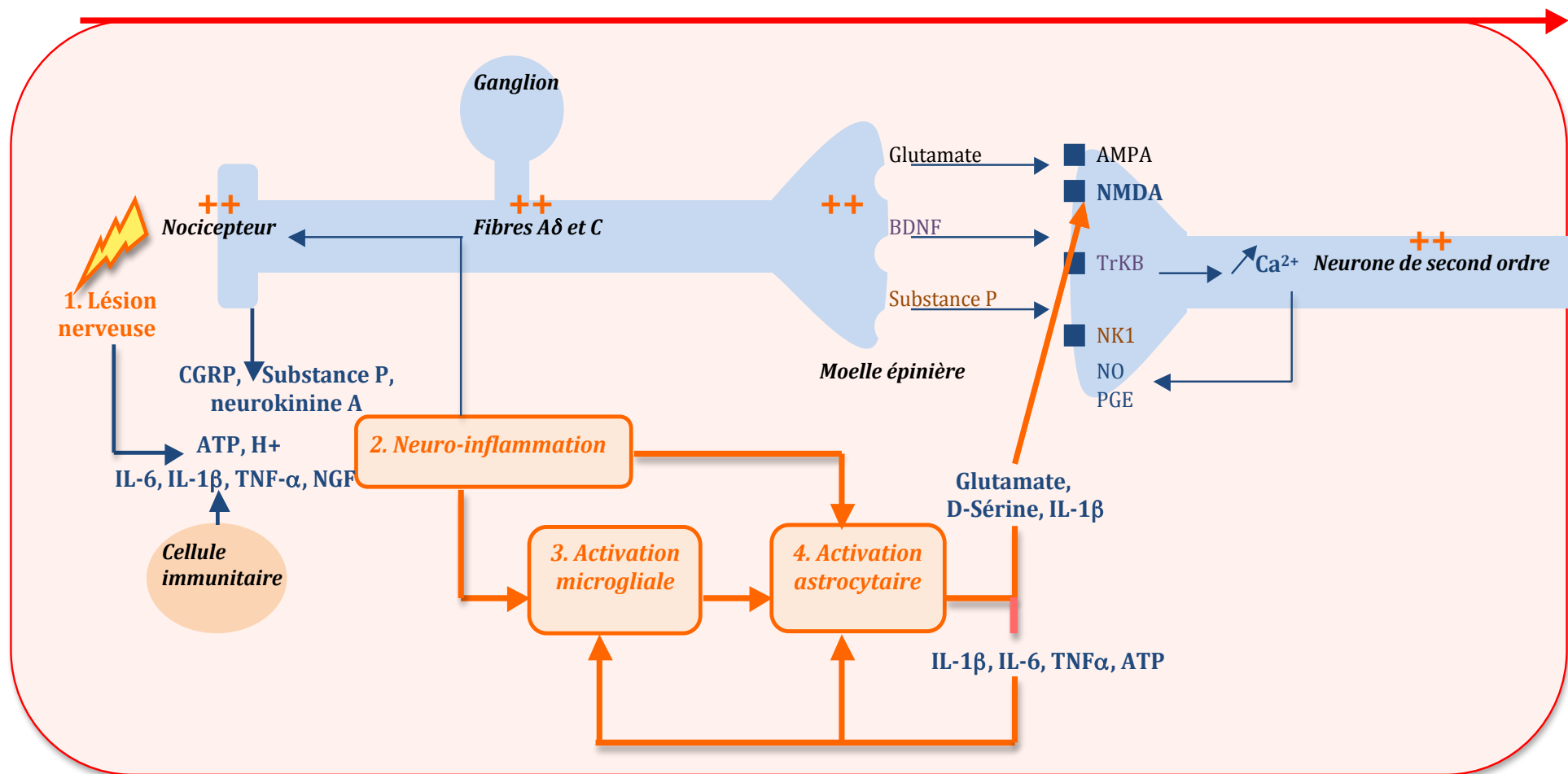


Figure 28 : Implication des astrocytes réactifs dans le mécanisme des douleurs neuropathiques. La neuro-inflammation succédant à la lésion nerveuse entraîne dans un premier temps l'activation de la microglie, qui contribue à son tour à l'activation plus tardive des astrocytes. La libération renforcée d'interleukines et d'ATP par les astrocytes réactifs conduit au maintien de l'excitabilité gliale. De plus, les astrocytes libèrent du glutamate, de la D-sérine et de l'IL-1β qui se fixent sur le récepteur NMDA et participent ainsi à l'excitabilité du neurone nociceptif de second ordre. Les astrocytes sont ainsi impliqués dans l'induction et le maintien des douleurs neuropathiques.

La réactivité astrocytaire participe à l'induction et au maintien des douleurs neuropathiques. Une surexpression de GFAP ainsi que la libération de molécules proinflammatoires témoignent de leur réactivité dans des modèles précliniques périphériques et centraux. Toutefois, aucun essai clinique n'a pu jusqu'à présent valider l'inhibition astrocytaire comme approche thérapeutique.

Une autre stratégie thérapeutique peut être envisagée, n'impliquant pas uniquement les astrocytes mais une classe de traitements communément utilisée dans les douleurs neuropathiques : les antidépresseurs. En effet, de nombreuses études rapportent un lien entre astrocytes et antidépresseurs. Ainsi, l'étude de cette population gliale ouvre **une nouvelle voie pour mieux comprendre le mécanisme des antidépresseurs et préciser leur action dans la pathologie des douleurs neuropathiques.**

III. Astrocytes et antidépresseurs

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* rapportent un effet des antidépresseurs sur les astrocytes. Leurs cibles sont variées puisqu'ils agissent aussi bien sur l'expression de GFAP, sur la libération de facteurs neurotrophiques ou encore sur les récepteurs et transporteurs astrocytaires.

III.1. Modulation de la GFAP

Des études réalisées dans un modèle de stress chronique rapportent une **réversion de la réduction** de l'expression de la GFAP chez les animaux traités avec des antidépresseurs TCA et ISRS (Liu et al., 2009; Czéh et al., 2006). Il est admis qu'un stress chronique, à l'origine de la pathologie de la dépression, conduit à réduction du nombre de cellules gliales comme le rapportent des modèles animaux et l'étude *post mortem* du cerveau de patients dépressifs (Czéh and Di Benedetto, 2013). Cette diminution ne semble ici pas avoir lieu lors d'un traitement avec antidépresseurs.

Par ailleurs, comme l'indique le tableau ci-dessous (Tableau 9), une étude réalisée dans un modèle de culture d'astrocytes rapporte une forte **réduction** de GFAP suite au traitement par des antidépresseurs tricycliques alors qu'une étude génétique par microarray rapporte au contraire une **augmentation** de GFAP suite au traitement par l'ISRS paroxétine.

Ainsi, si ces études sont en faveur d'une action des antidépresseurs sur la population astrocytaire dans les tissus cérébraux (hippocampe, cortex), elles doivent être renforcées

pour préciser cette action. Par ailleurs, la majorité de ces études ont été réalisées dans des modèles de dépression. Or, les astrocytes semblent être modulés négativement (inhibition de l'activation) dans le cas de la dépression (Czéh and Di Benedetto, 2013) et positivement dans les douleurs neuropathiques (renforcement de leur activation, comme mentionné précédemment). Ainsi, l'étude des antidépresseurs au niveau astrocytaire requiert des études spécifiques dans le contexte des douleurs neuropathiques, qui fait partie des objectifs de ce projet de thèse.

Antidépresseur (classe)	Modèle	Dose et durée du traitement	Tissu	Action sur les astrocytes	Référence
Clomipramine (TCA)	Rat, in vivo Protocole de stress chronique	- 5 mg/kg -Traitement chronique (21 jours)	Hippocampe	Réversion de la réduction de GFAP (messager et protéine)	(Liu et al., 2009)
Clomipramine Amitriptyline (TCA)	Culture d'astrocytes de souris	-Doses de 0 à 20 µM -Traitement chronique (10 jours)	Cortex	Forte réduction de GFAP (au niveau protéique)	(Cho et al., 2010)
Fluoxétine (ISRS)	Musaraigne, in vivo Protocole de stress chronique	-15 mg/kg -Traitement chronique (28 jours)	Hippocampe	Réversion de la réduction de cellules marquées GFAP	(Czéh et al., 2006)
Paroxétine (ISRS)	Microarray in situ analyses de souris	-10 mg/kg -Traitement chronique (28 jours)	Hippocampe	Expression augmentée du gène GFAP	(Sillaber et al., 2008)

Tableau 9 : Effet des antidépresseurs sur l'expression de GFAP *in vivo* et *in vitro*

III.2. Libération renforcée des facteurs neurotrophiques

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* sont en faveur d'une **augmentation de la libération** des facteurs neurotrophiques (BDNF et GDNF) par les astrocytes, suite au traitement par différentes classes d'antidépresseurs (Tableau 10).

Antidépresseur (classe)	Modèle	Dose et durée du traitement	Tissu	Action sur les astrocytes	Référence
Fluoxétine Paroxétine (ISRS)	Culture d'astrocytes de souris	-10 μ M -Traitement de 24 heures	Cortex	Augmentation de l'expression de facteurs neurotrophiques spécifiques des astrocytes (BDNF, VEGF)	(Allaman et al., 2011)
Amitriptyline (TCA)	Cellules C6 de gliome de rat	-25 μ M -Différents temps de 1 heure à 48 heures		Augmentation de l'expression (ARNm) et de la libération de GDNF	(Hisaoaka et al., 2007)
Reboxétine (ISRNA)	Cellules C6 de gliome de rat	-10 μ M -Traitement de 48 heures		Libération augmentée de GDNF	(Di Benedetto et al., 2012)
Desipramine (TCA)	Rat	-15 mg/kg -Traitement chronique (21 jours)	Hippocampe	Augmentation de BDNF (ARNm)	(Nibuya et al., 1995)

Tableau 10 : Action des antidépresseurs sur les facteurs neurotrophiques astrocytaires

III.3. Action au niveau des récepteurs monoaminergiques

Comme cela a précédemment été énoncé, les antidépresseurs sont connus pour leur action sur la recapture des monoamines, augmentant leur présence dans la fente synaptique. Or, les astrocytes expriment des **récepteurs ainsi que des transporteurs de ces monoamines**, dont l'action peut être modulée par les antidépresseurs.

Tout d'abord, il est établi chez le rongeur que les astrocytes expriment les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A} et 5-HT₇ (Shimizu et al., 1996; Hirst et al., 1997). Ceci suggère une action indirecte des antidépresseurs sur ces récepteurs astrocytaires, par l'augmentation de sérotonine qu'ils induisent. En outre, les transporteurs astrocytaires de la sérotonine sont inhibés en présence des antidépresseurs de type ISRS telle que la fluoxétine et la paroxétine (Bal et al., 1997).

Par ailleurs, une étude réalisée chez le rat après un traitement chronique avec la désipramine (TCA) rapporte une réduction des β 1-adrénorécepteurs, exprimés par les astrocytes présents dans le prosencéphale et le cervelet (Sapena et al., 1996).

III.4. Autres actions

Des études complémentaires, présentées dans le Tableau 11, indiquent que les antidépresseurs peuvent moduler **d'autres cibles astrocytaires variées**: le métabolisme du glucose, le transporteur EAAT2 du glutamate, les aquaporines (AQP4) impliquées dans le transport d'eau dans les pieds astrocytaires ou encore la protéine Ndr2 exprimée au niveau cérébral.

Antidépresseur (classe)	Modèle	Dose et durée du traitement	Tissu	Action sur les astrocytes	Référence
Fluoxétine Paroxétine (ISRS)	Culture d'astrocytes de souris	-10 µM -Traitement de 24 heures	Cortex	Augmentation de la libération de lactate par les astrocytes	(Allaman et al., 2011)
Fluoxétine (ISRS)	Rats, in vivo	-10 mg/kg -Traitement chronique (14 jours)	Hippocampe et cortex	Induction de l'expression de EAAT2 (ARNm)	(Zink et al., 2011)
Fluoxétine (ISRS)	Souris, in vivo Protocole de stress chronique	-10 mg/kg -Traitement chronique (4 semaines)	Hippocampe	Souris sans AQP4 : perte d'efficacité de la fluoxétine	(Kong et al., 2009)
Imipramine (TCA) Sertraline (ISRS)	Rat	- 10 mg/kg -Traitement chronique (21 jours)	Cortex	Réduction de l'expression de Ndr2 (ARNm et protéine)	(Takahashi et al., 2005)

Tableau 11 : Action des antidépresseurs sur des cibles astrocytaires variées

Si ces études concordent pour démontrer une action des antidépresseurs sur les astrocytes, le lien avec leur action antinociceptive reste à définir. En effet, alors qu'une baisse de GFAP pourrait concorder avec une réduction des douleurs neuropathiques, la libération accrue de facteurs neurotrophiques ou la réduction de l'expression des récepteurs adrénergiques ne sont pas en faveur d'une inhibition de ces douleurs. Ainsi, une meilleure compréhension de l'action des antidépresseurs sur l'expression et l'activité astrocytaire reste nécessaire, avant d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques dans la pathologie des douleurs neuropathiques.

De plus, il s'avère important, outre le fait de renforcer les études ci-dessus, de tester d'autres molécules. Par exemple, il semble crucial d'étudier la classe thérapeutique des IRSNA qui n'est pas représentée (hormis une étude avec la réboxétine), la duloxétine étant notamment une des molécules les plus prescrites dans la pathologie des douleurs neuropathiques.

La littérature est en faveur d'une implication des astrocytes dans le mécanisme d'action des antidépresseurs. Ces derniers modulent l'expression de GFAP, agissent sur différents récepteurs et transporteurs astrocytaires ainsi que sur la libération de facteurs neurotrophiques. Ces études doivent être approfondies pour préciser le lien avec l'action antinociceptive des antidépresseurs

Par ailleurs, plus précisément que la cible cellulaire des astrocytes, cette thèse propose de s'intéresser à une **protéine astrocytaire** dans la perspective d'une amélioration thérapeutique des douleurs neuropathiques. Cette cible protéique correspond à la connexine 43 (Cx43), qui fait l'objet de plusieurs études récentes démontrant son implication tant dans la pathologie que dans le mécanisme d'action de certains antidépresseurs. Ainsi, cela justifie l'étude fondamentale de la Cx43, dans le but de mieux comprendre le mode d'action des antidépresseurs dans la pathologie des douleurs neuropathiques.

Quatrième partie : la connexine 43 astrocytaire

I. Introduction sur les connexines

Le bon fonctionnement des cellules, tant chez l'animal que chez l'homme, requiert **une communication intercellulaire**. Les travaux de Weidmann ont été les premiers à mettre en évidence cette communication au niveau des cellules cardiaques (Weidmann, 1952). La mise en place d'études électrophysiologiques a ensuite permis de valider la présence de synapses électriques entre les neurones (Furshpan and Potter, 1959). Cette communication intercellulaire implique les connexines qui n'ont été identifiées que plus tardivement, dans les années 80. La première séquence codante de connexines est décrite en 1986 (Kumar and Gilula, 1986).

I.1. Structure moléculaire

Les connexines sont des **protéines transmembranaires** de 20 à 60 kDa. Chez le rongeur, 20 connexines ont été identifiées contre 21 chez l'homme (Theis et al., 2005). Chacune de ces connexines est nommée par son poids moléculaire en kDalton, critère morphologique qui permet de les distinguer. Au niveau du cerveau, les 11 connexines suivantes ont été détectées : Cx26, Cx29, Cx30, Cx32, Cx36, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46, Cx47 (Giaume and Liu, 2012).

Comme le présente la Figure 29, les connexines sont formées de quatre domaines transmembranaires hydrophobes (notés M1, M2, M3, M4) qui ont une topologie d'hélice alpha, de deux boucles extracellulaires (E1, E2) et d'une boucle cytoplasmique (Rackauskas et al., 2010). Les séquences amino (N) et carboxy (C) terminales sont intracellulaires.

L'extrémité C-terminale possède de nombreux domaines de phosphorylation, à l'origine d'un changement de la conformation des connexines et d'une modulation de leur fonction (Laird, 2010; Merrifield and Laird, 2016).

I.2. Expression des connexines

Les connexines sont exprimées dans l'ensemble des tissus excepté le muscle squelettique adulte, les érythrocytes et les spermatozoïdes matures. Un même tissu peut exprimer une

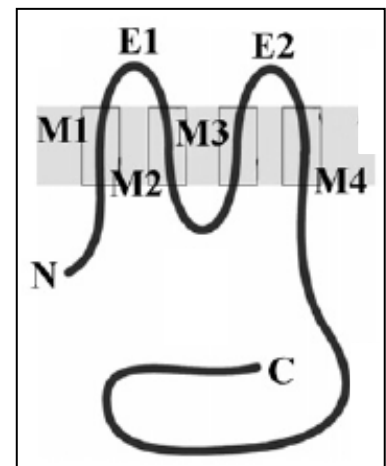


Figure 29 : Structure moléculaire d'une connexine
(Hervé et al, 2008)

seule ou plusieurs connexines. Le cristallin par exemple exprime la Cx46, la Cx43 et la Cx50 alors qu'on retrouve uniquement la Cx45 au niveau de l'utérus (Rackauskas et al., 2010).

Par ailleurs, **l'expression tissulaire diffère d'une connexine à l'autre**. En effet, alors que certaines connexines sont retrouvées dans de nombreux tissus, d'autres ont une expression plus restreinte. La Cx30,3 et la Cx50 sont ainsi retrouvées respectivement au niveau de la peau et du cristallin exclusivement, alors que la Cx37 est retrouvée dans le muscle vasculaire lisse, l'endothélium, les ovaires ou encore la peau (Rackauskas et al., 2010). En outre, cette expression tissulaire peut varier au cours du développement. La Cx40 a par exemple été démontrée comme fortement exprimée au niveau cardiaque chez le fœtus de souris, puis nettement moins exprimée après la naissance (Van Kempen et al., 1996).

Plus spécifiquement au niveau du **système nerveux central**, l'expression cellulaire des connexines varie, tel que le présente le Tableau 12. Certaines connexines sont retrouvées dans un seul type cellulaire, comme que la Cx29 au niveau des oligodendrocytes, alors que d'autres connexines comme la Cx36, la Cx32, la Cx26 ou encore la Cx43 peuvent être retrouvées au niveau des neurones et de la glie (Giaume and Liu, 2012).

Type cellulaire	Connexines exprimées
Astrocytes	Cx 43, Cx30 , Cx26, Cx40, Cx45
Oligodendrocytes	Cx32, Cx47, Cx29
Microglie	Cx43, Cx36, Cx32
Neurones	Cx36 , Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx45, Cx47, Cx43

Tableau 12 : Distribution cellulaire des connexines au sein du système nerveux central

Si elles diffèrent par leur expression tissulaire et cellulaire, les connexines ont un cycle de vie commun qui est présenté dans la partie suivante.

I.3. De la connexine à la plaque jonctionnelle

Durant leur traduction, les connexines sont insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique puis elles vont s'assembler par six dans le réseau trans-Golgi. Par un transport vésiculaire, les connexines oligomérisées vont ensuite atteindre la membrane cellulaire sur laquelle elles se fixeront (Figure 30).

Six connexines forment un **connexon**, qui peut être composé de la même connexine (homomère) ou de connexines différentes (hétéromère). Le connexon va dans un premier

temps rester sous cette forme, communément appelée **hémicanal** (HC), puis au cours de son cycle de vie il peut s'assembler avec un connexon d'une cellule voisine, pour former une **jonction gap** (GJ). Les GJ peuvent être homotypiques ou hétérotypiques si elles sont respectivement composées de deux connexons identiques ou différents. Le regroupement de plusieurs jonctions gap est à l'origine d'une **plaque jonctionnelle** entre deux cellules (Laird, 2010; Merrifield and Laird, 2016).

De plus, les connexines ont une durée de vie très courte, elle est par exemple de 1 à 3 heures pour la Cx43 (Laird et al., 1991; Beardslee et al., 1998). Ceci entraîne un renouvellement rapide de ces protéines au niveau de la membrane. Le recyclage des GJ a lieu de deux façons, soit les connexons se séparent et sont internalisés dans leurs cellules respectives, soit la plaque jonctionnelle est internalisée pour former une jonction annulaire qui fusionnera avec un lysosome (Laird, 2006).

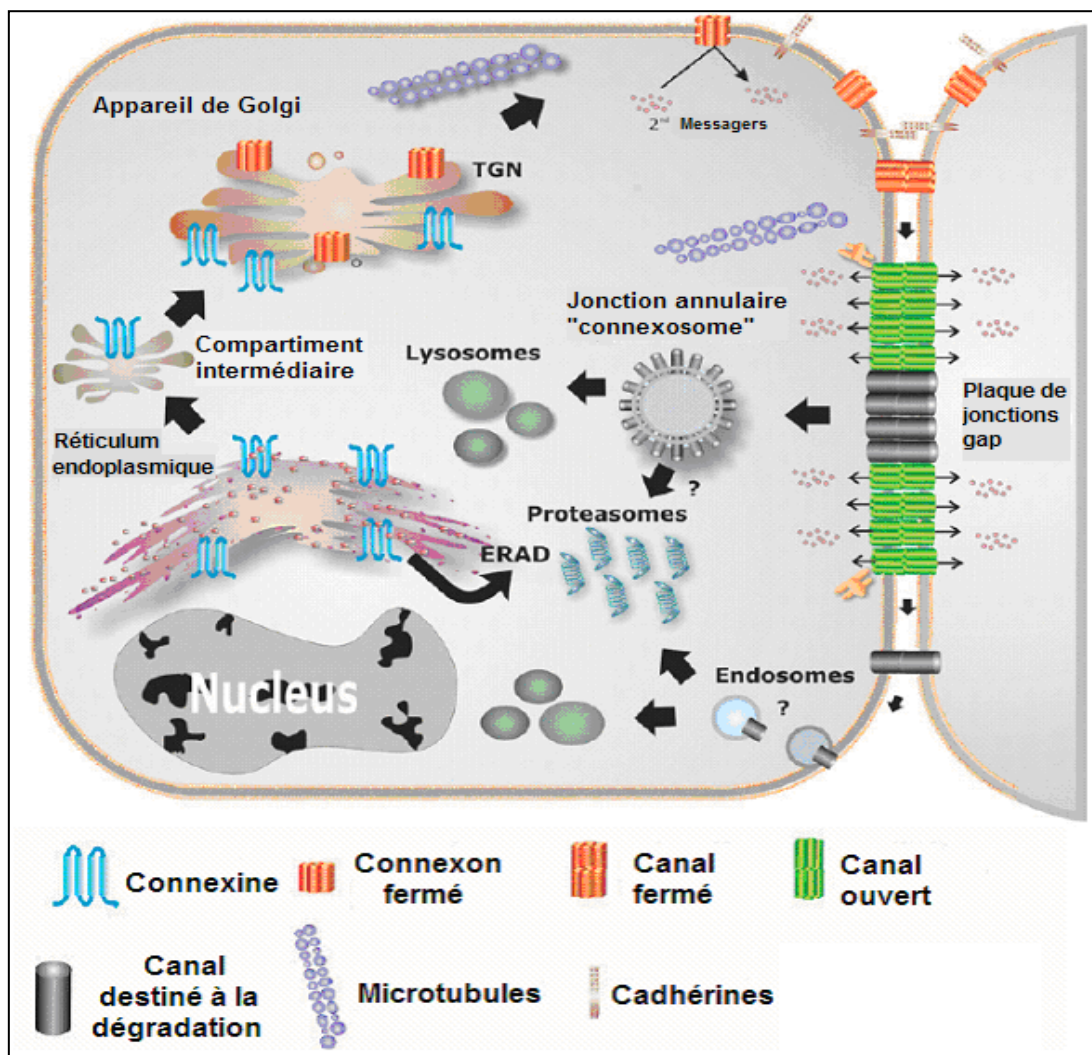


Figure 30 : Cycle de vie des connexines. Durant leur traduction, les connexines sont insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique. Elles sont ensuite oligomérisées par six au sein du trans-Golgi. Des vésicules de transport délivrent les connexons à la membrane via les microtubules. Puis, les connexons pourront fonctionner en tant qu'hémicanaux ou s'apparier avec d'autres connexons présents à la membrane plasmique de la cellule adjacente. Les canaux jonctionnels (jonctions gap) seront localisés à la périphérie de la plaque jonctionnelle alors que les plus anciens seront au centre. Un fragment ou la totalité de la plaque jonctionnelle est ensuite internalisé, la dégradation est effectuée dans les lysosomes ou dans les protéasomes (Laird, 2006).

I.4. Etudes *in vivo* des connexines

Chez l'animal, différents outils tant pharmacologiques que génétiques permettent d'inhiber les GJ et HC formés par les connexines. Les conséquences de ce blocage permettent d'en déduire leur implication fonctionnelle dans le modèle étudié.

I.4.1. Outils pharmacologiques

Parmi les inhibiteurs pharmacologiques des connexines, on peut citer la méfloquine et la quinine qui sont des antipaludéens, les fenamates tel que l'acide méclofénamique et

l'acide niflumique, ou encore l'acide glycyrrhétinique et ses dérivés, dont le carbenoxolone qui est majoritairement utilisé dans la littérature (Giaume et al., 2013). S'ils sont communément utilisés, ces inhibiteurs présentent un manque de spécificité et de sélectivité. Tout d'abord, ils n'assurent pas le blocage exclusif des GJ ou des HC mais inhibent les deux fonctions. De plus, ils exercent une fonction sur d'autres récepteurs incluant notamment les pannexines. Ces dernières induisent la formation d'HC de façon similaire aux connexines mais ne forment pas de GJ. Par ailleurs, la sélectivité pour un type de connexines n'est pas assurée par ces inhibiteurs pharmacologiques (Verselis and Srinivas, 2013).

Développer de nouveaux outils pharmacologiques **sélectifs et spécifiques** reste une priorité pour l'étude des connexines, de même que mieux comprendre **le mode d'action** des molécules utilisées. En effet, à ce jour le mécanisme d'inhibiteurs pharmacologiques comme le carbenoxolone reste mal compris (Verselis and Srinivas, 2013).

Il faut cependant noter que dans le cas de l'étude de la Cx43, des «peptides mimétiques» ont été développés. Ils sont composés de parties de séquences identiques à celles de la Cx43 et permettent l'étude sélective de cette connexine. Ils ont tout d'abord été découverts pour leur blocage des GJ. Toutefois, à plus court terme (30 minutes à quelques heures selon les auteurs), leur action s'est avérée spécifique des HC (Giaume et al., 2013).

Les outils génétiques, développés plus tardivement, ont également permis de répondre au besoin de sélectivité.

I.4.2. Outils génétiques

Des **souris transgéniques** ont été mises au point, pour lesquelles le gène de la Cx étudiée est inactivé (souris Knock-out, KO). Dans le cas de la Cx43, son inactivation globale étant létale, elle peut être spécifiquement réalisée avec la technique de GFAP-cre/loxP, permettant d'entraîner uniquement une délétion de la Cx43 astrocytaire. Des études précliniques ont confirmé la viabilité de ces souris (Theis et al., 2003; Wiencken-Barger et al., 2007).

On retrouve également la technique d'**ARN interférant** (ARNi) qui permet de dégrader la synthèse de la Cx ciblée et ainsi de pouvoir étudier de façon sélective les conséquences de son inhibition (Ohara et al., 2008).

Les connexines sont des protéines transmembranaires retrouvées dans la quasi totalité des tissus et exprimées de façon hétérogène par les cellules du système nerveux central. Elles s'assemblent par six pour former des connexons, également appelés hémicanaux. Le regroupement de deux connexons forme un canal de jonction gap, à l'origine de la communication intercytoplasmique entre deux astrocytes. Plusieurs outils ont été développés afin d'étudier les GJ et les HC tels que des inhibiteurs pharmacologiques ou des souris transgéniques.

Au sein du système nerveux central, les astrocytes sont les cellules les plus couplées entre-elles. La formation d'un véritable réseau astrocytaire par cette communication intercellulaire leur doit le nom de «syncytium».

II. Les connexines astrocytaires

II.1. Expression

La Cx30 et la Cx43 sont les deux connexines majoritairement exprimées par les astrocytes chez l'adulte (Giaume et al., 1991a). Chez le rongeur, la Cx43 est celle retrouvée le plus précocement puisque les astrocytes l'expriment dès le stade embryonnaire (Giaume and Liu, 2012), alors que la Cx30 n'est détectée qu'à partir de la troisième semaine postnatale (Kunzelmann et al., 1999).

De plus, ces connexines sont caractérisées par une distribution qui diffère dans le système nerveux central (Nagy et al., 1999). En effet, alors que l'expression de la Cx43 est assez homogène au niveau des régions cérébrales, la Cx30 est absente de certaines régions comme la substance blanche (Figure 31).

Region	Connexin30	Connexin43
Olfactory nerve layer	–	+
Olfactory glomeruli	+++++	+++
External plexiform layer	+	++++
Cerebral cortex	++	+++
Hippocampus	++	+++
Nucleus of the diagonal band	+++++	++
Lateral septal nucleus	++	+++
Medial septal nucleus	+++	++
Striatum	+	++
Globus pallidus	+++++	++++
Ventral pallidum	+++++	+++
Anterior hypothalamus	+++++	+++
Posterior hypothalamus	++++	+++
Thalamus	++++	++++
Geniculate nucleus*	++++	+++
Substantia nigra	+++++	+++
Superior colliculus**	++++	+++++
Pontine nucleus	+++++	+++++
Medulla	++++	+++
Inferior olivary nucleus	+++++	+++
Spinal trigeminal nucleus	++++	++
Facial nucleus	+++++	++
Cochlear nucleus	+++++	++
Cerebellar molecular layer	+	+++
Spinal cord gray matter	+++++	+++
Substantia gelatinosa	+	++++
White matter	–	+++
Leptomeninges	++++	++++
Cortical blood vessels	+++	+++
Subcortical blood vessels	+++	+

*refers to the ventral lateral subdivision.
**refers to the superficial layer only.

Figure 31 : Densités relatives des Cx30 et Cx43 obtenues par immunomarquage dans différentes régions cérébrales chez le rat (Nagy et al. 1999)

II.2. Fonctions

II.2.1. Perméabilité

Les connexines astrocytaires, de même que les autres connexines, assurent une **communication extra et intercellulaire** par le biais respectivement des HC et des GJ. Ces canaux sont perméables à des ions et des petites molécules de faible poids moléculaire, pouvant aller jusqu'à 1 kDa, on retrouve ainsi des ions (H^+ , CA^{2+}), des nucléotides (ADP, ATP), des seconds messagers (AMPC, IP3), des neurotransmetteurs (glutamate) ou encore des substrats énergétiques (glucose, lactate) (Orellana et al., 2013).

De la nature des connexines, dépend les molécules transportées par leurs canaux. De plus cette perméabilité varie également selon la charge, le poids moléculaire et la conformation des molécules ainsi que leurs interactions avec les autres connexines au sein du canal (Giaume and Theis, 2010). Il est important de noter par ailleurs la faible sélectivité de ces canaux pour les molécules qu'ils transportent, ce qui les distingue notamment des canaux ioniques (Giaume and Liu, 2012).

II.2.2. Jonction gap

Les astrocytes forment un grand nombre de GJ, composées par la Cx30 et la Cx43. Un couplage entre les astrocytes et les oligodendrocytes a également été décrit, de même qu'un couplage astrocytes-neurones, toutefois ces couplages restent très minoritaires face au couplage entre les astrocytes. De plus, le couplage entre les astrocytes et les neurones a principalement été observé chez le jeune animal et semble faible voire absent à l'âge adulte (Giaume and Theis, 2010).

Par le couplage intercellulaire, les GJ permettent **la diffusion de molécules** nécessaires à l'équilibre métabolique des astrocytes, au relais de l'information cellulaire ainsi qu'au maintien de l'homéostasie tant intra qu'extracellulaire. Elles participent notamment à l'homéostasie potassique évoquée précédemment en permettant la diffusion des ions K^+ entre les astrocytes (Eugenin et al., 2012).

Par ailleurs, l'activité des GJ astrocytaires est aussi impliquée dans la signalisation calcique intercellulaire. Les GJ participent ainsi à la diffusion et au maintien de la réactivité astrocytaire par la mise en place de vagues calciques intercellulaire (Giaume and Venance, 1998). Ces dernières impliquent le transport d'ions Ca^{2+} et d' IP_3 , d'un astrocyte réactif vers un astrocyte voisin. De plus, il a été observé que les vagues calciques sont induites par l'activité neuronale et qu'elles provoquent en retour des modifications de cette activité neuronale. Ceci implique l'activité de la synapse tripartite, présentée précédemment (Rodríguez-Sinovas et al., 2007).

II.2.3. Hémicanal

La formation d'HC par la Cx30 n'est à ce jour pas démontrée dans les astrocytes. Cependant, l'existence d'HC Cx30 a déjà été décrite, par exemple chez la souris au niveau rénal (Svenningsen et al., 2013).

La présence d'HC Cx43 astrocytaires est quant à elle clairement démontrée. Ces HC Cx43 assurent une **communication paracrine et autocrine** par des échanges entre le cytoplasme de la cellule et le milieu extracellulaire. En condition basale, ils sont majoritairement **fermés**. En effet, la demande énergétique nécessaire pour les ouvrir est trop importante pour que les HC soient maintenus ouverts par la cellule et les maintenir fermés permet de conserver l'intégrité cellulaire. L'ouverture des HC a toutefois lieu sous certaines conditions, telle qu'une augmentation de calcium intracellulaire, un changement de concentration potassique ou de glucose, un stress oxydatif, une variation de pH ou encore un changement de voltage transmembranaire (Giaume et al., 2013).

De plus, les HC sont, comme les GJ, impliqués dans la réactivité astrocytaire. En effet, l'augmentation de la concentration calcique des astrocytes réactifs conduit à l'ouverture des HC qui libèrent de l'ATP. Ceci va conduire à une activation des récepteurs purinergiques astrocytaires, qui en retour vont induire une augmentation calcique intracellulaire contribuant à l'ouverture des HC Cx43. Comme le présente la Figure 32, il y a une boucle d'activation entre les HC et les récepteurs purinergiques d'un même astrocyte, qui conduit au maintien de sa réactivité. De plus, par la libération d'ATP, les HC sont également impliqués dans la diffusion des vagues calciques au sein d'autres astrocytes et propagent ainsi la réactivité astrocytaire (Baroja-Mazo et al., 2013).

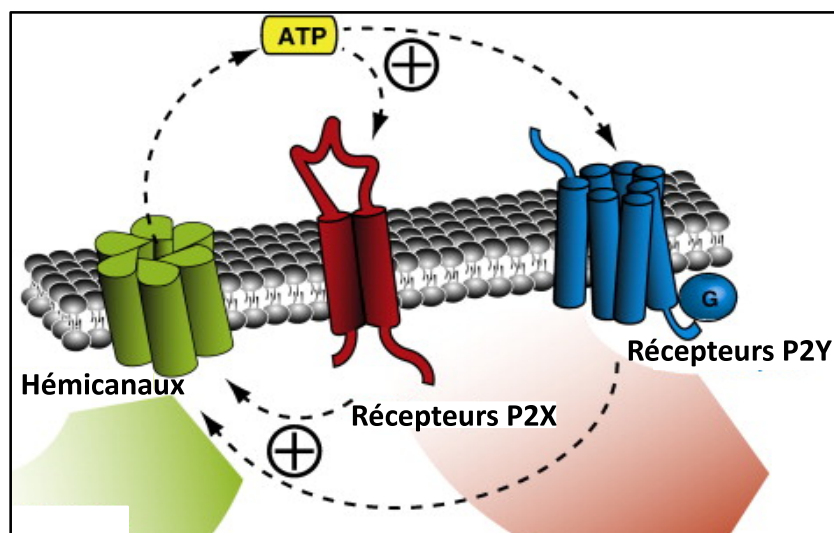


Figure 32 : Boucle d'activation entre les hémicanaux Cx43 et les récepteurs purinergiques astrocytaires (Baroja-Mazo et al, 2013)

En outre, la libération de glutamate conséquente à l'ouverture des HC, participe à l'activation des neurones postsynaptiques via les canaux NMDA (Froger et al., 2010).

