



**Rôle de l'altération de la perméabilité vasculaire
endoneurale dans la genèse des douleurs neuropathiques
périphériques post-traumatiques : Implications des voies
de signalisation TLR4, Sonic Hedgehog et
Wnt/ β -caténine**

Nathan Moreau

► **To cite this version:**

Nathan Moreau. Rôle de l'altération de la perméabilité vasculaire endoneurale dans la genèse des douleurs neuropathiques périphériques post-traumatiques : Implications des voies de signalisation TLR4, Sonic Hedgehog et Wnt/ β -caténine. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066039 . tel-01587723

HAL Id: tel-01587723

<https://theses.hal.science/tel-01587723>

Submitted on 14 Sep 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

Ecole doctorale Cerveau – Cognition – Comportement

Centre de Psychiatrie et Neurosciences - INSERM UMR 894

Equipe « Douleur, Neuroinflammation et Stress »

Rôle de l'altération de la perméabilité vasculaire endoneurale dans la genèse des douleurs neuropathiques périphériques post-traumatiques

Implications des voies de signalisation TLR4, Sonic Hedgehog et Wnt/ β -caténine

Par Nathan MOREAU

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par le Pr Yves BOUCHER

Présentée et soutenue publiquement le 1^{er} mars 2017

Devant un jury composé de :

DALLEL Radhouane	PU-PH (Clermont-Ferrand)	Examineur
BOUCHER Yves	PU-PH (Paris)	Directeur de thèse
POISBEAU Pierrick	PU (Strasbourg)	Rapporteur
LANDRY Marc	PU (Bordeaux)	Rapporteur
BOUHASSIRA Didier	DR1 (Boulogne)	Examineur
POHL Michel	DR1 (Paris)	Examineur
MELIK PARSADANIANZ Stéphane	DR1 (Paris)	Examineur
REAUX-LE GOAZIGO Annabelle	CR1 (Paris)	Examineur

« L'étude de la douleur rend la médecine humaine en tous ses gestes. »

Pr René LERICHE, 1944
Chirurgien français

A mes patients.

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement Pr Radhouane DALLEL, Pr Marc LANDRY, Pr Pierrick POISBEAU, Dr Annabelle REAUX-LE GOAZIGO, Dr Didier BOUHASSIRA et Dr Stéphane MELIK PARSADANIANZ de me faire l'honneur de leur présence dans mon jury de thèse. Leurs contributions respectives dans le domaine de la neurobiologie et de la physiopathologie de la douleur ont été essentielles à la mise en place et la réalisation de ce travail de recherche.

Je tiens également à remercier tout particulièrement mes directeurs d'équipe, Dr Michel POHL et Dr Luis VILLANUEVA pour leur gentillesse, leur encadrement, leur disponibilité et nos échanges très enrichissants pendant ces 4 années passées ensemble.

Au Pr Yves BOUCHER, mon directeur de thèse, toujours présent et à l'écoute, avec qui j'ai tant apprécié travailler, discuter et échanger sur ce travail et sur la médecine de la douleur. Je suis extrêmement honoré d'avoir pu faire ma thèse dans de si bonnes conditions, sous la direction de quelqu'un qui restera pour moi le modèle prototypique d'un grand professeur.

A ma Candice, pour son amour et son soutien constant durant cette thèse.

A Philippe ZIZZARI et Annie MAUBORGNE, les piliers du CPN, sans qui rien n'aurait été possible dans ce centre de recherche. Veuillez trouver ici le témoignage de ma grande reconnaissance pour votre dévouement et votre implication exemplaires.

Aux irréductibles du CPN, Alexandra, Rachel, Julia, Marie, Thomas et tous les autres.

A ma famille et son soutien sans faille. *A Vincent qui me manque.*

A mes amis et leur patience angélique vis à vis de mes absences.

A mes maitres, Pr Jean-Baptiste CHARRIER, Dr Benjamin SALMON, Dr Anne-Laure EJEIL, Dr Loredana RADOI, Dr Charles-Daniel ARRETO et Dr Claude Bernard WIERZBA pour tout ce qu'ils m'ont appris et tout ce qu'ils continuent à m'apprendre.

Résumé

Les douleurs neuropathiques sont un ensemble complexe et hétérogène de douleurs pathologiques, résultant d'une lésion ou d'une pathologie du système nerveux central ou périphérique. Parmi elles, les douleurs neuropathiques périphériques post-traumatiques résultant d'un traumatisme accidentel ou iatrogène sont de diagnostic et de traitement souvent très difficiles.

A la suite d'une lésion nerveuse périphérique, de multiples altérations cellulaires et moléculaires se produisent au sein du parenchyme nerveux, participant à la régénération physiologique du nerf, mais induisant dans certains cas le développement d'une cicatrisation dysfonctionnelle pouvant se traduire sur le plan phénotypique par l'apparition d'une douleur neuropathique chronique.

La régulation de la perméabilité micro-vasculaire au sein de l'endonèvre du nerf lésé joue un rôle essentiel dans ces phénomènes de cicatrisation nerveuse physiologique et pathologique, via notamment l'infiltration locale de cellules immunitaires réparatrices.

L'objectif de ce travail était d'étudier le rôle spécifique de l'altération de la barrière hémato-nerveuse au niveau du site lésé dans le développement des douleurs neuropathiques périphériques post-traumatiques.

Nous avons montré à l'aide de modèles de constriction chronique du nerf sciatique et/ou du nerf infra-orbitaire complétés par des cultures cellulaires de cellules endothéliales (hCMEC/D3), que la disruption précoce de la barrière hémato-nerveuse est un évènement clé de la neuropathie, favorisant l'infiltration de substances algogènes et d'immunocytes dans le parenchyme nerveux, induisant une neuroinflammation locale, une sensibilisation des fibres nerveuses afférentes primaires et le développement d'une douleur neuropathique périphérique. Parmi les mécanismes régulateurs de l'homéostasie de cette barrière, l'altération des voies de signalisation morphogénétiques Sonic Hedgehog et Wnt/ β -caténine, mais également de la voie de l'immunité innée TLR4, au niveau des cellules endothéliales endoneurales, favorise la disruption de cette barrière en diminuant la synthèse des protéines

de jonctions serrées (occludine, claudines), molécules clés de l'intégrité de la barrière hémato-nerveuse.

De plus, l'implication différentielle de ces voies de signalisation dans des modèles de neurite et de neuropathie apporte un éclairage nouveau à la transition phénotypique entre neurite et neuropathie.

Cette implication différentielle permet de proposer un profil moléculaire neuropathique, témoignant de la présence d'altérations moléculaires irréversibles au sein du parenchyme nerveux lésé. Ainsi, alors que la neurite s'accompagne d'une perméabilité vasculaire endoneurale réversible, la neuropathie pourrait être considérée comme une pathologie de la perméabilité vasculaire chronique irréversible.

Mots-clés : douleur neuropathique ; barrière hémato-nerveuse ; Sonic Hedgehog ; TLR4 ; Wnt/ β -caténine

Abstract

Neuropathic pain defines a complex and heterogeneous group of chronic painful disorders secondary to a lesion or disease of the central or peripheral nervous system. Among them, painful post-traumatic peripheral neuropathies resulting from accidental or iatrogenic nerve trauma are often very difficult to diagnose and treat.

Following peripheral nerve injury, multiple cellular and molecular alterations occur within the nerve's parenchyma, participating in physiological healing of the nerve, but can also lead to the development of dysfunctional nerve healing, translating as chronic neuropathic pain.

The regulation of endoneurial microvascular permeability within the injured nerve plays a pivotal rôle in physiological and pathological nerve healing, notably via the local infiltration of pro-regenerative immunocytes.

The main goal of this work was to study the specific role of local blood-nerve barrier disruption in the development of painful post-traumatic peripheral neuropathy.

In sciatic nerve and/or infra-orbital nerve chronic constriction injury models and *in vitro* endothelial cell cultures (hCMEC/D3), we showed that early disruption of the blood-nerve barrier is a key event in the development of neuropathy, allowing local infiltration of algogenic substances and immunocytes within the nerve's parenchyma, responsible for local neuroinflammation, peripheral sensitization of primary afferent fibers and peripheral neuropathic pain development.

Among the homeostatic regulatory mechanisms of this barrier, the alteration of morphogenetic signaling pathways Sonic Hedgehog and Wnt/ β -catenin, but also innate immunity receptor TLR4 pathway, in endoneurial endothelial cells, mediate the disruption of the blood-nerve barrier by downregulating key tight-junction proteins (occludin, claudins).

Furthermore, the differential implication of these signaling pathways in models of neuritis and neuropathy shed light on the phenotypical transition between neuritis and neuropathy. Such differential implication allowed us to propose a new neuropathic molecular profile, illustrative

of the irreversible molecular alterations that occur within the injured nerve's parenchyma. Therefore, as neuritis is associated with reversible endoneurial vascular permeability, neuropathy could be considered a disease of irreversible chronic vascular permeability.

Key-words : neuropathic pain ; blood-nerve barrier ; Sonic Hedgehog ; TLR4 ; Wnt/ β -catenin

Publications et Communications

Publications

Endoneurial endothelial crosstalk between Wnt/ β -catenin and Sonic Hedgehog pathways underlies the early disruption of the infra-orbital blood-nerve barrier following chronic constriction injury.

MOREAU N., MAUBORGNE A., COURAUD P.-O., WEKSLER B., ROMERO I.A., VILLANUEVA L., POHL M., BOUCHER Y.

Molecular Pain, 2016 [soumis]

Neuroinflammation in dental primary afferents as a risk factor for painful post-traumatic trigeminal neuropathy (PPTN) : a retrospective study.

DIEB W., MOREAU N., CHEMLA I., DESCROIX V., BOUCHER Y.

Rev Stomatol Maxillo-Fac, 2016 [soumis]

Hedgehog pathway-mediated vascular alterations following trigeminal nerve injury.

MOREAU N., MAUBORGNE A., VILLANUEVA L., POHL M., BOUCHER Y.

Journal of Dental Research, 2016 Nov 16. doi: 10.1177/0022034516679395 [Epub ahead of print]

Early alterations of Hedgehog signaling pathway in vascular endothelial cells after peripheral nerve injury elicit blood-nerve barrier disruption, nerve inflammation and neuropathic pain development.

MOREAU N., MAUBORGNE A., BOURGOIN S., COURAUD P.O., ROMERO I.A., WEKSLER B.B., VILLANUEVA L., POHL M., BOUCHER Y.

Pain, 2016;157(4):827-39.

Communications affichées

Endoneurial endothelial crosstalk between Wnt/ β -catenin and Sonic Hedgehog pathways underlies the early disruption of the infra-orbital blood-nerve barrier following chronic constriction injury.

MOREAU N., MAUBORGNE A., VILLANUEVA L., POHL M., BOUCHER Y.

6th international congress on neuropathic pain - NeuPSIG2017, 15/06/2017 au 18/06/2017, Göteborg, Suède [résumé soumis]

Neuroinflammation périphérique et altérations de la barrière hémato-nerveuse après traumatisme de nerfs périphériques – Implications des voies morphogénétiques SHH et Wnt/ β -caténine dans la genèse des neuropathies périphériques

MOREAU N., DIEB W., MAUBORGNE A., BOUCHER Y.

2^{ème} Journée Recherche de Garancière, 21/10/2016, UFR d'Odontologie, Université Paris Diderot

Neuroinflammation périphérique et altérations de la barrière hémato-nerveuse après traumatisme de nerfs périphériques – Rôles de la signalisation SHH dans le développement des neuropathies périphériques

MOREAU N., MAUBORGNE A., POHL M., BOUCHER Y.

1^{ère} Journée Recherche de Garancière, 09/10/2015, UFR d'Odontologie, Université Paris Diderot

Saliency of blood-nerve barrier disruption in peripheral neuroinflammation and painful neuropathies

MOREAU N., MAUBORGNE A., POHL M., BOUCHER Y.

9^{ème} congrès de l'European Pain Federation (EFIC), 03/09/2015, Vienne, Autriche

Saliency of blood-nerve barrier disruption in peripheral neuroinflammation and painful neuropathies

MOREAU N., MAUBORGNE A., POHL M., BOUCHER Y.

Journée scientifique de l'école doctorale « Cerveau, Cognition, Comportement », 12/03/2015, Université Pierre et Marie Curie

Communications orales

Neuroinflammation périphérique et altérations de la barrière hémato-nerveuse après traumatisme de nerfs périphériques – Implications des voies morphogénétiques SHH et Wnt/ β -caténine dans la genèse des neuropathies périphériques

Communication orale associée au poster, 2^{ème} Journée Recherche de Garancière, 21/10/2016, UFR d'Odontologie, Université Paris Diderot

Saliency of blood-nerve barrier disruption in peripheral neuroinflammation and painful neuropathies: Implications of the Hedgehog signalling pathway

Journée scientifique de l'école doctorale « Cerveau, Cognition, Comportement », 05/04/2016, Université Pierre et Marie Curie

Neuroinflammation périphérique et altérations de la barrière hémato-nerveuse après traumatisme de nerfs périphériques – Rôles de la signalisation SHH dans le développement des neuropathies périphériques

Communication orale associée au poster, 1^{ère} Journée Recherche de Garancière, 09/10/2015, UFR d'Odontologie, Université Paris Diderot

Saliency of blood-nerve barrier disruption in peripheral neuroinflammation and painful neuropathies : implications of the Hedgehog signalling pathway

European Pain Federation Krakow Pain School, 06/07/2015, Cracovie, Pologne

Altération de la barrière hémato-nerveuse : Support de la neuroinflammation périphérique et des neuropathies douloureuses ?

XI^{ème} symposium du réseau national INSERM des chercheurs de la douleur, 20/03/2015, Strasbourg

Sommaire

Avant-propos	12
Introduction	13
1. Définition des douleurs neuropathiques	14
2. Etiologies et épidémiologie des douleurs neuropathiques	15
3. Impact individuel et socio-économique des douleurs neuropathiques	16
4. Sémiologie générale des douleurs neuropathiques	17
5. Approches expérimentales et modélisation des douleurs neuropathiques	23
6. Spécificités des douleurs neuropathiques post-traumatiques	26
I – Physiopathologie des douleurs neuropathiques périphériques post-traumatiques	28
I-1 Physiologie de la nociception périphérique	29
I-1-1 Structure et ultrastructure du nerf périphérique	29
I-1-2 Vascularisation du nerf périphérique et rôles de la barrière hémato-nerveuse	34
I-1-3 Organisation fonctionnelle vasculo-nerveuse : les unités neuro-vasculaires	40
I-1-4 Transmission nociceptive physiologique	41
I-2 Altérations nerveuses post-traumatiques	46
I-2-1 Altérations tissulaires et cellulaires post-traumatiques	46
I-2-2 Cicatrisation nerveuse physiologique et pathologique : de la neurite à la neuropathie	54
I-3 Nociception pathologique et douleurs neuropathiques	60
I-3-1 Phénomènes de sensibilisation périphérique et centrale	60
I-3-2 Rôle de la neuroinflammation locale dans la sensibilisation périphérique	69
II – Etude de l’impact de l’altération de la perméabilité vasculaire endoneurale dans les phénomènes de sensibilisation périphérique des neurones nociceptifs primaires	72
II-1 Contexte scientifique : Altérations de la barrière hémato-nerveuse et neuroinflammation Périphérique	73
II-2 Objectifs de recherche	78
II-3 Matériels et méthodes	79
II-3-1 Animaux	79
II-3-2 Chirurgie	79
II-3-3 Evaluation de la perméabilité de la BHN	87
II-3-4 Comportement : évaluation de la sensibilité mécanique à l’aide de filaments de von Frey	89
II-3-5 Cultures cellulaires	90
II-3-6 Extraction d’ARN et RT-PCR semi-quantitative	91
II-3-7 Extraction protéique et quantification par ELISA	92
II-3-8 Immunohistochimie	93
II-3-9 Données et analyses statistiques	94
II-4 Résultats	95
II-4-1 Mise en évidence de l’altération de la barrière hémato-nerveuse dans deux modèles de neuropathies spinale et trigéminal	95
II-4-2 Développement de la neuroinflammation locale dans deux modèles de neuropathies spinale et trigéminal	100
II-4-3 Exploration des déterminants de la perméabilité vasculaire endoneurale post-traumatique	103
II-4-4 Différences et similitudes des nociceptions spinale et trigéminal	142
II-4-5 Implication des voies TLR, SHH et Wnt/β-caténine dans l’apparition du phénotype douloureux neuropathique	147
II-5 Discussion	163
II-5-1 Altérations de la perméabilité vasculaire endoneurale et développement des neuropathies périphériques	163
II-5-2 Morphogènes et douleurs pathologiques	174
II-5-3 Intérêts thérapeutiques de la modulation de perméabilité de la barrière hémato-nerveuse	178

III – Perspectives en recherche translationnelle : hypothèse du priming inflammatoire dans le développement des douleurs neuropathiques trigéminales post-traumatiques	181
III-1 Contexte clinique : Les Douleurs Neuropathiques Trigéminales Post-Traumatiques iatrogènes	182
III-2 L’hypothèse du « priming inflammatoire » dans la genèse des DNTPT	183
<i>III-2-1 Observations cliniques sur 56 cas de DNTPT</i>	183
<i>III-2-2 Rationnel biologique : rôle de l’inflammation orale médiée par le LPS bactérien et activation de la voie TLR4</i>	189
III-3 Approche expérimentale : Etude de la stimulation préemptive TLR4 dans un modèle de neurite et un modèle de neuropathie trigéminales	191
III-4 Premiers résultats	191
<i>III-4-1 Altérations moléculaires différentielles dans les modèles IoN-SNS et IoN-CCI après prétraitement par LPS</i>	191
<i>III-4-2 Exploration d’un potentiel « profil moléculaire neuropathique »</i>	201
III-5 Implications cliniques	204
<i>III-5-1 Rôle promoteur de l’inflammation dans le développement des neuropathies post-traumatiques iatrogènes ?</i>	204
<i>III-5-2 Altérations constitutives de la voie Wnt/β-caténine ou de la voie Sonic Hedgehog et risque de développement de neuropathies périphériques</i>	205
 Limites	 207
 Conclusion	 209
 Table des illustrations	 211
 Liste des abréviations	 216
 Références bibliographiques	 220
 Annexes	 238

Avant-propos

« *Mal nommer les choses, c'est ajouter au malheur du monde.* »

Albert Camus

La nomenclature scientifique répond à des impératifs de rigueur et de transparence, nécessaires à la bonne diffusion et compréhension du savoir scientifique.

Afin d'en faciliter sa compréhension, ce travail a été rédigé selon les nomenclatures suivantes :

- Règles générales de nomenclature :

Sauf exception, ce travail a tenté de répondre au style édicté par le *National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK995/>)

- Nomenclature des gènes et protéines :

Chaque gène ou protéine étudié dans ce travail a été nommé selon la nomenclature internationale de la *NCBI Gene database* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). En accord avec les conventions internationales en vigueur, la typographie suivante a été respectée (pour les sigles uniquement, les versions complètes restant en minuscules) :

- *Modèles humains* : gène PROTÉINE
- *Modèles murins* : Gène PROTÉINE

- Sémantique de la description du phénotype douloureux chez l'animal :

Bien qu'il semble évident que les animaux (et notamment les rats) puissent présenter des comportements aversifs traduisant la perception d'un stimulus nociceptif, la notion même de douleur, au sens d'une expérience multidimensionnelle complexe (incluant des composantes affectives, émotionnelles, motivationnelles, etc...), est difficile à envisager *stricto sensu* chez l'animal (Vierck et al., 2008).

Par soucis de simplification, les termes « hyperalgésie », « allodynie » ou « douleur neuropathique » seront utilisés pour décrire le comportement animal observé (le cas échéant), selon leurs définitions respectives en médecine humaine, bien qu'il soit difficile d'appréhender rigoureusement ce type de sémiologie douloureuse chez l'animal.

Introduction

Introduction

Les douleurs neuropathiques définissent un ensemble complexe et hétérogène de douleurs pathologiques, le plus souvent chroniques, de diagnostic et traitement souvent extrêmement difficiles.

Comme de nombreuses autres formes de douleurs chroniques, elles impactent sévèrement la qualité de vie des patients et entraînent de lourdes conséquences sanitaires et économiques pour la société (Breivik et al., 2006 ; Smith et al., 2013).

Du fait de l'errance diagnostique importante associée à ses pathologies et de stratégies thérapeutiques souvent peu efficaces (Costigan et al., 2009a ; Xu et al., 2012), ces douleurs peuvent être considérées comme un véritable fléau de santé publique (Xu et al., 2012 ; Smith et al., 2013).

L'amélioration de la compréhension et de la prise en charge de ces pathologies douloureuses très hétérogènes représente donc un enjeu majeur sur le plan sociétal, économique et scientifique.

1. Définition des douleurs neuropathiques

L'association internationale pour l'étude de la douleur (*International Association for the Study of Pain*, IASP) définit la douleur neuropathique comme « *une douleur provoquée par une lésion ou pathologie du système nerveux somato-sensoriel* » (IASP, 2012).

Historiquement, la première définition de la douleur neuropathique a été introduite officiellement en 1994 par l'IASP, en remplacement de l'ancien terme de « douleur de désafférentation », la définissant comme « *une douleur initiée ou causée par une lésion primaire ou un dysfonctionnement du système nerveux* ». En 2008, un groupe de travail initié par le *Special Interest Group in Neuropathic pain* de l'IASP (NeuPSIG) soulignait la nécessité de distinguer la douleur neuropathique de la douleur nociceptive survenant indirectement lors de pathologies neurologiques ou de pathologies douloureuses avec des changements neuroplastiques secondaires survenant au sein du système nociceptif. Il proposa ainsi une nouvelle définition en supprimant le terme « dysfonctionnement » : « *une douleur survenant en conséquence directe d'une lésion ou maladie affectant le système somato-sensoriel* ». Une version très légèrement modifiée de cette définition fut ensuite proposée par

le comité de taxonomie de l'IASP puis validée : « une douleur causée par une lésion ou pathologie du système nerveux somato-sensoriel ».

L'omission du terme « dysfonctionnement » permettait ainsi d'exclure les pathologies impliquant des changements mal définis du système nerveux et des pathologies sans altération reconnue du système nerveux somato-sensoriel, de la définition des douleurs neuropathiques.

La restriction de la définition des douleurs neuropathiques au système nerveux somato-sensoriel est importante car certains types de douleurs telles que des douleurs musculo-squelettiques consécutives à des pathologies du système nerveux moteur (ex : les douleurs de spasticité) ne doivent pas être confondues avec des douleurs neuropathiques.

Enfin, le terme « primaire » a été omis de la dernière définition du fait de la difficulté de distinguer précisément des causes primaires et secondaires de douleurs neuropathiques ; néanmoins cette omission suggère que des pathologies douloureuses nociceptives, qui sur le long terme peuvent générer des lésions du système nerveux somato-sensoriel, pourraient être finalement considérées comme en partie neuropathiques (Finnerup et al., 2016).

L'évolution de la définition « officielle » de la douleur neuropathique témoigne de la difficulté à établir précisément une entité nosologique pour un ensemble de pathologies d'étiologies et de mécanismes physiopathologiques variés.

2. Etiologies et épidémiologie des douleurs neuropathiques

Les douleurs neuropathiques peuvent avoir des étiologies distinctes et la notion de « douleur neuropathique » renvoie à une description clinique d'un tableau douloureux et non à un diagnostic (IASP, 2012).

La diversité étiologique des douleurs neuropathiques (Figure i-1) illustre les difficultés majeures rencontrées dans le diagnostic et le traitement de ces douleurs, en particulier pour les praticiens non spécialistes.

Figure i-1. Pathologies associées aux douleurs neuropathiques (d'après Stillman M, 2006).

Pathologies associées aux douleurs neuropathiques

Système nerveux central

- AVC - cortical et sous-cortical
- Lésions traumatiques de la moelle spinale
- Démýélinisation
- Syringomyélie et syringobulbie
- Lésions néoplasiques (et autres lésions compressives)
- Névralgies trigéminales et glossopharyngiennes
- Migraine*
- Fibromyalgie*

Système nerveux périphérique

- Compression nerveuse/neuropathies compressives
- Lésions nerveuses traumatiques
- Neuropathies ischémiques
- Polyneuropathies périphériques
- Plexopathies
- Compression de racines nerveuses
- Douleurs post-amputation ("membre fantôme")
- Névralgie post-herpétique
- Neuropathies liées au cancer (infiltration, traitement....)

* Douleurs neuropathiques possibles ou théoriques

Les douleurs neuropathiques peuvent ainsi avoir des origines (Bouhassira et Attal, 2007) :

- traumatiques (section nerveuse, compression d'origine iatrogène, traumatisme médullaire...),
- compressives (« piégeage » ou pincement d'un nerf dans un défilé anatomique, conflit vasculo-nerveux...),
- toxiques (neuropathie post-chimiothérapie...),
- métaboliques (neuropathie diabétique),
- infectieuses (névralgie post-herpétique...),
- ischémique (Accident Vasculaire Cérébral [AVC] cortical ou sous cortical).

Historiquement, compte-tenu d'une définition relativement vague et de l'absence de critères diagnostiques simples, valides et reconnus, il était très difficile de réaliser des études épidémiologiques en population générale pour établir une prévalence globale des pathologies douloureuses neuropathiques. Cependant, l'amélioration récente de la définition des douleurs neuropathiques et le développement de tests diagnostiques simples (Douleur Neuropathique en 4 questions [DN4], *Neuropathic Pain Symptom Inventory* [NPSI], PainDETECT ...) ont facilité la mise en place d'études épidémiologiques sur la douleur neuropathique (Bouhassira et Attal, 2007). Certaines études anciennes suggéraient que la douleur neuropathique affecterait 2 à 3 % de la population générale (Hall et al., 2006 ; Bouhassira et al., 2008) mais des études plus récentes suggèrent que la prévalence de douleurs présentant des caractéristiques neuropathiques se situe plutôt entre 7 et 10% de la population générale (Van Hecke et al., 2014).

3. Impact individuel et socio-économique des douleurs neuropathiques

Les douleurs neuropathiques chroniques ont un impact majeur sur la qualité de vie, tant sur le plan des relations familiales et sociales que des relations professionnelles (absentéisme professionnel), comme en témoignent diverses enquêtes épidémiologiques en population générale (Oster et al., 2005), en médecine générale ou dans des centres spécialisés (Galvez et al., 2007 ; Bouhassira et Attal, 2007).

Cet impact, corrélé à l'intensité douloureuse, peut être comparé à celui du cancer ou des pathologies cardiovasculaires sévères (Meyer-Rosberg et al., 2001).

De plus, il est souvent plus élevé que celui de patients présentant la même lésion nerveuse mais non douloureuse. Par exemple, chez les blessés médullaires, la douleur peut impacter

davantage la qualité de vie des patients que le déficit neurologique associé (Westgren et Levi, 1998).

L'impact individuel de la douleur neuropathique est également notable sur le plan psychologique et/ou psychiatrique. Ainsi, les patients douloureux neuropathiques présentent souvent des symptômes dépressifs, anxieux et des troubles du sommeil. Le retentissement émotionnel de ces douleurs est d'autant plus important que les patients estiment recevoir un bénéfice insuffisant de leurs traitements, souvent acquis au prix d'effets indésirables conséquents, responsables de leur arrêt dans plus de deux tiers des cas (Meyer-Rosberg et al., 2001). De plus, l'absence de reconnaissance précoce de ces douleurs peut contribuer à alourdir l'impact émotionnel négatif de ces dernières (Davies et al., 1994).

Au niveau professionnel, il est intéressant de noter que les patients présentant des douleurs ayant des caractéristiques neuropathiques sont plus souvent en arrêt de travail que ceux qui ont des douleurs non-neuropathiques (Torrance et al., 2006). Jusqu'à un patient sur deux peut ainsi voir son activité professionnelle affectée par la douleur neuropathique (McDermott et al., 2006 ; Tolle et al., 2006).

Sur le plan économique, ces douleurs neuropathiques peuvent générer des coûts directs et indirects importants pour la société, comme en témoigne une étude évaluant 602 patients douloureux neuropathiques (d'étiologies variées) consultant en médecine générale, qui montrait que 76% des patients avaient consulté un médecin au moins une fois au cours du mois écoulé et que 20% des patients avaient consulté 4 fois ou plus (McDermott et al., 2006). D'après une autre étude basée sur les données de compagnies d'assurance américaines de 55 686 patients douloureux neuropathiques, le coût annuel de prise en charge de ces patients représentait 3 fois celui de patients témoins, non neuropathiques (Berger et al., 2004).

4. Sémiologie générale et méthodologie diagnostique des douleurs neuropathiques

Suite à la nouvelle définition des douleurs neuropathiques, le NeuroPSIG proposa une démarche diagnostique permettant d'évaluer le degré de certitude avec lequel une origine neuropathique peut être évoquée pour un tableau douloureux donné (Finnerup et al., 2016).

Trois niveaux de certitude, stratifiés selon la présence d'arguments anamnestiques, cliniques et para-cliniques en faveur d'une douleur neuropathique, ont ainsi été proposés :

- douleur neuropathique possible,
- douleur neuropathique probable,
- douleur neuropathique certaine.

Cette démarche est résumée dans la Figure i-2.

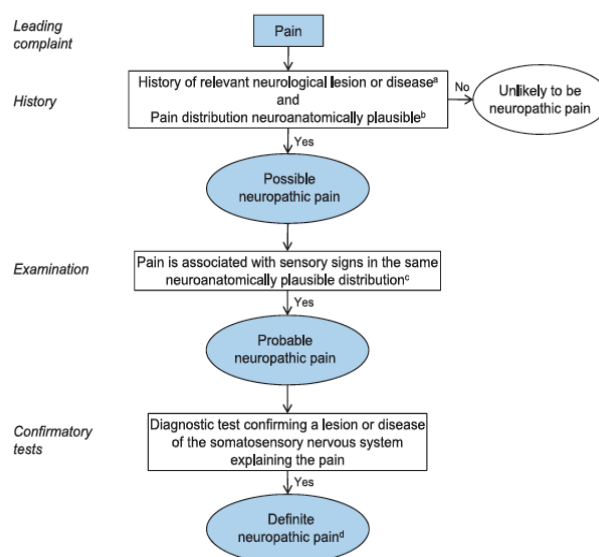


Figure i-2. Démarche diagnostique face à une douleur potentiellement neuropathique (d'après Finnerup et al., 2016).

Douleur neuropathique possible :

En premier lieu, l'interrogatoire du patient pourra suggérer que la cause de la douleur puisse être liée à une lésion ou une pathologie neurologique et à aucune autre cause, telle que l'inflammation ou un dommage tissulaire non-neuronal. Il sera important d'évaluer les descripteurs de la douleur, la présence d'anomalies sensibles non douloureuses ainsi que la présence de facteurs aggravants/calmants de la douleur.

Des descripteurs tels que « brûlure », « chaleur », « choc électrique », « élancement », « piquûre » ; une douleur au tact léger ou au froid ainsi que des sensations non douloureuses telles que des fourmillements ou un engourdissement suggèrent (de façon non pathognomonique) une origine neuropathique.

La combinaison de plusieurs descripteurs « neuropathiques » a une haute valeur discriminative et peut être explorée via des questionnaires tels que le *Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs* (LANSS), le *Neuropathic Pain Questionnaire* (NPQ), le questionnaire Douleur Neuropathique en 4 questions (DN4), le questionnaire painDETECT ou le questionnaire ID-Pain.

En outre, deux critères sont essentiels pour pouvoir évoquer une douleur neuropathique « possible » :

1) Présence d'un antécédent de lésion ou de maladie neurologique significative :

Il doit y avoir une suspicion clinique d'une lésion nerveuse somato-sensorielle comme par exemple une poussée de zona ou une lésion nerveuse post-traumatique. Le délai d'apparition est variable selon les pathologies impliquées, mais une corrélation étroite entre l'apparition de la douleur et la lésion est fortement évocatrice de neuropathie. En revanche, pour certaines pathologies telles que l'AVC ou la neuropathie diabétique, plusieurs mois voire plusieurs années peuvent s'écouler entre la lésion initiale et l'apparition de la douleur neuropathique.

2) La distribution de la douleur est neuro-anatomiquement plausible :

La distribution douloureuse doit être anatomiquement cohérente avec la localisation de la lésion nerveuse somato-sensorielle suspectée. Cela peut être assez difficile à évaluer à l'échelle du patient individuel car la douleur peut n'occuper qu'une petite partie du territoire d'innervation d'un nerf périphérique ou d'une zone de représentation somatotopique du corps dans le système nerveux central, voire à l'inverse s'étendre au delà de telles limites. Dans tous les cas, la topographie douloureuse devra être cohérente avec la topographie lésionnelle suspectée dans les grands tableaux douloureux neuropathiques.

La distribution neuro-anatomique habituelle des grands tableaux douloureux neuropathiques est illustrée dans la Figure i-3 :

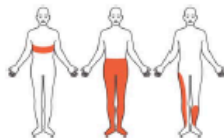
Common neuropathic pain conditions and neuroanatomically plausible distribution of pain symptoms and sensory signs.		
Neuropathic pain condition	Neuroanatomically plausible distribution of pain and sensory signs	Illustration of typical distribution
Trigeminal neuralgia	Within the facial or intraoral trigeminal territory.	
Postherpetic neuralgia	Unilateral distributed in one or more spinal dermatomes or the trigeminal ophthalmic division.	
Peripheral nerve injury pain	In the innervation territory of the lesioned nerve, typically distal to a trauma, surgery, or compression.	
Postamputation pain	In the missing body part and/or in the residual limb.	
Painful polyneuropathy	In feet, may extend to involve lower legs, thighs, and hands.	
Painful radiculopathy	Distribution consistent with the innervation territory of the nerve root.	
Neuropathic pain associated with spinal cord injury	At and/or below the level of the spinal cord lesion.	
Central poststroke pain	Contralateral to the stroke. In lateral medullary infarction, the distribution can also involve the ipsilateral side of the face.	

Figure i-3. Distribution neuro-anatomique usuelle des signes et symptômes observés dans les pathologies douloureuses neuropathiques les plus fréquentes (d'après Finnerup et al., 2016).

Douleur neuropathique probable :

Le niveau suivant de certitude repose sur des arguments issus de l'examen clinique, qui devra idéalement objectiver la présence de signes sensitifs négatifs, c'est à dire la perte partielle ou totale d'une ou plusieurs modalités sensitives concordant avec la lésion ou pathologie du système nerveux somato-sensoriel suspectée (ex : toucher léger, froid...). La démonstration de la perte d'une ou plusieurs modalités sensitives et la topographie précise de cette perte sont les éléments clés pour déterminer l'origine de cette altération sensitive. Bien que des pertes de

modalités sensibles puissent être observées dans des douleurs nociceptives, elles ne sont pas limitées sur le plan topographique au territoire de la zone lésée (contrairement aux douleurs neuropathiques).

Cette évaluation clinique s'appuiera sur différents tests et « outils » diagnostiques (Figure i-4).

Bedside sensory examination.	
Modality	Bedside assessment
Touch	Cotton bud or ball, painter's brush
Vibration	Tuning fork
Pinprick	Pin, toothpick, cocktail stick
Cold	Cold metal, tube with cold water, cloth with surgical spirit, Lindblom roller ²¹
Warm	Warm metal, tube with warm water, Lindblom roller ²¹

Figure i-4. Techniques d'évaluation clinique des différentes modalités sensibles (d'après Finnerup et al., 2016).

Il est important de noter que des signes sensitifs positifs (tels que l'hyperalgésie à la pression) sont moins prégnants dans l'évaluation de la probabilité d'une douleur neuropathique, surtout si leur distribution ne respecte pas le territoire de la zone lésée. En effet, de tels signes peuvent être observés dans le cas de douleurs inflammatoires, de douleurs inexplicables, d'anxiété ou d'insomnies et peuvent être affectés par le stress et les émotions négatives.

De plus, certaines pathologies neuropathiques ne requièrent pas nécessairement une perte sensitive comme critère diagnostique. C'est notamment le cas des canalopathies héréditaires ou de certaines lésions nerveuses. Par exemple, la névralgie trigéminalle peut être considérée comme une douleur neuropathique particulière, en ceci que des déficits sensitifs sont rarement observés à l'examen clinique (sauf via des tests sensoriels quantitatifs [QST]). En revanche, le déclenchement stéréotypé de crises douloureuses consécutives à la stimulation d'une zone gâchette est très évocateur du diagnostic. Enfin, dans le cas des canalopathies qui se présentent sous la forme d'accès douloureux paroxystiques, l'examen clinique peut être normal entre les crises. Ainsi des antécédents de symptômes caractéristiques pourront remplacer les signes sensitifs positifs dans l'élaboration du diagnostic de telles pathologies neuropathiques.

Dans la majorité des cas, des changements sensitifs au toucher léger, à la vibration, à la piqûre, au froid ou au chaud pourront être objectivés à l'examen clinique, mais des analyses plus poussées de type QST pourront s'avérer nécessaires. Evidemment, dans les cas de

douleurs profondes somatiques ou viscérales, une telle évaluation clinique est particulièrement délicate.

Douleur neuropathique certaine :

Le dernier niveau de certitude requiert un test diagnostique objectif pour confirmer la lésion ou la pathologie du système nerveux somato-sensoriel. Ceci n'est pas forcément possible en environnement non spécialisé.

Ces tests diagnostiques incluent :

- la Tomodensitométrie (TDM), l'Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM) ou d'autres techniques d'imageries pour confirmer la présence d'un AVC, d'une Sclérose en Plaques (SEP), d'une lésion de la moelle épinière ou une lésion nerveuse ;
- une biopsie cutanée pourra révéler une diminution de la densité intra-épidermique en fibres nerveuses ;
- des explorations neurophysiologiques pourront également être envisagées telles que des tests de conduction nerveuse, l'étude de la composante R1 du réflexe de clignement ou la microneurographie ;
- des tests génétiques pourront confirmer la possibilité d'une douleur neuropathique héréditaire.

De tels examens ne seront pas nécessaires face à une douleur post-amputation ou une lésion nerveuse objectivée en peropératoire par le chirurgien, dans la mesure où la lésion nerveuse est certaine dans ce contexte clinique particulier.

L'objectivation d'une lésion du système somato-sensoriel n'établit cependant pas formellement un lien de causalité avec la douleur neuropathique ressentie, d'autres étiologies douloureuses pouvant coexister ou se surajouter au tableau clinique.

A ce stade, il est important de se rappeler que la douleur peut toujours être causée par une pathologie nociceptive non neurologique et qu'il persiste donc toujours une incertitude quant à l'origine d'un tableau douloureux, même fortement évocateur de neuropathie (Finnerup et al., 2016).

5. Approches expérimentales et modélisation des douleurs neuropathiques

Pendant longtemps, la survenue de symptômes douloureux dans un territoire rendu « anesthésié » par une lésion nerveuse périphérique ou dans un membre disparu (douleur « fantôme » des amputés) était considérée hautement paradoxale. Cependant, les schémas physiopathologiques ont beaucoup évolué dès la fin des années 1980, principalement grâce au développement de modèles animaux de lésions nerveuses, mimant une « symptomatologie » rappelant celle observée en clinique chez les patients neuropathiques (Bouhassira et Attal, 2007), ce qui s'est traduit par un engouement majeur pour la recherche fondamentale et clinique comme en témoignent les données bibliométriques de la base de données MEDLINE, résumée dans le tableau i-1, ci-après :

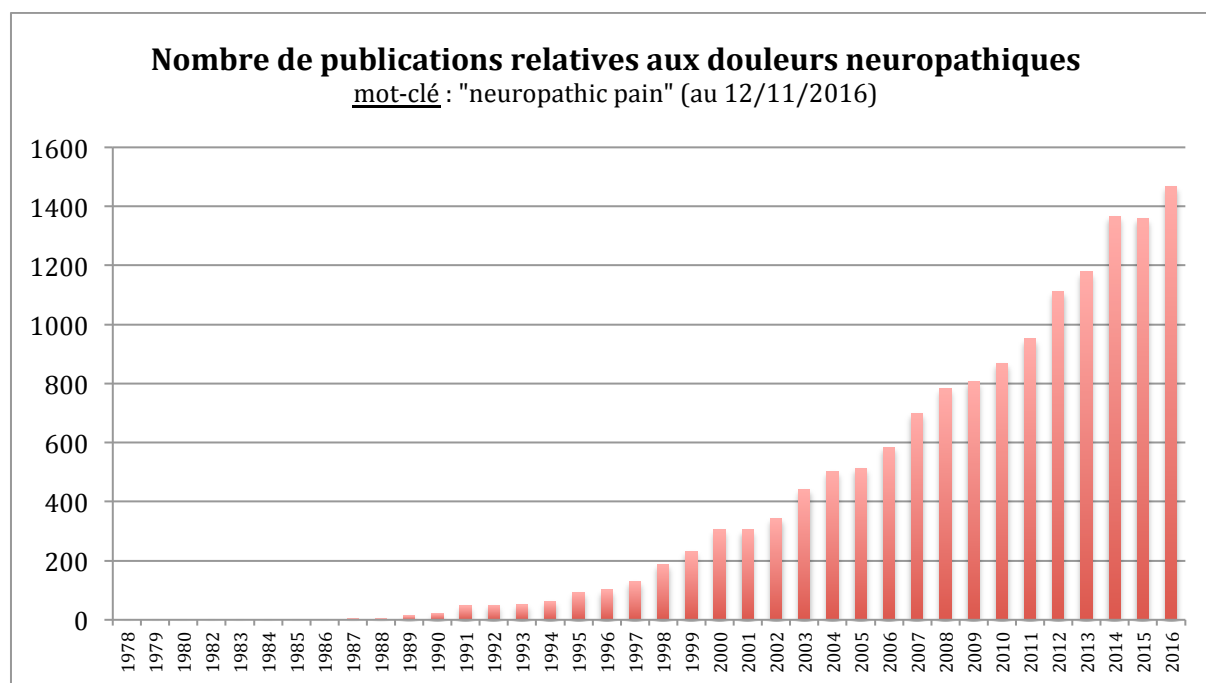


Tableau i-1. Données bibliométriques sur le nombre de publications relatives aux douleurs neuropathiques (base de donnée MEDLINE).

Ces modèles animaux ont permis de révéler la multiplicité et la complexité des modifications périphériques et centrales impliquées dans les douleurs neuropathiques et d'en faciliter la compréhension à l'échelle cellulaire et moléculaire. Ainsi, la complexité des douleurs neuropathiques a pu être mise en évidence, une lésion donnée pouvant entraîner plusieurs mécanismes physiopathologiques différents et un même mécanisme physiopathologique pouvant être associé à des lésions diverses. Ces données expérimentales et cliniques tendent à confirmer la nature « trans-étiologique » des douleurs neuropathiques (Bouhassira et Attal, 2007).

A ce jour, il existe plusieurs dizaines de modèles animaux de douleurs neuropathiques, principalement des modèles de neuropathies périphériques, séparables schématiquement en deux grandes catégories :

- les modèles « étiopathogéniques » qui reproduisent une lésion (ex : traumatisme nerveux périphérique) ou un mécanisme lésionnel (ex : métabolique ou toxique), tels que les modèles de section nerveuse (abandonnés aujourd'hui car induisant des autotomies chez l'animal et générant un comportement douloureux très éloigné de celui observable chez l'homme) ou les modèles métaboliques (ex : neuropathie diabétique) ou toxiques (ex : neuropathie chimio-induite) ;
- les modèles « symptomatiques » qui visent à reproduire une symptomatologie proche de celle observée en clinique, tels que la constriction chronique du nerf sciatique, la transection partielle du nerf sciatique ou la ligature des nerfs spinaux.

Les principaux modèles animaux de douleurs neuropathiques périphériques et centrales sont présentés dans le tableau i-2 :

Modèles animaux de « douleurs neuropathiques » (d'après Bouhassira et Attal, 2007)	
<i>Lésions périphériques</i>	<i>Lésions centrales</i>
Neuropathie traumatique • Section nerveuse et névrome expérimental (Wall et al., 1979) • Section des racines dorsales (Lombard et al., 1979) • Ecrasement du nerf sciatique (Kerns et al., 1991) • Cryoneurolyse du nerf sciatique (DeLeo et al., 1994) • Constriction chronique du nerf sciatique (Bennett et Xie, 1988) • Transection partielle du nerf sciatique (Seltzer et al., 1990) • Ligature des nerfs spinaux (Kim et al., 1992) • Constriction chronique du nerf infra-orbitaire (Vos et al., 1994) • Résection des nerfs caudaux (Na et al., 1994) • Enserrement du nerf sciatique (Mosconi et Kruger, 1996) • Dénervation partielle (Decorsted et Woolf, 2000) • Lésion partielle du nerf saphène (Walzack et al., 2005) Neuropathie métabolique • Diabète induit par la streptozotocine (Wuarin-Bierman et al., 1987)	• Lésion médullaire « photochimique » (Xu et al., 1992) • Lésion médullaire par injection de cytokines (Yezierski et al., 1998)

Neuropathie toxique • Traitement par la vincristine (Aley et al., 1996) • Traitement par le taxol (Authier et al., 2000) • Traitement par le cisplatine (Authier et al., 2000) • Traitement par l'oxaliplatine (Ling et al., 2006) Neuropathie inflammatoire • Névrite du nerf sciatique (Eliav et al., 1999)	
--	--

Tableau i-2. Principaux modèles animaux de « douleurs neuropathiques » (d'après Bouhassira et Attal, 2007).

Malgré le nombre conséquent de modèles animaux développés ces 30 dernières années et leur utilisation importante en recherche fondamentale et préclinique, ces modèles présentent des limitations qu'il convient de souligner.

La principale limite de ces modèles est leur faible prédictibilité clinique, en particulier en termes d'effets de nouveaux agents pharmacologiques. Ainsi de nombreuses molécules (antidépresseurs, antiépileptiques, etc...) ayant un effet anti-nociceptif prononcé chez l'animal peuvent ne présenter qu'un effet modeste chez l'homme, remettant en question la pertinence clinique de ces modèles (Bouhassira et Attal, 2007).

De plus, la plupart des modèles animaux de douleurs neuropathiques périphériques impliquent une lésion nerveuse partielle, se manifestant par une hypersensibilité aux stimuli nociceptifs et non nociceptifs dans le territoire non lésé avoisinant. Cependant, ces modèles ne distinguent pas les mécanismes cellulaires et moléculaires spécifiquement impliqués dans la genèse de la douleur neuropathique des conséquences plus générales de la lésion nerveuse, incluant les phénomènes de régénération nerveuse, le stress cellulaire ainsi que les altérations des voies métaboliques cellulaires et des voies de survie cellulaire qui en résultent (Costigan et al, 2009b).

Enfin, la définition de « douleur » impliquant plusieurs composantes (sensori-discriminative, affective, motivationnelle, etc...), il est souvent impossible d'évaluer *stricto sensu* de telles composantes et donc impropre de parler d'évaluation de la « douleur » chez l'animal. Il s'agit donc plutôt d'évaluer des réactions aversives à un stimulus nociceptif, qui ne sont que des marqueurs indirects de « douleur » chez l'animal (Vierck et al., 2008).

Néanmoins, malgré ces limitations et en l'absence d'alternatives fiables et envisageables (sur le plan technique, financier et surtout éthique), ces modèles restent une approche expérimentale intéressante pour l'étude des mécanismes physiopathologiques des différents types de douleurs, en particulier des douleurs neuropathiques.

6. Spécificités des douleurs neuropathiques post-traumatiques

Les douleurs neuropathiques post-traumatiques représentent une part importante de l'ensemble des douleurs neuropathiques. Parmi elles, les douleurs neuropathiques périphériques post-traumatiques d'origine iatrogène sont les plus fréquentes.

Globalement, les lésions nerveuses périphériques sont rencontrées dans 3 à 8 % de la population mondiale (Hughes, 2002) et les lésions nerveuses post-chirurgicales sont fréquemment observées pour les nerfs suivants (Bouhassira et Attal, 2007) :

- nerf thoracique (après thoracotomie),
- nerf intercostobrachial (après mastectomie),
- nerf crural (après pose de prothèse totale de hanche ou chirurgie abdominale),
- nerf médian ou de ses branches (après chirurgie d'un syndrome canalaire),
- nerf saphène (après stripping de varices),
- nerf alvéolaire inférieur ou nerf lingual (après avulsion de dents de sagesse),
- nerf infra-orbitaire (après chirurgie sinusienne).

Sur le plan mécanistique, la douleur neuropathique périphérique post-traumatique serait le reflet de l'excitabilité aberrante des neurones de la corne dorsale médullaire provenant de modifications moléculaires et cellulaires dans la corne dorsale après lésion nerveuse périphérique (Costigan et al., 2009a). Les douleurs spontanées et provoquées consécutives à une lésion nerveuse résulteraient ainsi de l'hyperexcitabilité de neurones sensitifs primaires ou secondaires générée notamment par des neurotrophines ou des cytokines pro-inflammatoires libérées par des cellules inflammatoires activées, dont la microglie (activée au niveau de la corne dorsale médullaire) et les macrophages envahissant le site lésionnel et les ganglions de racines dorsales des zones de projections des neurones primaires lésés (Hu et al., 2007). Ce rôle majeur de l'inflammation dans la genèse de la douleur neuropathique périphérique post-lésionnelle est confirmé sur le plan expérimental par la diminution voire l'abolition de la douleur après des interventions pharmacologiques visant à bloquer soit diverses cytokines ou protéines du complément, soit l'activation microgliale consécutive à la lésion nerveuse (Hu et al., 2007).

D'autres altérations se surajoutent à la physiopathologie complexe de ces neuropathies douloureuses telles que d'autres interactions neuro-immunes, la genèse de potentiels d'actions

ectopiques ainsi que la facilitation et désinhibition de la transmission synaptique (Costigan et al., 2009a).

Les mécanismes physiopathologiques à l'origine des douleurs neuropathiques périphériques post-traumatiques seront détaillés dans la première partie de ce travail, avec une attention particulière pour les altérations nerveuses post-traumatiques au niveau cellulaire et moléculaire ainsi qu'aux perturbations de la nociception périphérique qui en résultent.

Première partie :
**Physiopathologie des douleurs neuropathiques
périphériques post-traumatiques**

I – Physiopathologie des douleurs neuropathiques périphériques post-traumatiques

I-1 Physiologie de la nociception périphérique

I-1-1 Structure et ultrastructure du nerf périphérique

Les nerfs périphériques sont responsables de la transmission nerveuse afférente du système nerveux périphérique (SNP) vers le système nerveux central (SNC) ainsi que de la transmission nerveuse efférente du SNC vers le SNP, essentielle à la mise en place de fonctions effectrices telles que la locomotion.

Cette transmission nerveuse se fait sous la forme d'impulsions électriques générées et dirigées par un processus séquentiel de dépolarisation axonale puis de repolarisation, un processus dépendant de flux calciques et potassiques au niveau de la membrane neuronale. Ce processus est crucial pour le fonctionnement physiologique humain ; de fait, le gradient ionique au sein des nerfs périphériques doit être étroitement régulé pour prévenir des variations de concentrations locales en sodium ou potassium qui altèreraient la transmission nerveuse. De la même façon, les solutés et les macromolécules pouvant influencer l'équilibre ionique au niveau des nerfs périphériques doivent également être étroitement régulés (Ubogu, 2013).

Sur le plan histologique, les nerfs périphériques sont composés de fibres nerveuses et d'un ensemble de populations cellulaires responsables du maintien de l'homéostasie ionique et immunitaire, incluant : cellules endothéliales, fibroblastes, cellules de Schwann, cellules satellites, cellules dendritiques, macrophages résidents et mastocytes (Sapienza et al., 2014). Les macrophages résidents et les mastocytes pourraient agir comme les premiers acteurs de la réponse à une lésion de l'endonèvre (la zone la plus centrale du nerf) et participer à la réaction immunitaire innée en réponse à des pathogènes exogènes. Des lymphocytes T peuvent être également exceptionnellement observés dans des nerfs sains, jouant probablement un rôle dans la surveillance immunitaire (Ubogu, 2013).

Au niveau anatomique, les nerfs périphériques sont composés de 3 couches conjonctives concentriques (de la périphérie vers le centre) : l'épînèvre, le périnèvre et l'endonèvre (Figure I-1). La structure de ces couches est intimement liée à leur fonction de barrière, protégeant les structures nerveuses conductrices (Peltonen et al., 2013).

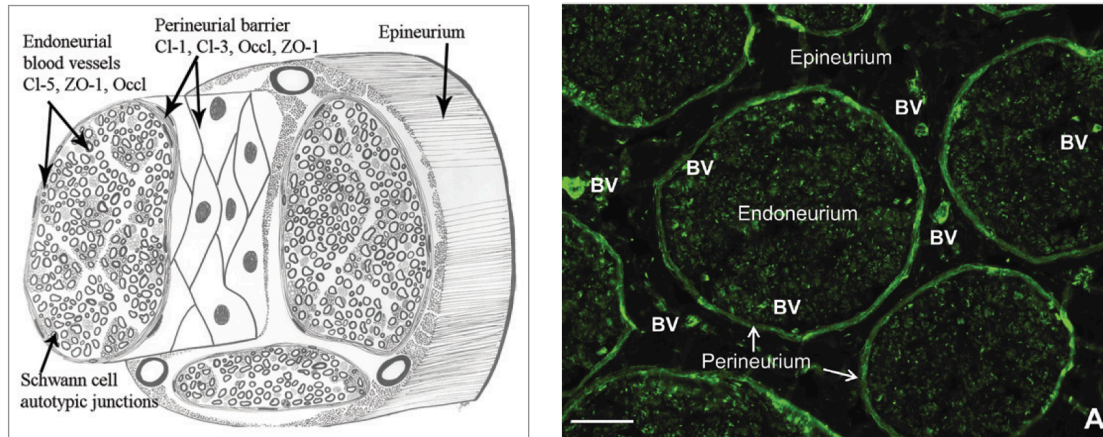


Figure I-1. Structure du nerf périphérique. Vue schématisée (gauche) et en microscopie confocale à fluorescence (droite) des 3 couches du nerf : l'épînèvre (*epineurium*), le périnèvre (*perineurium*) et l'endonèvre (*endoneurium*). BV = Blood Vessel (d'après Peltonen et al., 2013 [gauche] et Ubogu, 2013 [droite]).

L'épînèvre (*epineurium*) est composé principalement d'une matrice extracellulaire (MEC) collagénique qui entoure la totalité du nerf et ses différents fascicules. Il contribue à la résistance à la traction du nerf mais ne forme pas directement de barrière (Peltonen et al., 2013).

Le périnèvre (*perineurium*) isole des groupes d'unités « axone-cellule de Schwann » pour former des fascicules nerveux constituant ainsi la barrière principale entre l'endonèvre et les tissus extra-fasciculaires (épineuraux). Le périnèvre est composé de couches concentriques de cellules périneurales (d'origine fibroblastique) larges et plates (Figure I-1 gauche). Le nombre de couches cellulaires périneurales varie selon le nombre et la taille des fascicules du nerf ; les fascicules les plus larges, retrouvés dans le nerf sciatique, pouvant compter jusqu'à 15 couches. L'épaisseur du périnèvre diminue vers la périphérie du nerf où les plus petits fascicules peuvent ne comporter qu'une ou deux couches périneurales. Des petites poches de MEC sont également présentes entre les différentes cellules périneurales (Peltonen et al., 2013). Cette MEC est composée de différents collagènes fibrillaires et micro-fibrillaires ainsi que de fibronectine qui procurent au périnèvre sa capacité à moduler les forces de traction

externes permettant ainsi la régulation de la pression endoneurale et la protection du nerf contre de telles forces, nocives pour le nerf (Pina-Oviedo et Ortiz-Hidalgo, 2008).

Les cellules périneurales peuvent produire un nombre important de molécules composant la MEC. Chaque couche de cellules périneurales est entourée d'une membrane basale importante qui dans les plus gros nerfs peut atteindre 500 nm d'épaisseur et qui agit comme une barrière moléculaire supplémentaire. Les cellules périneurales sont connectées les unes aux autres via des jonctions serrées, formant une véritable barrière périneurale. Cette barrière de diffusion, métaboliquement active, permet le maintien de l'homéostasie de l'endonèvre, dont le maintien d'une pression intra-fasciculaire constante. La barrière périneurale présente 3 composants structurels et fonctionnels (Peltonen et al., 2013) :

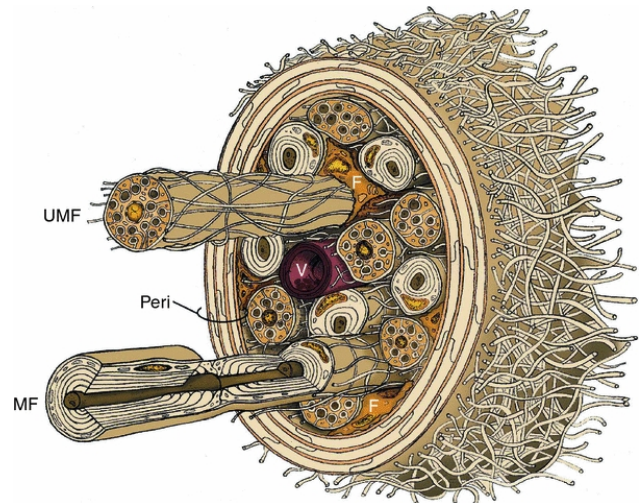
- 1) une membrane basale entourant chaque couche de cellules périneurales,
- 2) des jonctions serrées entre les cellules périneurales avoisinantes composées d'occludine, de Zonula-Occludens-1 (ZO-1), de claudine-1 et claudine-3 (avec également la possibilité de dimères de claudines : claudine 1/1, claudine 1/3 ou claudine 3/3) (Figure I-1 gauche),
- 3) un transport trans-cellulaire actif à travers les cellules périneurales (seul le GLUT-1 a été localisé pour le moment au niveau du périnèvre humain et de rat).

Des études de perméabilité et d'électrophysiologie ont montré que cette barrière périneurale est une barrière serrée mais sélective. Elle sert à protéger le nerf et restreint notamment la diffusion des analgésiques au niveau du nerf périphérique. Elle joue également un rôle important dans la réparation nerveuse post-traumatique. Ainsi, à la suite d'une lésion nerveuse compressive, une ouverture de la barrière périneurale se produit induisant une perturbation de l'homéostasie nerveuse (Peltonen et al., 2013). Dans le modèle expérimental de « fenêtre périneurale », l'excision localisée du périnèvre induit une démyélinisation focale des fibres nerveuses au centre des fascicules. A une semaine, des signes de régénération peuvent être observés avec réapparition d'une couche périneurale fine et de jonctions serrées (Sugimoto et al., 2002). Dans un modèle de lésion nerveuse périphérique, après ligature du nerf sciatique pendant 24 heures, l'expression périneurale de claudine-1 était récupérée en 2 jours. Les jonctions gap réapparaissaient plus tardivement à 5 jours et la régénération nerveuse était complète à 7 jours (Hirakawa et al., 2003).

L'endonèvre contient des groupes d'unités « axone-cellule de Schwann » enchâssées dans une MEC composée de fines fibrilles de collagènes, ayant une consistance de gel. Les axones de chaque unité sont recouverts de cellules de Schwann qui forment la gaine myélinisée ou

amyélinique. Les membranes cellulaires des cellules de Schwann myélinisantes s'enroulent autour de l'axone formant ainsi une structure multi-lamellaire (Figure I-2).

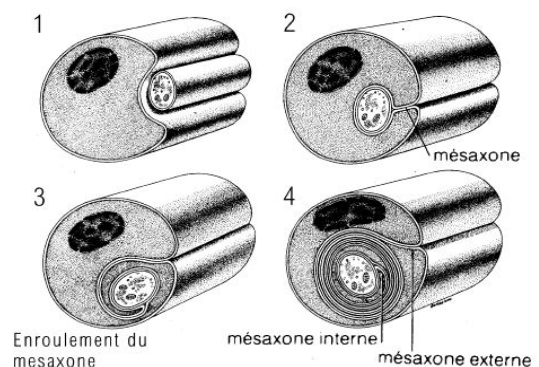
Figure I-2. Structure de l'endonèvre. Vue schématique représentant les fibres nerveuses myélinisées (MF) et non myélinisées (UMF) entourées de fibroblastes endoneuraux (F) et de micro-vaisseaux endoneuraux (V), le tout protégé par la barrière périneurale (Peri) (d'après Mizisin et Weerasuriya, 2011).