Ainsi, par leur position stratégique au niveau de la membrane des astrocytes, les HC participent à l'activité astrocytaire mais modulent également l'activité neuronale.

II.2.4. Autres fonctions

Outre leur activité liée aux GJ et aux HC, la Cx30 et la Cx43 exercent également des fonctions **n'impliquant pas la formation de canaux**.

Tout d'abord la Cx43 est impliquée dans la migration cellulaire. En effet, il a été montré que cette connexine permet la migration neuronale dans le cortex, durant le développement (Elias et al., 2007) et que cela implique notamment sa séquence carboxy terminale (Cina et al., 2009). De plus, la Cx43 et la Cx30 s'associent avec des protéines du cytosquelette et de fait interviennent dans la morphologie cellulaire des astrocytes. Elles se lient toutes deux à l'actine et à la tubuline (Olk et al., 2009). Par ailleurs, l'implication de la Cx30 dans le transport du glutamate et l'activité synaptique a également été démontrée (Pannasch et al., 2014).

II.3. Régulation de l'activité des canaux astrocytaires

Différentes études *in vitro* et *ex vivo* chez le rongeur ont démontré que l'activité des GJ et des HC peut être modulée au sein des astrocytes par différents facteurs à la fois intra et extracellulaire.

- Comme exemples de **facteurs intracellulaires** on peut citer le pH, la concentration calcique intracellulaire, la phosphorylation ou encore le voltage. Ces facteurs modulent positivement ou négativement les canaux de Cx30 et de Cx43, un pH acide ou une augmentation calcique induisent par exemple une réduction de l'activité des GJ (Duffy et al., 2004; Adermark and Lovinger, 2008) tandis que la phosphorylation de la Cx43 peut entraîner à la fois une augmentation ou une réduction de la communication intercellulaire (Nielsen et al., 2012).
- Au niveau des facteurs extracellulaires, on retrouve les **cytokines proinflammatoires** IL-6, IL-1 β , TNF- α , libérées par la microglie. Celles-ci se sont avérées inhibitrices des GJ Cx43 et activatrices des HC Cx43 chez la souris dans des modèles de cultures cellulaires d'astrocytes corticaux (Retamal et al., 2007) et spinaux (Chen et al., 2014). Toutefois, à noter que dans un modèle de tranches d'hippocampe de souris, l'ouverture des HC suite à l'activation de la microglie est

retrouvée mais le couplage assuré par les GJ est quant à lui inchangé (Abudara et al., 2015).

- Comme autre exemple de facteurs extracellulaires, on retrouve le **glutamate**. Ce neurotransmetteur et plusieurs agonistes des récepteurs au glutamate ont été décrits comme activateur des GJ et des HC (Giaume et al., 2010; Orellana et al., 2013).

De plus, **l'activité neuronale** peut également moduler l'activité des canaux de Cx30 et Cx43. Un modèle de coculture avec des neurones corticaux a ainsi démontré une augmentation du couplage astrocytaire (Rouach et al., 2000) et l'inhibition de l'activité neuronale par la tétrodontoxine a conduit à la réduction du couplage dans un modèle de tranches de bulbe olfactif (Roux et al., 2011). De plus, une étude récente a également démontré que l'activité des HC Cx43 est contrôlée par celle des neurones dans le bulbe olfactif (Roux et al., 2015).

La possibilité de moduler l'activité des canaux astrocytaires, est un critère qui permet de les étudier. En effet, l'activation des HC Cx43 par les interleukines est par exemple reproduite au niveau *in vitro* pour induire leur ouverture.

II.4. Outils d'études

II.4.1. Etudes *in vitro*

Les cultures d'astrocytes n'expriment **que la Cx43** (Giaume et al., 1991; Koulakoff et al., 2008), ce qui entraîne donc l'étude sélective des canaux formés par cette connexine.

L'étude du couplage assuré par les GJ est réalisée à l'aide de la méthode de scrape-loading (Giaume et al., 1991; Même et al., 2006). Cette dernière repose sur une déchirure effectuée dans le tapis cellulaire de cultures confluentes, permettant l'incorporation par les astrocytes de **Lucifer yellow** ajouté dans le milieu extracellulaire. L'étude de la diffusion de ce fluorochrome entre les astrocytes est une méthode classiquement utilisée pour analyser le couplage. C'est ici une aire de couplage qui sera quantifiée, directement corrélée à l'activité des GJ.

L'étude des HC est quant à elle réalisée par l'incorporation d'un autre fluorochrome: le **bromure d'éthidium**. Celui-ci va s'insérer dans l'ADN présent au niveau du noyau des astrocytes. L'ouverture des HC peut être induite par l'administration de

lipopolysaccharide (LPS) dans le milieu de culture ou l'ajout de cytokines proinflammatoires (Retamal et al., 2007). Dans le cas du LPS, son action fait intervenir la microglie, toujours présente quoiqu'en faible proportion dans une culture astrocytaire. En activant la microglie, le LPS induit la libération de cytokines proinflammatoires notamment du TNF- α et de l'IL-1 β .

Par ailleurs, d'autres outils basés sur la libération d'ATP et de glutamate par les HC peuvent être utilisés. Des études colorimétriques ou chromatographiques permettent l'analyse du glutamate dans le milieu extracellulaire, des études de bioluminescence sont quant à elles utilisées pour analyser l'ATP (Giaume and Theis, 2010).

II.4.2. Etudes *ex vivo*

A l'aide d'outils électrophysiologiques, il est possible d'étudier le couplage des astrocytes sur tranches. Les astrocytes sont dans un premier temps identifiés à l'aide de leur morphologie et de leurs propriétés électrophysiologiques. L'injection de Lucifer yellow ou de sulforhodamine B va ensuite être réalisée à l'aide d'une pipette dans un astrocyte enregistré (patch clamp). Le **suivi de la diffusion du fluorochrome**, corrélée au nombre d'astrocytes marqués, permet de quantifier le couplage astrocytaire.

Par ailleurs, l'étude des courants jonctionnels entre deux astrocytes permet aussi d'étudier la communication intercellulaire, ceci implique la technique du **double patch-clamp**. Un voltage est imposé sur l'un des astrocytes et le courant astrocytaire induit par ce voltage est quantifié dans chacune des deux cellules (Giaume et al., 1991a).

L'étude des HC peut quant à elle être réalisée par une étude électrophysiologique, impliquant la méthode du patch-clamp, ou reposer sur l'étude de l'incorporation de bromure d'éthidium (Giaume et al., 2012).

Les Cx30 et Cx43 forment des GJ, responsables de la communication intercellulaire des astrocytes. La communication paracrine et autocrine de ces cellules gliales est assurée par les Hc Cx43. Les deux connexines sont également impliquées dans d'autres fonctions telle que la morphologie cellulaire. Différents outils permettent d'étudier la fonctionnalité des Cx30 et Cx43 in vitro et ex vivo.

Des deux connexines astrocytaires présentées dans cette partie, notre étude s'intéresse plus spécifiquement à la Cx43. L'implication de cette protéine a été démontrée dans de

nombreuses pathologies du système nerveux central, comme la dépression, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques ou encore l'épilepsie (Eugenin et al., 2012) et a dernièrement été confirmée dans la maladie d'Alzheimer (Yi et al., 2016). De plus, cette protéine astrocytaire a récemment été impliquée dans la pathologie des douleurs neuropathiques.

III. Connexine 43 astrocytaire et douleurs neuropathiques

Plusieurs études précliniques ont démontré l'implication de la Cx43 dans la pathologie des douleurs neuropathiques. D'une part un changement de son expression et de sa fonction a été identifié, de plus l'effet antinociceptif de l'inhibition de la Cx43 a été démontré.

Ces études ont été réalisées au niveau du système nerveux central, impliquant essentiellement une expression de la Cx43 d'origine astrocytaire. En effet, cette protéine est également retrouvée au niveau de la microglie et des neurones, toutefois son expression par ces cellules reste très minoritaire (Rackauskas et al., 2010) et la majorité des études réalisées dans le système nerveux central considèrent que l'expression de cette Cx43 est exclusivement astrocytaire.

III.1. Etude de son expression et de sa fonction

III.1.1. Expression

L'expression de la Cx43 a été quantifiée au niveau protéique par les techniques de western blot et d'immunohistochimie chez le rongeur (rat et souris), dans des modèles de douleurs neuropathiques aussi bien périphériques que centrales, comme le rapporte le Tableau 13 de la page suivante.

L'ensemble des études réalisées rapporte une **augmentation significative de l'expression de la Cx43** chez les animaux neuropathiques.

Type de douleurs neuropathiques	Modèle	Tissu étudié	Référence
Douleurs neuropathiques périphériques	Ligature du nerf infraorbitaire	Ganglion trigéminal	(Ohara et al., 2008)
	Lésion du nerf sciatique	Moelle épinière	(Chen et al., 2014)
Douleurs neuropathiques centrales	Lésion de la moelle épinière (Section ou contusion)	Moelle épinière	(Lee et al., 2005) (Chen et al., 2012) (O'Carroll et al., 2013)
	Injection de cellules tumorales (Walker 256)		(Hang et al., 2016)
	Injection d'un anticancéreux (oxaliplatine)		(Yoon et al., 2013)

Tableau 13 : Modèles rapportant une surexpression de la Cx43 dans la pathologie des douleurs neuropathiques

L'augmentation de l'expression de la Cx43 a été observée dans la moelle épinière, dès les quatre premières heures après la lésion de ce tissu (O'Carroll et al., 2013) et est toujours présente au bout de deux mois dans ce même modèle de lésion centrale (Chen et al., 2012) ainsi que trois semaines après la lésion du nerf sciatique (Chen et al., 2014). Ceci suggère l'implication de la Cx43 aussi bien dans l'induction que le maintien des douleurs neuropathiques. Toutefois, il est important de noter que cette augmentation de Cx43 est corrélée à une augmentation de GFAP dans ces modèles, ainsi la surexpression de cette protéine peut s'expliquer par le nombre plus important d'astrocytes qui l'expriment et n'est pas forcément la conséquence directe d'une synthèse protéique renforcée.

Par ailleurs, des études de sa fonction sont en faveur d'une implication de la Cx43 dans la pathologie des douleurs neuropathiques.

III.1.2. Fonction

III.1.2.1. Etude des GJ Cx43

✓ Etude du couplage

L'étude de la communication intercellulaire assurée par les GJ Cx43 dans les modèles de douleurs neuropathiques est une donnée manquante de la littérature. A ce jour, l'étude spécifique du couplage astrocytaire a uniquement été réalisée dans des modèles de **douleurs inflammatoires**.

Dans ces modèles, l'inflammation est induite par l'injection de CFA (Complete Freund's Adjuvant) au niveau de la patte (Dublin and Hanani, 2007) ou l'administration de DNBS (Dinitrobenzene sulfonate) au niveau du colon (Hanani et al., 2010; Huang et al., 2010) chez la souris adulte. L'étude du couplage est réalisée au niveau des ganglions et repose sur l'injection de Lucifer yellow par microélectrodes. Le nombre de cellules marquées, significativement plus élevé chez les souris atteintes de douleurs inflammatoire, révèle une augmentation du couplage intercellulaire des cellules satellites.

✓ **Inhibition de la Cx43**

Plusieurs études réalisées chez le rongeur rapportent une **réduction des symptômes** comportementaux de douleurs neuropathiques **après l'inhibition** pharmacologique ou génétique de la Cx43 (Tableau 14). Toutefois, cette inhibition n'est pas spécifique des GJ et ne permet pas de conclure sur leur activité mais uniquement sur l'implication fonctionnelle de la Cx43 dans la pathologie des douleurs neuropathiques.

Méthode d'inhibition assurant le blocage des GJ et des HC	Type de lésion réalisée	Conséquence de l'inhibition sur la réponse comportementale	Référence
Pharmacologique : injection de carbenoxolone	Périphérique et centrale	Réduction de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie thermique	(Spataro et al., 2004) ; (Roh et al., 2010); (Yoon et al., 2013); (Chen et al., 2014)
Génétique : utilisation de souris Cx43KO	Périphérique et centrale		(Chen et al., 2012); (Huang et al., 2012); (Chen et al., 2014)
Génétique : administration d'ARNi pour la Cx43	Périphérique	Réduction de l'allodynie mécanique	(Jasmin et al., 2010)

Tableau 14 : Etude de l'inhibition de la Cx43 dans des modèles de douleurs neuropathiques périphériques et centraux

Par ailleurs, si l'étude spécifique du couplage n'a pas été réalisée, l'implication des HC Cx43 a quant à elle été démontrée dans des modèles précliniques de douleurs neuropathiques.

III.1.2.2. Etude des HC Cx43

✓ **Démonstration de l'implication des HC Cx43**

L'ouverture des HC a été démontrée dans un modèle de lésion de moelle épinière. Cette étude rapporte une augmentation de la libération d'ATP au niveau de la moelle suite chez la souris lésée, qui n'est pas observé dans le cas de souris Cx43KO (Huang et al., 2012). Ceci sous-entend l'ouverture des HC Cx43 qui conduit de fait à la libération d'ATP dans le milieu extracellulaire.

De plus, des études rapportent la réduction des symptômes d'hyperalgésie et d'allodynie suite à l'administration de peptides mimétiques chez le rat (O'Carroll et al., 2013) et la souris (Chen et al., 2014). Ceci valide donc l'implication des HC dans la pathologie des douleurs neuropathiques.

✓ **Facteurs induisant l'ouverture des HC Cx43**

Lors des douleurs neuropathiques, outre la possibilité de leur ouverture par une augmentation calcique intracellulaire, les HC seraient ouverts par les interleukines IL-1 β et TNF- α que l'on sait être davantage libérées par la microglie et les astrocytes réactifs dans cette pathologie (Mika et al., 2013). En effet, comme cela a déjà été mentionné, les études *in vitro* sont en faveur d'une ouverture des HC Cx43 en présence d'IL-1 β et de TNF- α . De plus, l'injection au niveau de la moelle d'astrocytes ayant été activés par TNF- α conduit à la libération de chimiokines et à la présence d'allodynie chez la souris, ceci étant reversé par le blocage de la Cx43 (Chen et al., 2014). Ceci sous-entend l'ouverture des HC par la présence de TNF- α et confirme leur implication dans les douleurs neuropathiques.

✓ **Conséquences de l'ouverture des HC Cx43**

L'ouverture des HC induit la libération d'ATP et de glutamate, pouvant contribuer respectivement à l'activation gliale et neuronale dans la pathologie des douleurs neuropathiques. Des études rapportent ainsi que le blocage des HC réduit l'activation astrocytaire (Huang et al., 2012; O'Carroll et al., 2013) et microgliale (Huang et al., 2012) et la libération associée d'IL-1 β et de TNF- α (O'Carroll et al., 2013) dans des modèles de lésion de moelle. L'ATP et les interleukines créent un cycle d'activation incessant des HC et des astrocytes dans la pathologie des douleurs neuropathiques (Figure 33).

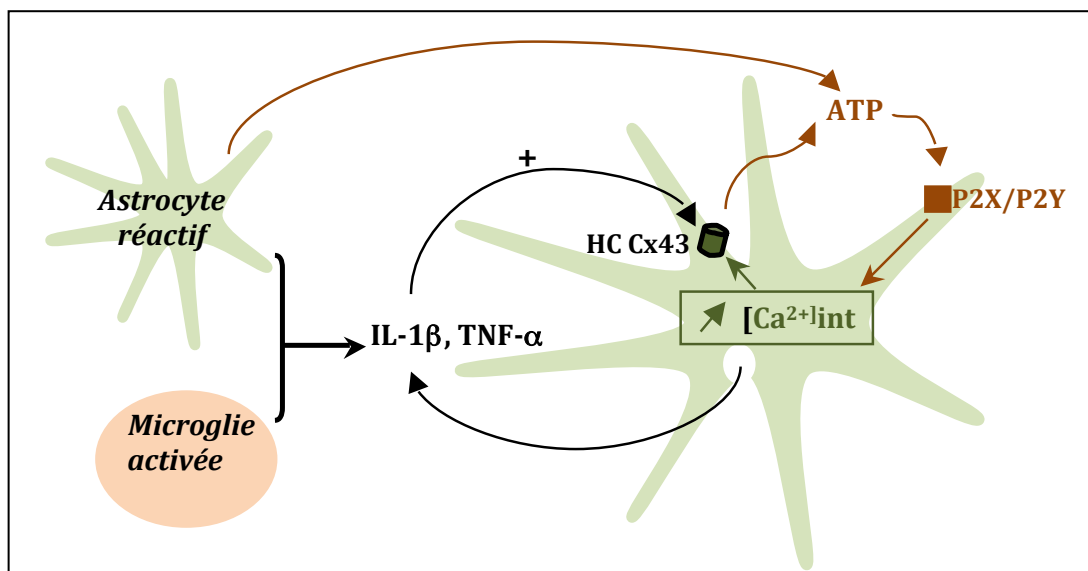


Figure 33 : Boucle d'activation des Hc Cx43 par l'ATP et les interleukines dans la condition pathologique des douleurs neuropathiques. Les interleukines (IL-1 β , TNF- α) libérées par la glie activée vont ouvrir (+) les HC Cx43. La libération d'ATP consécutive à cette activation des HC va conduire à une augmentation calcique intracellulaire par le biais des récepteurs purinergiques (P2X, P2Y). Ceci entraîne de nouveau l'ouverture des HC Cx43 et induit la libération d'interleukines par l'astrocyte réactif.

Toutefois, si les études mentionnées ci-dessus sont en faveur d'**une augmentation de l'expression et de la fonction** de la Cx43 dans les douleurs neuropathiques, ainsi que de l'effet **antinociceptif** de son blocage, deux articles récents présentent des idées contraires (Morioka et al., 2015; Zhang et al., 2016).

Ces articles s'appuient tous deux sur le modèle de ligature partielle du nerf sciatique chez la souris. Dans ce modèle, les auteurs rapportent une réduction de l'expression de la Cx43 au niveau de la moelle épinière (Morioka et al., 2015). En outre, ils observent également une diminution de l'expression spinale de la Cx43 *in vitro* dans des modèles de culture chez le rat et *in vivo* chez la souris après l'administration de TNF- α (Zhang et al., 2016), contrairement à ce qui a pu être observé *in vitro* chez la souris (Chen et al., 2014). Ces auteurs préconisent la réversion de l'inhibition de la Cx43 comme nouvelle approche thérapeutique des douleurs neuropathiques.

Cette idée est à l'encontre des autres études, en faveur de la réduction de la Cx43 pour réduire les symptômes d'hyperalgésie et d'allodynie. Toutefois, il est important de noter que les deux articles mentionnés ci-dessus ont été réalisés sur le modèle de ligature partielle du nerf sciatique, non utilisé dans les autres études. Il est donc possible que l'implication de la Cx43 varie selon le type de lésion nerveuse impliquée, ces travaux sont à compléter dans d'autres modèles et par d'autres équipes.

L'étude de la Cx43 a démontré une augmentation de son expression dans la majorité des modèles précliniques de douleurs neuropathiques ainsi que l'implication des HC suite à des lésions périphériques et centrales. L'inhibition de la Cx43 induit par ailleurs une réduction des symptômes d'allodynie et d'hyperalgésie consécutifs à ces lésions. L'étude des GJ Cx43 n'a toutefois pas été étudiée dans les douleurs neuropathiques, mais uniquement dans des modèles inflammatoires.

Par ailleurs, outre son implication dans les douleurs neuropathiques, plusieurs études sont en faveur d'un lien entre la Cx43 et les antidépresseurs.

IV. Connexine 43 astrocytaire et antidépresseurs

IV.1. Etudes de l'expression de la Cx43

Des études *in vitro* et *in vivo* réalisées chez le rat sont en faveur d'une **augmentation de l'expression de la Cx43** (au niveau messager et protéique) par des antidépresseurs TCA, ISRS et IRSNA. Ces études ont toutes été réalisées au niveau du cortex et plus précisément dans le cortex préfrontal pour les analyses *in vivo*. De plus, une étude avec la fluoxétine a été réalisée sur une lignée cellulaire humaine (Tableau 15).

Antidépresseur	Classe	Traitement (dose et durée)	Modèle	Référence
Amitriptyline	TCA	25 µM, 48 heures	Culture d'astrocytes corticaux de rats	(Morioka et al., 2014)
Clomipramine	TCA	10 µM, 48 heures	Culture d'astrocytes corticaux de rats	(Morioka et al., 2014)
Fluoxétine	ISRS	20 mg/kg, 21 jours	Rat, cortex préfrontal	(Fatemi et al., 2008)
		10 mg/kg, 21 jours	Rat, cortex préfrontal	(Sun et al., 2012)
		10, 20 µg/mL, 24 heures	Lignée cellulaire d'astrocytome humain	(Mostafavi et al., 2014)
Fluvoxamine	ISRS	25 µM, 48 heures	Culture d'astrocytes corticaux de rats	(Morioka et al., 2014)
Duloxétine	IRSNA	10 mg/kg, 21 jours	Rat, cortex préfrontal	(Sun et al., 2012)

Tableau 15 : Antidépresseurs ayant démontré une augmentation de l'expression de la Cx43 dans des modèles *in vitro* et *in vivo*

Plus récemment, une étude réalisée chez la souris indique qu'un traitement d'un mois avec de la fluoxétine n'induit pas de changement de l'expression de la Cx43 au niveau de l'hippocampe, contrairement à ce qui a été observé au niveau du cortex chez le rat (Quesseveur et al., 2015). Par ailleurs, cette étude de 2015 démontre que la fluoxétine

influence **la phosphorylation** de la Cx43. En effet, alors qu'une augmentation de cette phosphorylation est observée chez des souris soumises à un modèle de dépression, celles traitées avec la fluoxétine présentent un niveau de phosphorylation similaire aux souris contrôles. Ce qui indique que la fluoxétine est capable de reverser l'augmentation de la phosphorylation de la Cx43. Les auteurs suggèrent ici que cet antidépresseur pourrait de fait inhiber l'ouverture des HC et l'activité des GJ conséquentes à la phosphorylation de la Cx43, notamment en conditions pathologiques.

Comme énoncé précédemment pour les astrocytes, certaines des études mentionnées ci-dessus incluent des modèles de dépression. Il est nécessaire d'étudier l'effet des antidépresseurs sur la Cx43 dans des modèles spécifiques de douleurs neuropathiques, ceci fait l'objet de cette thèse.

D'autre part, des études ont plus spécifiquement été réalisées sur la fonctionnalité de la Cx43 après un traitement avec des antidépresseurs.

IV.2. Etudes fonctionnelles de la Cx43

Deux articles rapportent une étude de l'activité de la Cx43 suite au traitement par des antidépresseurs, tous deux étudient **le couplage** assuré par les GJ Cx43. L'étude des HC Cx43 n'est quant à elle pas référencée dans la littérature.

Le premier article étudie le couplage dans des tranches corticales, provenant de rats ayant été traités pendant 21 jours avec la fluoxétine et la duloxétine. L'absence de différence de diffusion du Lucifer yellow entre les animaux traités et contrôles indique que ces antidépresseurs n'induisent **pas de modulation directe** du couplage astrocytaire. Toutefois, lorsque ces mêmes animaux sont soumis à un protocole de stress chronique, la diminution du couplage conséquent au stress est reversée pour les rats ayant reçu de la fluoxétine ou de la duloxétine (Sun et al., 2012).

Le second article s'intéresse à l'amitriptyline et quantifie le couplage à l'aide de la technique de scrape loading dans un modèle de culture d'astrocytes corticaux chez le rat. Une **augmentation significative du couplage** est observée, suite aux 48 heures de traitement des astrocytes avec le TCA (Morioka et al., 2014).

Les effets des antidépresseurs sur les GJ Cx43 semblent hétérogènes selon les classes thérapeutiques étudiées (ISRS, IRSNA versus TCA). Cependant, les études ont été réalisées

dans des modèles différents et il est nécessaire de les renforcer avant de statuer sur la modulation de la fonctionnalité de la Cx43 par les antidépresseurs.

Les antidépresseurs de différentes classes thérapeutiques (TCA, ISRS, IRSNA) modulent l'expression de la Cx43. De plus, l'amitriptyline induit une augmentation du couplage assuré par les GJ Cx43. Ces résultats ont été obtenus suite à des traitements chroniques in vitro ou in vivo, majoritairement chez le rat. L'étude des HC n'a quant à elle pas été réalisée.

Si l'étude des fonctions de la Cx43 doit être renforcée, la littérature est en faveur d'une modulation de l'expression de la Cx43 par les antidépresseurs. Ces derniers incluent en outre deux molécules communément prescrites en douleurs neuropathiques: la duloxétine et l'amitriptyline. Etant donné l'implication de la Cx43 dans les douleurs neuropathiques, l'action des antidépresseurs sur cette même cible protéique pourrait de fait participer à leur action antinociceptive.

Ainsi, préciser le lien entre Cx43 et antidépresseurs notamment au niveau fonctionnel, pourrait permettre de mieux comprendre leur effets thérapeutiques dans la pathologie des douleurs neuropathiques et offrir une nouvelle cible pour renforcer leur efficacité. Cette approche est l'objet de cette thèse dont la problématique et les objectifs associés sont présentés à la page suivante.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Les douleurs neuropathiques, caractérisées par une forte épidémiologie, sont traitées en première intention par des antidépresseurs et plus particulièrement les tricycliques tels que l'amitriptyline (commercialisé sous le nom de Laroxyl), et ce quelles que soient les étiologies à la base de ces douleurs. Cependant, ces molécules présentent un manque d'efficacité et de sécurité, de même qu'un délai d'action important pouvant dans de trop nombreux cas conduire à l'arrêt du traitement par le patient. Il y a ainsi aujourd'hui une réelle nécessité d'améliorer ces molécules dans la perspective thérapeutique des douleurs neuropathiques.

Traditionnellement ont été étudiées les voies de neurotransmission, modulées dans les douleurs neuropathiques et modifiées par les antidépresseurs, telles que les voies sérotoninergiques ou noradrénergiques. Ce projet s'est, de façon complémentaire à ces travaux, focalisé sur un autre type cellulaire particulièrement important dans les processus neuronaux, les astrocytes. Ceux-ci joueraient un rôle dans la réponse aux antidépresseurs, et ce plus spécifiquement via une de leur protéines transmembranaires très exprimée dans ce type cellulaire, la connexine 43. En effet, un lien a dernièrement été démontré entre cette cible protéique et les antidépresseurs dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. En outre, la Cx43 a récemment été impliquée dans le mécanisme d'action des douleurs neuropathiques. Des modifications de son expression et de sa fonction ont été observées dans des modèles précliniques et son inhibition s'est avérée antinociceptive.

Préciser le lien entre les antidépresseurs et la Cx43 est donc primordial pour évaluer si les astrocytes, et plus particulièrement leur connexines, peuvent constituer une nouvelle cible thérapeutique pour moduler les effets des antidépresseurs dans les douleurs neuropathiques. La problématique de la thèse est ainsi la suivante :

La connexine 43 astrocytaire peut elle moduler le profil pharmacologique des antidépresseurs dans le traitement des douleurs neuropathiques ?

Pour répondre à cette problématique, la thèse est articulée autour de deux objectifs complémentaires, visant à mieux comprendre le lien entre le profil pharmacologique des antidépresseurs et l'implication des connexines astrocytaires :

✓ Dans un premier temps, **préciser l'action des antidépresseurs sur la connexine 43 astrocytaire, au niveau de son expression et de ses fonctions** (GJ et HC). Cet objectif a pour but de renforcer les données présentes dans la littérature, notamment pour la fonction HC jamais étudiée jusqu'à présent avec les antidépresseurs, en établissant un profil de comparaison de différentes classes d'antidépresseurs (bloqueurs de recapture de sérotonine, de noradrénaline, bloqueurs mixtes, tricycliques), dont la majorité est utilisée dans les douleurs neuropathiques.

✓ Dans un second temps, **étudier les conséquences de la modulation de la Cx43 astrocytaire sur l'effet antinociceptif d'un antidépresseur dans un modèle préclinique de douleurs neuropathiques**. Le but à ce stade est de déterminer comment la Cx43 module les effets d'un antidépresseur utilisé en première ligne dans les douleurs neuropathiques, l'amitriptyline, notamment au niveau de son efficacité et son délai d'action.

RESULTATS

Première étude : Les antidépresseurs modulent les fonctions de la Cx43 astrocytaire.

Introduction

Les antidépresseurs sont prescrits en première intention dans la pathologie des douleurs neuropathiques. Toutefois, ces traitements présentent un manque d'efficacité puisque seuls 50% des patients observent une réduction de leurs douleurs et celle-ci n'est que partielle (Grima, 2008). Le mode d'action des antidépresseurs résulte principalement de l'inhibition de la recapture des monoamines, impliquant les transporteurs des neurones monoaminergiques. Cependant, en plus de ces cibles neuronales, une protéine astrocytaire a récemment été impliquée dans l'action des antidépresseurs. Cette protéine est la Cx43, également décrite dans la pathologie des douleurs neuropathiques. De fait, la Cx43 astrocytaire pourrait être une nouvelle cible pour renforcer l'effet thérapeutique des antidépresseurs dans cette pathologie. Un des objectifs de ces travaux est d'évaluer ce potentiel impact.

La majorité des études de la littérature est en faveur d'une modulation positive de la Cx43 astrocytaire par les antidépresseurs. L'augmentation de l'expression de la Cx43 a été démontrée suite au traitement par des antidépresseurs TCA, ISRS et IRSNA chez le rat (Fatemi et al., 2008; Sun et al., 2012 ; Morioka et al., 2014; Mostafavi et al., 2014). De plus, le couplage intercellulaire assuré par les GJ Cx43 s'est avéré renforcé par l'antidépresseur TCA amitriptyline dans un modèle de culture d'astrocytes de rats (Morioka et al., 2014). Toutefois, deux articles vont à l'encontre de ces données, n'indiquant aucun changement de l'expression de la Cx43 suite au traitement avec l'ISRS fluoxétine chez la souris (Quesseveur et al., 2015) et pas de variation du couplage suite au traitement par des antidépresseurs ISRS et IRSNA chez le rat (Sun et al., 2012). Il est possible que les effets des antidépresseurs sur la Cx43 soient hétérogènes d'une classe thérapeutique à l'autre, cependant la variabilité des modèles (*in vitro* versus *in vivo*) et des conditions expérimentales (doses et temps de traitement) utilisés dans ces études ne permet pas de les comparer.

Il s'avère nécessaire de renforcer ces données de la littérature afin de préciser l'action des antidépresseurs sur la Cx43. De plus, il paraît crucial de s'intéresser à la fonction HC, jamais étudiée jusqu'à présent. Ceci a représenté la première partie de ce travail de thèse. Nous avons étudié l'action de 7 antidépresseurs, issus de 4 classes différentes, sur

l'expression et les fonctions de la Cx43. Par ailleurs, notre étude a inclus trois antidépresseurs communément prescrits dans la pathologie des douleurs neuropathiques: l'amitriptyline, la duloxétine et la venlafaxine.

Ces travaux ont été réalisés un modèle de culture d'astrocytes corticaux chez la souris (voir Mème et al., 2006). Ce modèle présente l'avantage de n'exprimer que la Cx43 (Koulakoff et al., 2008), ce qui permet une étude sélective de ses fonctions. De plus, le cortex est une région cible de l'action des antidépresseurs communément utilisé dans la littérature (Rantamäki and Yalcin, 2016), ce qui a justifié le choix de ce tissu. Deux techniques disponibles au sein du laboratoire ont été utilisées pour les GJ et les HC respectivement : le scrape-loading et l'étude de l'incorporation de bromure d'éthidium. L'expression de la Cx43 a été quantifiée par Western Blot. Les doses des antidépresseurs ont été choisies en fonction de la concentration cérébrale retrouvée chez le rongeur ou chez l'homme, après un traitement à doses cliniques. L'avantage de conserver les mêmes conditions expérimentales ainsi qu'un modèle commun pour les 7 antidépresseurs testés, est de pouvoir comparer leurs effets et ainsi statuer sur les éventuelles différences d'une classe thérapeutique à l'autre.



Antidepressants Impact Connexin 43 Channel Functions in Astrocytes

Tiffany Jeanson^{1,2,3,4}, Audrey Pondaven^{1,2,3}, Pascal Ezan^{1,2,3}, Franck Mouthon⁴, Mathieu Charvériat⁴ and Christian Giaume^{1,2,3*}

¹ Collège de France, Center for Interdisciplinary Research in Biology/Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7241/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1050, Paris, France, ² University Pierre et Marie Curie, Paris, France, ³ MemoLife Laboratory of Excellence and Paris Science Lettre Research University, Paris, France, ⁴ Theranexus, Lyon, France

Glial cells, and in particular astrocytes, are crucial to maintain neuronal microenvironment by regulating energy metabolism, neurotransmitter uptake, gliotransmission, and synaptic development. Moreover, a typical feature of astrocytes is their high expression level of connexins, a family of membrane proteins that form gap junction channels allowing intercellular exchanges and hemichannels that provide release and uptake pathways for neuroactive molecules. Interestingly, several studies have revealed unexpected changes in astrocytes from depressive patients and rodent models of depressive-like behavior. Moreover, changes in the expression level of the astroglial connexin 43 (Cx43) have been reported in a depressive context. On the other hand, antidepressive drugs have also been shown to impact the expression of this connexin in astrocytes. However, so far there is little information concerning the functional consequence of these changes, i.e., the status of gap junctional communication and hemichannel activity in astrocytes exposed to antidepressants. In the present work we focused our attention on the action of seven antidepressants from four different therapeutic classes and tested their effects on Cx43 expression and on the two connexin-based channels functions studied in cultured astrocytes. We here report that when used at non-toxic and clinically relevant concentrations they have no effects on Cx43 expression but differential effects on Cx43 gap junction channels. Moreover, all tested antidepressants inhibit Cx43 hemichannel with different efficiency depending on their therapeutic classe. By studying the impact of antidepressants on the functional status of astroglial connexin channels, contributing to dynamic neuroglial interactions, our observations should help to better understand the mechanism by which these drugs provide their effect in the brain.

OPEN ACCESS

Edited by:

Egidio D'Angelo,
University of Pavia, Italy

Reviewed by:

Ping Liu,
University of Connecticut Health
Center, USA
Sandra Henriques Vaz,
Universidade de Lisboa, Portugal

*Correspondence:

Christian Giaume
christian.giaume@college-de-france.fr

Received: 28 September 2015

Accepted: 09 December 2015

Published: 07 January 2016

Citation:

Jeanson T, Pondaven A, Ezan P,
Mouthon F, Charvériat M
and Giaume C (2016)
Antidepressants Impact Connexin 43
Channel Functions in Astrocytes.
Front. Cell. Neurosci. 9:495.
doi: 10.3389/fncel.2015.00495

Keywords: gap Junctions, hemichannels, glial cells, depression, inflammation

INTRODUCTION

During the two last decades, a major step in the understanding of brain functions and dysfunctions has been to consider that not only neurons are at the center of these processes but that also their glial environment is actively involved. This statement is particularly true for astrocytes, a major glial cell population that establishes tight morphological and functional interactions with neurons (Halassa and Haydon, 2010; Verkhratsky et al., 2012) leading to the concept of the “tripartite

synapse” (see Araque et al., 1999; Pérez-Alvarez and Araque, 2013). In brain pathologies and mental illness this partnership is impaired, contributing to severe neuronal defects and even in certain cases leading to neuronal death (Giaume et al., 2007; Bennett et al., 2012; Parpura et al., 2012). Such alterations in neuroglial interaction start to be investigated in order to identify and develop alternative therapeutic approaches that target astrocytes instead of solely neurons (Colangelo et al., 2014; Lundgaard et al., 2014; Vardjan et al., 2015). Following this strategy, the objective is to act on a specific astroglial molecular constituent known to regulate neuronal activity and/or survival. Based on these requirements astroglial connexins (Cxs), a family of membrane proteins, may be considered as a good candidate. Indeed, Cxs are highly expressed in astrocytes compared to all other brain cell populations (see Ransom and Giaume, 2013), including neurons, and they have been reported to interplay with synaptic activity and plasticity (Pannasch et al., 2011), animal behavior (Stehberg et al., 2012), and neuronal survival (Froger et al., 2010; Freitas-Andrade and Naus, 2015). Besides, the expression and function of astroglial Cxs are affected in neurodegenerative diseases (Kawasaki et al., 2009; Koulakoff et al., 2012; Takeuchi and Suzumura, 2014), ischemia and stroke (Orellana et al., 2014), epilepsy (Mylvaganam et al., 2014), demyelinating diseases (Cotrina and Nedergaard, 2012) and cancer (Naus and Laird, 2010). Much less is known about the status, i.e., expression and function, of Cxs in astrocytes in non-neurodegenerative mood disorders such as depression, while those pathologies are associated to a reduction in the number of astrocytes and a decrease in GFAP immunoreactivity (see Rajkowska and Stockmeier, 2013).