La gaine de myéline ainsi formée est divisée en compartiments de myéline compacte et non-compacte. La myéline non-compacte est présente uniquement en 3 endroits :

- 1) à proximité des nœuds de Ranvier (région para-nodale),
- 2) dans les incisures de Schmidt-Lanterman localisées à l'intérieur de la gaine de myéline compacte,
- 3) dans les mésaxones (zones d'accolement de deux parties de la même membrane plasmique d'une cellule de Schwann qui s'invagine puis s'enroule autour d'un axone) internes et externes, là où il existe le plus grand espacement entre les 2 parties de la même membrane plasmique (Figure I-3).

Figure I-3. Formation des mésaxones lors de la myélinisation des axones par les cellules de Schwann. Vue schématique représentant une cellule de Schwann s'enroulant autour d'un axone pour former la gaine de myéline (schéma obtenu à l'adresse : <http://www.db-gersite.com/HISTOLOGIE/HISTGENE/histgen1/histgen7/histgen7.htm>)



Cette division de la myéline en zones compactes et non-compactes est matérialisée par la présence de jonctions autotypiques entre les membranes de la même cellule de Schwann. La fonction exacte de ces jonctions autotypiques est encore inconnue, mais il a été suggéré qu'elles séparent la membrane externe et le compartiment extracellulaire de la zone de

myéline compacte, mais également qu'elles lieraient les membranes entre elles pour renforcer leur résistance mécanique (Peltonen et al., 2013). De plus, ces jonctions contenant des claudines, elles pourraient avoir un effet sur la conduction nerveuse, tel que suggéré par les résultats de modèles murins KO pour la Claudine-19 (Miyamoto et al., 2005).

Ces jonctions autotypiques incluent des jonctions adhérentes, serrées et gap, mais il semblerait que la composition de ces dernières diffère de leurs équivalents épithéliaux. La composition des jonctions autotypiques des cellules de Schwann a surtout été étudiée chez les rongeurs qui expriment Claudine-1, 2, 5, 19 et ZO-1, 2 dans les cellules de Schwann. La Claudine-19 est très exprimée dans les nerfs périphériques de souris, localisée aux incisures de Schmidt-Lanterman, à la région paranodale et aux mésaxones internes et externes. La Tricelluline a également été montrée chez la souris dans les mêmes localisations. En revanche, ni la claudine-19 ni la tricelluline n'ont été étudiées chez l'humain (Peltonen et al., 2003).

En revanche, les claudines-1, 2 et la ZO-1, de même que l'E-cadhérine ont été retrouvées dans la région paranodale chez l'homme. Les incisures de Schmidt-Lanterman sont composées quant à elles de claudine-1, 2, 3, 5, ZO-1, occludine et E-cadhérine. Les mêmes composants (claudine 1, 2, 3, ZO-1, occludine et E-cadhérine) ont été retrouvés dans les mésaxones à l'exception de la claudine-5 (Figure I-4).

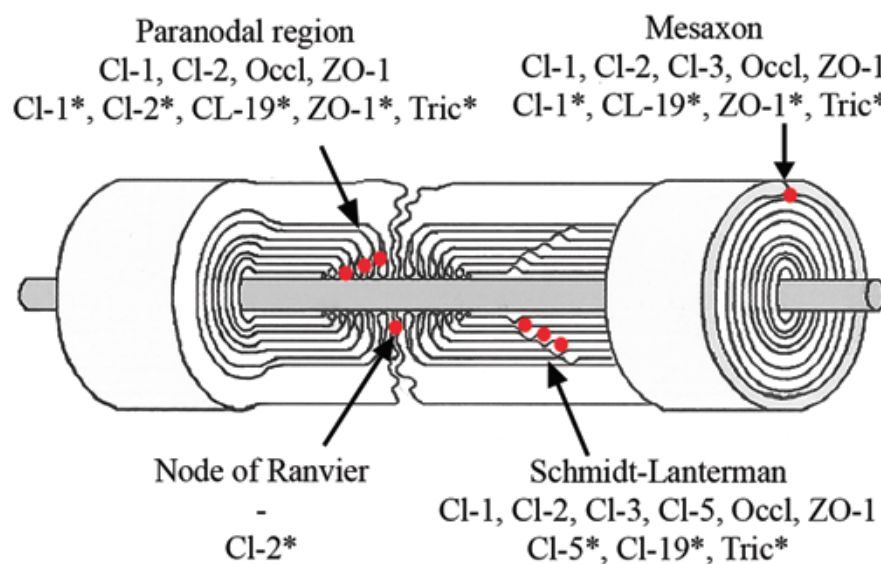


Figure I-4. Composition des jonctions autotypiques des cellules de Schwann. Vue schématique représentant la localisation des jonctions autotypiques (points rouges) et les protéines de jonction qui les composent (* chez les rongeurs) (d'après Peltonen et al., 2013)

De façon étonnante, des mutations humaines des gènes codant pour les *claudines 1, 14, 16* ou *19* ont été décrites mais aucune ne s'accompagne d'une symptomatologie au niveau des nerfs périphériques. De plus, la mutation de la claudine-19 humaine n'altère pas le système nerveux périphérique, malgré sa grande expression dans les jonctions autotypiques des cellules de Schwann chez la souris (son expression n'ayant pas été étudiée chez l'homme dans cette localisation pour le moment) (Peltonen, et al. 2013).

I-1-2 Vascularisation du nerf périphérique et rôle de la barrière hémato-nerveuse

Les nerfs périphériques ayant une organisation structurale en plusieurs couches (épinèvre, périnèvre et endonèvre), ils présentent un réseau vasculaire anastomotique irriguant ces différentes couches (Figure I-5). Le réseau vasculaire des nerfs périphériques provient de branches radiaires d'artères avoisinantes, formant le « vasa nervorum » qui parcourt le nerf dans le sens longitudinal au sein de l'épinèvre. Ces vaisseaux génèrent des ramifications qui traversent plus profondément le nerf au niveau de l'épinèvre, formant des petites artères et artéριοles, jusqu'aux artéριοles pré-capillaires qui parcourent la surface externe du périnèvre. Ces vaisseaux produisent alors des branches qui pénètrent les couches concentriques du périnèvre pour entrer dans l'endonèvre, formant des capillaires. Ces capillaires se drainent au sein de veinules post-capillaires plus larges au sein de l'endonèvre, puis de veinules émergeant à travers le périnèvre. Les veinules et les petites veines parcourent l'épinèvre longitudinalement, se rejoignant pour former des veines plus importantes, drainant le nerf périphérique dans des veines avoisinantes via des branches radiaires.

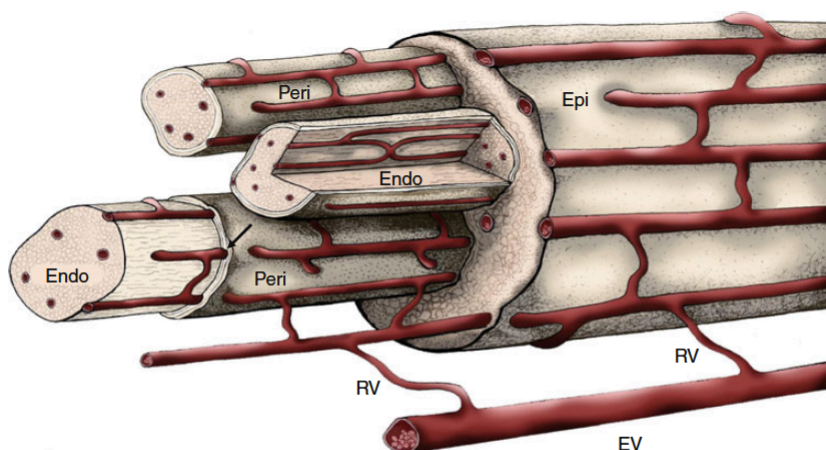


Figure I-5. Vascularisation du nerf périphérique. Vue schématique de la vascularisation (artérielle) des différentes couches du nerf (d'après Mizisin et Weerasuriya, 2011).

Sur le plan ultrastructural, le réseau vasculaire des nerfs périphériques est composé de multiples jonctions serrées denses aux électrons entre les cellules endothéliales de l'endonèvre, avec de petites vésicules intracellulaires de pinocytose de 50-100 nm de diamètre. Ces cellules endothéliales ne sont pas fenêtrées, à l'inverse des cellules endothéliales épineurales et périneurales contenant de nombreuses fenestrations et n'ayant pas de jonctions serrées. Ces cellules endothéliales microvasculaires endoneurales peuvent donc être considérées comme des cellules endothéliales microvasculaires spécialisées (dont les caractéristiques moléculaires sont résumées dans le tableau I-1), formant une véritable barrière hémato-nerveuse (à l'instar de la barrière hémato-encéphalique ou de la barrière hémato-testiculaire par exemple).

Cellules endothéliales endoneurales humaines (d'après Ubogu, 2013)	
<i>Marqueurs vasculaires endothéliaux</i>	UEA1, FvW
<i>Ligands/récepteurs de facteurs de croissance</i>	VEGF, GFR α 1 (mais pas son ligand le GDNF)
<i>Protéines de jonctions serrées et adhérentes</i>	claudines 1, 2, 5, 12, 19 occludine, ZO-1, 2 JAM-A, VE-cadhérine et β -caténine
<i>Transporteurs</i>	<u>Transporteurs ioniques</u> : phosphatase alcaline <u>Transporteurs de nutriments</u> : GLUT-1, MCT-1, CRT, LAT-1 <u>Transporteurs de xénobiotiques</u> : P-gp, MRP1, OATP-C, OAT-3
<i>Molécules d'adhésion cellulaire et chémokines</i>	<u>Molécules d'adhésion cellulaire</u> : E-sélectine, P-sélectine, CD34, ICAM-1, JAM-A, VCAM-1 ; FN CS1, PECAM-1 <u>Chimiokines</u> : <i>Expression constitutive</i> : CXCL1-3, CXCL5, CXCL7, CXCL8, CXCL10, CCL4, CCL22, CCL23, CCL24, CCL26 <i>Expression induite</i> : CCL2, CCL20, CCL27, CXCL9, CXCL11

Tableau I-1. Composants moléculaires des cellules endothéliales endoneurales humaines. UEA1 = Ulex Europaeus Agglutinin 1 ; FvW = Facteur de von Willebrand ; VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor ; GFR α 1 = GDNF Family Receptor α 1 ; GDNF = Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor ; ZO = Zonula Occludens ; JAM = Junctional Adhesion Molecule ; VE-cadhérine = Vascular Endothelial-cadhérine ; GLUT-1 = GLUcose Transporter 1 ; MCT-1 = MonoCarboxylate Transporter 1 ; CRT = CReatine Transporter ; LAT-1 = L-type Amino acid Transporter 1 ; P-gp = P-glycoprotein ; MRP-1 = Multidrug Resistance Protein 1 ; OATP-C = Organic Anion Transporting Polypeptid C ; OAT-3 = Organic Anion Transporter 3 ; CD = Cluster of Differentiation ; ICAM-1 = InterCellular Adhesion Molecule 1 ; VCAM-1 = Vascular Cell Adhesion Molecule 1 ; FN CS1 = FibroNectin containing the CS1 region ; PECAM-1 = Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 ; CXCL = Chemokine (C-X-C motif) Ligand ; CCL = Chemokine (C-C motif) Ligand (d'après Ubogu, 2013).

Du fait de l'absence de système lymphatique au niveau de l'espace endoneural, des altérations de la pression capillaire se traduiront par une accumulation liquidienne rapide et l'apparition d'un œdème endoneural, entraînant des lésions neuronales locales (Mizisin et Weerasuriya, 2011).

Par ailleurs, l'absence de jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales macrovasculaires épineurales, de même que la présence de fenestrations entre ces cellules, suggère que des solutés, macromolécules et autres substances d'origine sanguine peuvent diffuser dans l'épinèvre et influencer la constitution du fluide interstitiel. L'épinèvre étant principalement constitué de trames de fibres conjonctives disposées longitudinalement (nécessaires au maintien de l'intégrité structurelle du nerf), ces substances peuvent diffuser librement au sein de cette couche (Ubogu, 2013).

Ainsi, la barrière périneurale protège l'endonèvre de la diffusion passive de substances issues du fluide interstitiel épineural alors que les cellules endothéliales microvasculaires endoneurales, en contact direct avec les substances issues du sang circulant, forment - quant à elles - la barrière hémato-nerveuse (BHN), protégeant le microenvironnement nerveux endoneural des agressions extérieures (Ubogu, 2013).

La structure de la BHN est différente de son pendant central, la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE). Les cellules endothéliales hautement différenciées qui composent à la fois la BHE et la BHN sont complètement entourées d'une membrane basale au sein de laquelle sont retrouvés de nombreux péricytes. En revanche, dans la BHE, la partie abluminale de ce complexe cellule endothéliale/péricyte/membrane basale est entourée d'une structure unique dénommée « membrane gliale limitante périvasculaire », distincte de la membrane basale endothéliale, composée de laminines ainsi que d'une couche de pieds astrocytaires. A l'inverse, ni la membrane gliale limitante périvasculaire ni les pieds astrocytaires ne sont présents dans la BHN (Figure I-6).

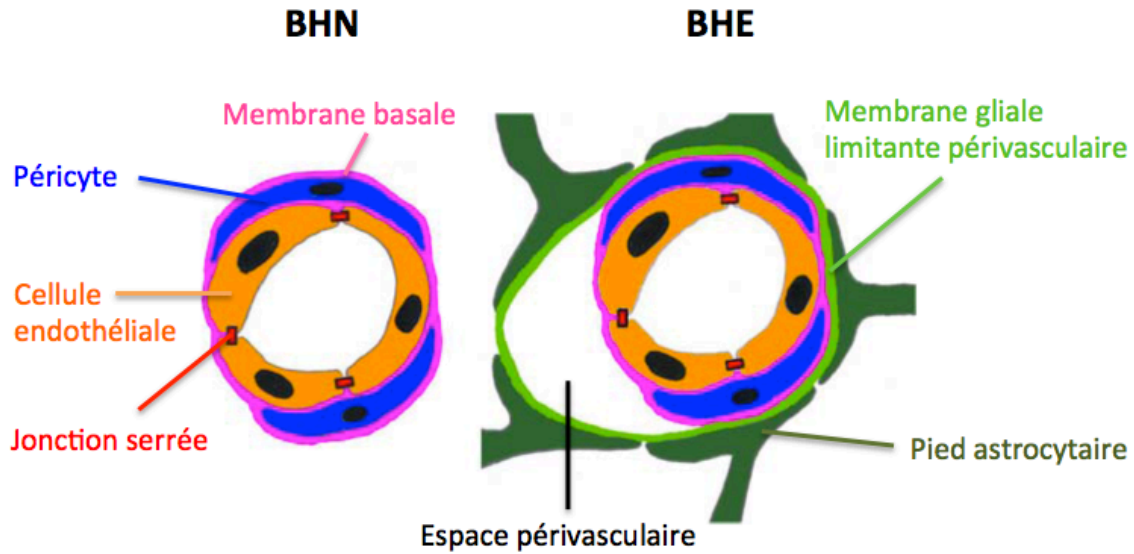


Figure I-6. Comparaison de la structure de la Barrière Hémato-Nerveuse (BHN) et de la Barrière Hémato-Encéphalique (BBB). A noter l'absence de membrane gliale limitante périvasculaire, de pieds astrocytaires et d'espace périvasculaire dans la BHN (d'après Kanda, 2013).

Parmi les composants moléculaires de la BHN, l'occludine, la claudine-5, la claudine-12, la ZO-1 et 2 et la JAM-A (Figure I-7 gauche) participent à la régulation du transport paracellulaire ainsi que la migration leucocytaire (diapédèse leucocytaire) via notamment des récepteurs membranaires tels que l'InterCellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) (Figure I-7 droite).

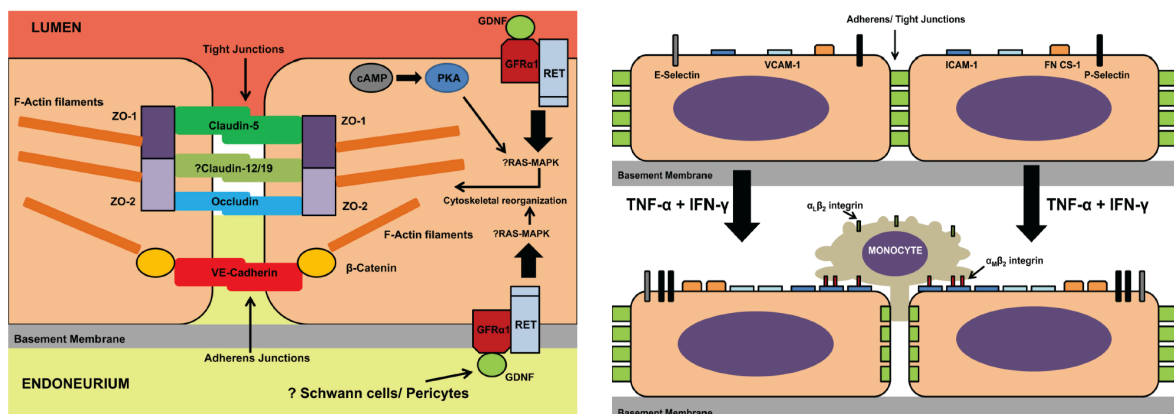


Figure I-7. Composition protéique des jonctions serrées de la Barrière Hémato-Nerveuse (BHN) et rôle dans le transport paracellulaire. Vue schématique des principales protéines de jonctions serrées (et adhérentes) de la BHN (gauche) et rôle dans la diapédèse leucocytaire, après stimulus inflammatoire (droite) (d'après Ubogu, 2013).

D'après Kanda (2013), la BHN posséderait globalement les mêmes propriétés moléculaires et physiologiques (perméabilité vasculaire, évaluée par mesure de ^{14}C -inuline et de la résistance électrique trans-endothéliale) que la BHE, excepté les transporteurs d'efflux OAT3 et Oatp2 qui transportent respectivement l'acide homovanillique et la déhydroépiandrosterone du système nerveux vers le sang (évalué sur des cellules endothéliales endoneurales microvasculaires purifiées). Les auteurs expliquent cette absence par l'absence de synapses au niveau du système nerveux périphérique (par rapport au SNC). Cependant, une étude portant sur un autre modèle de cellules endothéliales endoneurales microvasculaires conclut à la présence d'OAT3 dans ces cellules (Yosef et Ubogu, 2013).

Les transporteurs présents au niveau des cellules endothéliales endoneurales sont résumés dans le tableau I-1.

Parmi les cellules composant la BHN, les péricytes méritent une attention particulière. Ces cellules polygonales retrouvées à la périphérie de la paroi des micro-vaisseaux endoneuraux sont incluses, avec les cellules endothéliales, dans la membrane basale. Au niveau cérébral, les péricytes ont été récemment reconnus comme d'importants constituants de la BHE, communiquant activement avec les autres types cellulaires, telles que les cellules endothéliales, les astrocytes et les neurones. Ils contribuent notamment à la modulation de la fonction de barrière endothéliale via la sécrétion paracrine de facteurs de croissance tels que l'Angiopoietin-1 (Ang-1), le Transforming Growth Factor β (TGF- β), le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF). De la même façon, la BHN est stabilisée par l'augmentation d'expression de claudine-5 (la principale protéine de jonction serrée de la BHN) médiée par le bFGF et déstabilisée par la diminution d'expression de claudine-5 médiée par le VEGF, l'Ang-1 ou le TGF- β (Shimizu et al., 2010).

Les péricytes ont également une activité de phagocytose et pourraient fonctionner comme des cellules souches pluripotentes capables de former des neurones et des cellules gliales. Ainsi, les péricytes des nerfs périphériques pourraient -de façon similaire à ceux de la BHE- participer au maintien de la BHN, à la réparation tissulaire et la revascularisation après lésion du SNP (Shimizu et al., 2010). En outre, il a été montré récemment que ces péricytes participent au maintien de la fonction physiologique de la BHN, augmentant notamment l'expression des protéines de jonctions serrées via la sécrétion de facteurs solubles, tel que le bFGF (Shimizu et al., 2011). De fait, les péricytes périphériques pourraient ainsi jouer un rôle similaire à celui des astrocytes au niveau de la BHE (qui participent notamment au maintien de l'intégrité de la BHE) (Alvarez et al., 2011).

Les péricytes des nerfs périphériques produisent également des facteurs neurotrophiques, tels que le Nerve Growth Factor (NGF), le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) et le Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor (GDNF), facilitant la régénération axonale dans les neuropathies périphériques (Shimizu et al., 2011). Ces facteurs neurotrophiques ont un accès facilité aux axones et cellules de Schwann car les péricytes sont localisés juste derrière la barrière endothéliale, sans obstacle structurel à la diffusion de ces facteurs (Shimizu et al., 2008). Enfin, il a été souligné l'existence de jonctions serrées entre péricytes, au sein desquelles l'occludine semble une protéine clé, responsable de la stabilité mécanique des microvaisseaux endoneuraux et de la faible perméabilité paracellulaire endoneurale (Shimizu et al., 2008). Ainsi, les péricytes pourraient également jouer un rôle structurel majeur dans la stabilité mécanique de la BHN.

Le SNP sain est ainsi protégé -en conditions physiologiques- par la BHN. L'altération pathologique de cette barrière sera responsable de multiples pathologies neuropathiques, en permettant notamment une infiltration de lymphocytes T pathogènes et de facteurs humoraux (ex : immunoglobulines), tel qu'observé dans de nombreuses neuropathies périphériques dysimmunitaires (Kanda, 2013). Ainsi, l'absence de BHN au niveau des microvaisseaux de certaines structures importantes du SNP telles que les ganglions de racines dorsales, les racines spinales ou les jonctions neuromusculaires, expliquerait leur grande vulnérabilité aux neuropathies inflammatoires, en facilitant la diffusion d'immunoglobulines pouvant aisément attaquer le SNP via ces micro-vaisseaux perméables (Kanda, 2013).

Sur le plan fonctionnel, la BHN présente une faible perméabilité à de nombreuses substances, empêchant les solutés, macromolécules, leucocytes et bactéries de pénétrer dans le nerf par diffusion passive. La BHN régule également le flux de certains ions, nutriments et autres substances exogènes par un certain nombre de protéines de transport (Tableau I-1) ; elle régule également les phénomènes de dépolarisation/repolarisation axonale en maintenant les gradients de concentration en sodium et potassium et assure la conduction normale des signaux nerveux (Ubogu, 2013 ; Yosef et Ubogu, 2013).

Du fait de son rôle dans la régulation des échanges entre le microenvironnement endoneural et l'espace extracellulaire avoisinant, certains auteurs suggèrent de parler d'« interface hémato-nerveuse » plutôt que de « barrière hémato-nerveuse », soulignant ainsi la dynamique des échanges au sein de cette « interface » (Mizisin et Weerasuriya, 2011).

I-1-3 Organisation fonctionnelle vasculo-nerveuse : les unités neuro-vasculaires

Outre la régulation de l'homéostasie vasculaire endoneurale au niveau de la BHN, de nombreuses interactions neuro-vasculaires ont lieu au sein des nerfs périphériques, de façon similaire au niveau central.

La richesse des interactions neuro-glio-vasculaires observées dans le SNC a conduit certains auteurs à proposer le concept d'« unité neuro-vasculaire » (UNV) définie comme une unité fonctionnelle composée de cellules vasculaires (péricytes, cellules musculaires lisses vasculaires, cellules endothéliales), de cellules gliales (astrocytes, microglie et oligodendrocytes) et neurones. L'altération de cette unité fonctionnelle a été notamment impliquée dans de nombreuses pathologies douloureuses chroniques (Radu et al., 2013).

Sur le plan fonctionnel, les UNV sont le siège de multiples interactions cellulaires et moléculaires entre les différents composants de cette unité fonctionnelle (Radu et al., 2013) :

- 1) Interactions neurones-glie,
- 2) Interactions microglie-astrocytes,
- 3) Interactions astrocytes-cellules endothéliales,
- 4) Interactions péricytes-cellules endothéliales.

Parmi les différents acteurs composant les UNV, les péricytes jouent un rôle majeur. Au niveau cérébral, leur localisation centrale dans les UNV, entre les cellules endothéliales, les astrocytes et les neurones, leur permet de recevoir des signaux des cellules avoisinantes et de générer des réponses fonctionnelles essentielles au bon fonctionnement du SNC (Sweeney et al., 2016). Ils régulent ainsi la perméabilité de la BHE, l'angiogenèse, la clairance des débris cellulaires et des corps étrangers, la régulation du flux sanguin cérébral, la neuroinflammation et l'activité des cellules souches (Figure I-8).

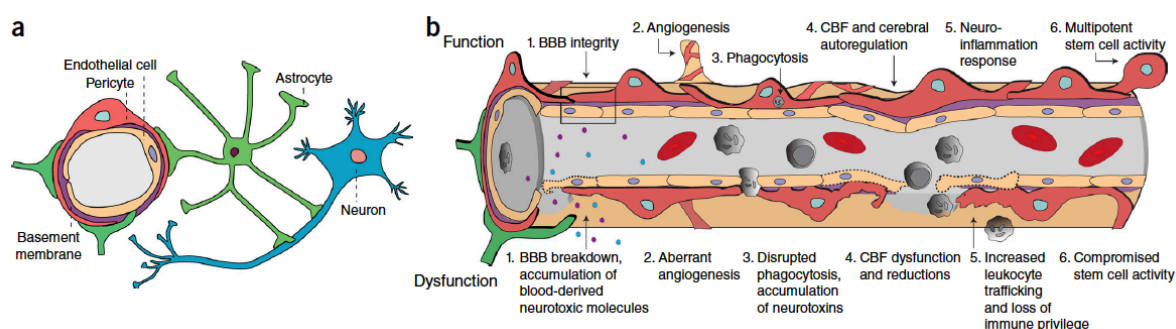


Figure I-8. Rôle des péricytes dans les unités neuro-vasculaires du Système Nerveux Central (SNC). Vue schématique de la localisation des péricytes dans la Barrière Hémato-Encéphalique (a) et de leurs multiples rôles fonctionnels dans le SNC (b) (d'après Sweeney et al., 2016).

En outre, la perte des péricytes ou une diminution de leur attachement aux cellules endothéliales ont été associées (Persidsky et al., 2016) :

- à la présence de micro-vaisseaux hyperperméables dans la sclérose en plaques, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique et l'AVC ;
- à la disruption de la BHE (corrélée à une diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées) ;
- à la neuroinflammation cérébrale (par perte de leur fonction de soutien ou par promotion de leur phénotype pro-inflammatoire) ;
- aux lésions neuronales.

Compte-tenu des similitudes structurelles et fonctionnelles entre la BHN et la BHE, le concept d'« unité neuro-vasculaire » peut également s'appliquer aux interactions neuro-vasculaires périphériques, impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques, dont la régulation de la transmission nociceptive.

I-1-4 Transmission nociceptive physiologique

Nociception et nocicepteurs :

La nociception définit le processus par lequel des stimuli thermiques, mécaniques ou chimiques de grande intensité sont détectés par une sous-population de fibres nerveuses périphériques appelées nocicepteurs. Les corps cellulaires de ces nocicepteurs sont localisés dans les ganglions de racines dorsales (GRD) pour le corps et dans les ganglions trigéminaux (GT) pour la face, les deux ayant une branche axonale périphérique et centrale, innervant respectivement leur organe cible et la moelle spinale.

Il existe deux classes majeures de nocicepteurs :

- 1) des fibres myélinisées de moyen diamètre (fibres A δ) qui véhiculent la douleur aiguë, rapide, bien localisée, parfois appelée « première douleur »,
- 2) les fibres de petit diamètre non myélinisées (fibres C) qui véhiculent une douleur difficile à localiser, de transmission plus lente, « la deuxième douleur ».

Les études électrophysiologiques ont permis de subdiviser les fibres A δ en deux sous-classes principales (Basbaum et al., 2009) :

- Fibres A δ de type I (nocicepteurs mécaniques de haut seuil) qui répondent aux stimuli mécaniques et chimiques, avec un seuil thermique élevé (> 50°C). Cependant, si le stimulus thermique est maintenu, ces afférences répondront à des températures plus basses. Ces nocicepteurs sont sensibilisés (i.e. présenteront une diminution de leur

seuil d'excitation thermique ou mécanique) en contexte de lésion tissulaire. Ces fibres sont responsables de la « première douleur » après piqûre et autres stimulations mécaniques intenses.

- Fibres A δ de type II qui présentent un seuil nociceptif thermique bien plus bas que les types I, mais un seuil nociceptif mécanique bien plus élevé. L'activation de ces fibres de type II est probablement responsable de la « première douleur » après stimulation thermique nociceptive.

Les fibres C amyéliniques sont également des nocicepteurs hétérogènes. A l'instar des afférences myélinisées, la plupart des fibres C sont polymodales, c'est à dire répondant à des stimuli mécaniques et thermiques (nocicepteurs thermomécaniques de type C). De plus, certaines fibres C sont thermosensibles, mais insensibles aux stimuli mécaniques, appelées « nocicepteurs silencieux » qui ne développent une hypersensibilité mécanique qu'en contexte lésionnel. Ces afférences sont plus sensibles aux stimuli chimiques (capsaïcine ou histamine) comparativement aux nocicepteurs thermomécaniques de type C, probablement activées en réponse à des modifications chimiques du milieu inflammatoire local. De plus, une partie de ces afférences est sensible à une grande variété de médiateurs pruritogènes. Enfin, il est intéressant de noter que toutes les fibres C ne véhiculent pas l'information nociceptive. Certaines répondent au refroidissement et une partie des fibres C répond à une stimulation inoffensive de la peau velue, mais ni aux stimuli thermiques ni chimiques. Ces fibres seraient impliquées dans le toucher agréable (McGlone et al., 2014).

L'hétérogénéité des nocicepteurs a été soulignée grâce à leur caractérisation moléculaire, en particulier pour les fibres C. On distingue ainsi les nocicepteurs C peptidergiques, libérant les neuropeptides substance P (SP) et Calcitonin-Gen Related Peptide (CGRP) et exprimant le récepteur TrkA, récepteur de la neurotrophine NGF. Les nocicepteurs C non-peptidergiques expriment quant à eux le récepteur aux neutrophines c-Ret, liant le GDNF, mais également la neurturine et l'artémine, ainsi que des récepteurs purinergiques P2X3 (Basbaum et al., 2009).

Les nocicepteurs peuvent également être distingués selon l'expression différentielle des canaux membranaires conférant la sensibilité au chaud (TRPV1), au froid (TRPM8), au milieu acide (ASICs) ou à de nombreux irritants chimiques (TRPA1) (Basbaum et al., 2009).

Signalisation bidirectionnelle des nocicepteurs :

Les fibres afférentes primaires présentent une morphologie neuronale unique, dite « pseudo-unipolaire », dans laquelle à la fois les terminaisons centrales et périphériques émanent d'un tronc axonal commun. La majorité des protéines synthétisées par les cellules du GRD ou du GT sont distribuées aux terminaisons périphériques et centrales. Ceci distingue ainsi les afférences primaires nociceptives du neurone prototypique où la branche « réceptrice » (le dendrite) est biochimiquement distincte de la branche de « transmission » (l'axone). L'équivalence biochimique des terminaisons centrales et périphériques des nocicepteurs signifie que ces derniers sont capables d'émettre et de recevoir des messages des deux extrémités (signalisation bidirectionnelle). Ainsi, de la même façon que la terminaison centrale est le siège d'une libération de neurotransmetteurs Ca^{2+} dépendante, la terminaison périphérique libère une variété de molécules modifiant l'environnement tissulaire local. De fait, la libération périphérique des neuropeptides CGRP et SP induit respectivement une vasodilatation et une extravasation des protéines plasmatiques locales, dénommée « inflammation neurogène ». De plus, alors que seule la terminaison périphérique du nocicepteur répond aux stimuli issus de l'environnement extérieur, les terminaisons périphérique et centrale peuvent être modulées par une variété de molécules ou signaux endogènes (telles que le pH, les lipides et les neurotransmetteurs) régulant la sensibilité du nocicepteur (Basbaum et al., 2009).

Projections centrales des nocicepteurs :

Les fibres nerveuses afférentes primaires projettent au niveau de la corne dorsale de la moelle spinale, organisée en couches (laminae) cytoarchitectoniques distinctes les unes des autres sur le plan anatomique et électrophysiologique. Par exemple, les nocicepteurs $\text{A}\delta$ projettent au niveau de la couche I ainsi que plus profondément dans la moelle spinale, au niveau de la couche V. Les fibres $\text{A}\beta$ de bas seuil, de conduction rapide répondant au tact léger, projettent dans les couches profondes (III, IV et V). A l'inverse, les nocicepteurs C projettent plus superficiellement dans les couches I et II.

Cette stratification remarquable des différents sous-types d'afférences dans la corne dorsale superficielle est davantage soulignée par les projections et circuits neuronaux distincts des nocicepteurs C. Par exemple, la plupart des nocicepteurs C peptidergiques terminent au niveau de la couche I et la partie la plus dorsale de la couche II. A l'inverse, les nocicepteurs C non-peptidergiques terminent dans la région médiane de la couche II. La partie la plus ventrale de la couche II est caractérisée par la présence d'inter-neurones excitateurs exprimant

la Protéine Kinase C γ (PKC γ), impliquée dans les douleurs persistantes post-lésionnelles. Des études récentes soulignent que cette couche PKC γ est ciblée principalement par les afférences myélinisées non-nociceptives (Miraucourt et al., 2007) et joue un rôle dans l'installation des allodynies secondaires, via la désinhibition GABA-dépendante des interneurons PKC γ^+ (Peirs et al., 2016).

Sur le plan électrophysiologique, les neurones spinaux au sein des couches I sont généralement sensibles aux stimuli nociceptifs (via les fibres A δ et C), les neurones des couches III et IV sont principalement sensibles aux stimuli inoffensifs (via les fibres A β) et les neurones de la couche V reçoivent une convergence de signaux nociceptifs et non nociceptifs via des signaux directs (monosynaptiques) issus des fibres A δ et C ainsi que des signaux indirects (polysynaptiques) par les fibres C. Ces derniers neurones sont appelés « neurones de gamme dynamique étendue » (Wide Dynamic Range neurons), en ceci qu'ils répondent à une grande variété d'intensités de stimulation. Il existe également généralement un signal viscéral vers ces neurones, dont la convergence avec les signaux somatiques contribue au phénomène de douleur référée, à savoir lorsque la douleur secondaire à une lésion viscérale (par exemple : le cœur durant un syndrome coronarien aigu) est projetée au niveau d'une structure somatique (par exemple : l'épaule).

Les projections médullaires des différentes afférences primaires sont résumées dans la Figure I-9.

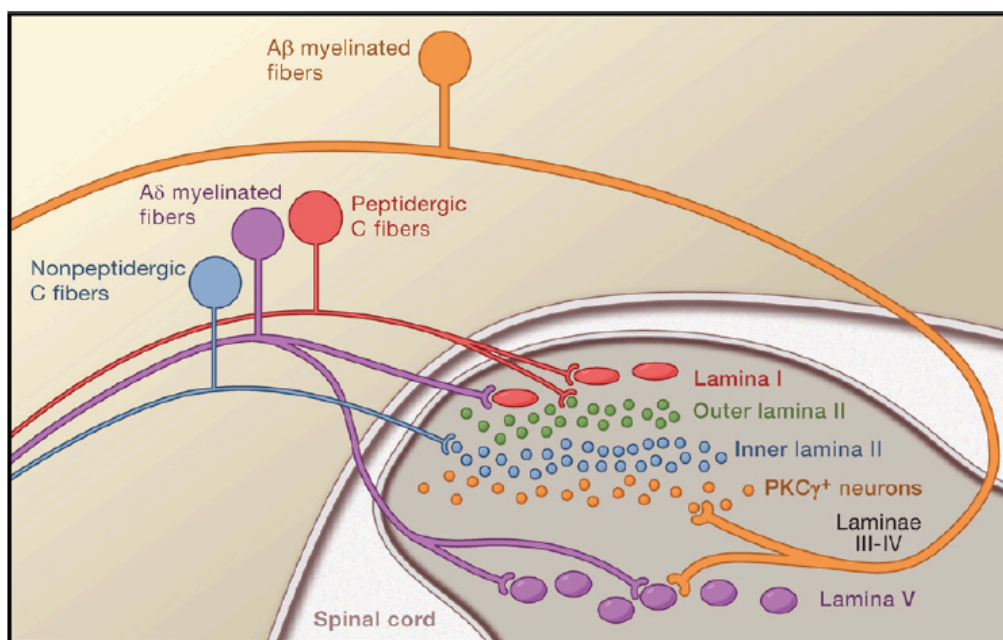


Figure I-9. Projections médullaires des afférences primaires. Vue schématique de la projection des différents types de fibres afférentes au sein des différentes couches de la corne dorsale médullaire (d'après Basbaum et al., 2009).

Voies nociceptives ascendantes et intégration nociceptive supra-spinale :

Les neurones de projection issus des couches I et V spinales sont les principaux signaux ascendants de la moelle spinale vers le cerveau. Ces neurones sont à l'origine de voies ascendantes multiples, incluant le tractus spino-thalamique et spino-réticulo-thalamique, qui véhiculent l'information douloureuse au thalamus et au tronc cérébral respectivement. La première voie serait essentielle pour véhiculer les aspects sensori-discriminatifs de la douleur (c'est à dire où est le stimulus douloureux et quelle en est son intensité) alors que la deuxième serait plutôt impliquée dans les douleurs peu localisées. Récemment, une attention particulière a été portée sur les projections spinales au niveau de la région para-brachiale du pont dorso-latéral, car les signaux provenant de cette région sont rapidement envoyés à l'amygdale, une région généralement considérée comme étant impliquée dans l'aspect aversif de l'expérience douloureuse.

De ces structures thalamiques et du tronc cérébral, l'information parvient aux structures corticales. Il n'existe pas une seule région cérébrale impliquée dans le traitement de l'information douloureuse (Apkarian et al., 2005) mais à l'inverse, la douleur proviendrait d'une activation de nombreuses structures cérébrales éparses, certaines étant associées aux propriétés sensori-discriminatives (ex : cortex somato-sensoriel) et d'autres aux aspects émotionnels de la douleur (ex : gyrus cingulaire antérieur, cortex insulaire) (Garcia-Larrea et Peyron, 2013). Plus récemment, des études d'imagerie ont montré l'activation de régions du cortex pré-frontal ainsi que de régions généralement non associées à l'intégration nociceptive (telles que les ganglions de la base et le cervelet). Le rôle exact de ces régions dans la réponse individuel au stimulus douloureux et/ou à la perception douloureuse est encore peu clair (Basbaum et al., 2009).

Enfin, il convient de souligner qu'il existe de puissantes voies descendantes (issues notamment de la substance grise périaqueducale et du raphé magnus pour les voies descendantes inhibitrices) qui influencent (positivement ou négativement) la transmission douloureuse au niveau spinal.

Les principales voies nociceptives sont résumées dans la Figure I-10.

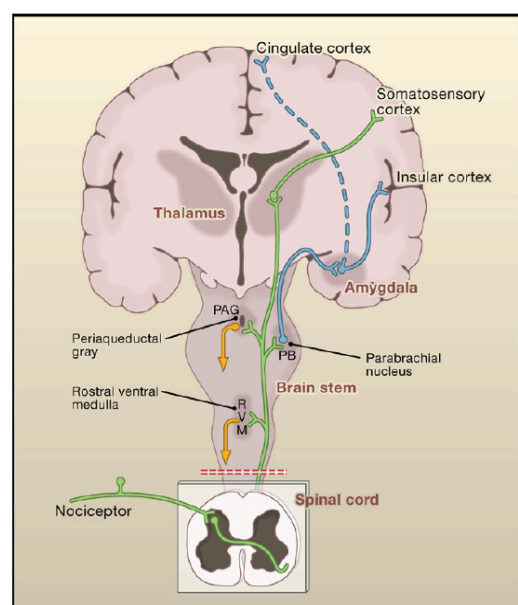


Figure I-10. Anatomie topographique des principales voies nociceptives. Les voies ascendantes activatrices sont représentées en vert et en bleu, alors que les voies descendantes inhibitrices sont représentées en orange (d'après Basbaum et al., 2009).

I-2 Altérations nerveuses post-traumatiques

A la suite d'une lésion nerveuse périphérique, de nombreuses modifications vont se produire en diverses localisations anatomiques (Xie et al., 2005) incluant :

- 1) une augmentation de l'activité électrique spontanée (ectopique) dans les corps cellulaires des GRD et les fibres afférentes lésées (Wall et Gutnick, 1974),
- 2) l'apparition de connexions anormales entre le système nerveux sensitif et sympathique (McLachlan et al., 1993)
- 3) des changements neuroplastiques dans la moelle spinale/complexe sensitif trigéminal et le cerveau.

Il n'est pas dans notre objectif de décrire ces changements, que la variété et complexité mettent hors de portée de ce travail. Nous nous focaliserons exclusivement sur les altérations tissulaires et cellulaires post-traumatiques périphériques, excluant les altérations spinales et cérébrales.

I-2-1 Altérations tissulaires et cellulaires périphériques post-traumatiques

Le traumatisme d'un nerf périphérique entraîne de multiples altérations tissulaires et cellulaires locales se produisant selon des cinétiques précises ; certaines étant simultanées, d'autres successives. Pour plus de clarté, ces différentes altérations seront décrites séparément, de façon non chronologique.

Dégénérescence wallérienne post-traumatique :

A la suite d'un traumatisme, la lésion nerveuse va induire une réponse importante des cellules non-neuronales du nerf périphérique, principalement au niveau du moignon distal, sous la forme d'un processus dégénératif appelé « dégénérescence wallérienne », d'après Augustus Volney Waller, le premier à avoir caractérisé de tels changements dans les nerfs glossopharyngien et hypoglosse sectionnés de grenouilles, il y a plus de 160 ans (Gaudet et al., 2011).

Il a été montré que la dégénérescence intrinsèque des axones distaux détachés est l'évènement clé de la dégénérescence wallérienne, engendrant une cascade de réponses cellulaires non-neuronales dans le nerf périphérique perdurant plusieurs mois après la lésion, menant à la

clairance des débris inhibiteurs de la régénération nerveuse et à la production d'un environnement promoteur de la régénération axonale (Figure I-11).

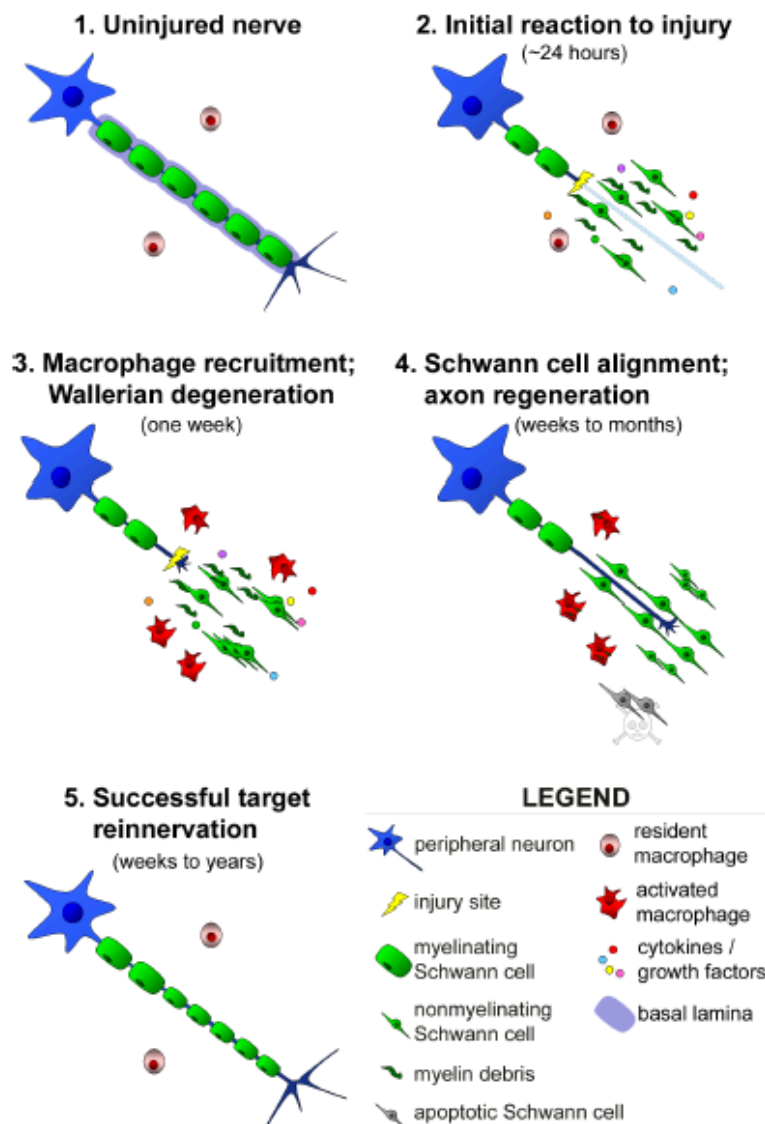


Figure I-11. Mécanismes cellulaires de la dégénérescence wallérienne après lésion nerveuse. Représentation schématique des différentes phases de la dégénérescence wallérienne et des populations cellulaires impliquées (d'après Gaudet et al., 2011).

Après lésion nerveuse, la dégénérescence axonale du segment nerveux distal va enclencher les futurs processus dégénératifs qui s'installeront dans le nerf ; cependant, la dégénérescence axonale ne se produira pas immédiatement. En effet, les segments axonaux détachés restent intacts plusieurs jours après la lésion nerveuse et peuvent toujours transmettre un signal nerveux lorsque stimulés. Le délai entre la lésion et la dégénérescence axonale est de 24-48 heures chez les jeunes rats et souris, alors qu'il est de plusieurs jours chez les primates et les humains. Passé ce délai, les axones lésés vont perler et gonfler avant qu'une désintégration

granulaire majeure du cytosquelette n'ait lieu, entraînant la destruction soudaine du cytosquelette en de fins débris en une heure (Gaudet et al., 2011).

De façon intéressante, la dégénérescence wallérienne est régulée par des mécanismes moléculaires intrinsèques aux axones détachés. Une entrée de calcium dans l'axoplasme, issu de stocks extra- et intracellulaires, est nécessaire pour déclencher la dégénérescence axonale. Cet influx de calcium activera la calpaïne, une protéase essentielle dans la dégradation du cytosquelette et la dégénérescence axonale. L'activation du système ubiquitine-protéasome serait également impliquée dans ces phénomènes dégénératifs (Gaudet et al., 2011).

A la suite de la dégénérescence axonale post-traumatique, de nombreux changements locaux vont rapidement se produire dans le nerf, dont la disruption de la BHN et l'initiation de changements cellulaires associés à la dégénérescence. La BHN n'est généralement altérée qu'au niveau du site lésionnel après le traumatisme, jusqu'au début de la dégénérescence axonale. Dès lors, la barrière devient partiellement compromise le long du nerf en distal de la lésion, pendant au moins 4 semaines après la lésion initiale. La perméabilité vasculaire post-lésionnelle maximale (de deux fois la perméabilité nerveuse normale) survient en 4 à 7 jours et correspond au pic de la réponse inflammatoire post-traumatique. L'augmentation de perméabilité de la BHN permet l'entrée dans le nerf des cellules sanguines et autres facteurs plasmatiques nécessaires à la réparation nerveuse. Par la suite, la perméabilité vasculaire diminuera environ 2 semaines post-lésion, avant qu'une deuxième augmentation soutenue de la perméabilité se développe à partir de 4 semaines post-lésion. Cette deuxième augmentation de perméabilité pourrait refléter des changements locaux nécessaires à la récupération de l'homéostasie locale après dégénérescence wallérienne (Mizisin et Weerasuriya, 2011).

Dégénérescence wallérienne et sensibilisation douloureuse :

Cette dégénérescence Wallérienne qui se produit rapidement après lésion nerveuse dans le cadre de la régénération nerveuse physiologique, peut également mener au développement d'une neuroinflammation, d'une hyperalgésie et d'une allodynie persistantes (Dubovy, 2011). La dégénérescence axonale s'associe notamment à une infiltration de monocytes/macrophages dans le nerf lésé, pour éliminer les débris de myéline par phagocytose. Ces monocytes/macrophages infiltrés libèrent de nombreux facteurs inflammatoires, responsables d'une sensibilisation périphérique et d'une exacerbation douloureuse (Abbadie et al., 2003 ; Sommer et Kress, 2004 ; Dubovy, 2011).

Des études ont montré que le CCL2 est la principale chimiokine responsable de l'attraction des monocytes et son récepteur CCR2 jouerait un rôle essentiel dans la régulation des

processus nociceptifs pendant la douleur neuropathique (Abbadie et al., 2009 ; Van Steenwinckel et al., 2011 ; Dauvergne et al., 2014). En effet, le blocage de CCR2 ou sa délétion génique abolit l'hypersensibilité douloureuse dans plusieurs modèles de douleurs neuropathiques. De plus, des injections intrathécales ou intracisternales de CCL2 induisent une douleur persistante via une signalisation CCR2-dépendante chez des rats naïfs. Durant la douleur chronique, l'expression de CCL2 est très fortement augmentée dans les neurones sensitifs primaires des GRD et libéré dans la corne dorsale de la moelle spinale où il module l'activité GABAergique et induit l'activation et la sensibilisation des cellules microgliales spinales. De plus, le blocage pharmacologique de la voie CCL2/CCR2 dans le SNC inhibe l'activation microgliale et prévient la douleur neuropathique (Van Steenwinckel et al., 2011 ; Dauvergne et al., 2014).

La douleur neuropathique induite par constriction chronique (CCI) du nerf sciatique est associée à une augmentation précoce et prolongée de CCL2 dans les fibres sensibles et une infiltration persistante de phagocytes mononucléés et de macrophages (Van Steenwinckel et al., 2015). En effet, une administration unique intra-neurale de CCL2 dans les nerfs sciatiques de rats naïfs est suffisante pour induire une infiltration de phagocytes mononucléés/macrophages, associée à une hypersensibilité mécanique persistante. A l'inverse, la délétion du gène codant pour CCL2 chez la souris atténue fortement l'hypersensibilité mécanique induite par le CCI et le nombre de macrophages/monocytes infiltrés dans le nerf sciatique lésé (Van Steenwinckel et al., 2015). Dans cette même étude, l'accumulation de CCL2 dans le nerf lésé était principalement due à une augmentation du transport antérograde du CCL2 endogène le long des fibres du nerf sciatique. Ce mécanisme est en accord avec les précédents résultats de cette équipe, qui avait montré une augmentation d'expression prolongée de l'ARNm de CCL2 dans les cellules des GRD lombaires. Ainsi, le CCL2 endogène pourrait être transporté de façon antérograde depuis les corps cellulaires des neurones sensitifs primaires du GRD (site de la synthèse du CCL2) jusqu'à la zone lésionnelle périphérique pour participer à l'inflammation neurogène. De plus, la source principale du CCL2 endogène favorisant l'infiltration de monocytes/macrophages dans le nerf sciatique lésé est le nerf lésé lui-même et non les macrophages/monocytes infiltrés (Van Steenwinckel et al., 2015).

Réponse immunitaire post-traumatique :

En complément de la libération de CCL2, le traumatisme nerveux va déclencher une réaction immunitaire locale importante avec activation des immunocytes résidents, qui vont libérer de nombreux médiateurs inflammatoires (cytokines pro-inflammatoires, radicaux libres de l'oxygène, facteurs de croissance, métalloprotéases,...) concourant à générer une rupture des membranes épineurales, périneurales et endoneurales ainsi qu'une disruption de la barrière hémato-nerveuse favorisant l'infiltration locale d'immunocytes (mastocytes, neutrophiles, monocytes et lymphocytes T) dans le nerf lésé, le GRD et la moelle spinale (Sapienza et al., 2014). Cette réponse immunitaire périphérique est déclenchée par l'invasion des cellules immunitaires orchestrée par les cellules satellites et les cellules de Schwann locales, via des réseaux de cytokines/chimiokines. A la suite de la lésion nerveuse, les cellules de Schwann mais également quelques macrophages résidents vont s'activer, proliférer, se différencier et activer des gènes impliqués dans la régénération tissulaire. Ces cellules de Schwann sont les principales cellules impliquées dans la phagocytose de la myéline dégénérée et des débris axonaux durant les phases précoces de la lésion. A J2-J3, un afflux cellulaire comprenant des macrophages hématogènes, quelques mastocytes et des lymphocytes T se produit au site lésionnel et s'étend autour du nerf lésé. Le nombre de macrophages et leur activité phagocytaire est maximale jusqu'à la deuxième semaine post-lésionnelle puis diminue progressivement (Sapienza et al., 2014).

Cette réponse inflammatoire après lésion nerveuse périphérique est étroitement contrôlée, notamment via des récepteurs de l'immunité innée, les *Toll-Like Receptors* (TLRs). Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires de l'immunité innée, reconnaissant des motifs spécifiques exogènes liés à l'invasion de pathogènes (Pathogen-Associated molecular Patterns [PAMPs]) mais également des signaux endogènes de danger (Danger/Damage-Associated Molecular Patterns [DAMPs] aussi appelés « alarmines ») libérés par des cellules activées, stressées ou nécrotiques ainsi que des molécules issues de la MEC à la suite d'une lésion ou d'un dommage tissulaire (Nicotra et al., 2012)

Divers TLRs seraient ainsi exprimés dans les cellules de Schwann des nerfs périphériques peu de temps après la lésion nerveuse. Shi et al. (2011) ont montré que le TLR2 peut être activé par des ligands endogènes libérés par le nerf lésé. L'expression de TLR2 augmente progressivement jusqu'à J14, où la majorité des cellules exprimant le TLR2 sont des macrophages ED1⁺. De plus, le TLR2 (probablement exprimé dans les macrophages résidents ou les cellules de Schwann) est impliqué dans le recrutement des macrophages pendant la dégénérescence wallérienne du nerf périphérique. Enfin, dans ce modèle de lésion nerveuse

(ligature partielle du nerf sciatique), l'induction de TLR2 était responsable de l'activation sous-jacente de la voie NF κ B et la libération de cytokines pro-inflammatoires. Ces médiateurs forment un réseau cytokinique, participant au développement de l'inflammation chronique et jouant ainsi un rôle critique dans la douleur neuropathique (Shi et al., 2011). Ces cytokines pro-inflammatoires incluent l'interleukine 1 β (IL-1 β), le Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) et l'interleukine 6 (IL-6), susceptibles de moduler directement l'excitabilité neuronale et l'hypersensibilité qui en résulte. Ces médiateurs immunitaires peuvent également augmenter le nombre de décharges spontanées et altérer la conduction nerveuse ainsi que les propriétés des neurotransmetteurs. Ainsi après lésion nerveuse, l'activation de TLR2 dans les macrophages peut déclencher le développement de la douleur persistante, mais également participer à l'organisation de la réponse immunitaire innée, menant à la clairance rapide et efficace des débris de myéline toxiques et à la régénération nerveuse (Shi et al., 2011). D'autres récepteurs TLRs ont également été impliqués dans ces phénomènes, comme par exemple le récepteur TLR4, dont le rôle primordial fera l'objet d'un traitement spécifique dans un chapitre ultérieur (II-4-3).

Outre l'immunité innée, l'immunité adaptative participe également au développement du phénotype douloureux neuropathique post-traumatique. Ainsi, après lésion nerveuse périphérique, la disruption de la gaine de myéline et la perte d'isolation électrique des fibres mécanosensitives A β résultante contribue à l'apparition d'une allodynie, selon un mécanisme lymphocyte T-dépendant (Zhu et al., 2012). L'immunité adaptative antigène-spécifique et la polarisation des lymphocytes Th1 et Th17 contribuent à la douleur neuropathique via la libération de cytokines pro-inflammatoires algésiques, telles que l'IL-1 β et IL17 (Costigan et al., 2009b, Sorge et al., 2015), notamment via la libération de la protéine MBP (Myelin Basic Protein), épitope des lymphocytes Th (Liu et al., 2012 b). La MBP est une protéine majeure de la gaine de myéline, non structurée et de charge positive, interagissant avec les groupes acidophiles de la bicouche lipidique et une variété de protéines poly-anioniques telles que l'actine, la tubuline et la Ca²⁺-calmoduline. Ces interactions régulent de multiples fonctions de l'unité axone-glie, notamment l'assemblage du cytosquelette, l'homéostasie calcique et le ratio protéines/lipides dans les membranes myéliniques. Les épitopes cryptiques centraux de cette protéine (ex : MBP84-104) libérés par protéolyse vont participer au développement de l'allodynie mécanique. Ainsi, l'injection dans un nerf sciatique sain de MBP84-104 est suffisante pour induire une allodynie mécanique robuste chez le rat. Cette protéine serait libérée suite à des lésions nerveuses telle que la

constriction chronique (CCI) ou l'écrasement du nerf spinal (Liu et al., 2012 b). L'allodynie mécanique MBP-dépendante se produirait selon deux mécanismes distincts (Ko et al., 2016) :

- 1) la libération locale d'auto-antigènes spécifiques de myéline (notamment le MBP) favoriserait l'infiltration immunitaire Th1/Th17 au sein des fibres myélinisées (fibres de gros calibre A β mécano-sensibles) mais pas des cellules non myélinisées (fibres de petit calibre C thermosensibles),
- 2) MBP régulerait, par un mécanisme IL-6-dépendant, l'expression neuronale des canaux calciques voltage-dépendants $\alpha_2\delta_1$ et l'excitotoxicité Ca^{2+} dépendante.

Enfin, les axones endommagés par le traumatisme nerveux vont également libérer des tachykinines (SP, neurokinines) et du CGRP (induisant une vasodilatation locale et la dégranulation des mastocytes) ; des prostaglandines et du Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) ayant également un effet vasodilatateur ; de l'histamine et de la sérotonine. Ces médiateurs concourent à générer une hyperexcitabilité neuronale et des décharges ectopiques, à l'origine de la douleur neuropathique (Sapienza et al., 2014).

Altérations post-traumatiques des cellules de Schwann :

Un des événements clés de la dégénérescence Wallérienne post-traumatique est la prolifération importante des cellules de Schwann. Les données issues d'un modèle de compression nerveuse chronique soutiennent l'idée que les cellules de Schwann subissent une prolifération et une apoptose de façon relativement indépendante de la pathologie axonale (Gupta et Steward, 2003). Dans ce modèle lésionnel, la dégénérescence wallérienne n'est pas précoce à l'inverse des modèles de compressions aiguës ou d'axotomies où la lésion axonale initie la cascade d'événements cellulaires sous-jacents. Il semblerait que dans la compression nerveuse chronique la pathologie axonale soit secondaire aux changements dans les cellules de Schwann, selon un double mécanisme ischémique et mécanique (Mackinnon, 2002). Ainsi, la présence de forces de cisaillement importantes (*shear stress*) va induire une altération directe de la fonction des cellules de Schwann, caractérisée par une prolifération de ces cellules et une diminution de l'expression de 2 protéines pro-myélinisantes : MAG et MBP, maintenant ainsi la démyélinisation locale (Gupta et al., 2005).

Ces cellules de Schwann semblent jouer un rôle majeur dans la régénération nerveuse post-traumatique. Ainsi, dans les 12 premières heures après lésion compressive du nerf sciatique, il a été observé une augmentation de la production autocrine d'IL6 par les cellules de Schwann, principalement en distal de la zone de compression (Bolin et al., 1995). Cette signalisation

IL6 pourrait participer à la régénération nerveuse post-traumatique. En effet, à la suite d'une lésion aiguë du SNP, l'élimination de la myéline (qui a un effet inhibiteur sur la croissance neuronale) est régulée par des communications précoces entre cellules de Schwann et macrophages, un prérequis de la régénération axonale. Après perte du contact axonal, les cellules de Schwann, stimulées par le régulateur négatif de myélinisation c-Jun, induisent des réactions autophagiques pour décomposer la myéline primaire mais activent également l'expression de NRG1/I pour enclencher la remyélinisation (Klein et Martini, 2016). De plus, elles vont produire une variété de chimiokines et cytokines servant au recrutement des cellules phagocytaires. Par ailleurs, il a été montré que ces cellules présentent une grande plasticité du fait de leur capacité à se différencier en « cellules de Büngner », des cellules de réparation capables de sécréter des facteurs neurotrophiques promoteurs de la régénération nerveuse. Ce comportement cellulaire est fortement dépendant de l'activation de c-Jun et de la voie ERK dans les cellules de Schwann (Klein et Martini, 2016).

Mueller et al. ont démontré qu'une population de macrophages résidents endoneuraux contribuait de façon substantielle à la réponse inflammatoire précoce après lésion nerveuse, avant l'infiltrat de macrophages hématogènes et pourraient ainsi expliquer les changements moléculaires précoces (i.e. la production de cytokines) dans les nerfs lésés (Mueller et al., 2001, 2003). Ces macrophages résidents prolifèrent rapidement et sont capables de phagocyter les débris de myéline, représentant environ 20% de la population totale macrophagique à J14 après lésion nerveuse (Mueller et al., 2003).

Ainsi, l'interrelation étroitement contrôlée entre cellules de Schwann et macrophages dans la dégénérescence wallérienne, régule les altérations moléculaires et la clairance efficace de la myéline, permettant *in fine* la régénération des nerfs périphériques lésés (Klein et Martini, 2016). Par ailleurs, il n'a toujours pas été déterminé si la clairance de la myéline est la seule fonction majeure des macrophages après lésion nerveuse. En effet, dans les nerfs sciatiques où seuls les axones non-myélinisés ont été lésés (par application proximale de capsaïcine), le nombre de macrophages augmentait, même si de façon moindre par rapport à une transection complète affectant les deux types de fibres (Cheepudomwit et al., 2008). La fonction de ces macrophages dans ces fibres non-myélinisées reste -de fait- à être découverte. Une autre fonction macrophagique distincte de la clairance des débris de myéline et de la promotion de la dégénérescence wallérienne pourrait se dérouler au niveau du ganglion nerveux périphérique après axotomie distale, où les macrophages s'accumulent autour du soma neuronal, dans une région où aucune lésion myélinique n'a lieu (Niemi et al., 2013). La prévention d'une telle accumulation macrophagique se traduit par un faible potentiel de

croissance axonal. A l'inverse, une augmentation du potentiel de régénération axonale après lésions conditionnantes est corrélée à une augmentation du nombre de macrophages. De fait, l'accumulation péri-neuronale de macrophages pourrait être importante pour la régénération axonale, une fonction qui pourrait trouver son équivalent central dans l'activité des cellules microgliales (Klein et Martini, 2016).

I-2-2 Cicatrisation nerveuse physiologique et pathologique : de la neurite à la neuropathie

Mécanismes de la cicatrisation nerveuse physiologique :

A la différence du SNC où les neurones lésés sont généralement incapables de se régénérer, les axones du système nerveux périphérique sont capables de régénération après lésion. Malheureusement, la régénération axonale périphérique est souvent incomplète pouvant mener à des pathologies neuropathiques.

A la suite d'une lésion axonale, la dégénérescence wallérienne de la partie distale s'installe progressivement en conséquence de la dégradation intrinsèque des axones. Cependant, le SNP n'étant pas complètement isolé, les axones lésés vont induire une réponse pluricellulaire complexe impliquant de multiples composantes, notamment une dédifférenciation des cellules de Schwann et l'activation de la réponse immunitaire. En effet, une régénération axonale efficace repose sur une réponse régénérative robuste des axones lésés et la contribution coordonnée de cellules non-neuronales, incluant les cellules immunitaires (Chen et al., 2015a). De nombreuses données récentes soulignent le rôle clé de l'immunité innée (neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques) et acquise (lymphocytes B et T) dans les phénomènes de dégénérescence et régénération du SNP, se manifestant par une infiltration immunitaire au niveau des sites lésionnels en quelques heures à quelques jours après la lésion nerveuse (Benowitz et Popovich, 2011). Parmi ces cellules immunitaires, les macrophages sont les plus importantes, jouant non seulement un rôle clé dans la clairance des débris de myéline et dans la modulation de l'activité des cellules de Schwann, mais également dans la promotion de la régénération axonale via la libération de nombreux facteurs, incluant des protéines de la MEC, des facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines (Martini et al., 2008 ; Gaudet et al., 2011).

Les macrophages sont des cellules phagocytaires mononucléées présentant une grande plasticité, réparties en différentes populations macrophagiques selon leur localisation

tissulaire. Chaque population macrophagique présente un profil fonctionnel propre associé à un profil d'expression génique spécifique du microenvironnement tissulaire local.

En plus de posséder une grande plasticité, les macrophages sont hautement hétérogènes, divisés en deux grands phénotypes : les macrophages M1 pro-inflammatoires et les macrophages M2 anti-inflammatoires. Les macrophages M1 sont les effecteurs et inducteurs de la réponse pro-inflammatoire et sont activés par le lipopolysaccharide (LPS), l'interféron γ (IFN- γ) et le TNF- α . Les M2, à l'inverse, sont impliqués dans la réponse anti-inflammatoire et sont activés suite à leur exposition à des cytokines et facteurs spécifiques, tels que IL4, IL10, IL13, des complexes immuns, des hormones ou les agonistes du récepteur de l'adénosine $A_{2A}R$. Globalement, les M1 sont capables de détruire les micro-organismes en activant des réponses immunitaires, alors que les M2 sont immunosuppresseurs et assurent la promotion du remodelage tissulaire et sa réparation. Cette transition entre un phénotype pro-inflammatoire (M1) et un phénotype anti-inflammatoire, réparateur (M2), appelé « polarisation macrophagique » participerait à la régénération axonale à la suite de la dégénérescence wallérienne (Figure I-12).

Par ailleurs, des données récentes suggèrent que les M2 peuvent être subdivisés en 4 sous-types distincts : M2a, M2b, M2c, M2d, chaque sous-type ayant ses propres inducteurs et marqueurs phénotypiques. Les M2a, b, c sont considérés comme anti-inflammatoires alors que les M2d sont dérivés des M1 pro-inflammatoires par l'activation du $A_{2A}R$ et jouent un rôle important dans la cicatrisation tissulaire et l'angiogenèse (Figure I-13).

Figure I-13. Diversité phénotypique des différentes populations macrophagiques. (d'après Chen et al., 2015a).

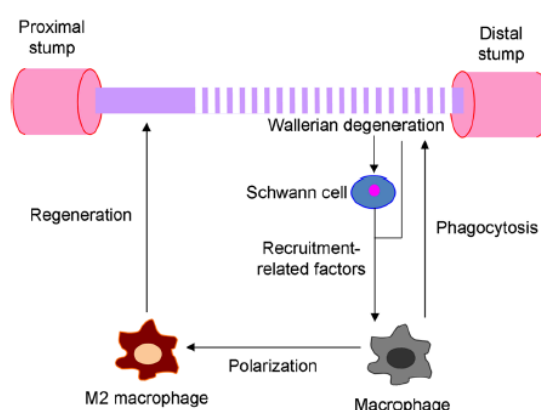
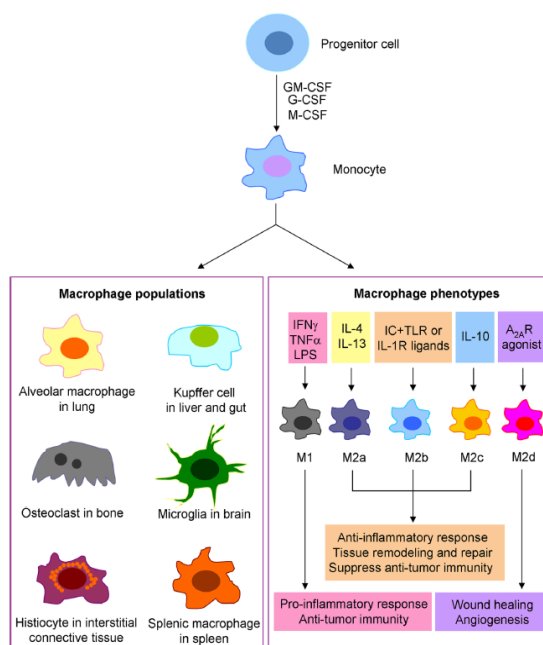


Figure I-12. Rôle des macrophages dans la régénération axonale après dégénérescence wallérienne. L'activation des macrophages par les cellules de Schwann et leur polarisation en macrophages M2 participerait à la régénération axonale après dégénérescence wallérienne (d'après Chen et al., 2015a).



A la suite d'une lésion nerveuse, la disruption de l'unité cellule de Schwann/axone déclenche la dédifférenciation des cellules de Schwann et induit la libération de multiples facteurs incluant des chimiokines, cytokines et autres facteurs qui sont responsables de l'infiltration macrophagique. Parmi ces facteurs, CCL2, leukemia inhibitory factor (LIF), IL-1 α , IL-1 β et pancreatitis-associated protein III (PAP-III) ont été identifiés comme les régulateurs principaux du recrutement monocytaire/macrophagique après lésion nerveuse (Shamash et al., 2002 ; Perrin et al., 2005). De plus, les macrophages infiltrés dans le nerf lésé expriment et produisent également certains facteurs, tels que CCL2, TNF- α , IL-1 α et IL-1 β , contribuant à amplifier le recrutement macrophagique au sein du nerf (Shamash et al., 2002).

Malgré le rôle essentiel des cellules de Schwann dans le recrutement macrophagique post-lésionnel, d'autres facteurs contribuent également au recrutement macrophagique (expliquant l'incapacité à bloquer totalement l'infiltration macrophagique via des anticorps anti-CCL2 ou anti-IL-1 β). En effet, des études récentes ont proposé le rôle de protéines de la MEC, de la galectine-1 et de protéines du complément dans l'infiltration macrophagique post-lésionnelle (Gaudet et al., 2009 ; Chen et al., 2015b).

Par exemple, le collagène VI est la principale protéine de la MEC produite par les cellules de Schwann et les macrophages dans les nerfs périphériques. Après compression du nerf sciatique, l'augmentation importante des dépôts de collagène VI au niveau des zones lésées joue un rôle à la fois de chémoattraction pour recruter les macrophages, mais également un rôle de régulateur de l'expression d'autres chémoattractants tels que le CCL2 ou IL-1 β (Chen et al., 2015b).

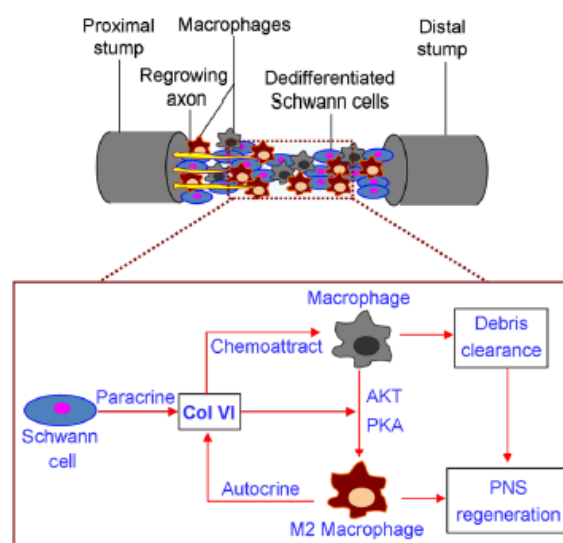


Figure I-14. Implication du collagène VI dans l'infiltration macrophagique après lésion nerveuse. La production paracrine de Collagène VI par les cellules de Schwann participe à la chémoattraction des macrophages lors de la dégénérescence wallérienne (d'après Chen et al., 2015a,b).

La galectine-1 est une autre protéine exprimée par les macrophages, cellules de Schwann et axones des nerfs périphériques, dont l'expression est augmentée après axotomie (Gaudet et al., 2009). Les protéines de la voie activée du complément jouent également un rôle dans le chimiotactisme des macrophages (Bianco et al., 1979), tout comme la P-sélectine (molécule d'adhésion cellulaire exprimée à la surface des macrophages), l'intercellular adhesion

molécule 1 (ICAM-1) exprimée dans les cellules de Schwann, la prostacycline ou la protéine Serum Amyloid A (SAA) (Chen et al., 2015a).

Enfin, il faut souligner le rôle important de la BHN dans l'infiltration macrophagique après lésion nerveuse. En effet, la BHN devient de plus en plus perméable durant la dégénérescence wallérienne après lésion nerveuse, avec un pic à J8, puis regagne progressivement son imperméabilité jusqu'à J30 quand la régénération nerveuse est complète (Seitz et al., 1989). Ainsi, la transection du nerf sciatique s'accompagne d'une surexpression robuste de MMP2 et MMP9, corrélée à la disruption de la BHN et l'accumulation des macrophages (Siebert et al., 2001). De plus, la dysfonction de la BHN post-lésion nerveuse est régulée par les macrophages, démontrée par le fait que les altérations de la BHN post-compression nerveuse chronique sont atténuées par la déplétion en macrophages (Gray et al., 2007).

Après leur infiltration, les macrophages contribuent initialement à la régénération nerveuse périphérique en supprimant les signaux inhibiteurs de la régénération axonale provenant des débris de myéline et en préparant le terrain pour la régénération axonale future. De plus, ces cellules sécrètent de multiples facteurs, dont des protéases, des facteurs de croissance ou des cytokines stimulant le remodelage de la MEC pour promouvoir la régénération nerveuse périphérique (Chen et al., 2015a). Les macrophages infiltrés agissent également sur d'autres populations cellulaires dans les nerfs lésés. Ainsi, les macrophages modulent la mitose, la différenciation, l'infiltration et/ou la migration des cellules de Schwann, essentielles à la régénération nerveuse. En effet, après section nerveuse, il se crée un environnement local hypoxique détecté par les macrophages, qui synthétisent alors du VEGF-A pour polariser les néovaisseaux, facilitant la migration des cellules de Schwann à travers la plaie, contribuant ainsi à la régénération nerveuse (Cattin et al., 2015). En plus de leur infiltration dans la partie distale du nerf après lésion, les macrophages s'accumulent également autour des corps cellulaires des neurones axotomisés où ils stimulent directement la régénération nerveuse (Niemi et al., 2013).

Des études récentes suggèrent que les macrophages infiltrés peuvent être éduqués par le microenvironnement local et changer de phénotype, passant ainsi d'un phénotype pro-inflammatoire destructeur à un phénotype anti-inflammatoire réparateur (Chen et al., 2015a). Ainsi, la transection du nerf sciatique induit la production d'inhibiteurs de la réponse pro-inflammatoire et l'activation d'IL-10 (une cytokine anti-inflammatoire), créant ainsi un microenvironnement favorable à la polarisation M2, se traduisant par une absence notable de macrophages M1 (Ydens et al., 2012). D'autres études ont montré que les M1 ne sont présents

que les premiers jours après ligature du nerf sciatique et disparaissent à J3-J4, où les macrophages se polarisent vers le phénotype M2 et expriment de hauts niveaux d'arginase-1 et CD206 (Nadeau et al., 2011).

De multiples signaux sont impliqués dans cette polarisation M2 dans les nerfs lésés (résumés dans le Tableau I-2).

Factors/signaling pathways	Key findings	References
apoE-p38 apoE-tyrosine kinase	Sciatic nerve crush injury induces a robust upregulation of apoE, which promotes macrophage M2 polarization via activation of p38 and tyrosine kinase signaling pathways	[3, 100, 114]
Collagen VI-AKT Collagen VI-PKA	Collagen VI deposition is dramatically upregulated in injured sciatic nerves, where it stimulates macrophage M2 polarization by activation of AKT and PKA signaling pathways	[21]
CCL2-CCR2	Sciatic nerve ligation injury upregulates the expression of CCL2-CCR2 signal, which in turn polarizes macrophage to M2 phenotype	[52, 103, 112, 117, 120]
GPR84	Ablation of GPR84 induces macrophage M2 polarization after sciatic nerve ligation injury	[82]

Tableau I-2. Facteurs et voies de signalisation impliquées dans la polarisation M2. (d'après Chen et al., 2015a).

Cette polarisation des macrophages vers un phénotype « pro-réparateur » traduit la mise en place du processus physiologique de cicatrisation (Chen et al., 2015a).

De la neurite à la neuropathie :

Alors que les neurones du SNP ont une capacité de régénération intrinsèque, la récupération fonctionnelle chez l'homme est souvent incomplète. Ceci semble résulter du fait que la réponse régénérative des neurones lésés et des cellules environnantes ne peut maintenir une réponse promotrice de la croissance axonale sur le long terme (Gaudet et al., 2011).

De plus, les différences de récupération neurophysiologique observées après lésion nerveuse varient probablement entre lésion aiguë et lésion chronique, ainsi que selon la durée de la lésion nerveuse (Tseng et al., 2015). La récupération de la conduction nerveuse nécessite l'intégrité des fibres nerveuses et gaines de myéline. Les lésions compressives (modélisant des lésions neuropathiques) induisent une dégénérescence wallérienne complète du moignon distal au site de compression, avec perte complète de conduction nerveuse lors d'une stimulation de la région proximale. Dans la constriction chronique du nerf sciatique par exemple, la constriction crée une zone de blocage de la transmission électrophysiologique. Cette disruption structurelle altère également l'architecture de la gaine de myéline et mène au blocage de la transmission électrique des fibres nerveuses survivantes, de façon similaire à une compression nerveuse aiguë (Tseng et al., 2015). La durée de la lésion nerveuse détermine également la quantité de récupération de conduction nerveuse. Par exemple, la

restauration de la densité de fibres nerveuses intra-épidermiques est limitée même après décompression d'une constriction chronique. Ces résultats suggèrent qu'une constriction prolongée altère fortement la restauration de la conduction nerveuse et la régénération axonale. Enfin, il faut noter que la meilleure récupération des potentiels d'actions (PA) musculaires composés par rapport aux potentiels d'actions des nerfs sensoriels suggère que les fibres sensorielles myélinisées sont plus sensibles à la constriction mécanique que les fibres motrices. La faible récupération de ces PA des fibres nerveuses sensorielles pourrait expliquer la persistance d'anomalies sensorielles lors de syndromes de compression nerveuse, telle qu'observé en clinique (Tseng et al., 2015).

Les mécanismes sous-tendant cette transition aiguë → chronique commencent à être explorés, notamment le rôle de l'activation (« priming ») microgliale. De fait, alors que la microglie peut exprimer de multiples états d'activation, l'état « sensibilisé » ou « primé » contribue à la potentialisation d'autres pathologies neuro-inflammatoires. Des réponses potentialisées de la microglie ont été observées chez le rat après trauma/inflammation périphérique ou centrale, se traduisant par des réponses IL-1 β potentialisées. Bien que les mécanismes exacts d'un tel priming soient encore peu connus, une augmentation d'expression de l'ARNm du récepteur de l'immunité innée TLR4 a notamment été impliquée (Nicotra et al., 2012).

Par ailleurs, la durée de transition entre une lésion nerveuse aiguë (neurite) et une lésion chronique (neuropathie) serait sous la dépendance de la production d'un "priming" (sensibilisation) hyperalgésique. En effet, des lésions aiguës vont induire un priming hyperalgésique, c'est à dire des changements neuroplastiques des nocicepteurs qui prolongent de façon conséquente l'hyperalgésie induite par les médiateurs inflammatoires. Après une agression aiguë, il y est observé un délai de 72 heures avant le déclenchement du priming, de mécanisme sous-jacent inconnu. Ferrari et al. ont émis l'hypothèse que ce délai correspondrait au temps nécessaire au signal neuronal de voyager de la terminaison nerveuse périphérique au corps cellulaire puis de retourner vers la terminaison périphérique. Ainsi, lorsqu'un inducteur de priming hyperalgésique (ex : CCL2) est administré dans la moelle spinale de rats, le priming est détecté à la terminaison périphérique dans un délai bien plus court que lorsqu'administré en périphérie. De plus, l'hyperalgésie inflammatoire induite par l'injection spinale de PGE2 est observée non seulement lorsque la prostaglandine PGE2 est administrée au niveau des terminaisons périphériques des nocicepteurs, mais aussi lorsqu'elle est administrée à proximité des terminaisons centrales dans la moelle spinale. Le signal

responsable de l'hyperalgésie transmis du corps cellulaire vers la terminaison périphérique ne serait pas une nouvelle protéine mais un ARNm nouvellement exprimé (Ferrari et al., 2015).

Dans l'ensemble, ces données suggèrent que la persistance d'un stimulus offensif (ex : compression nerveuse), sur une durée suffisante, pourrait être un élément clé du développement d'une douleur neuropathique post-lésionnelle.

I-3 Nociception pathologique et douleurs neuropathiques

La nociception physiologique est nécessaire et importante à la survie, renseignant sur une atteinte immédiate à l'intégrité corporelle. Cependant, cette douleur aiguë protectrice peut évoluer dans certains cas vers une douleur chronique pathologique. Le plus souvent, les altérations des voies nociceptives physiologiques mènent à une hypersensibilité douloureuse, la douleur ne jouant plus son rôle utile de système d'alerte, mais devenant chronique et invalidante. Cette hypersensibilité peut dans une certaine mesure être assimilée à une extension du processus physiologique de cicatrisation, où la lésion tissulaire/nerveuse produit une hypersensibilité pour protéger la zone lésée de toute stimulation intempestive (qui retarderait la cicatrisation). Un tel phénomène est fréquemment observé après un coup de soleil par exemple, résultant en une sensibilisation transitoire de la région affectée (Basbaum et al., 2009).

Néanmoins le maintien anormal de cette hypersensibilité, notamment par le biais d'une sensibilisation des voies nociceptives périphériques et centrales, conduira au développement d'une douleur neuropathique chronique (Basbaum et al., 2009).

I-3-1 Phénomènes de sensibilisation périphérique et centrale

Sensibilisation périphérique :

Les nerfs périphériques peuvent voir leurs propriétés fonctionnelles altérées à la suite d'une lésion des fibres nerveuses menant à une augmentation des décharges électriques spontanées, une altération de la conduction nerveuse voire des changements au niveau de la neurotransmission (altérations des neurotransmetteurs) définissant la « sensibilisation périphérique ».

Cette sensibilisation périphérique résulte le plus souvent de changements de l'environnement chimique de la fibre nerveuse, en réponse à une inflammation. De fait, la lésion tissulaire s'accompagne souvent d'une accumulation de facteurs endogènes libérés par les nocicepteurs activés ou des cellules non-neuronales qui résident dans la région lésée ou qui infiltrent cette dernière (incluant les mastocytes, polynucléaires basophiles [PNB], plaquettes, macrophages, polynucléaires neutrophiles [PNN], cellules endothéliales, kératinocytes et fibroblastes). Cet environnement, communément appelé « soupe inflammatoire », comprend une grande variété de molécules de signalisation, incluant des neurotransmetteurs, peptides (SP, CGRP, bradykinine), eicosanoïdes et lipides apparentés (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes, endocannabinoïdes), neurotrophines, cytokines et chimiokines, ainsi que des protéases extracellulaires et des protons. De façon intéressante, les nocicepteurs expriment un ou plusieurs récepteurs membranaires capables de reconnaître et répondre à chacun de ces facteurs pro-inflammatoires et/ou pro-algésiques (Figure I-15). De telles interactions favorisent l'excitabilité neuronale, augmentant ainsi sa sensibilité aux stimuli thermiques et mécaniques.

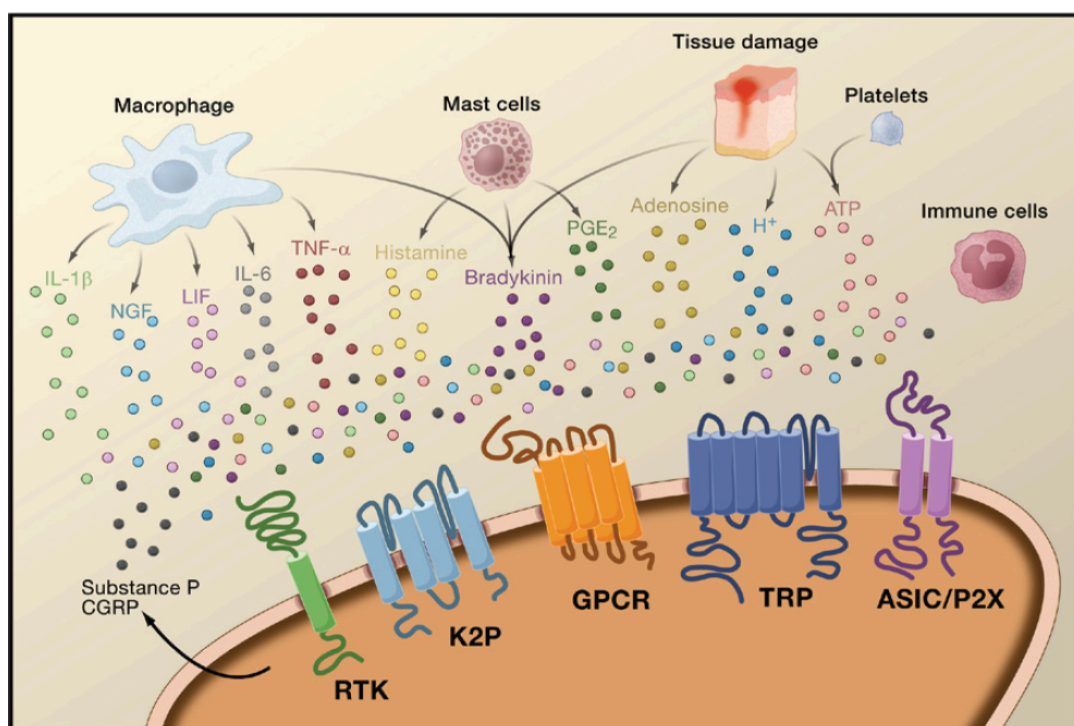


Figure I-15. Mécanismes moléculaires de la sensibilisation périphérique. Les différents composants de la « soupe inflammatoire » libérée au niveau des terminaisons nerveuses périphériques participent à la sensibilisation périphérique des afférences primaires et la genèse de douleurs neuropathiques périphériques (d'après Basbaum et al., 2009).

Le NGF, surtout connu pour son rôle neurotrophique nécessaire à la survie et au développement des neurones sensitifs durant l'embryogénèse, est produit chez l'adulte dans

un contexte de lésion tissulaire et constitue un important composant de la « soupe inflammatoire ». Parmi ces cibles cellulaires, le NGF agit directement sur les nocicepteurs C peptidergiques qui expriment le récepteur tyrosine kinase à haute affinité au NGF, TrkA, ainsi que le récepteur aux neutrophines à faible affinité, p75. Le NGF produit une importante hypersensibilité thermique et mécanique par deux mécanismes temporellement distincts. En premier lieu, une interaction NGF-TrkA active des voies de signalisation sous-jacentes, notamment les voies de la phospholipase C (PLC), des mitogen-activated proteins kinases (MAPK) et de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Ceci se traduit par une potentialisation fonctionnelle des protéines cibles au niveau de la terminaison périphérique du nocicepteur, surtout TRPV1, menant à des changements rapides dans la sensibilité thermique tant au niveau cellulaire que comportemental. Dans un deuxième temps, le NGF fait l'objet d'un transport rétrograde jusqu'au noyau du nocicepteur, où il favorise l'augmentation d'expression de protéines pro-nociceptives, dont la SP, TRPV1 et la sous-unité Na_v1.8 du canal sodium voltage-dépendant. Ensemble, ces changements d'expression génique augmentent l'excitabilité du nocicepteur et amplifient la réponse inflammatoire neurogène. En complément des neurotrophines, la lésion tissulaire induit la libération de nombreuses cytokines, dont les principales sont IL-1 β , IL6 et TNF- α . Bien qu'il existe des données soulignant leur rôle direct sur les nocicepteurs, leur principale contribution à l'hypersensibilité douloureuse proviendrait de la potentialisation de la réponse inflammatoire et l'augmentation de la production d'agents pro-algésiques (tels que les prostaglandines, NGF, bradykinine et les protons extracellulaires) (Basbaum et al., 2009).

Sensibilisation centrale :

Les stimuli nociceptifs peuvent déclencher une augmentation réversible mais prolongée de l'excitabilité neuronale et de l'efficacité synaptique des neurones des voies nociceptives centrales, la « sensibilisation centrale ». Cette sensibilisation centrale se manifeste sous la forme d'une hypersensibilité douloureuse, en particulier une allodynie tactile dynamique, une hyperalgésie secondaire à la pression ou la piqûre, des « sensations persistantes » et une augmentation de la sommation temporelle de la douleur (Latrémoière et Woolf, 2009).

Le terme « sensibilisation centrale » désigne ainsi les processus responsables de l'établissement d'un état d'hyperexcitabilité du SNC, conduisant à une exagération de l'intégration nociceptive. De nombreux mécanismes ont été impliqués dans cette sensibilisation, dont 3 principaux (Basbaum et al., 2009 ; Pohl, 2014) :

1) Altérations de la neurotransmission glutamatergique/sensibilisation induite par le récepteur NMDA

La douleur aiguë est véhiculée par la libération de glutamate par les terminaisons centrales des nocicepteurs, générant ainsi des courants post-synaptiques excitateurs dans les neurones spinaux (de la corne dorsale) de deuxième ordre. Ceci a lieu principalement via l'activation des récepteurs AMPA et kaïnate post-synaptiques. La sommation des courants post-synaptiques excitateurs infraliminaires (i.e. sous le seuil d'excitation neuronal) dans le neurone post-synaptique se traduira à terme par la genèse d'un potentiel d'action et la transmission du message nociceptif à des neurones de plus haut ordre. Dans ces conditions, le récepteur NMDA est silencieux, mais dans un contexte lésionnel, l'augmentation de libération des neurotransmetteurs par les nocicepteurs génère une dépolarisation suffisante des neurones post-synaptiques pour activer ces récepteurs NMDA quiescents. L'augmentation de l'influx de calcium qui en résulte renforce la connexion synaptique entre les nocicepteurs et les neurones de la corne dorsale, menant à des réponses exacerbées à un stimulus nociceptif, générant ainsi une hyperalgésie.

Ce processus est très similaire à ceux impliqués dans les changements plastiques associés à la *Long-Term Potentiation* (LTP) hippocampique. En effet, les molécules bloquant la LTP spinale diminuent l'hyperalgésie post-lésionnelle. De la même façon que pour la LTP hippocampique, la sensibilisation centrale spinale dépend d'augmentations de la concentration intracellulaire de calcium induite par le NMDA dans les neurones post-synaptiques. L'activation simultanée des récepteurs métabotropiques au glutamate et à la SP au niveau du neurone post-synaptique pourraient également contribuer à la sensibilisation par augmentation du calcium intracellulaire. L'activation de multiples voies de signalisation et seconds messagers, notamment les kinases (MAPK, PKA, PKC, PI3K, Src) contribue à l'augmentation de l'excitabilité neuronale de ces neurones, en partie via la modulation de la fonction du récepteur NMDA.

En plus d'augmenter la réponse aux stimuli au niveau du site lésionnel (hyperalgésie primaire), la sensibilisation centrale contribue également à l'apparition de douleur lors de la stimulation inoffensive des zones péri-lésionnelles (hyperalgésie secondaire). Cette hyperalgésie secondaire implique la facilitation de la neurotransmission hétérosynaptique, où les stimuli issus des fibres A β , répondant normalement au tact

léger, empruntent les voies de transmission nociceptive, résultant en une allodynie mécanique importante.

2) Perte des contrôles inhibiteurs toniques GABAergiques et glycinergiques : la désinhibition (Coull et al., 2003 ; De Koninck, 2007)

Les interneurons inhibiteurs GABAergiques ou glycinergiques sont densément distribués dans la corne dorsale superficielle et sont la base de la théorie du « *gate control* » qui postule que la perte de fonction de ces interneurons inhibiteurs (désinhibition) se traduit par une augmentation de la douleur. En effet, chez le rongeur, l'administration spinale d'antagonistes des récepteurs au GABA (bicuculline) ou à la glycine (strychnine) produit une hypersensibilité douloureuse (sur le plan comportemental) similaire à celle observée après lésion tissulaire périphérique. De façon cohérente avec ces observations chez l'animal, il a été montré qu'une lésion périphérique induit une diminution des courants post-synaptiques inhibiteurs dans les neurones de la corne dorsale superficielle.

Quelle qu'en soit l'étiologie, la diminution de l'inhibition tonique augmente la dépolarisation et l'excitation des neurones de projection. De même que pour la sensibilisation centrale NMDA-dépendante, la désinhibition augmente la transmission spinale en réponse à des stimulations douloureuses et non-douloureuses, contribuant ainsi à l'allodynie mécanique.

Cette désinhibition implique les interneurons inhibiteurs PKC γ^+ dans la couche II spinale (Miraucourt et al., 2007), la diminution d'expression du co-transporteur K $^+$ /Cl $^-$ KCC2 neuronal se traduisant par une inversion des courants sortants (dépolarisation neuronale induite par le GABA) et enfin la modulation de la signalisation glycinergique, notamment par les prostaglandines (la libération spinale de PGE2 [suite à la lésion tissulaire] bloquant l'effet inhibiteur de la glycine sur les interneurons excitateurs spinaux).

3) Interactions neuro-gliales

En conditions normales, la microglie fonctionne comme les macrophages résidents du SNC, jouant le rôle de sentinelles de lésion ou d'infection. Dans les heures suivant une lésion nerveuse périphérique, la microglie s'accumule dans la corne dorsale au niveau des terminaisons des fibres nerveuses lésées. Cette microglie activée libère de nombreuses molécules de signalisation dont des cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL6) qui

augmentent la sensibilisation neuronale centrale et la douleur persistante post-lésionnelle.

L'activation microgliale ne dépend pas directement de l'activation des fibres nerveuses afférentes, mais plutôt de la détection microgliale de nombreux facteurs libérés lors de la lésion tissulaire, dont l'ATP principalement, qui active les récepteurs purinergiques de type P2, surtout P2X4, P2X7 et P2Y12. En outre, l'activation de P2X4 par l'ATP induit la libération de BDNF par la microglie, dont la fixation à son récepteur TrkB au niveau des neurones de projection de la couche I, induit un changement dans le gradient Cl^- , menant à un changement dans l'effet du GABA qui devient dépolarisant (et non hyperpolarisant) (Coull et al., 2003).

L'activation microgliale va se traduire par une sensibilisation des neurones de la couche I, résultant en une augmentation de leur réponse à des influx monosynaptiques issus des nocicepteurs ou des influx indirects par les fibres A β .

De plus, de nombreuses cytokines et chimiokines contribuent également à la sensibilisation centrale. L'augmentation de libération neuronale de fractalkine (CX3CL1) induite par une lésion nerveuse périphérique, se traduit par une activation microgliale via le récepteur CX3CR1 dont l'expression est augmentée après lésion nerveuse. Ceci pourrait faire partie d'une boucle de rétrocontrôle positif d'interactions neuro-gliales favorisant l'amplification des signaux nociceptifs.

Récemment, différents membres de la famille des récepteurs de l'immunité innée (TLRs) ont été impliqués dans l'activation microgliale, dont le TLR4 principalement (Nicotra et al., 2012).

Enfin, la contribution des astrocytes à la sensibilisation centrale est moins claire. Les astrocytes sont incontestablement activés dans la moelle spinale après lésion tissulaire ou nerveuse. Mais, à l'inverse de la microglie, l'activation astrocytaire est généralement retardée et persiste bien plus longtemps, jusqu'à plusieurs mois. Ainsi, une hypothèse intéressante propose un rôle des astrocytes dans le maintien de la sensibilisation centrale et la douleur persistante plutôt que son initiation (Molet et al., 2016).

Enfin, il convient de noter qu'une lésion périphérique spinale active la glie non seulement au niveau spinal mais également au niveau du tronc cérébral, où cette dernière contribue à la facilitation supra-spinale des messages nociceptifs spinaux, selon un phénomène dénommé « facilitation descendante ». Une telle facilitation est

particulièrement proéminente en contexte lésionnel et semble contrecarrer les contrôles inhibiteurs descendants issus de diverses régions du tronc cérébral.

Ces mécanismes de sensibilisation centrale sont illustrés dans la Figure I-16.

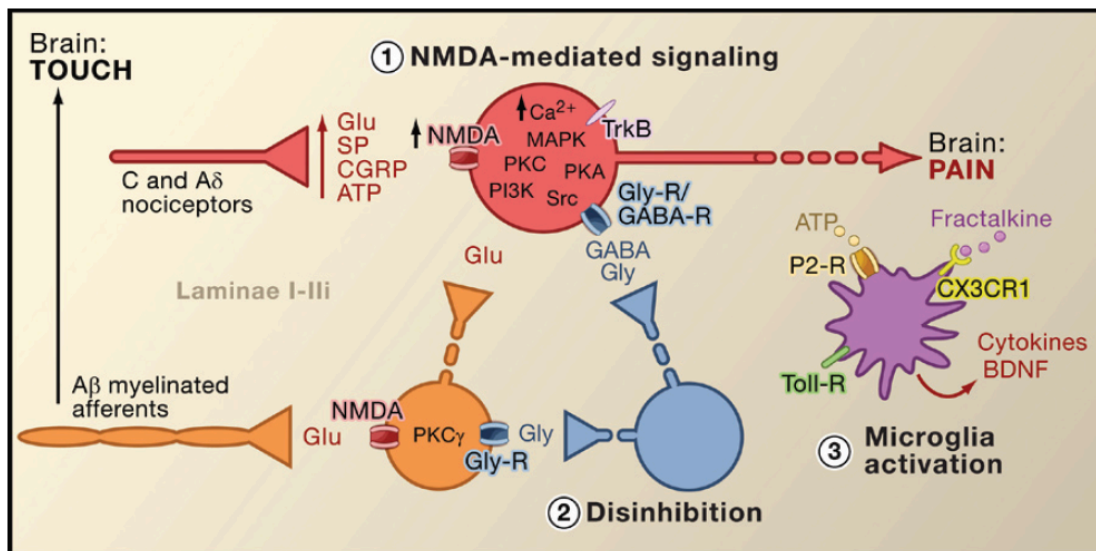


Figure I-16. Mécanismes moléculaires de la sensibilisation centrale. Trois grands mécanismes contribuent à la sensibilisation centrale (et l'apparition d'une douleur lors d'un stimulus tactile non douloureux) : 1) la signalisation NMDA-dépendante, 2) la désinhibition et 3) l'activation microgliale (d'après Basbaum et al., 2009).

Cette sensibilisation centrale apparaît à la suite de stimulations nociceptives particulièrement intenses, répétées ou prolongées, comme c'est typiquement le cas après lésion tissulaire (inflammation post-traumatique, lésion chirurgicale...) entraînant une sensibilisation des neurones centraux spinaux (ou trigéminaux). Elle reflète un gain d'efficacité de la transmission nociceptive résultant de l'augmentation de l'excitabilité neuronale, du renforcement de l'efficacité de la transmission synaptique et de la levée d'inhibition au sein des circuits nerveux nociceptifs, comme évoqué précédemment (Pohl, 2014).

A court terme, l'apparition de la sensibilisation nociceptive centrale est principalement liée aux changements fonctionnels de nombreuses protéines consécutifs à leurs modifications post-traductionnelles (en particulier leur phosphorylation). Ces altérations conduisent notamment à la facilitation de la transmission glutamatergique et à la modification de la perméabilité des canaux ioniques. En revanche, à long terme, la sensibilisation centrale s'accompagne d'une plasticité et d'un remodelage tissulaire qui implique de nombreux types cellulaires. Ce stade est caractérisé par l'induction et la modulation de synthèse de très nombreuses protéines, dont la sécrétion contribue au bouleversement de l'environnement

biochimique des cellules et de la signalisation intercellulaire, ainsi qu'*in fine* à la sensibilisation des neurones des voies nociceptives (Pohl, 2014).

En condition de douleurs physiologiques, ces altérations fonctionnelles des neurones spinaux sont temporaires (déphosphorylations des protéines cibles par les phosphatases, changement du trafic intracellulaire des protéines,...) et après « guérison », c'est à dire en l'absence d'autres stimulations importantes, le système retrouve rapidement un état proche du fonctionnement initial. L'élément central de la mise en place de la sensibilisation centrale physiologique est l'augmentation de la transmission glutamatergique qui s'accompagne de l'activation des récepteurs NMDA. L'entrée de Ca^{2+} via les récepteurs NMDA et AMPA, la dépolarisation membranaire entraînant l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants ainsi que la mobilisation du calcium des stocks intracellulaires conduisent à une hausse des concentrations intra-neuronales de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Cette montée de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est nécessaire à l'activation des protéines kinases de type PKC et PKA qui phosphorylent directement de nombreuses protéines clés de la sensibilisation centrale et participent aux cascades de phosphorylation (activation) d'autres protéines kinases, en particulier MAP et ERK. Cette dernière est mise en jeu de façon convergente par de nombreuses voies de signalisation différentes (R-NMDA, R-NK1, R-CGRP, TrkB, CCR2,...) suggérant son implication majeure dans les modifications du fonctionnement de nombreuses protéines sous-tendant la sensibilisation centrale. L'activation des récepteurs glutamatergiques, l'augmentation de leur densité membranaire, les modifications de la sensibilité des canaux ioniques au potentiel de membrane sont responsables de l'hyperexcitabilité post-synaptique. De plus, l'activité PKC participe également à la réduction du tonus inhibiteur spinal exercé par le GABA et la glycine, ainsi qu'à la diminution de l'efficacité de certains contrôles inhibiteurs descendants (Pohl, 2014).

Dans le cas de douleurs pathologiques, la plasticité cellulaire et le remodelage tissulaire qui s'opèrent au sein du SNC en réponse à l'activation initiale intense et soutenue des nocicepteurs, sont suffisants pour maintenir la sensibilisation centrale à long terme, même sans activité anormalement élevée des neurones sensitifs primaires, menant au développement d'une douleur chronique persistante. Ainsi, dans certaines conditions généralement associées à une inflammation périphérique persistante ou à une lésion nerveuse, la sensibilisation nociceptive centrale va perdurer et participer au maintien de la douleur à plus long terme voire à l'émergence de douleurs pathologiques chroniques. Outre les mécanismes similaires à

la sensibilisation centrale physiologique (exacerbation de la transmission glutamatergique, hausse de $[Ca^{2+}]_i$, baisse de l'efficacité des systèmes inhibiteurs,...), d'autres mécanismes pourraient être impliqués dans la genèse de ces douleurs pathologiques. Ainsi, la PKM ζ , un type particulier de PKC, pourrait expliquer l'existence d'une sensibilisation nociceptive centrale latente pouvant persister à la suite d'une inflammation ou lésion tissulaire temporaire et se révéler lors d'un nouvel épisode douloureux (Asiedu et al., 2011). La mise en place de cette forme de sensibilisation centrale est associée à des modifications traductionnelles périphériques et centrales, au niveau spinal et trigéminal. En revanche, son maintien est indépendant d'une néosynthèse de protéines et peut être complètement aboli par l'inhibition sélective de la PKM ζ . La mise en jeu de PKM ζ dans la moelle spinale semble ainsi l'élément central de ce type de sensibilisation pathologique. En effet, il a été montré récemment que l'expression d'une forme constitutivement active de la kinase dans la corne dorsale de la moelle est suffisante pour provoquer une sensibilisation centrale persistante en dehors de toute lésion ou inflammation périphérique initiales (Asiedu et al., 2011). Selon ces auteurs, des altérations périphériques temporaires seraient à l'origine d'un maintien de traces moléculaires au sein de la moelle spinale qui rendraient compte de l'état de sensibilisation nociceptive latente et qui impliqueraient des mécanismes proches de la L-LTP (*Late LTP*).

Néanmoins, la sensibilisation nociceptive centrale à long terme (pathologique) semble fondée sur des mécanismes distincts. Elle est caractérisée en outre par des modifications de l'expression d'un nombre important de gènes conduisant à de profonds changements phénotypiques des neurones (périphériques et centraux) et souvent d'autres populations cellulaires. En réponse à une inflammation périphérique prolongée, on estime que l'expression d'une centaine de gènes est altérée au sein des ganglions sensoriels et de la moelle spinale. Les conséquences d'une lésion nerveuse sont bien plus importantes encore puisque l'expression différentielle de plus d'un millier de gènes a été identifiée (Gong et al., 2016). Le contrôle de la transcription des gènes, qui implique différents facteurs d'expression, des ARN interférents non codants (courts ou longs) et des mécanismes épigénétiques, apparaît comme l'élément clé des altérations soutenant la sensibilisation nociceptive centrale pathologique. Ces modifications impliquent de nombreuses voies de signalisation intracellulaires, dont la voie p38 MAPK, la MAP kinase ERK, la kinase JNK, ou la voie JAK/STAT3.

Bien qu'en principe ce type de sensibilisation ne soit pas directement dépendant -à long terme- de l'influx nociceptif, les altérations phénotypiques des neurones sensoriels primaires participent néanmoins à la facilitation de la transmission synaptique spinale. De fait,

l'inflammation périphérique persistante et davantage encore, la lésion des nerfs périphériques exacerbent la synthèse des neuromodulateurs classiques des nocicepteurs (SP, CGRP...) et induisent fortement la synthèse d'autres molécules, par exemple les cytokines et les chimiokines, dont la production est généralement faible en conditions physiologiques. La synthèse et la libération altérées de ces molécules par les neurones afférents primaires modifiera directement le seuil d'excitabilité des neurones spinaux et participera au remodelage tissulaire au sein de la moelle spinale, à la plasticité cellulaire et, en particulier, au changement de la réactivité gliale (Pohl, 2014).

I-3-2 Rôle de la neuroinflammation locale dans la sensibilisation périphérique

Les lésions nerveuses périphériques génèrent l'apparition d'une neuroinflammation périphérique, conséquence du traumatisme initial. Cette neuroinflammation entraîne des modifications locales et à distance, concourant à l'apparition d'une sensibilisation périphérique telle que précédemment décrite.

Les lésions nerveuses périphériques induisant une dégénérescence wallérienne, se traduisent sur le plan immunitaire par une infiltration coordonnée et séquentielle d'immunocytes (Tableau I-3), participant à la régénération nerveuse (notamment via la clairance des débris de myéline).

<i>Nerf périphérique non lésé</i>	<i>24 heures post-lésion</i>	<i>3 jours post-lésion</i>	<i>1-2 semaines post-lésion</i>	<i>> 3 semaines post-lésion</i>
- mastocytes - macrophages résidents	- dégranulation des mastocytes - pic d'infiltration des PNN - début d'infiltration des macrophages - pic de CCL2 dans les neurones	- pic d'infiltration des macrophages (dégénérescence wallérienne) - infiltration des lymphocytes T - fin d'infiltration des PNN	- poursuite de l'infiltration des macrophages et des lymphocytes T - poursuite de la dégénérescence wallérienne	- pic d'infiltration des lymphocytes T - régénération du nerf

Tableau I-3. Cinétique de l'infiltration d'immunocytes dans le nerf après lésion nerveuse. (d'après Sapienza et al., 2014).

La dégranulation des mastocytes présents dans le nerf jouerait un rôle majeur dans l'initiation de la douleur neuropathique, par libération de TNF- α dans les 24 premières heures après la lésion. A 24 heures, les polynucléaires neutrophiles vont être les premiers leucocytes à infiltrer le site de l'inflammation, probablement via un chimiotactisme induit par les mastocytes. Par la suite, les monocytes/macrophages vont être recrutés dans le nerf lésé, avec un pic d'infiltration à J3 post-lésion, via la libération de chimiokines, telles que CCL2 ou CX3CL1. De nombreuses chimiokines sont ainsi impliquées dans les processus neuro-inflammatoires et neurodégénératifs, par la modulation de la communication intercellulaire et des fonctions neuronales. Elles participent notamment à la neuromodulation de la douleur, via leur localisation au niveau des neurones afférents primaires et des zones de projection de la corne dorsale médullaire (Sapienza et al., 2014).

La chimiokine CCL2 joue un rôle prépondérant dans la douleur neuropathique. Alors qu'elle est exprimée de façon constitutive dans les fibres afférentes, la moelle épinière et les GRD, son expression augmente après lésion nerveuse (Van Steenwinckel et al., 2011, 2015). Le CCL2 libéré par les neurones nociceptifs lésés participe au maintien de la douleur neuropathique, notamment en favorisant l'infiltration de macrophages dans le parenchyme nerveux lésé. De plus, le CCL2 participe au maintien de la sensibilisation centrale par modulation de la transmission GABAergique dans les neurones spinaux.

D'autres chimiokines ont été impliquées dans la douleur neuropathique, telles que la Fractalkine (CX3CL1), le CXCL12/CXCR4, ainsi que CCL3, CCL4 et CCL5 (qui partagent le même récepteur CCR5) ou le CCL21 (considéré comme un activateur microglial, impliqué notamment dans les interactions neuro-gliales de la douleur neuropathique) (Sapienza et al., 2014).

Enfin, alors qu'on ne retrouve aucun lymphocyte T dans les nerfs sains, des lymphocytes T vont infiltrer le nerf après lésion nerveuse. Dans le modèle de constriction chronique du nerf sciatique, l'infiltration lymphocytaire débute à J3, avec un pic à J21 (Sapienza et al., 2014).

La libération de médiateurs inflammatoires par ces cellules immunitaires, mais également par les cellules gliales, va jouer un rôle important dans le développement de la douleur neuropathique. L'activation microgliale puis l'activation astrocytaire dans la moelle spinale, mènent à une inflammation chronique, l'altération de la physiologie neuronale puis à la douleur neuropathique. Ainsi, dans la plupart des modèles expérimentaux de douleurs neuropathiques, il est retrouvé une importante composante inflammatoire, qui implique une activation immunitaire et l'infiltration d'immunocytes. Parmi les immuno-modulateurs

potentiels impliqués dans la genèse des douleurs neuropathiques, l'IL-15, la cytokine des lymphocytes T, va jouer un rôle clé dans la régulation de l'activation des cellules immunitaires et de la réactivité gliale après lésion du SNC (Gomez-Nicola et al., 2008). Gomez-Nicola et al. ont montré, dans un modèle de constriction chronique (CCI) du nerf sciatique, que l'IL-15 est essentielle pour le développement des événements inflammatoires spinaux initiaux après lésion nerveuse périphérique, menant au développement d'une douleur neuropathique. L'expression d'IL-15 a ainsi été objectivée dans les cellules astrogliales et microgliales et était présente pendant la phase initiale de réponse gliotique et inflammatoire (NFκB-dépendante) à la lésion. L'expression d'IL-15 a également été identifiée dans cette étude comme un signal favorisant l'infiltration et l'activation des macrophages et des lymphocytes T dans le nerf sciatique, après CCI (Gomez-Nicola et al., 2008).

La neuroinflammation locale générée suite à l'infiltration des diverses populations immunocytaires dans le nerf lésé (sécrétant de multiples molécules pro-inflammatoires) va induire une diminution du seuil d'excitabilité neuronal associée à une augmentation de l'activité neuronale spontanée dans les afférences nociceptives. Cette augmentation précoce d'activité spontanée pourrait être un élément clé du déclenchement de la neuropathie périphérique, tel que suggéré dans diverses études. En effet, l'activité spontanée provenant des fibres afférentes lésées pourrait être impliquée dans le déclenchement et le maintien de la sensibilisation centrale à la suite d'une lésion nerveuse périphérique (Ji et Woolf, 2001). Dans ce sens, Smith et al. ont montré que l'administration de lidocaïne systémique pendant les 3 premiers jours post-lésionnels permettait l'inhibition complète du développement de l'hyperalgésie thermique post-CCI chez le rat (Smith et al., 2002). De la même façon, l'application ponctuelle d'anesthésiques locaux 2 jours après la lésion nerveuse, diminuait l'allodynie mécanique de façon plus efficace que lorsque administrés à 7 jours (Araujo et al., 2003).

Par ailleurs, dans la plupart des modèles animaux de douleurs neuropathiques l'activité spontanée et les comportements douloureux surviennent généralement dans les 12 heures à 2 jours post-lésionnels. Le blocage temporaire de cette activité spontanée précoce réduit voire élimine la douleur spontanée, l'hyperalgésie et l'allodynie observées dans ces modèles suggérant leur rôle clé dans l'initiation de la douleur neuropathique (Xie et al., 2005).

Au final, l'apparition d'une neuroinflammation locale, en déclenchant des phénomènes de sensibilisation périphérique et centrale, est un événement initial essentiel du développement des douleurs neuropathiques périphériques post-traumatiques.

Deuxième partie :

**Etude de l'impact de l'altération de la
perméabilité vasculaire endoneurale dans
les phénomènes de sensibilisation périphérique
des neurones nociceptifs primaires**

II – Etude de l’impact de l’altération de la perméabilité vasculaire endoneurale dans les phénomènes de sensibilisation périphérique des neurones nociceptifs primaires

II-1 Contexte scientifique : Altérations de la barrière hémato-nerveuse et neuroinflammation périphérique

L’infiltration d’immunocytes (et de substances algogènes) à l’origine du développement de la neuroinflammation périphérique (notamment post-traumatique) ne peut se concevoir qu’en association avec des altérations de la perméabilité vasculaire endoneurale et notamment une perméabilisation de la barrière hémato-nerveuse (BHN), dont un des rôles physiologiques est de maintenir l’homéostasie immunitaire locale.

De nombreuses études ont ainsi adressé la problématique de l’altération de la perméabilité vasculaire tant au niveau central que périphérique dans des modèles de douleurs inflammatoires et neuropathiques.

Au niveau central, des altérations de la barrière hémato-encéphalique (BHE) ou de la barrière hémato-spinale (BHS) se traduisant par une augmentation de la perméabilité vasculaire locale, ont été observées depuis plusieurs années dans plusieurs modèles de pathologies douloureuses inflammatoires (tableau II-1) ou neuropathiques depuis plusieurs années.

Barrier	Model	Main outcomes	Reference
BBB	Inflammatory pain, produced by subcutaneous injection of CFA, λ -carrageenan (CIP) or formalin, in sprague-dawley rats.	Peripheral inflammation led to an increase in the uptake of sucrose into the cerebral hemispheres, in all models studied. Western blot revealed changes in the TJ protein expression during peripheral inflammation. Occludin decreased in the groups treated with λ -carrageenan or CFA, while ZO-1 expression was increased in all inflammatory pain models. On the other hand, Claudin-1 protein expression did not change throughout the experiment.	Huber et al. (2001)
BBB	Chronic inflammatory pain, using CFA, in sprague-dawley rats.	Decrease in the expression of Occludin. Significant increase in the expression of claudin-3 (450%) and claudin-5 (615%) were also demonstrated, but the same results were not obtained with zonula occluden-1.	Brooks et al. (2005)
BBB	CIP, in sprague-dawley rats.	Increase in ICAM-1 RNA and protein expression in the thalamus, frontal, and parietal cortices; which were correlated with augmented expression of activated microglia.	Huber et al. (2006)
BBB	CIP and perineural injection of bupivacaine, in sprague-dawley rats.	Changes in the BBB integrity induced by CIP were prevented by a perineural injection of bupivacaine. This data suggests that nociceptive input is necessary to the increased BBB permeability found in λ -carrageenan models of inflammatory pain.	Campos et al. (2008)
BBB	CIP and capsaicin, in sprague-dawley rats.	Significant changes in occludin protein were observed in the lumbar spine after λ -carrageenan but not after capsaicin administration. Simultaneously, significant amounts of immunoglobulin G were seen in the lumbar and thoracic segments of the spinal cord	Xanthos et al. (2012)
BBB	CIP, in sprague-dawley rats.	Structural changes in P-gp.	McCaffrey et al. (2012)
BSCB	Perispinal inflammation induced by zymosan, in mice.	Perispinal inflammation led to changes in the reactivity of resident astrocytes and microglia within the spinal cord but maintained the integrity of the BSCB. Chronic pain did not develop.	Tenorio et al. (2013)
BBB	CIP and diclofenac treatment, in sprague-dawley rats.	Increased P-gp expression following peripheral inflammatory pain and also after diclofenac treatment. Both peripheral inflammatory pain and diclofenac treatment alone increased P-gp efflux activity, leading to a reduced morphine brain uptake. Analgesia produced by morphine was significantly reduced in animals pretreated with diclofenac, when compared to those that received diclofenac and morphine concurrently.	Sanchez-Covarrubias et al. (2014)

Tableau II-1. Etudes explorant les altérations de la barrière hémato-encéphalique (BHE) ou de la barrière hémato-spinale (BHS) dans des modèles de douleurs inflammatoires. BBB = Blood-Brain Barrier (= BHE) ; BSCB = Blood-Spinal Cord Barrier (= BHS) (d'après DosSantos et al., 2014).

Dans ce dernier cas, une disruption de la BHS a été observée après ligature nerveuse spinale, se traduisant par une augmentation de la perméabilité vasculaire locale et une activation astrocytaire au sein de la moelle spinale (Gordh et Sharma, 2006).

Plus récemment, Beggs et al. (2010) ont montré que la constriction chronique du nerf sciatique (*Chronic Constriction Injury*, CCI) ou sa transection, mais également la stimulation de fibres afférentes C saines, étaient capables d'induire une augmentation de la perméabilité de la BHE et de la BHS (évaluée par extravasation de Bleu d'Evans ou de peroxydase de Raifort [Horseradish Peroxidase]). De plus, l'application de capsaïcine au niveau d'un nerf sciatique non lésé mimait les effets vasculaires du CCI ou de la stimulation des fibres C saines, suggérant que les fibres C TPRV1⁺ pourraient être responsables de l'augmentation brutale de la perméabilité de la BHE/BHS (Beggs et al., 2010).

Dans un autre modèle de lésion nerveuse neuropathique, la ligature partielle du nerf sciatique chez le rat, une augmentation de la perméabilité de la BHS à des traceurs de différentes tailles (Bleu d'Evans, Fluorescéine sodique) était observée au niveau de la moelle lombaire mais pas thoracique, maximale entre J3 et J7 post-lésion, persistant pendant au moins 4 semaines après la lésion, avec un retour à la normale à 2 mois post-lésionnels. Après 3 jours post-ligature, des dépôts de protéines plasmatiques (IgG et fibronectine) étaient observés dans le parenchyme spinal ipsilatéral, associée à une diminution d'expression de protéines de jonctions serrées (ZO-1, Occludine et Cavéoline-1) dans les micro-vaisseaux de la moelle spinale (Echeverry et al., 2011). Cette perméabilisation de la BHS était indépendante de l'activation de la microglie résidente. De plus, l'administration de hautes doses d'IL-1 β en intraveineux aggravait la disruption de la BHS alors que l'administration intrathécale de TGF- β 1 et d'IL-10 restaurait la BHS.

Selon Radu et al. 2013, cette altération de la perméabilité vasculaire au niveau de la BHE ou de la BHS pourrait participer à la transition entre douleur aiguë et douleur chronique observée dans ces modèles lésionnels périphériques. Celle-ci résulterait de nombreuses perturbations au sein de l'unité neuro-vasculaire, telles que la libération de médiateurs inflammatoires, la modification de l'expression de protéines de jonctions serrées ou de transporteurs ABC, une activation microgliale/astrocytaire ou l'extravasation de cellules immunitaires ou d'albumine (Radu et al., 2013).

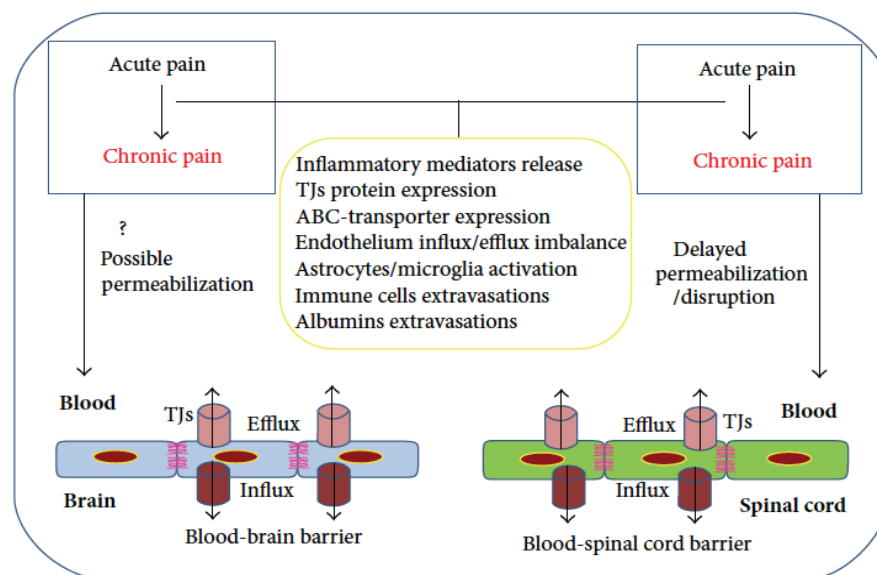


Figure II-1. Implication de la perméabilisation des barrières hémato-encéphalique et hémato-spinale dans la transition entre douleur aiguë et douleur chronique. (d'après Radu et al., 2013).