Connexins are the molecular constituents of gap junctions that are membrane specializations consisting of dense aggregates of large pore channels formed by two paired hexamers of Cxs. These gap junction channels extend from one cell into an adjacent cell and mediate a unique direct cytoplasm-to-cytoplasm communication. These channels are poorly selective for ions and for small molecular weight signaling molecules, thus they allow extensive ionic and biochemical exchanges between cells (Harris, 2007). In astrocytes, gap junction channels provide the basis for ionic homeostasis, particularly for potassium buffering and intercellular calcium signaling. They are also involved in biochemical and metabolic coupling (see Ransom and Giaume, 2013). Under certain conditions Cxs can also operate as half of a gap junction channel, named “hemichannel,” representing another functional state that provides a pathway suitable for autocrine as well as paracrine interactions in the brain. In astrocytes, connexin hemichannels are permeable to ions and are involved in the release of gliotransmitters such as ATP and glutamate (Ye et al., 2003; Kang et al., 2008; Abudara et al., 2015), the uptake of glucose (Retamal et al., 2007) and the efflux of glutathione (Rana and Dringen, 2007; Ye et al., 2015). In astrocytes two major Cxs have been identified, Cx43 and Cx30, which are not expressed in other brain cell types and are characterized by different developmental and regional patterns of expression (Nagy et al., 2004). Both Cxs contribute to gap junctional communication

but so far only hemichannels made by Cx43 have been reported to be functional in astrocytes (see Giaume et al., 2013).

The information concerning astroglial Cxs and depression is based on two kinds of observations available from the literature. Firstly, those that report changes in the expression of astroglial Cxs from depressive patients, persons having committed suicide or from animal models of depression. Indeed, a Canadian study of postmortem generated microarray data suicide completers indicated that the expression level of Cx43 and Cx30 is reduced in dorsal lateral prefrontal cortex (Ernst et al., 2011) and in the locus coeruleus (Bernard et al., 2011). In addition, a recent study has reported that the expression of Cx43 is reduced in postmortem brains from patients suffering from major depressive disorder or comorbid depression relative to healthy subjects (Miguel-Hidalgo et al., 2014). Also, Sun et al. (2012) have reported a decrease in diffusion of gap junction channel-permeable dye and expression of Cx43 in the prefrontal cortex in rats subjected to chronic unpredictable stress. Secondly, on the other side treatment with antidepressants also results in changes in the expression level of Cx43 in astrocytes as indicated in **Table 1**. Five antidepressants, from three different therapeutic classes, have been tested in cellular and animal models; results indicate that 24–48 h treatment induces an increase in Cx43 expression at mRNA and/or protein levels. This is particularly the case for fluoxetine that has been tested in several models (Fatemi et al., 2008; Mostafavi et al., 2008; Sun et al., 2012). However, there is little information about the effect of these drugs on the functional status of gap junctional communication and none about hemichannel activity. So far based on this literature it is tempting to deduce and summarize that depressive brains show a down-regulation of Cx43 while antidepressant treatments favor its up-regulation (see Rajkowska and Stockmeier, 2013). Nevertheless, an important clue concerning Cxs is to identify the functional consequences of these treatments on Cx43-based channels since changes in level of expression can have unpredictable consequences on their function. In order to address this question we have carried out a systematic test of seven antidepressants on gap junctional communication and hemichannel activity in primary cultures of astrocytes, known to express only Cx43 (Dermietzel et al., 1991; Giaume et al., 1991; Koulakoff et al., 2008). The present study indicates that when used at a non-toxic and clinically relevant concentration they have differential effects on both channel functions leading to a more complicated global view of their action on intercellular communication mediated by Cx43 in astrocytes.

MATERIALS AND METHODS

All experiments were performed according to the European Community Council Directives of 2010/63/UE and all efforts were made to minimize the number of animals. This study was carried out in accordance with the recommendations of the Ethic Committee 59, Paris, France and received the approval of the

TABLE 1 | Summary table of the effects of antidepressants on Cx43 expression and gap junctional function in astrocytes.

Antidepressant	Class	Effect on Cx43 expression	Effect on Cx43 function	Model	Treatment (dose and time)	Reference
Amitriptyline	TCA	Increase (mRNA, protein)	Increase (gap junction)	Primary cultures rat cortical astrocytes	25 μ M, 48 h	Morioka et al., 2014
Clomipramine	TCA	Increase (protein)	NT	Primary culture rat cortical astrocytes	10 μ M, 48 h	Morioka et al., 2014
Fluoxetine	SSRI	Increase (protein)	NT	Rat <i>in vivo</i> Prefrontal cortex	20 mg/kg i.p. for 21 days	Fatemi et al., 2008
Fluoxetine	SSRI	Increase (mRNA, protein)	NT	Human astrocytoma cell line	10, 20 μ g/ml 24 h	Mostafavi et al., 2008
Fluoxetine	SSRI	Increase (protein)	No effect (gap junction)	Rat <i>in vivo</i> Prefrontal cortex	10 mg/kg 21 days	Sun et al., 2012
Duloxetine	SNRI	Increase (mRNA, protein)	No effect (gap junction)	Rat <i>in vivo</i> Prefrontal cortex	10 mg/kg 21 days	Sun et al., 2012
Fluvoxamine	SSRI	Increase (protein)	NT	Primary cultures rat cortical astrocytes	25 μ M 48 h	Morioka et al., 2014

Scientific Committee of the animal facilities of the Collège de France.

Cortical Astrocyte Cultures

Primary astrocyte cultures were prepared from the cortex of newborn (1–2 days) OF1 mice as previously described (Meme et al., 2006). For western blot and scrape-loading dye-transfer experiments, cells were seeded on polyornithine-coated 35-mm-diameter dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) at a density of 5×10^5 cells/mL. For hemichannel experiments cells were seeded (2×10^5 cells per well) on glass coverslips (Gassalem, Limeil-Brévannes, France) placed inside 24-round-well plate; area 1.9 cm²/well; (NunClon, ThermoScientific, Atlanta, GA, USA). Cellular medium, DMEM (Sigma–Aldrich, St-Louis MO, USA), supplemented with penicillin (5 U/ml), streptomycin (5 μ g/ml; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), fungizone amphotericin B (500 ng/mL; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and 10% FCS (Hyclone, Logan, UT, USA), was changed twice a week. When cells reached confluence, around 10 days *in vitro* (DIV), they were harvested with trypsin-EDTA (Invitrogen). The medium was changed twice a week until the experiments were carried out. In order to characterize the proportion of microglia in primary culture of astrocytes, the two cell types were identified by immunostaining with Isolectine B4 and GFAP antibodies, respectively.

Products and Cell Treatments

Astrocyte cultures were treated for 24 h with lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/ml) and/or the following antidepressants: fluoxetine, duloxetine, paroxetine, reboxetine, amitriptyline, imipramine, venlafaxine (5, 10, or 20 μ M, Sigma–Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Carbenoxolone (50 μ M, Sigma–Aldrich) was used as positive inhibitor control for gap junction channels. Drugs were prepared either in H₂O or DMSO. Control cells received no treatment and were previously studied with vehicle (H₂O or DMSO) which induced no changes in comparison with untreated cells.

Determination of Gap Junctional Communication

Experiments were performed by using the scrape-loading dye-transfer technique, as previously described (Meme et al., 2006). Briefly, cells were incubated at room temperature for 10 min in HEPES buffered salt solution containing (in mM): NaCl, 140; KCl, 5.4; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1; glucose, 10; HEPES, 5 at pH 7.4. Cells were then washed with a calcium-free HEPES solution for 1 min and the scrape loading and dye transfer assay (see Giaume et al., 2012) was carried out in the same calcium-free solution containing Lucifer yellow CH (427 Da, 1 mg/ml). One minute after scraping procedure, cells were washed with the HEPES solution and then Lucifer yellow loaded in the cells was allowed to diffuse through gap junction channels for 8 min. Photomicrographs were taken and data were quantified using NIS Nikon software. In all experiments, the fluorescence area of the first row of cells initially loaded, as measured in the presence of the gap junction channel inhibitor carbenoxolone (50 μ M, 24 h), was subtracted from the total fluorescence area.

Ethidium Bromide Uptake Experiments in Cortical Astrocyte Cultures

Following 10 min exposure to 5 μ M ethidium bromide (EtBr), cells were washed with HEPES buffered salt solution containing (in mM): NaCl, 140; KCl, 5.4; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1; glucose, 10; HEPES, 5 at pH 7.4. After 10 min in fixing solution (4% paraformaldehyde in 0.12 M buffer phosphate) and rinsing with phosphate buffered saline (PBS), cells were mounted in Fluoromount-G mounting medium (Orellana et al., 2011). Images of astrocyte cultures were taken with a 40 \times objective using a confocal laser-scanning microscope (Leica TBCS SP5). Stacks of consecutive confocal images for 10 μ m at 0.49 μ m intervals were acquired with an argon ion laser at 488 nm. Confocal images of EthBr uptake were analyzed with Image J software. The EtBr fluorescence intensity in the nuclei of astrocytes in each image was measured and the average of six images of different areas in the same culture was calculated the final measurement of dye uptake in that culture.

Western Blot

After 24 h of treatment, cultures were rinsed with PBS 1X and added 75 μ L of a solution containing protease and phosphatase inhibitors (orthovanadate 1 mM; α -glycerophosphate 10 mM), and complete miniprotease inhibitor (Roche Diagnostics, Meylan, France). Cells were then harvested by scraping with a rubber policeman and pelleted cells were added 20 μ L of 5X Laemmli sample buffer. Samples were boiled for 5 min, placed on ice, and lysed by sonication (Ultrasonic cell disrupter, Microson, Bruxelles, Belgium). Then, samples were stored at -20°C . Proteins were measured with the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad laboratories, Richmond, CA, USA). For each cell lysate sample, 20 μ g of proteins were separated on Bis-Tris 4–12% NuPAGE gels and electro-transferred to nitrocellulose sheets as previously described (Orellana et al., 2011). Non-specific protein binding was blocked by incubation of nitrocellulose sheets in tris-buffered saline (TBS) – Tween – milk solution (500 mL TBS 1X; 500 μ L Tween 20X; non-fat powder milk 25 g) for 1 h. Blots were then incubated overnight with primary antibody mouse Cx43 1:500 (Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France) at 4°C , followed by 4×15 min PBS washes. Blots were incubated with goat anti-mouse antibody 1:2500 conjugated to horseradish peroxidase (Tébu, Le Perray-En-Yveline, France). Immunoreactivity was detected by ECL detection using the SuperSignal kit (Pierce, Rockford, IL, USA) according to instructions. Blots were then reprobed with mouse monoclonal anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase peroxidase (Sigma–Aldrich, 1:10,000) to check the protein load. Chemiluminescence imaging was performed on a LAS4000 (Fujifilm, Stamford, CT, USA). Semiquantitative densitometric analysis was performed with ImageJ software after scanning the bands.

Statistical Analysis

For each data group, results are expressed as mean \pm SEM and n refers to the number of independent experiments. Kruskal–Wallis test and one-way ANOVA, followed, respectively, by Dunn and Bonferroni post tests, were used as well as unpaired t -test. Differences are considered significant at $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ versus control, $+P < 0.05$, $++P < 0.01$, and $+++P < 0.001$ vs. LPS. GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used for calculations.

RESULTS

The doses of the antidepressants were chosen in accordance with literature addressing the neuropharmacokinetics of the tested molecules of interest. Accordingly, cultured cortical astrocytes were treated with concentrations identical to those reported for brains of human or rodent after treatment with clinically relevant doses from *in vivo* studies: for fluoxetine, 20 μ M in human brain is achieved at 20 mg/day (see Henry et al., 2005); for venlafaxine, 10 μ M in mice brain is reached at 20 mg/kg (Karlsson et al., 2011); for duloxetine, 4.2 mg/kg in rat leads to 10 μ M in brain (Kielbasa and Stratford, 2012). For the other molecules (amitriptyline, imipramine, paroxetine, reboxetine)

the doses were selected below cell toxicity that was identified by microscopic examination of astrocyte cultures treated for 24 h, related to changed cell morphology and entry of Lucifer yellow into damaged cells. More precisely the lack of toxicity of the selected doses was routinely validated by the absence of Lucifer yellow unspecific uptake in area far from the scrape lines in scrape-loading dye-transfer experiments (see Figure 1A). Based on these criterions all molecules were tested at concentrations between 5 and 20 μ M (24 h) for toxicity; we observed that fluoxetine at 20 μ M, paroxetine 10 μ M, and duloxetine 20 μ M were toxic at these indicated doses, consequently these molecules were tested at lower doses.

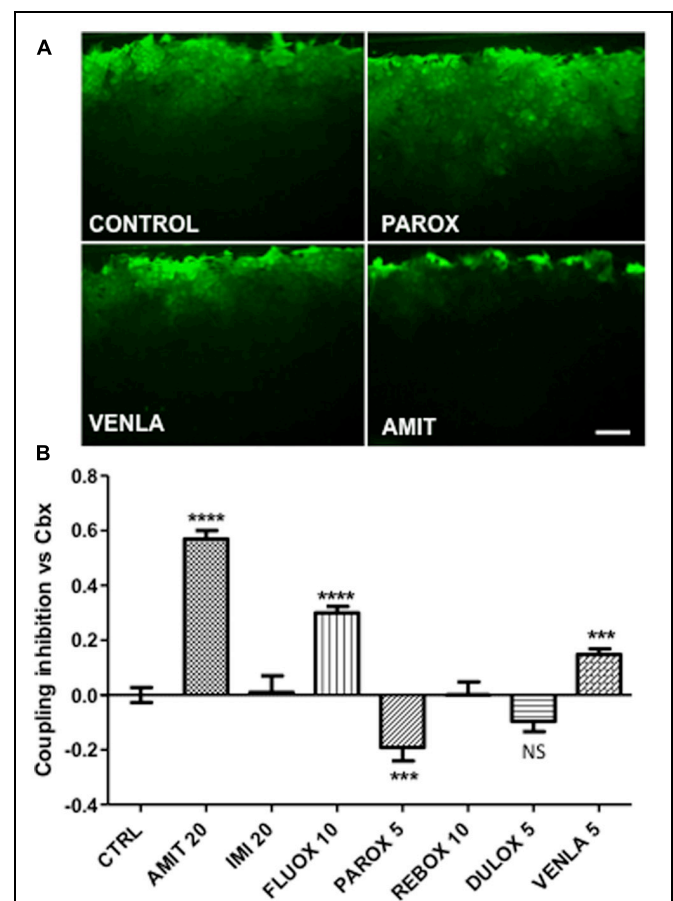


FIGURE 1 | Modulation of astrocyte Cx43 gap junctional communication after 24-h treatment by seven antidepressants in mice cortical astrocyte cultures. Amitriptyline (AMIT), imipramine (IMI), fluoxetine (FLUOX), paroxetine (PAROX), reboxetine (REBOX), duloxetine (DULOX), and venlafaxine (VENLA) were added from 5 to 20 μ M in cellular medium during 24 h, gap junctional communication was evaluated by the scrape loading dye transfer method. (A) Pictures of control, paroxetine 5 μ M, venlafaxine 5 μ M, and amitriptyline 20 μ M, illustrate the Lucifer yellow spreading through astrocyte gap junctions for these different treatments. (B) Summary diagram of junctional communication in vehicle-treated cells (control group) and after antidepressant treatment. Note that the values are normalized to carbenoxolone (50 μ M, 24 h). Data are the means \pm SEM $n = 3–7$ per group, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$ vs. control, Kruskal–Wallis test and one-way ANOVA followed, respectively, by Dunn and Bonferroni post test. Scale bar 20 μ M.

The first question addressed during this screening with antidepressants was their effect on the level of Cx43 expression investigated by western blotting. As indicated in **Table 2**, the seven tested antidepressants did not significantly modify the level of expression of Cx43 studied in cultured cortical mouse astrocytes ($n = 3-6$ per group, $p > 0.05$ One way ANOVA, Dunn post test).

The effect of the selected antidepressants on gap junctional communication was then tested by using the scrape-loading dye transfer technique (see Giaume et al., 2012). In control condition after 10 min the Lucifer yellow diffuses widely perpendicular to the scrape line that indicates a high level of gap junctional communication (**Figure 1A**, control). As illustrated in **Figure 1B**, three different effects were observed. Three antidepressants, amitriptyline (20 μM ; **Figure 1A**), fluoxetine (10 μM), and venlafaxine (5 μM ; **Figure 1A**) reduced intercellular dye spread by 57% ($n = 6$), 25% ($n = 6$), and 15% ($n = 6$), respectively. In contrast, paroxetine (5 μM ; **Figure 1A**) increased dye coupling by 19% ($n = 7$). Finally, imipramine (20 μM , $n = 3$), reboxetine (10 μM , $n = 6$) and duloxetine (5 μM , $n = 9$) had no statistically significant action on the level of intercellular communication between astrocytes, neither at these doses nor at higher non-toxic doses.

In normal condition, astrocytes in culture as well as in acute slices are characterized by a high level of gap junctional communication and low hemichannel activity (Bennett et al., 2003; Retamal et al., 2007; but see Chever et al., 2014). However, in most pathological situations involving brain inflammation, a reactive gliosis is associated with elevated hemichannel activity in astrocytes (see Bennett et al., 2012; Giaume et al., 2013). Such low hemichannel activity was also observed in our culture condition (**Figure 2A**). Therefore, to induce hemichannel activity we treated our cortical primary cultures, in which 11% ($n = 9$) of isolectin B4-positive microglia versus GFAP-positive astrocytes were present, with the endotoxin LPS. As already reported for *in vitro* astrocytes (Retamal et al., 2007), we observed that LPS treatment (1 $\mu\text{g/ml}$, 24 h) inhibited gap junctional communication by 64% ($n = 6$), in such condition we found that the antidepressants amitriptyline (20 μM , $n = 4$), imipramine (20 μM , $n = 4$), venlafaxine (5 μM , $n = 3$), and duloxetine (5 μM , $n = 4$) did not reverse the inhibition induced by LPS, when co-treated during 24 h in astrocyte cultures. However, paroxetine (5 μM , $n = 4$) and reboxetine (10 μM , $n = 3$) reversed LPS-induced uncoupling, in a low but significant

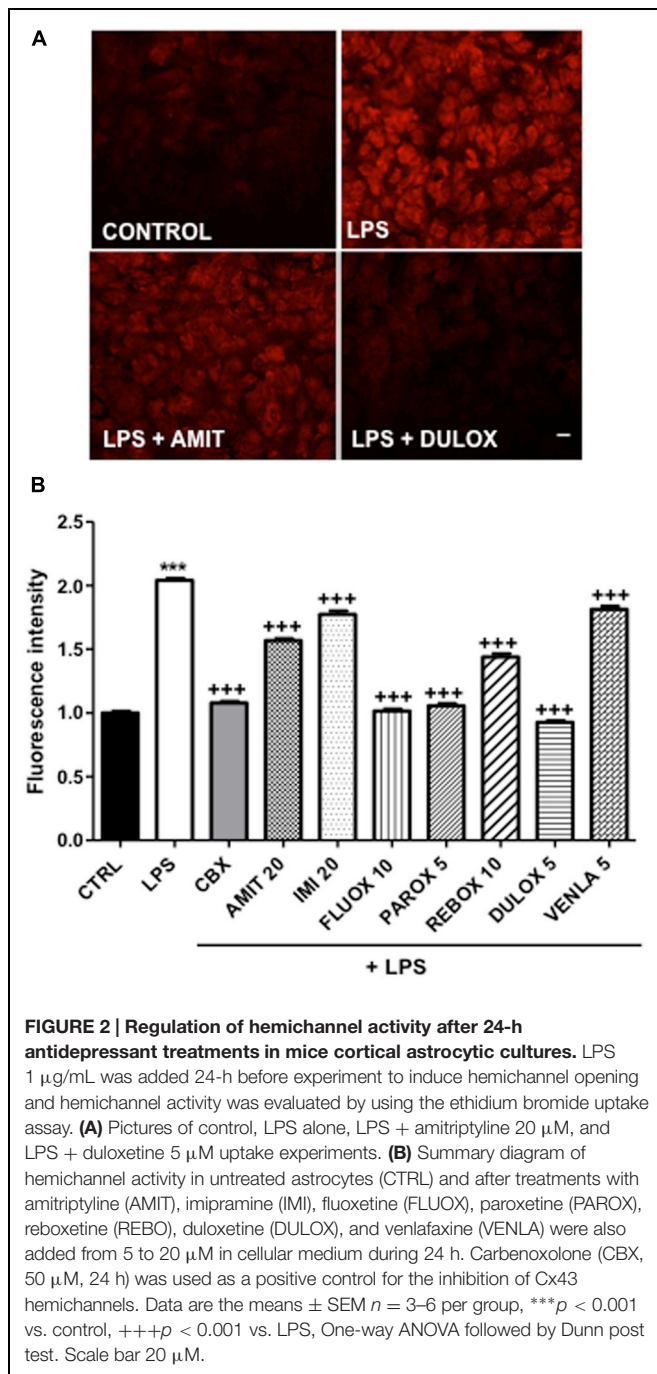
manner, respectively, by 17% ($n = 4$) and 10% ($n = 3$) whereas fluoxetine (10 μM) improved it by 10% ($n = 4$; data not illustrated). Moreover, we found that LPS treatment (1 $\mu\text{g/ml}$, 24 h) increased by 104% ($n = 7$) the uptake of ethidium bromide (EtBr) in GFAP-positive astrocytes indicating that, as previously reported (Retamal et al., 2007; Abudara et al., 2015) hemichannels in cortical astrocytes were activated (**Figure 2A**). As expected EtBr uptake was inhibited by 93% ($n = 3$) in the presence of carbenoxolone (50 μM ; 24 h) indicating that this uptake is mediated through hemichannel activity (**Figure 2B**). All the seven antidepressants tested had a significant inhibitor effect on the LPS-induced EtBr uptake, however, with difference in their efficiency. Indeed, fluoxetine (10 μM), paroxetine (5 μM), and duloxetine (5 μM ; **Figure 2A**) had pronounced effect and inhibited EtBr uptake by 97% ($n = 3$), 93% ($n = 3$), and 111% ($n = 4$), respectively (**Figure 2B**). Meanwhile, amitriptyline (20 μM ; **Figure 2A**), imipramine (20 μM), reboxetine (10 μM), and venlafaxine (5 μM) had milder effect with 45% ($n = 6$), 28% ($n = 3$), 52% ($n = 3$), and 23% ($n = 4$), respectively (**Figure 2B**).

DISCUSSION

The objective of the present study was to investigate the effects of a panel of antidepressants on the property of the astroglial Cx43, a membrane protein widely expressed in glial cells that contributes actively to neuroglial interaction in normal and disease brain (see Ransom and Giaume, 2013). For this purpose we undertook an *in vitro* screening of seven antidepressants from four different classes (TCA, SSRI, NRI, SNRI), all implied in serotonin and/or noradrenaline reuptake inhibition, to characterize their action on astroglial Cx43 at diverse levels: protein expression, gap junctional communication and hemichannel function. We selected a simple cellular system, primary cultures of mouse cortical and striatal astrocytes in which only Cx43 is detected (Dermietzel et al., 1991; Giaume et al., 1991; Koulakoff et al., 2008). The tested concentrations were determined either based on the literature, when clinically relevant doses were available, or by establishing experimentally their threshold of toxicity for 24 h treatment (see Results section). While we did not observe any significant change in Cx43 protein level, we found that antidepressants had differential effects on astroglial Cx43-based gap junctional communication as summarized in **Table 2**. These

TABLE 2 | Summary table of the effect of seven antidepressants for four different classes: tricyclic (TCA), selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), noradrenaline reuptake inhibitor (NRI), serotonin noradrenaline reuptake inhibitor (SNRI), on Cx43 expression and channel functions in cultured astrocytes.

Antidepressant	Class	Concentration tested (μM)	Cx43 expression	Effect on gap junctional coupling	Effect on hemichannels
Amitriptyline	TCA	20	No significant effect	Inhibition	Mild inhibition
Imipramine	TCA	20	No significant effect	No effect	Mild inhibition
Fluoxetine	SSRI	10	No significant effect	Inhibition	Total inhibition
Paroxetine	SSRI	5	No significant effect	Increase	Total inhibition
Reboxetine	NRI	10	No significant effect	No effect	Mild inhibition
Duloxetine	SNRI	5	No significant effect	No effect	Total inhibition
Venlafaxine	SNRI	5	No significant effect	Inhibition	Mild inhibition



results are different compared those reported in the few articles that so far have addressed these properties for some of the antidepressants used in the present study, i.e., amitriptyline, fluoxetine, and duloxetine (see **Tables 1** and **2**). Indeed, Sun et al. (2012) and Morioka et al. (2014) reported, respectively, an enhancement in Cx43 mRNA and protein levels in astrocytes from cultured rat astrocytes treated with amitriptyline and in the prefrontal cortex of rats chronically treated with duloxetine (Sun et al., 2012; Morioka et al., 2014). Additionally, two studies have also shown a rise in Cx43 protein levels in the

prefrontal cortex after *in vivo* treatment with fluoxetine (Fatemi et al., 2008; Sun et al., 2012), as well as in human astrocytoma cultures (Mostafavi et al., 2008). However, no changes in Cx43 gap junctional communication have been found after *in vivo* treatments with both fluoxetine and duloxetine in rats (Sun et al., 2012) whereas this Cx43 function was increased after amitriptyline treatment in cultured rat astrocytes (Morioka et al., 2014). In our experiments (see **Table 2**) only paroxetine (5 mM) was found to increase gap junctional communication while duloxetine (5 μM) has a slight, but not statistically significant increasing effect. Imipramine (20 μM) and reboxetine (10 μM) had no effect and an inhibition was observed with amitriptyline (20 μM), fluoxetine (10 μM), and venlafaxine (5 μM). These effects were not specific to a defined class of antidepressants and allow for taking a step back regarding results from other models. Indeed, our study demonstrates that the link between antidepressants and Cx43-mediated intercellular communication in astrocyte is likely more complex than the literature consensual interpretation concerning an increase of Cx43 expression and function, and that opposed effects are observed within a same therapeutic class. However, when pointing out the differences between our results and the current literature, several parameters must be taken into account. First, the models of study differed: we used cultured mouse astrocytes, while Sun et al. (2012) and Fatemi et al. (2008) worked *in vivo* on rats, and others used cell culture models from various species and cellular types in culture (human astrocytoma and rat astrocytes). Second, dosage, time, and chronicity of the treatments also differ. Indeed, our *in vitro* tested concentrations were non-toxic and similar to what is found in the brain in pharmacokinetics studies addressing clinically relevant doses for these molecules, and ranged from 1 to 100 μM in the literature. In literature, *in vitro* treatments were administered for several minutes to 48 h (see **Table 1**). We treated for 24 h, as for example preliminary trials of 48-h treatments with amitriptyline (20 μM) induced cell toxicity. In addition, in the studies that were performed using *in vivo* models, animals received chronic treatment (see **Table 1**) that certainly involved more integrated and complex mechanisms. Taken as a whole these information complete and extend the knowledge about the effect of antidepressants on gap junctional communication in astrocytes. Finally, as no changes in Cx43 expression were detected after treatment with antidepressant, we suggested that they act at the post-translational level.

Up-to-now there was no indication about the effect of antidepressants on the other channel function of Cx43 in astrocytes, i.e., the hemichannel activity. This lack of information can be attributed to the fact that for astrocytes this activity has been established much latter than the gap junction channel function and that hemichannels are weakly opened in normal conditions hence requiring a pathological context to be activated (see Bennett et al., 2003; Giaume et al., 2013). We confirmed this feature on untreated primary cortical cultures as the Cx channel inhibitor carbenoxolone had no significant effect (data not shown) on the uptake of EtBr (see Giaume et al., 2012). However, we took advantage that our LPS-stimulated cultures contained a non-negligible proportion of microglial cells (11%), a situation already identified to activated Cx43 hemichannels and

to reduce gap junctional communication in astrocytes (Retamal et al., 2007). Indeed, we previously showed that when LPS-stimulated microglia are co-cultured with astrocytes two pro-inflammatory cytokines are released, i.e., TNF- α and IL-1 β , activating Cx43 hemichannel activity in astrocytes (Retamal et al., 2007; Abudara et al., 2015). Interestingly, LPS has been reported to cause time-dependent behavioral alterations with sickness behavior (Huang et al., 2008) and a depressive-like behavior observed 24 h after LPS challenge (Painsipp et al., 2011; Custódio et al., 2013); and it is noteworthy that this effect is reversed by fluoxetine (Yirmiya et al., 2001), imipramine (Tomaz et al., 2014), paroxetine and duloxetine (Ohgi et al., 2013). Besides, the level of TNF- α and IL-1 β , are increased after LPS treatments in animal model, similarly to the increase observed in subjects with major depression disease (Seidel et al., 1995; Sluzewska et al., 1996; Dowlati et al., 2010; Hannestad et al., 2011). On this basis LPS has been proposed as an inducer of depressive-like context (Mello et al., 2013; Ohgi et al., 2013) confirming the interest of LPS in the evaluation of antidepressant mechanisms. Using the EtBr uptake assay we found that all tested antidepressants had an inhibitory effect on LPS-induced astroglial hemichannel activity. The effect on Cx43-based hemichannel function was correlated when considering the class of the antidepressants, the SSRIs (fluoxetine, paroxetine) induced a strong inhibition while the TCAs (amitriptyline, imipramine) and NRI (reboxetine) had mild effect, the treatment with SNRI (duloxetine, venlafaxine) resulting in mixed inhibition efficiency. Interestingly, several of these antidepressants are known to have an inhibitory effect on the production of pro-inflammatory cytokines, in particular TNF- α and IL-1 β , fluoxetine (Chiou et al., 2006; Tai et al., 2009; Valera et al., 2014), amitriptyline (Obuchowicz et al., 2006; Tai et al., 2009), paroxetine (Liu et al., 2014), and imipramine (Lee et al., 2012). Meanwhile venlafaxine, which presents the lowest inhibitory effect on LPS-induced hemichannel activity (23%), is the only tested compound that increased the level of TNF- α (Valera et al., 2014). Taken as a whole these results could support the idea that antidepressants may control Cx43 hemichannel activity through the production of TNF- α and/or IL-1 β as the result of a reduction of microglial activation. However, just paroxetine and reboxetine modestly reversed the inhibition of gap junctional communication induced by LPS, it could consequently imply that antidepressant effects are not targeting microglia-released interleukins. It could also suggest that the antidepressant inhibitory effects on hemichannels are acting downstream to the microglial step and/or more directly on the Cx43 hemichannel function. Nevertheless, more work is needed to decipher the specific mechanisms involved in the

regulation of astroglial Cx channels by antidepressants, an aim that is beyond the scope of the present study.

Interestingly, hemichannel activity in astrocytes has been shown to provide a pathway for glutamate release (Ye et al., 2003; Abudara et al., 2015). Consequently, the antidepressant inhibitory action on hemichannel activity could support the current hypothesis of the action of these drugs on glutamine/glutamate metabolic cycle (Garakani et al., 2013) and glutamate transmission (Gorman and Docherty, 2010; Sanacora and Banasr, 2013) in the pathophysiology of major depression (Etiévant et al., 2013). Finally, glutamate gliotransmission mediated by Cx43 hemichannels has been recently reported to occur in a model of chronic restraint stress (Orellana et al., 2015) which is admitted as a model inducing depressive-like symptoms in rodents (Levinstein and Samuels, 2014).

The present study reflects the need to re-evaluate the statement according to which an alternative strategy for antidepressive treatments is to target astroglial Cx43 and to increase gap junctional communication. This proposition was solely based on reports indicating that several antidepressants favor Cx43 expression levels while a few have investigated their effect on the functional aspect, i.e., gap junctional communication. Based on the present results the effect of antidepressant drugs on astroglial gap junctions appears more complex than initially thought and suggests that Cx43 hemichannel activity in astrocytes may be part of the mode of action of these drugs. Finally, our observation, and in particular those related to hemichannel activity, could benefit to the understanding of the mode of action of antidepressants in other pathologies treated by antidepressants such as neuropathic pain (Dworkin et al., 2010; Finnerup et al., 2015) and for which the involvement of glial Cx43 hemichannel activity has been proposed (Chen et al., 2014).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TJ and CG contributed to the study design, TJ and AP conducted the experiments, CG wrote the initial draft; TJ, CG, FM, MC contributed to the writing of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Collège de France and the INSERM. The authors wish to thank Dr. A. Koulakoff for constant and helpful discussions along this work.