Au niveau périphérique, à l'instar des modifications de la BHE, l'altération de la BHN a été également observée dans de multiples pathologies nerveuses périphériques, telles que les

lésions thermiques, la neuropathie diabétique, le trauma nerveux ou la compression nerveuse (*crush injury*) (Dyck et Giannini, 1996 ; Omura et al., 2004).

Olsson (1968) puis Mellick et Cavanagh (1968) furent les premiers à proposer un lien entre lésion nerveuse et augmentation de la perméabilité vasculaire endoneurale, ces derniers suggérant que la libération d'amines vaso-actives lors de la dégranulation des mastocytes pourrait être à l'origine de l'augmentation de perméabilité vasculaire.

Malgré quelques travaux classiques sur les altérations locales vasculaires consécutives à une lésion nerveuse dans différents modèles expérimentaux (Myers et al., 1981, 1985 ; Powell et al., 1991), peu d'études ont exploré les mécanismes cellulaires et moléculaires spécifiques sous-tendant les événements vasculaires observés dans les neuropathies périphériques post-traumatiques.

Hirakawa et al. (2002) furent ainsi parmi les premiers à montrer que la disruption et la récupération de la BHN dans le nerf sciatique consécutives à une compression nerve (« *crush injury* ») étaient associées à l'expression des protéines de jonctions intercellulaires, notamment Claudine-1, Claudine-5, Occludine, VE-cadhérine et la connexine-43 (Cx43). Selon ces auteurs, la perte d'expression de ces protéines coïncidait parfaitement avec la période de perméabilité vasculaire augmentée de la BHN. Plus précisément, la perte de Claudine-1 et Occludine dans le périnèvre et de Claudine-5 et Occludine dans l'endonèvre étaient les principaux mécanismes responsables de la disruption de la BHN. De plus, lors de la régénération nerveuse, la restauration des jonctions intercellulaires périneurales avait lieu selon différentes cinétiques : la restauration des jonctions gap était plus lente que celle des jonctions serrées et adhérentes. Il est possible que ces jonctions gap nécessitent des jonctions serrées et adhérentes fonctionnelles pour s'établir. Enfin, selon les mêmes auteurs, l'expression de l'Occludine était étroitement corrélée à la fonction de barrière endothéliale dans le nerf périphérique. En effet, dans les nerfs contrôle, le bleu d'Evans diffusait dans l'épinèvre et le périnèvre mais pas l'endonèvre. De plus, les cellules endothéliales endoneurales exprimaient Claudine-5 et Occludine, alors que les cellules endothéliales épineurales n'exprimaient que Claudine-5 et VE-cadhérine mais ni Claudine-1 ni Occludine. Ceci amena les auteurs à conclure que ce ne serait donc pas tant Claudine-5 que Occludine qui serait responsable de l'imperméabilité vasculaire de la BHN dans leur modèle (Hirakawa et al., 2003).

Récemment, Lim et al. (2014) ont montré une altération de la BHN après ligature partielle du nerf sciatique, dont le décours temporel coïncidait avec l'apparition de l'allodynie mécanique dans ce modèle, suggérant que les macrophages résidents initieraient l'altération de la BHN

via l'expression de VEGF et la perturbation sous-jacente de l'expression des protéines de jonctions serrées dans les cellules endothéliales périneurales et endoneurales. Cette disruption permettrait l'influx de macrophages sanguins dans l'espace endoneural. Ces macrophages produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1- β ou le TNF- α ainsi que du fibrinogène, dont les effets pro-nociceptifs proviendraient de l'activation des TLRs, surtout du TLR4. Cette libération de VEGF par les macrophages serait induite par l'hypoxie résultant de la constriction physique des vaisseaux sanguins nerveux dans ce modèle de neuropathie (Lim et al., 2014). Ceci fut confirmé dans une étude ultérieure de la même équipe, qui montra que l'hypoxie induite par la ligature partielle du nerf sciatique provenait d'une dysfonction microvasculaire, d'une fibrose endoneurale et d'une augmentation des besoins métaboliques du nerf lésé [Lim et al., 2015]. Des injections de VEGF intraneural se traduisaient par une augmentation de la perméabilité de la BHN et par la diminution des seuils de retrait de la patte (témoignant d'une hyperalgésie voire d'une allodynie), suggérant que l'altération de la BHN serait suffisante à elle seule pour générer la douleur neuropathique (Lim et al., 2014). Dans ce même modèle, les auteurs observaient également une angiogenèse épineurale extensive, probablement liée au VEGF et une augmentation du flux épineural après lésion nerveuse. Ils montraient également que la disruption de la BHN est un prérequis à l'infiltration de macrophages sanguins dans l'espace endoneural et que l'infiltration nerveuse de molécules sanguines telles que les cytokines ou le fibrinogène contribueraient au développement d'un comportement douloureux chez les animaux lésés (Lim et al., 2014).

II- 2 Objectifs de recherche

L'objectif de ce travail de recherche était d'étudier le rôle de l'altération de la barrière hémato-nerveuse dans la genèse des douleurs neuropathiques. Dans un modèle bien établi chez le rat résultant de la constriction chronique d'un nerf périphérique, nous avons cherché à préciser les déterminants précoces de la perméabilité vasculaire endoneurale, ainsi que leurs conséquences comportementales. Les questions spécifiques que nous nous sommes posés, eu égard à l'état de la littérature scientifique, étaient les suivantes :

- 1) *Quels sont la nature (type de perméabilité, localisation) et le décours temporel de l'altération de la perméabilité vasculaire résultant d'une constriction nerveuse chronique ?*
- 2) *Quelles sont les voies moléculaires essentielles impliquées dans la disruption de la barrière hémato-nerveuse après constriction nerveuse chronique et quel est leur impact respectif sur le développement du comportement douloureux post-lésionnel ?*
- 3) *Existe-t-il des différences entre les modèles spinaux et trigéminaux en termes d'altérations de perméabilité vasculaire ?*
- 4) *Quels sont les mécanismes moléculaires sous-tendant le passage de la neurite à la neuropathie ?*
- 5) *Quelles sont les implications potentielles des altérations post-traumatiques de la perméabilité vasculaire endoneurale en clinique humaine ?*

Afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé le modèle de constriction nerveuse chronique, résultant de la ligature lâche d'un nerf périphérique chez le rat. Nous avons utilisé deux variantes de ce modèle au niveau spinal (constriction chronique du nerf sciatique) et trigéminal (constriction chronique du nerf infra-orbitaire). Nous avons comparé les changements induits par cette ligature lâche avec un modèle de neurite (étirement nerveux après exposition chirurgicale du nerf infra-orbitaire) et leurs contrôles respectifs (procédure *sham*).

II – 3 Matériels et méthodes

II-3-1 Animaux

L'ensemble des procédures expérimentales décrites ci-après ont été réalisées sur des rats mâles Sprague-Dawley de 200-250g, achetés aux Laboratoires Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) et stabulés dans un environnement de température et luminosité contrôlées ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, cycle jour/nuit de 12/12 heures) avec de la nourriture et de l'eau disponibles *ad libitum*.

Toutes les expérimentations animales ont été réalisées conformément aux lois et directives nationales et internationales relatives à l'expérimentale animale dans la recherche neuroscientifique (European Communities Council Directive #87848, Octobre 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection animale; Autorisation #00354.02, Comité d'Ethique, Université Paris Descartes) ainsi qu'aux recommandations du comité à la recherche et à l'éthique de l'association internationale pour l'étude de la douleur (Zimmermann, 1983).

II-3-2 Chirurgie

Constriction chronique du nerf sciatique (SN-CCI) :

Le modèle initial de constriction chronique du nerf sciatique (*Sciatic Nerve Chronic Constriction Injury*, SN-CCI) a été développé par Bennett et Xie (1988) et consiste en une constriction persistante du nerf sciatique créée par 4 ligatures lâches de Catgut chromé autour du nerf n'interrompant pas la vascularisation épineurale. La lésion nerveuse apparaît en 24 heures, en conséquence de la formation d'un œdème intra-neural du fait de l'occlusion partielle de la vascularisation nerveuse par les ligatures. L'œdème ainsi créé s'oppose à l'effet des ligatures lâches et le nerf finit par s'auto-strangler (Bennett et Xie, 1988). Les modifications comportementales observées après CCI du nerf sciatique miment celles observées dans les pathologies douloureuses neuropathiques. Ainsi, les rats ayant subi un SN-CCI vont ainsi présenter des signes comportementaux :

- d'allodynie (diminution des seuils de vocalisation à la stimulation mécanique de la patte, refus de poser la patte sur un sol normal de température non nociceptive),
- d'hyperalgésie (réduction du temps de latence avant retrait de la patte, flexion prolongée de la patte arrière et occasionnellement agitation de la patte arrière ou léchage intense de la patte affectée en réponse à un stimulus nociceptif thermique, chimique ou mécanique appliqué sur la surface plantaire de la patte),

- de paresthésies ou dysesthésies (anomalies de la démarche, épisodes de léchage de la patte arrière, grattage de la patte arrière voire parfois autotomie de la patte).

Ces changements comportementaux apparaissent entre deux et cinq jours après le CCI avec un pic autour de J14 (Bennett et Xie, 1988).

Dans le présent travail, la constriction chronique du nerf sciatique (*sciatic nerve chronic constriction injury* [SN-CCI]) a été pratiquée sur des rats sous anesthésie générale (induction de 3% d'isoflurane dans de l'O₂ à 3L/min puis entretien avec 1,5% d'isoflurane dans de l'O₂ à 3L/min) selon la technique de Bennett et Xie (Bennett et Xie, 1988) illustrée dans la Figure II-2.

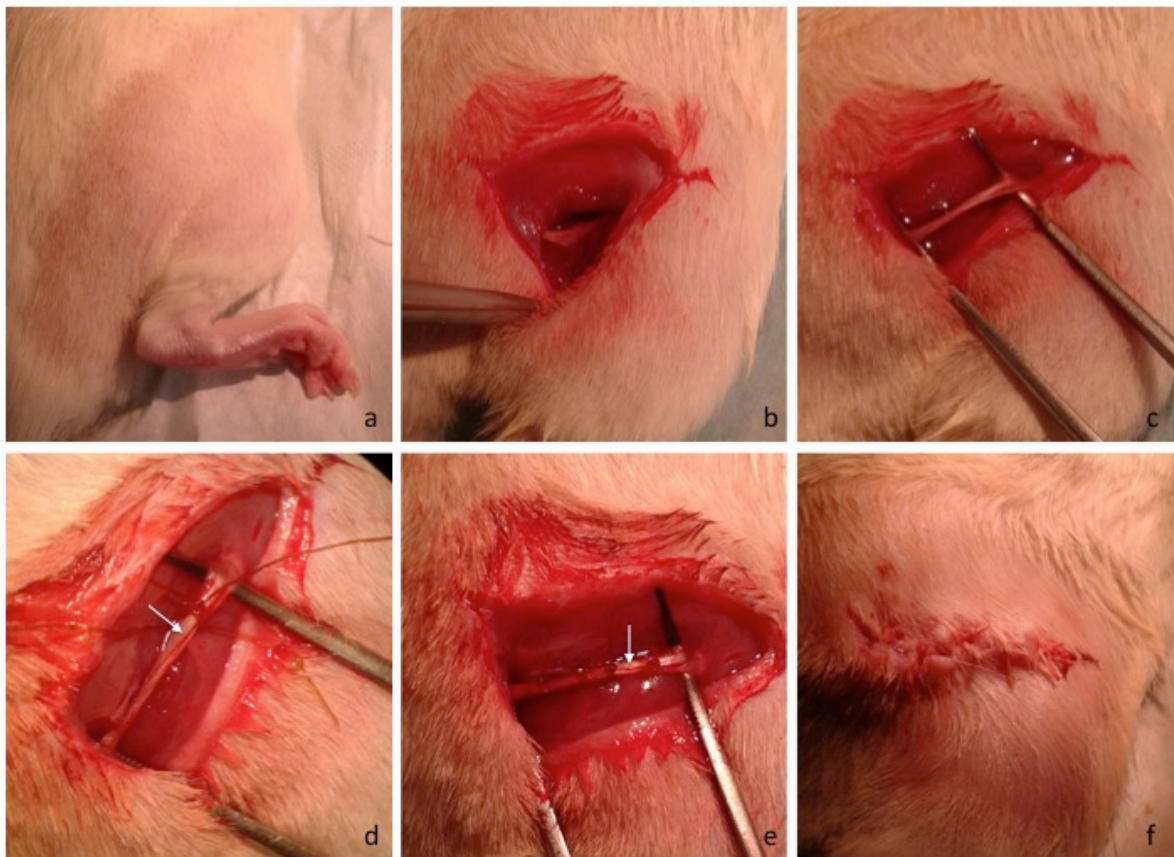


Figure II-2. Procédure expérimentale de constriction chronique du nerf sciatique chez le rat. Après exposition du nerf (a,b,c), des ligatures de catgut chromé sont posées délicatement autour du nerf sans interrompre la circulation épineurale (d,e ; flèches) puis le nerf ligaturé est reposé délicatement *in situ* et le site opératoire refermé avec des points discontinus de VICRYL® 4-0.

Après désinfection (éthanol 70%) et rasage de la région cutanée de la patte arrière droite (a), la peau est incisée sur 2 cm immédiatement en dessous de la tête fémorale (perceptible à la palpation) et les plans musculaires superficiels (*biceps femoris*) disséqués prudemment pour exposer le nerf sciatique droit (b). Ce dernier est ensuite délicatement étiré à l'aide d'une

précelle courbe, en veillant bien à visualiser la vasculature épineurale (témoignant de la dissection complète des plans tissulaires superficiels) (c). Quatre ligatures (Chromic Gut® 5-0 ; Ethicon) sont ensuite placées autour du nerf en proximal de la trifurcation sciatique, de façon à engendrer une légère striction du nerf sans interrompre la vascularisation épineurale (d). Chaque ligature est espacée d'environ 1 mm (e). Après libération douce du nerf exposé, les plans musculaires sont ensuite rapprochés manuellement et la peau suturée par des points discontinus de VICRYL® 4-0 (Ethicon) (f).

Les animaux contrôles (*sham*) ont été soumis au même protocole décrit plus haut, mais le nerf sciatique était exposé sans contact direct ou ligature.

Les animaux CCI et *sham* ont par la suite été sacrifiés par décapitation à différents temps post-opératoires (3 heures, 6 heures, 24 heures, 48 heures, 7 jours, 15 jours, 30 jours et 60 jours) et environ 1 cm de nerf sciatique était disséqué au niveau de la même région anatomique (portion moyenne du nerf sciatique, en proximal de la trifurcation sciatique) du côté ligaturé et du côté controlatéral. Les nerfs ainsi prélevés étaient immédiatement congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

L'analyse macroscopique des nerfs prélevés a permis de s'assurer de la conformité au modèle initial (Figure II-3).

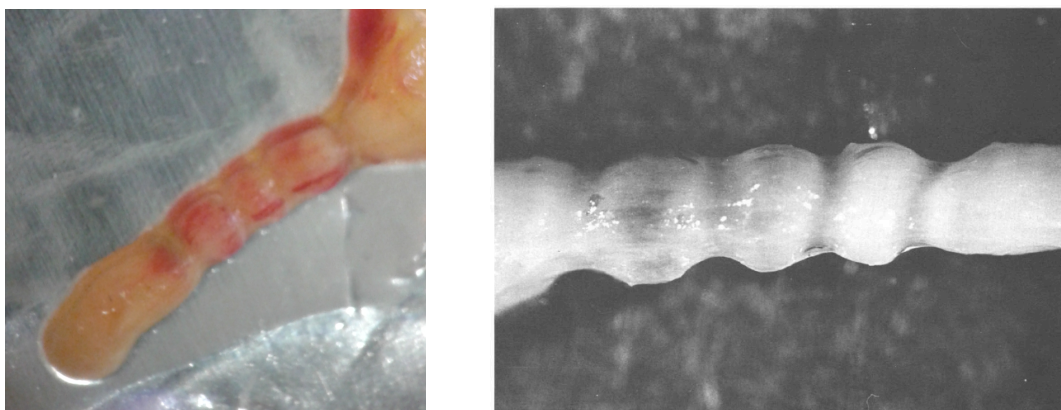


Figure II-3. Vue macroscopique d'un nerf sciatique à 6 heures post-CCI (gauche), comparé au modèle initial de Bennett et Xie (droite). A noter la néovascularisation épineurale importante au niveau du nerf entre les zones de constriction (gauche). Les différences observées en terme de profondeur de constriction peuvent être expliquées par des différences de temps de constriction (la figure de droite correspondant à un nerf sciatique à 24 heures post-CCI [Bennett et Xie, 1988])

Constriction chronique du nerf infra-orbitaire (IoN-CCI) :

En 1994, Vos et al. proposèrent un nouveau modèle de douleur neuropathique post-traumatique basé sur la constriction chronique du nerf infra-orbitaire (*infra-orbital nerve chronic constriction injury*, IoN-CCI) (Vos et al., 1994). Ce modèle devait permettre de s'affranchir des limites du modèle de constriction chronique du nerf sciatique et notamment de la difficulté de l'interprétation réelle des changements comportementaux post-SN-CCI. En effet, le nerf sciatique est un nerf mixte avec une composante motrice significative ; par ailleurs le nerf saphène serait également impliqué dans les modifications comportementales observées après lésion du nerf sciatique (Vos et al., 1994 ; Geuna, 2015).

Ce modèle repose sur une méthodologie expérimentale similaire au SN-CCI avec pose de deux ligatures lâches de catgut chromé autour du nerf infra-orbitaire du rat, abordé selon une voie supra-zygomatique (Vos et al., 1994). A la suite de la ligature, les animaux lésés vont développer des changements comportementaux se développant en deux phases :

- 1) Dans la période post-opératoire immédiate (J1 à J12 post-opératoire), les changements comportementaux spontanés sont les plus importants : les rats lèchent le territoire du nerf lésé très fréquemment et pour de longues périodes (« grooming ») ; ils montrent une diminution significative de leur comportement exploratoire et restent le plus souvent immobiles. Durant cette période, les rats ne répondent pas à une stimulation de faible intensité au niveau du territoire lésé (mais répondent à des stimuli de très haute intensité). Cette période « d'hyporéactivité » est plus courte chez certains rats que d'autres.
- 2) Dans la période post-opératoire tardive (à partir de J15 post-opératoire), la prévalence du « grooming » asymétrique de la face est clairement réduit. En revanche, le temps total de « grooming » de la face reste plus important que chez les rats contrôles. A partir de J15, les rats vont développer une « hyperréactivité » à toutes les intensités de stimulations au niveau du territoire lésé, mais peu d'hyperréactivité au niveau du territoire controlatéral non lésé. Deux à trois semaines après l'apparition de cette hyperréactivité du côté lésé, une hyperréactivité du côté non lésé s'installe également progressivement, probablement du fait de projections trigéminales au niveau de la corne dorsale controlatérale (Jacquin et al., 1980) .

Dans ce modèle, l'activité de « grooming » est considérée comme un indicateur de douleur spontanée, les rats se « grattant » après stimulation nociceptive (Vos et al., 1994).

Sur le plan mécanistique, la période initiale de mécanosensibilité diminuée serait probablement liée à une dégénérescence importante des axones myélinisés, tel

qu'habituellement observé après CCI. La persistance de la réponse à des stimuli mécaniques de haute intensité du coté lésé est cohérente avec le taux de survie plus important des petites fibres myélinisées A δ et non-myélinisées C. De plus, les auteurs suggèrent que le « grooming » unilatéral observé chez les rats après IoN-CCI pourrait résulter de décharges électriques spontanées au niveau des neurones afférents primaires myélinisés survivants (à l'instar de celles observées dans le modèle SN-CCI) (Vos et al., 1994).

Dans le présent travail, la constriction chronique du nerf infra-orbitaire a été pratiquée sur des rats sous anesthésie générale (induction de 3% d'isoflurane dans de l'O₂ à 3L/min puis entretien avec 1,5% d'isoflurane dans de l'O₂ à 3L/min), installés en décubitus dorsal, via un abord endobuccal, selon une technique modifiée de la technique initiale de Vos et al. (Dieb et al., 2013), illustrée dans la Figure II-4.

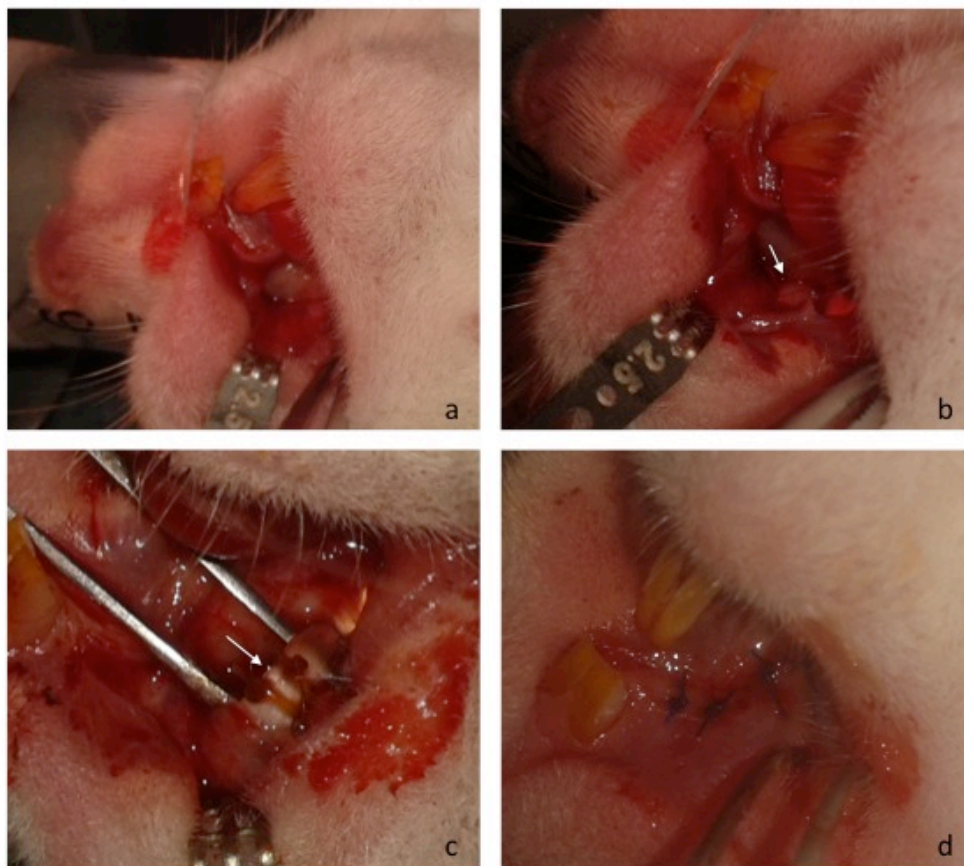


Figure II-4. Procédure expérimentale de constriction chronique du nerf infra-orbitaire chez le rat. Après incision vestibulaire endobuccale (a) et exposition du nerf infra-orbitaire (flèche) à la hauteur de son émergence foraminale (b), ce dernier était ligaturé avec 2 ligatures de catgut chromé sans interrompre la circulation épineurale (c ; flèche), puis délicatement reposé *in situ* et la muqueuse sus-jacente suturée avec 4 points discontinus de PROLENE® 5-0.

Le nerf infra-orbitaire droit était exposé selon un abord endobuccal, par une incision vestibulaire de 5 mm de long (a) puis réclinaison d'un lambeau muco-périosté (b) jusqu'à visualisation du foramen infra-orbitaire. Le nerf était ensuite délicatement étiré à l'aide d'une pince courbe et deux ligatures (Chromic Gut[®] 5-0) placées autour du nerf, espacées de 2 mm, sans interrompre la vascularisation épineurale, à environ 2 mm de l'émergence foraminale du nerf (c). L'incision vestibulaire était ensuite refermée par points discontinus de PROLENE[®] 5-0 (d).

Les animaux contrôles (*sham*) étaient soumis à la même procédure, mais le nerf infra-orbitaire était visualisé sans contact direct ni ligature.

Les rats CCI et *sham* étaient ensuite sacrifiés par overdose d'isoflurane à différents temps post-opératoires (3 heures, 6 heures, 24 heures, 7 jours et 14 jours, correspondant à la période des « événements précoces » du modèle de Vos et al., 1994) et environ 7 mm de nerf infra-orbitaire était prélevé à 2 mm du foramen du côté ligaturé et du côté controlatéral. Les nerfs prélevés étaient immédiatement congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Injections péri-neurales :

Afin d'étudier l'impact de différentes voies de signalisation (TLR4, Wnt/ β -caténine et Sonic Hedgehog) sur la physiopathologie des nerfs sciatique et infra-orbitaire, nous avons développé un protocole d'injections péri-neurales, sans aucun contact avec celui-ci pendant l'injection.

En effet, notre approche initiale avait été d'installer à proximité du nerf des éponges de collagène (PANGEN[®], Urgo Médical) pour permettre une diffusion locale de nos traitements pharmacologiques d'intérêt, à l'instar du protocole utilisé dans le modèle de neurite expérimentale d'Eliav (Eliav et al., 1999). Cependant, de façon assez étonnante, le simple contact du nerf voire même le décollement des plans musculaires sus-jacents sans contact nerveux direct, suffisait à déclencher des altérations des niveaux d'expression de nos ARNm d'intérêt (Figure II-5).

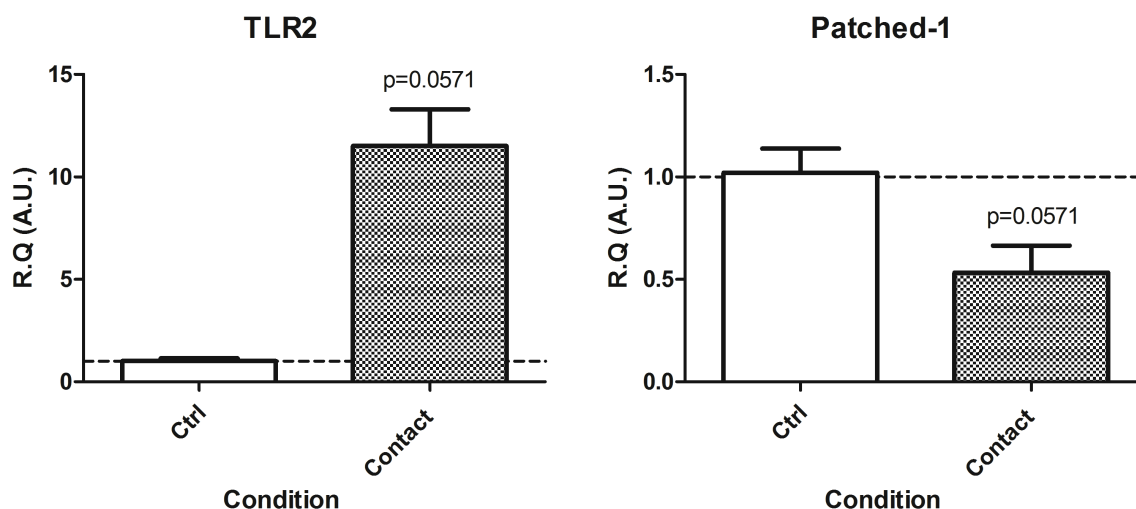


Figure II-5. Altérations moléculaires (ARNm) observées après contact direct du nerf sciatique. Des variations importantes des taux d'ARNm de TLR2 et Patched-1 (utilisés ici comme marqueurs illustratifs) étaient observées 24 heures après simple contact du nerf, comparativement aux rats sham (Ctrl). Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de $n=4$ animaux pour chaque marqueur. Un test de Mann-Whitney a été utilisé.

Il a donc fallu développer un protocole expérimental permettant l'administration locale de nos traitements pharmacologiques sans générer d'altération nerveuse locale. Nous avons donc développé un protocole d'injection péri-neurale calibrée, afin de déposer le traitement pharmacologique à proximité immédiate du nerf, de façon fiable et reproductible.

L'utilisation de Bleu d'Evans a permis de tester la localisation précise des injections à réaliser, ainsi que le volume d'injection pour obtenir une imbibition notable du nerf. Cette approche a été appliquée au niveau des nerfs sciatique et infra-orbitaire (Figure II-6).

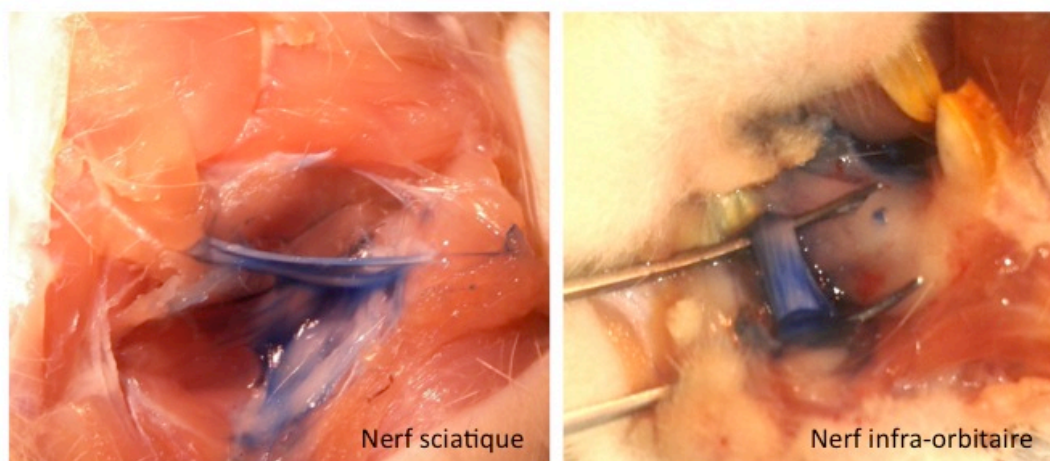


Figure II-6. Validation du protocole d'injection péri-neurale au niveau des nerfs sciatique (figure de gauche) et infra-orbitaire (figure de droite). La validation portait sur la localisation précise (noter la bonne imbibition du nerf) et le volume d'injection (absence de « spill-over » [débordement au delà de la zone d'intérêt]).

Après plusieurs tentatives par nerf, les injections périneurales à proximité du nerf sciatique ont été validées pour une injection transcutanée, immédiatement en postérieur de la tête fémorale (ressentie à la palpation) à une profondeur de 1 cm (sans déprimer la peau lors de l'injection), avec un volume d'injection de 100 μ L (Figure II-6 gauche). Les injections périneurales à proximité du nerf infra-orbitaire -quant à elles- ont été validées pour une injection trans-muqueuse en regard de la première crête palatine, à une profondeur de 2 mm, avec un volume d'injection de 50 μ L (Figure II-6 droite).

L'impact du lipopolysaccharide (LPS ; agoniste TLR4), du CLI-095 (antagoniste TLR4), ou de la cycloamine (antagoniste du récepteur *Smoothed*) sur la fonction de la BHN du nerf sciatique a été étudiée via des injections répétées pendant 4 jours consécutifs, chez des rats naïfs anesthésiés (protocole anesthésique identique à celui utilisé dans le CCI), de 100 μ L de véhicule (2% diméthylsulfoxyde [DMSO] dans du NaCl 0,9% ou Ethanol 100%), LPS (1 mg/mL ; Sigma-Aldrich, Evry, France), CLI-095 (30 μ M, Invivogen, Toulouse, France) ou de cycloamine (300 mM ; Santa Cruz, Heidelberg, Allemagne). L'évaluation de la perméabilité de la BHN, les modifications moléculaires (ARNm) et la sensibilité tactile de la patte arrière aux stimulations mécaniques ont été réalisées 6 heures après la dernière injection. Le même intervalle a été choisi pour sacrifier les animaux (par décapitation) et prélever les nerfs sciatiques. Les nerfs ainsi prélevés étaient examinés macroscopiquement puis congelés immédiatement dans de l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

De la même façon, afin d'étudier l'impact des voies de signalisation Sonic Hedgehog et Wnt/ β -caténine sur la physiopathologie de la BHN du nerf infra-orbitaire, des injections de 50 μ L de Smoothed Agonist (SAG, agoniste du récepteur *Smoothed* ; 2 μ M, Calbiochem), de cyclopamine (antagoniste du récepteur *Smoothed* ; 300 μ M, Santa Cruz, Heidelberg, Allemagne), de Wnt Agonist I (activateur de la voie Wnt/ β -caténine non inhibiteur du GSK3 β et Frizzled-indépendant ; 50 μ M, Calbiochem), de PKF 118-310 (antagoniste de la voie Wnt, Frizzled-indépendant, prévenant la translocation nucléaire de β -caténine ; 50 μ M, Sigma-Aldrich, Evry, France) ou de leur véhicule respectif (NaCl 0,9% ou 2% DMSO dans du NaCl 0,9% ou Ethanol 100%) ont été pratiquées à proximité immédiate du nerf infra-orbitaire selon la technique décrite plus haut.

Des rats naïfs étaient traités pendant 4 jours consécutifs (tel que décrit précédemment) pour évaluer les altérations moléculaires (ARNm), vasculaires (perméabilité de la BHN) et comportementales (allodynie mécanique de la face) résultant du traitement pharmacologique injecté (voir les parties correspondantes pour les détails).

D'autres rats naïfs étaient prétraités 24 heures avant chirurgie (3 injections espacées de 6 heures), la dernière injection ayant lieu au cours de la chirurgie (la moitié du volume d'injection étant déposée directement sur le nerf et l'autre moitié injectée après fermeture du site opératoire). L'évaluation des altérations moléculaires et/ou de la perméabilité de la BHN ont été réalisées 3 heures après la dernière injection. Après sacrifice des rats, les nerfs infra-orbitaires (bilatéraux) étaient prélevés et immédiatement congelés dans de l'azote liquide, puis conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation, sauf pour l'évaluation de la perméabilité vasculaire (cf. partie correspondante).

Dans les expériences comparant le CCI et le SNS, les injections péri-neurales étaient utilisées comme condition contrôle (voir les sections spécifiques pour les détails).

II-3-3 Evaluation de la perméabilité de la BHN

La perméabilité de la BHN du nerf sciatique aux macromolécules était évaluée par l'utilisation de bleu d'Evans (Sigma-Aldrich, Evry, France) et la perméabilité micromoléculaire évaluée par l'utilisation de Fluorescéine sodique (NaFlu ; Sigma-Aldrich, Evry, France) tel que précédemment décrit (Pettersson et al., 1990 ; Malmgren & Olsson, 1980 ; Yen et al., 2013).

Pettersson et al. (1990) ont montré qu'en condition physiologique, les vaisseaux endoneuraux sont imperméables à l'albumine colorée au bleu d'Evans dont l'extravasation au sein du

parenchyme nerveux suggère l'altération de la BHN et sa perméabilisation (Pettersson et al., 1990).

Chez des rats contrôles ou chez les rats après 3 ou 6 heures post-CCI du nerf sciatique, du bleu d'Evans était injecté par voie intraveineuse (0,05% dans NaCl 0,9% ; 0.8 mL/kg) dans la veine jugulaire de rats profondément anesthésiés (50 mg/kg de sodium pentobarbital en i.p. ; Sanofi, Libourne, France) puis laissé à circuler pendant 30 minutes. Les rats étaient ensuite sacrifiés par perfusion trans-cardiaque de 100 mL d'une solution à 0,1% (p/v) de nitrite de sodium (Honeywell Specialty Chemicals) dans du NaCl 0,9%. Un centimètre de nerf sciatique (au niveau du site de constriction) du côté lésé et controlatéral étaient prélevés puis examinés macroscopiquement.

Pour poursuivre l'exploration de la perméabilité de la BHN, ces expériences furent répliquées en utilisant du NaFlu (PM 376, rayon de Stokes 5,5 Å, 10% dans NaCl 0,9%, 2 mL/kg ; Sigma-Aldrich, Evry, France) un traceur fluorescent qui ne traverse pas la BHN de nerfs sciatiques non lésés (Malmgren & Olsson, 1980 ; Yen et al., 2013). Le NaFlu était injecté tel que décrit précédemment puis les rats étaient perfusés en trans-cardiaque avec 100 mL d'une solution à 0,1% (p/v) de nitrite de sodium (Honeywell Specialty Chemicals) dans du NaCl 0,9% suivi de 500 mL de paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich, Evry, France) à 4% (p/v) dans 1X de *phosphate buffered-saline* (PBS ; Sigma-Aldrich, Evry, France). Un centimètre de nerf sciatique fixé était prélevé tel que décrit précédemment puis post-fixé dans du paraformaldéhyde 4% sur la nuit, puis transféré dans une solution de sucrose à 20% (p/v) dans du PBS 1X pour cryoprotéger le prélèvement, puis congelé dans de l'isopentane à -30°C. Le tissu congelé était inclus dans du Tissue-tek O.C.T (Sakura) puis coupé longitudinalement et axialement en coupes de 30µm d'épaisseur, à l'aide d'un microtome-cryostat (Leica CM3050S). Les coupes étaient ensuite montées sur des lames de verre puis laissées à sécher avant d'être recouvertes de Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) puis d'une lamelle de verre. Les coupes de nerf étaient par la suite examinées en microscopie à fluorescence, à l'aide d'un microscope confocal Leica TCS SP5 II (Leica microsystems, Nanterre, France).

La perméabilité de la BHN du nerf infra-orbitaire a été étudiée à l'aide de NaFlu, tel que précédemment décrit, chez des rats après CCI, SNS ou injection péri-neurale. Après sacrifice et perfusion trans-cardiaque de PAF 4%, environ 7 mm de nerf infra-orbitaire étaient prélevés (à 2 mm de l'émergence foraminale), du côté lésé et controlatéral, puis traités comme précédemment décrit.

II-3-4 Comportement : évaluation de la sensibilité mécanique à l'aide de filaments de von Frey

Les rats ayant reçu des injections péri-sciatiques de véhicule, LPS ou cyclopamine ont été soumis à une stimulation mécanique de la patte arrière droite, à l'aide de filaments de von Frey, pour évaluer l'apparition d'une allodynie mécanique. Chaque rat était habitué pendant 1 à 2 heures sur une grille métallique, dans une cage plastique (35x20x15 cm). L'allodynie mécanique a été évaluée à l'aide d'une série de filaments de von Frey (Bioseb, Chaville, France) produisant une force de flexion de 2 à 26 g. Chaque filament était appliqué 3 fois (à 3 secondes d'intervalle), en commençant toujours par le filament produisant la force la plus faible. Un comportement allodynique était observé lorsque le rat retirait brusquement sa patte et/ou lorsqu'il tentait de s'échapper de la stimulation nocifensive. La pression minimale induisant au moins une de ces deux réponses était considérée comme le seuil nociceptif. Le filament de 26 g était considéré comme le seuil maximal envisageable. En effet, dans les tests prétraitement, la stimulation avec le filament de 26 g n'induisait aucun comportement nociceptif chez la majorité des rats (90%). Afin d'éviter des réponses non spécifiques, seuls ces rats étaient inclus dans les expériences.

Au niveau trigéminal, les rats injectés avec de la cyclopamine ou son véhicule étaient évalués de façon similaire à l'aide de filaments de von Frey, produisant une force de flexion entre 1 et 10 g. Chaque filament était appliqué 5 fois, à 3 secondes d'intervalle. La réponse comportementale était évaluée à l'aide du score établi dans le travail de Vos et al. (Vos et al., 1994). La réponse à la stimulation mécanique de la face était notée selon un score allant de 0 à 4 :

- 0 - absence de réponse
- 1 - réponse non aversive (détection du filament)
- 2 - réponse aversive légère (détection du filament et retrait de la stimulation)
- 3 - réponse aversive forte (détection, retrait et fuite ou attaque)
- 4 - réponse aversive majeure (détection, retrait, fuite/attaque et léchage asymétrique de la face)

Entre 1 et 6 g, plus de 80% des rats des deux groupes ne montraient aucun comportement aversif (score < 2) lorsque testé avant les injections (de fait considéré comme le seuil de stimulation mécanique non douloureuse). Seuls ces rats ont été utilisés pour les évaluations comportements, afin d'éviter des réponses non spécifiques.

Dans les deux protocoles d'évaluation comportementale, l'investigateur réalisant les évaluations était tenu dans l'ignorance des traitements reçus.

II-3-5 Cultures cellulaires

Des cellules endothéliales cérébrales microvasculaires humaines immortalisées (human cerebral microvascular endothelial cells, hCMEC/D3) ont été gracieusement fournies par le Dr P.-O. Couraud (INSERM U1016, France). Les cellules étaient cultivées dans les flacons de culture cellulaire T75 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) dans du milieu basal de cellules endothéliales - 2 (Lonza, Levallois-Perret, France) supplémenté avec 5 % de sérum de veau fœtal (Sigma), 10 U/mL de pénicilline, 10 mg/mL streptomycine (Gibco, Villebon sur Yvette, France), 1.4 mM hydrocortisone (Sigma), 5 mg/mL d'acide ascorbique (Sigma), 1:100 concentré lipidique défini chimiquement (Gibco), 10 mM HEPES (Sigma) et 1 ng/mL de *basic fibroblast growth factor* humain (Sigma), puis maintenues à 37°C dans un incubateur humidifié sous 5% CO₂/95% O₂. Les cellules étaient passées une fois par semaine ou lorsque proche de 100% de confluence : le milieu de culture était aspiré et les cellules rincées dans du PBS 1 X (Gibco) avant d'ajouter 5 mL de trypsine-EDTA 1X à 0.05%, puis laissées à incuber 5 minutes à 37°C. Les cellules étaient ensuite récupérées et centrifugées 5 minutes à 150 g, le culot re-suspendu dans 10 mL de milieu de culture pour réensemencement dans un nouveau flacon T75 selon un ratio de 1:10 avec du milieu frais. Pour les expériences pharmacologiques et les études de niveau d'expression d'ARNm, des plaques 6-puits étaient ensemencées avec 150 mg/mL de collagène-I de rat Cultrex[®] (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) dilué dans de l'eau et incubées à 37°C pendant 1 heure. Les cellules étaient ensuite ensemencées à une densité de 80000 cellules/cm² et incubées de nouveau pendant 24 heures avant les expériences.

Les cellules étaient incubées pendant 3 heures avec du LPS (100 ng/mL et 200 ng/mL; Sigma), du LTA (100 ng/mL, 1mg/mL, ou 10mg/mL; Sigma), du PolyI:C (100nM, 1mM et 10 mM; Sigma), de la cyclopamine (30 mM; Santa Cruz), du Wnt Agonist I (5 µM; Calbiochem, Merck, Darmstadt, Allemagne) ou du PKF 118-310 (2 µM; Sigma-Aldrich). Dans certaines expériences, les cellules étaient pré-incubées pendant 30 minutes avec un inhibiteur du *nuclear factor κB* (NF-κB) (JSH-23, 100 mM; Merck, Lyon, France), MEK inhibitor (PD98059, 100 mM; InvivoGen, Toulouse, France), ou un antagoniste TLR4 (CLI-095, 10 mM; InvivoGen) puis traitées pendant 3 heures avec du LPS.

L'influence de l'activation soutenue de la signalisation Hedgehog sur les effets LPS-

dépendants était évaluée dans des cellules incubées avec différentes concentrations d'agoniste du récepteur Smoothed, Smoothed Agonist (SAG, 1 mM à 1 nM ; Calbiochem, Darmstadt, Allemagne) pendant 24 à 48 heures, puis traitées pendant 3 heures avec du LPS (100 ng/mL).

Enfin, afin d'évaluer l'impact de la signalisation Wnt sur les altérations moléculaires LPS-dépendantes in vitro, les cellules étaient incubées pendant 30 minutes avec du PKF 118-310 (2 µM; Sigma-Aldrich) puis traitées pendant 4 heures par du LPS (200 ng/mL ; Sigma)

A la suite de la période de traitement, les cellules étaient rincées avec du PBS 1X et les ARN totaux extraits pour les expériences de transcription inverse et réaction en chaîne par polymérase (*reverse transcription polymerase chain reaction* ; RT-PCR) tel que décrit ci-après. Les cellules utilisées pour les expériences d'immunohistochimie étaient traitées comme précédemment, puis fixées dans du PAF 4% et traitées tel que décrit dans la section correspondante.

II-3-6 Extraction d'ARN et RT-PCR semi-quantitative

Les ARN totaux des nerfs sciatique et infra-orbitaire ou des cultures cellulaires étaient extraits à l'aide du kit de purification NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) et un spectrophotomètre NanoDrop (ND-1000, ThermoFisher Scientific) utilisé pour évaluer la qualité et la concentration en ARN à partir des mesures d'absorbance. Pour l'analyse RT-PCR en temps-réel, la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) premier brin était réalisée à l'aide du kit de transcription inverse *High Capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant. La transcription inverse était suivie d'une amplification PCR en temps réel pour chaque échantillon en triplicat via le *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) sur un *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Les amorces (« primers ») utilisées dans les différentes expériences de ce travail sont listées dans le tableau II-2.

Gène	Rat	Humain
<i>Protéine ribosomale S18 (RPS18S)</i>	Rn01428913_gH	
<i>Glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase (GAPDH)</i>	Rn01428913_gH	
<i>Claudine-1</i>	Rn00581740_m1	
<i>Claudine-5</i>	Rn01753146_s1	Hs00533949_s1
<i>Occludine</i>	Rn00580064_m1	Hs00170162_m1
<i>Sonic Hedgehog</i>	Rn00568129_m1	
<i>Patched-1</i>	Rn01527980_m1	Hs00181117_m1
<i>Glioma-associated oncogene-1 (Gli-1)</i>	Rn01504237_m1	Hs01110766_m1)
<i>Smoothened</i>	Rn00563043_m1	Hs01090242_m1
<i>Frizzled-7 (Fzd-7)</i>	Rn01441541_m1	HS00275833_s1
<i>β-caténine</i>	Rn01504237_m1	Hs00258305_m1
<i>Vascular Endothelial-cadhérine (VE-cadhérine)</i>	Rn01405893_m1	Hs00170986_m1
<i>Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A)</i>	Rn01511601_m1	
<i>Toll-like Receptor 2 (TLR2)</i>	Rn02133647_s1	Hs00152932_m1
<i>Toll-like Receptor 4 (TLR4)</i>	Rn00569848_m1	Hs00152939_m1
<i>Interleukine 1β (IL-1β)</i>	Rn00580432_m1	
<i>Integrin Alpha M (ITGAM ou CD11b)</i>	Rn00709342_s1	
<i>CD3</i>	Rn00565890_m1	
<i>CD4</i>	Rn00562286_m1	
<i>Chemokine (CC motif) Ligand 2 (CCL2)</i>	Rn00580555_m1	
<i>Hypoxia Inducible Factor-1α (HIF-1α)</i>	Rn005777560_m1	

Tableau II-2. Liste des « primers » utilisés dans les différentes expériences. Tous les primers ont été commandés chez Life Technologies.

Les niveaux spécifiques d'ARNm ont ensuite été calculés après normalisation des résultats de chaque échantillon avec les niveaux des ARNm du GAPDH ou du RSP18S. Les données sont présentées en unités relatives d'ARNm comparativement aux valeurs contrôles (exprimées en nombre de fois la valeur contrôle).

II-3-7 Extraction protéique et quantification par ELISA

Afin d'évaluer le taux de synthèse protéique de VEGF-A dans le nerf infra-orbitaire, les nerfs infra-orbitaires de rats après CCI ont été prélevés à différents temps post-opératoires (6 heures, 24 heures, 48 heures et 7 jours) selon la même méthode de collection tissulaire que pour les extractions d'ARN (voir la partie correspondante pour les détails). Les taux de

protéines totales et les taux spécifiques de VEGF-A étaient évalués dans les nerfs infra-orbitaires après CCI, en triplicat, à l'aide d'un kit ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) spécifique (Rat VEGF-A ELISA kit, EKB01917, Abcam) selon les recommandations du fabricant.

Les taux de VEGF-A sont exprimés comme le ratio de la quantité de protéine spécifique (VEGF-A) en picogrammes (pg) sur la quantité de protéines totales (en µg).

II-3-8 Immunohistochimie

Pour les études immunohistochimiques, les nerfs sciatiques ou infra-orbitaires de rats sacrifiés prélevés tel que précédemment décrit ou les cellules hCMEC/D3 (ayant subi un traitement spécifique) ont été fixés dans du PAF 4% et déposés sur des lames de verre. Les sections tissulaires fixées ou les cellules ont ensuite été incubés dans un tampon de blocage (3% horse serum, 0.3% Triton X-100 dans du PBS) pendant une heure à température ambiante. Puis ils ont été incubés toute la nuit à 4°C avec différents anticorps, résumés dans le tableau II-3.

Anticorps	Dilution	Fabricant	Commentaires
<i>Goat anti-Claudine 1</i>	1:300	Santa Cruz	
<i>Goat anti-Claudine 5</i>	1:300	Santa Cruz	
<i>Goat anti-Patched-1</i>	1:300	Santa Cruz	
<i>Goat anti-Occludine</i>	1:1000	Abcam, Paris, France	
<i>Rabbit anti-Reca 1</i>	1:250	AbD Serotec, Kidlington, Royaume Uni	Marqueur endothélial
<i>Rabbit anti-vWF</i>	1:500	Abcam, Paris, France	Facteur de von Willebrand (marqueur endothélial)
<i>Goat anti-Fzd-7</i>	1:400	Santa Cruz	
<i>Mouse anti-VE-cadhérine</i>	1:250	Santa Cruz	
<i>Mouse anti-β-caténine</i>	1:800	BD Bioscience	

Tableau II-3. Liste des anticorps utilisés dans les différentes expériences.

Les lames étaient ensuite rincées 3 fois dans du PBS 1X et incubées avec des anticorps donkey anti-rabbit et donkey anti-goat conjugués à de l'Alexa 488 ou de l'Alexa 555 (Life technologies) dilués dans du PBS (1:600) puis rincées 2 fois et incubées avec du TO-PRO 3 (marqueur nucléaire ; 1:5000 ; ThermoFischer) pendant 5 minutes et rincées une nouvelle fois.

Les lames étaient par la suite recouvertes d'une lamelle de verre et examinées en microscopie à fluorescence à l'aide d'un microscope confocal Leica TCS SP5 II (Leica microsystems).

II-3-9 Données et analyses statistiques

Les données sont présentées comme moyennes $\pm$ erreur-type de la moyenne. Pour les expériences de RT-PCR, la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak et Schmittgen, 2001) a été utilisée pour analyser les différentes relatives des niveaux d'ARNm spécifiques entre les groupes (RQ Study Software 1.2 version ; Applied Biosystems). Les données étaient ensuite validées à l'aide, selon les expériences, soit d'une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni (pour les variations temporelles d'expression des ARNm d'intérêt), soit d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Dunn (pour les variations conditionnelles d'expression des ARNm d'intérêt de 3 conditions ou plus) ou d'un test de Mann-Whitney (pour les variations d'expression des ARNm d'intérêt entre deux groupes non appariés).

Les données issues des expériences de quantification protéique ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni.

Pour les expériences de comportement, les données ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance bivariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni.

Le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.) a été utilisé pour les analyses statistiques. Le niveau de significativité a été défini à $p < 0.05$.

II-4 Résultats

II-4-1 Mise en évidence de l'altération de la barrière hémato-nerveuse dans deux modèles de neuropathies spinale et trigéminal

La perméabilité de la BHN a été évaluée à l'aide de bleu d'Evans et de fluorescéine sodique (NaFlu) chez des rats soumis à une constriction chronique du nerf sciatique (SN-CCI).

A 6 heures post-SN-CCI, une augmentation de la vascularisation épineurale était observée à l'examen macroscopique du nerf lésé (comparativement au nerf contrôle), accompagnée d'une extravasation importante de bleu d'Evans dans le nerf lésé, traduisant une altération de la perméabilité vasculaire épineurale (Figure II-7).

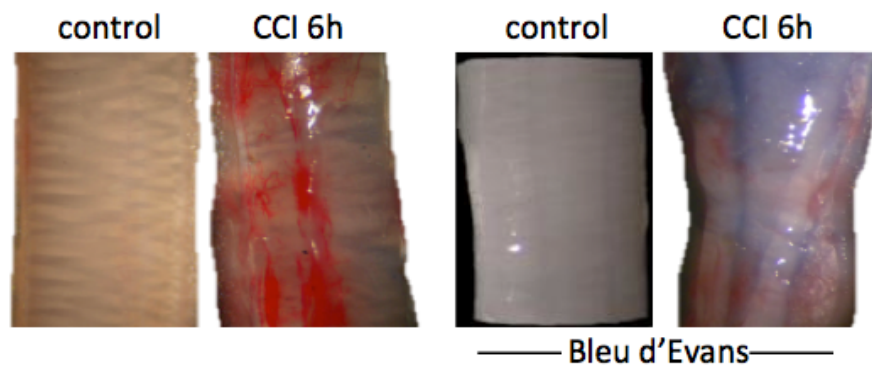


Figure II-7. La constriction chronique (CCI) du nerf sciatique altère la perméabilité vasculaire épineurale.

L'inspection macroscopique du nerf sciatique à 6 heures post-CCI révélait une augmentation de la perméabilité vasculaire épineurale (figures de gauche) comparativement au nerf contrôle. De plus, une extravasation du bleu d'Evans (injecté par voie intraveineuse) est observée à 6 heures post-CCI dans le nerf lésé mais pas le nerf contrôle (figures de droite), indiquant une augmentation de la perméabilité vasculaire épineurale après CCI.

Par ailleurs, l'altération de la barrière hémato-nerveuse après CCI a été évaluée en microscopie confocale à fluorescence chez des rats ayant été préalablement injectés avec du NaFlu. La présence d'une fluorescence à l'intérieur du nerf sciatique de rats lésés était observée dès 3 heures post-CCI (comparativement au nerf contrôle), témoignant de l'accumulation de fluorescéine sodique à l'intérieur du parenchyme nerveux, consécutive à l'augmentation de perméabilité de la BHN (perméabilité vasculaire endoneurale) (Figure II-8).

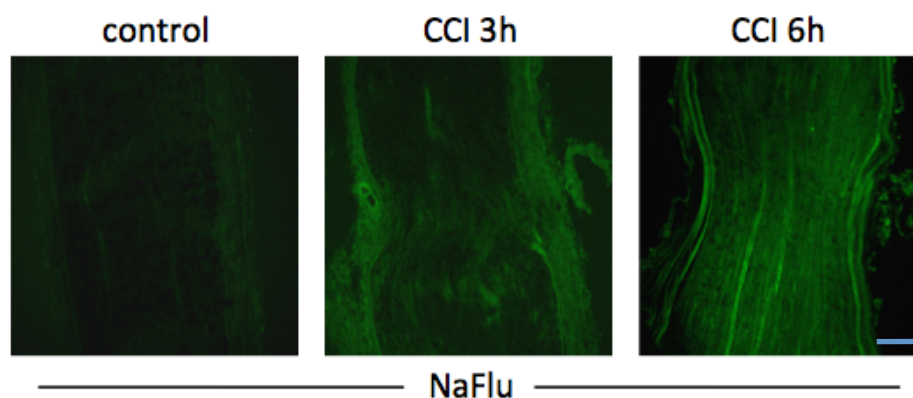


Figure II-8. La constriction chronique (CCI) du nerf sciatique altère la perméabilité vasculaire endoneurale.

L'observation au microscope confocal à fluorescence de coupes longitudinales (de 30 μm d'épaisseur) de nerf sciatique lésé (CCI) ou *sham* (control) montrait une augmentation de l'extravasation de NaFlu dans le parenchyme du nerf sciatique soumis à CCI (comparativement au contrôle) dès 3 heures post-CCI et de façon plus importante à 6 heures post-CCI. Cette accumulation de traceur fluorescent dans le parenchyme du nerf sciatique lésé suggère une augmentation de la perméabilité vasculaire endoneurale traduisant une altération de la BHN après CCI (Barre d'échelle = 100 μm).

Les propriétés de barrière de la BHN, à l'instar de toute barrière endothéliale, sont liées à la présence et à l'intégrité de différentes jonctions intercellulaires dont les jonctions adhérentes, les jonctions serrées et les jonctions gap (Kanda, 2013 ; Ubogu, 2013 ; Rodrigues et Granger, 2015). Parmi ces jonctions, les jonctions serrées jouent un rôle majeur dans la fonction de barrière, via des contacts cellule-cellule médiés par des protéines telles que claudine-1, claudine-5 ou occludine (Hu et al., 2013 ; Peltonen et al. 2013). De plus, il a été postulé que la claudine-5 exprimée au niveau de la BHN serait la principale protéine de jonction serrée responsable de ses propriétés de barrière (Ubogu, 2013).

Nous avons donc postulé que l'altération de la BHN observée après CCI (se traduisant par une augmentation de la perméabilité vasculaire épineurale et endoneurale) pourrait résulter d'une altération de l'expression des principales protéines de jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales des micro-vaisseaux endoneuraux.

Après constriction chronique du nerf sciatique, une diminution significative de l'expression des ARNm codant pour Claudine-5 et Occludine était observée dès 3 heures post-CCI, persistant jusqu'à la fin de la période d'étude (60 jours) (Figure II-9).

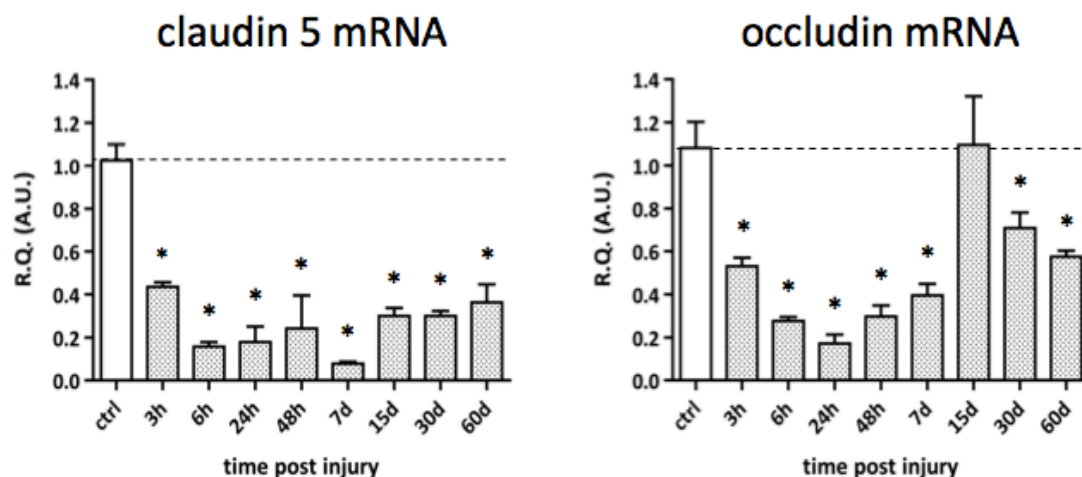


Figure II-9. La constriction chronique (CCI) du nerf sciatique induit une diminution précoce et prolongée de l'expression des ARNm des protéines de jonctions serrées Claudine-5 et Occludine. Les changements dans le temps des niveaux d'expression des ARNm des protéines de jonctions serrées *Claudine-5* et *Occludine* ont été évalués dans le nerf sciatique de rats après CCI ou *sham* (condition contrôle, ctrl) par RT-PCR semi-quantitative. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de $n=5-8$ animaux pour chaque temps post-lésion. * $p<0,05$. Une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni ont été utilisés.

Cette diminution d'expression des ARNm de *Claudine-5* et *Occludine* après SN-CCI s'accompagnait d'une diminution de la production endothéliale (endoneurale) de ces protéines. Celle-ci était objectivée en microscopie confocale à fluorescence, sur des coupes axiales de nerfs sciatiques (lésés ou *sham*) centrées au niveau d'un micro-vaisseau endoneural (révélé par le marqueur endothélial Recla-1), comme une diminution de l'immunofluorescence pour l'Occludine à 7 jours post-CCI, comparativement au nerf contrôle (Figure II-10).

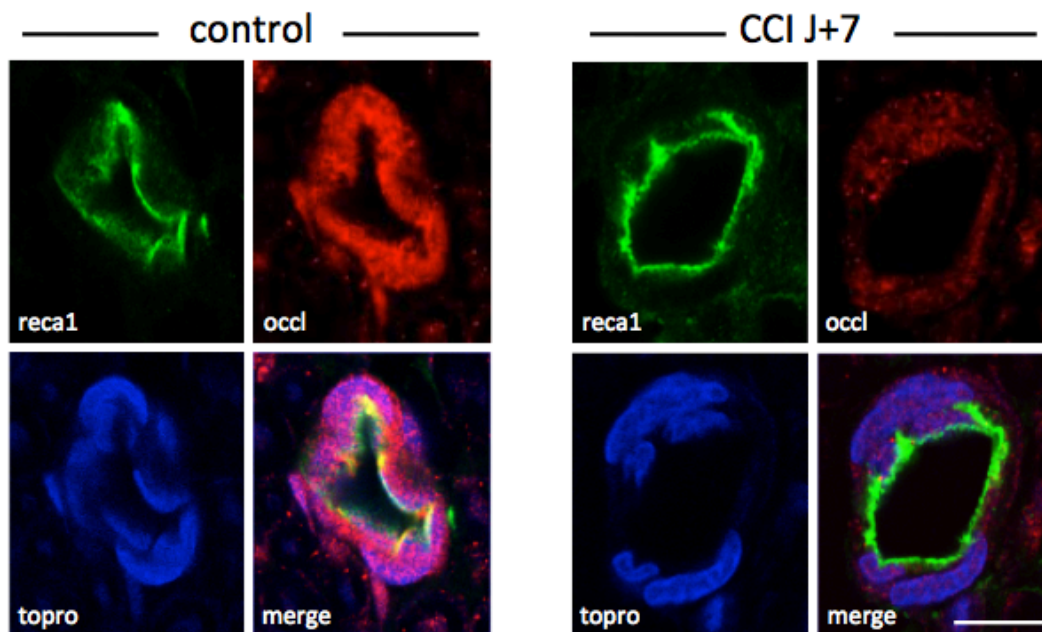
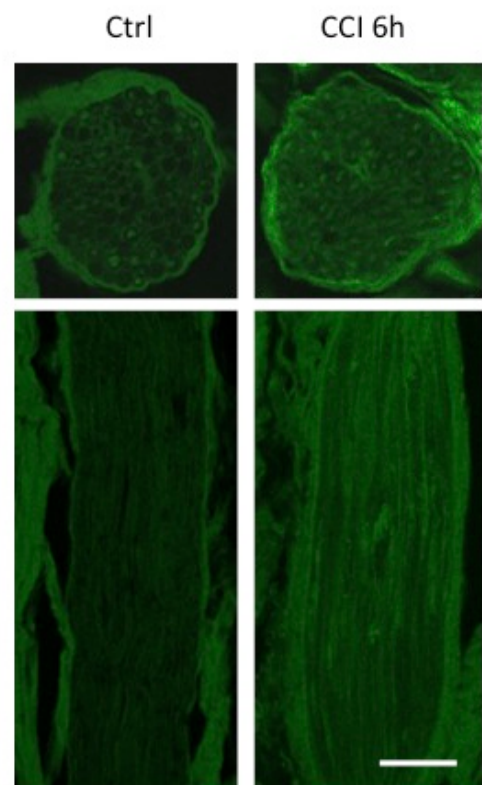


Figure II-10. *La constriction chronique (CCI) du nerf sciatique induit une diminution de la synthèse endothéliale endoneurale de la protéine de jonctions serrées Occludine.* Comparativement au sham, à 7 jours post-CCI l'immunoréactivité pour l'Occludine (occl) observée sur des coupes axiales de nerf sciatique (centrées autour d'un micro-vaisseau endoneural) était fortement diminuée dans les cellules endothéliales (marquées au Reca-1). Des coupes axiales de nerf sciatique de rats CCI et sham fixées au PAF 4% étaient incubées avec du TO-PRO (marqueur nucléaire, bleu), un anticorps anti-Reca 1 (marqueur endothélial, vert) et un anticorps anti-Occludine (rouge) (Barre d'échelle = 10 μ m).

Dans le modèle trigéminal, une accumulation de NaFlu au niveau du parenchyme du nerf infra-orbitaire à 6 heures post-CCI (Figure II-11), suggérait une augmentation de la perméabilité vasculaire endoneurale, semblable à celle observée après SN-CCI.

Figure II-11. *La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire altère la perméabilité vasculaire endoneurale.* L'observation au microscope confocal à fluorescence de coupes longitudinales et axiales (de 30 μ m d'épaisseur) de nerf infra-orbitaire lésé (CCI) ou sham (Ctrl) montrait une augmentation de l'extravasation de NaFlu dans le parenchyme du nerf infra-orbitaire à 6 heures post-CCI (comparativement au contrôle) dès 3 heures post-CCI et de façon plus importante à 6 heures post-CCI, suggérant une augmentation de la perméabilité vasculaire endoneurale traduisant une altération de la BHN après CCI (Barre d'échelle = 50 μ m).



De la même façon, cette augmentation de perméabilité vasculaire était associée à une diminution significative de l'expression des ARNm des protéines de jonctions serrées *Claudine-1* (entre 3 heures et 24 heures post-CCI) et *Claudine-5* (entre 3 heures et 48 heures post-CCI ainsi qu'à 14 jours post-CCI) (Figure II-12 A) ainsi qu'une diminution de la synthèse endothéliale endoneurale de Claudine-1 et Claudine-5, tel qu'observée en microscopie confocale à fluorescence à 24 heures post-CCI (Figure II-12 B).

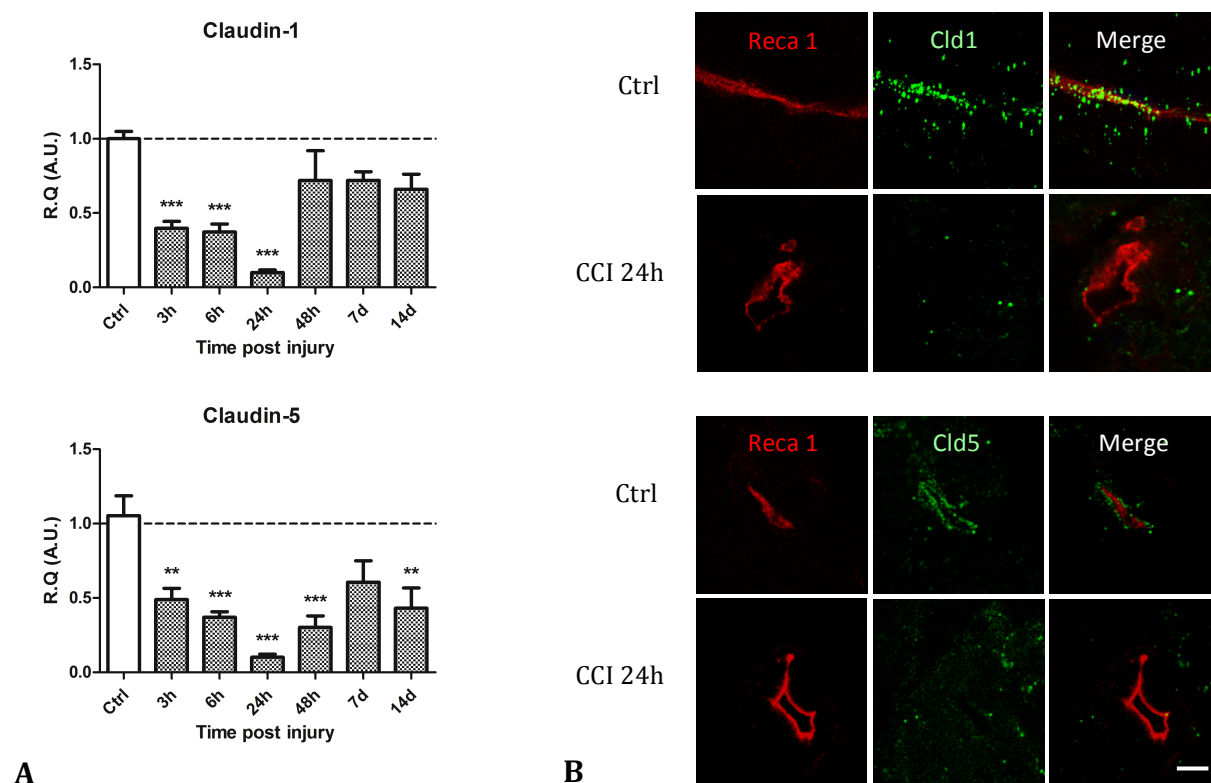


Figure II-12. La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire induit une diminution de l'expression des ARNm et de la synthèse endothéliale endoneurale des protéines de jonctions serrées Claudine-1 et Claudine-5. **A.** Les changements dans le temps des niveaux d'expression des ARNm des protéines de jonctions serrées *Claudine-1* et *Claudine-5* et *Occludine* ont été évalués dans le nerf infra-orbitaire de rats après CCI ou *sham* (condition contrôle, Ctrl) par RT-PCR semi-quantitative. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de $n=5-10$ animaux pour chaque temps post-lésion. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni ont été utilisés. **B.** L'immunoréactivité de Claudine-1 et Claudine-5 était fortement diminuée dans les coupes axiales de nerf infra-orbitaire à 24 heures post-CCI (par rapport au contrôle). Des coupes axiales de nerf infra-orbitaire de rats CCI et *sham* fixées au PAF 4% étaient incubées avec un anticorps anti-Reca 1 (marqueur endothélial, rouge) et un anticorps anti-Claudine-1 ou anti-Claudine-5 (vert) (Barre d'échelle = 10 μ m).

Les différences de cinétique d'expression des ARNm de *Claudine-1* et *Claudine-5* après IoN-CCI pourraient traduire la plasticité physiologique des jonctions serrées, impliquant une adaptabilité de l'expression des Claudines, avec des expressions parfois opposées, selon un mécanisme dit de « *claudin switching* » (Capaldo et Nusrat, 2015).

II-4-2 Développement de la neuroinflammation locale dans deux modèles de neuropathies spinale et trigéminal

L'altération de la BHN, se traduisant par une augmentation de la perméabilité vasculaire locale, permet la pénétration dans le parenchyme nerveux de substances algogènes et d'immunocytes, responsables de l'apparition d'une neuroinflammation locale (Echeverry et al., 2011 ; Echeverry et al., 2013 ; Lim et al., 2014 ; Trevisan et al., 2016). De plus, des études récentes suggèrent le rôle majeur des récepteurs de l'immunité innée *Toll-Like Receptors*, en particulier des TLR2 et 4 dans le développement des douleurs neuropathiques périphériques (Kim et al., 2007 ; Shi et al., 2011 ; Jurga et al., 2016).

Nous avons ainsi étudié les altérations de l'expression des ARNm de différents marqueurs immunitaires et neuroinflammatoires clés dans nos modèles de neuropathies spinale et trigéminal.

Après CCI du nerf sciatique, il était observé au sein du parenchyme nerveux lésé une augmentation significative de l'expression des ARNm codant pour des récepteurs de l'immunité innée (*Toll-Like Receptors*) *TLR2* et *TLR4* présentant respectivement un pic d'expression de 3 à 48 heures post-CCI et à 6 heures post-CCI, de la chimiokine *CCL2* (à 6 heures et 24 heures post-CCI), du marqueur d'hypoxie *Hypoxia Inducible Factor 1α* (*HIF-1α* ; de 6 heures à 48 heures post-CCI) ainsi que des marqueurs de macrophages (*CD11b* ; entre 6 heures et 7 jours post-CCI) et de lymphocytes (*CD3* ; de 7 à 15 jours post-CCI) (Figure II-13).

Ces données suggèrent l'apparition d'une infiltration macrophagique précoce, probablement *CCL2*-dépendante (dès 6 heures) suivie d'une infiltration lymphocytaire plus tardive (à 7 jours) dans le parenchyme du nerf sciatique après CCI, conformément aux données de la littérature (Sapienza et al., 2014 ; Van Steenwinckel et al., 2015).

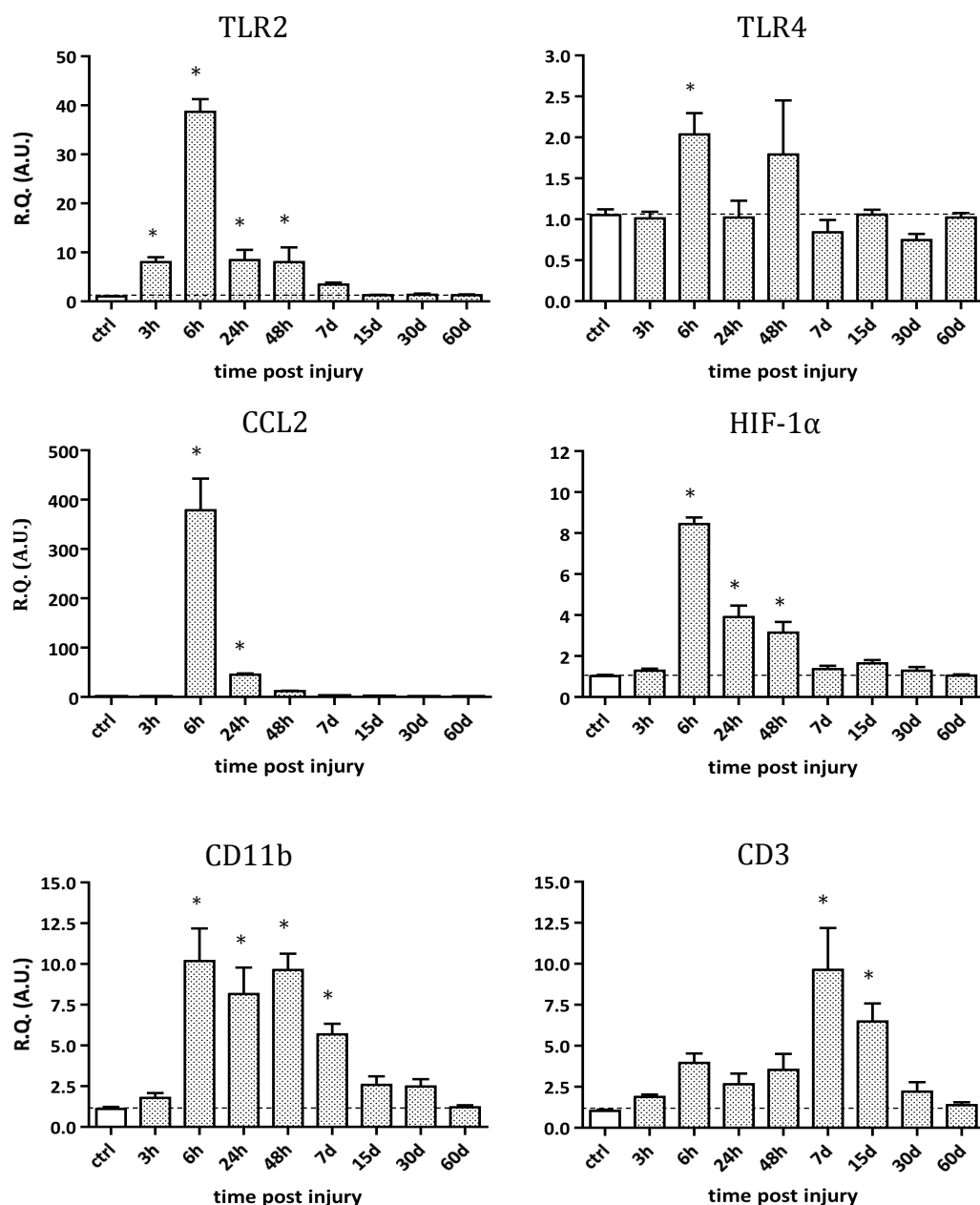


Figure II-13. La constriction chronique (CCI) du nerf sciatique induit une augmentation précoce de l'expression des ARNm de marqueurs neuroinflammatoires clés. Les changements dans le temps des niveaux d'expression des ARNm de *Toll-like Receptor 2 et 4 (TLR2, TLR4)*, *Chemokine (CC motif) ligand 2 (CCL2)*, *hypoxia-inducible factor α (HIF-1α)*, *CD11b* et *CD3* ont été évalués dans les nerfs sciatiques de rats après CCI ou sham (condition contrôle, ctrl) par RT-PCR semi-quantitative. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification, R.Q.*) en unités arbitraires (*Arbitrary Units, A.U.*) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de $n=6-8$ animaux pour chaque temps post-lésion. * $p<0,05$. Une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni ont été utilisés.

Au niveau trigéminal, une augmentation significative d'expression des ARNm codant pour *TLR2* (à 6 heures post-CCI), *TLR4* (à 6 heures post-CCI), *CD11b* (à 24 heures post-CCI) et *CD3* (à 14 jours post-CCI) était observée dans les nerfs infra-orbitaires après constriction chronique, comparativement aux rats *sham* (condition contrôle, Ctrl) (Figure II-14), traduisant une infiltration macrophagique puis lymphocytaire, similaire à celle observée dans le nerf sciatique.

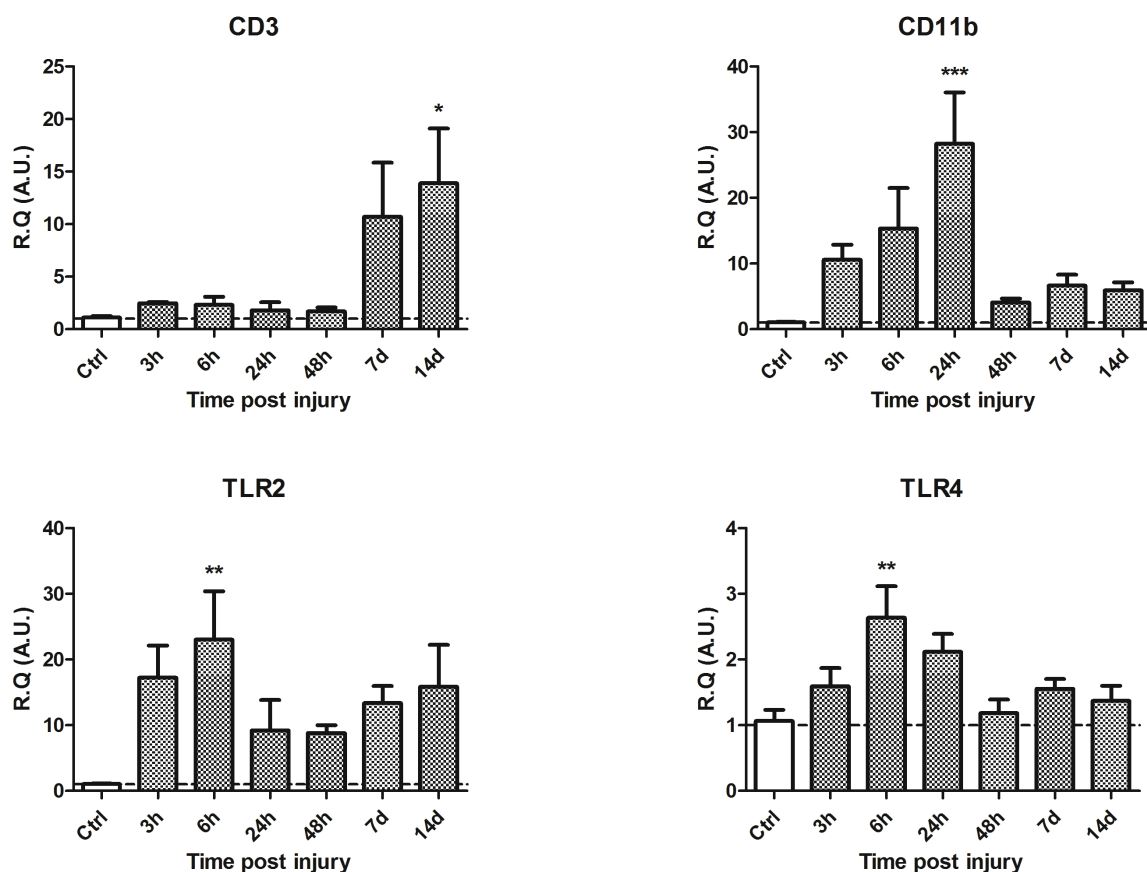


Figure II-14. La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire induit une augmentation précoce de l'expression des ARNm de marqueurs neuroinflammatoires clés. Les changements dans le temps des niveaux d'expression des ARNm de *CD3*, *CD11b* et Toll-like Receptor 2 et 4 (*TLR2*, *TLR4*) ont été évalués dans les nerfs infra-orbitaires de rats après CCI ou *sham* (condition contrôle, ctrl) par RT-PCR semi-quantitative. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de $n=5-10$ animaux pour chaque temps post-lésion. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni ont été utilisés.

Ces résultats sont concordants avec le développement précoce d'une neuroinflammation locale résultant de l'augmentation de perméabilité vasculaire liée à l'altération de la BHN après CCI du nerf sciatique ou infra-orbitaire tel que précédemment décrit dans la littérature.

II-4-3 Exploration des déterminants de la perméabilité vasculaire endoneurale post-traumatique

La perméabilité vasculaire endoneurale est régulée par de nombreux déterminants et voies de signalisation, aussi bien en conditions physiologiques que pathologiques, dont l'action effectrice finale implique -le plus souvent- la régulation de la synthèse, l'expression et/ou l'organisation des jonctions serrées, adhérentes et gap (Hu et al., 2013 ; Kanda, 2013 ; Peltonen et al., 2013 ; Ubogu, 2013 ; Rodrigues et Granger, 2015).

Ainsi, les altérations observées au niveau des jonctions serrées par exemple, résultent toujours de la combinaison de différentes voies de signalisation (ayant un effet agoniste ou antagoniste) (Hu et al., 2013).

Dans ce travail, deux types majeurs de déterminants de la perméabilité vasculaire endoneurale ont été étudiés :

- des déterminants immunitaires : la voie des TLRs,
- des déterminants morphogénétiques : les voies Sonic Hedgehog et Wnt/ β -caténine.

a. Déterminants immunitaires : la voie des TLRs

Les *Toll-Like Receptors* (TLRs) sont des récepteurs transmembranaires de l'immunité innée, reconnaissant des motifs spécifiques exogènes liés à l'invasion de pathogènes (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* [PAMPs]) mais également des signaux endogènes de danger (*Danger/Damage-Associated Molecular Patterns* [DAMPs] aussi appelés « alarmines ») libérés par des cellules activées, stressées ou nécrotiques ainsi que des molécules issues de la MEC à la suite d'une lésion ou d'un dommage tissulaire (Nicotra et al., 2012).

Le ligand exogène principal de TLR4 est le lipopolysaccharide (LPS), une endotoxine composant la membrane des bactéries Gram -, alors que le TLR2 reconnaît des lipoprotéines de bactéries Gram +. Divers ligands endogènes (DAMPs) peuvent activer les TLRs, tels que la fibronectine, les β -défensines, le *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) et les *Heat Shock Proteins* (HSP). L'activation des TLRs par les DAMPs résulterait à son tour en l'activation de nombreux autres types cellulaires, telles que les cellules gliales, dont le rôle dans la douleur pathologique est aujourd'hui clairement établi. La dégénérescence Wallérienne des fibres nociceptives serait responsable de la production à long terme de DAMPs pouvant perdurer des années après la lésion nerveuse initiale (Nicotra et al., 2012).

Les TLRs sont à la fois intra- et extracellulaires, sauf pour les TLRs 3,7,8 et 9 qui sont uniquement localisés dans les membranes intracellulaires (compartiments endosomaux et endolysosomaux) où ils sont activés par les acides nucléiques d'origine bactérienne ou virale (Nicotra et al., 2012).

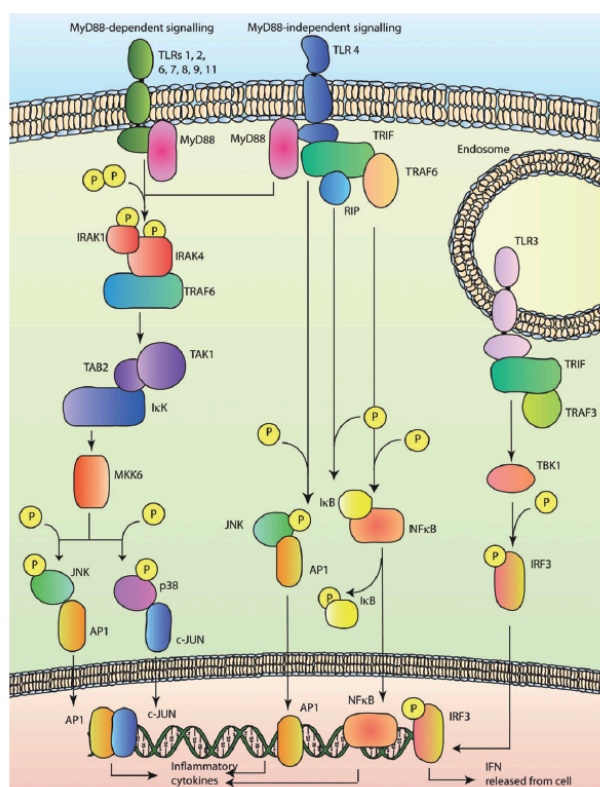
En tant que sentinelles de l'immunité innée, les TLRs étaient supposés être uniquement exprimés sur les cellules immunitaires telles que les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques. Cependant, des travaux récents ont également montré leur présence sur des cellules épithéliales, des cellules endothéliales, neuronales et gliales, jouant ainsi un rôle important dans l'inflammation tissu-spécifique (Murad, 2014).

A la suite de la fixation du ligand, une dimérisation du récepteur et des changements conformationnels se produisent. Ces changements sont essentiels pour attirer les molécules adaptatrices au niveau des TLRs via leur domaine TIR (*Toll Interleukin-1 Receptor*). Ces molécules adaptatrices incluent *Myeloid Differentiation primary response gene 88* (MyD88), *MyD88-Adapter-Like* (MAL, aussi appelée *TIR-domain-containing adaptor protein* [TIRAP]), *TIR-domain-containing adapter inducing interferon- β* (TRIF), *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) et *Sterile-alpha and armadillo motif containing protein* (SARM). De plus, pour produire un signal, certains récepteurs utilisent certaines protéines adaptatrices et corécepteurs. Par exemple, TLR4 utilise classiquement le *Myeloid Differentiation Factor 2* (MD-2) formant un complexe TLR4-MD2, ainsi que le corécepteur CD14, permettant la signalisation TLR4 après fixation du LPS. Il est maintenant clair que selon le type cellulaire, différentes associations TLR4/corécepteurs peuvent interagir pour produire des signaux pro-inflammatoires (Nicotra et al., 2012).

La transduction du signal après activation des TLRs implique deux voies distinctes, dépendant respectivement de MyD88 et de TRIF (Figure II-15). La voie MyD88 est impliquée dans la signalisation de tous les TLRs sauf le TLR3 et résulte en l'activation de Nuclear Factor κ B (NF κ B) et *Activator Protein-1* (AP-1) (Downes et Crack, 2010).

Figure II-15. Voies de signalisation moléculaire des différents Toll-Like Receptors (TLRs). L'activation des voies *Myeloid Differentiation primary response gene 88* (MyD88)-dépendantes se traduit par une activation des facteurs de transcription nucléaires Nuclear Factor κ B (NF κ B) et Activator Protein-1 (AP-1) (d'après Downes et Crack, 2010)

A la suite de l'activation de ces deux molécules, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont libérées telles que IL-6, IL-1 β et TNF- α , impliquées dans l'initiation et le maintien des douleurs chroniques (Nicotra et al., 2012).



Les médiateurs pro-inflammatoires libérés à la suite de l'activation TLR impliqués dans les douleurs chroniques sont résumés dans le tableau II-4.

Proinflammatory Mediators released via TLR activation			
	Astrocytes	Microglia	DRG neurons
TLR1			Expressed
TLR2	MCP-1, ROS, NO, CXCL8, IL-6, IL-12p40	TNF- α , IL-1 β , iNOS, COX-2, NO, CCL2, CXCL2	Expressed
TLR3	MCP-1, ROS, TNF- α , IL-6, CCL3, NO, IL-1 α , IL-1 β	IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, NO	PGE ₂ , RANTES, CXCL10, IL-1 α , IL-1 β
TLR4	MCP-1, TNF- α , IL-6, IL-1 α , IL-1 β , NO, IFN- β , iNOS	IL-1 α , IL-6, CCL3, CXCL2, TNF- α , IL-18, iNOS, NO	CGRP, TNF- α , IL-1 β
TLR5	IL-6		Expressed
TLR6			Expressed
TLR7	IL-6, IL-1 α , TNF- α , IL-5, IL-13	IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-12, IL-13, IL-15	PGE ₂ , RANTES, CXCL10, IL-1 α , IL-1 β
TLR9	MCP-1, ROS, IL-6, TNF- α	IL-6, TNF- α , IL-5, IL-13, IL-15, NO	PGE ₂ , RANTES, CXCL10, IL-1 α , IL-1 β

Tableau II-4. Médiateurs pro-inflammatoires libérés par une activation des TLRs impliqués dans les douleurs chroniques (d'après Nicotra et al., 2012).

Des travaux récents suggèrent que les TLRs joueraient d'autres rôles que simplement la reconnaissance de signaux de dommage ou de pathogènes et la libération subséquente de cytokines pro-inflammatoires. Ils seraient notamment impliqués dans la réparation neuronale et la résolution de l'inflammation. Ainsi la signalisation TLR est également observée dans la microglie activée selon un phénotype macrophagique M2, avec expression d'un profil cytokinique anti-inflammatoire. De plus, la signalisation microgliale TLR4 est impliquée dans la clairance des débris de myéline à la suite d'une lésion neuronale, entraînant la prolifération de cellules progénitrices oligodendrocytaires, une remyélinisation et un effet neuroprotecteur.

L'activation microgliale de TLR3 et TLR9 aurait également un effet neuroprotecteur (Nicotra et al., 2012).

Signalisation TLR et douleurs pathologiques :

De nombreux travaux ont montré le rôle majeur de la signalisation TLR dans l'initiation des douleurs pathologiques, que ce soit après transection nerveuse de L5 ou après inflammatoire périphérique induite par le *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) (DeLeo et al., 2004).

Tanga et al. furent les premiers en 2005 à établir un rôle causal de TLR4 dans l'initiation d'un modèle préclinique de douleur neuropathique. En utilisant deux lignées murines génétiquement déficientes en TLR4 et via l'utilisation d'injections intrathécales d'un oligodésoxynucléotide antisens TLR4 chez des rats ayant eu une transection au niveau de L5, ils montrèrent une atténuation notable de l'hypersensibilité et une expression diminuée de marqueurs microgliaux spinaux et de cytokines pro-inflammatoires (Tanga et al., 2005).

Par la suite, d'autres études montrèrent la possibilité de prévenir et rapidement antagoniser des douleurs neuropathiques dans des modèles précliniques par le blocage pharmacologique de TLR4 (Hutchinson et al., 2007, 2008 ; Bettoni et al., 2008). Il est par ailleurs intéressant de noter que de nombreux ligands sont capables de moduler la signalisation TLR4 : certains antidépresseurs tricycliques tels que l'amitriptyline possèdent une importante activité inhibitrice de TLR4 (Hutchinson et al., 2010).

Par la suite, d'autres études ont confirmé le rôle essentiel de TLR4 dans plusieurs modèles précliniques de douleurs neuropathiques. Lan et al. (2010) ont montré que l'administration intrathécale d'un siRNA TLR4 chez des rats en amont du développement de l'allodynie dans un modèle de douleur cancéreuse osseuse diminuait significativement le comportement hypersensible et diminuait l'expression des marqueurs spinaux microgliaux et des cytokines pro-inflammatoires (Lan et al., 2010). De façon similaire, Wu et al. (2010) ont montré le blocage de l'allodynie induite par le CCI, par un traitement préventif par siRNA TLR4 (Wu et al., 2010).

L'implication des TLRs du SNC dans les modèles précliniques de douleurs neuropathiques inclue également le TLR2 extracellulaire (Kim et al., 2007 ; Shi et al., 2011) et le TLR3 intracellulaire (Obata et al., 2008) ; l'activation TLR2 dans les astrocytes et la microglie et l'activation TLR3 dans la microglie sont responsables de l'apparition de la douleur neuropathique (Nicotra et al., 2012). Kim et al. (2007) ont montré que les neurones sensitifs lésés activaient les cellules gliales via TLR2 et l'hypersensibilité douloureuse qui en résulte

est le fruit direct de l'activation de TLR2. De plus, les KO TLR2 ont montré une abolition du développement et maintien de l'allodynie induite par une lésion nerveuse (Kim et al., 2007). Enfin, TLR3 serait essentiel à l'activation gliale spinale impliquée dans l'allodynie tactile post-lésion nerveuse, même si les mécanismes exacts sont encore inconnus (Obata et al., 2008).

Importance de la signalisation TLR2 et TLR4 dans la douleur neuropathique :

Parmi l'ensemble des TLRs, les récepteurs TLR2 et TLR4 seraient impliqués de façon majeure dans la genèse et l'entretien des douleurs neuropathiques.

En 2011, Shi et al. ont montré que le récepteur TLR2 peut être activé par des ligands endogènes libérés par le nerf lésé. L'expression de TLR2 augmentait ainsi progressivement jusqu'à J14, où la majorité des cellules exprimant le TLR2 étaient des macrophages ED1⁺. De plus, ils ont montré que le TLR2 (probablement exprimé dans les macrophages résidents ou les cellules de Schwann) était impliqué dans le recrutement des macrophages pendant la dégénérescence wallérienne du nerf périphérique. L'induction de TLR2 était responsable de l'activation sous-jacente de la voie NFκB et la libération de cytokines pro-inflammatoires (Shi et al., 2011).

Lewis et al. (2012) ont montré que TLR4 était impliqué non seulement dans la douleur neuropathique récente mais également dans le maintien de la douleur neuropathique persistante. Ainsi, le blocage par siRNA de TLR4 au moment de la chirurgie, diminuait le développement de la neuropathie jusqu'à 14 jours post-chirurgie. Selon ces auteurs, le récepteur TLR4 serait continuellement stimulé pendant les neuropathies, contribuant au maintien de la douleur (Lewis et al., 2012).

TLRs et altérations de la perméabilité vasculaire :

Des études récentes ont montré le rôle essentiel des TLRs et en particulier de TLR4 dans l'inflammation micro-vasculaire et la dysfonction de la barrière endothéliale (Breslin et al., 2008 ; Nagyoszi et al., 2010). Ainsi, les TLRs endothéliaux pourraient être impliqués dans la régulation de la perméabilité de la BHE en lien avec l'apparition des douleurs pathologiques, tel que décrit dans la littérature, mais également en lien avec la surexpression des ARNm de TLR2 et TLR4 tels qu'observés après CCI dans nos modèles lésionnels.

Afin d'explorer l'impact de la signalisation TLR dans les cellules endothéliales endoneurales, nous avons d'abord étudié l'impact de la stimulation TLR2, TLR3 et TLR4 dans des cellules endothéliales cérébrales microvasculaires humaines (cellules hCMEC/D3, un modèle *in vitro* validé de BHE [Weksler et al., 2013]). *In vitro*, ni la stimulation de TLR2 (LTA – 100 ng, 1 mg ou 10 mg/mL) ni celle de TLR3 (polyI :C – 1 mg, 10 mg ou 100 mg/mL) n'induisaient de changements de niveaux d'expression des ARNm d'intérêts (données non présentées). A l'inverse, l'activation de TLR4 (LPS – 100 ng/mL) induisait de multiples changements de niveaux d'expression de nombreux ARNm, rappelant les modifications observées *in vivo* dans les nerfs sciatiques lésés. Ainsi, comparativement aux cellules contrôles, les ARNm des protéines de jonctions serrées *Claudine-5* et *Occludine*, ainsi que les ARNm des marqueurs de la voie Sonic Hedgehog (voir la partie sur la voie Sonic Hedgehog ci-après) *Patched-1* et *Gli-1* étaient significativement moins exprimés après 3 heures de stimulation par le LPS. De plus, la stimulation LPS était également responsable d'une augmentation de l'expression de l'ARNm de *TLR2* et d'*IL-1 β* (Figure II-16). Enfin, le niveau d'expression de l'ARNm de *TLR4* n'était pas modifié par la stimulation LPS (données non présentées).

Ces changements TLR4-dépendants étaient tous atténués (hormis pour l'ARNm de l'*Occludine*) en présence de l'antagoniste du récepteur TLR4 CLI-095, suggérant un effet spécifique du TLR4 (Figure II-16).

Afin d'explorer les voies moléculaires sous-jacentes pouvant expliquer les effets de la stimulation TLR4, les cellules endothéliales ont ensuite été prétraitées avec un inhibiteur sélectif de MEK kinase (PD98059), une kinase impliquée dans la production de cytokines TLR-dépendante. Le prétraitement avec le PD98059 n'affectait pas les effets moléculaires LPS-dépendants (données non présentées). A l'inverse, le blocage de l'activité NF κ B p65 par JSH-23, un inhibiteur de la translocation nucléaire de NF κ B, bloquait de façon majeure les modifications moléculaires LPS-dépendantes (Figure II-16).

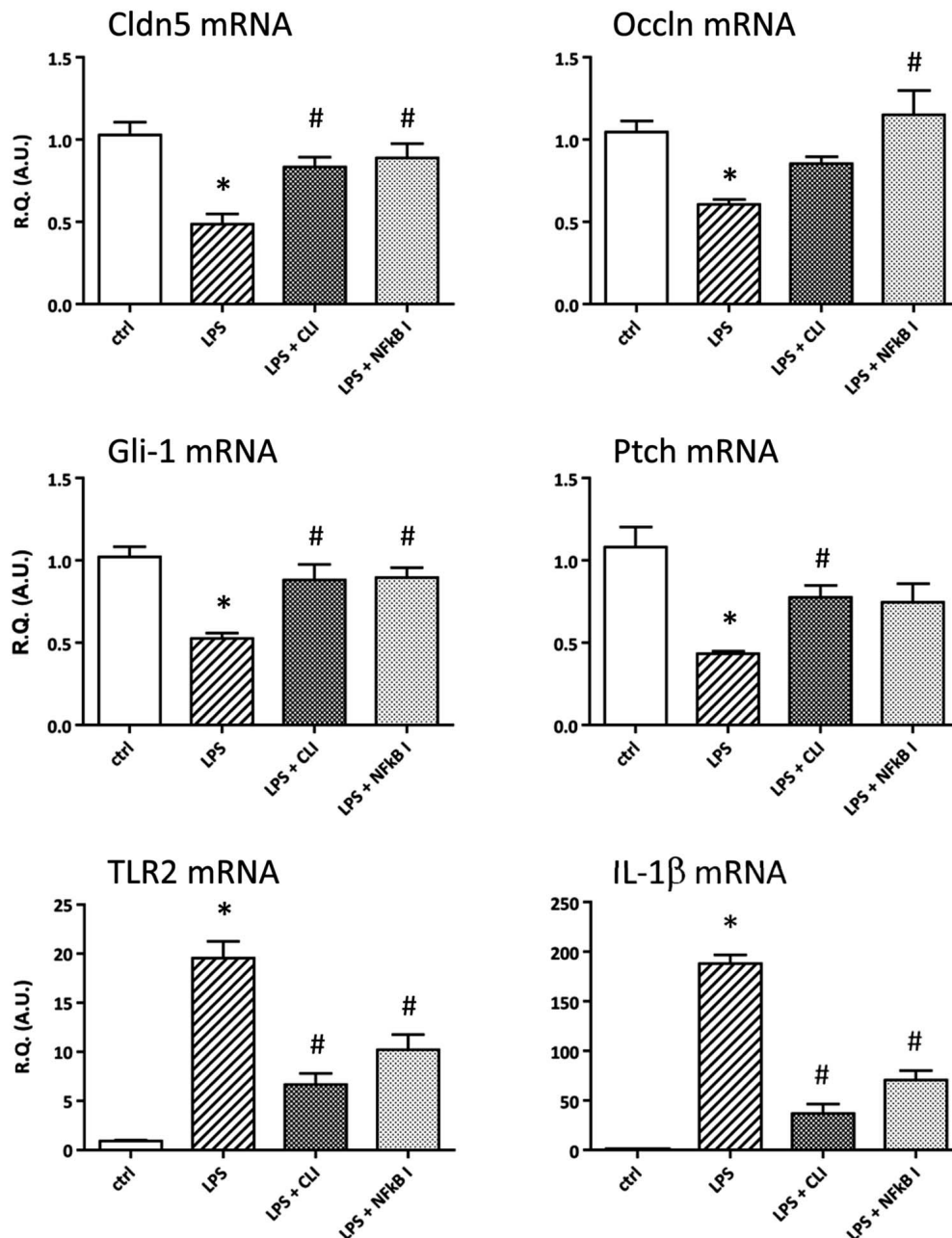


Figure II-16. La stimulation du récepteur Toll-like 4 (TLR4) dans les cellules endothéliales cérébrales microvasculaires humaines (hCMEC/D3) induit des changements d'expression des ARNm similaires à ceux observés après constriction chronique (CCI) du nerf sciatique. Des cellules hCMEC/D3 ont été incubées avec du lipopolysaccharide (LPS ; 100 ng/mL, 3 heures) en présence ou non d'un antagoniste du récepteur TLR4 (CLI-095, 10 mM) ou d'un inhibiteur du nuclear factor κ B (NF κ B) (JSH-23, 100 mM). Les niveaux d'expressions des ARNm de différents marqueurs caractéristiques des changements observés *in vivo* après constriction chronique du nerf sciatique ont été mesurés par RT-PCR semi-quantitative. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de $n=5-7$ expériences ; * $p<0,05$ cellules traitées par LPS vs contrôles ; # $p<0,05$ cellules traitées par LPS en présence de l'antagoniste TLR ou de l'inhibiteur NF κ B. Une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni ont été utilisés.

Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature, suggérant une augmentation de l'expression de TLR2 après stimulation TLR4 (Fan et al., 2003) ainsi qu'un rôle important de NFκB dans la régulation de la perméabilité vasculaire, via des modifications d'expression des protéines de jonctions serrées. Ainsi, NFκB diminue l'expression de Claudine-5 par sa sous-unité p65 bloquant l'activité du promoteur de *Claudine-5* (Hu et al., 2013).

De façon intéressante, le NFκB peut être activé par le TNF-α (via PKCζ) et par l'IL-1β, deux cytokines pro-inflammatoires libérées par l'activation TLR NFκB-dépendante, suggérant la possibilité d'une boucle d'auto-amplification du signal pro-inflammatoire (Hu et al., 2013).

Afin de confirmer l'importance fonctionnelle de la signalisation TLR4 endothéliale *in vivo*, la présence effective du récepteur TLR4 au niveau des cellules endothéliales endoneurales a été confirmée en immunohistochimie, sur des coupes axiales et longitudinales de nerfs sciatiques, centrées sur des micro-vaisseaux endoneuraux marqués au facteur de von Willebrand (utilisé ici comme marqueur endothélial) (Figure II-17).

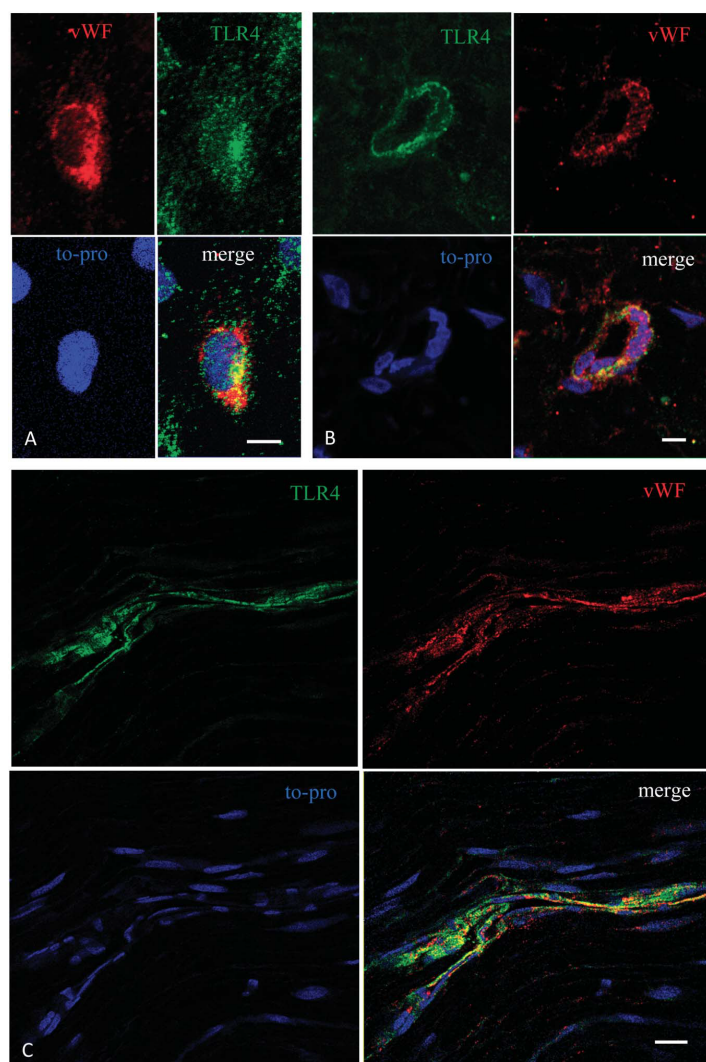


Figure II-17. Immunoréactivité pour le récepteur Toll-like Receptor 4 (TLR4) dans les cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*.

Des cellules endothéliales hCMEC/D3 fixées au paraformaldéhyde 4% (A) et des coupes axiales (B) et longitudinales (C) fixées au paraformaldéhyde 4% de nerf sciatique ont été incubées avec du TO-PRO (marqueur nucléaire, bleu), des anticorps anti-facteur de von Willebrand (vWF, marqueur endothélial, rouge) et des anticorps anti-TLR4 (vert). L'immunoréactivité TLR4 colocalisait avec les cellules endothéliales marquées au facteur de von Willebrand. A noter également, l'immunoréactivité TLR4 similaire entre les cellules endothéliales hCMEC/D3 (A) et les coupes axiales de nerf sciatique (B) renforçant la validité de ce modèle *in vitro* (Barre d'échelle = 10 μm).

In vivo, la stimulation de la voie TLR4 au niveau de nerfs sciatiques non lésés (via des injections péri-neurales de LPS), répliquait les altérations moléculaires observées après CCI du nerf sciatique (Figure II-18 A) mais également les altérations vasculaires, i.e. l'augmentation de la perméabilité vasculaire endoneurale (se traduisant par une immunofluorescence prononcée au centre du nerf après injection intraveineuse de NaFlu) (Figure II-18 B).

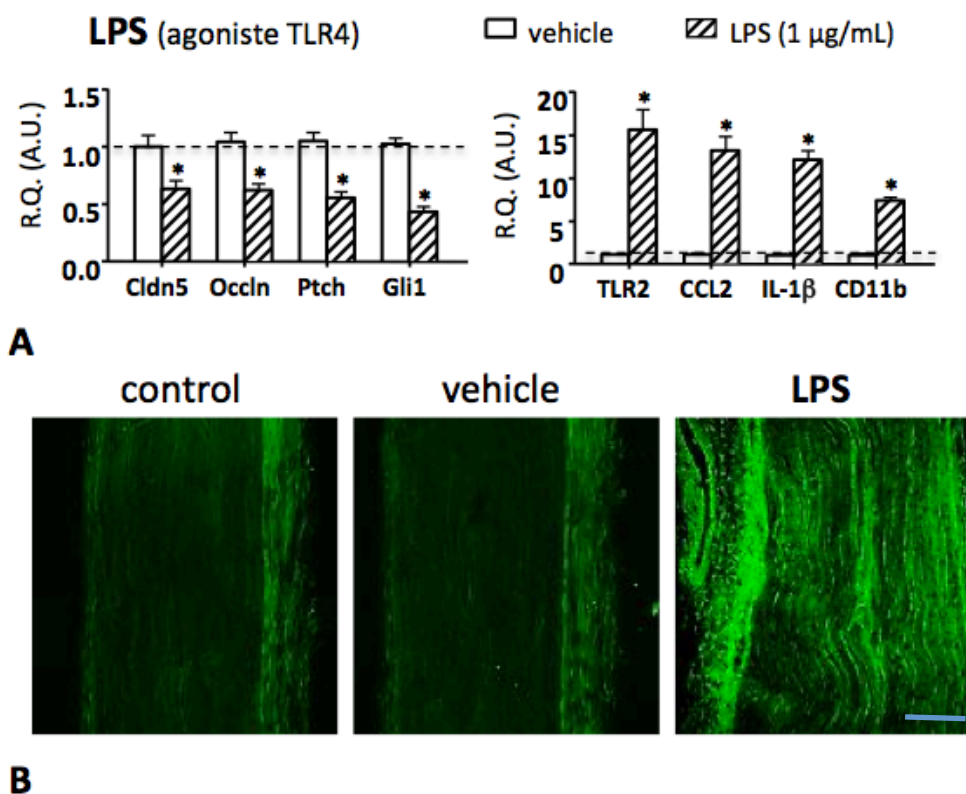


Figure II-18. L'activation locale du récepteur Toll-like Receptor 4 (TLR4) dans le nerf sciatique de rats naïfs réplique les altérations moléculaires et vasculaires observées après constriction chronique du nerf sciatique. Chez des animaux naïfs, sans exposer le nerf sciatique, du lipopolysaccharide (LPS ; 1 mg/mL) ou son véhicule (NaCl 0,9%) ont été injectés par voie transcutanée (100 μL) à proximité du nerf sciatique une fois par jour pendant 4 jours. **A.** L'évaluation des niveaux d'expression des ARNm d'intérêt a été réalisée par RT-PCR semi-quantitative sur les nerfs sciatiques injectés, 6 heures après la dernière injection. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne ± erreur-type de la moyenne de n=5-6 animaux par groupe. *p<0,05 ; t-test non apparié. **B.** De façon similaire, l'extravasation de fluorescéine sodique (NaFlu) dans le parenchyme du nerf sciatique des rats injectés était évaluée 6 heures après la dernière injection. Une immunofluorescence plus marquée de NaFlu dans l'endonèvre de coupes longitudinales (30 μm d'épaisseur) de nerfs sciatiques de rats injectés au LPS était observée comparativement aux rats injectés avec le véhicule, suggérant une augmentation de la perméabilité de la BHN (Barre d'échelle = 100 μm).

Ces résultats suggèrent une implication majeure de la voie TLR4 dans les altérations moléculaires et vasculaires observées après CCI du nerf sciatique. De plus, la diminution d'expression des ARNm des marqueurs de la voie Sonic Hedgehog (*Patched-1*, *Gli-1*) après stimulation TLR4, suggère une interaction signalétique entre ces deux voies de signalisation.

b. Déterminants morphogénétiques : les voies Sonic Hedgehog (SHH) et Wnt/ β -caténine

La voie Sonic Hedgehog (SHH) :

La voie Hedgehog est une famille de protéines morphogénétiques (Sonic Hedgehog [SHH], Desert Hedgehog [DHH], Indian Hedgehog [IHH]) jouant des rôles majeurs lors du développement embryonnaire, mais également à l'âge adulte, dans de nombreux processus pathologiques, notamment dans la cancérogenèse (Traiffort et al., 1999 ; Hooper et Scott, 2005). Desert Hedgehog est par exemple impliquée dans l'organogénèse des nerfs périphériques lors du développement, mais également dans le maintien de l'intégrité nerveuse chez l'adulte, ainsi que dans la régénération et réparation post-lésionnelles (Parmantier et al., 1999 ; Bajestan et al., 2006).

Alvarez et al. (2011) ont montré le rôle essentiel de Sonic Hedgehog (SHH) dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et la quiescence immunitaire du système nerveux central, en contrôlant la production endothéliale de protéines de jonctions serrées. De plus, ils ont également montré qu'une signalisation SHH active exerce une activité anti-inflammatoire. De fait, en situation d'inflammation centrale, l'augmentation de production de SHH par les astrocytes pourrait promouvoir la réparation de la BHE et la restauration du fonctionnement physiologique et immunologique de la BHE (Alvarez et al., 2011).

Au niveau cellulaire, en l'absence de ligand (protéine SHH), le récepteur transmembranaire Patched-1 réprime l'activité du récepteur *Smoothened* (Smo) et la forme inhibitrice du facteur de transcription Gli (GLI3B) est active, inhibant la signalisation sous-jacente. Dès que SHH se fixe à Patched-1, l'inhibition constitutive de Smo est levée, permettant la translocation du récepteur au niveau des cils primaires de la cellule où il peut activer ses voies de transduction du signal, notamment la forme activatrice du facteur de transcription Gli (Gli-1). Le facteur

Gli-1 va migrer dans le noyau cellulaire et promouvoir la synthèse de nombreuses molécules clés (Figure II-19), comme par exemple des protéines de jonctions serrées (Pan et al., 2013).

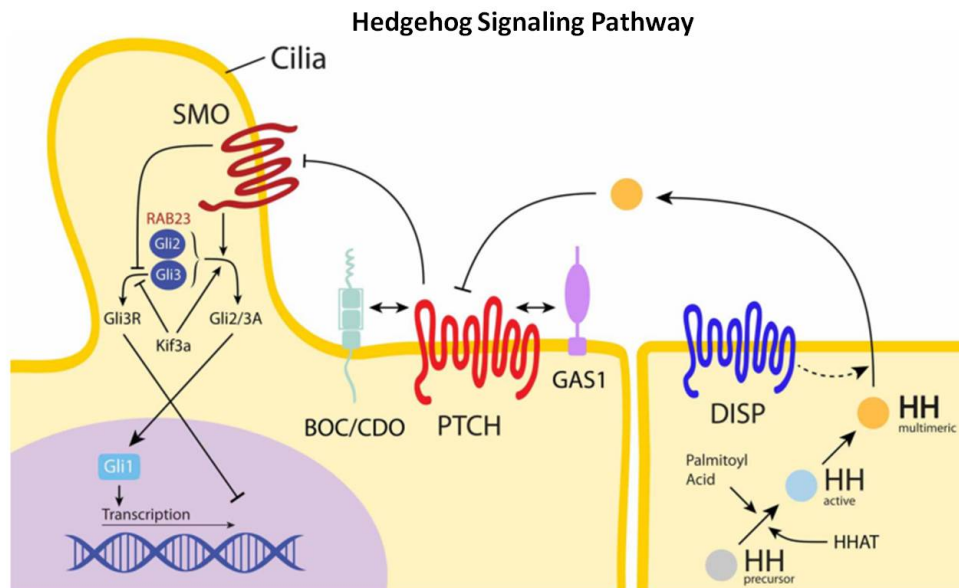


Figure II-19. Schéma récapitulatif de la voie de signalisation Hedgehog au niveau des cils primaires de la membrane cellulaire. De façon schématique, la fixation du ligand (protéine Hedgehog [HH]) sur le récepteur Patched (PTCH) va entraîner la levée de son action inhibitrice sur le récepteur *Smoothened* (SMO) migrant ainsi au niveau des cils primaires puis activant le facteur de transcription nucléaire Gli-1, qui va migrer dans le noyau et moduler la transcription de nombreux gènes cellulaires clés (d'après Pan et al., 2013).

Récemment, il a été montré que l'IL-1 β libérée par la microglie activée, induisait une perméabilité de la BHE en diminuant la libération astrocytaire de SHH, se traduisant par une diminution de la synthèse endothéliale de protéines de jonctions serrées, mais également en déclenchant la libération astrocytaire de VEGF. De plus, l'IL-1 β libérée serait également responsable de l'augmentation de la synthèse des chimiokines CXCL2, CCL2 et CCL20 favorisant la migration de cellules immunitaires au travers de la BHE perméabilisée (Wang et al., 2014). En outre, dans un contexte d'AVC, la protéine SHH augmenterait l'expression des ARNm et la production des protéines ZO-1 et Occludine *in vitro* et *in vivo*, favorisant le maintien de l'intégrité de la BHE en conditions ischémiques (Xia et al., 2013). Enfin, il a été montré dès 2011, chez la drosophile puis le rat, le rôle de la signalisation Hedgehog (via notamment DHH) dans la nociception et plus spécifiquement dans les phénomènes d'hyperalgésie et d'allodynie, probablement médiés par des canaux TRP (dont TRPA1 pour l'hyperalgésie thermique et Painless pour l'allodynie thermique) (Babcock et al., 2011).

Compte-tenu de son rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie de la BHE et de son implication dans les phénomènes de sensibilisation nociceptive, nous avons cherché à

explorer l'implication potentielle de la voie Sonic Hedgehog dans la régulation de la perméabilité vasculaire endoneurale post-traumatique.

Dans le modèle spinal des nerfs sciatiques soumis à une constriction chronique, une augmentation transitoire significative de l'expression de l'ARNm de *SHH* était observée entre 3 heures et 48 heures post-CCI, associée à une diminution majeure de l'expression des ARNm des effecteurs clés de la voie Sonic Hedgehog, à savoir *Patched-1*, *Gli-1* et *Smoothened* (SMO) (Figure II-20).

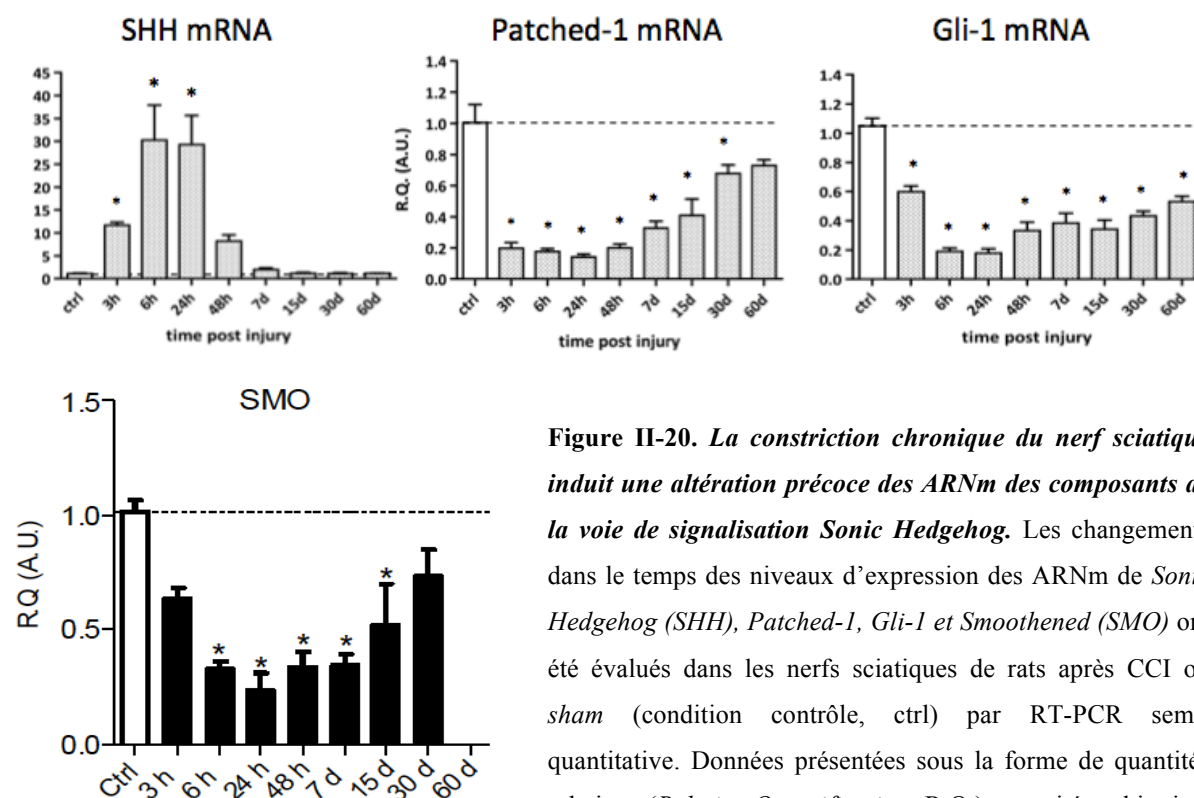


Figure II-20. La constriction chronique du nerf sciatique induit une altération précoce des ARNm des composants de la voie de signalisation Sonic Hedgehog. Les changements dans le temps des niveaux d'expression des ARNm de *Sonic Hedgehog* (*SHH*), *Patched-1*, *Gli-1* et *Smoothened* (*SMO*) ont été évalués dans les nerfs sciatiques de rats après CCI ou *sham* (condition contrôle, ctrl) par RT-PCR semi-quantitative. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires

(*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de $n=6-8$ animaux pour chaque temps post-lésion. * $p<0,05$. Une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni ont été utilisés.