REFERENCES

- Abudara, V., Roux, L., Dallérac, G., Matias, I., Dulong, J., Mothet, J. P., et al. (2015). Activated microglia impairs neuroglial interaction by opening Cx43 hemichannels in hippocampal astrocytes. *Glia* 63, 795–811. doi: 10.1002/glia.22785
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., and Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215. doi: 10.1016/S0166-2236(98)01349-6
- Bennett, M. V., Contreras, J. E., Bukauskas, F. F., and Sáez, J. C. (2003). New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci.* 26, 610–617. doi: 10.1016/j.tins.2003.09.008
- Bennett, M. V., Garré, J. M., Orellana, J. A., Bukauskas, F. F., Nedergaard, M., Giaume, C., et al. (2012). Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Res.* 1487, 3–15. doi: 10.1016/j.brainres.2012.08.042
- Bernard, R., Kerman, I. A., Thompson, R. C., Jones, E. G., Bunney, W. E., Barchas, J. D., et al. (2011). Altered expression of glutamate signaling, growth factor,

- and glia genes in the locus coeruleus of patients with major depression. *Mol. Psychiatry* 16, 634–646. doi: 10.1038/mp.2010.44
- Chen, G., Park, C. K., Xie, R. G., Berta, T., Nedergaard, M., and Ji, R. R. (2014). Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice. *Brain* 137(Pt 8), 2193–2209. doi: 10.1093/brain/awu140
- Chever, O., Lee, C. Y., and Rouach, N. (2014). Astroglial connexin43 hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission. *J. Neurosci.* 34, 11228–11232. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0015-14.2014
- Chiou, S. H., Chen, S. J., Peng, C. H., Chang, Y. L., Ku, H. H., Hsu, W. M., et al. (2006). Fluoxetine up-regulates expression of cellular FLICE-inhibitory protein and inhibits LPS-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343, 391–400. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.180
- Colangelo, A. M., Alberghina, L., and Papa, M. (2014). Astroglialosis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Neurosci. Lett.* 565, 59–64. doi: 10.1016/j.neulet.2014.01.014
- Cotrina, M. L., and Nedergaard, M. (2012). Brain connexins in demyelinating diseases: therapeutic potential of glial targets. *Brain Res.* 1487, 61–68. doi: 10.1016/j.brainres.2012.07.003
- Custódio, C. S., Mello, B. S., Cordeiro, R. C., de Araújo, F. Y., Chaves, J. H., Vasconcelos, S. M., et al. (2013). Time course of the effects of lipopolysaccharide on prepulse inhibition and brain nitrite content in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 713, 31–38. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.04.040
- Dermietzel, R., Hertberg, E. L., Kessler, J. A., and Spray, D. C. (1991). Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *J. Neurosci.* 11, 1421–1432.
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., et al. (2010). A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol. Psychiatry* 67, 446–457. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.09.033
- Dworkin, R. H., O'Connor, A. B., Audette, J., Baron, R., Gourlay, G. K., Haanpää, M. L., et al. (2010). Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin. Proc.* 85, S3–S14. doi: 10.4065/mcp.2009.0649
- Ernst, C., Nagy, C., Kim, S., Yang, J. P., Deng, X., Hellstrom, I. C., et al. (2011). Dysfunction of astrocyte connexins 30 and 43 in dorsal lateral prefrontal cortex of suicide completers. *Biol. Psychiatry* 70, 312–319. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.03.038
- Etiévant, A., Lambás-Señas, L., Scarna, H., Lucas, G., and Haddjeri, N. (2013). Astrocytes and gliotransmitters: new players in the treatment of major depression? *Curr. Drug Targets* 14, 1295–1307.
- Fatemi, S. H., Folsom, T. D., Reutiman, T. J., and Lee, S. (2008). Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects with autism. *Synapse* 62, 501–507. doi: 10.1002/syn.20519
- Finnerup, N. B., Attal, N., Haroutounian, S., McNicol, E., Baron, R., Dworkin, R. H., et al. (2015). Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 14, 162–173. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70251-0
- Freitas-Andrade, M., and Naus, C. C. (2015). Astrocytes in neuroprotection and neurodegeneration: the role of connexin43 and pannexin1. *Neuroscience* doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.035 [Epub ahead of print].
- Froger, N., Orellan, J. A., Calvo, C. F., Amigou, E., Kozoriz, M. G., Naus, C. C., et al. (2010). Inhibition of cytokine-induced connexin43 hemichannel activity in astrocytes is neuroprotective. *Mol. Cell. Neurosci.* 45, 37–46. doi: 10.1016/j.mcn.2010.05.007
- Garakani, A., Martinez, J. M., Yehuda, R., and Gorman, J. M. (2013). Cerebrospinal fluid levels of glutamate and corticotropin releasing hormone in major depression before and after treatment. *J. Affect. Disord.* 146, 262–265. doi: 10.1016/j.jad.2012.06.037
- Giaume, C., Fromaget, C., el Aoumari, A., Cordier, J., Glowinski, J., and Gros, D. (1991). Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron* 6, 133–143. doi: 10.1016/0896-6273(91)90128-M
- Giaume, C., Kirchhoff, F., Matute, C., Reichenbach, A., and Verkhratsky, A. (2007). Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ.* 14, 1324–1335. doi: 10.1038/sj.cdd.4402144
- Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C. C., and Sáez, J. C. (2013). Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front. Pharmacol.* 4:88. doi: 10.3389/fphar.2013.00088
- Giaume, C., Orellana, J. A., Abudara, V., and Sáez, J. C. (2012). Connexin-based channels in astrocytes: how to study their properties. *Methods Mol. Biol.* 814, 283–303. doi: 10.1007/978-1-61779-452-0_19
- Gorman, J. M., and Docherty, J. P. (2010). A hypothesized role for dendritic remodeling in the etiology of mood and anxiety disorders. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 22, 256–264. doi: 10.1176/appi.neuropsych.22.3.256
- Halassa, M. M., and Haydon, P. G. (2010). Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 335–355. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135843
- Hannestad, J., DellaGioia, N., and Bloch, M. (2011). The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology* 36, 2452–2459. doi: 10.1038/npp.2011.132
- Harris, A. L. (2007). Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 94, 120–143. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.011
- Henry, M. E., Schmidt, M. E., Hennen, J., Villafuerte, R. A., Butman, M. L., Tran, P., et al. (2005). A comparison of brain and serum pharmacokinetics of R-fluoxetine and racemic fluoxetine: a 19-F MRS study. *Neuropsychopharmacology* 30, 1576–1583. doi: 10.1038/sj.npp.1300749
- Huang, Y., Henry, C. J., Dantzer, R., Johnson, R. W., and Godbout, J. P. (2008). Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. *Neurobiol. Aging* 29, 1744–1753. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.012
- Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., et al. (2008). Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J. Neurosci.* 28, 4702–4711. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5048-07.2008
- Karlsson, L., Hiemke, C., Carlsson, B., Josefsson, M., Ahlner, J., Bengtsson, F., et al. (2011). Effects on enantiomeric drug disposition and open-field behavior after chronic treatment with venlafaxine in the P-glycoprotein knockout mice model. *Psychopharmacology (Berl.)* 215, 367–377. doi: 10.1007/s00213-010-2148-5
- Kawasaki, A., Hayashi, T., Nakachi, K., Trosko, J. E., Sugihara, K., Kotake, Y., et al. (2009). Modulation of connexin 43 in rotenone-induced model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 160, 61–68. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.01.080
- Kielbasa, W., and Stratford, R. E. Jr. (2012). Exploratory translational modeling approach in drug development to predict human brain pharmacokinetics and pharmacologically relevant clinical doses. *Drug Metab. Dispos.* 40, 877–883. doi: 10.1124/dmd.111.043554
- Koulakoff, A., Ezan, P., and Giaume, C. (2008). Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia* 56, 1299–1311. doi: 10.1002/glia.20698
- Koulakoff, A., Mei, X., Orellana, J. A., Sáez, J. C., and Giaume, C. (2012). Glial connexin expression and function in the context of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2048–2057. doi: 10.1016/j.bbame.2011.10.001
- Lee, Y. H., Kim, S. H., Kim, Y., Lim, Y., Ha, K., and Shin, S. Y. (2012). Inhibitory effect of the antidepressant imipramine on NF- κ B-dependent CXCL1 expression in TNF α -exposed astrocytes. *Int. Immunopharmacol.* 12, 547–555. doi: 10.1016/j.intimp.2012.01.011
- Levinstein, M. R., and Samuels, B. A. (2014). Mechanisms underlying the antidepressant response and treatment resistance. *Front. Behav. Neurosci.* 8:208. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00208
- Liu, R. P., Zou, M., Wang, J. Y., Zhu, J. J., Lai, J. M., Zhou, L. L., et al. (2014). Paroxetine ameliorates lipopolysaccharide-induced microglia activation via differential regulation of MAPK signaling. *J. Neuroinflammation* 11, 47. doi: 10.1186/1742-2094-11-47
- Lundgaard, I., Osório, M. J., Kress, B. T., Sanggaard, S., and Nedergaard, M. (2014). White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience* 276, 161–173. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.10.050
- Mello, B. S., Monte, A. S., McIntyre, R. S., Soczynska, J. K., Custódio, C. S., Cordeiro, R. C., et al. (2013). Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. *J. Psychiatr. Res.* 47, 1521–1529. doi: 10.1016/j.jpsychires.2013.06.008
- Meme, W., Calvo, C. F., Froger, N., Ezan, P., Amigou, E., Koulakoff, A., et al. (2006). Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by β -amyloid. *FASEB J.* 20, 494–496.
- Miguel-Hidalgo, J. J., Wilson, B. A., Hussain, S., Meshram, A., Rajkowska, G., and Stockmeier, C. A. (2014). Reduced connexin 43 immunolabeling in the orbitofrontal cortex in alcohol dependence and depression. *J. Psychiatr. Res.* 55, 101–109. doi: 10.1016/j.jpsychires.2014.04.007

- Morioka, N., Suekama, K., Zhang, F. F., Kajitani, N., Hisaoka-Nakashima, K., Takebayashi, M., et al. (2014). Amitriptyline up-regulates connexin43-gap junction in rat cultured cortical astrocytes via activation of the p38 and c-Fos/AP-1 signalling pathway. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2854–2867. doi: 10.1111/bph.12614
- Mostafavi, H., Khaksarian, M., Joghataei, M. T., Hassanzadeh, G., Soleimani, M., Eftekhari, S., et al. (2008). Fluoxetine upregulates connexin 43 expression in astrocyte. *Basic Clin. Neurosci.* 5, 74–79.
- Mylvaganam, S., Ramani, M., Krawczyk, M., and Carlen, P. L. (2014). Roles of gap junctions, connexins, and pannexins in epilepsy. *Front. Physiol.* 5:172. doi: 10.3389/fphys.2014.00172
- Nagy, J. I., Dudek, F. E., and Rash, J. E. (2004). Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 47, 191–215. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.05.005
- Naus, C. C., and Laird, D. W. (2010). Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 435–441. doi: 10.1038/nrc2841
- Obuchowicz, E., Kowalski, J., Labuzek, K., Krysiak, R., Pendzich, J., and Herman, Z. S. (2006). Amitriptyline and nortriptyline inhibit interleukin-1 release by rat mixed glial and microglial cell cultures. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 9, 27–35. doi: 10.1017/S146114570500547X
- Ohgi, Y., Futamura, T., Kikuchi, T., and Hashimoto, K. (2013). Effects of antidepressants on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 103, 853–859. doi: 10.1016/j.pbb.2012.12.003
- Orellana, J. A., Avendaño, B. C., and Montero, T. D. (2014). Role of connexins and pannexins in ischemic stroke. *Curr. Med. Chem.* 21, 2165–2182. doi: 10.2174/0929867321666131228191714
- Orellana, J. A., Moraga-Amaro, R., Díaz-Galarce, R., Rojas, S., Maturana, C. J., Stehberg, J., et al. (2015). Restraint stress increases hemichannel activity in hippocampal glial cells and neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 9:102. doi: 10.3389/fncel.2015.00102
- Orellana, J. A., Shoji, K. F., Abudara, V., Ezan, P., Amigou, E., Sáez, P. J., et al. (2011). Amyloid β -induced death in neurons involves glial and neuronal hemichannels. *J. Neurosci.* 31, 4962–4977. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6417-10.2011
- Painsipp, E., Köfer, M. J., Sinner, F., and Holzer, P. (2011). Prolonged depression-like behavior caused by immune challenge: influence of mouse strain and social environment. *PLoS ONE* 6:e20719. doi: 10.1371/journal.pone.0020719
- Pannasch, U., Vargová, L., Reingruber, J., Ezan, P., Holcman, D., Giaume, C., et al. (2011). Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 8467–8472. doi: 10.1073/pnas.1016650108
- Parpura, V., Heneka, M. T., Montana, V., Oliet, S. H., Schousboe, A., Haydon, P. G., et al. (2012). Glial cells in (patho)physiology. *J. Neurochem.* 121, 4–27. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07664.x
- Pérez-Alvarez, A., and Araque, A. (2013). Astrocyte-neuron interaction at tripartite synapses. *Curr. Drug Targets* 14, 1220–1224. doi: 10.2174/13894501113149990203
- Rajkowska, G., and Stockmeier, C. A. (2013). Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. *Curr. Drug Targets* 14, 1225–1236. doi: 10.2174/13894501113149990156
- Rana, S., and Dringen, R. (2007). Gap junction hemichannel-mediated release of glutathione from cultured rat astrocytes. *Neurosci. Lett.* 415, 45–48. doi: 10.1016/j.neulet.2006.12.043
- Ransom, B. R., and Giaume, C. (2013). “Gap junctions, hemichannels,” in *Neuroglia*, 3rd Edn, eds H. Kettenmann and B. R. Ransom (Oxford: Oxford University Press), 292–305.
- Retamal, M. A., Froger, N., Palacios-Prado, N., Ezan, P., Sáez, P. J., Sáez, J. C., et al. (2007). Cx43 Hemichannels and Gap Junction Channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activate microglia. *J. Neurosci.* 27, 13781–13792. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2042-07.2007
- Sanacora, G., and Banasr, M. (2013). From pathophysiology to novel antidepressant drugs: glial contributions to the pathology and treatment of mood disorders. *Biol. Psychiatry* 73, 1172–1179. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.03.032
- Seidel, A., Arolt, V., Hunstiger, M., Rink, L., Behnisch, A., and Kirchner, H. (1995). Cytokine production and serum proteins in depression. *Scand. J. Immunol.* 41, 534–538. doi: 10.1111/j.1365-3083.1995.tb03604.x
- Sluzewska, A., Rybakowski, J., Bosmans, E., Sobieska, M., Berghmans, R., Maes, M., et al. (1996). Indicators of immune activation in major depression. *Psychiatry Res.* 64, 161–167. doi: 10.1016/S0165-1781(96)02783-7
- Stehberg, J., Moraga-Amaro, R., Salazar, C., Becerra, A., Echeverría, C., Orellana, J. A., et al. (2012). Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. *FASEB J.* 26, 3649–3657. doi: 10.1096/fj.11-198416
- Sun, J. D., Liu, Y., Yuan, Y. H., Li, J., and Chen, N. H. (2012). Gap junction dysfunction in the prefrontal cortex induces depressive-like behaviors in rats. *Neuropsychopharmacology* 37, 1305–1320. doi: 10.1038/npp.2011.319
- Tai, Y. H., Tsai, R. Y., Lin, S. L., Yeh, C. C., Wang, J. J., Tao, P. L., et al. (2009). Amitriptyline suppresses neuroinflammation-dependent interleukin-10-p38 mitogen-activated protein kinase-heme oxygenase-1 signaling pathway in chronic morphine-infused rats. *Anesthesiology* 110, 1379–1389. doi: 10.1097/ALN.0b013e31819fcd5
- Takeuchi, H., and Suzumura, A. (2014). Gap junctions and hemichannels composed of connexins: potential therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 8:189. doi: 10.3389/fncel.2014.00189
- Tomaz, V. S., Cordeiro, R. C., Costa, A. M., de Lucena, D. F., Nobre Júnior, H. V., de Sousa, F. C., et al. (2014). Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. *Neuroscience* 268, 236–246. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.03.025
- Valera, E., Ubhi, K., Mante, M., Rockenstein, E., and Masliah, E. (2014). Antidepressants reduce neuroinflammatory responses and astroglial alpha-synuclein accumulation in a transgenic mouse model of multiple system atrophy. *Glia* 62, 317–337. doi: 10.1002/glia.22610
- Vardjan, N., Verkhatsky, A., and Zorec, R. (2015). Pathologic potential of astrocytic vesicle traffic: new targets to treat neurologic diseases? *Cell Transplant.* 24, 599–612. doi: 10.3727/096368915X687750
- Verkhatsky, A., Rodríguez, J. J., and Parpura, V. (2012). Neurotransmitters and integration in neuronal-astroglial networks. *Neurochem. Res.* 37, 2326–2338. doi: 10.1007/s11064-012-0765-6
- Ye, B., Shen, H., Zhang, J., Zhu, Y. G., Ransom, B. R., Chen, X. C., et al. (2015). Dual pathways mediate β -amyloid stimulated glutathione release from astrocytes. *Glia* 63, 2208–2219. doi: 10.1002/glia.22886
- Ye, Z. C., Wyeth, M. S., Baltan-Tekkok, S., and Ransom, B. R. (2003). Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J. Neurosci.* 23, 3588–3596.
- Yirmiya, R., Pollak, Y., Barak, O., Avitsur, R., Ovadia, H., Bette, M., et al. (2001). Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents. *Neuropsychopharmacology* 24, 531–544. doi: 10.1016/S0893-133X(00)00226-8

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

Copyright © 2016 Jeanson, Pondaven, Ezan, Mouthon, Charvériat and Giaume. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Discussion

Ce premier article a permis de préciser le lien entre la Cx43 et les antidépresseurs dans un modèle de culture d'astrocytes corticaux chez la souris. Si l'expression de la Cx43 s'est avérée inchangée par les sept antidépresseurs testés (amitriptyline, imipramine, duloxétine, venlafaxine, paroxétine, fluoxétine, réboxétine), leur effet sur les GJ Cx43 s'est avéré variable, tandis qu'ils ont tous induit une inhibition significative de l'ouverture des HC Cx43. Ces résultats renforcent les données de la littérature, de plus certaines molécules, telles que la réboxétine ou la paroxétine, n'avaient jamais été étudiées auparavant pour leur action sur la Cx43.

1. Les antidépresseurs présentent des effets hétérogènes sur l'expression de la Cx43 et le couplage astrocytaire.

Les résultats obtenus dans notre étude indiquent que les antidépresseurs n'induisent pas de changement de l'expression de la Cx43 dans des cultures primaires d'astrocytes corticaux de souris, ce qui rejoint l'observation faite au niveau de l'hippocampe avec la fluoxétine réalisée *in vivo* chez la même espèce (Quesseveur et al., 2015). Le parallèle entre ces deux études suggère un effet similaire des antidépresseurs au niveau de l'expression des Cx43 cérébrales et lève le biais d'une disparité entre le cortex et l'hippocampe pour cette protéine. Cette dernière aurait pu être suggérée par l'augmentation de l'expression de la Cx43 observée dans l'ensemble des autres études, toutes réalisées au niveau du cortex chez le rat (Fatemi et al., 2008; Sun et al., 2012; Morioka et al., 2014; Mostafavi et al., 2014). Si l'effet des antidépresseurs ne semble pas spécifique d'un tissu donné, il semble toutefois y avoir une variabilité de leurs effets d'une espèce à l'autre.

Par ailleurs, l'effet des antidépresseurs sur le couplage assuré par les GJ Cx43 s'est avéré hétérogène dans notre étude et non spécifique d'une classe thérapeutique. Notamment, l'amitriptyline a entraîné la réduction du couplage astrocytaire, contrairement à ce qui a été observé chez le rat (Morioka et al., 2015). La divergence des résultats observés entre les deux études peut s'expliquer par les modèles utilisés (souris *versus* rat) ainsi que les doses et les durées de traitements qui varient. Cependant, à la dose (25 μ M) et au temps (48 heures) de traitement utilisés par l'équipe de Morioka, les profils morphologiques des

astrocytes ont été modifiés dans notre étude, rendant de fait difficiles les comparaisons avec la condition contrôle.

2. L'inhibition de l'ouverture des HC Cx43 corticaux par les antidépresseurs ne résulte pas d'une action sur la microglie ni sur les interleukines proinflammatoires chez la souris.

Notre étude est la première à s'intéresser aux HC Cx43 suite à un traitement avec des antidépresseurs. Les résultats obtenus démontrent l'effet homogène des 7 antidépresseurs sur l'inhibition significative de l'ouverture des HC Cx43. Ceci souligne leur implication dans le mécanisme d'action des antidépresseurs, toutes classes confondues. Dans la mesure où en condition basale l'activité des hémicanaux est très faible voire absente, l'ouverture des HC Cx43 a été induite par l'ajout de LPS, impliquant l'activation microgliale et la libération d'interleukines associées (IL-1 β , TNF- α) (Rétamal et al., 2007). Le fait que les HC Cx43 restent fermés ou que leur ouverture soit limitée en présence des antidépresseurs, implique la possibilité d'une action sur la microglie et les interleukines par ces molécules.

Afin d'évaluer l'action des antidépresseurs sur les interleukines, nous avons tout d'abord étudié le couplage dans le même modèle de cultures d'astrocytes corticaux, avec la technique de scrape-loading. Comme précédemment décrit, le LPS a conduit une réduction de l'activité des GJ Cx43 (Retamal et al., 2007). Cependant, aucun des antidépresseurs n'a reversé significativement cette réduction, ce qui implique qu'ils n'agissent pas de façon marquée sur l'activation de la microglie ni sur les interleukines proinflammatoires inhibant le couplage (Figure 34 A). En outre, le dosage de TNF- α a été réalisé dans le milieu de culture. La concentration de cette interleukine était trop faible en condition contrôle pour pouvoir être dosée mais a été augmentée suite au LPS, en conséquence de l'activation microgliale. Cependant la concentration de TNF- α s'est avérée inchangée entre la condition LPS et les conditions LPS + antidépresseur (Figure 34 B).

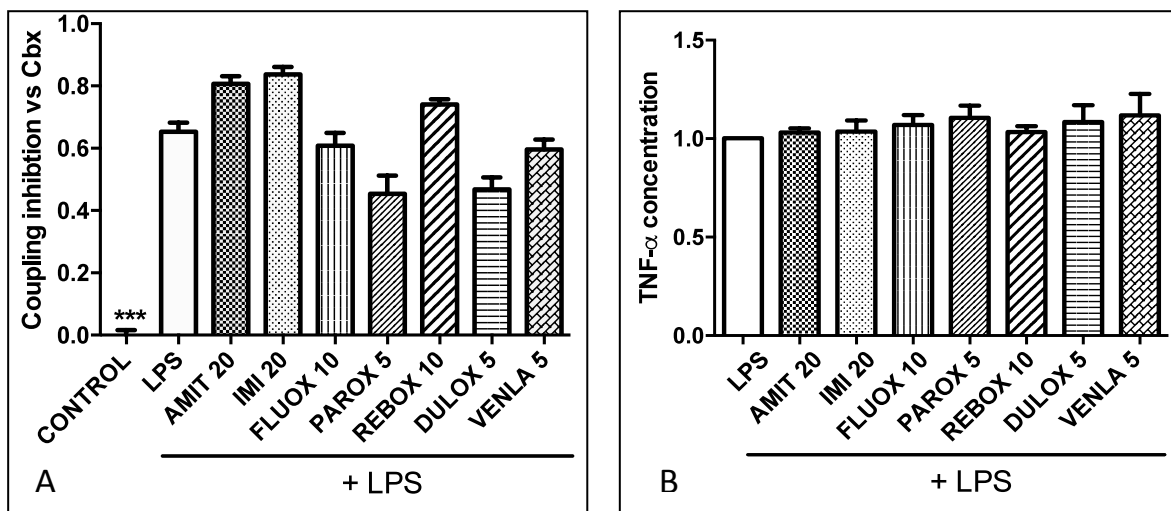


Figure 34 : Etude de l'effet des antidépresseurs sur l'activation microgliale et les interleukines proinflammatoires. Etude du couplage (A) et de la concentration de TNF- α dans le milieu extracellulaire (B) suite au traitement d'astrocytes corticaux en culture pendant 24 heures, avec du LPS (1 μ g/mL) et sept antidépresseurs (amitriptyline, imipramine, fluoxétine, paroxétine, réboxétine, duloxétine, venlafaxine). Les résultats obtenus pour le couplage ont été normalisés par rapport (A) au carbenoxolone (Cbx, 50 μ M), référence de l'inhibition maximale pouvant être obtenue (B) au LPS. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm SEM. *** p<0,001 versus LPS, Kruskal-Wallis Dunn's post test. n=3-8 (A) et n=3 (B).

D'après ces résultats complémentaires, les antidépresseurs ne semblent pas agir sur la microglie ni sur ses interleukines pour réduire l'ouverture des HC Cx43 au niveau du cortex chez la souris. Il est possible qu'ils inhibent ces canaux de façon directe, ou indirecte en modulant par exemple l'activation astrocytaire. Toutefois, dans d'autres modèles de cultures impliquant des cellules neuronales (Chiou et al., 2006), des cultures gliales mixtes chez le rat (Obuchowicz et al., 2006; Lee et al., 2012) ou encore des cellules microgliales (Liu et al., 2014) les effets inhibiteurs respectivement des antidépresseurs fluoxétine, paroxétine, imipramine et amitriptyline ont été décrits sur les interleukines proinflammatoires IL-1 β et de TNF- α . Par conséquent, d'un modèle cellulaire à l'autre les effets des antidépresseurs semblent varier de même qu'inter-espèces, ces données sont donc à confirmer notamment par des approches *ex vivo* ou *in vivo*.

3. La réversion de l'ouverture des HC Cx43 par les antidépresseurs peut être corrélée à leur action antinociceptive.

En inhibant l'ouverture des HC Cx43, les antidépresseurs contribuent à la réduction de l'activation gliale et neuronale, *via* une libération diminuée respectivement d'ATP (Baroja-Mazo et al., 2013) et de glutamate (Froger et al., 2010). Ceci pourrait participer à l'effet thérapeutique de la duloxétine, de l'amitriptyline et de la venlafaxine dans la pathologie des douleurs neuropathiques, dans laquelle l'activité des HC a été démontrée

(Huang et al., 2012) de même qu'une réaction gliale suite à cette activation (O'Carroll et al., 2013).

En outre, l'implication des HC Cx43 dans le mécanisme d'action des antidépresseurs peut offrir une nouvelle piste pour mieux comprendre leur rôle dans d'autres pathologies telle que la sclérose en plaques. En effet, l'ouverture des HC Cx43 a récemment été démontrée dans cette pathologie (Almad et al., 2016) qui est notamment traitée par la fluoxétine, antidépresseur reversant fortement (97% d'inhibition) l'ouverture des HC Cx43 dans notre étude.

Seconde étude : l'effet anti-hyperalgésique de l'amitriptyline est potentialisé par l'inhibition de la connexine 43 astrocytaire.

Les travaux réalisés lors de la première partie de cette thèse ont confirmé l'implication de la Cx43 astrocytaire dans le mécanisme des antidépresseurs. La suite de l'étude s'est placée plus spécifiquement dans le contexte des douleurs neuropathiques. L'objectif étant de valider la Cx43 astrocytaire comme nouvelle cible thérapeutique, permettant d'améliorer l'effet antinociceptif des antidépresseurs dans cette indication. Ceci a impliqué l'étude d'une combinaison entre un antidépresseur et un modulateur de la Cx43.

Le choix de l'antidépresseur s'est porté sur l'amitriptyline, pour deux raisons principales. La première est la prescription majeure de ce TCA, figurant parmi les premières lignes de traitement en douleurs neuropathiques, la seconde est l'inhibition des deux fonctions de la Cx43 par l'amitriptyline, observé par notre première étude chez la souris. Ceci pouvant de fait participer à son action antinociceptive. Pour le modulateur de la Cx43, nous avons choisi la méfloquine, décrit dans la littérature comme inhibiteur des GJ Cx43 (Cruikshank et al., 2004; Picoli et al., 2012) et passant la barrière hémato-encéphalique (McCarthy, 2015). De plus, nos études *in vitro* ont confirmé son action inhibitrice sur les GJ Cx43 mais également sur les HC Cx43.

Les travaux de cette seconde partie de thèse ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Pr Michel Hamon, au sein de la Pitié Salpêtrière. Cette équipe travaille de façon quotidienne avec le modèle de ligature du nerf sciatique chez le rat, communément utilisé dans la littérature. L'enjeu des travaux a tout d'abord été de confirmer *in vitro* chez cette espèce l'effet inhibiteur de l'amitriptyline sur les fonctions de la Cx43, obtenus chez la souris. Ceci a été réalisé dans le laboratoire du Collège-de-France en utilisant des cultures primaires d'astrocytes corticaux de rats. De plus, une étude de la méfloquine et de la combinaison a également été réalisée sur l'expression et les fonctions de la Cx43 dans ce même modèle chez le rat et la souris, impliquant les techniques précédemment évoquées.

Pour l'étude *in vivo*, menée à la Pitié Salpêtrière, la première étape a tout d'abord été de vérifier au niveau pharmacocinétique l'absence d'interaction entre méfloquine et l'amitriptyline, suite au traitement chronique des animaux. Nous avons choisi la dose

d'amitriptyline classiquement utilisée dans la littérature pour son action antinociceptive, celle de méfloquine a été réduite afin de ne pas avoir d'effet propre de cette molécule sur le comportement des animaux (réduction de l'hyperalgésie, sédation, etc). De plus, la dose choisie de méfloquine permet d'atteindre une concentration cérébrale similaire à celle testée dans nos travaux *in vitro*, entraînant une inhibition de la Cx43, nécessaire à notre hypothèse de travail. Des études de RT-PCR ont également été menées afin d'identifier l'éventuel impact de cette combinaison sur les marqueurs gliaux et neuro-inflammatoires impliqués dans la pathologie des douleurs neuropathiques. Enfin, nous avons pu tester la combinaison au niveau comportemental dans le modèle préclinique de ligature du nerf sciatique. Le symptôme d'hyperalgésie a été évalué chez le rat à l'aide du test de Randall & Selitto.

Ainsi, partant d'une étude *in vitro* avant d'aboutir à des tests *in vivo*, la seconde partie de ce projet de thèse a porté sur l'étude plus spécifique de l'implication de la Cx43 astrocytaire dans l'action antinociceptive de l'amitriptyline, avec la perspective d'une étude clinique en cas de résultats concluants.

POTENTIATION OF AMITRIPTYLINE ANTI-HYPERALGESIC-LIKE ACTION BY ASTROGLIAL CONNEXIN 43 INHIBITION IN NEUROPATHIC RATS

Tiffany Jeanson^{1,2}, Adeline Duchêne¹, Damien Richard³, Sylvie Bourgoïn⁴, Christèle Picoli¹,
Pascal Ezan², Franck Mouthon¹, Christian Giaume², Michel Hamon⁴, Mathieu Charvériat^{1,*}

¹ Theranexus, Lyon, France

² CIRB, Collège de France, Paris, France

³ CHU Clermont-Ferrand, Service de Pharmacologie Médicale, Clermont-Ferrand, France

⁴ INSERM U894 – CPN, Paris, France

* Corresponding author:

Dr Mathieu Charvériat

Theranexus

60, avenue Rockefeller

F-69008 Lyon

France

mathieu.charveriat@theranexus.com

Tel : +33 1 46 54 83 97

Fax : +33 1 46 54 93 19

Running title: Potentiation of amitriptyline-induced anti-hyperalgesia by connexin 43 inhibition

ABBREVIATIONS

AMIT	Amitriptyline
CCI-SN	Unilateral Chronic Constriction Injury to the Sciatic Nerve
Cx	Connexin
DRG	Dorsal Root Ganglia
GJC	Gap junction channels
HC	Hemichannel
MEFLO	Mefloquine

Abstract

Antidepressants, prescribed as first line treatment of neuropathic pain, have a limited efficacy and poorly tolerated side effects. Because recent studies pointed out the implication of astroglial connexins (Cx) in both neuropathic pain and antidepressive treatment, we investigated whether their blockade by mefloquine could modulate the action of the tricyclic antidepressant amitriptyline. Using primary cultures, we found that both mefloquine and amitriptyline inhibited Cx43-containing gap junctions, and that the drug combination acted synergically. We then investigated whether mefloquine could enhance amitriptyline efficacy in a preclinical model of neuropathic pain. Sprague-Dawley rats that underwent chronic unilateral constriction injury (CCI) to the sciatic nerve (SN) were treated with either amitriptyline, mefloquine or the combination of both drugs. Whereas acute treatments were ineffective, chronic administration of amitriptyline reduced CCI-SN-induced hyperalgesia-like behavior, and this effect was markedly enhanced by co-administration of mefloquine, which was inactive on its own. No pharmacokinetic interactions between both drugs were observed and CCI-SN-induced neuroinflammatory and glial activation markers remained unaffected by these treatments in dorsal root ganglia and spinal cord. Mechanisms downstream of CCI-SN-induced neuroinflammation and glial activation might therefore be targeted. Connexin inhibition in astroglia could represent a promising approach towards improving neuropathic pain therapy by antidepressants.

Key words: neuropathic pain, sciatic nerve ligation, astrocyte gap junctions, connexin, hemichannel, amitriptyline, mefloquine.

INTRODUCTION

Neuropathic pain, caused by lesion or dysfunction of the peripheral or central nervous system¹, substantially affects the quality of life and is associated with heavy individual and societal burden². Available treatments with anticonvulsants, antidepressants, opioids, and lidocaine or capsaicin patches are only moderately effective and may induce poorly tolerated side effects that negatively impact compliance¹⁻⁵. Numerous peripheral and central pathways have been suggested as new therapeutic avenues⁶; this study focused on a recently proposed target, astroglial connexins (Cx), since these “gap junction proteins” have been reported to be involved in neuropathic pain⁷ and as a target for antidepressants⁸.

Connexins are transmembrane proteins, assembled as hexamers, called hemichannels (HCs) that, when open, allow direct communication between the cytoplasm and the extracellular space⁹⁻¹². Hemichannels of adjacent cells can join to form gap junction channels (GJCs), through which direct cytoplasm-to-cytoplasm exchanges occur⁹⁻¹¹. A large variety of ions and signaling molecules (< 1 kDa) can diffuse through GJCs, which play therefore a key role in extensive ionic and biochemical exchanges between cells⁹⁻¹¹. In the brain, astrocytes’ coupling through GJC channels contributes to ionic homeostasis maintenance and to various biochemical/metabolic processes⁹. On the other hand, HCs are involved in astrocyte release of gliotransmitters^{12,13}, uptake of glucose¹⁴ and efflux of glutathione¹⁵. In astrocytes, two major Cxs have been identified, Cx43 and Cx30, both contributing to GJC. However, so far only Cx43-containing HCs have been shown to operate in astrocytes¹⁶.

Under peripheral and central neuropathic conditions, a marked increase in Cx43 levels was reported in both dorsal root ganglia (DRG) and spinal cord tissues, during pain induction phase and its maintenance^{7,17}. Concomitant functional increases of Cx43-containing GJCs^{18,19} and HCs²⁰ promote astrocyte coupling and enhance HC-mediated release of excitatory gliotransmitters, including glutamate^{21,22} and ATP²³, that activate post-synaptic NMDA receptors and purinergic receptors, respectively. Contribution of this signaling sequence to pain sensitization mechanisms is supported by data showing that inactivation of Cx43-mediated functions by pharmacological^{20,24,25} or genetic approaches²⁶ reduces hyperalgesia- and allodynia-like behaviours in validated models of neuropathic pain. Furthermore,

antidepressants used to alleviate neuropathic pain, such as duloxetine²⁷ and amitriptyline²⁸, were reported to affect Cx43 expression and function in astrocytes⁸.

We first investigated the effects of the widely used antidepressant, amitriptyline, on Cx43 expression and functions in astrocytes. Then, using the validated model of neuropathic pain that consists of unilateral ligation of the sciatic nerve in rats²⁹, we explored whether partial Cx43 channels blockade by mefloquine, a potent connexin blocker^{30,31}, could interfere with the anti-hyperalgesic-like action of amitriptyline. Finally, whether pharmacokinetic and/or pharmacodynamic interactions accounted for the modulatory effect of mefloquine on amitriptyline-induced effect was investigated using relevant HPLC and real time RT-qPCR quantifications.

RESULTS

Mefloquine and amitriptyline inhibited Cx43-mediated channel functions in rat cortex astrocytes

Primary cultures of astrocytes only express Cx43^{32,33}. After a 24h exposure to mefloquine (MEFLO) at 0.5 μ M, Cx43-mediated astrocyte coupling assessed from LY fluorescence spreading was significantly reduced (Fig. 1A,B; $P < 0.001$, One-way ANOVA, Newman-Keuls test), as expected from GJC inhibition by this drug^{30,31}. Under the same conditions, amitriptyline (AMIT) was also found to inhibit Cx43-mediated astrocyte coupling in a concentration-dependent manner: by 22% (n=4) at 5 μ M, 27% (n=5) at 10 μ M, 58% (n=4) at 20 μ M (Fig. 1B). Interestingly, the relative decrease in LY spreading fluorescence evoked by AMIT at 10 μ M reached -52% in the presence of MEFLO (Fig. 1B), a percentage almost twice as high as that found for the tricyclic drug tested alone at this same concentration (see above).

For assessment of the effects of MEFLO and/or AMIT on HC-mediated EtBr uptake, cortical astrocytes were first treated with LPS to enhance HC activity¹⁴. As expected, LPS significantly increased EtBr uptake by 64% (n=6) compared to basal situation (Fig. 2B), up to levels high enough for reliable quantification of possible modulations by drugs. Data depicted in Fig.2 show that a 24 h exposure to MEFLO (0.5 μ M) or AMIT (10 μ M) significantly reduced EtBr uptake in astrocytes which had been pretreated with LPS, indicating that both drugs inhibited LPS-induced HC activity (n=6 per condition, $P < 0.001$ as compared with LPS treatment alone, one-way ANOVA, Dunn test). However, in contrast to that observed on GJC

(Fig. 1B), no synergic interaction between these drugs was noted on HC activity because the reduction in EtBr uptake induced by the combination of MEFLO + AMIT did not differ from that evoked by either drug tested alone (Fig. 2B).

Treatment with amitriptyline but not mefloquine decreased Cx43 expression in rat cortex astrocytes

Under the same 24 h treatment conditions as those producing reduced GJ and HC functions, AMIT (10 μ M) but not MEFLO (0.5 μ M) significantly reduced the levels of Cx43 protein measured by western blots in extracts from treated cortex astrocyte cultures. As shown in figure 2D, AMIT-induced effect reached - 45% compared to CTRL conditions ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis test, Dunn's post test). The combination of AMIT+MEFLO also induced a decrease of Cx43 expression (- 40% vs CTRL), but statistical significance was not reached compared to CTRL conditions ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test, Dunn's post test).

Acute administration of mefloquine and/or amitriptyline did not affect mechanical hyperalgesia-like behaviour in neuropathic CCI-SN rats

A marked decrease in pressure threshold values to trigger hind paw withdrawal (not shown) and vocalization (Fig. 3, $P < 0.05$, two-way ANOVA, Bonferroni post test) in the Randall-Selitto test was noted in 75% (n=29) of operated rats two weeks after unilateral ligation of the sciatic nerve, as expected of the occurrence of CCI-SN-induced hypersensitivity to mechanical stimulation^{34,35}. Performance of the Randall-Selitto test at various times (up to 2 hours) after acute administration of MEFLO (1 mg/kg i.p.), AMIT (12 mg/kg i.p.) or the combination of both drugs did not reveal any significant changes in these pressure threshold values (Fig. 3).

Anti-hyperalgesic-like effects of chronic amitriptyline treatment were enhanced by combined chronic administration of mefloquine in neuropathic CCI-SN rats

In contrast to its lack of effect under acute treatment conditions, continuous administration of AMIT at the dose of 12 mg/kg/day (through a s.c. implanted Alzet minipump) for 14 days produced a progressive, time-dependent, increase of pressure threshold values to trigger hindpaw withdrawal (Fig. 4A) and vocalization (Fig. 4C) in CCI-SN rats. At the end of the 14 day-treatment, pressure threshold values reached levels corresponding to 50-75% recovery in comparison with control values determined before CCI-SN surgery (C on abscissa; n=8-14 in each group, $P < 0.05$, two-way ANOVA, Bonferroni test). In contrast, repeated daily

administration of MEFLO (1 mg/kg i.p./day) was essentially inactive for the two-week treatment, as only a (non significant) tendency to elevated pressure threshold to trigger vocalization was noted on day 14 (Fig. 4C). However, when combined with AMIT, MEFLO, at the same inactive dose, significantly enhanced the anti-hyperalgesic-like effect of the tricyclic drug, as shown by the faster (Fig. 4A,C, $P < 0.05$ at days 6, 9, 14, two-way ANOVA, Bonferroni test) and larger (Fig. 4B,D, $P < 0.05$, one-way ANOVA, Newman-Keuls test) recovery toward normal pressure threshold values (C on abscissa) in CCI-SN rats treated with AMIT + MEFLO compared to AMIT alone (Fig. 4A,B,C,D). Indeed, at the end of the two week-treatment, pressure threshold values to trigger hindpaw withdrawal and vocalization no longer differed in [AMIT + MEFLO]-treated- vs control-CCI-SN rats (Fig. 4A,C).

Mefloquine co-treatment did not affect brain and serum levels of amitriptyline after a 14 day-treatment

A marked accumulation of AMIT in brain tissues was observed at the end of the 14 day continuous treatment with this drug at the daily dose of 12 mg/kg s.c. delivered through an Alzet osmotic mini-pump since brain AMIT levels reached $1350 \pm 210 \mu\text{g/g}$ (corresponding to $4.87 \pm 0.76 \mu\text{M}$; mean \pm S.E.M., $n = 8$), a value about 25 fold higher than that in serum: $55.3 \pm 5.4 \text{ ng/ml}$ (corresponding to $199.35 \pm 19.47 \text{ nM}$; mean \pm S.E.M., $n = 8$; Fig. 5). Co-treatment with MEFLO (2 x 0.5 mg/kg i.p. daily) for the same period did not significantly ($P > 0.05$, Student's t-test) affect AMIT levels in brain and serum ($1350 \pm 240 \mu\text{g/g}$ and $48.4 \pm 2.6 \text{ ng/ml}$, respectively, means \pm S.E.M., $n=8$).

Chronic treatments with amitriptyline and/or mefloquine did not affect CCI-SN-induced up regulation of glial and neuro-inflammation markers in dorsal root ganglia and spinal cord

At the end of vehicle administrations for 14 days starting two weeks after surgery, i.e. 28 days after CCI-SN, marked increases in the levels of transcripts encoding ATF3 (Fig. 6A) and IL-6 (Fig. 6B) were noted in right (ipsilateral) L4-L6 DRG compared to those found in unoperated naive rats. A tendency to an up-regulation of DRG levels of mRNAs encoding IL-1 β (Fig. 6C), OX-42 (Fig. 6D) and GFAP (Fig. 6E) was also observed in CCI-SN rats, whereas the expression of Cx43 (Fig. 6F), TNF α , BDNF and NR2B (not shown) did not differ from that quantified in unoperated animals.

CCI-SN-induced changes in L4-L6 spinal cord tissues were less pronounced than in DRG since only OX-42 (Fig. 6D) and IL-1 β (Fig. 6C) transcripts were up regulated in operated vs naive unoperated animals.

As illustrated in figure 6, neither AMIT (12 mg/kg s.c. daily) or MEFLO (2 x 0.5 mg/kg i.p. daily) alone nor the combined administration of both drugs significantly modified CCI-SN-induced changes in the levels of transcripts encoding these various glial and neuroinflammation markers in DRG and spinal cord tissues.

DISCUSSION

Convergent data showed that Cx43 overexpression in DRG and spinal cord tissues contributes to the induction and maintenance of neuropathic pain, by promoting astrocyte coupling and enhancing the release of excitatory gliotransmitters by hemichannel opening at critical synaptic relays of pain signaling pathways^{7,17}. Accordingly, Cx43 might be a potential target for alternative treatments of neuropathic pain. Indeed, high doses of Cx inhibitors have already been shown to reduce hyperalgesia- and allodynia-like behaviours in validated rodent models of neuropathic pain³⁶. However, severe adverse effects are induced with such high dosages, which preclude the use of Cx inhibitors alone for developing treatments specifically targeted on neuropathic pain^{27,37,38}. This led us to assess whether moderate pharmacological modulation of Cx43 functions in astrocyte GJCs and HCs by a relatively low dose of the Cx inhibitor mefloquine could enhance the anti-hyperalgesic efficacy of amitriptyline, a tricyclic antidepressant used as first line treatment of neuropathic pain¹⁻⁵. To this goal, we performed both *in vitro* and *in vivo* studies, with primary cultures of rat cortical astrocytes on one hand and the rat model of neuropathic pain generated by unilateral ligation of the sciatic nerve on the other hand. Care was taken to use an amitriptyline dose (12 mg/kg/day) yielding brain and serum levels in the same μM range as that reached in humans treated with this drug³⁹. On the other hand, the selected dose of mefloquine (1 mg/kg/day) led to a brain concentration (0.5 μM) high enough to affect GJ but largely lower than those producing therapeutic or adverse effects in humans⁴⁰.

For *in vitro* experiments, astrocytes, with their typical pavement-like morphology under culture conditions^{11,28} (Figs 1 and 2), which markedly differs from the usual star or sponge-shape in brain tissues, were prepared from the cerebral cortex rather than the spinal cord in order to yield enough cell material. Indeed, previous studies showed that astroglial Cx43 GJCs behave similarly whether cultured astrocytes had been prepared from the cerebral cortex^{14,41} or the spinal cord^{42,43}. This led us to infer that data obtained with cortical astrocytes would have relevance for spinal cord astrocytes, whose implication in neuropathic-like pain mechanisms has been extensively characterized in CCI-SN rats^{34,44}. Moreover, the effect of amitriptyline has previously been published in similar model²⁸. In addition to mefloquine, amitriptyline itself was found to decrease, in a concentration-dependent manner, Cx43-GJC-mediated Lucifer yellow spreading among cultured astrocytes, indicating clear-cut GJC

inhibition by the tricyclic antidepressant. Interestingly, this effect, also related to down regulation of Cx43 expression, occurred at therapeutic μM concentrations reached in humans⁴⁵. Recently, a similar inhibitory effect of GJCs by amitriptyline was reported in mouse cultured astrocytes⁸. In contrast, Morioka et al.²⁸ reported that amitriptyline, at a slightly higher concentration, 25 μM and longer treatment time (48 h) up-regulated both Cx43 expression (mRNA and protein) and Cx43-mediated GJC function in cultured rat cortical astrocytes. Such discrepancy between these results and our own might be explained by differences in respective experimental conditions, notably for astrocyte cell cultures. In particular, the presence of microglial cells in astrocyte culture might be critical because previous studies showed that microglia strongly interacts with astrocytes to deeply modulate Cx activities^{13,14}. Quantification of specific markers indicated that, under our culture conditions, microglial cells accounted for approximately 4% and 11% of all cells in rat and mouse models, respectively (not shown). However, further comparison with the discrepant data reported by Morioka et al.²⁸ could not be made because the percentage of microglial cells was not determined in their study.

Interestingly, partial inhibition of GJC function by a low concentration of mefloquine (0.5 μM) was found to markedly enhance GJC inhibition by amitriptyline, whereas only weak, non additive, inhibitory effects of these drugs were noted on LPS-induced HC activity measured by astrocyte uptake of EtBr. This observation, suggesting the occurrence of some synergy between the *in vitro* effects of mefloquine and amitriptyline, led us to investigate whether a similar interaction might also occur *in vivo*. Indeed, mefloquine appeared especially relevant for such studies because it crosses the blood brain barrier⁴⁶. Furthermore, its pharmacological profile indicates a relatively good selectivity as a Cx channel inhibitor. In particular, its affinity/potency at various serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) receptors and transporters mediating the anti-hyperalgesic and anti-allodynic effects of tricyclic antidepressants⁴⁷ was low enough ($\text{EC}_{50} = 9.3 \mu\text{M}$ on 5-HT₃ receptors⁴⁸; $K_i > 9 \mu\text{M}$ and 3.8 μM on 5-HT_{1A} receptors and 5-HT_{2C} receptors, respectively⁴⁹; $\text{EC}_{50} > 1.9 \mu\text{M}$ on 5-HT_{2A} receptors ; $\text{EC}_{50} > 5 \mu\text{M}$ on NA re-uptake⁴⁹) to rule out any direct action of *in vivo* treatment at the dose of 1 mg/kg, leading to maximal mefloquine brain concentration around 0.5 μM ⁴⁰.

The *in vivo* CCI-SN model of neuropathic pain used herein consisted of unilateral ligation of the sciatic nerve, which produced, as expected of hyperalgesia-like behavior^{29,34,35}, clear-cut hypersensitivity to mechanical stimulation of ipsilateral hindpaw (Figs 3 and 4). Acute

administration of amitriptyline (12 mg/kg i.p.) or mefloquine (1 mg/kg i.p.) did not alleviate this behavior. Furthermore, combined acute treatment with amitriptyline + mefloquine was also inactive. However, *in vitro*, apparent synergy was observed after rather long term exposure, for 24 h, of cultures astrocytes to these drugs, and we therefore investigated the effects of a long term administration in CCI-SN rats.

Indeed, under chronic treatment conditions, a clear-cut interaction between the antidepressant and mefloquine was observed. As expected⁵⁰⁻⁵², amitriptyline alone was found to reduce CCI-SN-induced hypersensitivity to mechanical stimulation and this effect was significantly enhanced in rats co-treated with mefloquine at a dose inactive on its own (2 x 0.5 mg/kg i.p. daily). The mefloquine-induced enhancement of amitriptyline effect was observed on both hindpaw withdrawal and vocalization responses, suggesting that underlying mechanisms involved both spinal and supraspinal relays of pain signaling⁵³. The improved anti-hyperalgesic-like effect of amitriptyline could be linked to the reinforcement of its GJC inhibitory effect by mefloquine (Fig. 1), which might probably lead to an overall *in vivo* reduction of the release of pro-inflammatory compounds (such as ATP, glutamate, CXCL1) by astrocytes⁹⁻¹⁴. Indeed, at the doses administered in our studies, amitriptyline concentrations in brain reached the same μM range as those used in our *in vitro* assays with cultured astrocytes, supporting the idea that the apparent synergy observed *in vitro* between the tricyclic and mefloquine on Cx43-mediated GJC function might also occur *in vivo*. Interestingly, in both serum and brain, similar concentrations of amitriptyline were found whether or not rats had been co-treated with mefloquine, which allows us to rule out that the mefloquine effect would have resulted from some inhibition of amitriptyline catabolism.

Numerous studies have pointed out that antidepressants, including amitriptyline, exert anti-inflammatory properties^{54,55}, which might contribute to their efficacy in alleviating pain⁵⁶. Indeed, after neural lesion, microglia switches from a resting state to an activated state, with the production and release of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1 β and IL-6, which activate astrocytes⁴⁴. Direct blockade of microglia activation by minocycline markedly attenuated nerve lesion-induced neuropathic pain⁵⁷ and the decreased microglia production of proinflammatory cytokines by amitriptyline⁵⁴, might as well underlay, at least partly, its anti-hyperalgesic action in CCI-SN rats. As HCs open in astrocytes exposed to pro-inflammatory cytokines released from microglia^{13,14}, under our mixed astrocyte-microglia culture conditions, partial prevention of HC opening by amitriptyline might have resulted from the drug capacity to decrease microglia production of such cytokines.

These data led us to investigate whether the enhancement by mefloquine of the anti-hyperalgesic-like effect of chronic amitriptyline could be mediated through some increase of its anti-neuroinflammatory action. To this goal, we measured the concentrations of transcripts encoding relevant markers in both ipsilateral DRG and spinal cord tissues. Although these measurements were made four weeks after sciatic nerve ligation, mRNAs coding for ATF-3, a marker of neuronal injury⁴⁴, and the proinflammatory cytokine IL-6, were still up-regulated in DRG. A tendency to some increase was also noted for the transcripts encoding GFAP, OX-42, IL-1 β , but statistical significance was scarcely reached probably because of the marked decrease in corresponding genes induction four weeks following nerve ligation⁴⁴. The progressive attenuation of neural lesion-induced neuroinflammatory reaction also very probably accounted for our finding that only OX-42 encoding transcript was still up regulated in spinal cord tissues four weeks after ligation. Interestingly, neither amitriptyline or mefloquine, nor their combination, were found to significantly affect the transcript levels of any of the neuroinflammatory markers in both DRG and spinal cord tissues. Although it cannot be excluded that some inhibition of CCI-SN-induced neuroinflammatory reaction might have occurred earlier, it seems rather unlikely that such an effect might have underlain the marked anti-hyperalgesic action of amitriptyline + mefloquine at the end of treatment. Possible implication of some change in Cx43 expression might also be ruled out because levels of its encoding transcript did not differ from respective values in control healthy rats. However, as emphasized above for other astrocyte markers⁴⁴, this negative finding probably reflected the progressive disappearance of nerve lesion-induced Cx43 induction because quantification was performed four weeks after injury. In literature Cx43 increase was observed earlier.

Altogether, these data suggest that mechanisms underlying the promoting action of mefloquine on the anti-hyperalgesic-like effect of chronic treatment with amitriptyline might target pain-signaling processes downstream of neural lesion-induced neuroinflammatory reaction. Further investigations at synaptic relays of nociceptive pathways in the dorsal horn of the spinal cord and supraspinal structures should allow deciphering how Cx modulation combined with a tricyclic antidepressant opens promising perspective toward improved treatment of neuropathic pain.

METHODS

Animals

Male rats (weighing 175-200 g on arrival) of the Sprague-Dawley strain (Charles River breeding center, 69210 L'Arbresle, France), for which our laboratory has long expertise regarding neuropathic-like pain studies^{34,35,44}, were accustomed to the housing facilities for one week before handling. Rats were housed under standard laboratory conditions (22°C ± 1°C, 60% relative humidity, 12-h light-dark cycle with light on at 7:00 a.m.) with free access to food and water *ad libitum*. On the other hand, the Wistar rat strain (Charles River) was selected for the preparation of cortical cell cultures (see below) from pups (P2), following the detailed procedure of Morioka et al.²⁸.

All experiments were performed in strict conformity with the Ethical Guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain (IASP)⁵⁸, the European Union laws and policies for use of animals in neuroscience research (European Committee Council Directive 86/609/EEC) and strictly followed the recommendations of the Ethical Committee of the French Ministry of Research and High Education (articles R.214-124, R.214-125; Registration nb.01296.01; official authorizations no. 006228 to S.B. and no. B75-116 to M.H., 31 December 2012). All experiments herein reported were specifically approved by the Ethical Committee for Preclinical Research (nb 5) of the French Ministry of National University Education and Research under the official notification nb R.214-987-126 of July 1, 2014. Throughout performance of the studies, all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Cell cultures

Brains were removed from Wistar rat pups, and cortices were dissected out. Meninges were carefully peeled off and cortical tissue was mechanically dissociated in phosphate buffered-saline (PBS, pH 7.4) supplemented with 33 mM glucose. Cells were seeded on polyornithine-coated plastic dishes at 5×10^5 cells/dish of 35 mm in diameter or 3×10^6 cells/dish of 100 mm in diameter (Nunc, Roskilde, Denmark), in medium containing DMEM (Sigma-Aldrich, St-Louis MO, USA), supplemented with penicillin (5 µg/mL), streptomycin (5 µg/mL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 10% fetal calf serum (FCS, Hyclone, Logan, UT, USA). After 8–10 days, when cells grown into 35 mm-dishes had reached confluence, 1 µM of cytosine-arabinoside was added to the culture medium during 3 days to eliminate proliferating microglial cells. Medium was then changed twice a week.

At confluence, cells grown in 100 mm-dishes were harvested with trypsin-EDTA (Invitrogen) and re-plated (2×10^5 cells per well), as secondary cultures, on glass coverslips (Gassalem, Limeil-Brévannes, France) placed inside a 24-round-well plate ($1.9 \text{ cm}^2/\text{well}$, NunClon, Thermoscientific, Villebon-sur-Yvette, France). Finally, they were grown to confluence (about 1 week), cytosine-arabinoide was added and the medium was changed twice a week. Treatments (with amitriptyline at 5, 10 or 20 μM , and/or mefloquine at 0.5 μM) consisted of cell exposure to drugs for 24 hours before GJ and HC functional assays.

Scrape loading/Lucifer yellow transfer assay of gap junction channel activity

Cultured cells that had been treated as indicated above were first incubated at 20–22°C for 10 min in HEPES buffered-saline 1 (HBS1: NaCl 140 mM, KCl 5.5 mM, CaCl_2 1.8 mM, MgCl_2 1 mM, d-glucose 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.35), then washed in Ca^{2+} -free HEPES buffered-saline for 1 min. Cells were subsequently exposed to Lucifer yellow (LY, 1 mg/ml) for 1 min¹¹, washed, and LY was allowed to diffuse through GJCs during 8 min. Six successive fluorescent images taken at the center of the scrape line were captured using an inverted epifluorescence microscope (Diaphot-Nikon, Tokyo, Japan) for this 8 min diffusion period. Area of fluorescence was quantified with Image J program (NIH software).

Ethidium bromide uptake assay of hemichannel activity

HC activity was evaluated by quantifying ethidium bromide (EtBr) uptake in cultured cortical astrocytes⁵⁹. Briefly, as HC activity is low in basal condition, cells were pretreated with lipopolysaccharide (LPS, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) overnight to enhance HC activity, thereby allowing optimal conditions to assess subsequent modulations by drugs¹⁴. The next day, they were pre-incubated in HEPES buffered-saline 2 (HBS2: NaCl 150 mM, KCl 5.4 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 1 mM, d-glucose 10 mM, HEPES 5 mM, pH 7.4), then incubated for 10 min in the same medium supplemented with 5 μM EtBr at room temperature, before washing and fixation with paraformaldehyde (4%). Ten consecutive images of fixed cells were taken at 0.49 μm intervals using a confocal laser-scanning microscope (Leica SP5), then stacked and finally analyzed with Image J program.

Western blot

After treatment for 24 h with amitriptyline, mefloquine or both drugs together, cultured cells were harvested after scraping and centrifugation, and then cell pellets were suspended in 20 μL of 5X Laemmli sample buffer, boiled and sonicated (Ultrasonic cell disrupter, Microson).

Proteins in sonicated samples (20 µg per sample) were separated by electrophoresis on Bis-Tris 4-12% NuPAGE gels and electro-transferred to nitrocellulose sheets. Nonspecific protein binding was blocked by incubation in TBS-Tween-milk solution for 1 hour. Blots were incubated overnight with primary anti-mouse Cx43 antibody (1:500, Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA) at 4°C, then with goat anti-mouse antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:2,500, Tebu-Bio, 78610 Le Perray-en-Yvelines, France). Immunoreactivity was detected by ECL using the SuperSignal kit (Pierce, Rockford, IL, USA) according to manufacturer's instructions. Blots were then reprobated with mouse monoclonal anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GaPDH) antibody (Sigma-Aldrich, 1:10,000) to check the protein load. Chemoluminescence imaging was performed on a LAS4000 (Fujifilm, Stamford, CT, USA). Semiquantitative densitometric analysis was performed with ImageJ software after scanning the bands.

Chronic constriction injury (CCI) to the sciatic nerve (SN)

Rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg i.p.), before exposing the right common sciatic nerve, which was subsequently tied with four silk (5.0) ligatures proximally to the sciatic trifurcation^{29,44}. Skin and muscle were finally sewed using silk (4.0) sutures. CCI-SN rats were allowed to recover from anesthesia on a warming pad in a postoperative chamber before returning to their home cages.

Pharmacological treatments

Acute treatments: Two weeks after surgery, CCI-SN rats received two injections two min apart. First, amitriptyline (12 mg/kg; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) or its vehicle (0.9% NaCl) was injected i.p. in a volume of 0.3 mL per CCI-SN rat. Then, CCI-SN rats were injected with mefloquine (1 mg/kg i.p.; Sigma-Aldrich) or its vehicle (0.9% NaCl with 0.017% DMSO).

Chronic treatments: Osmotic mini-pumps (Alzet, Charles-River) delivering amitriptyline at 12 mg/kg/day or 0.9% NaCl for 14 days were subcutaneously implanted in the back of CCI-SN rats under isoflurane anesthesia on the 15th day post surgery. In addition, mefloquine (0.5 mg/kg) or its vehicle (0.9% NaCl with 0.017% DMSO) was administered i.p. twice a day (9:00 a.m., 6:00 p.m.) also for a 14-day treatment starting on the 15th day post-surgery

Paw pressure test

Mechanical nociceptive thresholds, expressed as grams (g), were measured using an Ugo Basile analgesy-meter (Bioseb, 13127 Vitrolles, France) as described³⁵. All determinations were made by an experienced person blind to treatment groups.

Briefly, an increasing pressure was applied onto the nerve-injured (right) hindpaw of CCI-SN rats until paw withdrawal and then vocalization (i.e. a squeak when the paw was maintained under pressure) were obtained. All tests were conducted between 10:00 a.m. and 5:00 p.m. in a quiet room where rats acclimatized for two hours before test performance. Basal responses were established on the day before nerve injury. On day 15 post surgery, when hypersensitivity to mechanical stimulation had fully developed^{34,35}, responses thresholds were measured again to establish post-injury baseline, and further pressure threshold determinations were made at various times after subsequent acute or chronic treatments with amitriptyline and/or mefloquine or their vehicles (see above). Only animals showing clear-cut mechanical hypersensitivity (approximately 75% of CCI-SN rats), with a reduction of nociceptive thresholds of at least 30% compared to their pre-injury baseline, were used for these studies.

LC/MS/MS quantification of amitriptyline in serum and brain

Rats were decapitated on the last day of chronic treatments, blood was collected from trunk vessels, and the brain was rapidly removed from the skull and frozen in isopentane at -30°C before storage at -80°C. Immediately after collection, blood samples were allowed to clot for 1 hour at 4°C, and then centrifuged at 2,500 g for 25 min at 4°C. Serum was collected and stored at -20°C.

After thawing at 4°C, serum samples were homogenized in perchloric acid (30%, v/v) and brain samples in a mixture of methanol and 10% perchloric acid (1:5, v/v). Precipitated proteins were sedimented by centrifugation at 10,000 x g for 10 min, and supernatants were collected. After extraction with a mixture of methanol: 10% formic acid (1:5, v/v), 20 µL aliquots (maintained in the auto-sampler kept at 4°C) were injected into the liquid chromatography (LC) system (transcend TLX1, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Chromatographic separation was carried out using a reverse-phase Hypersil GOLD column (50 x 2.1 mm, 1.9 µm, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) with the mobile phase consisting of a linear gradient of solvent A (0.05 % formic acid in water) and solvent B (0.05 % formic acid in acetonitrile) at a flow rate of 500 µL/min for a 10.90 min run. On-line MS analyses were performed using a 4000QTrap triple quadrupole linear trap mass

spectrometer equipped with a turbo ionspray source operated in electrospray mode (ABSciex, Foster City, CA, USA). The MRM transitions of m/z 278.2; 233.1 for amitriptyline and m/z 264.1; 233.2 for amitriptyline D6 (internal standard added in serum and brain homogenates before extraction step) were simultaneously monitored, and their respective concentrations calculated from specific peak surfaces (weight quadratic fit). Lower limit of quantification for amitriptyline was 10 $\mu\text{g/L}$. All determinations were made in triplicate for each sample.

Real time RT-qPCR determinations of transcripts encoding neuroinflammatory and astrocyte markers

Rats were killed by decapitation on the last treatment day (see above), and both DRG and the dorsal quadrant of the lumbar enlargement of the spinal cord at L4-L6 level on the right side (ipsilateral to CCI-SN) were rapidly dissected out at 0-4 °C⁴⁴. Dissected tissues were then immediately frozen in liquid nitrogen to be stored at -80 °C. Total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA II extraction kit (Macherey-Nagel, 67722 Hoerd, France) and quantified with a NanoDrop. First-stranded cDNA synthesis (from 660 ng total RNA per 20 μL of reaction mixture) was carried out using High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, 91973 Courtaboeuf, France). PCR amplification, in triplicate for each sample, was performed using ABI Prism 7300 (Applied Biosystems), TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG (Applied Biosystems) and Assays-on-Demand Gene Expression probes (Applied Biosystems) for target genes: Activating Transcription Factor 3 (ATF3, assay ID Rn00563784_m1), Integrin alpha M (OX-42, Rn00709342_m1), GFAP (Rn01460868_m1), Interleukin-1 β (IL-1 β , Rn00580432_m1), Interleukin-6 (IL-6, Rn00561420_m1), Cx43 (Rn01433957_m1). Semi-quantitative determinations were made with reference to the reporter gene encoding glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Rn99999916_s1). The polymerase activation step at 95°C for 15 min was followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 60 sec at 60°C⁴⁴. The validity of the results was checked by running appropriate negative controls (replacement of cDNA by water for PCR amplification; omission of reverse transcriptase for cDNA synthesis). Specific mRNA levels were calculated after normalizing from GAPDH mRNA in each sample. Data are presented as relative mRNA units compared with control values⁴⁴.

Statistical analyses

All values are expressed as means \pm S.E.M. Areas under the time-course curves (AUC) were calculated using the trapezoidal rule. Student's-t-test, one-way ANOVA followed by

Newman-Keuls test and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post test, were used for analyses, except in case of paw pressure tests for which two-way ANOVA for repeated measures (effect over time) followed by Bonferroni test were used. For qRT-PCR data, the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method⁶⁰ was used (RQ Study Software 1.2 version; Applied Biosystems).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Ana Claudia Figueiredo and Dr. Laurence Lanfumey for excellent scientific and technical assistance in these studies.

AUTHORS' CONTRIBUTION

TJ performed the experiments, with the help of SB for the surgical procedure and PE for western blot experiments. CP confirmed the effects on gap junction functionality. AD and TJ participated in reflections on mechanistic studies. DR determined the serum and brain levels of amitriptyline. MC and MH supervised the project and wrote the first draft of the manuscript. MC, FM, CG and MH designed the studies. All authors revised the manuscript.

DISCLOSURE AND FUNDING

This work was supported by the Commissariat à l'Energie Atomique and Theranexus Company. TJ, AD, CP, FM and MC are employees of Theranexus. The other authors declare no potential conflict of interest.

References

- 1 Finnerup, N. B. *et al.* Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* **14**, 162-173 (2015).
- 2 Attal, N., Lanteri-Minet, M., Laurent, B., Fermanian, J. & Bouhassira, D. The specific disease burden of neuropathic pain: results of a French nationwide survey. *Pain* **152**, 2836-2843, (2011).
- 3 NICE. in *Neuropathic Pain: The Pharmacological Management of Neuropathic Pain in Adults in Non-specialist Settings* National Institute for Health and Clinical Excellence: *Guidance* (2013).
- 4 Moulin, D. *et al.* Pharmacological management of chronic neuropathic pain: revised consensus statement from the Canadian Pain Society. *Pain Res Manag.* **19**, 328-335 (2014).
- 5 Piano, V. *et al.* Treatment for neuropathic pain in patients with cancer: comparative analysis of recommendations in national clinical practice guidelines from European countries. *Pain Pract.* **14**, 1-7 (2014).
- 6 Yaksh, T. L., Woller, S. A., Ramachandran, R. & Sorokin, L. S. The search for novel analgesics: targets and mechanisms. *F1000 Prime Rep.* **7**, 56 (2015).
- 7 Chen, M. J. *et al.* Astrocytic CX43 hemichannels and gap junctions play a crucial role in development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Glia* **60**, 1660-1670 (2012).
- 8 Jeanson, T. *et al.* Antidepressants impact connexin 43 channel functions in astrocytes. *Front Cell Neurosci.* **9**, 495 (2016).
- 9 Ransom, B. & Giaume, C. *Gap Junctions and hemichannels*. Neuroglia (third edition), Oxford University Press (2012).
- 10 Laird, D. W. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J.* **394**, 527-543 (2006).
- 11 Giaume, C. *et al.* Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron* **6**, 133-143 (1991).
- 12 Kang, J. *et al.* Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci.* **28**, 4702-4711 (2008).
- 13 Abudara, V. *et al.* Activated microglia impairs neuroglial interaction by opening Cx43 hemichannels in hippocampal astrocytes. *Glia* **63**, 795-811 (2015).
- 14 Retamal, M. A. *et al.* Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *J Neurosci.* **27**, 13781-13792 (2007).
- 15 Rana, S. & Dringen, R. Gap junction hemichannel-mediated release of glutathione from cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett.* **415**, 45-48 (2007).
- 16 Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C. C. & Saez, J. C. Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front Pharmacol.* **4**, 88 (2013).
- 17 Ohara, P. T., Vit, J. P., Bhargava, A. & Jasmin, L. Evidence for a role of connexin 43 in trigeminal pain using RNA interference in vivo. *J Neurophysiol.* **100**, 3064-3073 (2008).
- 18 Ledda, M., Blum, E., De Palo, S. & Hanani, M. Augmentation in gap junction-mediated cell coupling in dorsal root ganglia following sciatic nerve neuritis in the mouse. *Neuroscience* **164**, 1538-1545 (2009).
- 19 Hanani, M., Caspi, A. & Belzer, V. Peripheral inflammation augments gap junction-mediated coupling among satellite glial cells in mouse sympathetic ganglia. *Neuron Glia Biol.* **6**, 85-89 (2010).
- 20 O'Carroll, S. J., Gorrie, C. A., Velamoor, S., Green, C. R. & Nicholson, L. F. Connexin43 mimetic peptide is neuroprotective and improves function following spinal cord injury. *Neurosci Res.* **75**, 256-267 (2013).
- 21 Innocenti, B., Parpura, V. & Haydon, P. G. Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *J Neurosci.* **20**, 1800-1808 (2000).

- 22 Parpura, V. *et al.* Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* **369**, 744-747 (1994).
- 23 Takeuchi, H. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem.* **281**, 21362-21368, (2006).
- 24 Yoon, S. Y., Robinson, C. R., Zhang, H. & Dougherty, P. M. Spinal astrocyte gap junctions contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity. *J Pain* **14**, 205-214 (2013).
- 25 Roh, D. H. *et al.* Intrathecal injection of carbenoxolone, a gap junction decoupler, attenuates the induction of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol.* **224**, 123-132 (2010).
- 26 Jasmin, L., Vit, J. P., Bhargava, A. & Ohara, P. T. Can satellite glial cells be therapeutic targets for pain control? *Neuron Glia Biol.* **6**, 63-71 (2010).
- 27 Sun, J. D., Liu, Y., Yuan, Y. H., Li, J. & Chen, N. H. Gap junction dysfunction in the prefrontal cortex induces depressive-like behaviors in rats. *Neuropsychopharmacology* **37**, 1305-1320 (2012).
- 28 Morioka, N. *et al.* Amitriptyline up-regulates connexin43-gap junction in rat cultured cortical astrocytes via activation of the p38 and c-Fos/AP-1 signalling pathway. *Br J Pharmacol.* **171**, 2854-2867 (2014).
- 29 Bennett, G. J. & Xie, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **33**, 87-107 (1988).
- 30 Picoli, C. *et al.* Human Connexin Channel Specificity of Classical and New Gap Junction Inhibitors. *J Biomol Screen* **17**, 1339-1347 (2012).
- 31 Cruikshank, S. J. *et al.* Potent block of Cx36 and Cx50 gap junction channels by mefloquine. *Proc Natl Acad Sci. U S A* **101**, 12364-12369 (2004).
- 32 Kunzelmann, P. *et al.* Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes. *Glia* **25**, 111-119 (1999).
- 33 Koulakoff, A., Ezan, P. & Giaume, C. Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia* **56**, 1299-1311 (2008).
- 34 M'Dahoma, S. *et al.* Respective pharmacological features of neuropathic-like pain evoked by intrathecal BDNF versus sciatic nerve ligation in rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* **25**, 2118-2130 (2015).
- 35 Viguier, F., Michot, B., Hamon, M. & Bourgoin, S. Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms-implications of 5-HT(7) and other 5-HT receptor types. *Eur J Pharmacol.* **716**, 8-16 (2013).
- 36 Xu, Q. *et al.* Intrathecal carbenoxolone inhibits neuropathic pain and spinal wide-dynamic range neuronal activity in rats after an L5 spinal nerve injury. *Neurosci Lett.* **563**, 45-50 (2014).
- 37 Diao, H. *et al.* Broad gap junction blocker carbenoxolone disrupts uterine preparation for embryo implantation in mice. *Biol Reprod.* **89**, 31 (2013).
- 38 Ritchie, E. C., Block, J. & Nevin, R. L. Psychiatric side effects of mefloquine: applications to forensic psychiatry. *J Am Psychiatry Law* **41**, 224-235 (2013).
- 39 Coudore, F. *et al.* Pharmacokinetics of amitriptyline and its demethylated and hydroxylated metabolites in streptozocin-induced diabetic rats. *Gen Pharmacol.* **27**, 803-807 (1996).
- 40 Barraud de Lagerie, S. *et al.* Cerebral uptake of mefloquine enantiomers with and without the P-gp inhibitor elacridar (GF1210918) in mice. *Br J Pharmacol* **141**, 1214-1222 (2004).
- 41 Mème, W. *et al.* Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by beta-amyloid. *FASEB J.* **20**, 494-496 (2006).
- 42 Garré, J.M. *et al.* FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. *Proc Natl Acad Sci. USA* **107**, 22659-22664 (2010).
- 43 Zhang, F.F., Morioka, N., Kitamura, T., Hisaoka-Nakashima, K. & Nakata, Y. Proinflammatory cytokines downregulate connexin 43-gap junctions via the ubiquitin-proteasome system in rat spinal astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **464**, 1202-1208 (2015).