Globalement, malgré une synthèse transitoire de SHH (illustrée par l'augmentation majeure d'expression de l'ARNm de *SHH*), ces résultats suggèrent une inhibition globale de la voie Sonic Hedgehog après CCI du nerf sciatique. Ceci était confirmé par l'observation d'une diminution de la synthèse endothéliale endoneurale de la protéine du récepteur Patched-1 à 7 jours après CCI (Figure II-21).

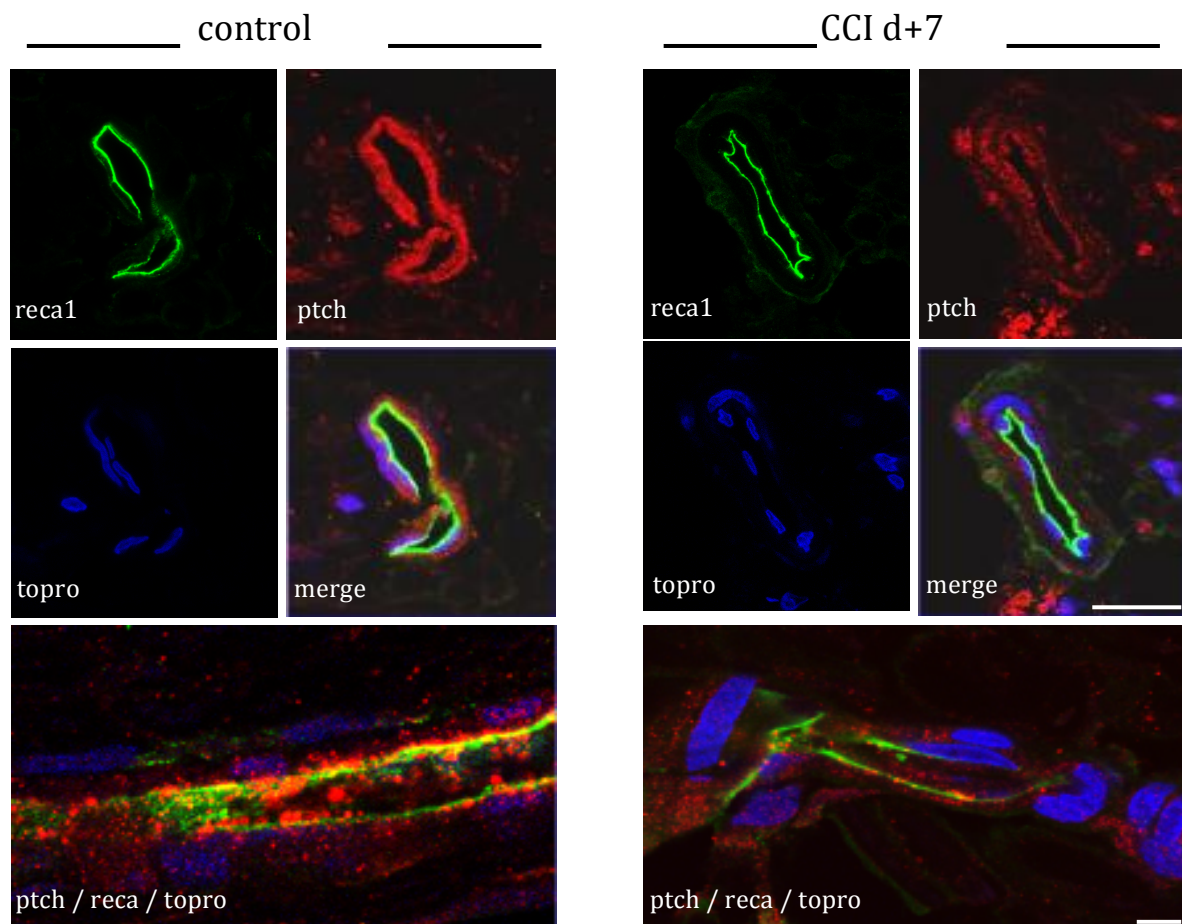


Figure II-21. La constriction chronique (CCI) du nerf sciatique induit une altération des composants de la voie de signalisation Sonic Hedgehog dans les cellules endothéliales endoneurales du nerf sciatique lésé. Comparativement au *sham*, à 7 jours post-CCI l'immunoréactivité pour Patched-1 (ptch) observée sur des coupes axiales et longitudinales de nerf sciatique (centrées autour d'un micro-vaisseau endoneural) était fortement diminuée dans les cellules endothéliales (marquées au Reca-1). Des coupes axiales et longitudinales de nerf sciatique de rats CCI et *sham* fixées au PAF 4% étaient incubées avec du TO-PRO (marqueur nucléaire, bleu), un anticorps anti-Reca 1 (marqueur endothélial, vert) et un anticorps anti-Patched-1 (rouge) (Barre d'échelle = 10 μ m).

Afin de confirmer l'importance fonctionnelle de l'inhibition de la voie Hedgehog dans le développement des altérations moléculaires et vasculaires dans le nerf sciatique après CCI, des injections péri-neurales de cyclopamine (un antagoniste du récepteur *Smoothened*) ont été réalisées chez des rats naïfs.

Le traitement local du nerf sciatique par cyclopamine induisait des altérations moléculaires similaires à celles observées après CCI (Figure II-22 A) mais également une augmentation de la perméabilité vasculaire endoneurale (observée en microscopie confocale à fluorescence sur des coupes axiales et longitudinales de nerf sciatique) (Figure II-22 B), de façon plus importante qu'après injections péri-neurales de LPS (Figure II-18 B).

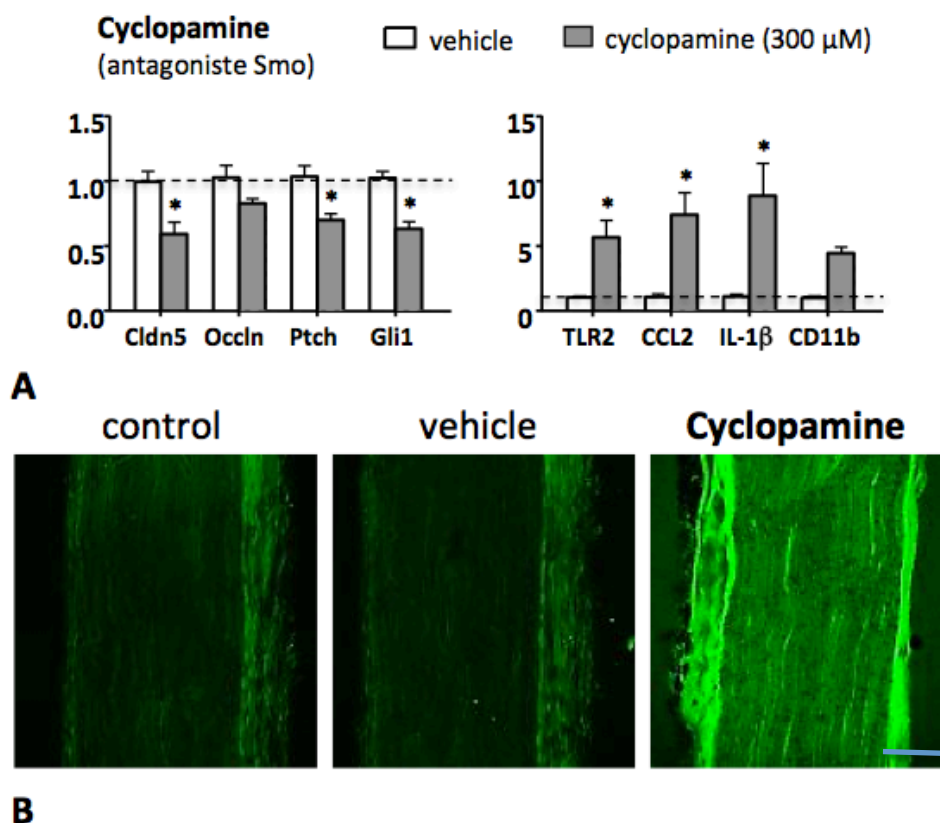


Figure II-22. L'inhibition locale de la voie de signalisation Sonic Hedgehog dans le nerf sciatique de rats naïfs réplique les altérations moléculaires et vasculaires observées après constriction chronique du nerf sciatique. Chez des animaux naïfs, sans exposer le nerf sciatique, de la cyclopamine (un antagoniste du récepteur *Smoothed* ; 300 µM) ou son véhicule (Ethanol 100%) ont été injectés par voie transcutanée (100 µL) à proximité du nerf sciatique une fois par jour pendant 4 jours. **A.** L'évaluation des niveaux d'expression des ARNm d'intérêt a été réalisée par RT-PCR semi-quantitative sur les nerfs sciatiques injectés, 6 heures après la dernière injection. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne ± erreur-type de la moyenne de n=5-6 animaux par groupe. *p<0,05 ; t-test non apparié. **B.** De façon similaire, l'extravasation de fluorescéine sodique (NaFlu) dans le parenchyme du nerf sciatique des rats injectés était évaluée 6 heures après la dernière injection. Une immunofluorescence plus marquée de NaFlu dans l'endonèvre de coupes longitudinales (30 µm d'épaisseur) de nerfs sciatiques de rats injectés à la cyclopamine était observée comparativement aux rats injectés avec le véhicule, suggérant une augmentation de la perméabilité de la BHN (Barre d'échelle = 100 µm).

Ainsi, l'inhibition de la voie Sonic Hedgehog était suffisante à elle seule pour mimer les altérations moléculaires et vasculaires observées après CCI du nerf sciatique. Ces résultats sont en accord avec des travaux récents qui ont montré l'importance de l'inhibition de la voie Hedgehog dans la disruption de la BHN dans un modèle de neuropathie diabétique (Chapouly et al., 2016).

Dans le modèle trigéminal, l'implication de la voie Hedgehog a été montrée de façon similaire.

Après CCI du nerf infra-orbitaire, une diminution significative de l'expression des ARNm des effecteurs de la voie SHH *Gli-1* et *Patched-1* était observée respectivement entre 3 heures et 48 heures post-CCI et entre 3 heures et 24 heures post-CCI (Figure II-23).

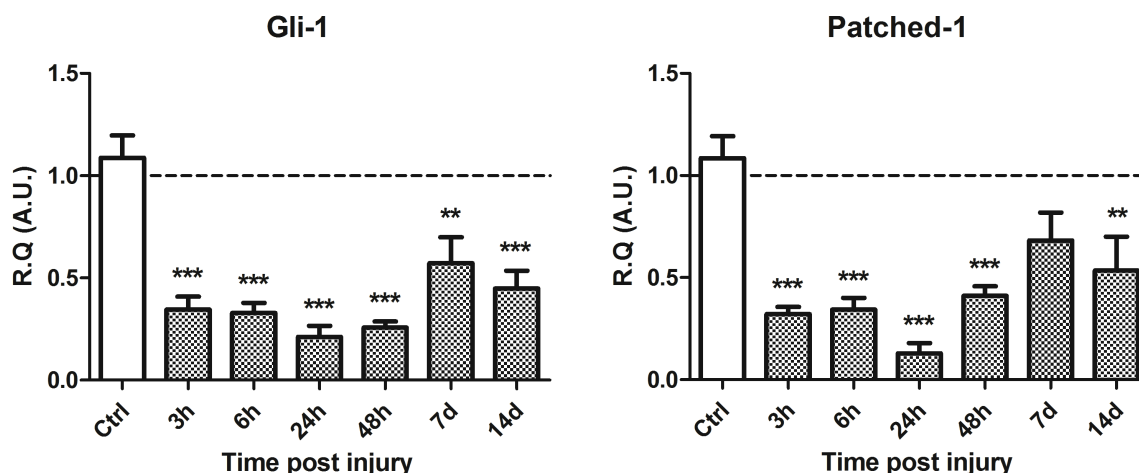


Figure II-23. La constriction chronique du nerf infra-orbitaire induit une altération précoce des ARNm des composants de la voie de signalisation Sonic Hedgehog. Les changements dans le temps des niveaux d'expression des ARNm de *Patched-1* et *Gli-1* ont été évalués dans les nerfs infra-orbitaires de rats après CCI ou *sham* (condition contrôle, Ctrl) par RT-PCR semi-quantitative. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de $n=5-10$ animaux pour chaque temps post-lésion. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni a été utilisée.

De la même façon, afin de confirmer l'importance fonctionnelle de l'inhibition de la voie SHH dans le développement de la neuropathie trigéminal post-CCI, des injections péri-neurales de cyclopamine ont été réalisées pendant 4 jours chez des rats naïfs, induisant des modifications moléculaires (expression des ARNm d'intérêt) et vasculaires (augmentation de la perméabilité vasculaire endoneurale, mesurée par extravasation de NaFlu) similaires à celles observées post-CCI du nerf infra-orbitaire (Figure II-24) et post-CCI du nerf sciatique (Figure II-22).

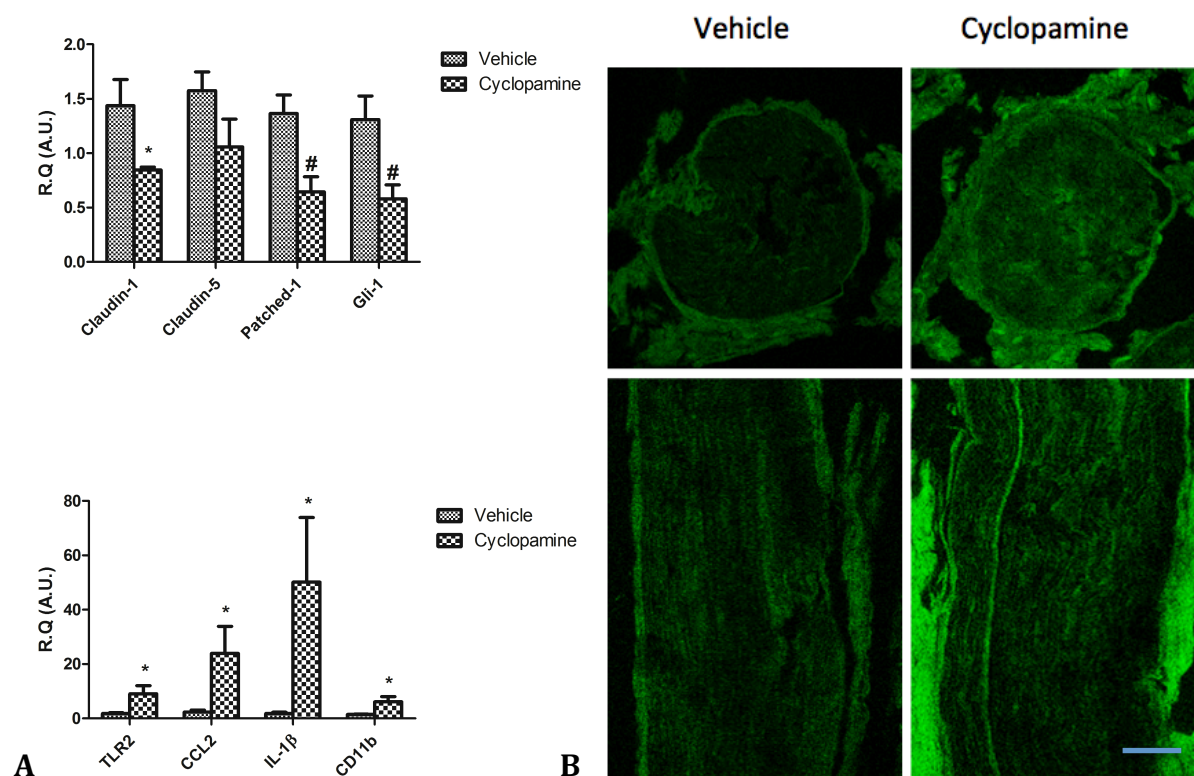


Figure II-24. L'inhibition locale de la voie de signalisation Sonic Hedgehog dans le nerf infra-orbitaire de rats naïfs réplique les altérations moléculaires et vasculaires observées après constriction chronique du nerf infra-orbitaire. Chez des animaux naïfs, sans exposer le nerf infra-orbitaire, de la cyclopamine (un antagoniste du récepteur *Smoothened* ; 300 μ M) ou son véhicule (Ethanol 100%) ont été injectés par voie transcutanée (50 μ L) à proximité du nerf infra-orbitaire une fois par jour pendant 4 jours. **A.** L'évaluation des niveaux d'expression des ARNm d'intérêt a été réalisée par RT-PCR semi-quantitative sur les nerfs infra-orbitaires injectés, 6 heures après la dernière injection. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de $n=4$ animaux par groupe. * $p<0,05$; t-test. **B.** De façon similaire, l'extravasation de fluorescéine sodique (NaFlu) dans le parenchyme du nerf infra-orbitaire des rats injectés était évaluée 6 heures après la dernière injection. Une immunofluorescence plus marquée de NaFlu dans l'endonèvre de coupes longitudinales (30 μ m d'épaisseur) de nerfs infra-orbitaires de rats injectés à la cyclopamine était observée comparativement aux rats injectés avec le véhicule, suggérant une augmentation de la perméabilité de la BHN (Barre d'échelle = 50 μ m).

Compte-tenu de l'importance fonctionnelle des voies de signalisation TLR4 et SHH dans la régulation de la perméabilité vasculaire endoneurale post-traumatique (i.e. post-constriction chronique du nerf sciatique ou infra-orbitaire), nous avons ensuite recherché si l'altération de la voie Sonic Hedgehog dans les cellules endothéliales endoneurales était nécessaire ou du moins contribuait aux changements induits par la stimulation TLR4 sur les protéines de jonctions serrées ou les marqueurs inflammatoires, *in vitro* et *in vivo*.

Des cellules hCMEC/D3 étaient incubées avec un agoniste du récepteur *Smoothened* Smo agonist (SAG, 0,1 μ M) pendant 24 heures puis exposées à du LPS (100 ng/mL). Malgré la stimulation tonique du récepteur *Smoothened*, la diminution d'expression des ARNm des protéines de jonctions serrées *Claudine-5* et *Occludine* était similaire à celle induite par la stimulation LPS seule, dans les cellules contrôles. A l'inverse, l'augmentation d'expression induite par le LPS des ARNm des marqueurs inflammatoires *TLR2* et *IL-1 β* était significativement atténuée dans les cellules ayant une signalisation *Smoothened* active (*TLR2* : $33,35 \pm 4,97$ vs $16,77 \pm 2,78$, $p < 0.01$; *IL-1 β* : $188,05 \pm 8,87$ vs $52,99 \pm 3,90$, $p < 0,001$; $n=5$ expériences ; dans les cellules contrôles exposées au LPS ou dans les cellules prétraitées au SAG exposées au LPS). Ces données suggèrent qu'*in vitro*, malgré des interactions entre les voies de signalisation *TLR4* et *SHH* précédemment montrées, l'activation *TLR4* et le blocage de la signalisation *SHH* avaient des effets similaires mais indépendants sur la régulation de la synthèse des protéines de jonctions serrées, bien qu'une signalisation *Hedgehog* active exerce un effet anti-inflammatoire (en accord avec les travaux d'Alvarez et al., 2011).

De façon intéressante, *in vivo*, ni le blocage du récepteur *TLR4* (injections préemptives péri-neurales de CLI-095 avant CCI) ni l'activation de la voie *SHH* (injections préemptives péri-neurales de SAG avant CCI) n'étaient capables de prévenir les altérations moléculaires et vasculaires résultant de la constriction chronique du nerf sciatique ou infra-orbitaire (données non présentées). L'impossibilité de maintenir une activation tonique de la voie *SHH* dans ces conditions expérimentales pourrait s'expliquer par la diminution majeure d'expression de l'ARNm du récepteur *Smoothened* après CCI (Figure II-20) qui pourrait traduire l'absence de récepteur *Smoothened* fonctionnel au niveau des cils primaires endothéliaux, la cible pharmacologique de l'agoniste de la voie *Hedgehog* SAG.

Au final, ces données pourraient suggérer l'implication d'une autre voie de signalisation impliquée dans les modifications moléculaires et vasculaires après constriction chronique nerveuse.

Nous avons alors envisagé l'implication d'une autre voie de signalisation morphogénétique dans l'altération de la perméabilité vasculaire endoneurale post-traumatique, la voie *Wnt/ β -caténine*, impliquée à la fois dans les phénomènes de perméabilité vasculaire physiologique et pathologique (Dejana, 2010) et dans le développement des douleurs neuropathiques post-traumatiques (Itokazu et al., 2014).

La voie Wnt/ β -caténine :

La voie Wnt est une voie morphogénétique majeure, impliquée dans le développement à l'instar de la voie Hedgehog mais également impliquée chez l'adulte dans de nombreux processus pathologiques (cancer, maladie d'Alzheimer, Schizophrénie, ostéoporose, vieillissement) (Clevers et Nusse, 2012). Elle joue notamment des rôles importants dans de nombreux mécanismes physiopathologiques du système nerveux (développement neuronal [induction neurale, prolifération cellulaire, migration neuronale], guidage axonal, douleurs neuropathiques, survie neuronale, arborisation dendritique, synaptogénèse) (Gao et al., 2015). Le génome humain comporte 19 gènes Wnt (répartis en 12 superfamilles Wnt). Les gènes Wnt sont retrouvés dans quasiment toutes les espèces animales (même les éponges) mais pas dans les organismes unicellulaires. Ainsi, ces gènes Wnt pourraient avoir joué un rôle évolutif clé dans l'apparition des organismes pluricellulaires (Clevers et Nusse, 2012).

La voie morphogénétique Wnt est une voie extrêmement complexe, impliquant au moins 3 voies de signalisation distinctes : la voie canonique β -caténine-dépendante et deux voies non canoniques, la voie Ca^{2+} dépendante et la voie *Planar Cell Polarity* (PCP)-dépendante (Figure II-25).

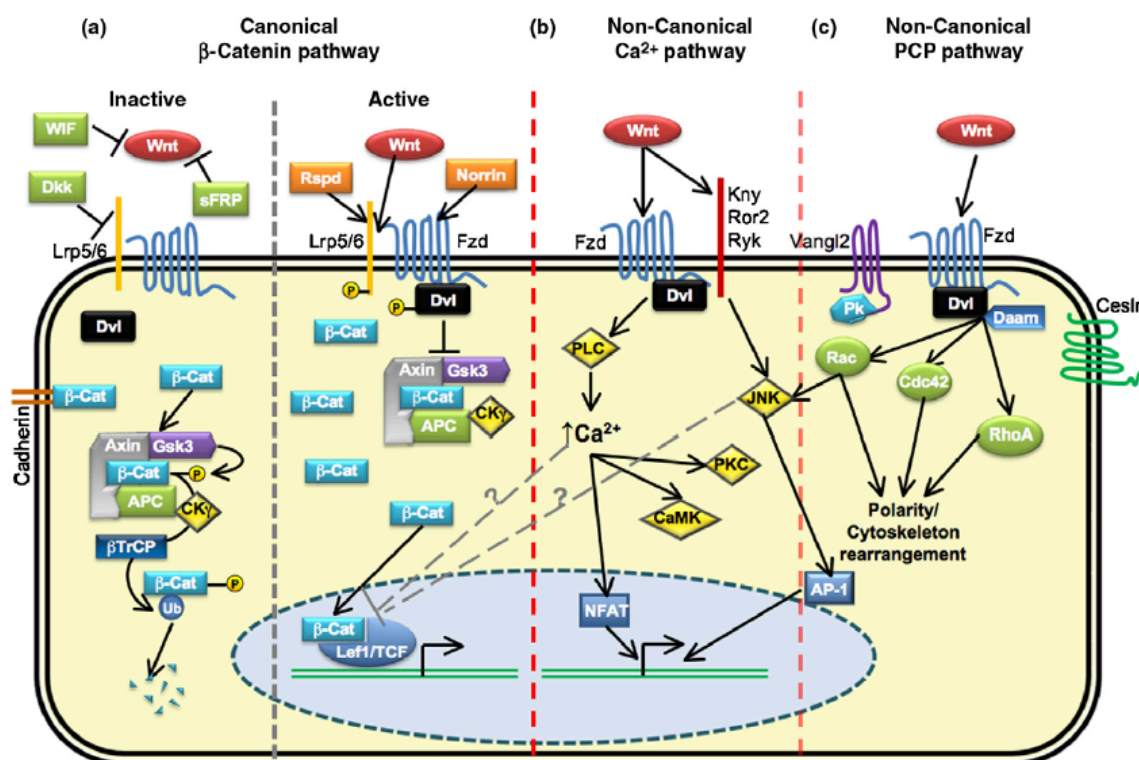


Figure II-25. Schéma récapitulatif des 3 voies de signalisation impliquées dans la signalisation Wnt. Schématiquement, ces voies de signalisation impliquent des protéines effectrices (Wnt) se fixant à des récepteurs *Frizzled* (Fzd) puis une transduction du signal impliquant la protéine β -caténine (voie canonique) ou une augmentation du calcium intracellulaire (voie non canonique Ca^{2+} -dépendante) ou un réarrangement du cytosquelette (voie non canonique *Planar Cell Polarity* [PCP]-dépendante) (d'après Franco et al., 2009).

Dans la voie canonique, le principal mode de signalisation de la voie Wnt, la protéine Wnt se fixe à un hétérodimère composé d'un récepteur *Frizzled* et d'une protéine *Low density lipoprotein receptor-related protein 5* ou 6 (LRP5/6). Une molécule Wnt peut lier plusieurs *Frizzled* et vice-versa. La transduction du signal se fait par le couple Axin/LRP6, suite à la phosphorylation de la queue de LRP6 par les kinases *Glycogen Synthase Kinase 3* (GSK3) ou Casein Kinase 1 γ (CK1 γ). La phosphorylation de LRP6 par Wnt induit une transduction stoechiométrique du signal plutôt que catalytique (titration progressive du régulateur négatif Axin) se traduisant par une inhibition progressive du complexe GSK3/APC/Axin, aussi appelé « complexe de destruction », qui en condition de « non stimulation » fixe la β -caténine et l'adresse au protéasome. L'activation de la voie canonique va donc se traduire par une accumulation cytoplasmique de β -caténine, qui va pouvoir pénétrer dans le noyau, se fixer à *T-cell Factor* (TCF) et induire la transcription de nombreux gènes. Inversement, au niveau nucléaire, en l'absence de stimulation Wnt le facteur TCF est fixé à la protéine Groucho pour empêcher la transcription génique (Figure II-26) (Kim et al., 2013).

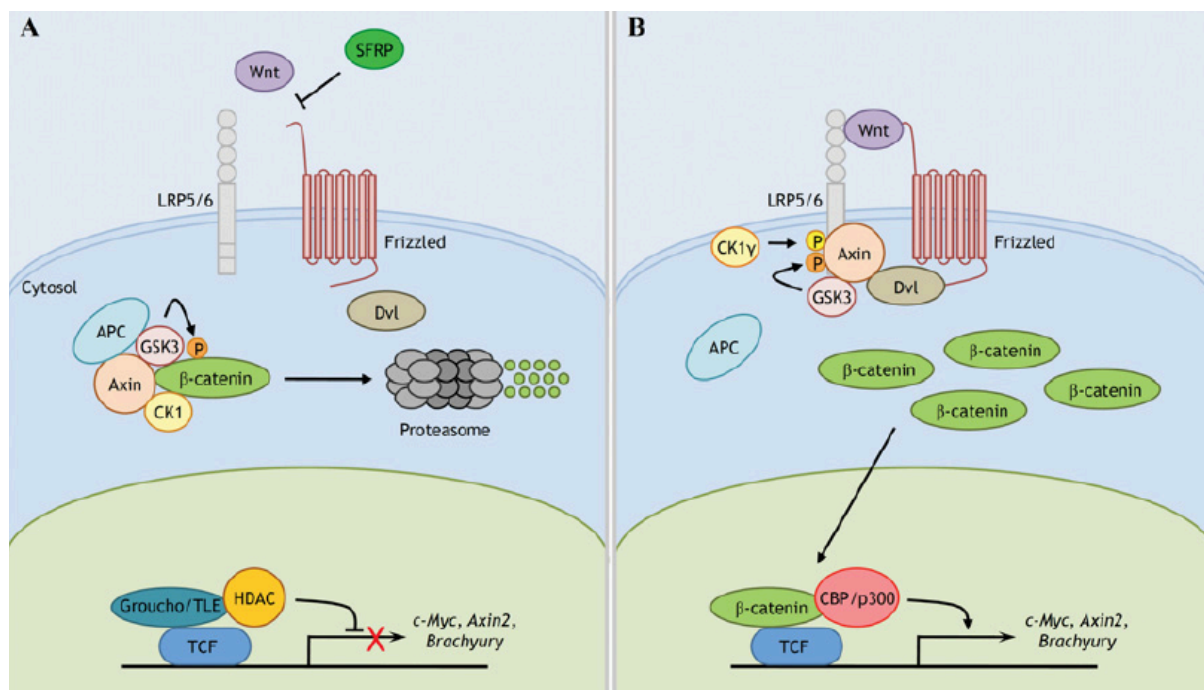


Figure II-26. Schéma récapitulatif de la voie canonique Wnt/ β -caténine. A. En l'absence de stimulation de la voie Wnt, la β -caténine est adressée au protéasome par le complexe de destruction (GSK3, APC, Axin, CK1) où elle est détruite. B. En présence d'une stimulation Wnt, le ligand Wnt va se fixer sur le récepteur Frizzled et inhiber l'action du complexe de destruction, favorisant ainsi l'accumulation cytoplasmique de β -caténine et sa translocation vers le noyau où elle se fixe au facteur TCF pour activer la transcription génique (d'après Kim et al., 2013).

En condition physiologique basale, il n'y a que peu de β -caténine cytoplasmique libre, la majorité étant liée à la partie intracellulaire des cadhérines (protéines de jonctions adhérentes) (Figure II-27). De fait, dans certaines conditions physiopathologiques, l'altération des jonctions adhérentes ou certains mécanismes régulateurs de la perméabilité vasculaire pourront induire une libération de la β -caténine membranaire, qui jouera son rôle de facteur de transcription, notamment dans la régulation de l'expression des protéines de jonctions serrées (*vide infra*).

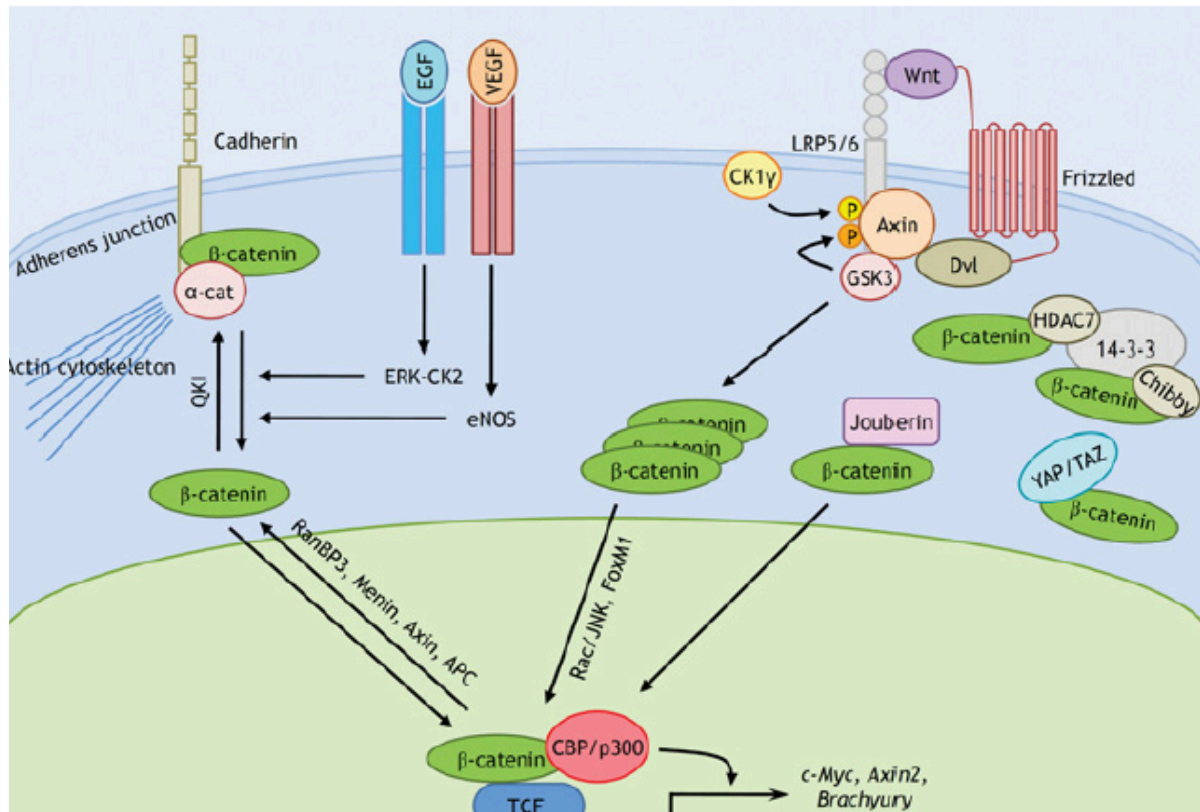


Figure II-27. Schéma récapitulatif des deux composantes principales de la signalisation canonique Wnt : les complexes récepteurs Frizzled/LRP 5/6 et les cadhérines membranaires. La signalisation canonique Wnt médiée par la protéine β -caténine peut provenir soit d'une activation du récepteur membranaire Frizzled (avec inhibition subséquente du complexe de destruction) soit d'une libération de la β -caténine liée aux cadhérines membranaires (notamment lors de l'altération de la structure des jonctions adhérentes) (d'après Kim et al., 2013).

Enfin, il est important de noter que la signalisation Wnt peut exister en l'absence de ligands, notamment dans les cas de mutations génétiques « gain de fonction » pour la β -caténine ou « perte de fonction » pour les protéines clés du « complexe de destruction » (APC, Axin, GSK3) se traduisant par l'accumulation de la β -caténine dans la cellule et son passage dans le noyau (Jamieson et al., 2012). De plus, dans certains contextes pathologiques notamment cancéreux, la β -caténine peut en plus être retenue dans le noyau via une boucle de feedback positif *Lymphoid enhancer-binding factor 1* (LEF-1)-dépendante : la β -caténine intranucléaire

se fixe à LEF-1 et va induire la transcription de nouvelles molécules de LEF-1 qui vont se fixer à leur tour à la β -caténine, la maintenant ainsi dans le noyau et favorisant son activité transcriptionnelle (Jamieson et al., 2012) (Figure II-28).

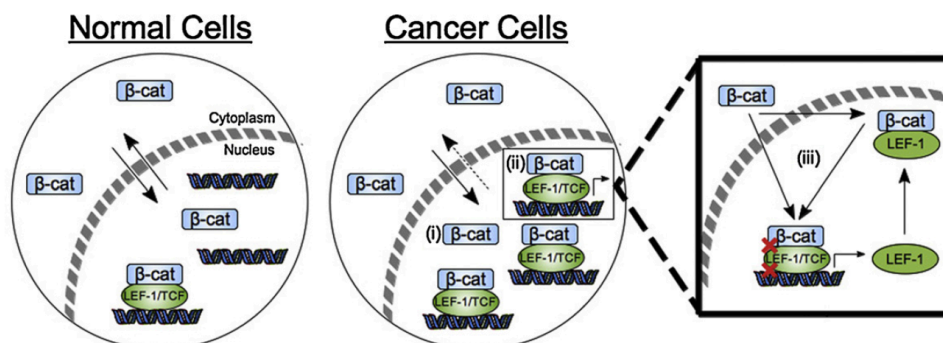


Figure II-28. Schéma récapitulatif du mécanisme de la séquestration LEF-1-dépendante de β -caténine dans les cellules cancéreuses. La β -caténine intra-nucléaire va se fixer à LEF-1/TCF et induire la synthèse nucléaire de nouvelles molécules de LEF-1, se fixant sur la β -caténine et la maintenant dans le noyau (d'après Jamieson et al., 2012).

Voie Wnt et douleurs neuropathiques :

Des études récentes ont montré le rôle de la voie Wnt dans la genèse des réponses inflammatoires dans le SNC via des modifications des cellules gliales (Marchetti et Pluchino, 2013), suggérant une implication potentielle de cette voie de signalisation dans le développement des douleurs neuropathiques (Itokazu et al., 2014).

Dans un modèle murin de ligature partielle du nerf sciatique (Itokazu et al., 2014), l'augmentation d'expression de la β -caténine au niveau de la corne dorsale spinale, associée à la surexpression de Wnt3a, un ligand prototypique activant la voie Wnt et la suppression de l'allodynie par un antagoniste de la voie Wnt (XAV939) ont suggéré l'implication de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine spinale dans le développement de la douleur neuropathique. De plus, l'injection intrathécale de Wnt3a recombinante suffisait à déclencher l'allodynie dans ce modèle. Enfin, l'administration de Wnt3a activait la libération microgliale de BDNF *in vitro* suggérant que la surexpression de Wnt3a dans la corne dorsale induise le développement du phénotype douloureux neuropathique via une activation microgliale.

D'autres études ont montré une surexpression de β -caténine et de Wnt3a dans la corne dorsale dans différents modèles de douleurs neuropathiques tels que la ligature du nerf spinal L5 (Shi et al., 2012) et le SN-CCI (Zhang et al., 2013) suggérant que l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans la moelle spinale est une caractéristique universelle de la physiopathologie des douleurs neuropathiques.

Zhang et al. (2013) ont ainsi montré que le CCI du nerf sciatique chez le rat activait la voie Wnt pouvant contribuer à la douleur neuropathique en régulant les cytokines pro-inflammatoires IL-18 et TNF α , le NR2B et certains signaux cellulaires calcium-dépendants subséquents dans la corne dorsale spinale (Zhang et al., 2013). Le CCI entraînait une activation rapide et prolongée de la voie Wnt/Fzd-8/ β -caténine dans les neurones de la corne dorsale et les astrocytes. Cependant, dans les neurones des GRD, les protéines Wnts pourraient fonctionner via le transport nucléaire de Fzd-8 ou d'autres voies de signalisation β -caténine-indépendantes. De plus, le blocage spinal de la voie Wnt inhibait la production et la persistance de la douleur neuropathique post-CCI sans affecter la sensibilité douloureuse normale ou l'activité locomotrice. Le blocage spinal de la signalisation Wnt inhibait également l'induction de c-Fos et l'activation des astrocytes et de la microglie tous induits par le CCI, ainsi que l'activation de NR2B et les signaux calcium-dépendants subséquents dans la corne dorsale. Ces résultats semblent confirmer l'importance de la voie Wnt3a/Fzd-8/ β -caténine après lésion nerveuse dans la transduction du signal et les altérations de la plasticité synaptique, essentielles à la sensibilisation centrale dans la moelle spinale (Zhang et al., 2013).

Simonetti et al. (2014) ont montré le rôle de la voie Wnt dans la modulation de la sensibilité des axones périphériques aux stimuli mécaniques et thermiques. Wnt5a est exprimé dans le GRD et présente une activité autocrine, alors que Wnt3a est un ligand abondant dans les tissus périphériques mais uniquement en contexte pathologique (inflammation, croissance tumorale...) jouant un rôle de modulation paracrine des neurones nociceptifs voisins, générant une hypersensibilité douloureuse. Par ailleurs, la voie PCP agissant via l'activation de JNK Rac-dépendante, était essentielle à l'hypersensibilité mécanique induite par la voie Wnt. Inversement, l'hypersensibilité thermique induite par Wnt3a semblait médiée par la voie non-canonique Ca²⁺ dépendante, via la CaMKII α et Src. De fait, le transport Src-dépendant de TRPV1 (canal cationique sensible à la chaleur) du pool cytoplasmique vers la membrane était associé à une hyperalgésie thermique liée à d'autres molécules sensibilisantes dont le NGF. Cette dichotomie de signalisation Wnt et d'hypersensibilité résultante pourrait traduire l'implication de différentes populations neuronales exprimant une voie préférentielle : les nocicepteurs liant IB4 associés à la nociception mécanique recruterait la voie Rac-JNK PCP-dépendante, alors que les nocicepteurs peptidergiques, associés à la nociception thermique, activeraient essentiellement la voie Src-TRPV1 (Simonetti et al., 2014).

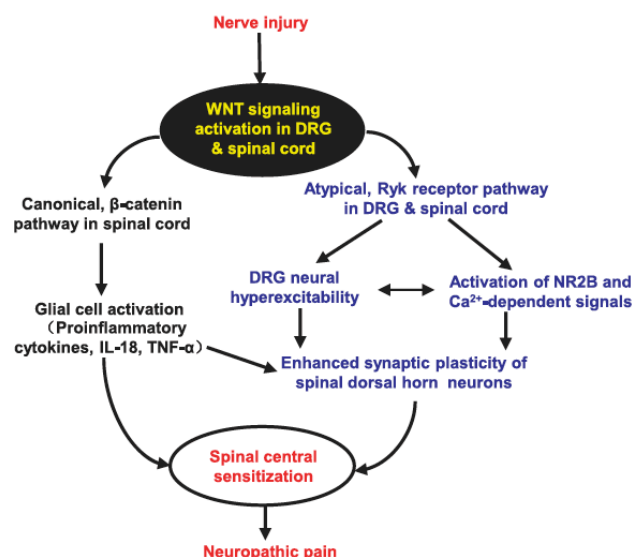
Wnt 5a, un régulateur important des cytokines pro-inflammatoires (incluant IL-1 β et TNF- α) serait surexprimé après CCI chez le rat, participant à la pathogénèse du modèle via la

surproduction de cytokines pro-inflammatoires. Wnt5a, du fait de son rôle dans la plasticité synaptique, pourrait contribuer à la genèse et la persistance des douleurs neuropathiques post-CCI (Wang et al., 2015).

Dans l'étude de Xu et al. (2015), le CCI du nerf sciatique induisait une augmentation de l'expression de TCF4 dans les neurones spinaux, dans la moelle spinale et le GRD, maximale à J7 et diminuant à J21. L'injection intrathécale d'un siRNA TCF4 diminuait de façon significative l'abaissement du seuil de retrait de patte induit par le CCI à J3 et J5 (comparativement à un siRNA non spécifique). Ainsi, le TCF4 pourrait être responsable du maintien de la douleur neuropathique post-CCI via la voie Wnt/ β -caténine (Xu et al., 2015).

Enfin, l'implication de la voie Wnt dans la douleur neuropathique pourrait impliquer une voie de signalisation intracellulaire atypique : la voie Wnt/Ryk (Figure II-29). Ryk est une protéine transmembranaire (à 1 domaine transmembranaire) avec un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase, récemment découvert comme un récepteur atypique de la voie Wnt. Il a été ainsi montré que le CCI chez le rat induisait une augmentation d'expression de Wnt3a, Wnt5b et Ryk dans le GRD et la moelle spinale. Inversement, le blocage spinal de la voie Wnt/Ryk inhibait l'induction et le maintien de l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique après CCI. La signalisation Wnt médiée par Ryk pourrait ainsi contribuer aux mécanismes sous-tendant les douleurs neuropathiques en régulant l'excitabilité des neurones des GRD et la transmission synaptique nociceptive dans la corne dorsale par la modulation intracellulaire de Ca^{2+} , l'activation du récepteur NR2B et les signaux sous-jacents Ca^{2+} dépendants (Liu et al., 2015).

Figure II-29. Schéma récapitulatif de l'implication de la voie Wnt/Ryk dans la genèse des douleurs neuropathiques (d'après Liu et al., 2015).



Voie Wnt et perméabilité vasculaire :

La voie Wnt est également impliquée dans la régulation de l'angiogenèse et de la perméabilité vasculaire dans de nombreux contextes physiopathologiques (Franco et al., 2009). Par sa protéine β -caténine interagissant avec la *Vascular Endothelial-cadherin* (VE-cadhérine), protéine majeure des jonctions adhérentes, la voie Wnt est de fait un effecteur clé de la régulation des phénomènes de perméabilité vasculaire endothéliale (Gavard, 2014).

Ferreira-Tojais et al. (2014) ont montré le rôle clé d'un récepteur de la voie Wnt, le récepteur Frizzled-7 (Fzd-7), dans la régulation de la perméabilité vasculaire. Ce récepteur est exprimé dans les cellules endothéliales et la diminution de son expression augmente l'étalement des cellules endothéliales et modifie le cytosquelette d'actine. Fzd-7 est un composant des jonctions adhérentes dans l'endothélium, participant via la voie Wnt/Fzd7 et les jonctions adhérentes à la régulation de l'intégrité de l'endothélium. La suppression de Fzd-7 mène à une altération majeure de la perméabilité vasculaire *in vitro* et *in vivo*, une altération de l'organisation des jonctions adhérentes, de l'expression de VE-cadhérine et de β -caténine (Ferreira-Tojais et al., 2014).

In vivo, Fzd-7 colocalise avec les complexes VE-cadhérine/ β -caténine, interagissant avec VE-cadhérine par ses domaines intracellulaires. Fzd-7 pourrait ainsi avoir un rôle dans la persistance des adhésions cellule-cellule dans l'endothélium. Par ailleurs, la signalisation Fzd-7 est essentielle pour l'intégrité vasculaire et le contrôle de la perméabilité vasculaire. La délétion de Fzd-7 induisait ainsi des dérégulations de plusieurs types de perméabilités vasculaires :

- 1) la perméabilité vasculaire basale des tissus normaux,
- 2) l'hyperperméabilité vasculaire aiguë en réponse au VEGF-A,
- 3) l'hyperperméabilité vasculaire chronique qui caractérise l'angiogenèse pathologique.

La délétion de Fzd-7 induisait également une disruption de l'organisation des jonctions adhérentes avec formation d'espaces entre les cellules endothéliales et une diminution de l'expression de VE-cadhérine et β -caténine au niveau de la jonction cellule-cellule. Ainsi, le contrôle de la perméabilité vasculaire liée à Fzd-7 serait sous la régulation de la voie canonique β -caténine-dépendante. Fzd-7 régulerait les taux intracellulaires des ARNm de *β -caténine*, affecterait l'activité de trans-activation de β -caténine et la fonction des jonctions adhérentes (Ferreira-Tojais et al., 2014).

Le rôle des cadhérines dans le contrôle de l'expression génique est associé à leur effet négatif sur la voie canonique Wnt, par un mécanisme impliquant la rétention de la β -caténine au niveau de la membrane plasmique en se fixant à des clusters de cadhérines, limitant ainsi le pool libre disponible pour la translocation nucléaire et la transcription génique (Figure II-29). L'endocytose de VE-cadhérine et son découplage des protéines associées aux caténines a été proposée comme mécanisme expliquant l'augmentation de la perméabilité vasculaire par le VEGF, en entraînant une disruption des adhésions endothéliales cellule-cellule (Gavard et Gutkind, 2006).

L'inhibition de l'expression de VE-cadhérine, ses propriétés adhésives ou sa disponibilité au niveau de la membrane plasmique pourrait provoquer une accumulation nucléaire de β -caténine et FoxO1 qui, se fixant sur la région promotrice de claudine-5, vont entraîner l'inhibition de la transcription de claudine-5. Ainsi, alors qu'une stimulation VEGF aiguë pourrait induire une augmentation réversible de la perméabilité vasculaire par une disruption réversible de l'adhésion VE-cadhérine et subséquemment la désorganisation des jonctions serrées, l'exposition chronique au VEGF ou à un autre facteur pro-perméabilisant pourrait à l'inverse sévèrement affecter la barrière endothéliale, du fait d'un turnover et d'une expression de claudine-5 tous deux compromis en l'absence d'une adhésion VE-cadhérine fonctionnelle (Gavard et Gutkind, 2008).

En dehors du VEGF, les radicaux libres de l'oxygène (RLO) peuvent également augmenter la perméabilité vasculaire par un mécanisme Rac-dépendent, associée à la perte des jonctions endothéliales cellule-cellule. Les RLO pourraient altérer le fonctionnement endothélial par une action précoce sur l'adhésion VE-cadhérine via la signalisation Rac, puis plus tardivement par une diminution de l'expression de claudine-5 (Gavard et Gutkind, 2008).

Compte-tenu du rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans le développement des douleurs neuropathiques et dans la régulation de la perméabilité vasculaire, nous avons étudié son implication dans les altérations de la perméabilité vasculaire post-traumatique, dans le modèle de constriction chronique du nerf infra-orbitaire. Ce modèle a été choisi préférentiellement afin de circonvenir les limitations intrinsèques du modèle de constriction chronique du nerf sciatique (Geuna, 2015) et faciliter l'analyse des altérations des marqueurs de la voie Wnt/ β -caténine, tant dans la régulation de la perméabilité de la BHN que dans leur implication potentielle dans la transition phénotypique entre neurite et neuropathie.

Nous avons d'abord exploré les niveaux d'expression des ARNm clés du complexe de jonction adhérente *Fzd-7/VE-cadhérine/β-caténine* après CCI du nerf infra-orbitaire (IoN-CCI), en nous limitant aux deux premières semaines post-lésionnelles (correspondant aux « évènements précoces » du modèle initial de Vos et al., 1994).

Après IoN-CCI, une diminution significative de l'expression des ARNm de *Fzd-7* était observée entre 3 heures et 48 heures post-CCI associée à une diminution significative de l'expression de l'ARNm de *VE-cadhérine* à 24 heures post-CCI (Figure II-30).

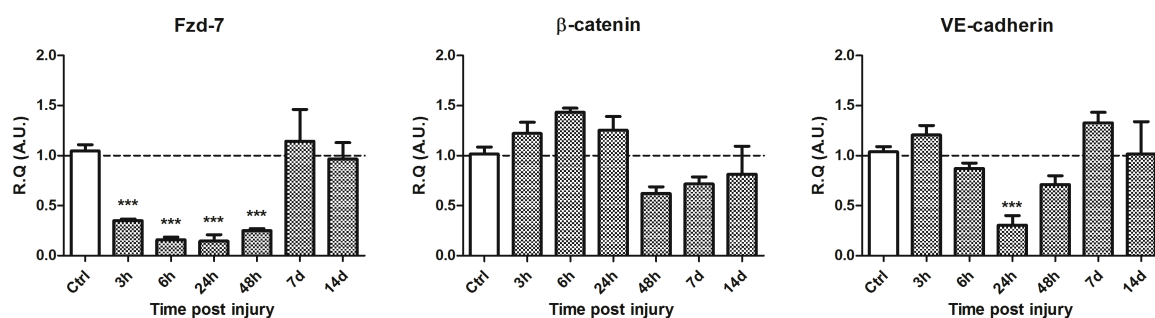


Figure II-30. La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire induit une diminution précoce et transitoire de l'expression des ARNm de *Fzd-7* et *VE-cadhérine* dans le nerf infra-orbitaire lésé. Les changements dans le temps des niveaux d'expression des ARNm de *Fzd-7*, *β-caténine* et *VE-cadhérine* ont été évalués dans les nerfs infra-orbitaires de rats après CCI ou *sham* (condition contrôle, Ctrl) par RT-PCR semi-quantitative. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de $n=5-8$ animaux pour chaque temps post-lésion ; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni ont été utilisés.

Par ailleurs, ainsi que l'indique la Figure II-31, une accumulation de matériel immunoréactif *Fzd-7-like* (vert) était également observée en microscopie confocale à fluorescence dans des coupes longitudinales de nerfs infra-orbitaires de rats après CCI ou *sham* (à 24 heures post-lésion, le temps post-opératoire correspondant aux niveaux d'expression des ARNm de *Fzd-7* et *VE-cadhérine* les plus faibles). Ce matériel immunoréactif colocalisait avec les cellules endoneurales marquées au Reca-1 (rouge) confirmant l'expression endothéliale endoneurale du récepteur dans nos conditions expérimentales. De plus, l'immunoréactivité *Fzd-7* était visiblement moindre dans la condition CCI (à 24 heures post-CCI) qu'en condition contrôle (*sham*).

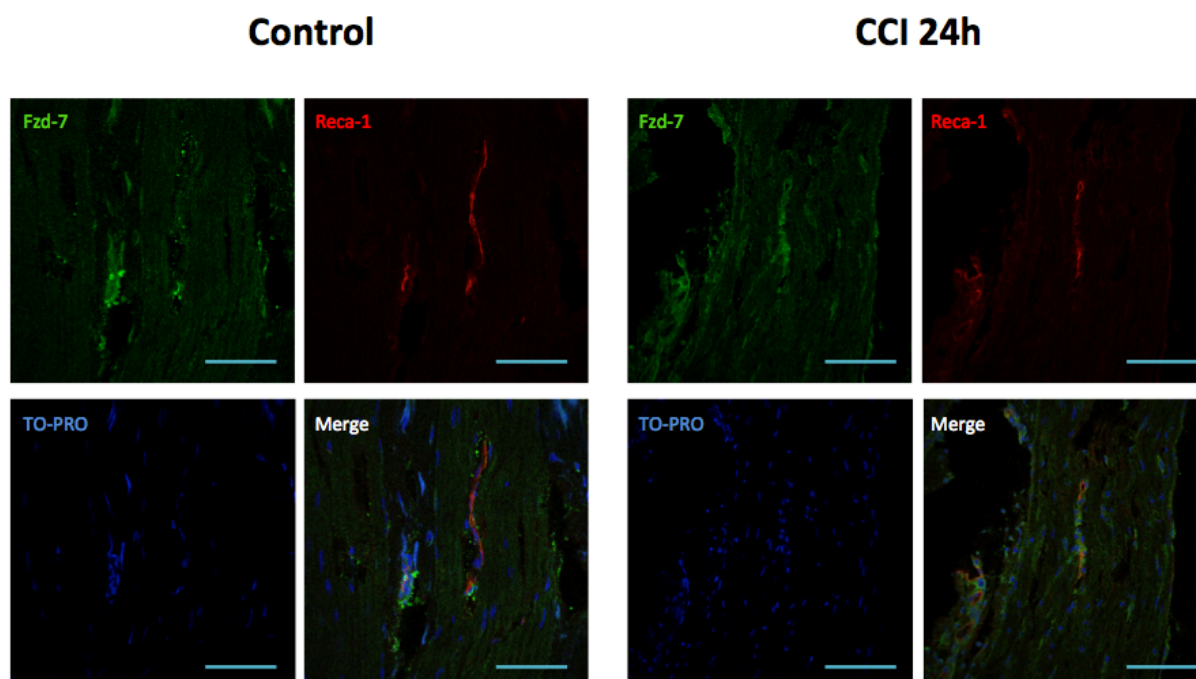


Figure II-31. *La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire induit une diminution de l'immunoréactivité Fzd-7 dans les micro-vaisseaux endoneuraux comparativement à la condition contrôle (animaux sham) à 24 heures post-CCI dans des coupes longitudinales de nerf infra-orbitaire lésé.* Comparativement au *sham*, à 24 heures post-CCI l'immunoréactivité pour Frizzled-7 (Fzd-7) observée sur des coupes longitudinales de nerf infra-orbitaire (centrées autour d'un micro-vaisseau endoneural) était fortement diminuée dans les cellules endothéliales (marquées au Reca-1). Par ailleurs, aucune immunoréactivité Frizzled-7 n'était observée en dehors des cellules endothéliales marquées au Reca-1. Des coupes longitudinales de nerf infra-orbitaire de rats CCI et *sham* fixées au PAF 4% étaient incubées avec du TO-PRO (marqueur nucléaire, bleu), un anticorps anti-Reca 1 (marqueur endothélial, rouge) et un anticorps anti-Frizzled-7 (vert) (Barre d'échelle = 10 μ m).

Ceci fut confirmé dans des coupes axiales centrées sur des micro-vaisseaux endoneuraux, où l'immunoréactivité Fzd-7 était également plus faible en condition CCI que contrôle (à 24 heures post-lésion) (Figure II-32).

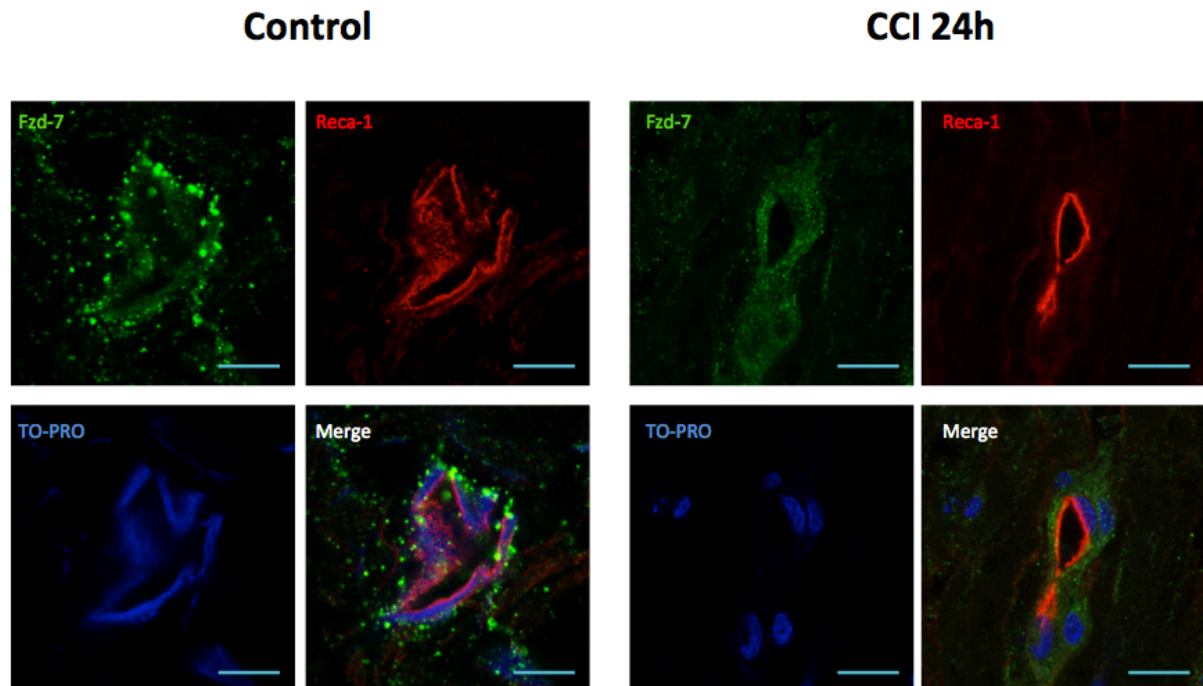


Figure II-32. *La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire induit une diminution de l'immunoréactivité Fzd-7 dans les micro-vaisseaux endoneuraux comparativement à la condition contrôle (animaux sham) à 24 heures post-CCI dans des coupes axiales de nerf infra-orbitaire lésé.* Comparativement au *sham*, à 24 heures post-CCI l'immunoréactivité pour Frizzled-7 (Fzd-7) observée sur des coupes axiales de nerf infra-orbitaire (centrées autour d'un micro-vaisseau endoneural) était fortement diminuée dans les cellules endothéliales (marquées au Reca-1). Par ailleurs, aucune immunoréactivité Frizzled-7 n'était observée en dehors des cellules endothéliales marquées au Reca-1. Des coupes axiales de nerf infra-orbitaire de rats CCI et *sham* fixées au PAF 4% étaient incubées avec du TO-PRO (marqueur nucléaire, bleu), un anticorps anti-Reca 1 (marqueur endothélial, rouge) et un anticorps anti-Frizzled-7 (vert) (Barre d'échelle = 10 μ m).

Des altérations similaires de l'immunoréactivité VE-cadhérine étaient observées en condition CCI comparativement à la condition contrôle (*sham*) à 24-heures post-lésion, en utilisant la même méthodologie que précédemment (Figure II-33).