- 44 Latremoliere, A. *et al.* Differential implication of proinflammatory cytokine interleukin-6 in the development of cephalic versus extracephalic neuropathic pain in rats. *J Neurosci.* **28**, 8489-8501(2008).
- 45 el-Yazigi, A., Chaleby, K., Gad, A. & Raines, D. A. Steady-state kinetics of fluoxetine and amitriptyline in patients treated with a combination of these drugs as compared with those treated with amitriptyline alone. *J Clin Pharmacol.* **35**, 17-21 (1995).
- 46 Dow, G. S. *et al.* Central nervous system exposure of next generation quinoline methanols is reduced relative to mefloquine after intravenous dosing in mice. *Malaria J.* **10**, 150 (2011).
- 47 Mico, J. A. *et al.* Effects of milnacipran, duloxetine and indomethacin, in polyarthritic rats using the Randall-Selitto model. *Behav Pharmacol.* **22**, 599-606 (2011).
- 48 Thompson, A. J., Lochner, M. & Lummis, S. C. The antimalarial drugs quinine, chloroquine and mefloquine are antagonists at 5-HT₃ receptors. *Br J Pharmacol.* **151**, 666-677 (2007).
- 49 Janowsky, A. *et al.* Mefloquine and psychotomimetics share neurotransmitter receptor and transporter interactions in vitro. *Psychopharmacology (Berl)* **231**, 2771-2783 (2014).
- 50 Berrocoso, E. *et al.* Evaluation of milnacipran, in comparison with amitriptyline, on cold and mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* **655**, 46-51 (2011).
- 51 Sung, B. & Wang, G. K. Peripherally administered amitriptyline derivatives have differential anti-allodynic effects in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett.* **357**, 115-118 (2004).
- 52 Esser, M. J., Chase, T., Allen, G. V. & Sawynok, J. Chronic administration of amitriptyline and caffeine in a rat model of neuropathic pain: multiple interactions. *Eur J Pharmacol.* **430**, 211-218 (2001).
- 53 Le Bars, D., Gozariu, M. & Cadden, S. W. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* **53**, 597-652 (2001).
- 54 Obuchowicz, E. *et al.* Amitriptyline and nortriptyline inhibit interleukin-1 release by rat mixed glial and microglial cell cultures. *Int J Neuropsychopharmacol.* **9**, 27-35 (2006).
- 55 Hwang, J. *et al.* Inhibition of glial inflammatory activation and neurotoxicity by tricyclic antidepressants. *Neuropharmacology* **55**, 826-834 (2008).
- 56 Sadeghi, H., Hajhashemi, V., Minaiyan, M., Movahedian, A. & Talebi, A. A study on the mechanisms involving the anti-inflammatory effect of amitriptyline in carrageenan-induced paw edema in rats. *Eur J Pharmacol.* **667**, 396-401 (2011).
- 57 Mika, J., Zychowska, M., Popiolek-Barczyk, K., Rojewska, E. & Przewlocka, B. Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* **716**, 106-119 (2013).
- 58 Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **16**, 109-110 (1983).
- 59 Orellana, J. A. *et al.* Hemichannels in the neurovascular unit and white matter under normal and inflamed conditions. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **10**, 404-414 (2011).
- 60 Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**, 1101-1108 (2008).

Legends to Figures

Figure 1: Synergistic inhibitory effects of mefloquine and amitriptyline on astroglial Cx43 coupling

Cultured astrocytes were treated during 24 h before imaging. A – Typical fluorescence photomicrographs of intercellular Lucifer yellow spreading after a 10-min scrape loading under the following conditions: no treatment (control, CTRL, black bar); mefloquine (MEFLO 0.5 μ M); amitriptyline (AMIT 10 μ M); AMIT 10 μ M + MEFLO 0.5 μ M. Calibration scale: 20 μ m. B - Fluorescence area of Lucifer yellow spreading after 24 h treatment with AMIT and/or MEFLO at the indicated concentrations (μ M). Values are expressed with respect to CTRL fluorescence area. Each bar is the mean \pm S.E.M. of 3-6 independent determinations. *** P <0.001 compared with CTRL group, one-way ANOVA, Newman-Keuls; ### P <0.001 comparison between AMIT-treated groups, one-way ANOVA, Newman-Keuls test.

Figure 2: Unchanged inhibitory effect of amitriptyline on astroglial Cx43 expression and hemichannels upon concomitant treatment with mefloquine

A – Photomicrographs of fixed cells examined at 40 \times with a confocal laser-scanning microscope one day after EtBr uptake in cultured astrocytes treated with: none (control, CTRL, black bar); LPS (1 μ g/mL) alone; LPS + MEFLO 0.5 μ M; LPS + AMIT 10 μ M; LPS + AMIT 10 μ M + MEFLO 0.5 μ M. Stacks of 10 consecutive confocal images were taken at 0.49 μ m intervals. Calibration scale: 20 μ m. B - Effects of AMIT and/or MEFLO on LPS-induced HeC activity measured by EtBr uptake (fluorescence intensity). Values are expressed with respect to CTRL fluorescence intensity. Each bar is the mean \pm S.E.M. of 4-6 independent determinations. *** P <0.001 compared with treatment with LPS alone, Kruskal-Wallis, Dunn's test. C – Western blots of Cx43 and Gapdh in extracts from cultured astrocytes after 24-hour treatment by amitriptyline 10 μ M and/or mefloquine 0.5 μ M. D – Quantification of Cx43 immunolabeling under these respective treatment conditions. Each bar is the mean \pm S.E.M. of 5 independent determinations. * P < 0.05, as compared with control (no treatment, black bar) (Kruskal-Wallis, Dunn's test).

Figure 3: Unaltered CCI-SN-induced mechanical hyperalgesia after acute treatment with amitriptyline and/or mefloquine

Amitriptyline (AMIT, 12 mg/kg i.p.) or its vehicle (saline) was co-administered with mefloquine (MEFLO, 1 mg/kg i.p.) or its vehicle (saline) in rats that had undergone unilateral CCI-SN two weeks before. Mechanical hyperalgesia was assessed at various times after treatment (abscissa) by determining pressure threshold value (in g) to trigger vocalization in the Randall-Selitto test. Each point is the mean \pm S.E.M. of independent determinations in n rats: CTRL (saline + saline), n=6; AMIT, n=9; MEFLO, n=4; AMIT + MEFLO, n=10). C on abscissa: control naïve rats before CCI-SN; 0 on abscissa: two weeks after CCI-SN just prior to treatments. None of the pressure threshold values determined after treatment significantly differed from those at time 0; two-way ANOVA, Bonferroni test.

Figure 4: Potentiation by mefloquine of the anti-hyperalgesic effect of chronic treatment with amitriptyline in CCI-SN rats

Rats underwent unilateral CCI-SN and two-week-treatments with amitriptyline (12 mg/kg s.c. daily, via osmotic mini-pump) or its vehicle (saline s.c. via osmotic mini-pump), and mefloquine (0.5 mg/kg i.p., twice daily) or its vehicle (saline) started on day 15 post-surgery. Mechanical hyperalgesia was assessed by determining pressure threshold values to trigger hindpaw withdrawal (A,B) and vocalization (C,D) in the Randall-Selitto test performed at various times during treatment (abscissa, in days). A, C: Time-course changes in pressure threshold values. Each point is the mean \pm S.E.M. of independent determinations in n rats ("AMIT+MEFLO", n=14; "AMIT", n=12; "MEFLO", n=10; "CTRL", n=8). C on abscissa: control rats before CCI-SN; 0 on abscissa: two weeks after CCI-SN just prior to treatments. B, D: AUC values (g x day) calculated from respective time course-curves illustrated in A, C. Each bar is the mean \pm S.E.M. of n rats.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$ compared with CTRL group, two-way ANOVA, Bonferroni test; $\neq P < 0.05$, $\neq P < 0.01$, one-way ANOVA, Newman-Keuls test.

Figure 5: Unchanged serum and brain levels of amitriptyline by co-administration of mefloquine in CCI-SN rats after a two-week treatment with amitriptyline

Amitriptyline (12 mg/kg s.c. daily, via osmotic mini-pump) was co-administered with mefloquine (0.5 mg/kg i.p., twice daily, AMIT+MEFLO) or its vehicle (0.9% NaCl, AMIT) for 14 days in rats which had undergone CCI-SN two weeks before. At the end of treatment, amitriptyline levels were measured in serum (ng/ml, A1) and in brain (μ g/g, A2). The ratio of amitriptyline levels in serum over those in brain (A_3) was also calculated for each rat. Each bar is the mean \pm S.E.M. of independent determinations in 8 rats. No significant difference was noted between both treatment groups (unpaired t-test).

Figure 6: Unchanged CCI-SN-induced expression of mRNAs encoding glial and neuro-inflammatory markers in dorsal root ganglia and spinal cord in rats treated with amitriptyline and/or mefloquine or their vehicles for two weeks

Amitriptyline (AMIT, 12 mg/kg s.c. daily, via osmotic mini-pump) or its vehicle (CTRL, 0.9% NaCl) was co-administered with mefloquine (MEFLO, 0.5 mg/kg i.p., twice daily) or its vehicle (0.9% NaCl) for 14 days in rats which had undergone unilateral CCI-SN two weeks before. At the end of treatments, mRNA levels of ATF3 (A), IL-6 (B), IL-1 β (C), OX-42 (D), GFAP (E) and Cx43 (F) encoding mRNAs were measured by RT-qPCR in ipsilateral dorsal root ganglia (L4-L6) and dorsal quadrant of the L4-L6 segment of the spinal cord. Determinations were also made in naïve rats (D-1, black bars) for comparison. Each bar is the mean \pm S.E.M. of independent determinations in 5-10 rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with naïve rats (D-1, black bars), Kruskal-Wallis and one-way ANOVA, followed respectively by Dunn and Newman-Keuls tests. None of the treatments significantly changed CCI-SN-induced up regulation of any of those markers in both dorsal root ganglia and lumbar cord (comparison with CTRL CCI-SN rats, empty bars).

Figure 1

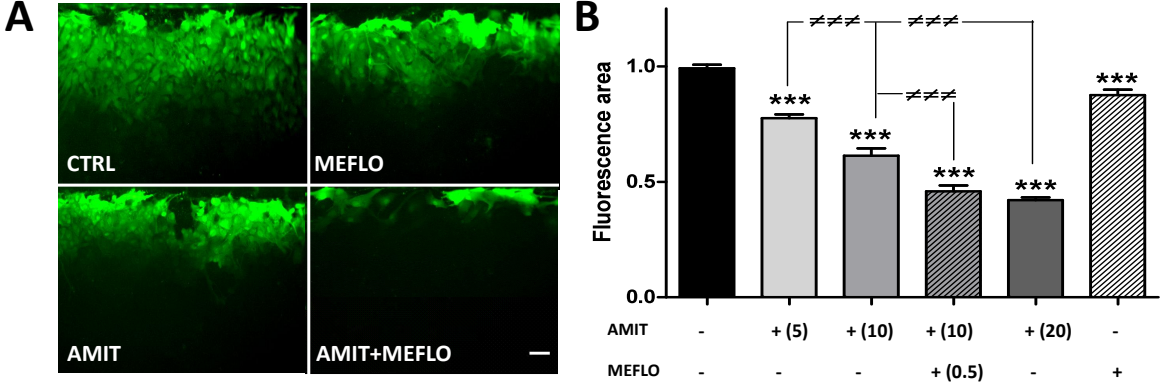


Figure 2

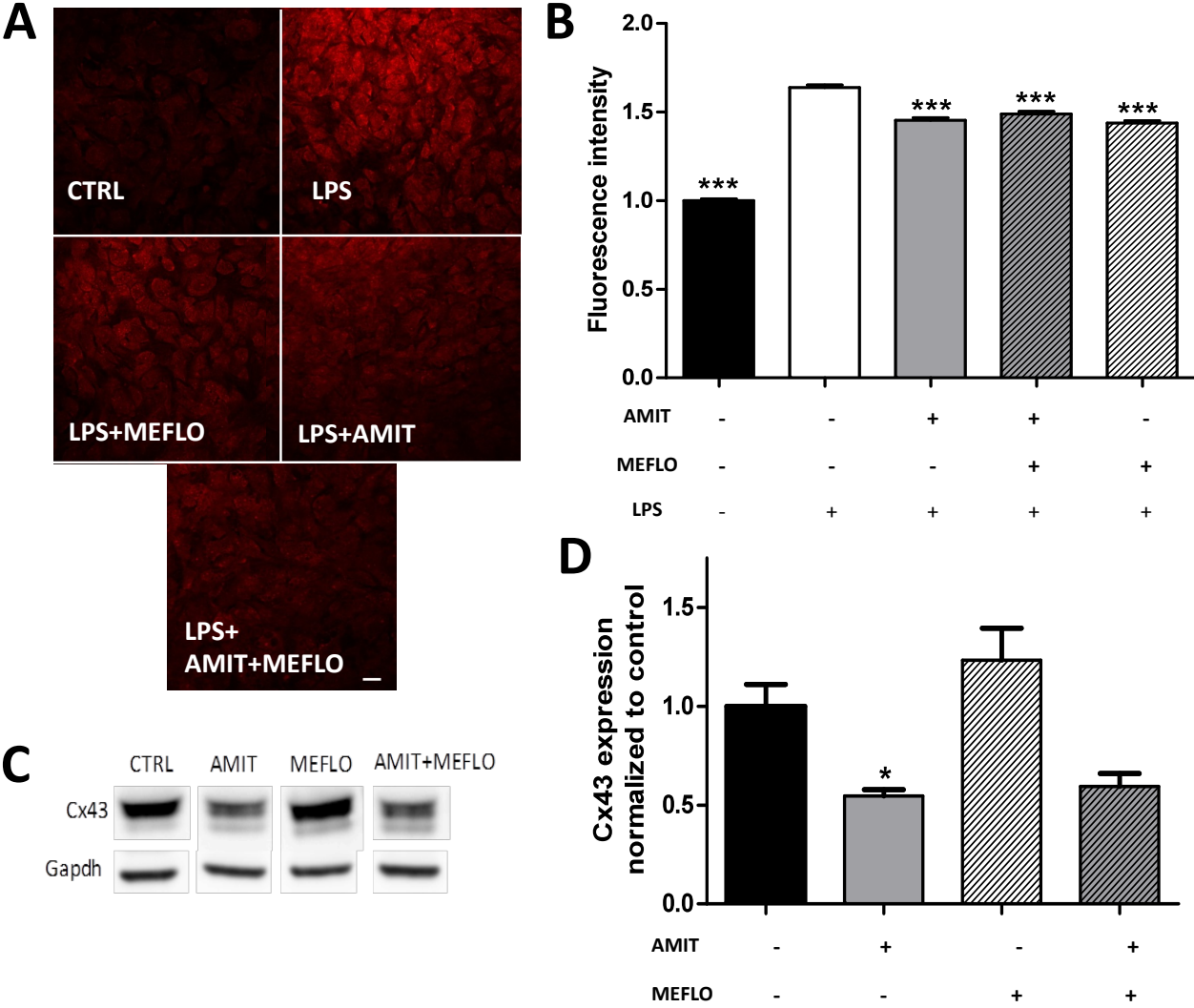


Figure 3

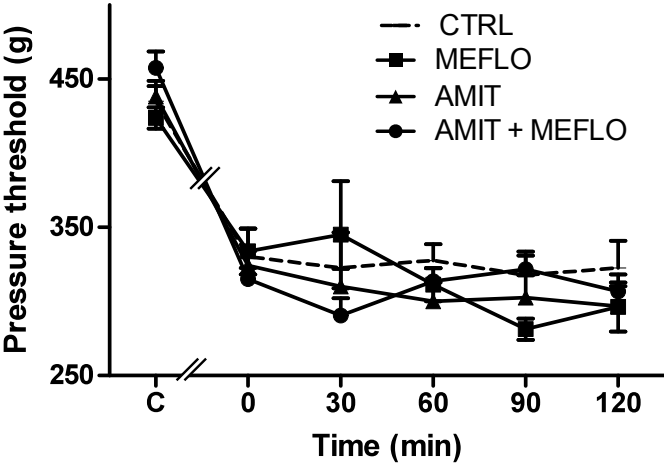


Figure 4

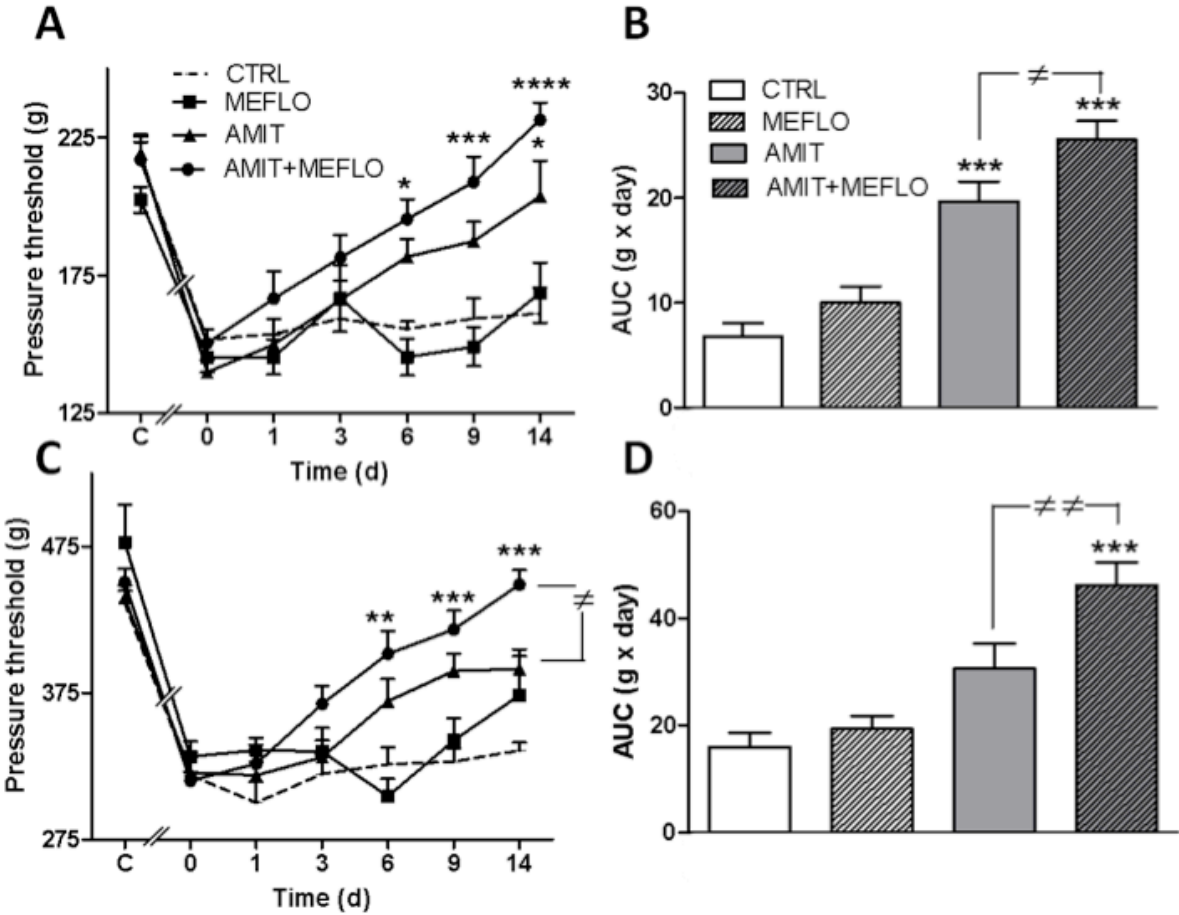


Figure 5

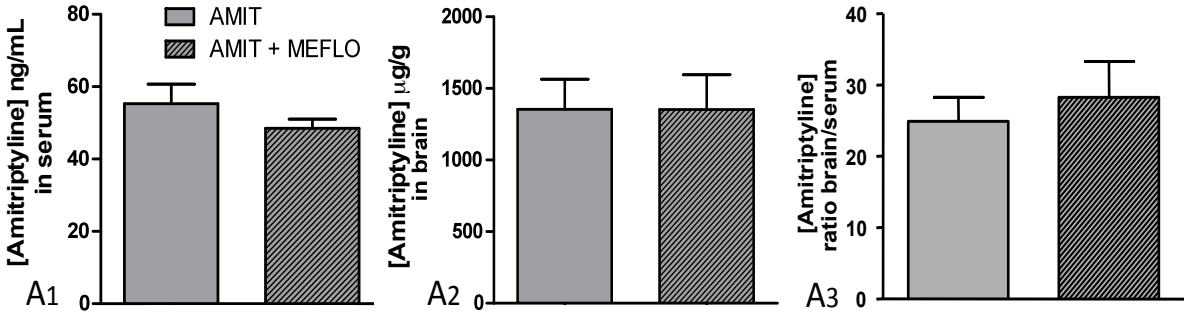
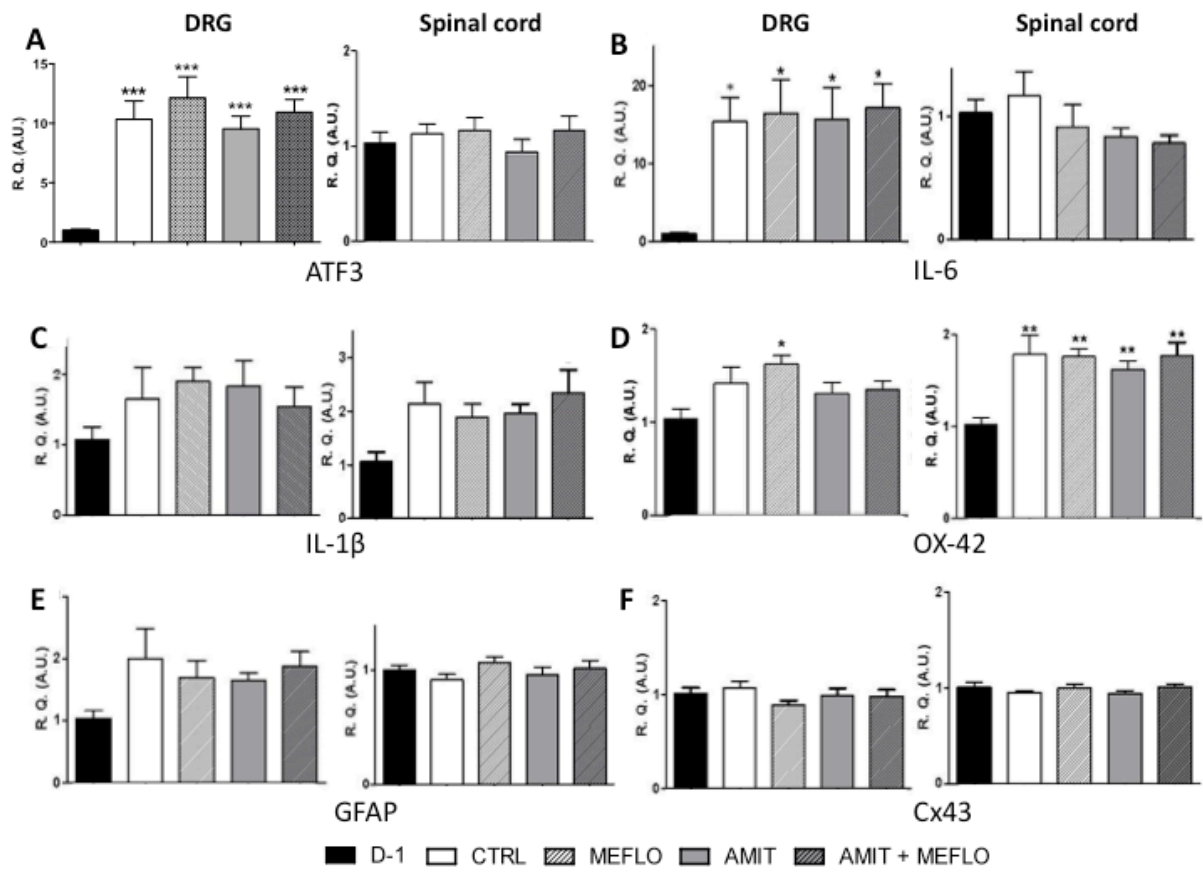


Figure 6



Discussion

Ce second article démontre la synergie d'effet de l'amitriptyline et de la méfloquine sur l'inhibition des GJ Cx43, dans un modèle de culture d'astrocytes corticaux chez le rat. De plus, l'administration de la combinaison de ces deux molécules chez le rat lésé au niveau du nerf sciatique, conduit à une potentialisation de l'effet anti-hyperalgésique de l'amitriptyline. Ceci est en faveur de l'implication de la Cx43 astrocytaire dans l'action antinociceptive des antidépresseurs.

1. L'amitriptyline inhibe les fonctions de la Cx43 astrocytaire et son action sur les GJ est potentialisée par la méfloquine.

Notre article présente l'effet inhibiteur de l'amitriptyline sur les GJ et les HC Cx43 chez le rat. Ceci va à l'encontre de l'augmentation du couplage décrite avec cet antidépresseur TCA, dans le même modèle de culture d'astrocytes corticaux de rats (Morioka et al., 2014). Cependant, dans cet article la dose et la durée de traitement sont plus élevées et n'ont pas été utilisées dans notre approche, en raison des modifications morphologiques des astrocytes que cela induisait, rendant complexe la comparaison avec nos travaux.

De plus, nos travaux *in vitro* démontrent un effet inhibiteur de l'amitriptyline tant sur les GJ que sur les HC retrouvé chez deux espèces, puisqu'ils confirment ce qui a été précédemment obtenu chez la souris. Ceci renforce la fiabilité de ces résultats. En outre, cela infirme l'hypothèse d'une disparité de l'effet des antidépresseurs sur les fonctions de la Cx43 entre le rat et la souris, supposée par la divergence des résultats entre notre première étude et la littérature (du moins pour l'amitriptyline).

La combinaison réalisée entre l'amitriptyline et la méfloquine entraîne une synergie sur l'inhibition du couplage astrocytaire. Cette

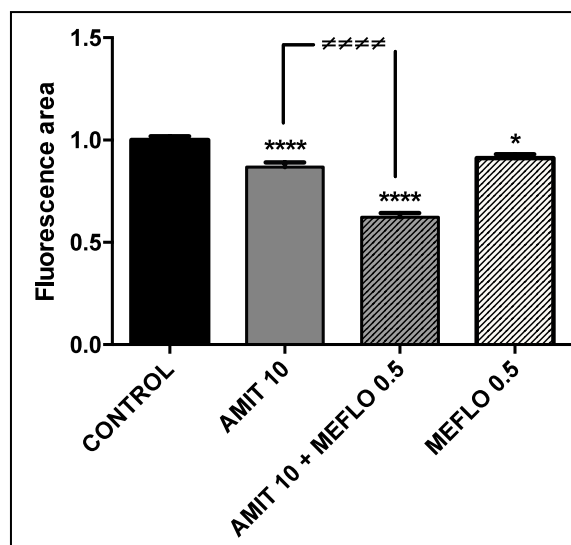


Figure 35 : Etude du couplage dans un modèle de culture d'astrocytes corticaux chez la souris. Les molécules (amitriptyline, méfloquine) ont été administrées 24 heures dans le milieu de culture. Le couplage a été quantifié par scrape loading. Les données sont présentées comme des moyennes \pm SEM, n=3 par condition. *p<0,05; ****p<0,0001 versus control, #####p<0,0001 versus Amit 10, one-way ANOVA Bonferroni post test.

observation est également retrouvée chez la souris (Figure 35). L'absence de potentialisation pour l'inhibition des HC Cx43 peut s'expliquer par une action de la méfloquine et de l'amitriptyline sur des cibles communes.

Par ailleurs, la synergie observée au niveau du couplage astrocytaire est corrélée à une potentialisation par la méfloquine de l'effet antinociceptif de l'amitriptyline *in vivo*.

2. Les GJ Cx43 semblent participer à l'effet antinociceptif de l'amitriptyline et être impliquées dans le maintien des douleurs neuropathiques périphériques.

La méfloquine entraîne une potentialisation de l'effet anti-hyperalgésique de l'amitriptyline chez le rat, dans notre modèle de lésion du nerf sciatique. Ceci peut être lié au renforcement de l'inhibition des GJ Cx43 par la combinaison des deux molécules. Par conséquent, ces travaux sous entendent l'implication du couplage astrocytaire dans la réponse antinociceptive de l'antidépresseur TCA. Les GJ Cx43 participent à la réactivité astrocytaire par la mise en place de vagues calciques (Giaume and Venance, 1998) qui induisent notamment la libération de glutamate par les astrocytes (Parpura et al., 1994; Innocenti et al., 2000), neurotransmetteur responsable de l'excitabilité des neurones nociceptifs dans la pathologie des douleurs neuropathiques (Larsson and Broman, 2011). Le renforcement de l'effet inhibiteur de l'amitriptyline sur le couplage astrocytaire, va ainsi dans le sens d'une amélioration de son action antinociceptive.

De plus, les GJ Cx43 n'ayant jamais été étudiées dans les douleurs neuropathiques, notre étude apporte un premier résultat en faveur de leur rôle dans cette pathologie. En outre, *in vivo* l'effet potentialisateur de la méfloquine, sur la réduction de l'hyperalgésie, apparaît significatif seulement à partir du 6^{ème} jour de traitement soit trois semaines après la lésion, et est renforcé dans les derniers jours de traitement. Ceci sous-entend une implication des GJ Cx43 dans le maintien des douleurs neuropathiques plus que dans leur induction. Ces résultats sont en accord avec le rôle des HC Cx43 démontrés également dans le maintien de ces douleurs, dans le même modèle de lésion du nerf sciatique (Chen et al., 2014).

Par ailleurs, il est important de préciser que nos travaux concernent uniquement les GJ Cx43 d'astrocytes corticaux. Cependant, les résultats obtenus dans le test de test de Randall & Selitto démontrent une potentialisation de l'effet de l'amitriptyline au niveau spinal (retrait) et supraspinal (vocalisation). Il est ainsi possible que l'amitriptyline et la méfloquine agissent également sur le couplage des astrocytes de la moelle épinière.

3. Vers une étude clinique

Ces travaux sont en faveur de la stratégie proposée par Theranexus, reposant sur des combinaisons entre psychotropes et modulateurs de connexines, déjà validée dans la narcolepsie par des études chez la souris (Duchêne et al., 2016). Ils apportent ainsi une seconde validation de cette approche thérapeutique, cette fois-ci dans l'indication des douleurs neuropathiques.

Par ailleurs, l'action observée au niveau comportemental ne résulte pas d'un effet de la méfloquine sur le métabolisme de l'amitriptyline, comme le rapportent les résultats de l'étude pharmacocinétique. Ceci conforte l'idée d'une synergie entre les deux molécules et nous a permis de parler ici de travaux novateurs présentant un réel intérêt dans la perspective thérapeutique des douleurs neuropathiques. Cette combinaison innovante a fait l'objet d'une demande internationale de brevet par Theranexus.

La potentialisation de l'amitriptyline par la méfloquine a par la suite été confirmée par l'équipe de Michel Barrot à Strasbourg, dans un modèle de souris ayant eu une compression du nerf sciatique ("Cuff model", Yalcin et al., 2014). Afin de poursuivre cette étude et de valider l'intérêt de la combinaison chez le patient atteint de douleurs neuropathiques, des essais cliniques pourraient être envisagés par Theranexus.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE

Afin de répondre aux besoins insatisfaits par les antidépresseurs dans le traitement des douleurs neuropathiques, ce travail de thèse s'est axé sur une cible protéique astrocytaire récemment impliquée dans leur action ainsi que dans cette pathologie : la Cx43. Les objectifs de la thèse ont été d'une part de préciser le lien entre les antidépresseurs et la Cx43 et d'autre part d'étudier *in vivo* la modulation de la Cx43 sur la réponse antinociceptive de l'amitriptyline. Ces travaux ont été réalisés au Collège-de-France et à la Pitié Salpêtrière, en collaboration avec la start-up Theranexus.

I. Implication de la Cx43 astrocytaire dans le mécanisme d'action des antidépresseurs

I.1. Modulation des HC et GJ Cx43 par les antidépresseurs

Nos travaux *in vitro* ont permis de préciser l'action des antidépresseurs sur la Cx43 astrocytaire, chez la souris, en démontrant l'effet inhibiteur de l'ensemble de ces molécules sur les HC Cx43 et leur effet hétérogène sur l'activité des GJ Cx43. En outre, l'action des antidépresseurs sur le couplage astrocytaire n'apparaît pas spécifique d'une classe thérapeutique mais s'avère variable d'une molécule à l'autre. De plus, certaines des molécules testées présentent des effets opposés sur les HC et les GJ Cx43, comme la paroxétine qui augmente le couplage des astrocytes corticaux en culture et inhibe l'activité des HC. Ceci démontre une dualité d'effets opposés, qui a déjà été décrite pour des conditions inflammatoires (Rétamal et al., 2007). L'expression de la Cx43 a quant à elle été inchangée dans notre modèle de culture d'astrocytes suite au traitement par des antidépresseurs de 4 classes différentes. L'ensemble de ces données démontre donc un lien plus complexe entre la Cx43 et les antidépresseurs qu'une modulation uniquement positive de cette protéine, suggérée par les études de la littérature réalisées tant sur l'expression (Fatemi et al., 2008; Sun et al., 2012; Mostafavi et al., 2014; Morioka et al., 2014) que sur le couplage (Morioka et al., 2014) au niveau du cortex chez le rat.

De plus, nos travaux ne confirment pas l'hypothèse d'une disparité d'effets des antidépresseurs, entre les régions cérébrales pour l'expression de la Cx43 et entre les espèces pour l'étude des fonctions de la Cx43. En effet, nous retrouvons des résultats identiques à ceux obtenus au niveau de l'hippocampe chez la souris, pour l'étude de

l'expression de la Cx43 (Quesseveur et al., 2015) et notre étude de l'amitriptyline sur les fonctions de la Cx43 a conduit aux mêmes observations chez la souris et le rat.

I.2. Une réduction des canaux de Cx43 dans le sens de l'action antinociceptive des antidépresseurs

Plus précisément dans le contexte des douleurs neuropathiques, pathologie ciblée par nos travaux, les trois antidépresseurs couramment prescrits dans cette indication présentent des effets en faveur de leur action antinociceptive. En effet, l'amitriptyline et la venlafaxine s'avèrent toutes deux inhibitrices des HC et des GJ Cx43, la duloxétine présente quant à elle une inhibition totale de l'activité des HC Cx43. En inhibant l'ouverture des HC Cx43, impliquée dans les douleurs neuropathiques (Huang et al., 2012), ces molécules réduiraient la libération d'ATP et de glutamate responsables respectivement de l'activation gliale (Baroja-Mazo et al., 2013) et neuronale (Froger et al., 2010). La réduction des GJ Cx43 sous-entend quant à elle une inhibition des vagues calciques et donc de la réactivité astrocytaire (Giaume and Venance, 1998) et limite la libération associée de molécules pronociceptives telles que le glutamate (Parpura et al., 1994; Innocenti et al., 2000). Notre étude démontre donc que les astrocytes, par l'expression de la Cx43, ne sont pas impliqués uniquement dans les mécanismes qui sous-tendent la pathologie des douleurs neuropathiques, mais qu'ils peuvent également participer à l'action antinociceptive des antidépresseurs.

De plus, étudier la glie et plus précisément ici des protéines astrocytaires, ouvre le champ des connaissances sur le mécanisme d'action des antidépresseurs, au-delà des systèmes de neurotransmission. Ceci pourrait notamment permettre de mieux cerner leurs effets indésirables ou leur manque d'efficacité, ainsi que de comprendre la tolérance des patients à certaines molécules, tel que cela a été décrit pour la morphine. Une étude récente rapporte l'augmentation de la Cx43 induite au niveau spinal par la morphine, qui participerait à la réduction de ses effets antinociceptifs, entraînant sa tolérance par le patient lors d'une administration prolongée (Shen et al., 2014).

L'inhibition des canaux de Cx43, qui semble pouvoir être impliquée dans l'action antinociceptive des antidépresseurs, pourrait résulter d'une action directe ou indirecte de ces molécules. A ce titre, différentes hypothèses mécanistiques peuvent être envisagées.

I.3. Hypothèses de l'inhibition des canaux de Cx43 par les antidépresseurs

I.3.1. Action directe

Tout d'abord, il est possible que les antidépresseurs agissent directement sur la Cx43. Notamment, ils pourraient agir sur la phosphorylation de cette protéine, impliquée dans la modulation de son activité (Nielsen et al., 2012). Toutefois, dans notre étude *in vitro* l'expression de même que le niveau de phosphorylation de la Cx43 se sont avérés inchangés suite au traitement par les antidépresseurs, ce qui n'est pas en faveur de cette hypothèse.

Plus largement dans la littérature, certains inhibiteurs de connexines sont décrits comme ayant une action directe sur les canaux de Cx43, comme l'acide flufénamique. Cependant, pour la majorité de ces inhibiteurs, dont le carbenoxolone couramment utilisé (pas dans notre étude, son passage de la barrière hémato-encéphalique n'étant pas clairement établi), il réside une incertitude sur leur mode d'action, direct ou indirect (Verselis and Srinivas, 2013). Connaître la cinétique d'inhibition des antidépresseurs sur le blocage des canaux de Cx43 pourrait permettre de davantage caractériser leur action. En effet, un blocage rapide des GJ et des HC est en faveur d'une action directe, alors qu'un temps d'action plus long sous-entend des mécanismes indirects tel que le couplage avec des molécules intermédiaires au niveau du cytoplasme.