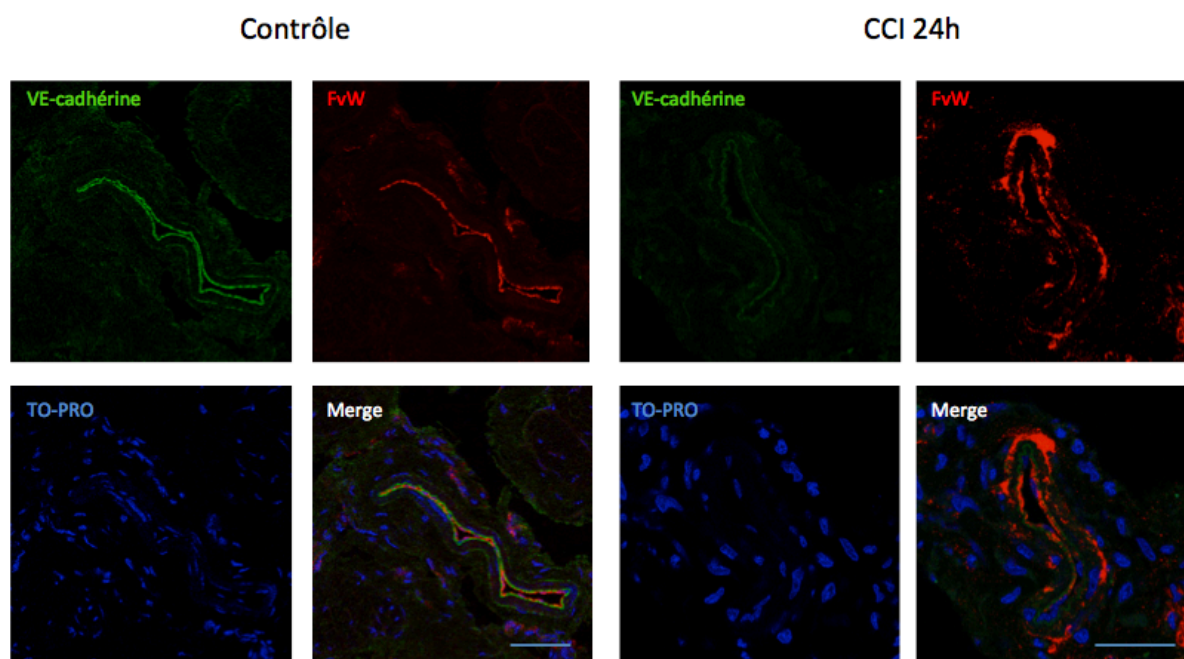


Figure II-33. *La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire induit une diminution de l'immunoréactivité VE-cadhérine dans les micro-vaisseaux endoneuraux comparativement à la condition contrôle (animaux sham) à 24 heures post-CCI dans des coupes axiales de nerf infra-orbitaire lésé.* Comparativement au *sham*, à 24 heures post-CCI l'immunoréactivité pour VE-cadhérine (vert) observée sur des coupes axiales de nerf infra-orbitaire (centrées autour d'un micro-vaisseau endoneural) était fortement diminuée dans les cellules endothéliales (marquées au facteur de von Willebrand, FvW). Des coupes axiales de nerf infra-orbitaire de rats CCI et *sham* fixées au PAF 4% étaient incubées avec du TO-PRO (marqueur nucléaire, bleu), un anticorps anti-FvW (facteur de von Willebrand, marqueur endothélial, rouge) et un anticorps anti-VE-cadhérine (vert) (Barre d'échelle = 20 μ m).

Ces résultats suggèrent une diminution de la synthèse endothéliale endoneurale de Fzd-7 et VE-cadhérine dans les nerfs infra-orbitaires à 24 heures post-CCI.

Dans l'étude de Ferreira-Tojais et al. (2014), l'absence d'expression de Fzd-7 dans des souris KO était responsable de la désorganisation des jonctions adhérentes endothéliales, se traduisant par la séparation et l'espacement de cellules endothéliales adjacentes mais également par une diminution d'expression de VE-cadhérine et Claudine-5 (Ferreira-Tojais et al., 2014), retrouvée également dans d'autres études (Gavard et Gutkind, 2008 ; Taddei et al., 2008).

Ainsi, compte-tenu de la diminution d'expression de Claudine-5 après IoN-CCI également observée (Figure II-12), l'ensemble de ces résultats suggèrent une altération significative de l'architecture des jonctions adhérentes et serrées dans les micro-vaisseaux endoneuraux de nerfs infra-orbitaires après constriction nerveuse chronique.

Bien que ces altérations n'aient pas été étudiées directement dans le modèle de CCI du nerf sciatique dans le présent travail, il est probable que des mécanismes similaires existent dans ce modèle (tel que suggéré par des données préliminaires d'évaluation des niveaux d'expression des ARNm de *Fzd-7* et *VE-cadhérine* dans le nerf sciatique après CCI, étudiés aux mêmes temps post-lésion [Figure II-34]).

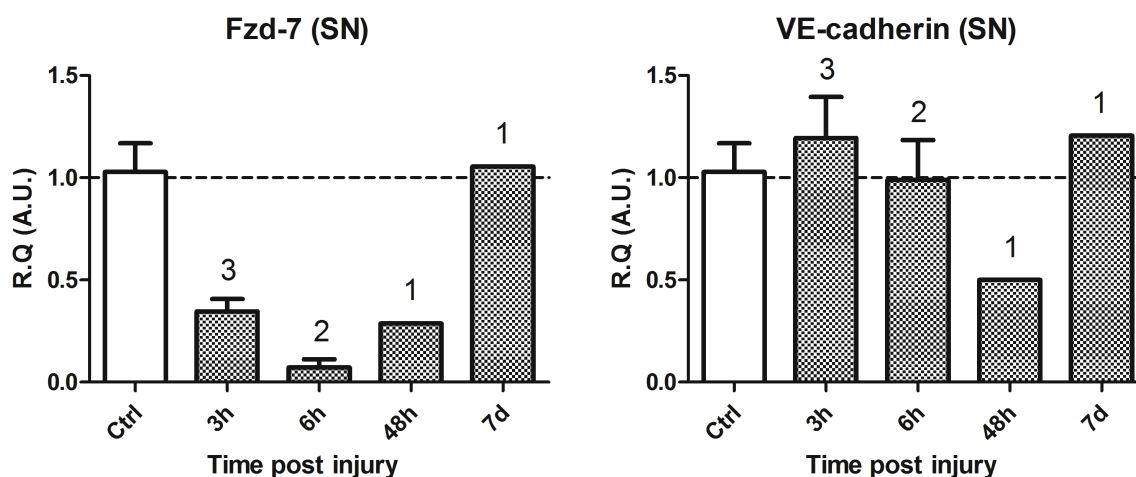


Figure II-34. Données préliminaires sur les altérations des niveaux d'expression des ARNm des marqueurs *Fzd-7* et *VE-cadhérine* dans le nerf sciatique de rats après CCI. Les changements dans le temps des niveaux d'expression des ARNm de *Fzd-7* et *VE-cadhérine* ont été évalués dans les nerfs sciatiques de rats après CCI ou *sham* (condition contrôle, Ctrl) par RT-PCR semi-quantitative. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de n animaux (le n figurant sur chaque histogramme) pour chaque temps post-lésion.

Afin d'élucider les mécanismes impliqués dans l'altération des jonctions adhérentes des micro-vaisseaux endoneuraux et l'augmentation de perméabilité vasculaire qui en résulte, nous avons étudié l'implication potentielle du VEGF-A, un facteur pro-perméabilisant agissant par phosphorylation et internalisation de la VE-cadhérine, induisant une dissociation subséquente de la β -caténine associée (Gavard, 2009), permettant ainsi sa translocation dans le noyau et l'inhibition de l'activité du promoteur de la claudine-5 (Gavard et Gutkind, 2008).

Après IoN-CCI, une augmentation significative d'expression de l'ARNm de *VEGF-A* était observée à 24 heures post-CCI, suivie d'une diminution significative d'expression entre 48 heures et 7 jours post-CCI. Par ailleurs, une augmentation de la synthèse de la protéine VEGF-A dans le nerf infra-orbitaire était observée entre 6 heures et 48 heures (statistiquement significative à 48 heures) (Figure II-35).

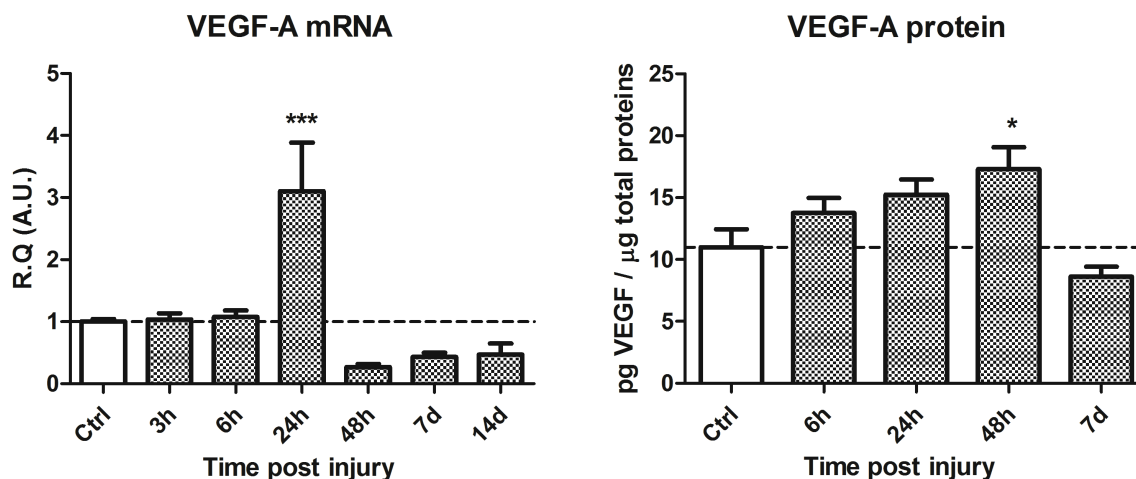


Figure II-35. La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire induit une augmentation transitoire d'expression de l'ARNm de VEGF-A à 24 heures post-CCI (figure de gauche) associée à une augmentation significative de la synthèse de la protéine VEGF-A dans le nerf infra-orbitaire à 48 heures post-CCI. Les changements dans le temps des niveaux d'expression de l'ARNm de VEGF-A ont été évalués dans les nerfs infra-orbitaires de rats après CCI ou *sham* (condition contrôle, Ctrl) par RT-PCR semi-quantitative. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de $n=5-8$ animaux pour chaque temps post-lésion ; * $p<0,05$, *** $p<0,001$. Une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni a été utilisée. Les changements dans le temps des taux de synthèse protéique de VEGF-A chez des rats après IoN-CCI (comparativement aux rats *sham*) ont également été évalués, à l'aide d'une technique *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) spécifique. Données présentées sous la forme du ratio entre la quantité de protéine VEGF-A (en pg) sur la quantité de protéines totales (en μ g). Chaque histogramme correspond à $n=3$ rats pour chaque temps post-opératoire ; * $p<0,05$, Une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni a été utilisée.

L'augmentation des taux de l'ARNm de VEGF-A coïncidait avec les plus faibles niveaux d'expression de VE-cadhérine et Fzd-7 (i.e. à 24 heures post-CCI), en cohérence avec une diminution d'expression de VE-cadhérine VEGF-dépendante (Gavard et Gutkind, 2006).

Afin de confirmer l'implication de la voie Wnt/ β -caténine dans l'augmentation de perméabilité vasculaire après IoN-CCI, nous avons recherché si la signalisation Wnt pouvait moduler les niveaux d'expression des ARNm des marqueurs clés du complexe de jonction adhérente *in vitro*, dans des cellules humaines cérébrales microvasculaires (hCMEC/D3).

L'imagerie en microscopie confocale à fluorescence de cellules hCMEC/D3 confluentes indiquait l'accumulation cytoplasmique de matériel immunoréactif *Fzd-7-like* (vert) en association avec une immunofluorescence membranaire de β -caténine (rouge) en conditions basales (Figure II-36), confirmant la présence de Fzd-7 dans cette lignée de cellules endothéliales.

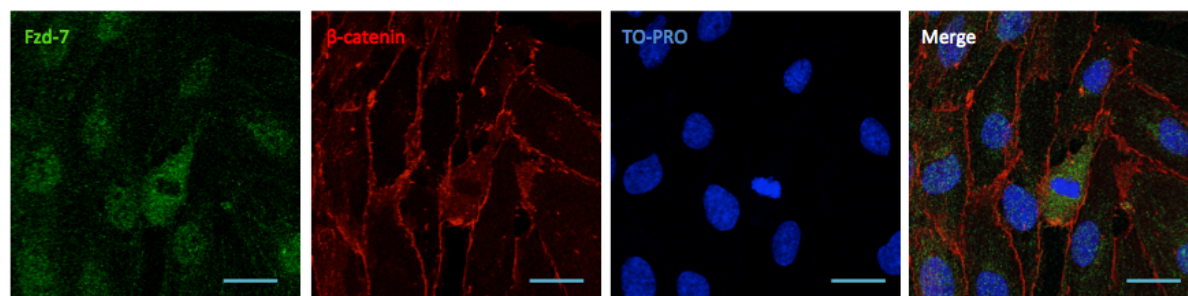


Figure II-36. Le récepteur *Frizzled-7* est bien exprimé dans les cellules endothéliales hCMEC/D3 in vitro. La présence du récepteur *Frizzled-7* (Fzd-7) dans les cellules hCMEC/D3 in vitro était évaluée par immunomarquage de *Frizzled-7*, β -caténine et TO-PRO observé en microscopie confocale à fluorescence. Des cellules hCMEC/D3 fixées avec du PAF 4% étaient incubées avec des anticorps anti-*Frizzled-7* (vert), anti- β -caténine (utilisé ici comme marqueur de membrane cellulaire, rouge) et TO-PRO (marqueur nucléaire, bleu) (barre d'échelle = 20 μ m).

In vitro, l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (en utilisant le Wnt Agonist I ; 5 μ M) n'induisait pas de modifications significatives d'expression des ARNm étudiés, alors que l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine (en utilisant le PKF 118-310 ; 2 μ M) induisait une diminution significative d'expression de l'ARNm de β -caténine (Figure II-37). Par ailleurs, une différence significative d'expression des ARNm de *frizzled-7* et *VE-cadhérine* était observée dans les cellules traitées par l'agoniste Wnt par rapport à celles traitées par l'antagoniste Wnt.

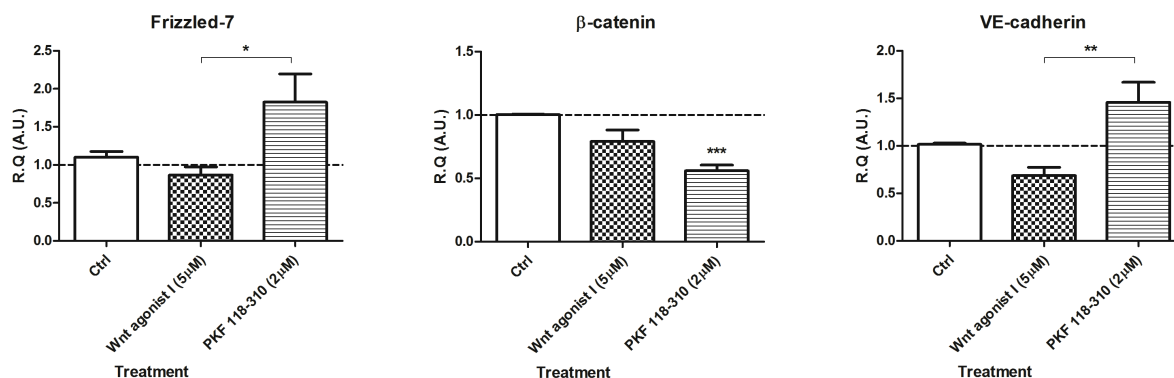


Figure II-37. *In vitro*, dans les cellules hCMEC/D3, la modulation de la voie Wnt/β-caténine induit des changements significatifs des niveaux d'expression des ARNm du complexe VE-cadhérine/β-caténine/fzd-7.

Les changements des niveaux d'expression des ARNm de *frizzled-7*, *β-caténine* et *VE-cadhérine* ont été évalués *in vitro* après stimulation par le Wnt agonist I (5 μM ; agoniste de la voie Wnt) ou par le PKF 118-310 (2 μM ; antagoniste de la voie Wnt) comparativement aux cellules contrôles, par RT-PCR semi-quantitative. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne ± erreur-type de la moyenne de n=4 expériences pour chaque condition ; *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001. Une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni a été utilisée.

Ces résultats suggèrent que la voie Wnt/β-caténine pourrait moduler les niveaux d'expression des ARNm du complexe *VE-cadhérine/fzd-7/β-caténine in vitro*.

c. Interactions signalétiques entre les voies TLR, SHH et Wnt/β-caténine

Des études précédentes investigant les interactions entre VE-cadhérine et Claudine-5 suggèrent d'étroites interactions entre les protéines des jonctions adhérentes et les protéines des jonctions serrées dans la régulation de la perméabilité vasculaire (Gavard et Gutkind, 2008 ; Taddei et al., 2008).

Nous avons donc étudié l'hypothèse d'une implication de la voie Wnt/β-caténine dans la régulation des niveaux d'expression des protéines de jonctions serrées, notamment via des interactions avec les voies SHH ou TLR4, dont nous avons précédemment montré le rôle dans la régulation de l'expression des protéines de jonctions serrées (Figures II-16, II-18, II-22, II-24).

In vitro, dans les cellules hCMEC/D3, l'activation de la voie Wnt se traduisait par une diminution significative des ARNm des effecteurs clés de la voie Hedgehog, i.e. *patched-1* et *gli-1* (Figure II-38).

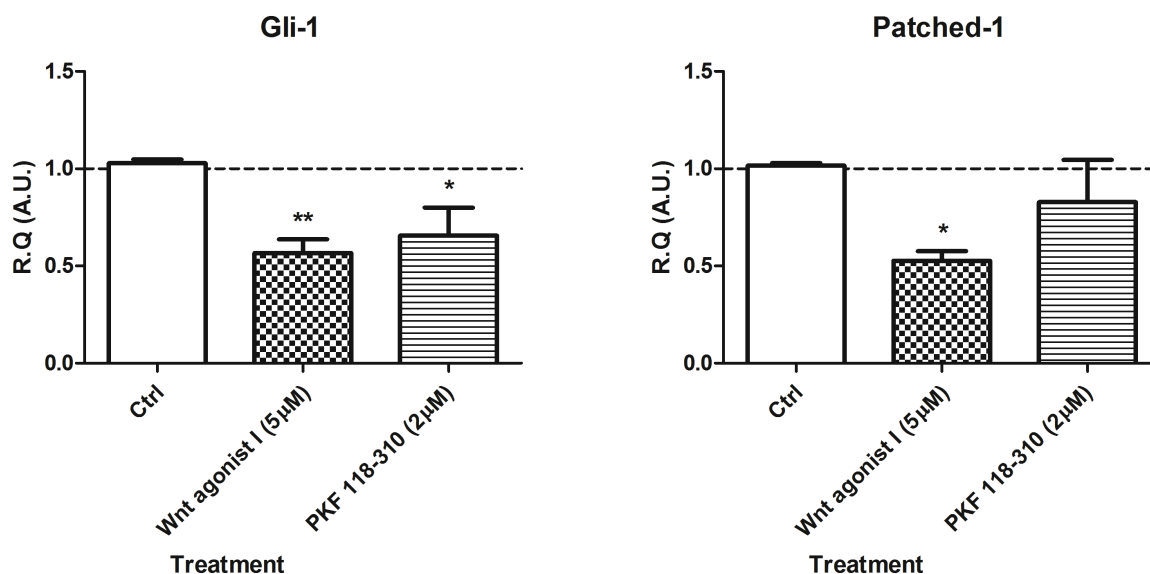


Figure II-38. *In vitro*, dans les cellules hCMEC/D3, l'activation de la voie Wnt/ β -caténine induit une diminution significative des niveaux d'expression des ARNm des effecteurs clés de la voie Hedgehog. Les changements des niveaux d'expression des ARNm de *patched-1* et *gli-1* ont été évalués *in vitro* après stimulation par le Wnt agonist I (5 μ M ; agoniste de la voie Wnt) ou par le PKF 118-310 (2 μ M ; antagoniste de la voie Wnt) par RT-PCR semi-quantitative. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de n=4 expériences pour chaque condition ; *p<0,05 ; **p<0,01. Une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni a été utilisée.

De plus, après prétraitement par du LPS (un agoniste TLR4), une accumulation nucléaire et péri-nucléaire de matériel immunoréactif β -caténine-like (vert) était observée en microscopie confocale à fluorescence dans les cellules hCMEC/D3 (Figure II-39) suggérant une activation de la voie Wnt/ β -caténine (Clevers et Nusse, 2012) après stimulation de la voie TLR4, conformément aux données de la littérature (Jang et al., 2014 ; *vide infra*).

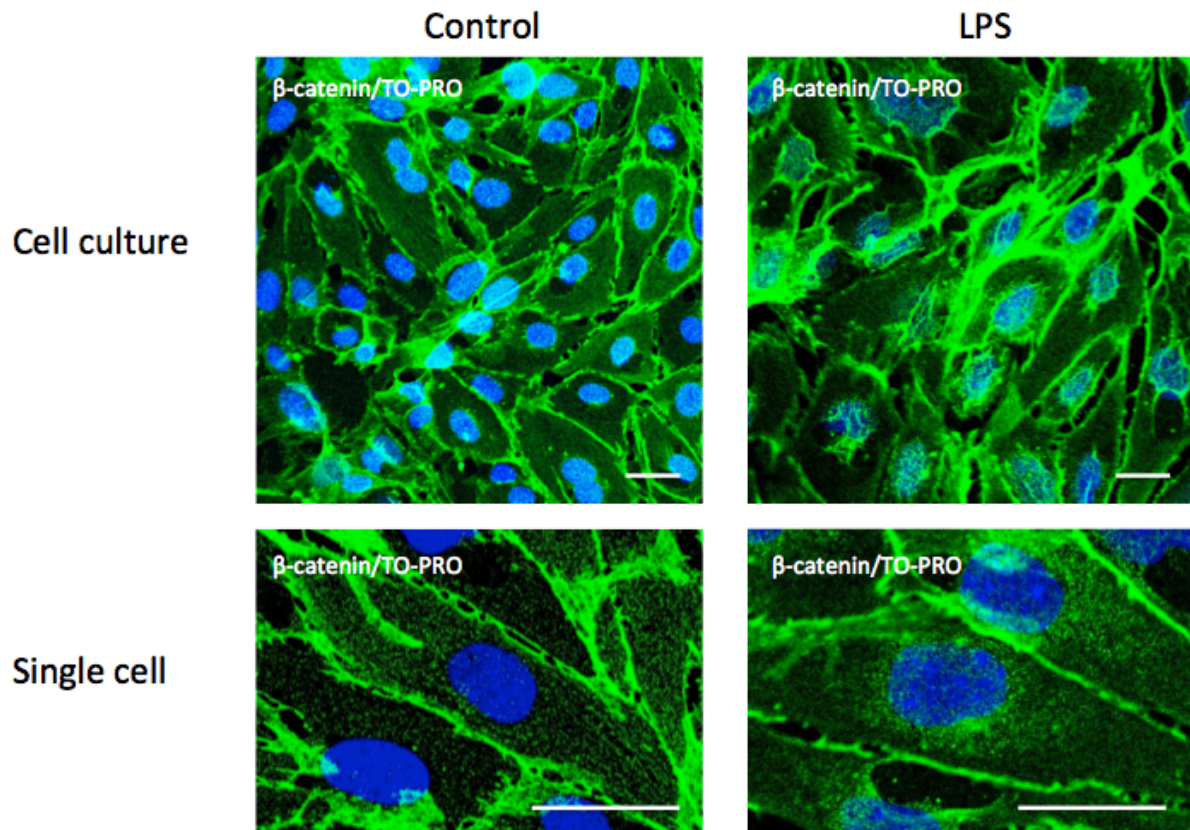


Figure II-39. In vitro, dans les cellules hCMEC/D3, la stimulation TLR4 induit une activation de la voie Wnt. *In vitro*, dans les cellules endothéliales hCMEC/D3 incubées avec du LPS (agoniste TLR4), une augmentation de l'immunoréactivité β -caténine était observée en microscopie confocale à fluorescence, au niveau de la membrane cellulaire et dans les régions nucléaires et péri-nucléaires des cellules, comparativement aux cellules contrôles, suggérant une activation de la voie Wnt par le LPS. Des cellules hCMEC/D3 fixées au PAF 4% ont été incubées avec des anticorps anti- β -caténine (vert) et du TO-PRO (marqueur nucléaire, bleu) (barre d'échelle = 30 μ m).

Pour confirmer ces résultats, nous avons ensuite étudié si l'inhibition de la voie Wnt (via l'utilisation de PKF 118-310 ; 2 μ M) pouvait prévenir les altérations moléculaires observées après stimulation TLR4 (LPS ; 200 ng/mL).

In vitro, le traitement par PKF 118-310 prévenait effectivement les altérations moléculaires induites par la stimulation LPS, telles que l'ARNm de la protéine de jonction *claudine-5*, du marqueur de la voie Sonic Hedgehog *gli-1* et le marqueur de la voie de l'immunité innée *TLR2* (Figure II-40).

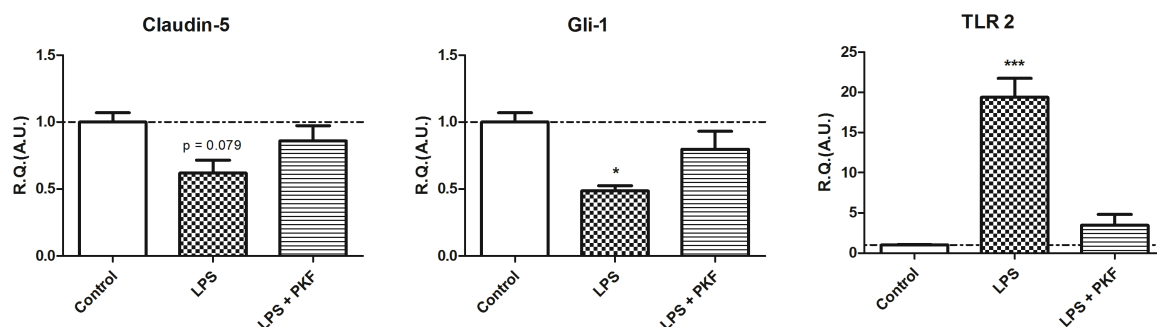


Figure II-40. In vitro, dans les cellules hCMEC/D3, les altérations moléculaires TLR4-dépendantes sont médiées par une signalisation Wnt active. Les changements des niveaux d'expression des ARNm de *claudine-5*, *gli-1* et *TLR2* ont été évalués *in vitro* après stimulation par le LPS (200 ng/mL) ou après prétraitement par le PKF 118-310 (2 μ M ; antagoniste de la voie Wnt) puis stimulation par le LPS (200 ng/mL), par RT-PCR semi-quantitative. Dans ces conditions, le prétraitement au PKF 118-310 atténue fortement les changements des niveaux d'expression des ARNm des 3 marqueurs, suggérant que les altérations moléculaires TLR4-dépendantes (i.e. médiées par le traitement LPS) sont médiées par une signalisation Wnt active. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de n=4 expériences pour chaque condition ; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni a été utilisée.

Globalement, ces résultats indiquent que la voie Wnt/ β -caténine pourrait médier l'interaction signalétique entre l'activation TLR4 et l'inhibition de la voie SHH tel que suggéré dans nos précédents résultats (Figure II-18). De plus, la signalisation Wnt active pourrait être responsable des altérations moléculaires (telles que la diminution d'expression des protéines de jonctions serrées) observées après challenge inflammatoire (LPS).

Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui suggèrent des interactions signalétiques complexes entre les voies Wnt, Hedgehog et TLR4 dans différents contextes physiopathologiques (Tableau II-5).

Données de la littérature sur les interactions entre les voies Wnt, Hedgehog et TLR4 (liste non exhaustive)		
Référence	Interaction	Modèle/contexte clinique
<i>Interactions SHH/Wnt</i>		
Mullor et al., 2001	L'activation de Gli-1 se traduit par la transcription de multiples effecteurs de la voie Wnt.	Modèle de cancérogénèse chez la grenouille
He et al., 2006	L'activation de la voie Hedgehog induit une importante expression Gli-1-dépendante de <i>secreted Frizzled Related Peptide-1</i> (SFRP-1) induisant une inhibition de la voie Wnt.	Cellules gastriques cancéreuses humaines
Takahashi-Yanaga, 2013	En l'absence de signalisation Hedgehog, GSK3 (en plus de PKA et CK-1) phosphoryle Gli-1 et Gli-2 entraînant leur dégradation. Ces kinases sont inhibées par une signalisation Hedgehog active. L'activation de GSK3 induit donc une inhibition de la voie Hedgehog.	*/*
Winkler et al., 2014	La voie canonique Wnt active la voie SHH dans les disques intervertébraux de souris pendant le développement. Par la suite, la voie SHH activée inhibe la voie Wnt par un feedback négatif. Ces deux voies gardent les mêmes voies signalétiques lorsqu'elles sont réactivées à l'âge adulte.	Disques intervertébraux de souris durant le développement et à l'âge adulte
Giakoustidis et al., 2015	La signalisation Hedgehog a un effet inhibiteur sur la prolifération de l'épithélium intestinal via un effet négatif sur la voie canonique Wnt.	Epithélium intestinal
Kurosaka et al., 2015	Une importante signalisation SHH limite la signalisation Wnt durant le développement des ganglions crâniens.	Développement des ganglions crâniens
Qualtrough et al., 2015	La cyclopamine (inhibiteur de la voie SHH) diminue l'activité transcriptionnelle de β -caténine/TCF.	Modèle de cancer colo-rectal
Zinke et al., 2015	La β -caténine cytoplasmique [mais également nucléaire] (stabilisée par l'inhibition de GSK3 β) interagit avec Gli-1, entrant sa dégradation.	Médulloblastome
Aurrekoetxea et al., 2016	L'hyperactivité pathologique de la voie Wnt était associée à une diminution de la synthèse de SHH (sans disparition complète du signal).	Modèle organotypique de développement dentaire
Briggs et al., 2016	Pendant la cardiogénèse, les ligands et récepteurs SHH et Wnt présentent des profils d'expression spatio-temporels similaires. Les souris déficientes en voie Wnt ou SHH présentent des malformations cardiaques similaires, suggérant une action synergique de ces deux voies durant le développement.	Cardiogénèse chez la souris

Données de la littérature sur les interactions entre les voies Wnt, Hedgehog et TLR4 (liste non exhaustive) <i>(suite)</i>		
Référence	Interaction	Modèle/contexte clinique
<i>Interactions TLR4/Wnt</i>		
Pereira et al., 2009	La surexpression de Wnt5a en réponse à une stimulation microbienne nécessite l'activation des voies TLR/NFκB.	Macrophages humains
Santaolalla et al., 2013	Le TLR4 peut activer β-caténine selon un mécanisme PI3K-dépendant.	Néoplasies intestinales
Wang et al., 2013	Le LPS de <i>Porphyromonas gingivalis</i> induit la phosphorylation de GSK3β et la stabilisation puis augmentation de β-caténine, résultant en une activation de la voie Wnt, dans un modèle d'inflammation de cellules souches dentaires.	Cellules souches de la papille apicale dentaire
He et al., 2014	La stimulation par le LPS augmente l'expression de Wnt5a par une voie TLR4/MyD88/PI3K/Akt/NFκB-dépendante.	Cellules souches pulpaire
Jang et al., 2014	Le LPS induit la déphosphorylation, stabilisation et translocation nucléaire de β-caténine et augmente son activité dans les cellules épithéliales bronchiques. La β-caténine est impliquée dans l'activation de NFκB LPS-dépendante.	Cellules épithéliales bronchiques
Li et al., 2014	Une signalisation Wnt active est capable d'améliorer l'inflammation secondaire à la fixation d'un ligand bactérien en diminuant la signalisation TLR dans les cellules épithéliales alvéolaires. En revanche, en l'absence d'un stimulus inflammatoire (ex : LPS), la surexpression de β-caténine augmente la signalisation TLR. Le GSK3β phosphoryle β-caténine induisant sa dégradation et empêchant son interaction avec le NFκB dans le cytoplasme. Le NFκB ainsi libéré peut entrer dans le noyau et activer la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. A l'inverse, l'expression forcée de β-caténine induit une diminution de la quantité de NFκB intra-nucléaire dans les cellules épithéliales.	Cellules épithéliales pulmonaires

Tableau II-5. Données de la littérature sur les interactions signalétiques entre les voies Wnt, SHH et TLR4.

Ces données (non exhaustives) sur les interactions signalétiques entre ces voies de signalisation sont à interpréter avec prudence car elles sont dépendantes du contexte clinique et/ou du modèle particulier dans lequel elles ont été initialement décrites.

Ces interactions signalétiques sont à interpréter avec beaucoup de prudence, car nombre d'entre elles sont contexte-spécifiques et pas nécessairement transposables à d'autres situations physiopathologiques.

Néanmoins, en se basant sur des interactions décrites dans la littérature, nous pouvons émettre une hypothèse sur la nature de l'interaction signalétique entre la signalisation TLR4 et la voie Sonic Hedgehog médiée par la voie canonique Wnt (Figure II-41).

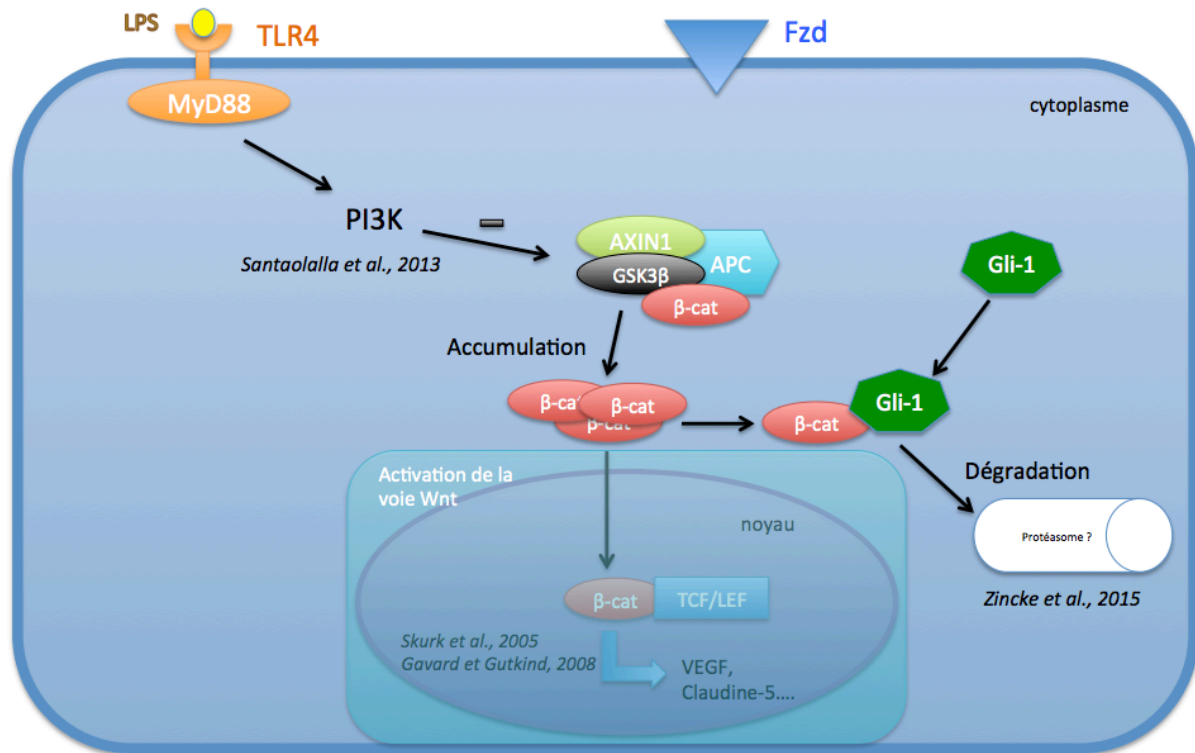


Figure II-41. Modélisation simplifiée des mécanismes moléculaires responsables de l'inhibition de la voie Hedgehog TLR4-dépendante dans les cellules endothéliales après stimulation par le LPS. La stimulation par le LPS des cellules endothéliales induit une activation du récepteur TLR4 et l'inhibition du complexe de destruction PI3K/MyD88-dépendante (Santaolalla et al., 2013), se traduisant par une accumulation cytoplasmique de β-caténine. Cette β-caténine peut ensuite migrer dans le noyau et exercer son rôle de facteur de transcription (définissant « l'activation » de la voie Wnt/β-caténine), comme par exemple l'amplification de la synthèse de VEGF (Skurk et al., 2005) ou la répression de la synthèse de Claudine-5 (Gavard et Gutkind, 2008). La β-caténine cytoplasmique peut également se fixer au facteur de transcription Gli-1 (effecteur de la voie Hedgehog) et entraîner sa dégradation (Zincke et al., 2015) probablement via son adressage au protéasome. Cette voie de signalisation expliquerait ainsi la diminution de l'expression de l'ARNm de *Gli-1* après stimulation par le LPS *in vitro* et *in vivo*.

d. Autres déterminants de la perméabilité vasculaire endoneurale post-traumatique

Bien que n'ayant pas été étudiés dans ce travail, d'autres déterminants de la perméabilité vasculaire endoneurale pourraient également être impliqués dans le développement des neuropathies périphériques post-traumatiques.

Parmi ces déterminants potentiels, les microRNA pourraient être des candidats de choix. En effet, non seulement leur rôle a clairement été établi dans différents modèles de douleurs, dont des douleurs neuropathiques (Elramah et al., 2014), mais certains miRNA ont été spécifiquement impliqués dans la régulation de la perméabilité vasculaire, dont la perméabilité de la BHE (Almutairi et al., 2016). A titre d'exemple, le miR27a participerait à la régulation de la perméabilité vasculaire en inhibant l'ARNm de *VE-cadhérine* dans des conditions d'hyperperméabilité vasculaire VEGF-dépendante (Young et al., 2013). De plus, des miRNA seraient également impliqués dans la modulation de la signalisation cellulaire β -caténine-dépendante (Huang et al., 2010), pouvant participer à d'éventuelles interactions signalétiques avec d'autres voies de signalisations majeures impliquées dans la régulation de la perméabilité vasculaire endoneurale.

D'autres déterminants tels que des modificateurs épigénétiques (ex : ADN méthyltransférases ou histone acétyltransférases) pourraient également participer à la régulation de la perméabilité vasculaire (Thangavel et al., 2014) et/ou de l'inflammation (Thangavel et al., 2015) mais ne seront pas non plus envisagés dans la suite de ce travail.

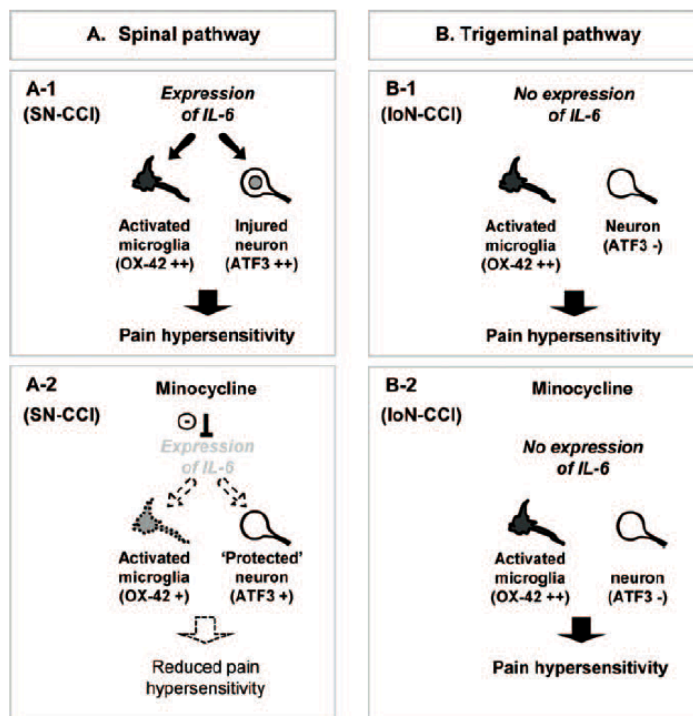
II-4-4 Différences et similitudes des nociceptions spinale et trigéminal

De nombreuses études ont suggéré -depuis longtemps- l'existence de différences entre les nociceptions spinale et trigéminal (Dallel et al., 1988 ; Hargreaves, 2011 ; Benoliel et al., 2012a) ainsi que des différences dans la réponse au traitement des neuropathies spinales et trigéminales (Haviv et al., 2014).

Dans de précédents travaux de notre équipe, Latrémolière et al. ont montré des différences importantes dans les voies de signalisation impliquées dans le développement des douleurs pathologiques après IoN-CCI ou SN-CCI et suggèrent que des interactions entre neurones

lésés et cellules gliales jouent un rôle clé dans les mécanismes sous-jacents à ces modèles lésionnels (Latremolière et al., 2008). Ainsi, un traitement par minocycline prévenait partiellement le développement d'un comportement « *allodynie-like* » dans les rats SN-CCI mais pas dans les IoN-CCI, probablement via une influence inhibitrice d'IL-6 produit par les neurones spinaux. Après lésion du nerf sciatique, une augmentation d'expression des gènes étudiés était observée dans les GRD L4-L5 après SN-CCI. L'induction des mêmes gènes était observée également dans le GT des rats IoN-CCI. En revanche, la surexpression d'IL-6 et OX-42 était plus précoce dans le modèle IoN-CCI que le SN-CCI, alors que le nombre de ligatures (4 vs. 2) laissait supposer une réponse inflammatoire plus importante. La différence entre les deux modèles provient probablement d'une plus grande densité de fibres myélinisées dans le nerf infra-orbitaire (50%) que le nerf sciatique (20%) (Young, 1977) et d'une plus grande sensibilité des fibres myélinisées aux effets néfastes du CCI (Guilbaud et al., 1993). Dans ce sens également, ATF3, un marqueur de réponse neuronale post-lésionnelle essentiellement exprimé par des neurones des fibres myélinisées, était également surexprimé de façon plus rapide et plus robuste après IoN-CCI que SN-CCI (Latremolière et al., 2008). De façon intéressante, l'augmentation de l'ARNm d'*IL-6* dans le GT des rats IoN-CCI était détectée dès 1 heure et demi post-opératoire avec des niveaux d'expression bien plus élevés que dans les temps post-opératoires plus tardifs. A l'inverse, le SN-CCI induisait une surexpression de l'ARNm d'*IL-6* dans le GRD seulement une semaine après chirurgie (Latremolière et al., 2008). Par ailleurs, la diminution de la production d'IL-6 induite par la minocycline jouerait probablement un rôle essentiel dans son efficacité à prévenir le développement de l'hypersensibilité douloureuse (Figure II-42) (Latremolière et al., 2008). En conclusion, ces données soutiennent l'idée de différences dans le développement de la douleur neuropathique céphalique vs extra-céphalique dont la surexpression d'IL-6 au site de terminaison des afférences primaires serait un élément majeur, entraînant l'activation microgliale.

Figure II-42. Représentation schématique des principales différences entre deux modèles de neuropathies spinale et trigéminal (constriction chronique du nerf sciatique ou du nerf infra-orbitaire). Une différence majeure entre les deux modèles résiderait dans l'expression importante d'IL-6 dans le modèle spinal mais pas le modèle trigéminal (expliquant l'efficacité de la minocycline à prévenir l'hypersensibilité douloureuse dans le modèle spinal mais pas trigéminal) (d'après Latrémolière et al., 2008).



Par la suite, Michot et al. (2012) ont montré -via l'évaluation de l'hyperalgésie et de l'allodynie dans des modèles de CCI chez le rat- que le blocage du récepteur CGRP par l'olcegepant était bien plus efficace pour atténuer le comportement douloureux neuropathique induit par le IoN-CCI que par le SN-CCI (Michot et al., 2012).

Nous avons observé une diminution d'expression plus importante de l'ARNm de *Gli-1* à 3 heures post-CCI dans le modèle IoN-CCI que SN-CCI, associé à une augmentation d'expression plus précoce (3 heures versus 6 heures) et plus importante (d'un facteur 3) de l'ARNm de *CD11b* dans le IoN-CCI par rapport au SN-CCI suggérant une inhibition plus importante de la voie Sonic Hedgehog dans le modèle trigéminal, associée à une infiltration macrophagique plus précoce et plus importante (Figure II-43).

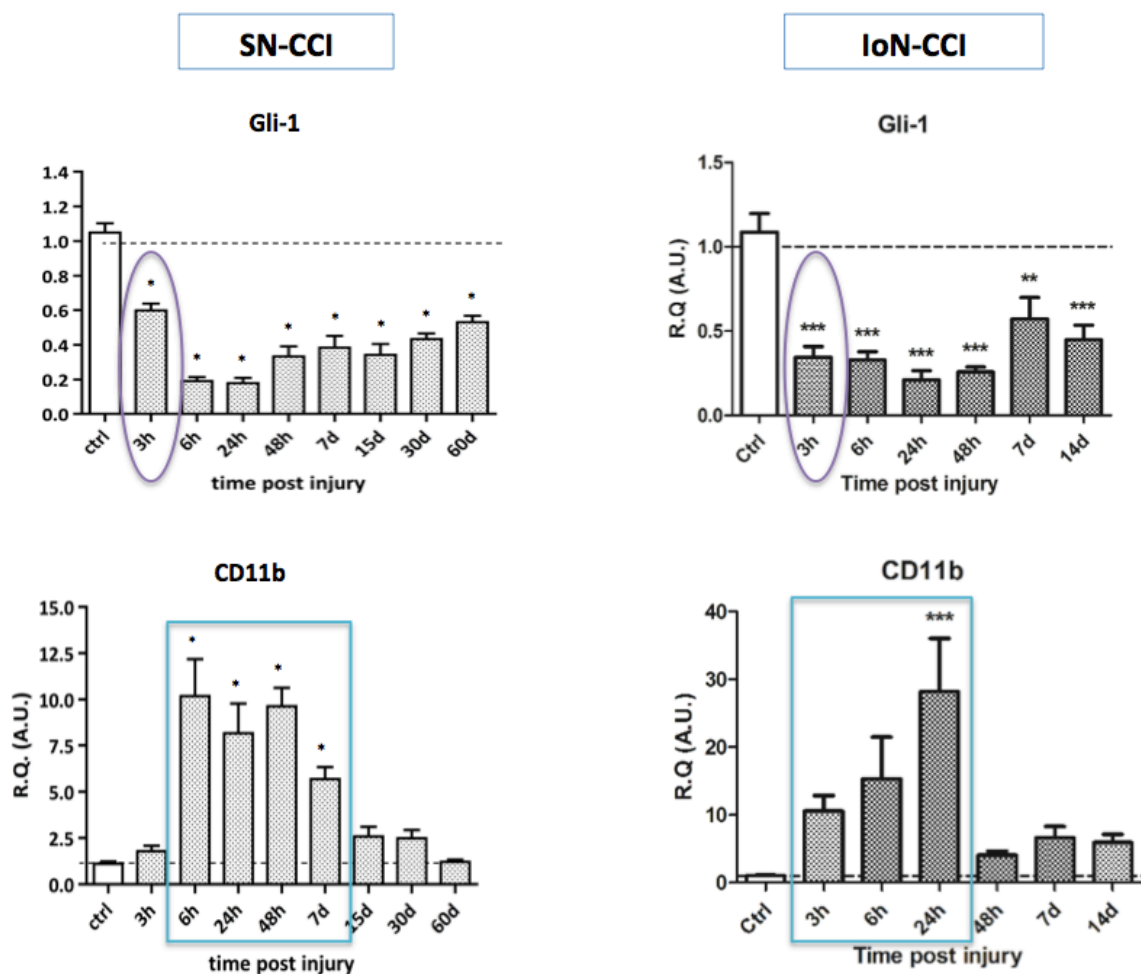


Figure II-43. Comparaisons des variations des niveaux d'expression des ARNm du facteur de transcription *Gli-1* et du marqueur de macrophages *CD11b* entre les modèles de constriction chronique du nerf sciatique (SN-CCI) et du nerf infra-orbitaire (IoN-CCI). Une diminution d'expression plus importante de l'ARNm de *Gli-1* à 3 heures post-lésion était observée dans le modèle trigéminal (IoN-CCI) par rapport au modèle spinal (SN-CCI) s'accompagnant d'une augmentation d'expression plus précoce (3 heures vs 6 heures) et plus importante (d'un facteur 3) de l'ARNm du marqueur macrophagique *CD11b* dans le modèle trigéminal (IoN-CCI) par rapport au modèle spinal (SN-CCI). Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de $n=5-8$ animaux pour chaque temps post-lésion dans les différentes conditions expérimentales. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni a été utilisée.

Ces données sont en accord avec celles de Latrémolière et al. (2008) précédemment décrites, qui observaient une augmentation plus importante de l'ARN d'*IL-6* et d'*OX-42* dans le IoN-CCI que dans le SN-CCI. Comme évoqué précédemment, cette différence pourrait provenir d'une différence dans la densité plus importante des fibres myélinisées dans le nerf infra-

orbitaire (50%) par rapport au nerf sciatique (20%) (Jacquin et al., 1984), ces fibres myélinisées étaient plus sensibles aux effets nocifs du CCI (Guilbaud et al., 1993).

Ainsi, l'infiltration macrophagique plus précoce et plus importante dans le modèle trigéminal pourrait résulter d'une dégénérescence nerveuse locale plus sévère dans ce modèle, induisant une prolifération des macrophages endoneuraux (afin de phagocyter les débris de myéline) selon un mécanisme IL-6-dépendant (Ko et al., 2016).

Cette infiltration plus précoce et plus importante de macrophages dans le IoN-CCI par rapport au SN-CCI était également corroborée par une augmentation majeure de l'expression de l'ARNm de la chimiokine *CCL2*, impliquée dans l'infiltration macrophagique post-CCI, dès 3 heures dans le modèle trigéminal, n'apparaissant qu'à 6 heures dans le modèle spinal (Figure II-15 et Figure II-44). De plus, l'augmentation d'expression plus précoce du marqueur d'hypoxie *HIF-1 α* dans le modèle trigéminal (3 heures vs 6 heures, Figure II-44) pourrait témoigner d'un effet « nocif » (i.e. inducteur d'hypoxie tissulaire) du IoN-CCI plus précoce que le SN-CCI tel que précédemment décrit (Guilbaud et al., 1993).

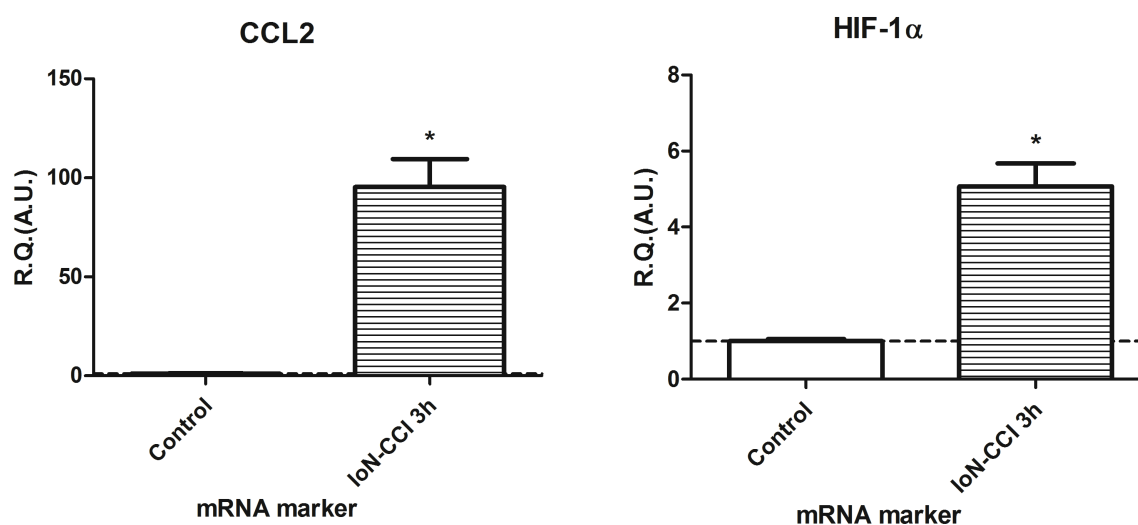


Figure II-44. La constriction chronique du nerf infra-orbitaire (IoN-CCI) induit une augmentation précoce de la chimiokine *CCL2* et du marqueur d'hypoxie *HIF-1 α* dès 3 heures dans le nerf infra-orbitaire lésé. Les changements dans le temps des niveaux d'expression des ARNm de *CCL2* et *HIF-1 α* ont été évalués dans les nerfs infra-orbitaires de rats après CCI ou *sham* (condition contrôle, Control) par RT-PCR semi-quantitative. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de $n=5-8$ animaux pour chaque marqueur; * $p<0,05$. Un test de Mann-Whitney a été utilisé.

II-4-5 Implication des voies TLR4, SHH et Wnt/ β -caténine dans l'apparition du phénotype douloureux neuropathique

a. Comportement aversif

Après avoir montré l'implication de l'activation de la voie TLR4 ou l'inhibition de la voie SHH dans les altérations moléculaires et vasculaires observées après CCI du nerf sciatique, nous avons ensuite exploré leur implication dans l'apparition d'un phénotype douloureux neuropathique chez des rats naïfs après injections péri-sciatiques (pendant 4 jours) de 100 μ L de véhicule, cyclopamine (300 mM) ou LPS (1 μ g/mL), tel que précédemment réalisé pour les études biochimiques.

La sensibilité tactile de la patte arrière droite des rats injectés était évaluée à l'aide de filaments de von Frey, 6 heures après la dernière injection, pendant 18 jours consécutifs. La sensibilité aux stimuli mécaniques (i.e. le seuil de retrait de la patte) des rats injectés avec le véhicule restait stable durant toute la durée de l'expérience et était comparable aux seuils déterminés avant traitement (i.e. les rats ne répondaient pas à la stimulation de 26 g). Inversement, dès 6 heures post-injection, les rats injectés au LPS présentaient une hypersensibilité mécanique significative ($p < 0,001$, $n = 5-7$ rats) au niveau de la patte ipsilatérale (coté injecté). Cette allodynie mécanique persistait jusqu'à la fin de l'expérience (Figure II-45).

De façon intéressante, comparativement aux valeurs de contrôle prétraitement ou au groupe de rats injectés avec le véhicule, les injections péri-sciatiques de cyclopamine induisaient également une allodynie mécanique ipsilatérale marquée ($p < 0,001$, $n = 5-7$ rats), de sévérité et profil temporel similaires à ceux des rats injectés au LPS (Figure II-45).

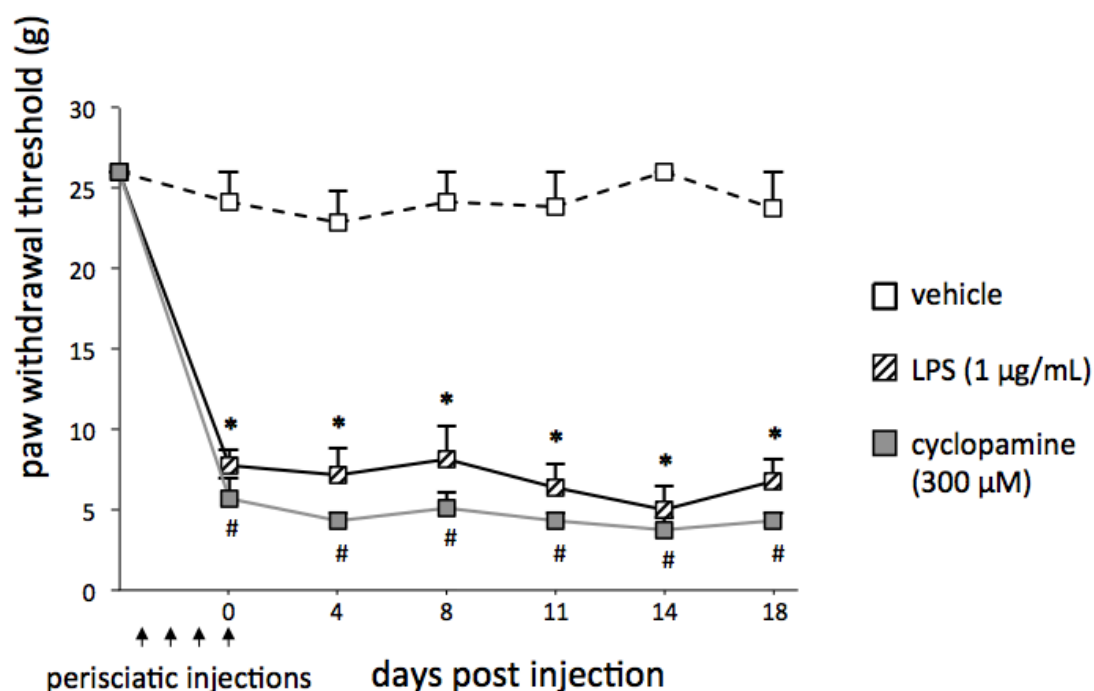


Figure II-45. L'inhibition locale de la voie de signalisation Sonic Hedgehog ou l'activation du récepteur TLR4 dans le nerf sciatique de rats naïfs répliquent les altérations comportementales observées après constriction chronique du nerf sciatique. Les seuils de retrait de la patte arrière après stimulation mécanique aux filaments de von Frey ont été mesurés chez des rats naïfs après des injections journalières péri-sciatiques, pendant 4 jours consécutifs (flèches noires), de 100 µL de cyclopamine (300 µM), de LPS (1 mg/mL) ou de véhicule (n=5-7 animaux par condition), 6 heures après la dernière injection durant une période de 18 jours consécutifs. De façon intéressante, dès le premier jour après la dernière injection péri-sciatique, une diminution significative du seuil de retrait de la patte arrière était observée dans les groupes traités à la cyclopamine ou au LPS, comparativement au groupe contrôle. Cette allodynie mécanique prononcée (les rats naïfs n'ayant aucun retrait de la patte jusqu'à 26 g de stimulation) était maintenue jusqu'à la fin de l'expérience, i.e. 18 jours après la dernière injection (n=5-7 rats par groupe ; *p<0,001 ; # p<0,001). Une analyse de variance bivariée à mesures répétées suivie d'un test post-hoc de Bonferroni ont été utilisés.

Dans le modèle trigéminal, afin de confirmer l'implication similaire de l'inhibition de la voie SHH dans l'allodynie mécanique post-CCI du nerf infra-orbitaire, des injections péri-neurales de cyclopamine (ou son véhicule) ont été réalisées chez des rats naïfs pendant 4 jours puis leur sensibilité tactile faciale a été évaluée à l'aide de filaments de von Frey à J4, J6, J8, J10 et J14 après la dernière injection. La réponse comportementale des rats était évaluée selon le score défini par Vos et al. (1994).

Après injection de cyclopamine, les rats présentaient un comportement aversif après stimulation mécanique (2 g à 10 g) de la région infra-orbitaire droite, qui n'était pas observé chez les rats injectés avec le véhicule (Figure II-46).