De plus, un autre critère permettant de préciser leur action sur la Cx43 est l'étude de leur sélectivité. Il est possible que les antidépresseurs agissent sur d'autres connexines, telle que sur la Cx30 participant à la formation des GJ astrocytaires. De plus, ils peuvent agir sur les HC formés par la pannexine 1 (Px1), protéine astrocytaire également impliquée dans la pathologie des douleurs neuropathiques (Bravo et al., 2015). L'inhibition des HC Px1 pourrait, de même que les HC Cx43, participer à la réduction des douleurs neuropathiques par une libération réduite d'ATP et de glutamate. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'effet des antidépresseurs sur ces autres cibles astrocytaires.

Par ailleurs, différentes études tant *in vitro* qu'*in vivo* suggèrent l'inhibition indirecte des HC et GJ Cx43 par les antidépresseurs *via* différentes molécules et circuits de signalisation, tous impliqués dans la pathologie des douleurs neuropathiques. On retrouve notamment le glutamate, principal neurotransmetteur induisant l'activation des neurones nociceptifs (Larsson and Broman, 2011) et l'activation astrocytaire impliquant

les récepteurs purinergiques, qui participe à l'induction et au maintien des douleurs neuropathiques (Farquhar-Smith, 2007).

I.3.2. Action indirecte

I.3.2.1. L'ATP et la réactivité astrocytaire

L'ouverture des HC Cx43 implique une situation pathologique, ces canaux étant majoritairement fermés en condition basale. Parmi les facteurs induisant l'activité des HC Cx43, on retrouve l'augmentation calcique intracellulaire des astrocytes réactifs (Giaume and Theis, 2010). En outre, les HC Cx43 étant perméables au calcium, leur ouverture participe en retour à cette augmentation calcique, créant un cycle incessant d'activation (Giaume et al., 2013).

L'ATP, libéré notamment par les astrocytes réactifs, conduit également à leur augmentation calcique intracellulaire en se fixant à ses récepteurs membranaires (Baroja-Mazo et al., 2013). Les antidépresseurs pourraient ainsi limiter l'ouverture des HC Cx43 par l'inhibition des récepteurs purinergiques astrocytaires, de même que cela a été démontré *in vitro* pour d'autres types cellulaires. En effet, au niveau cérébral l'inhibition des récepteurs microgliaux P2X4 a été démontrée par plusieurs antidépresseurs dont la fluoxétine et la paroxétine (Nagata et al., 2009) et l'imipramine a démontrée une action inhibitrice des récepteurs neuronaux P2X2 (Koizumi et al., 1998). Il est par ailleurs possible que les antidépresseurs exercent une action *in vivo* sur ces récepteurs microgliaux et neuronaux et de fait, en réduisant l'activation de ces cibles cellulaires, entraînent par conséquent la réduction de l'activation astrocytaire. Ceci pourrait s'appliquer à la pathologie des douleurs neuropathiques, dans laquelle la microglie et les neurones présynaptiques sont impliqués dans l'activation des astrocytes (Mika et al., 2013).

De plus, la réduction de l'expression de la GFAP par des antidépresseurs tricycliques a été décrite dans un modèle de culture d'astrocytes corticaux chez la souris (Cho et al., 2010). C'est dans ce même modèle que nous avons montré l'inhibition des HC Cx43 par les antidépresseurs. Ceci est donc en faveur d'une diminution de la réactivité astrocytaire par les antidépresseurs, qui de fait limiterait l'ouverture de ces HC.

I.3.2.2. Les interleukines proinflammatoires

Dans notre modèle *in vitro*, l'ouverture des HC Cx43 est induite par le LPS qui entraîne l'activation de cellules microgliales et la libération associée des interleukines IL-1 β et TNF- α . Toutes deux ont été décrites comme activatrices des HC Cx43 (Retamal et al., 2007). Or, des études en culture décrivent un effet inhibiteur des antidépresseurs sur IL-1 β et TNF- α dans le cortex (Lee et al., 2012 ; Liu et al., 2014) et l'hippocampe (Chiou et al., 2006). L'inhibition de TNF- α par les antidépresseurs n'a pas été retrouvée dans nos cultures d'astrocytes corticaux, cependant la variabilité des modèles cellulaires utilisés (microgliales et neuronales *versus* astrocytaires) peut être à l'origine de ces divergences. Par ailleurs, un article décrit la réduction de l'activation microgliale au niveau spinal par la fluoxétine et la venlafaxine, chez le rat neuropathique (Zychowska et al., 2015). Ainsi, il est possible que les antidépresseurs exercent *in vitro* et *in vivo* une action inhibitrice sur la microglie et les interleukines proinflammatoires, induisant secondairement la réduction de l'ouverture des HC Cx43.

I.3.2.3. Le glutamate

Le glutamate et des agonistes de ses récepteurs ont été décrits comme activateur des GJ et HC astrocytaires, au niveau cérébral dans des modèles de culture cellulaires (Giaume et al., 2010; Orellana et al., 2013). Or, une étude *in vivo* a démontré l'implication de la fluoxétine dans le transport du glutamate astrocytaire au niveau du cortex et de l'hippocampe, conduisant de fait à la réduction de sa concentration extracellulaire (Zink et al., 2011). Les antidépresseurs pourraient donc inhiber *in vitro* et *in vivo* l'activité des canaux de Cx43 en agissant sur le glutamate. Ce dernier est notamment davantage libéré par les neurones présynaptiques et les astrocytes dans la pathologie des douleurs neuropathiques (Larsson and Broman, 2011).

I.3.2.4. Les monoamines

Par ailleurs, en plus des hypothèses énoncées ci-dessus qui s'appliquent directement à notre modèle de culture d'astrocytes, les monoamines libérées *in vivo* par les neurones présynaptiques pourraient être impliquées et participer aux résultats comportementaux présentés dans ce travail.

Le mécanisme d'action principal des antidépresseurs repose sur l'inhibition de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, conduisant à l'augmentation de leur

concentration extracellulaire. Ces monoamines participent notamment à la réduction des douleurs neuropathiques (Zhuo and Gebhart, 1997; Campbell and Meyer, 2006). Or, des articles ont démontré *in vitro* la réduction des GJ Cx43 en présence de sérotonine (Blomstrand et al., 1999) et de noradrénaline (Giaume et al., 1991b) dans des modèles d'astrocytes en culture, provenant respectivement du cortex ainsi que de l'hippocampe et du striatum. Ainsi, par leur action sur les monoamines, les antidépresseurs pourraient de fait *in vivo* inhiber la fonction GJ de la Cx43.

L'ensemble de ces études est donc en faveur de la réduction indirecte des canaux de Cx43 par les antidépresseurs, *via* différentes cibles moléculaires qui s'avèrent de plus impliquées dans les douleurs neuropathiques (Figure 36).

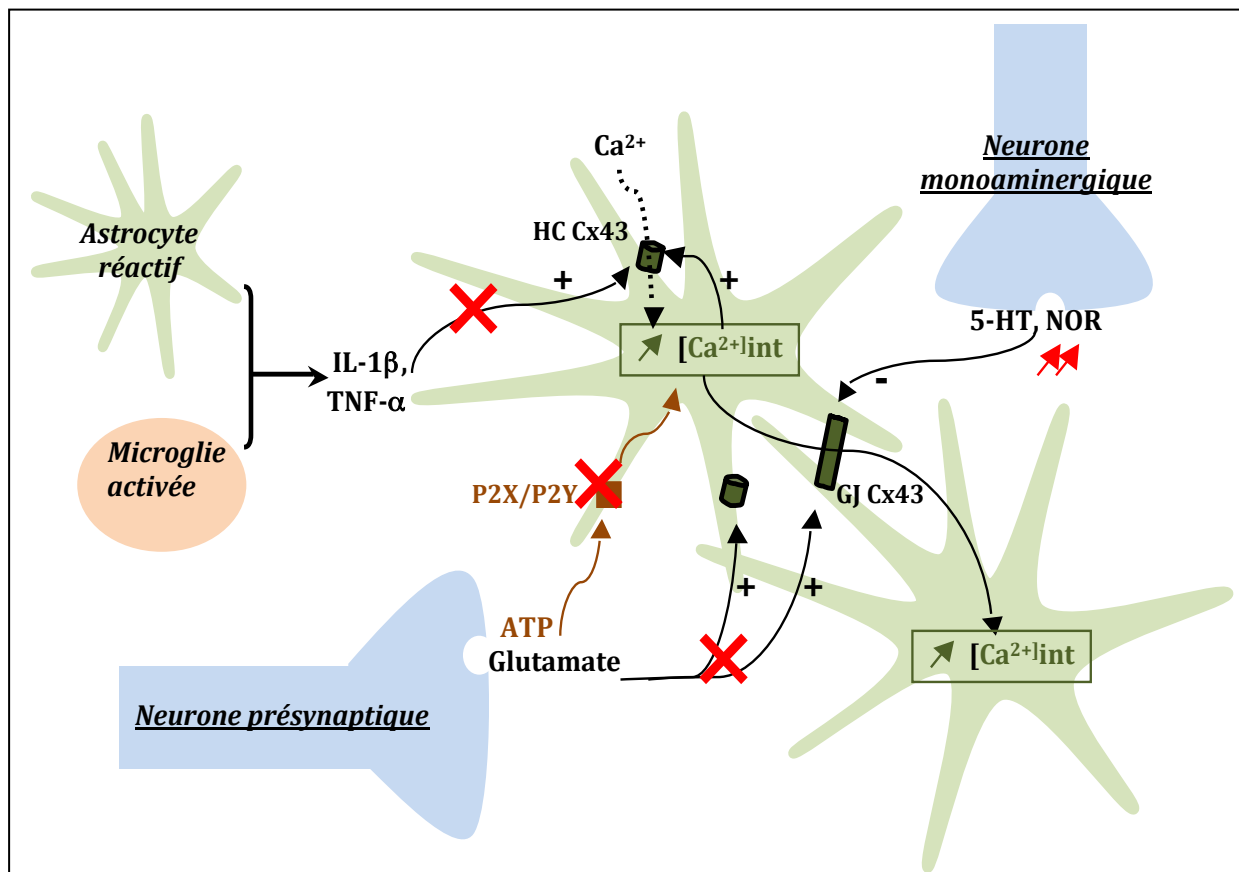


Figure 36 : Hypothèses de l'action des antidépresseurs sur les canaux de Cx43 dans le contexte pathologique des douleurs neuropathiques. (X = action inhibitrice, \blacktriangleright = potentialisation).

Il faut cependant noter que ces études ont presque tous été réalisées au niveau du cerveau (cortex, hippocampe, striatum). Pour l'étude de l'action des antidépresseurs dans les douleurs neuropathiques, il serait intéressant de réaliser ces travaux dans la moelle épinière, tissu classiquement étudié dans cette pathologie. En effet, c'est au niveau spinal

que s'établit le relais de l'information nociceptive entre les neurones de premier et de second ordre et c'est la première région centrale impliquée lors d'une lésion nerveuse.

Toutefois, si peu d'études rapportent l'effet des antidépresseurs dans la moelle épinière, nos travaux ont suggéré un lien entre les GJ Cx43 corticales et l'action antinociceptive de l'amitriptyline au niveau spinal, comme discuté dans la partie suivante.

II. Validation de la Cx43 astrocytaire comme cible thérapeutique permettant d'améliorer l'effet antinociceptif des antidépresseurs

II.1. Implication des GJ Cx43 corticales dans la réponse pharmacologique de l'amitriptyline

Nos travaux réalisés *in vitro* dans un modèle de culture d'astrocytes corticaux chez le rat et *in vivo* chez des rats lésés au niveau du nerf sciatique, ont respectivement démontré que la méfloquine, décrit comme bloqueur des GJ Cx43 dans la littérature (Cruikshank et al., 2004), et l'amitriptyline agissent de façon synergique sur l'inhibition des GJ Cx43 et que cela pourrait être corrélé à la potentialisation de l'effet anti-hyperalgésique de l'amitriptyline.

Ces travaux sous-entendent deux points novateurs. Tout d'abord, l'implication des GJ Cx43 astrocytaires dans les douleurs neuropathiques. Si le couplage astrocytaire n'est pas spécifiquement étudié chez les rats lésés dans notre étude, cette dernière est toutefois en faveur du rôle des GJ Cx43 dans la réponse antinociceptive de l'amitriptyline et suggère de fait leur activité dans la pathologie des douleurs neuropathiques. De plus, l'inhibition renforcée des GJ Cx43 corticales pourrait être associée à une potentialisation de l'effet anti-hyperalgésique de l'amitriptyline retrouvée pour le retrait de la patte (réponse spinale) et la vocalisation (réponse supraspinale) de l'animal. Ceci indique donc que si l'action des antidépresseurs a uniquement été étudiée au niveau des Cx43 cérébrales, dans notre étude et dans la littérature, les conséquences de la modulation de cette protéine ne seraient pas spécifiques de ces tissus pour la réponse antinociceptive des antidépresseurs. Nos travaux suggèrent également la possibilité d'une action synergique de l'amitriptyline et de la méfloquine sur les Cx43 au niveau de la moelle épinière.

Ceci renforce donc l'intérêt d'étudier l'action des antidépresseurs sur les Cx43 spinales. De même, étant donné que les études de la Cx43 ont uniquement été réalisées au niveau

de la moelle épinière dans les modèles précliniques de douleurs neuropathiques, il serait intéressant de pouvoir réaliser ces travaux au niveau du cortex.

II.2. Autres cibles d'action potentielles de la méfloquine

La potentialisation de l'action antinociceptive de l'amitriptyline semble résulter d'une synergie sur l'inhibition de l'activité des GJ Cx43, cependant d'autres cibles pourraient également être impliquées.

Tout d'abord, l'action de la méfloquine est décrite principalement sur la Cx36 et la Cx50 pour lesquelles elle a une forte sélectivité (Cruikshank et al., 2004), son action sur la Cx43 a été davantage précisée par la suite (Picoli et al., 2012). Nous montrons ici que la méfloquine est efficace à dose beaucoup plus faible sur la Cx43 que celles présentées dans Cruikshank et al., potentiellement en raison de modèles expérimentaux différents. Un article récent démontre que la micro-injection de méfloquine au niveau du cortex cingulaire antérieure induit une action antinociceptive chez le rat lésé au niveau du nerf sciatique, résultant de l'inhibition de la Cx36 (Chen et al., 2016). Ainsi, en agissant sur cette protéine au niveau cérébral, la méfloquine peut participer à l'action anti-hyperalgésique de l'amitriptyline. De plus, de même qu'elle agit sur le couplage médié par la Cx43, il est possible que la méfloquine exerce une action inhibitrice sur les GJ Cx30 astrocytaires et non exclusivement sur celles formées par la Cx43. En outre, la méfloquine inhibe les HC formés par la Px1 à doses faibles, proches de celles utilisées dans notre étude (Iglesias et al., 2009). Cette action inhibitrice sur les HC Px1, impliqués dans les douleurs neuropathiques, pourrait de fait renforcer l'effet antinociceptif de l'amitriptyline. Ainsi, si cet antidépresseur n'a pas d'action décrite dans la littérature sur ces différentes cibles (Cx36, Cx30, Px1), il n'est pas exclu qu'elles participent à son effet anti-hyperalgésique et que cela soit ici potentialisé par la méfloquine.

Par ailleurs, la méfloquine peut se fixer sur les récepteurs et transporteurs neuronaux de la sérotonine et noradrénaline (Mico et al., 2011). Toutefois, aux doses utilisées dans notre étude, son affinité pour ces cibles neuronales s'avère très faible (Janowsky et al., 2014). Ceci suggère donc que les effets pharmacologiques observés ne résulteraient pas d'une modulation directe de ces voies.

Si le rôle de la méfloquine doit être précisé, combiner les antidépresseurs avec des inhibiteurs de la Cx43 semble ouvrir de nouvelles perspectives dans le traitement des douleurs neuropathiques.

III. Combinaison d'un acteur neuronal avec un acteur glial, une approche thérapeutique innovante

Le rôle des astrocytes est aujourd'hui communément admis dans la pathologie des douleurs neuropathiques, cependant l'utilisation de modulateurs gliaux n'a pas encore donné de preuves concrètes dans les études cliniques impliquant des patients neuropathiques. Par exemple, l'administration de propentofylline n'a pas entraîné de réduction de la douleur chez des patients atteints de douleurs neuropathiques post-herpétiques (Ren and Dubner, 2016). Exerçant une action inhibitrice sur la phosphodiesterase, la propentofylline a démontré des effets anti-inflammatoires et antiprolifératifs *in vitro* et *in vivo* qui résulteraient notamment d'une action directe sur la glie, limitant sa réactivité et la libération de facteurs proinflammatoires (Sweitzer and De Leo, 2011). Ainsi, viser la modulation de la glie non pas uniquement comme traitement à part entière mais comme moyen de renforcer l'efficacité des traitements utilisés, présente un réel intérêt thérapeutique et innovant dans les douleurs neuropathiques.

En outre, en démontrant l'intérêt thérapeutique de combinaisons entre psychotropes et modulateurs de connexines, notre étude valide la stratégie de Theranexus dans une seconde pathologie, la première étant la narcolepsie (Duchêne et al., 2016). Ces études combinatoires proposées par la start-up offrent l'avantage d'utiliser des molécules déjà enregistrées auprès des autorités réglementaires, réduisant le délai de recherche et développement et limitant de fait les risques de toxicité rencontrés par les nouvelles molécules en voie de développement. Ainsi, l'étude clinique de la combinaison amitriptyline + méfloquine, identifiée grâce à nos travaux précliniques chez le rat et à ceux de Michel Barrot chez la souris (INCI, Strasbourg), en sera d'autant plus facilitée et pourrait être prochainement mise en place.

Ce projet de thèse offre donc une réelle perspective thérapeutique dans la pathologie des douleurs neuropathiques. De plus, nos travaux pourraient également s'appliquer à d'autres pathologies du système nerveux central telle que la dépression ou la sclérose en plaques, dans lesquelles la Cx43 astrocytaire est impliquée (Sun et al., 2012; Almad et al., 2016) et dont les traitements incluent aussi des antidépresseurs (Sun et al., 2012; Koschnitzky et al., 2014).

PERSPECTIVES

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse reposent sur des études *in vitro* et sur un modèle préclinique de douleurs neuropathiques, impliquant respectivement des cultures d'astrocytes corticaux et la lésion du nerf sciatique. Ces outils ont permis d'obtenir des résultats robustes, confirmés chez le rat et la souris, qui ont fait l'objet de deux publications et d'un dépôt de brevet en 2015. Afin de les compléter et de préciser davantage les conclusions de ces travaux, différentes expériences peuvent être envisagées.

I. Etudes *in vitro* et *ex vivo*

I.1. Etude du couplage astrocytaire chez des animaux neuropathiques

Etant donnée l'implication des GJ Cx43 dans la réponse anti-hyperalgésique de l'amitriptyline et l'absence de données rapportant leur étude dans les douleurs neuropathiques, il semble intéressant de pouvoir évaluer le couplage astrocytaire dans cette indication. De même que cela a été réalisé dans les ganglions de la corne dorsale de la moelle épinière dans des modèles de douleurs inflammatoires (Dublin and Hanani, 2007; Huang et al., 2010), l'étude du couplage astrocytaire peut être réalisé dans ces tissus chez des animaux neuropathiques. Il semble préférable de réaliser ici une lésion au niveau périphérique pour l'étude des tissus ganglionnaires.

Pour l'étude du couplage au niveau central, le patch clamp est communément réalisé sur tranches de cortex ou d'hippocampe. Toutefois, cette technique est réalisée chez le jeune animal (3 à 5 semaines maximum) et ne pourra pas être ici utilisée pour l'étude d'animaux neuropathiques, les lésions étant réalisés chez l'adulte. Une méthode récemment mise en place au sein du laboratoire est celle du FRAP (Fluorescence Recovery After Bleaching), permettant d'étudier le couplage sur tranches chez des animaux plus âgés. Cette technique a donné récemment de bons résultats au niveau de l'hippocampe sur un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Yi et al., 2016) mais doit encore être confirmée au niveau cortical. A terme, elle pourrait permettre l'étude de la moelle ou de tissus cérébraux provenant d'animaux neuropathiques.

I.2. Confirmation de l'effet des antidépresseurs sur la Cx43

Tout d'abord, au niveau *in vitro* l'étude des antidépresseurs pourrait être complétée par des cultures de moelle épinière. Ceci permettrait d'évaluer l'effet des molécules sur

l'expression et les fonctions de la Cx43, dans un tissu majoritairement impliqué dans les douleurs neuropathiques et également de noter toute disparité d'effets entre les tissus.

De plus, afin de confirmer les résultats obtenus en culture pour l'étude des HC et des GJ Cx43, il est nécessaire d'évaluer l'effet des antidépresseurs et de la combinaison amitriptyline + méfloquine en utilisant un modèle plus intégré, comme les tranches aigües de cortex ou de moelle d'animaux naïfs. L'étude du couplage implique les techniques énoncées ci-dessus, l'étude des HC repose quant à elle sur l'incorporation de bromure d'éthidium. Par ailleurs, ces techniques offrent l'opportunité de pouvoir traiter les animaux *in vivo* avant de récupérer les tranches des tissus étudiés.

Il serait par ailleurs judicieux de compléter l'étude de la Cx43, réalisée dans cette thèse par RT-PCR suite au traitement des rats pendant 14 jours, avec une quantification protéique.

I.3. Etude de l'amitriptyline sur d'autres cibles protéiques

Il serait intéressant d'évaluer l'action de l'amitriptyline, seule et en combinaison avec la méfloquine, sur d'autres connexines dont la Cx30 astrocytaire et la Cx36 neuronale ainsi que sur la Px1, qui peuvent être des cibles impliquées dans son action antinociceptive. Pour ce faire, des outils de culture cellulaire peuvent être réalisés pour étudier les connexines, en les exprimant dans des lignées cellulaires dépourvues de Cxs endogènes (telles que les cellules d'insulinome de rat, RIN, n'exprimant pas de Cx fonctionnelles) ou de Px fonctionnelles. De plus, des quantifications par western blot ou RT-PCR pourront être réalisées dans différents tissus tels que les ganglions, la moelle épinière et le cortex, provenant d'animaux traités.

L'étude du couplage astrocytaire pourra être réalisé en tranches sur des souris Cx43 KO, permettant d'évaluer l'impact de l'amitriptyline sur les GJ Cx30.

II. Etudes *in vivo*

II.1. Validation de la modulation de la Cx43 par l'amitriptyline et la méfloquine

Il n'existe pas à ce jour de méthode validée pour quantifier la fonction des connexines, et encore moins de la Cx43, directement chez l'animal. Des articles récents proposent cependant l'utilisation de la sulforhodamine B, administrée par voie systémique, comme marqueur des astrocytes capable de diffuser via les jonctions gap (Appaix et al., 2012; Hill

et al., 2014). La quantification de la zone marquée par ce fluorochrome serait ainsi directement corrélée à la fonction moyenne des connexines astrocytaires. Une telle méthode, lourde techniquement parlant car nécessitant l'utilisation de microscopes biphotoniques sur animaux vigiles, pourrait être une manière innovante de démontrer que l'amitriptyline (mais également la méfloquine) module, *in vivo*, les connexines astrocytaires. L'utilisation de souris KO pour la Cx30 permettrait également de le démontrer spécifiquement sur la Cx43. Ces études constitueraient la validation de l'implication des connexines dans l'action de l'amitriptyline et de la méfloquine, et par les deux produits associés.

II.2. Confirmation de l'implication de la Cx43 dans la réponse antinociceptive de l'amitriptyline

Il paraît intéressant d'évaluer l'effet anti-hyperalgésique de l'amitriptyline chez des souris Cx43 $-/-$ ou $+/-$ atteintes de douleurs neuropathiques. De telles études permettront de valider ou invalider l'implication de la Cx43 dans la réponse pharmacologique de l'amitriptyline. En outre, d'autres outils pourraient être employés pour inhiber la Cx43, tels que l'ARNi, afin de valider le ciblage de la Cx43 comme outil d'amélioration du profil de l'amitriptyline.

II.3. Etude de la combinaison dans des modèles précliniques variés

Afin d'avoir une représentation plus fine de l'ensemble des étiologies retrouvées en clinique, tester la combinaison dans d'autres modèles de douleurs, notamment suite à des lésions centrales, permettrait de savoir si l'effet est spécifique i) des lésions réalisées au niveau du nerf sciatique (modèle de ligature utilisé dans notre étude et modèle de compression réalisé chez Michel Barrot) ii) des modèles périphériques (tester d'autres lésions telles que celle du nerf trigéminal) iii) ou s'il s'applique aussi aux modèles centraux (tester des modèles de contusion de la moelle épinière).

II.4. Etude d'autres molécules prescrites en douleurs neuropathiques

Dans un premier temps, d'autres antidépresseurs pourraient être testés en combinaison avec la méfloquine dans le modèle de ligature du nerf sciatique, afin de savoir si son effet potentialisateur est spécifique ou non de l'amitriptyline. La duloxétine et la venlafaxine pourront par exemple être testées. De plus, il serait aussi intéressant de tester les antiépileptiques, autre classe thérapeutique majoritairement prescrite dans les douleurs

neuropathiques, afin d'évaluer l'effet de ces molécules sur la Cx43 ainsi que leur combinaison avec des modulateurs de cette connexine.

La suite de ce travail de thèse offre donc la possibilité d'un large choix d'expériences. Par ailleurs, en plus de ces travaux chez le rongeur et afin de valider la combinaison identifiée au niveau préclinique, réaliser son étude chez le patient atteint de douleurs neuropathiques (étude de phase II) fait également partie des perspectives envisagées. Ainsi, de ce travail de thèse ressort une réelle perspective thérapeutique dans la pathologie des douleurs neuropathiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Abudara, V., Roux, L., Dallérac, G., Matias, I., Dulong, J., Mothet, J.P., Rouach, N., and Giaume, C. (2015). Activated microglia impairs neuroglial interaction by opening Cx43 hemichannels in hippocampal astrocytes. *Glia* 63, 795–811.
- Adermark, L., and Lovinger, D.M. (2008). Electrophysiological properties and gap junction coupling of striatal astrocytes. *Neurochem. Int.* 52, 1365–1372.
- Afssaps (2008). Dossier thématique/traitements antidépresseurs.
- Allaman, I., Fiumelli, H., Magistretti, P.J., and Martin, J.-L. (2011). Fluoxetine regulates the expression of neurotrophic/growth factors and glucose metabolism in astrocytes. *Psychopharmacology (Berl.)* 216, 75–84.
- Almad, A.A., Doreswamy, A., Gross, S.K., Richard, J.-P., Huo, Y., Haughey, N., and Maragakis, N.J. (2016). Connexin 43 in astrocytes contributes to motor neuron toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 64, 1154–1169.
- Appaix, F., Girod, S., Boisseau, S., Römer, J., Vial, J.-C., Albrieux, M., Maurin, M., Depaulis, A., Guillemain, I., and van der Sanden, B. (2012). Specific in vivo staining of astrocytes in the whole brain after intravenous injection of sulforhodamine dyes. *PloS One* 7, e35169.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215.
- Attal, N. (2001). Les antidépresseurs et le traitement de la douleur.
- Attal, N. (2008). Douleurs neuropathiques : comment les reconnaître et les prendre en charge ?
- Attal, N. (2011). [Therapeutic advances in pharmaceutical treatment of neuropathic pain]. *Rev. Neurol. (Paris)* 167, 930–937.
- Bair, M.J., Wu, J., Damush, T.M., Sutherland, J.M., and Kroenke, K. (2008). Association of depression and anxiety alone and in combination with chronic musculoskeletal pain in primary care patients. *Psychosom. Med.* 70, 890–897.
- Bal, N., Figueras, G., Vilaró, M.T., Suñol, C., and Artigas, F. (1997). Antidepressant drugs inhibit glial 5-hydroxytryptamine transporter in rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1728–1738.
- Bardin, L. (2011). The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. *Behav. Pharmacol.* 22, 390–404.
- Baroja-Mazo, A., Barberà-Cremades, M., and Pelegrín, P. (2013). The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 79–93.
- Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neurosci.* 211 39–50.
- Basbaum, A.I. (1999). Spinal mechanisms of acute and persistent pain. *Reg. Anesth. Pain Med.* 24, 59–67.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267–284.

- Baud, P., and Mick, G. (2007). *Les douleurs neuropathiques en pratique quotidienne* (Montrouge (Hauts-de-Seine): John Libbey Eurotext).
- Beardslee, M.A., Laing, J.G., Beyer, E.C., and Saffitz, J.E. (1998). Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ. Res.* *83*, 629–635.
- Bennett, G.J., and Xie, Y.K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* *33*, 87–107.
- Bernard, J., and Villanueva, L. (2009). *Architecture fonctionnelle des systèmes nociceptifs*. Bouhassira Cavino Eds *Douleurs Physiol. Physiopathol. Pharmacol.* Paris Arnette 1–27.
- Besson, J.-M.R. (1992). *La douleur* (Paris: Ed. Odile Jacob).
- Besson, J.M., and Chaouch, A. (1987). Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol. Rev.* *67*, 67–186.
- Biella, G., Riva, L., and Sotgiu, M.L. (1997). Interaction between neurons in different laminae of the dorsal horn of the spinal cord. A correlation study in normal and neuropathic rats. *Eur. J. Neurosci.* *9*, 1017–1025.
- Blackburn-Munro, G. (2004). Pain-like behaviours in animals - how human are they? *Trends Pharmacol. Sci.* *25*, 299–305.
- Blank, T., and Prinz, M. (2013). Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. *Glia* *61*, 62–70.
- Blomstrand, F., Giaume, C., Hansson, E., and Rönnbäck, L. (1999). Distinct pharmacological properties of ET-1 and ET-3 on astroglial gap junctions and Ca(2+) signaling. *Am. J. Physiol.* *277*, C616-627.
- Bouhassira, D. (2009). *Douleurs: physiologie, physiopathologie et pharmacologie* (Rueil-Malmaison: Arnette).
- Bouhassira, D., and Attal, N. (2012). *Douleurs neuropathiques* (Rueil-Malmaison: Arnette).
- Bouhassira, D., Lantéri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B., and Touboul, C. (2008). Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* *136*, 380–387.
- Bouzier-Sore, A.-K., and Pellerin, L. (2013). Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Front. Cell. Neurosci.* *7*, 179.
- Brasseur, L. (2010). *Douleurs: thérapeutiques invasives* (Rueil-Malmaison: Arnette).
- Bravo, D., Maturana, C.J., Pelissier, T., Hernández, A., and Constandil, L. (2015). Interactions of pannexin 1 with NMDA and P2X7 receptors in central nervous system pathologies: Possible role on chronic pain. *Pharmacol. Res.* *101*, 86–93.
- Breivik, H., Borchgrevink, P.C., Allen, S.M., Rosseland, L.A., Romundstad, L., Hals, E.K.B., Kvarstein, G., and Stubhaug, A. (2008). Assessment of pain. *Br. J. Anaesth.* *101*, 17–24.
- Calvino, B. (2006). Douleur et canaux ioniques. *Douleurs Eval. - Diagn. - Trait.* *7*, 23–27.
- Campbell, J.N., and Meyer, R.A. (2006). Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* *52*, 77–92.
- Caterina, M.J., and Julius, D. (1999). Sense and specificity: a molecular identity for nociceptors. *Curr.*

Opin. Neurobiol. 9, 525–530.

Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., and Yaksh, T.L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* 53, 55–63.

Chen, G., Park, C.-K., Xie, R.-G., Berta, T., Nedergaard, M., and Ji, R.-R. (2014). Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice. *Brain J. Neurol.* 137, 2193–2209.

Chen, M.J., Kress, B., Han, X., Moll, K., Peng, W., Ji, R.-R., and Nedergaard, M. (2012). Astrocytic CX43 hemichannels and gap junctions play a crucial role in development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Glia* 60, 1660–1670.

Chen, Z.-Y., Shen, F.-Y., Jiang, L., Zhao, X., Shen, X.-L., Zhong, W., Liu, S., Wang, Z.-R., and Wang, Y.-W. (2016). Attenuation of Neuropathic Pain by Inhibiting Electrical Synapses in the Anterior Cingulate Cortex. *Anesthesiology* 124, 169–183.

Chiou, S.-H., Chen, S.-J., Peng, C.-H., Chang, Y.-L., Ku, H.-H., Hsu, W.-M., Ho, L.L.-T., and Lee, C.-H. (2006). Fluoxetine up-regulates expression of cellular FLICE-inhibitory protein and inhibits LPS-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343, 391–400.

Cho, W., Brenner, M., Peters, N., and Messing, A. (2010). Drug screening to identify suppressors of GFAP expression. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3169–3178.

Cina, C., Maass, K., Theis, M., Willecke, K., Bechberger, J.F., and Naus, C.C. (2009). Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin43 in neuronal migration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 2009–2021.

Clarac, F., and Ternaux, J.-P. (2008). *Encyclopédie historique des neurosciences: du neurone à l'émergence de la pensée* (Bruxelles: De Boeck Université).

Claverie, B. (1992). *Douleurs: sociétés, personne et expressions* (Paris: Editions Eshel).

Corruble, E. (2013). *Les antidépresseurs*.

Cousin, M.-T. (2005). *L'anesthésie-réanimation en France. Des origines à 1965 Tome II, Tome II*, (Paris: Harmattan).

CPAM (2015). <http://www.forumpsy.net/t885-statistiques-des-consommations-d-antidepresseurs-en-france-2008-2013>.

Crane, G.E. (1957). Iproniazid (marsilid) phosphate, a therapeutic agent for mental disorders and debilitating diseases. *Psychiatr. Res. Rep. Am. Psychiatr. Assoc.* 8, 142–152.

Croom, K.F., Perry, C.M., and Plosker, G.L. (2009). Mirtazapine: a review of its use in major depression and other psychiatric disorders. *CNS Drugs* 23, 427–452.

Cruikshank, S.J., Hopperstad, M., Younger, M., Connors, B.W., Spray, D.C., and Srinivas, M. (2004). Potent block of Cx36 and Cx50 gap junction channels by mefloquine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12364–12369.

Czéh, B., and Di Benedetto, B. (2013). Antidepressants act directly on astrocytes: evidences and functional consequences. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 23, 171–

- Czéh, B., Simon, M., Schmelting, B., Hiemke, C., and Fuchs, E. (2006). Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *31*, 1616–1626.
- Datamonitor (2011). Pipeline and commercial insight: Neuropathic pain.
- Davies, H.T., Crombie, I.K., and Macrae, W.A. (1994). Why use a pain clinic? Management of neurogenic pain before and after referral. *J. R. Soc. Med.* *87*, 382–385.
- DeLeo, J.A., Rutkowski, M.D., Stalder, A.K., and Campbell, I.L. (2000). Transgenic expression of TNF by astrocytes increases mechanical allodynia in a mouse neuropathy model. *Neuroreport* *11*, 599–602.
- Demyttenaere, K., Bonnewyn, A., Bruffaerts, R., Brugha, T., De Graaf, R., and Alonso, J. (2006). Comorbid painful physical symptoms and depression: prevalence, work loss, and help seeking. *J. Affect. Disord.* *92*, 185–193.
- Descartes, R., and Bridoux, A. (1999). *Œuvres et lettres* (Paris: Gallimard).
- Di Benedetto, B., Kühn, R., Nothdurfter, C., Rein, T., Wurst, W., and Rupprecht, R. (2012). N-desalkylquetiapine activates ERK1/2 to induce GDNF release in C6 glioma cells: a putative cellular mechanism for quetiapine as antidepressant. *Neuropharmacology* *62*, 209–216.
- Dublin, P., and Hanani, M. (2007). Satellite glial cells in sensory ganglia: their possible contribution to inflammatory pain. *Brain. Behav. Immun.* *21*, 592–598.
- Duchêne, A., Perier, M., Zhao, Y., Liu, X., Thomasson, J., Chauveau, F., Piérard, C., Lagarde, D., Picoli, C., Jeanson, T., et al. (2016). Impact of Astroglial Connexins on Modafinil Pharmacological Properties. *Sleep* *39*, 1283–1292.
- Duffy, H.S., Ashton, A.W., O'Donnell, P., Coombs, W., Taffet, S.M., Delmar, M., and Spray, D.C. (2004). Regulation of connexin43 protein complexes by intracellular acidification. *Circ. Res.* *94*, 215–222.
- Duman, C.H. (2010). Models of Depression. In *Vitamins & Hormones*, (Elsevier), pp. 1–21.
- Dykes, R.W., Avendaño, C., and Leclerc, S.S. (1995). Evolution of cortical responsiveness subsequent to multiple forelimb nerve transections: an electrophysiological study in adult cat somatosensory cortex. *J. Comp. Neurol.* *354*, 333–344.
- Elias, L.A.B., Wang, D.D., and Kriegstein, A.R. (2007). Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* *448*, 901–907.
- Eroglu, C., and Barres, B.A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* *468*, 223–231.
- Eugenin, E.A., Basilio, D., Sáez, J.C., Orellana, J.A., Raine, C.S., Bukauskas, F., Bennett, M.V.L., and Berman, J.W. (2012). The role of gap junction channels during physiologic and pathologic conditions of the human central nervous system. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* *7*, 499–518.
- Farquhar-Smith, W. (2007). Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesth. Intensive Care Med.* *91*.

- Fatemi, S.H., Folsom, T.D., Reutiman, T.J., and Lee, S. (2008). Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects with autism. *Synap. N. Y. N* 62, 501–507.
- Finnerup, N.B., Attal, N., Haroutounian, S., McNicol, E., Baron, R., Dworkin, R.H., Gilron, I., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T.S., et al. (2015). Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 14, 162–173.
- Fix, J.D. (2006). *Neuro-anatomie* (Bruxelles: De Boeck).
- Froger, N., Orellana, J.A., Calvo, C.-F., Amigou, E., Kozoriz, M.G., Naus, C.C., Sáez, J.C., and Giaume, C. (2010). Inhibition of cytokine-induced connexin43 hemichannel activity in astrocytes is neuroprotective. *Mol. Cell. Neurosci.* 45, 37–46.
- Furshpan, E.J., and Potter, D.D. (1959). Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol.* 145, 289–325.
- Garcia-Larrea, L., and Magnin, M. (2008). Physiopathologie de la douleur neuropathique : revue des modèles expérimentaux et des mécanismes proposés. *Presse Med.* 315–340.
- Garrison, C.J., Dougherty, P.M., Kajander, K.C., and Carlton, S.M. (1991). Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res.* 565, 1–7.
- Giaume, C., and Liu, X. (2012). From a glial syncytium to a more restricted and specific glial networking. *J. Physiol. Paris* 106, 34–39.
- Giaume, C., and Theis, M. (2010). Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated channels in glial cells of the central nervous system. *Brain Res. Rev.* 63, 160–176.
- Giaume, C., and Venance, L. (1998). Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia* 24, 50–64.
- Giaume, C., Fromaget, C., el Aoumari, A., Cordier, J., Glowinski, J., and Gros, D. (1991a). Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron* 6, 133–143.
- Giaume, C., Marin, P., Cordier, J., Glowinski, J., and Premont, J. (1991b). Adrenergic regulation of intercellular communications between cultured striatal astrocytes from the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5577–5581.
- Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., and Rouach, N. (2010). Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 87–99.
- Giaume, C., Orellana, J.A., Abudara, V., and Sáez, J.C. (2012). Connexin-based channels in astrocytes: how to study their properties. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 814, 283–303.
- Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C.C., and Sáez, J.C. (2013). Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front. Pharmacol.* 4, 88.
- Grill, R.J. (2005). User-defined variables that affect outcome in spinal cord contusion/compression models. *Exp. Neurol.* 196, 1–5.
- Grima, M. (2008). *Les antidépresseurs*.

- Guo, W., Wang, H., Watanabe, M., Shimizu, K., Zou, S., LaGraize, S.C., Wei, F., Dubner, R., and Ren, K. (2007). Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 6006–6018.
- Hanani, M., Caspi, A., and Belzer, V. (2010). Peripheral inflammation augments gap junction-mediated coupling among satellite glial cells in mouse sympathetic ganglia. *Neuron Glia Biol.* 6, 85–89.
- Hang, L.-H., Li, S.-N., Luo, H., Shu, W.-W., Mao, Z.-M., Chen, Y.-F., Shi, L.-L., and Shao, D.-H. (2016). Connexin 43 Mediates CXCL12 Production from Spinal Dorsal Horn to Maintain Bone Cancer Pain in Rats. *Neurochem. Res.* 41, 1200–1208.
- Harden, N., and Cohen, M. (2003). Unmet needs in the management of neuropathic pain. *J. Pain Symptom Manage.* 25, S12-17.
- Hill, R.A., Medved, J., Patel, K.D., and Nishiyama, A. (2014). Organotypic slice cultures to study oligodendrocyte dynamics and myelination. *J. Vis. Exp. JoVE* e51835.
- Hirst, W.D., Price, G.W., Rattray, M., and Wilkin, G.P. (1997). Identification of 5-hydroxytryptamine receptors positively coupled to adenylyl cyclase in rat cultured astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* 120, 509–515.
- Hisaoka, K., Takebayashi, M., Tsuchioka, M., Maeda, N., Nakata, Y., and Yamawaki, S. (2007). Antidepressants increase glial cell line-derived neurotrophic factor production through monoamine-independent activation of protein tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase in glial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321, 148–157.
- Huang, C., Han, X., Li, X., Lam, E., Peng, W., Lou, N., Torres, A., Yang, M., Garre, J.M., Tian, G.-F., et al. (2012). Critical role of connexin 43 in secondary expansion of traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 3333–3338.
- Huang, T.-Y., Belzer, V., and Hanani, M. (2010). Gap junctions in dorsal root ganglia: possible contribution to visceral pain. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 14, 49.e1-11.
- Iglesias, R., Spray, D.C., and Scemes, E. (2009). Mefloquine blockade of Pannexin1 currents: resolution of a conflict. *Cell Commun. Adhes.* 16, 131–137.
- Innocenti, B., Parpura, V., and Haydon, P.G. (2000). Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 1800–1808.
- Inoue, M., Ma, L., Aoki, J., and Ueda, H. (2008). Simultaneous stimulation of spinal NK1 and NMDA receptors produces LPC which undergoes ATX-mediated conversion to LPA, an initiator of neuropathic pain. *J. Neurochem.* 107, 1556–1565.
- Jaggi, A.S., Jain, V., and Singh, N. (2009). Animal models of neuropathic pain. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1–28.
- Janowsky, A., Eshleman, A.J., Johnson, R.A., Wolfrum, K.M., Hinrichs, D.J., Yang, J., Zabriskie, T.M., Smilkstein, M.J., and Riscoe, M.K. (2014). Mefloquine and psychotomimetics share neurotransmitter receptor and transporter interactions in vitro. *Psychopharmacology (Berl.)* 231, 2771–2783.
- Jasmin, L., Vit, J.-P., Bhargava, A., and Ohara, P.T. (2010). Can satellite glial cells be therapeutic targets for pain control? *Neuron Glia Biol.* 6, 63–71.

- Jensen, T.S., Gottrup, H., Sindrup, S.H., and Bach, F.W. (2001). The clinical picture of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* *429*, 1–11.
- Jha, M.K., Jeon, S., and Suk, K. (2012). Glia as a Link between Neuroinflammation and Neuropathic Pain. *Immune Netw.* *12*, 41–47.
- Ji, R.-R., Berta, T., and Nedergaard, M. (2013). Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* *154 Suppl 1*, S10-28.
- Kaneko, T., Shigemoto, R., and Mizuno, N. (1988). Metabolism of glutamate and ammonia in astrocyte: an immunocytochemical study. *Brain Res.* *457*, 160–164.
- Kettenmann, H., and Verkhratsky, A. (2011). [Neuroglia--living nerve glue]. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* *79*, 588–597.
- Kiebertz, K., Simpson, D., Yiannoutsos, C., Max, M.B., Hall, C.D., Ellis, R.J., Marra, C.M., McKendall, R., Singer, E., Dal Pan, G.J., et al. (1998). A randomized trial of amitriptyline and mexiletine for painful neuropathy in HIV infection. AIDS Clinical Trial Group 242 Protocol Team. *Neurology* *51*, 1682–1688.
- Kirchhoff, F., Mülhardt, C., Pastor, A., Becker, C.M., and Kettenmann, H. (1996). Expression of glycine receptor subunits in glial cells of the rat spinal cord. *J. Neurochem.* *66*, 1383–1390.
- Koizumi, S., Uneyama, H., Ikeda, M., Ueno, S., and Inoue, K. (1998). Inhibition by imipramine of ATP-evoked responses in rat pheochromocytoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *244*, 342–346.
- Kolb, B., and Wishaw, I.Q. (2002). *Cerveau & comportement* (Paris: De Boeck).
- Kong, H., Sha, L., Fan, Y., Xiao, M., Ding, J., Wu, J., and Hu, G. (2009). Requirement of AQP4 for antidepressive efficiency of fluoxetine: implication in adult hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *34*, 1263–1276.
- Koschnitzky, J.E., Quinlan, K.A., Lukas, T.J., Kajtaz, E., Kocevar, E.J., Mayers, W.F., Siddique, T., and Heckman, C.J. (2014). Effect of fluoxetine on disease progression in a mouse model of ALS. *J. Neurophysiol.* *111*, 2164–2176.
- Koulakoff, A., Ezan, P., and Giaume, C. (2008). Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia* *56*, 1299–1311.
- Koupernik, C., Lôo, H., and Zarifian, É. (1982). *Précis de psychiatrie* (Paris: Flammarion Médecine-Sciences).
- Kroenke, K., Outcalt, S., Krebs, E., Bair, M.J., Wu, J., Chumbler, N., and Yu, Z. (2013). Association between anxiety, health-related quality of life and functional impairment in primary care patients with chronic pain. *Gen. Hosp. Psychiatry* *35*, 359–365.
- Kuhn, R. (1957). Du traitement des états dépressifs par un dérivé de l'iminodibenzile. 35–36.
- Kumar, N.M., and Gilula, N.B. (1986). Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J. Cell Biol.* *103*, 767–776.
- Kunzelmann, P., Schröder, W., Traub, O., Steinhäuser, C., Dermietzel, R., and Willecke, K. (1999). Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and

long-term cultured astrocytes. *Glia* 25, 111–119.

Laird, D.W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* 394, 527–543.

Laird, D.W. (2010). The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trends Cell Biol.* 20, 92–101.

Laird, D.W., Puranam, K.L., and Revel, J.P. (1991). Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem. J.* 273(Pt 1), 67–72.

Larsson, M., and Broman, J. (2011). Synaptic plasticity and pain: role of ionotropic glutamate receptors. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 17, 256–273.

Latrémolière, A., Mauborgne, A., Masson, J., Bourgoin, S., Kayser, V., Hamon, M., and Pohl, M. (2008). Differential implication of proinflammatory cytokine interleukin-6 in the development of cephalic versus extracephalic neuropathic pain in rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 8489–8501.

Laurent, B., Annequin, D., Boureau, F., Colin, E., Delorme, T., and Eschalier, A. (2004). La douleur en questions. *Dociété Détude Trait. Douleur.*

Le Bars, D., Dickenson, A.H., and Besson, J.M. (1979). Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications. *Pain* 6, 305–327.

Ledda, M., Blum, E., De Palo, S., and Hanani, M. (2009). Augmentation in gap junction-mediated cell coupling in dorsal root ganglia following sciatic nerve neuritis in the mouse. *Neuroscience* 164, 1538–1545.

Lee, I.-H., Lindqvist, E., Kiehn, O., Widenfalk, J., and Olson, L. (2005). Glial and neuronal connexin expression patterns in the rat spinal cord during development and following injury. *J. Comp. Neurol.* 489, 1–10.

Lee, Y.H., Kim, S.H., Kim, Y., Lim, Y., Ha, K., and Shin, S.Y. (2012). Inhibitory effect of the antidepressant imipramine on NF- κ B-dependent CXCL1 expression in TNF α -exposed astrocytes. *Int. Immunopharmacol.* 12, 547–555.

Lefèvre, Y., Amadio, A., Vincent, P., Descheemaeker, A., Oliet, S.H.R., Dallel, R., and Voisin, D.L. (2015). Neuropathic pain depends upon D-serine co-activation of spinal NMDA receptors in rats. *Neurosci. Lett.* 603, 42–47.

Liu, Q., Li, B., Zhu, H.-Y., Wang, Y.-Q., Yu, J., and Wu, G.-C. (2009). Clomipramine treatment reversed the glial pathology in a chronic unpredictable stress-induced rat model of depression. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 19, 796–805.

Liu, R.-P., Zou, M., Wang, J.-Y., Zhu, J.-J., Lai, J.-M., Zhou, L.-L., Chen, S.-F., Zhang, X., and Zhu, J.-H. (2014). Paroxetine ameliorates lipopolysaccharide-induced microglia activation via differential regulation of MAPK signaling. *J. Neuroinflammation* 11, 47.

Lôo, H., Galinowski, A., Poirier, M.-F., Hartmann, F., Krebs, M.-O., Chauchot, F., and Olié, J.-P. (2004). Antidépresseurs. *Historique. EMC - Psychiatr.* 1, 243–245.

Loomer, H.P., Saunders, J.C., and Kline, N.S. (1957). A clinical and pharmacodynamic evaluation of

iproniazid as a psychic energizer. *Psychiatr. Res. Rep. Am. Psychiatr. Assoc.* 8, 129–141.

Mann, C. (2006). *Neuro-physiologie de la douleur.*

Martinez, V., Attal, N., Bouhassira, D., and Lanteri-Minet, M. (2010). Les douleurs neuropathiques chroniques : diagnostic, évaluation et traitement en médecine ambulatoire. Recommandations pour la pratique clinique de la Société française d'étude et de traitement de la douleur. *Douleurs Eval. - Diagn. - Trait.* 11, 3–21.

McCarthy, S. (2015). Malaria Prevention, Mefloquine Neurotoxicity, Neuropsychiatric Illness, and Risk-Benefit Analysis in the Australian Defence Force. *J. Parasitol. Res.* 2015, 287651.

M'Dahoma, S., Bourgoïn, S., Kayser, V., Barthélémy, S., Chevarin, C., Chali, F., Orsal, D., and Hamon, M. (2014). Spinal cord transection-induced allodynia in rats--behavioral, physiopathological and pharmacological characterization. *PloS One* 9, e102027.

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

Même, W., Calvo, C.-F., Froger, N., Ezan, P., Amigou, E., Koulakoff, A., and Giaume, C. (2006). Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by beta-amyloid. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 494–496.

Merrifield, P.A., and Laird, D.W. (2016). Connexins in skeletal muscle development and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 50, 67–73.

Merskey, H. (1986). Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. *Pain. Suppl.* 3, S1-226.

Merskey, H. (2007). The taxonomy of pain. *Med. Clin. North Am.* 91, 13–20, vii.

Merskey, H., and Bogduk N. (1994). Classification of Chronic Pain. IASP Task Force Taxon.

Michot, B., Kayser, V., Bastian, G., Bourgoïn, S., and Hamon, M. (2014). Differential pharmacological alleviation of oxaliplatin-induced hyperalgesia/allodynia at cephalic versus extra-cephalic level in rodents. *Neuropharmacology* 79, 432–443.

Mico, J.A., Berrocoso, E., Vitton, O., Ladure, P., Newman-Tancredi, A., Bardin, L., and Depoortère, R. (2011). Effects of milnacipran, duloxetine and indomethacin, in polyarthritic rats using the Randall-Selitto model. *Behav. Pharmacol.* 22, 599–606.

Mika, J., Osikowicz, M., Rojewska, E., Korostynski, M., Wawrzczak-Bargiela, A., Przewlocki, R., and Przewlocka, B. (2009). Differential activation of spinal microglial and astroglial cells in a mouse model of peripheral neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 623, 65–72.

Mika, J., Zychowska, M., Popiolek-Barczyk, K., Rojewska, E., and Przewlocka, B. (2013). Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 716, 106–119.

Moalem, G., and Tracey, D.J. (2006). Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res. Rev.* 51, 240–264.

Molenaar, J.C. (2003). [From the library of the Netherlands Journal of Medicine. Rudolf Virchow: Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre; 1858]. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 147, 2236–2244.

Moon, J.-Y., Choi, S.-R., Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Kwon, S.-G., Choi, H.-S., Kang, S.-Y., Han, H.-J., Kim, H.-W., Beitz, A.J., et al. (2015). Spinal sigma-1 receptor activation increases the production of D-serine in astrocytes which contributes to the development of mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *Pharmacol. Res.* *100*, 353–364.

de Moraes Vieira, E.B., Garcia, J.B.S., da Silva, A.A.M., Mualem Araújo, R.L.T., and Jansen, R.C.S. (2012). Prevalence, characteristics, and factors associated with chronic pain with and without neuropathic characteristics in São Luís, Brazil. *J. Pain Symptom Manage.* *44*, 239–251.

Morioka, N., Suekama, K., Zhang, F.F., Kajitani, N., Hisaoka-Nakashima, K., Takebayashi, M., and Nakata, Y. (2014). Amitriptyline up-regulates connexin43-gap junction in rat cultured cortical astrocytes via activation of the p38 and c-Fos/AP-1 signalling pathway. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 2854–2867.

Morioka, N., Zhang, F.F., Nakamura, Y., Kitamura, T., Hisaoka-Nakashima, K., and Nakata, Y. (2015). Tumor necrosis factor-mediated downregulation of spinal astrocytic connexin43 leads to increased glutamatergic neurotransmission and neuropathic pain in mice. *Brain. Behav. Immun.* *49*, 293–310.

Mostafavi, H., Khaksarian, M., Joghataei, M.T., Hassanzadeh, G., Soleimani, M., Eftekhari, S., Soleimani, M., Mousavizadeh, K., and Hadjighassem, M.R. (2014). Fluoxetine upregulates connexin 43 expression in astrocyte. *Basic Clin. Neurosci.* *5*, 74–79.

Nagata, K., Imai, T., Yamashita, T., Tsuda, M., Tozaki-Saitoh, H., and Inoue, K. (2009). Antidepressants inhibit P2X4 receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. *Mol. Pain* *5*, 20.

Nagy, J.I., Patel, D., Ochalski, P.A., and Stelmack, G.L. (1999). Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience* *88*, 447–468.

NeuroPerspective (2012). Neuropathic Pain.

Nibuya, M., Morinobu, S., and Duman, R.S. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *15*, 7539–7547.

Nielsen, M.S., Axelsen, L.N., Sorgen, P.L., Verma, V., Delmar, M., and Holstein-Rathlou, N.-H. (2012). Gap junctions. *Compr. Physiol.* *2*, 1981–2035.

Nisard, D., and Chotard, L. (1995). Musset (Paris: Presses de l'université de Paris-Sorbonne).

Norenberg, M.D., Smith, J., and Marcillo, A. (2004). The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J. Neurotrauma* *21*, 429–440.

Obuchowicz, E., Kowalski, J., Labuzek, K., Krysiak, R., Pendzich, J., and Herman, Z.S. (2006). Amitriptyline and nortriptyline inhibit interleukin-1 release by rat mixed glial and microglial cell cultures. *Int. J. Neuropsychopharmacol. Off. Sci. J. Coll. Int. Neuropsychopharmacol. CINP* *9*, 27–35.

O'Carroll, S.J., Gorrie, C.A., Velamoor, S., Green, C.R., and Nicholson, L.F.B. (2013). Connexin43 mimetic peptide is neuroprotective and improves function following spinal cord injury. *Neurosci. Res.* *75*, 256–267.

OCDE (2013). <http://www.lemonde.fr/idees/article/2013/11/26/la-france-n-est-plus-leader-dans-les->

antidepressseurs_3520348_3232.html.

O'Connor, A.B., and Dworkin, R.H. (2009). Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. *Am. J. Med.* *122*, S22-32.

Ohara, P.T., Vit, J.-P., Bhargava, A., and Jasmin, L. (2008). Evidence for a role of connexin 43 in trigeminal pain using RNA interference in vivo. *J. Neurophysiol.* *100*, 3064–3073.

Olk, S., Zoidl, G., and Dermietzel, R. (2009). Connexins, cell motility, and the cytoskeleton. *Cell Motil. Cytoskeleton* *66*, 1000–1016.

Orellana, J.A., Martinez, A.D., and Retamal, M.A. (2013). Gap junction channels and hemichannels in the CNS: regulation by signaling molecules. *Neuropharmacology* *75*, 567–582.

Pannasch, U., Freche, D., Dallérac, G., Ghézali, G., Escartin, C., Ezan, P., Cohen-Salmon, M., Benchenane, K., Abudara, V., Dufour, A., et al. (2014). Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nat. Neurosci.* *17*, 549–558.

Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jęftinija, K., Jęftinija, S., and Haydon, P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* *369*, 744–747.

Pasero, C. (2004). Pathophysiology of neuropathic pain. *Pain Manag. Nurs. Off. J. Am. Soc. Pain Manag. Nurses* *5*, 3–8.

Pélissier, J., and Viel, E. (2000). *Douleur et médecine physique et de réadaptation* (Paris: Masson).

Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.-K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., and Magistretti, P.J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* *55*, 1251–1262.

Perl, E.R. (2007). Ideas about pain, a historical view. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 71–80.

Peroutka, S.J., and Snyder, S.H. (1981). [3H]Mianserin: differential labeling of serotonin and histamine receptors in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *216*, 142–148.

Pfrieger, F.W., and Barres, B.A. (1997). Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* *277*, 1684–1687.

Picoli, C., Nouvel, V., Aubry, F., Reboul, M., Duchêne, A., Jeanson, T., Thomasson, J., Mouthon, F., and Charvériat, M. (2012). Human connexin channel specificity of classical and new gap junction inhibitors. *J. Biomol. Screen.* *17*, 1339–1347.

Pignarre, P. (2001). *Comment la dépression est devenue une épidémie* (Paris: La Découverte).

Purves, D., and Williams, S.M. (2001). *Neuroscience* (Sunderland, Mass: Sinauer Associates).

Quesseveur, G., Portal, B., Basile, J.-A., Ezan, P., Mathou, A., Halley, H., Leloup, C., Fioramonti, X., Déglon, N., Giaume, C., et al. (2015). Attenuated Levels of Hippocampal Connexin 43 and its Phosphorylation Correlate with Antidepressant- and Anxiolytic-Like Activities in Mice. *Front. Cell. Neurosci.* *9*, 490.

Raboisson, P., Dallel, R., Bernard, J.F., Le Bars, D., and Villanueva, L. (1996). Organization of efferent projections from the spinal cervical enlargement to the medullary subnucleus reticularis dorsalis and the adjacent cuneate nucleus: a PHA-L study in the rat. *J. Comp. Neurol.* *367*, 503–517.

- Rackauskas, M., Neverauskas, V., and Skeberdis, V.A. (2010). Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Med. Kaunas Lith.* 46, 1–12.
- Randall, L.O., and Selitto, J.J. (1957). A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Thérapie* 111, 409–419.
- Rantamäki, T., and Yalcin, I. (2016). Antidepressant drug action--From rapid changes on network function to network rewiring. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 64, 285–292.
- Ren, K. (2010). Emerging role of astroglia in pain hypersensitivity. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 46, 86.
- Ren, K., and Dubner, R. (2016). Activity-triggered tetrapartite neuron-gial interactions following peripheral injury. *Curr. Opin. Pharmacol.* 26, 16–25.
- Retamal, M.A., Froger, N., Palacios-Prado, N., Ezan, P., Sáez, P.J., Sáez, J.C., and Giaume, C. (2007). Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 13781–13792.
- Rey, R. (2011). *Histoire de la douleur* (Paris: La Découverte).
- Rodis-Lewis, G., and Oliveira, F. (1996). *Descartes* (Lisbonne: Instituto Piaget).
- Rodríguez-Sinovas, A., Cabestrero, A., López, D., Torre, I., Morente, M., Abellán, A., Miró, E., Ruiz-Meana, M., and García-Dorado, D. (2007). The modulatory effects of connexin 43 on cell death/survival beyond cell coupling. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 94, 219–232.
- Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Seo, H.-S., Kang, S.-Y., Han, H.-J., Beitz, A.J., and Lee, J.-H. (2010). Intrathecal injection of carbenoxolone, a gap junction decoupler, attenuates the induction of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.* 224, 123–132.
- Rouach, N., Glowinski, J., and Giaume, C. (2000). Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J. Cell Biol.* 149, 1513–1526.
- Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J.D., Bonvento, G., and Giaume, C. (2011). Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18442–18446.
- Roux, L., Madar, A., Lacroix, M.M., Yi, C., Benchenane, K., and Giaume, C. (2015). Astroglial Connexin 43 Hemichannels Modulate Olfactory Bulb Slow Oscillations. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 15339–15352.
- Roy, M., Lebuis, A., Peretz, I., and Rainville, P. (2011). The modulation of pain by attention and emotion: a dissociation of perceptual and spinal nociceptive processes. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 15, 641.e1-10.
- Sanacora, G., and Banasr, M. (2013). From Pathophysiology to Novel Antidepressant Drugs: Glial Contributions to the Pathology and Treatment of Mood Disorders. *Biol. Psychiatry* 73, 1172–1179.
- Sapena, R., Morin, D., Zini, R., Morin, C., and Tillement, J.P. (1996). Desipramine treatment differently down-regulates beta-adrenoceptors of freshly isolated neurons and astrocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 300, 159–162.
- Schlesinger, E.B. (1991). Alfred Reginald Allen: the mythic career of a gifted neuroscientist. *Surg. Neurol.* 36, 229–233.

- Scholten, P.M., and Harden, R.N. (2015). Assessing and Treating Patients With Neuropathic Pain. *PM R* 7, S257-269.
- Sen, J., and Belli, A. (2007). S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *J. Neurosci. Res.* 85, 1373–1380.
- Shen, N., Mo, L.-Q., Hu, F., Chen, P.-X., Guo, R.-X., and Feng, J.-Q. (2014). A novel role of spinal astrocytic connexin 43: mediating morphine antinociceptive tolerance by activation of NMDA receptors and inhibition of glutamate transporter-1 in rats. *CNS Neurosci. Ther.* 20, 728–736.
- Shimizu, M., Nishida, A., Zensho, H., and Yamawaki, S. (1996). Chronic antidepressant exposure enhances 5-hydroxytryptamine₇ receptor-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation in rat frontocortical astrocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 1551–1558.
- Sillaber, I., Panhuysen, M., Henniger, M.S.H., Ohl, F., Kühne, C., Pütz, B., Pohl, T., Deussing, J.M., Paez-Pereda, M., and Holsboer, F. (2008). Profiling of behavioral changes and hippocampal gene expression in mice chronically treated with the SSRI paroxetine. *Psychopharmacology (Berl.)* 200, 557–572.
- Slowik, F., Gazsó, L., Pásztor, E., Piffkó, P., and Lapis, K. (1983). Morphological investigations of mixed pituitary adenomas. *Acta Morphol. Hung.* 31, 353–364.
- Snider, W.D., and McMahon, S.B. (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 20, 629–632.
- Sofroniew, M.V. (2014). Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 20, 160–172.
- Spataro, L.E., Sloane, E.M., Milligan, E.D., Wieseler-Frank, J., Schoeniger, D., Jekich, B.M., Barrientos, R.M., Maier, S.F., and Watkins, L.R. (2004). Spinal gap junctions: potential involvement in pain facilitation. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* 5, 392–405.
- Spiller, N. (2012). Neuropathic pain treatment.
- Stoudemire, A., and Sandhu, J. (1987). Psychogenic/idiopathic pain syndromes. *Gen. Hosp. Psychiatry* 9, 79–86.
- Sun, J.-D., Liu, Y., Yuan, Y.-H., Li, J., and Chen, N.-H. (2012). Gap junction dysfunction in the prefrontal cortex induces depressive-like behaviors in rats. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 37, 1305–1320.
- Svenningsen, P., Burford, J.L., and Peti-Peterdi, J. (2013). ATP releasing connexin 30 hemichannels mediate flow-induced calcium signaling in the collecting duct. *Front. Physiol.* 4, 292.
- Sweitzer, S., and De Leo, J. (2011). Propentofylline: glial modulation, neuroprotection, and alleviation of chronic pain. *Handb. Exp. Pharmacol.* 235–250.
- Takahashi, K., Yamada, M., Ohata, H., Momose, K., Higuchi, T., Honda, K., and Yamada, M. (2005). Expression of Ndr2 in the rat frontal cortex after antidepressant and electroconvulsive treatment. *Int. J. Neuropsychopharmacol. Off. Sci. J. Coll. Int. Neuropsychopharmacol. CINP* 8, 381–389.
- Theis, M., and Giaume, C. (2012). Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res.* 1487, 88–98.

- Theis, M., Jauch, R., Zhuo, L., Speidel, D., Wallraff, A., Döring, B., Frisch, C., Söhl, G., Teubner, B., Euwens, C., et al. (2003). Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 766–776.
- Theis, M., Söhl, G., Eiberger, J., and Willecke, K. (2005). Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci.* *28*, 188–195.
- Tiwari, V., Guan, Y., and Raja, S.N. (2014). Modulating the delicate glial-neuronal interactions in neuropathic pain: promises and potential caveats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *45*, 19–27.
- Tuttle, A.H., Tohyama, S., Ramsay, T., Kimmelman, J., Schweinhardt, P., Bennett, G.J., and Mogil, J.S. (2015). Increasing placebo responses over time in U.S. clinical trials of neuropathic pain. *Pain* *156*, 2616–2626.
- Vallejo, R., Tilley, D.M., Vogel, L., and Benyamin, R. (2010). The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Pract. Off. J. World Inst. Pain* *10*, 167–184.
- Van Kempen, M.J., Vermeulen, J.L., Moorman, A.F., Gros, D., Paul, D.L., and Lamers, W.H. (1996). Developmental changes of connexin40 and connexin43 mRNA distribution patterns in the rat heart. *Cardiovasc. Res.* *32*, 886–900.
- Verselis, V.K., and Srinivas, M. (2013). Connexin channel modulators and their mechanisms of action. *Neuropharmacology* *75*, 517–524.
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M.M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Di Luca, M., Galli, C.L., et al. (2003). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 8692–8700.
- Volterra, A., and Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 626–640.
- Vranken, J.H. (2012). Elucidation of pathophysiology and treatment of neuropathic pain. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* *12*, 304–314.
- Walz, W. (1989). Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog. Neurobiol.* *33*, 309–333.
- Wei, F., Guo, W., Zou, S., Ren, K., and Dubner, R. (2008). Spinal glial-neuronal interactions contribute to descending pain facilitation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 10482–10495.
- Weidmann, S. (1952). The electrical constants of Purkinje fibres. *J. Physiol.* *118*, 348–360.
- Wiencken-Barger, A.E., Djukic, B., Casper, K.B., and McCarthy, K.D. (2007). A role for Connexin43 during neurodevelopment. *Glia* *55*, 675–686.
- Willis, W.D., and Westlund, K.N. (1997). Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J. Clin. Neurophysiol. Off. Publ. Am. Electroencephalogr. Soc.* *14*, 2–31.
- Woolf, C.J., and Mannion, R.J. (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet Lond. Engl.* *353*, 1959–1964.

- Xu, L., Zhang, Y., and Huang, Y. (2016). Advances in the Treatment of Neuropathic Pain. *Adv. Exp. Med. Biol.* *904*, 117–129.
- Yalcin, I., Megat, S., Barthas, F., Waltisperger, E., Kremer, M., Salvat, E., and Barrot, M. (2014). The sciatic nerve cuffing model of neuropathic pain in mice. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Yi, C., Mei, X., Ezan, P., Mato, S., Matias, I., Giaume, C., and Koulakoff, A. (2016). Astroglial connexin43 contributes to neuronal suffering in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Differ.*
- Yoon, S.-Y., Robinson, C.R., Zhang, H., and Dougherty, P.M. (2013). Spinal astrocyte gap junctions contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* *14*, 205–214.
- Zalc, B., and Rosier, F. (2016). *La myéline, le turbo du cerveau* (Paris: Odile Jacob).
- Zhang, F.F., Morioka, N., Kitamura, T., Fujii, S., Miyauchi, K., Nakamura, Y., Hisaoka-Nakashima, K., and Nakata, Y. (2016). Lycopene ameliorates neuropathic pain by upregulating spinal astrocytic connexin 43 expression. *Life Sci.* *155*, 116–122.
- Zhang, R.-X., Liu, B., Wang, L., Ren, K., Qiao, J.-T., Berman, B.M., and Lao, L. (2005). Spinal glial activation in a new rat model of bone cancer pain produced by prostate cancer cell inoculation of the tibia. *Pain* *118*, 125–136.
- Zhuo, M., and Gebhart, G.F. (1997). Biphasic modulation of spinal nociceptive transmission from the medullary raphe nuclei in the rat. *J. Neurophysiol.* *78*, 746–758.
- Zink, M., Rapp, S., Donev, R., Gebicke-Haerter, P.J., and Thome, J. (2011). Fluoxetine treatment induces EAAT2 expression in rat brain. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* *118*, 849–855.
- Zychowska, M., Rojewska, E., Makuch, W., Przewlocka, B., and Mika, J. (2015). The influence of microglia activation on the efficacy of amitriptyline, doxepin, milnacipran, venlafaxine and fluoxetine in a rat model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* *749*, 115–123.

Résumé - Connexine 43 astrocytaire et antidépresseurs : une nouvelle approche thérapeutique des douleurs neuropathiques.

Touchant 63 millions de personnes dans le monde, les douleurs neuropathiques résultent de la compression ou lésion de nerfs. Les antidépresseurs figurent parmi les traitements de première intention de cette pathologie, toutefois ils présentent un manque d'efficacité et des effets indésirables importants. L'étude des astrocytes pourrait permettre de préciser le mécanisme d'action des antidépresseurs, outre les voies de neurotransmission classiquement décrites. En effet, un lien a récemment été établi entre cette classe thérapeutique et une protéine astrocytaire, la connexine 43 (Cx43). De plus, cette dernière s'est avérée impliquée dans les douleurs neuropathiques. Ce projet de thèse a ainsi posé la problématique suivante : la Cx43 astrocytaire peut elle moduler le profil pharmacologique des antidépresseurs dans le traitement des douleurs neuropathiques ? Les objectifs ont été de préciser l'action des antidépresseurs sur cette cible protéique et d'étudier les conséquences de sa modulation sur l'effet antinociceptif d'un antidépresseur, majoritairement prescrit dans les douleurs neuropathiques, l'amitriptyline.

La première partie des travaux a été réalisée dans un modèle *in vitro* de cultures d'astrocytes corticaux chez la souris. L'action d'antidépresseurs a été quantifiée sur l'expression et les deux fonctions «canal» de la Cx43 : les jonctions gap (GJ) et les hémicanaux (HC). Alors que son expression s'est avérée inchangée dans notre modèle, un effet hétérogène des antidépresseurs a été observé sur le couplage intercellulaire des astrocytes. De plus, l'ensemble des molécules testées a conduit à l'inhibition significative de l'ouverture des HC. Outre la confirmation de l'action des antidépresseurs sur la Cx43, notre étude est la première à rapporter leur effet inhibiteur sur cette deuxième fonction de la Cx43.

La seconde partie des travaux a porté plus précisément sur la combinaison entre l'amitriptyline et la méfloquine, un bloqueur de connexines couramment utilisé en pharmacologie. Les deux molécules ont présenté une synergie d'effet sur la réduction des GJ Cx43 *in vitro* corrélée à une potentialisation de l'action anti-hyperalgésique de l'amitriptyline *in vivo*, dans un modèle de rat lésé au niveau du nerf sciatique. Ainsi, ce projet de thèse confirme la Cx43 comme cible thérapeutique des douleurs neuropathiques et de plus propose une combinaison qui pourrait à terme aboutir à des essais cliniques avec Theranexus, société de biotechnologies qui accompagna cette thèse et étudie des combinaisons psychotropes – modulateurs de connexines.