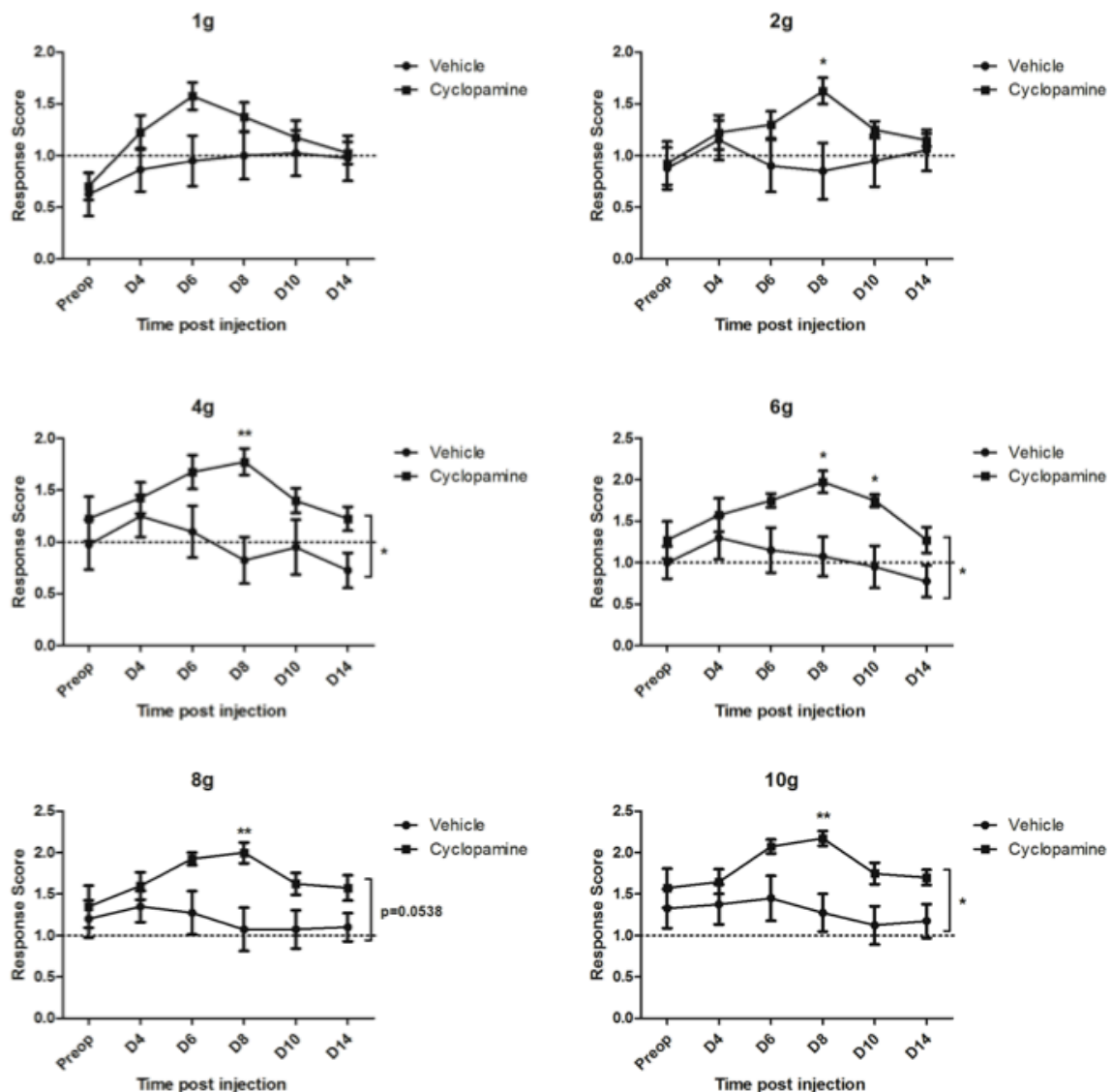


Figure II-46. L'inhibition locale de la voie de signalisation Sonic Hedgehog dans le nerf infra-orbitaire de rats naïfs réplique les altérations comportementales observées après constriction chronique du nerf infra-orbitaire. La réponse comportementale après stimulation mécanique de la cutanée région infra-orbitaire droite par des filaments de von Frey (1, 2, 4, 6, 8 et 10 g) était évaluée chez des rats naïfs ayant reçu 4 jours d'injections péri-neurales de 50 μ L de cyclopamine (300 μ M ; n=8 rats) ou de son véhicule (n=8 rats), à différents temps post-injection (J4, J6, J8, J10, J14). Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ l'erreur-type de la moyenne du score de réponse du groupe (chaque réponse individuelle des rats correspondant à la réponse moyenne après 5 stimulations délivrées à 3 secondes d'intervalle) selon le score de Vos et al. (1994) : 0, absence de réponse ; 1, réponse non aversive ; 2, réponse aversive légère ; 3, réponse aversive forte ; 4, réponse aversive majeure (voir partie II-3 pour les détails). Une analyse de variance bivariable à mesures répétées suivie d'un test post-hoc de Bonferroni ont été utilisés (* p <0,05, ** p <0,01). L'inhibition de la voie Hedgehog chez des rats naïfs induisait des réponses aversives significatives (scores de réponse > 1, ligne pointillée) à des stimuli mécaniques normalement non aversifs (scores de réponse < 2 avant les injections) comparativement au groupe contrôle (rats injectés avec le véhicule) suggérant le développement d'une allodynie mécanique chez ces rats.

Ce comportement aversif pour des stimulations normalement non nociceptives (telles qu'évaluées dans les pré-tests) suggère une allodynie mécanique, similaire à celle observée par Vos et al., (1994) (Figure II-47).

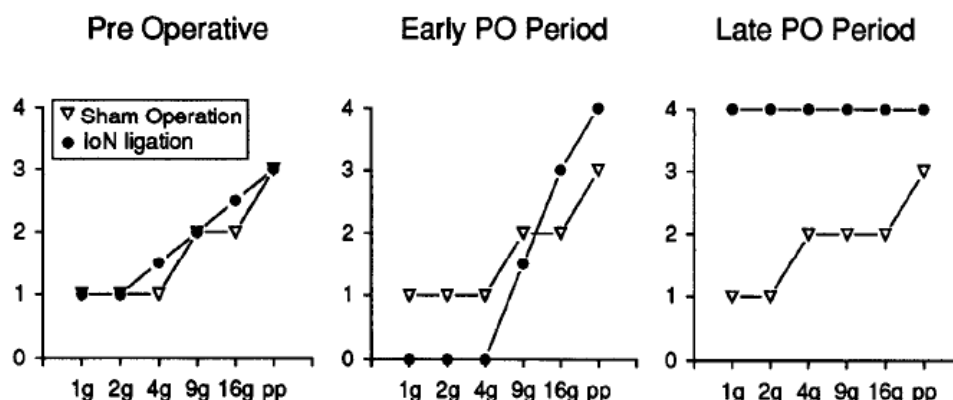


Figure II-47. Altérations comportements après ligature du nerf infra-orbitaire (IoN-CCI) dans le modèle initial de Vos et al., 1994. Dans l'étude de Vos et al., 1994, la réponse comportementale après stimulation mécanique de la cutanée région infra-orbitaire droite par des filaments de von Frey (1, 2, 4, 9 et 16 g) et à la piquûre (*pin prick*, pp) était évaluée en préopératoire (*Pre Operative*), puis après IoN-CCI en période post-opératoire précoce (3 à 12 jours, *Early PO Period*) et tardive (15 à 130 jours, *Late PO Period*), selon leur score : 0, absence de réponse ; 1, réponse non aversive ; 2, réponse aversive légère ; 3, réponse aversive forte ; 4, réponse aversive majeure. Comparativement aux rats *sham*, les rats ligaturés présentaient une augmentation rapide du score de réponse aversive dès 9 g dans la période post-opératoire précoce, avec une réponse aversive majeure persistante dans la période post-opératoire tardive dès 1g de stimulation mécanique, suggérant une allodynie sévère dans cette période (d'après Vos et al., 1994).

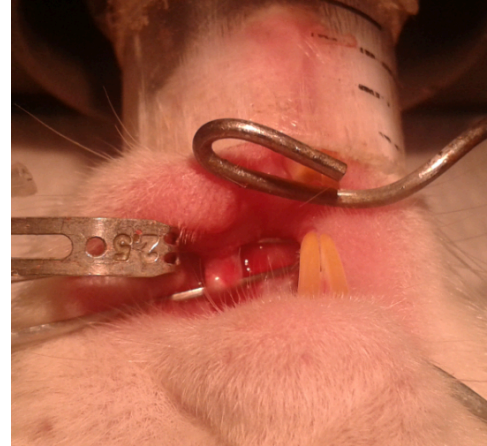
b. Transition neurite - neuropathie

Après avoir étudié les implications des voies SHH et TLR4 dans l'apparition du phénotype douloureux neuropathique ainsi que l'implication de la voie Wnt/ β -caténine dans l'interaction signalétique entre ces deux voies, nous avons ensuite recherché le rôle respectif de ces 3 voies de signalisation dans la transition phénotypique entre neurite (inflammation nerveuse réversible) et neuropathie (inflammation nerveuse irréversible).

Pour ce faire, nous avons développé un modèle simple de neurite, le « *simple nerve stretch* » (SNS), correspondant à un étirement contrôlé du nerf intra-orbitaire (tel que réalisé dans la première partie du modèle IoN-CCI) sans ligature du nerf.

Les rats étaient anesthésiés tel que pour le IoN-CCI et le nerf infra-orbitaire droit exposé par une incision vestibulaire de 5 mm et la réclinaison d'un lambeau muco-périosté. Par la suite, le nerf était exposé et étiré à l'aide d'une précelle courbe (la même précelle que pour le IoN-CCI) pendant précisément 20 secondes (Figure II-48).

Figure II-48. Procédure expérimentale de l'étirement simple du nerf infra-orbitaire (simple nerve stretch, SNS). Le nerf infra-orbitaire était exposé comme pour un IoN-CCI puis étiré 20 secondes sur une précelle avant d'être reposé *in situ* et fermeture du site opératoire.



Cet étirement était passif et résultait uniquement de la tension induite par la précelle sur le nerf (afin de garantir la reproductibilité du degré d'étirement sur les différents animaux lésés). Le nerf était ensuite délicatement relâché et le lambeau refermé par des points discontinus de PROLENE® 5-0.

A la suite de cet étirement, les rats ne présentaient aucun comportement aversif ou nocifensif spontané majeur mais présentaient des altérations moléculaires marquées au niveau d'ARNm d'intérêt : marqueurs inflammatoires (TLR2), protéines de jonctions serrées (Claudine-5, Occludine [non significatif]), effecteurs de la voie Sonic Hedgehog (Patched-1, Gli-1) et effecteurs de la voie Wnt/ β -caténine (Fzd-7, VE-cadhérine [non significatif]), normalisées entre 7 et 14 jours post-opératoires (Figure II-49).

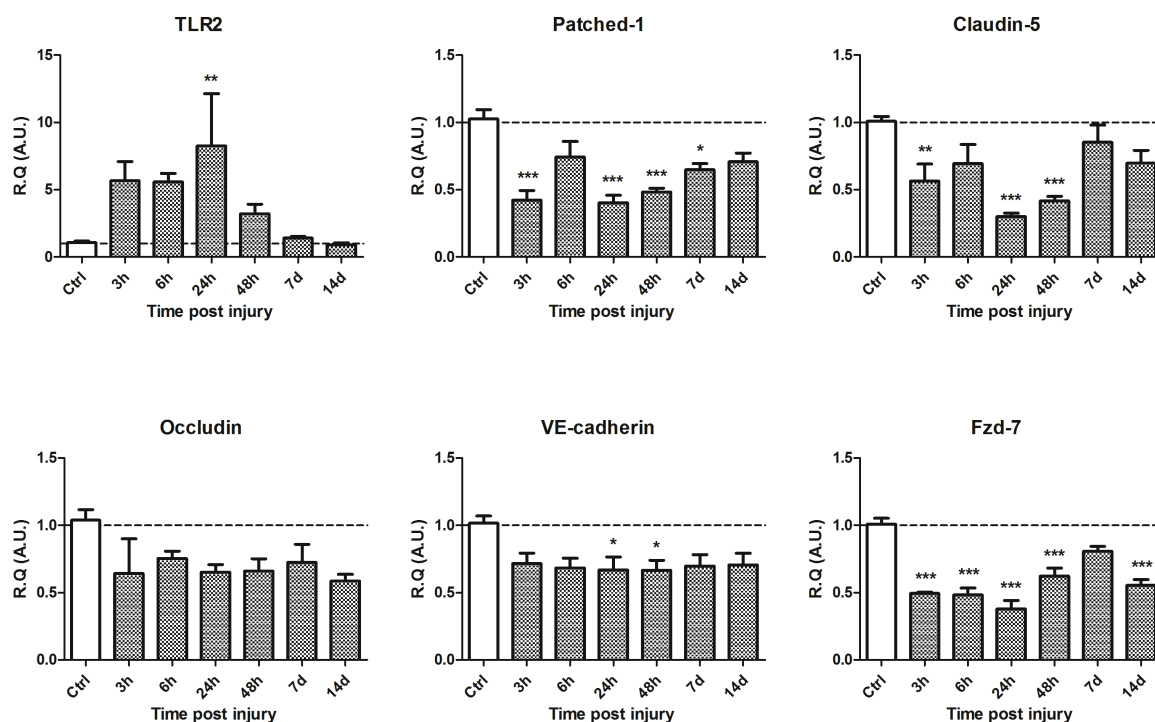


Figure II-49. Altérations moléculaires (ARNm) observées après étirement simple du nerf infra-orbitaire (simple nerve stretch, SNS). Des variations significatives des taux d'ARNm de TLR2, Patched-1, Claudine-5 et Fzd-7 étaient observés entre 3 heures et 48 heures post-SNS selon les marqueurs, retournant au niveau d'expression basal entre 7 et 14 jours. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de n=5-6 animaux à chaque temps post-lésionnel. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Une analyse de variance univariée suivie d'un test post-hoc de Bonferroni ont été utilisés.

Ayant montré précédemment que l'activation de la voie Wnt/ β -caténine se traduit par une diminution d'expression des effecteurs de la voie Sonic Hedgehog *in vitro* et que l'inhibition de la voie Hedgehog joue un rôle essentiel dans le développement des altérations moléculaires, vasculaires et comportementales observées après CCI, nous avons émis l'hypothèse que la constriction chronique du nerf infra-orbitaire induit une activation de la voie Wnt/ β -caténine.

Afin d'étudier l'impact différentiel de cette voie Wnt/ β -caténine activée dans nos modèles lésionnels, des rats ont été prétraités par des injections périmébrales de PKF 118-310, un inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine, puis soumis à un SNS ou un CCI du nerf infra-orbitaire. Des rats injectés au PKF 118-310 mais n'ayant pas eu de lésion nerveuse par la suite ont été utilisés comme groupe contrôle (appelé « Injection » dans les figures correspondantes).

A 3 heures post-lésion, l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine permettait de prévenir (ou atténuer selon les marqueurs) les altérations des niveaux d'expression des ARNm de *Claudine-5*, *VEGF-A* (Figure II-50), *TLR2*, *CD11b* (Figure II-51) ainsi que *Patched-1*, *Gli-1*, *VE-cadhérine*, *Fzd-7* et β -caténine (Figure II-52) dans le modèle de neurite (SNS) mais pas (ou de façon moindre [pour l'ARNm de *Fzd-7* notamment]) dans le modèle de neuropathie (IoN-CCI).

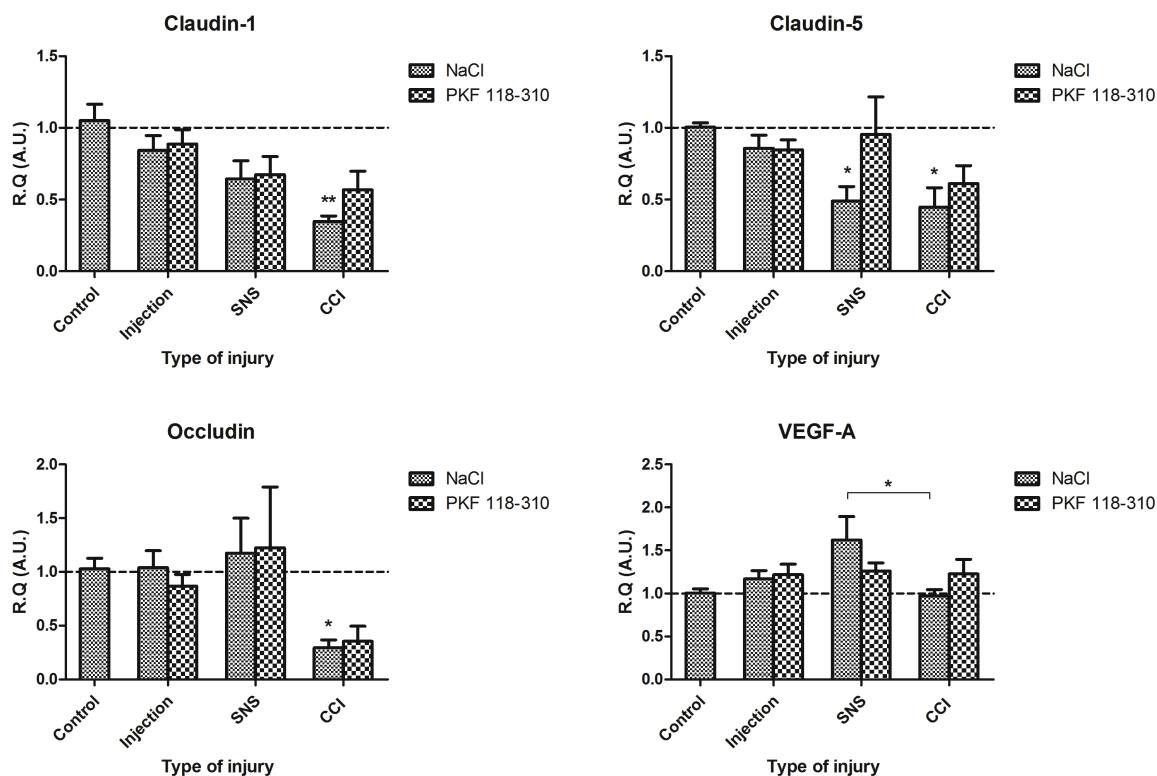


Figure II-50. In vivo, à 3 heures post-lésion, l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine prévient les altérations moléculaires des ARNm de la protéine de jonction serrée Claudine-5 et du facteur pro-perméabilisant VEGF dans le modèle de neurite (SNS) mais pas de neuropathie (CCI). Les changements des niveaux d'expression des ARNm de Claudine-1, Claudine 5, Occludine et VEGF ont été évalués par RT-PCR semi-quantitative dans trois types de lésions du nerf infra-orbitaire : injections péri-neurales (servant de condition contrôle), étirement simple du nerf infra-orbitaire (Simple Nerve Stretch [SNS], modèle de neurite) ou la constriction chronique du nerf infra-orbitaire (CCI, modèle de neuropathie), après injections péri-neurales de 50 μ L de PKF 118-310 (50 μ M, antagoniste de la voie Wnt) ou NaCl 0,9% (3 injections, espacées de 6 heures, débutant 24 heures avant la lésion), comparativement aux nerfs infra-orbitaires non lésés de rats naïfs (servant de valeur de base pour les comparaisons des niveaux d'expression d'ARNm). Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de n=5-8 animaux pour chaque marqueur; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Dunn ont été utilisés.

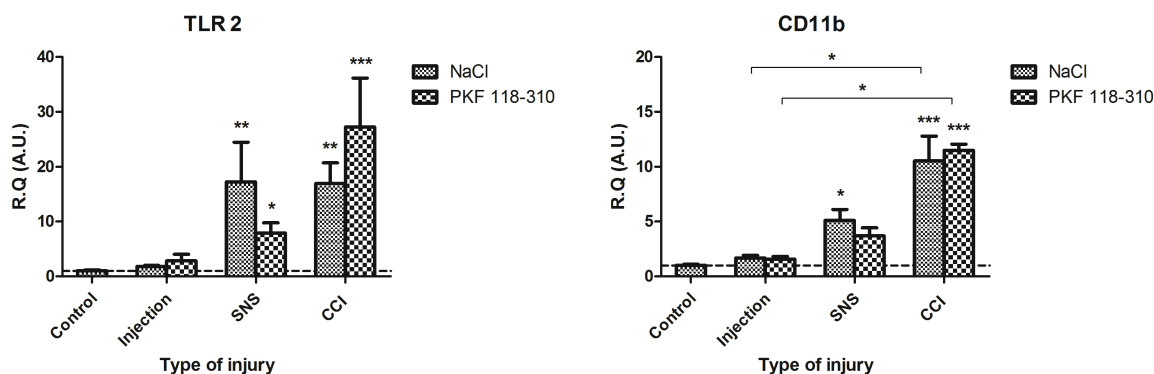


Figure II-51. *In vivo*, à 3 heures post-lésion, l'inhibition de la voie *Wnt/β-caténine* atténue les altérations moléculaires des ARNm du marqueur de l'immunité innée TLR2 et du marqueur de macrophages CD11b dans le modèle de neurite (SNS) mais pas de neuropathie (CCI). Les changements des niveaux d'expression des ARNm de *TLR2* et *CD11b* ont été évalués par RT-PCR semi-quantitative dans trois types de lésions du nerf infra-orbitaire : injections péri-neurales (servant de condition contrôle), étirement simple du nerf infra-orbitaire (Simple Nerve Stretch [SNS], modèle de neurite) ou la constriction chronique du nerf infra-orbitaire (CCI, modèle de neuropathie), après injections péri-neurales de 50 µL de PKF 118-310 (50 µM, antagoniste de la voie *Wnt*) ou NaCl 0,9% (3 injections, espacées de 6 heures, débutant 24 heures avant la lésion), comparativement aux nerfs infra-orbitaires non lésés de rats naïfs (servant de valeur de base pour les comparaisons des niveaux d'expression d'ARNm). Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne ± erreur-type de la moyenne de n=5-8 animaux pour chaque marqueur; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Dunn ont été utilisés.

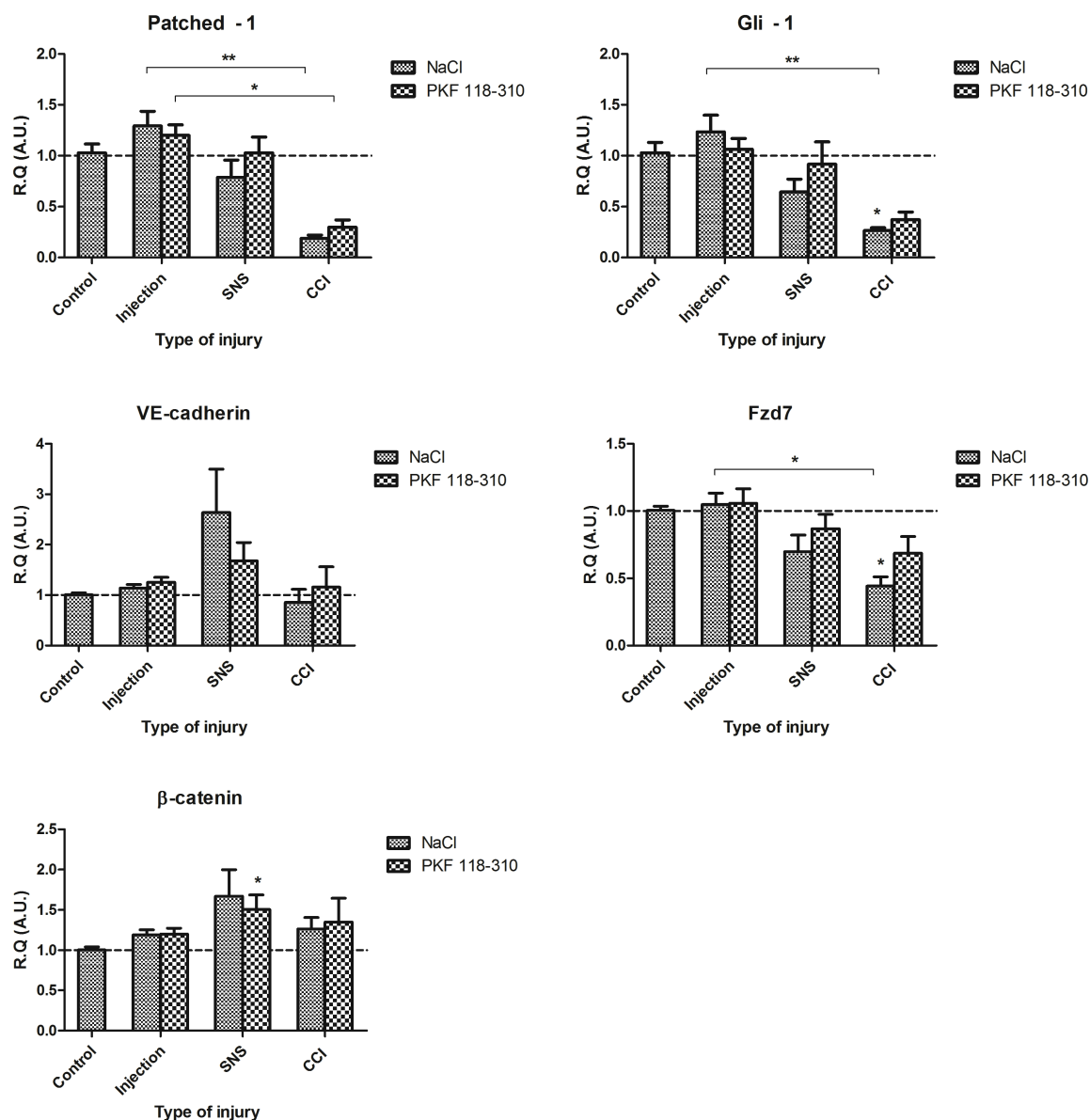


Figure II-52. In vivo, à 3 heures *post-lésion*, l'inhibition de la voie *Wnt/β-caténine* prévient les altérations moléculaires des ARNm des marqueurs de la voie *SHH* *Patched-1* et *Gli-1* et diminue celles des marqueurs de la voie *Wnt* *VE-cadhérine*, *Fzd-7* et *β-caténine* dans le modèle de neurite (*SNS*) mais pas de neuropathie (*CCI*) sauf pour *Fzd-7*. Les changements des niveaux d'expression des ARNm de *Patched-1*, *Gli-1*, *VE-cadhérine*, *Fzd-7* et *β-caténine* ont été évalués par RT-PCR semi-quantitative dans trois types de lésions du nerf infra-orbitaire : injections péri-neurales (servant de condition contrôle), étirement simple du nerf infra-orbitaire (Simple Nerve Stretch [*SNS*], modèle de neurite) ou la constriction chronique du nerf infra-orbitaire (*CCI*, modèle de neuropathie), après injections péri-neurales de 50 µL de PKF 118-310 (50 µM, antagoniste de la voie *Wnt*) ou NaCl 0,9% (3 injections, espacées de 6 heures, débutant 24 heures avant la lésion), comparativement aux nerfs infra-orbitaires non lésés de rats naïfs (niveau basal d'expression des ARNm). Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de *RPS18*. Chaque histogramme correspond à la moyenne ± erreur-type de la moyenne de n=5-8 animaux pour chaque marqueur; *p<0,05 ; **p<0,01. Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Dunn ont été utilisés.

De plus, l'inhibition préemptive de la signalisation Wnt (via des injections périneurales de PKF 118-310) prévenait l'augmentation de perméabilité vasculaire (observée par l'accumulation intra-parenchymateuse de NaFlu dans le nerf infra-orbitaire en microscopie confocale à fluorescence) après SNS mais pas CCI, comparativement aux injections périneurales de PKF 118-310 ou véhicule (NaCl 0,9%) sans lésion nerveuse, servant de conditions contrôles (permettant l'évaluation du niveau de fluorescence basale) (Figure II-53).

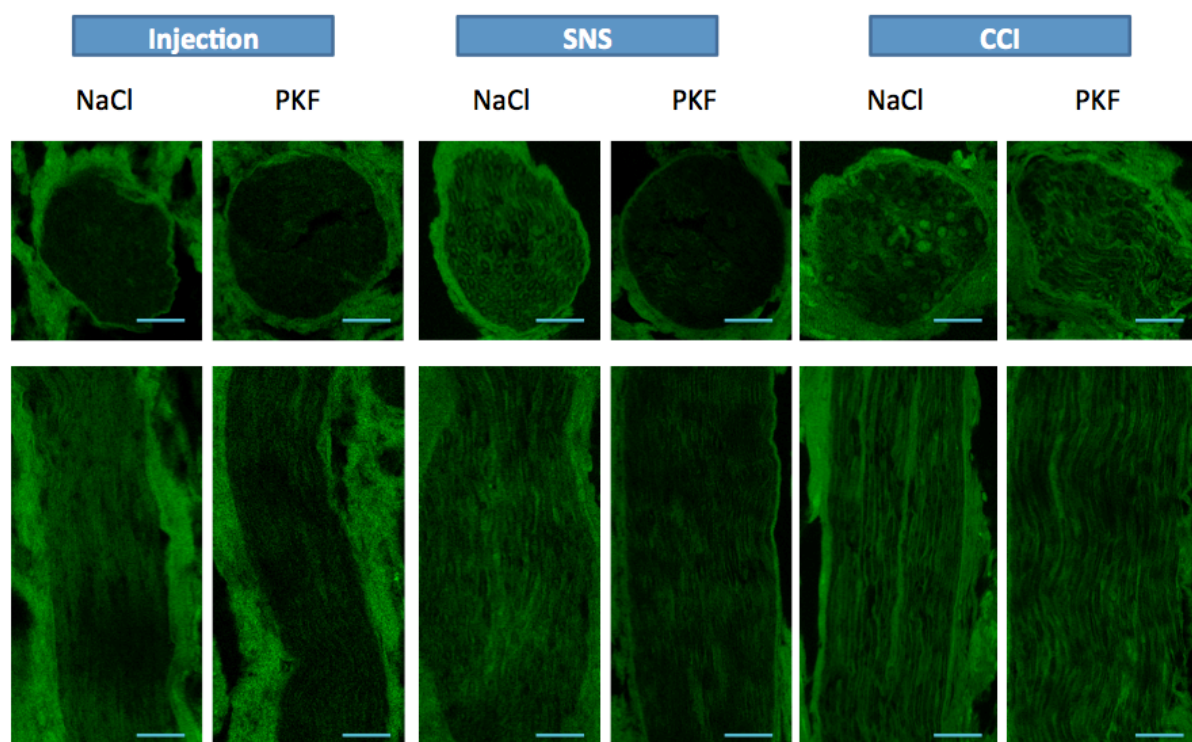


Figure II-53. In vivo, à 3 heures post-lésion, l'inhibition de la voie Wnt/β-caténine prévient les altérations vasculaires dans le modèle de neurite (SNS) mais pas de neuropathie (CCI). Des coupes axiales et longitudinales (30 μm) de nerfs infra-orbitaires de rats injectés à la fluorescéine sodique (NaFlu, voie IV) après injection périneurale, étirement simple (SNS) ou constriction chronique (CCI) chez des rats préalablement injectés au PKF 118-310 (50 μM, inhibiteur Wnt) ou au NaCl 0,9% (3 injections, espacées de 6 heures, débutant 24 heures avant la lésion) ont été examinées en microscopie confocale à fluorescence. Une diminution de l'immunofluorescence du NaFlu dans le parenchyme des nerfs infra-orbitaires en condition contrôle (« injection ») ou SNS après prétraitement au PKF 118-310 était observée comparativement au véhicule (NaCl 0,9%), suggérant une diminution de la perméabilité vasculaire endoneurale après prétraitement au PKF 118-310. A l'inverse, des niveaux similaires de fluorescence étaient observées dans le parenchyme de nerfs infra-orbitaires soumis à un CCI après prétraitement au PKF 118-310 ou au NaCl 0,9%, suggérant l'absence d'effet de l'inhibition de la voie Wnt sur la perméabilité vasculaire endoneurale induite par le CCI. De façon intéressante, bien que des augmentations des niveaux de fluorescence (traduisant une augmentation de la perméabilité vasculaire endoneurale) étaient observées à la fois dans le SNS et le CCI après prétraitement au NaCl 0,9%, le « schéma » de fluorescence était différent entre ces deux conditions, pouvant suggérer des différences dans la nature de la perméabilité vasculaire consécutive à ces deux types de lésions nerveuses (barre d'échelle = 50 μm).

Ces résultats suggèrent fortement que l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine pourrait prévenir les altérations moléculaires et vasculaires à la suite d'une lésion nerveuse de neurite mais pas d'une lésion nerveuse neuropathique.

Compte-tenu des différents niveaux d'expression des ARNm des effecteurs de la voie SHH (*Gli-1* et *Patched-1*) dans les modèles de SNS et CCI et la prévention complète de leur diminution d'expression à la suite du traitement par PKF 118-310 dans le modèle SNS mais pas le modèle CCI, ces résultats suggèrent également que la diminution d'expression significative de ces marqueurs après CCI n'implique pas uniquement la voie Wnt (tel que c'est le cas dans le modèle SNS) mais implique probablement également une inhibition indépendante de la voie Hedgehog tel que montrée dans nos précédents résultats (Figure II-22).

Les deux modèles lésionnels SNS et CCI induisant des niveaux différents d'infiltration immunocytaire dans le parenchyme infra-orbitaire à 3 heures post-lésion, suggéré par un niveau d'expression de l'ARNm de *CD11b* deux fois plus important dans le CCI que le SNS (Figure II-51), nous avons ensuite cherché à étudier si ces différences d'infiltration macrophagique pourraient résulter de différences dans la signalisation Wnt et/ou Hedgehog dans ces deux types de lésions nerveuses.

Nous avons d'abord envisagé la possibilité que l'infiltration macrophagique différentielle puisse résulter de différences dans la nature et/ou la sévérité du trauma nerveux entre ces deux modèles.

La sévérité du trauma nerveux a été évaluée de façon indirecte dans les deux conditions, en utilisant la chimiokine CCL2 comme marqueur indirect de lésion neuronale. En effet, des études récentes ont montré que le CCL2 libéré par des neurones lésés était responsable de l'infiltration de macrophages sanguins dans le parenchyme nerveux, un évènement essentiel au développement de la douleur neuropathique (Shi et al., 2011 ; Sapienza et al., 2014 ; Van Steenwinckel et al., 2015 ; Zhang et al., 2016). A 3 heures post-lésion, le CCI induisait une augmentation d'expression plus importante (bien que non statistiquement significative) de l'ARNm de *CCL2* (d'un facteur 1,6) dans le parenchyme du nerf infra-orbitaire comparé au SNS (95,46x vs. 59,62x le niveau d'expression de rats contrôles) (Figure II-54) suggérant un « trauma neuronal » plus sévère et cohérent avec une plus grande infiltration macrophagique

(mise en évidence par les niveaux d'expression plus élevés de l'ARNm *CD11b* dans le CCI vs SNS [Figure II-51]).

De plus, considérant de précédentes études montrant une activation de la voie Wnt/ β -caténine en conditions d'hypoxie ainsi qu'une augmentation de la perméabilité vasculaire en réponse à une lésion hypoxique (Mazumdar et al., 2010 ; Song et al., 2015) et considérant les différences de perméabilité vasculaire entre le SNS et le CCI (Figure II-53), nous avons ensuite exploré l'hypothèse que le CCI pourrait générer davantage d'hypoxie que le SNS. Nous avons pour cela évalué le niveau d'expression de l'ARNm du marqueur d'hypoxie *Hypoxia Inducible Factor-1 α* (HIF-1 α), dont la transcription est fortement augmentée en condition hypoxique (Belaiba et al., 2007). A 3 heures post-lésion, aucune différence significative d'expression de l'ARNm de *HIF-1 α* n'était observée post-IoN- CCI par rapport à post-SNS (Figure II-54).

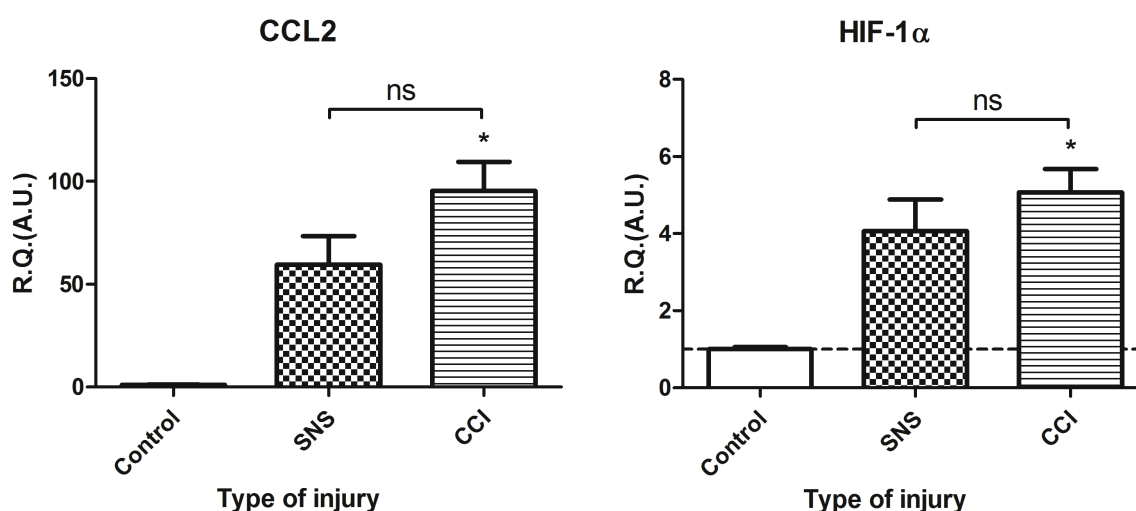


Figure II-54. In vivo, à 3 heures post-lésion, le SNS et le CCI du nerf infra-orbitaire induisent des altérations similaires des niveaux d'expression des ARNm de la chimiokine CCL2 et du marqueur d'hypoxie HIF-1 α . Les changements des niveaux d'expression des ARNm de *CCL2* et *HIF-1 α* ont été évalués par RT-PCR semi-quantitative dans le parenchyme de nerfs infra-orbitaires de rats soumis à un SNS ou un CCI, comparativement aux rats *sham* (Control). Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de n=5-6 animaux pour chaque marqueur; *p<0,05. Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Dunn a été utilisé.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le CCI n'induit pas un dommage hypoxique ou un trauma nerveux significativement plus importants que le SNS. Cependant, la différence d'augmentation d'expression d'ARNm entre les conditions SNS et CCI était plus importante pour l'ARNm de la chimiokine chémo-attractante des macrophages *CCL2* que pour le marqueur d'hypoxie *HIF-1 α* (1,6x vs. 1,25x respectivement).

Compte-tenu de l'absence de différence significative de dommage hypoxique entre ces deux types de lésions nerveuses, nous avons par la suite émis l'hypothèse que les différences de niveaux d'expression de *CCL2* observées (Figure II-54) pourraient provenir de l'infiltration macrophagique plus importante, conséquence de l'altération plus sévère de la BHN après CCI qu'après SNS (tel que suggéré dans les Figures II-51 et II-53).

Précédemment, nous avons montré que l'inhibition de la voie SHH par des injections péri-neurales de cyclopamine (antagoniste du récepteur *Smoothed*) se traduisait par une altération de la BHN et une infiltration d'immunocytes dans les nerfs sciatique et infra-orbitaire de rats naïfs (Figures II-24 et II-26).

En utilisant le même paradigme expérimental, nous avons montré qu'à 6 heures après la dernière injection péri-neurale de cyclopamine (correspondant au pic d'augmentation maximale d'expression des ARNm de *CCL2* et *HIF-1 α* dans le modèle SN-CCI [Figure II-15]), une augmentation significative d'expression de l'ARNm de *CCL2* était observée, mais pas de l'ARNm de *HIF-1 α* (Figure II-55)

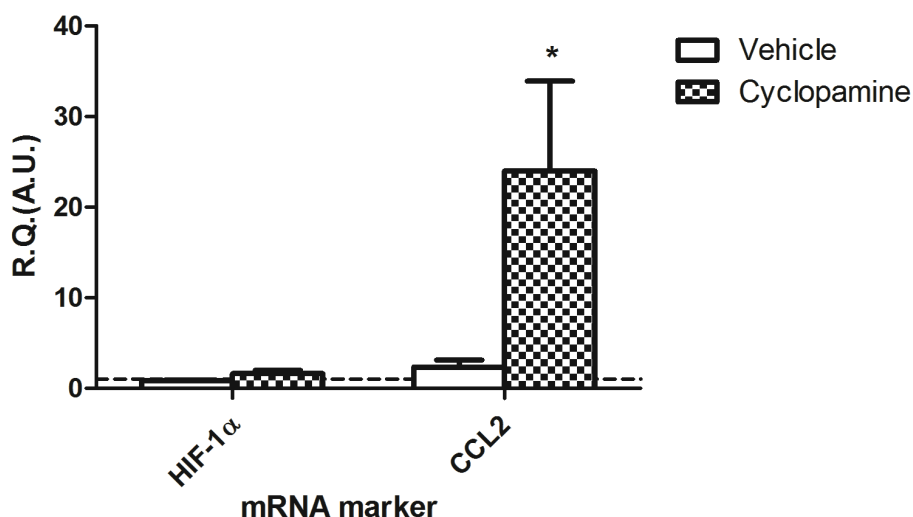


Figure II-55. *In vivo*, à 6 heures post-lésion, l'inhibition de la voie Sonic Hedgehog induit une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de la chimiokine CCL2 mais pas de l'ARNm du marqueur d'hypoxie HIF-1α. Les changements des niveaux d'expression des ARNm de CCL2 et HIF-1α ont été évalués par RT-PCR semi-quantitative dans le parenchyme de nerfs infra-orbitaires de rats naïfs après injections péri-neurales de 50μL de cyclopamine (300 μM) ou son véhicule (Ethanol 100%) (3 injections espacées de 6 heures, débutant 24 heures avant le prélèvement du nerf). Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne ± erreur-type de la moyenne de n=5-6 animaux pour chaque condition; *p<0,05, **p<0,01. Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour chaque marqueur.

De plus, *in vitro* dans les cellules hCMEC/D3, le prétraitement par la cyclopamine (30 μM) n'induisait pas de changement significatif du niveau d'expression de l'ARNm de CCL2 ($0,98 \pm 0,47$ vs. $1 \pm 0,16$ [condition contrôle]; n=4), un argument indirect suggérant l'absence de libération endothéliale de CCL2 par la cyclopamine. Cette conclusion était renforcée par l'absence de changements des niveaux d'expression de l'ARNm de CCL2 aux différentes doses de cyclopamine testées (10 μM, 30 μM, 100 μM et 300 μM ; données non présentées) et par le fait que le prétraitement par LPS induisait un changement majeur du niveau d'expression de cet ARNm dans les mêmes conditions expérimentales (données non présentées), allant à l'encontre de la possibilité d'une libération phasique de cette chimiokine dans ce modèle de cellules endothéliales.

En l'absence de lésion nerveuse significative dans ce paradigme expérimental (cf. Matériels et méthodes [II-3]), l'augmentation d'expression de l'ARNm de CCL2 résulte probablement de l'infiltration macrophagique plus importante, consécutive à la disruption de la BHN. En effet, les macrophages sont des sources connues de CCL2 et la libération de CCL2 par les

macrophages pourrait participer à une promotion autocrine de l'infiltration macrophagique dans les nerfs lésés (Van Steenwinckel et al., 2015).

Ces résultats suggèrent que les différences majeures entre les modèles SNS et CCI pourraient résulter de différences d'état fonctionnel de la voie Hedgehog ; le CCI était associé à une inhibition sévère de la voie Hedgehog (non-réversible par l'antagoniste de la voie Wnt PKF 118-310) comparativement à celle induite par le SNS (réversible par le PKF 118-310).

II- 5 Discussion

II-5-1 Altérations de la perméabilité vasculaire endoneurale et développement des neuropathies périphériques

Perméabilité vasculaire et douleurs neuropathiques :

Le concept de dysfonction des unités neuro-vasculaires [UNV] (composées de cellules endothéliales, de péricytes, de cellules gliales et de neurones) impliquée dans de nombreux contextes pathologiques (Neuwelt et al., 2011 ; Rosenberg, 2012) a été récemment introduit dans le domaine de la douleur (DosSantos et al., 2014).

L'exposition à des agents inflammatoires peut perméabiliser la barrière hémato-encéphalique et permettre le passage trans-endothélial de substances algogènes et/ou d'immunocytes menant à des états douloureux chroniques dont des pathologies douloureuses neuropathiques. A titre d'exemple, certaines molécules de chimiothérapie connues pour induire des neuropathies périphériques peuvent altérer la perméabilité micro-vasculaire focale au niveau du ganglion de racine dorsale (Jimenez-Andrade et al., 2008) et favoriser l'infiltration de monocytes CX3CR1⁺ dans le nerf sciatique (Old et al., 2014).

Cependant, les altérations vasculaires dans les modèles périphériques de douleurs neuropathiques n'ont été que peu explorées à l'heure actuelle. La ligature serrée du nerf sciatique favoriserait la croissance et le réarrangement architectural des micro-vaisseaux autour des neurones des ganglions de racines dorsales (Kubicek et al., 2010). De plus, la disruption de la barrière hémato-spinale après ligature partielle du nerf sciatique a été liée au développement de la douleur neuropathique par une augmentation de la perméabilité vasculaire menant à une activation microgliale CCL2-dépendante et une accumulation d'immunocytes dans la moelle spinale dans la région des afférences primaires (Echeverry et al., 2011). Plus récemment, Lim et al. (2014) ont montré que la ligature partielle du nerf sciatique induisait une disruption de la barrière hémato-nerveuse (se traduisant par une augmentation de la perméabilité vasculaire locale) liée à une diminution d'expression de la protéine de jonction serrée Zonula Occludens-1 attribuée à une libération de VEGF par les macrophages résidents. Ces changements étaient associés à l'extravasation de molécules algogènes, notamment du fibrinogène, protéine essentielle au développement de la neuroinflammation locale (Davalos et al., 2012).

Dans nos travaux, nous avons observé des changements macroscopiques et une augmentation de la perméabilité vasculaire endoneurale, induite par la diminution de production de certaines protéines de jonctions serrées (Claudine-1, Claudine-5, Occludine) au niveau du site lésionnel, dès 3 heures post-CCI dans les modèles spinal et trigéminal. Des variations des niveaux d'expression de certains marqueurs ARNm (*Claudine-5*, *TLR2*, *IL-1 β* , *CCL2*) étaient même détectés dès 1 heure post-CCI du nerf sciatique (données non présentées).

Nous avons également mis en évidence une infiltration macrophagique locale rapide (plus rapide dans le modèle trigéminal que spinal) ainsi qu'une infiltration lymphocytaire plus lente (montrée dans le modèle spinal), suggérant un processus neuroinflammatoire local (Costigan et al., 2009). Ces mécanismes d'infiltration immunocytaire ont déjà été montrés dans des modèles de lésion du nerf sciatique, notamment la pénétration endoneurale d'immunocytes (Eliav et al., 1999) mais les mécanismes sous-jacents étaient encore largement méconnus. En outre, le rôle des macrophages dans la genèse des douleurs neuropathiques est un sujet d'intérêt croissant en neurobiologie de la douleur (Ristoiu, 2013). Les macrophages résidents pourraient par exemple constituer un élément clé de la genèse des douleurs neuropathiques par la libération de la chimiokine CCL2 (Van Steenwinckel et al., 2015). Dans l'étude de Lim et al. (2014), la ligature partielle du nerf sciatique induisait également une infiltration locale de macrophages dès 3 heures post-lésion jusqu'à 7 jours, contribuant à la neuroinflammation locale et au développement de la douleur neuropathique. De façon intéressante, ces auteurs ont proposé un rôle majeur des macrophages résidents dans la disruption de la BHN par libération paracrine de VEGF (Lim et al., 2014).

Implication des voies de signalisation TLR4, Sonic Hedgehog et Wnt/ β -caténine dans la disruption de la BHN après CCI :

Nos travaux suggèrent une implication des voies de signalisation TLR4, Sonic Hedgehog et Wnt/ β -caténine dans la disruption de la BHN après CCI, tant dans le modèle spinal que trigéminal. Ces voies présenteraient vraisemblablement de multiples interactions signalétiques participant à la régulation de la synthèse des protéines de jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales endoneurales microvasculaires.

L'activation des TLR endothéliaux, impliqués dans les altérations et le remodelage vasculaires, pourrait participer à la diminution d'expression des protéines de jonctions serrées et la disruption de la BHN induite par le CCI (Downes et Crack, 2010 ; Grote et al., 2011) probablement via l'activation de la voie Wnt/ β -caténine ainsi que le suggèrent nos résultats.

Bien que leur implication spécifique dans le contrôle de la perméabilité vasculaire dans les modèles de lésions nerveuses périphériques n'ait pas été décrite au préalable, ces récepteurs ont été largement impliqués dans des lésions du système nerveux central (Shichita et al., 2012 ; Gesuete et al., 2014) et périphérique (Boivin et al., 2007 ; Zanin-Zhorov et Cohen, 2013), via leur rôle dans la détection des PAMPs et DAMPs (Medzhitov, 2008). Les TLR sont également impliqués dans le développement et le maintien des douleurs neuropathiques, en particulier les TLR 2 et 4, comme l'indiquent certaines données de la littérature (Wu et al., 2010 ; Lewis et al., 2012 ; Liu et al., 2012 a) et nos présents résultats expérimentaux. En particulier, l'activation de la voie TLR4 chez des animaux naïfs permettait de répliquer les altérations moléculaires, vasculaires et comportementales observées après CCI du nerf sciatique, suggérant son rôle majeur dans le développement de la neuropathie douloureuse. De la même façon, l'inhibition sélective de la voie Sonic Hedgehog permet également de répliquer les altérations observées après CCI du nerf sciatique et ce, de façon plus importante qu'après stimulation TLR4.

Enfin, l'activation de la voie Wnt était impliquée dans le développement de la douleur neuropathique, mais n'était pas suffisante à elle seule pour expliquer les altérations moléculaires et vasculaires observées après CCI.

De façon intéressante, l'inhibition de la voie TLR4 et/ou l'activation soutenue de la voie Hedgehog, ou alors l'activation de la voie Hedgehog associée (ou non) à l'inactivation de la voie Wnt/ β -caténine ne permettaient pas de prévenir l'apparition de la neuropathie dans nos conditions expérimentales (données non présentées), soulignant la complexité des altérations moléculaires locales observées après CCI, impliquant d'autres mécanismes, comme par exemple le rôle majeur de l'hypoxie endoneurale montré récemment par Lim et al. en 2015 (Lim et al., 2015), également montré dans un modèle de disruption de la BHE (Engelhardt et al., 2014). Compte-tenu des différentes lignées cellulaires des UNV lésées de façon concomitante après trauma nerveux, la nature des interactions entre ces différents protagonistes est nécessairement très complexe et implique vraisemblablement de nombreux facteurs, dont les voies de signalisation p53 (Menendez et al., 2013), Numb et Numblake (Liu et al., 2011), Rho kinase (Renault et al., 2010) ou des miRNAs (Ghorpade et al., 2013). En outre, le rôle des sécrétions paracrines au sein des UNV dans l'altération de l'homéostasie de la BHE (Engelhardt et Liebner, 2014) a été souligné, que ce soit des morphogènes SHH et Wnt (Wälchli et al., 2015), des facteurs trophiques (VEGF, PDGF [Lee et al., 2013]), des

cytokines, des chimiokines, des gaz, des ions (Marchand et al., 2005 ; Thacker et al. 2007) voire des micro-vésicules ou des exosomes (Smalheiser, 2009).

Perméabilité vasculaire aiguë et chronique de la BHN dans les modèles de lésions nerveuses périphériques :

La régulation de la perméabilité vasculaire est impliquée dans de nombreux processus physiologiques (comme la diapédèse leucocytaire [Allport et al., 2000]) et pathologiques (tels que dans les traumatismes crâniens ou l'AVC [Gavard, 2009]), étroitement corrélée à la régulation des jonctions adhérentes et serrées au niveau de la barrière endothéliale (Taddei et al., 2008 ; Tharakan et al., 2012 ; Kim et al., 2013).

Selon la nature et l'intensité des altérations moléculaires au sein de ces jonctions adhérentes et serrées, l'altération de la barrière endothéliale peut se traduire par une perméabilité vasculaire aiguë transitoire (perméabilité vasculaire physiologique) ou une perméabilité vasculaire chronique persistante (perméabilité vasculaire pathologique) (Gavard et Gutkind, 2008 ; Gavard, 2009 ; Hu et al., 2013).

Ces différences de perméabilités vasculaires pourraient résulter de différences d'expression des protéines de jonctions adhérentes et serrées au niveau des zones de contact intercellulaire. Par exemple, la perméabilité aiguë pourrait résulter d'altérations structurales du complexe jonction adhérente/jonction serrée, la VE-cadhérine se séparant de la Claudine-5 au niveau de la membrane cellulaire endothéliale, alors que la perméabilité vasculaire chronique pourrait - quant à elle - résulter de l'internalisation de la VE-cadhérine, se traduisant par une libération de la β -caténine associée et subséquentement par l'inhibition de la synthèse de Claudine-5 (Figure II-56).

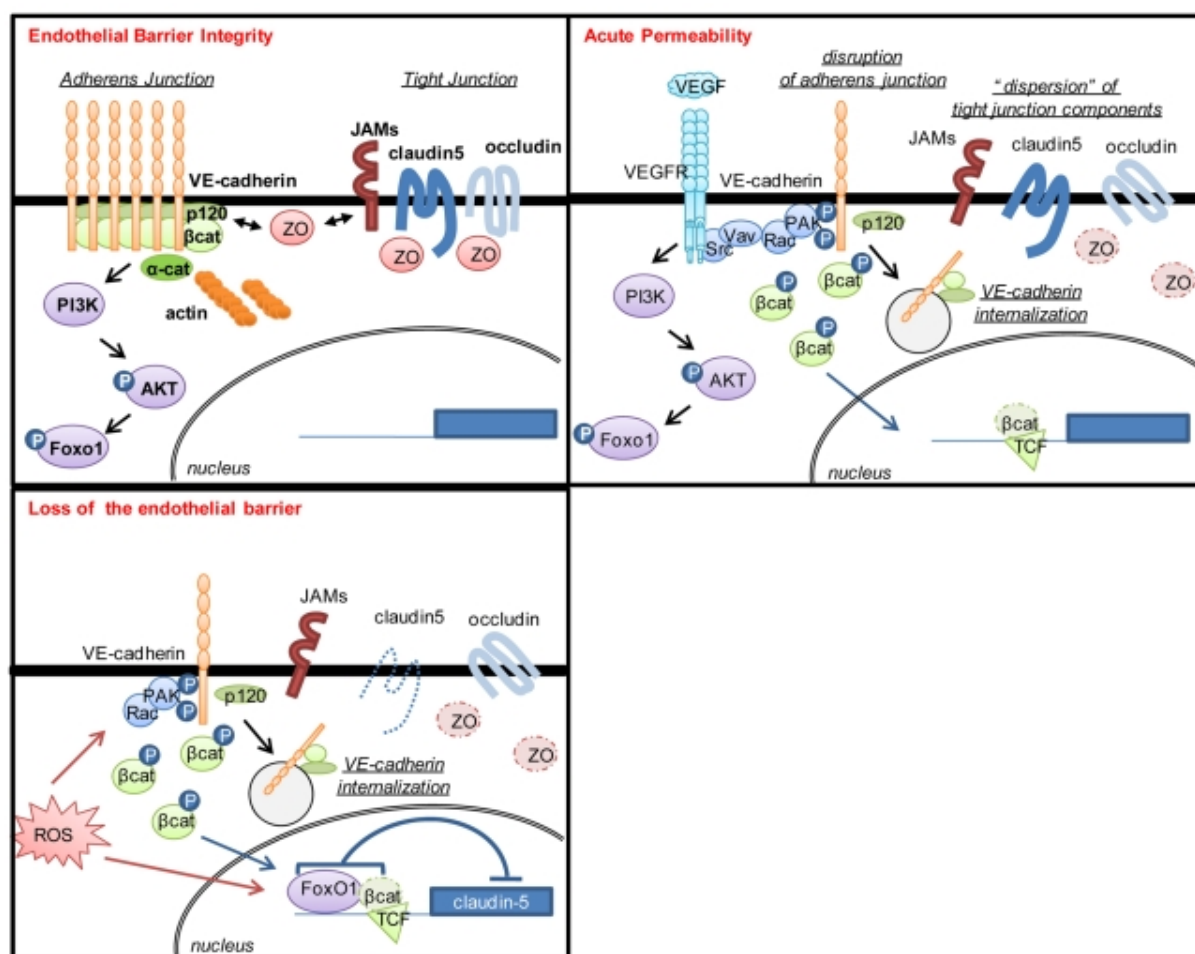


Figure II-56. Représentation schématique des interactions moléculaires entre les protéines des jonctions adhérentes et les protéines des jonctions serrées au niveau de la membrane endothéliale dans différentes conditions (intégrité endothéliale, perméabilité vasculaire aiguë et disruption pathologique de la barrière endothéliale). Alors qu'en condition de perméabilité vasculaire aiguë (ex : après activation du récepteur endothélial VEGF-R par le VEGF) une « dispersion » des protéines de jonctions adhérentes et serrée peut être observée (s'accompagnant d'une internalisation de la VE-cadhérine notamment), en condition de perméabilité vasculaire chronique (médiée par exemple par des radicaux libres de l'oxygène [ROS]), la perte de l'intégrité de la barrière endothéliale s'accompagne d'une internalisation de la VE-cadhérine mais également d'une diminution de la synthèse de Claudine-5 (via l'effet répresseur du facteur de transcription FoxO1, qui en condition de perméabilité vasculaire aiguë VEGF-dépendante est inhibé par phosphorylation, selon un mécanisme PI3K/AKT-dépendant) (d'après Gavard et Gutkind, 2008).

Dans nos travaux, nous avons observé d'importantes différences de niveaux d'expression des ARNm des protéines de jonctions serrées (*Claudine-5*, *Occludine*) et adhérentes (*VE-cadhérine*) entre les modèles de neurite (SNS) et neuropathie (IoN-CCI) dans nos conditions expérimentales (non statistiquement significatives pour *Claudine 5* et *VE-cadhérine* ; $p < 0,05$).

pour *Occludine* [test de Mann-Whitney, données non présentées]), se traduisant par des différences dans la perméabilité vasculaire au NaFlu.

Nous avons émis l'hypothèse que ces différences d'extravasation de NaFlu pourraient résulter de différences dans le type de perméabilité vasculaire, i.e. une perméabilité aiguë transitoire dans le modèle de neurite et une perméabilité chronique persistante dans le modèle de neuropathie.

Cette hypothèse est en accord avec la proposition de Radu et al. qui suggèrent que les altérations de la BHN pourraient résulter soit d'une ouverture physiologique de la BHN (la « perméabilisation de la BHN ») ou d'une altération pathologique de la BHN (la « disruption de la BHN ») (Radu et al., 2013). Alors que l'ouverture de la BHN est un processus physiologique réversible, la disruption de la BHN est associée à des modifications à long terme, irréversibles (Radu et al., 2013).

De plus, certains auteurs suggèrent que l'ouverture de la BHE ou de la BHS observées dans les modèles de douleurs inflammatoires serait un phénomène réversible (Brooks et al., 2005 ; Radu et al., 2013), en accord avec les altérations moléculaires des ARNm des protéines de jonctions serrées et adhérentes réversibles en 7 jours tels qu'observées dans notre modèle de neurite (cf. Partie II-3). Inversement, la disruption de la BHS consécutive à une ligature partielle du nerf sciatique induirait une douleur neuropathique par une augmentation prolongée de la perméabilité vasculaire menant à une activation microgliale CCL2-dépendante et l'accumulation d'immunocytes dans la moelle spinale au niveau des afférences primaires (Echeverry et al., 2011).

Ces différences de perméabilité vasculaire, résultant de différences dans l'expression endothéliale endoneurale des protéines de jonctions adhérentes et serrées, pourraient résulter d'une implication différentielle des voies Wnt/ β -caténine et SHH dans nos différents modèles (condition contrôle, SNS, IoN-CCI).

En nous basant sur nos présents résultats et sur les données de la littérature, nous pouvons faire l'hypothèse de 3 états fonctionnels de la BHN (Figure II-57) :

- 1) un état basal, modélisé par la condition contrôle (injection) dans nos expériences, correspondant à une condition physiologique d'activation tonique de la voie SHH :
 - responsable de la synthèse Gli-1-dépendante des protéines de jonctions serrées dont Claudine-5 (probablement par la synthèse tonique de SHH, tel qu'impliquée dans le maintien de l'homéostasie de la BHE [Alvarez et al., 2011] ou dans le maintien de l'homéostasie de la barrière hémato-rétinienne [Walshe et al., 2011]),
 - sans activation significative de la voie Wnt/ β -caténine (absence de variations majeures des ARNm des effecteurs clés de cette voie)
 - se traduisant par une BHN imperméable et intacte ;
- 2) un état de perméabilité vasculaire aiguë (modélisé par la condition SNS dans nos expériences) résultant d'un stimulus inflammatoire aigu (comme par exemple un traitement par LPS [agoniste TLR4]) :
 - dans lequel l'activation de la voie Wnt/ β -caténine induit une diminution d'expression des ARNm des protéines de jonctions adhérentes (*VE-cadhérine*) et serrées (*Claudine-5*) mais également des marqueurs de la voie SHH comme *Gli-1*,
 - se traduisant subséquemment par une diminution d'expression des ARNm des protéines de jonctions serrées comme *Claudine-5* (dont la promotion est sous le contrôle de Gli-1),
 - menant toutes deux à une « ouverture » transitoire de la BHN ;
- 3) un état de perméabilité vasculaire chronique (modélisé par la condition CCI dans nos expériences) au sein duquel l'activation de la voie Wnt/ β -caténine concomitante de l'inhibition de la voie SHH se traduit par :
 - une diminution importante et prolongée de l'expression des ARNm des protéines des jonctions adhérentes et serrées,
 - une augmentation majeure de la perméabilité vasculaire endoneurale, permettant l'infiltration locale importante de substances algogènes et d'immunocytes (comparativement au modèle SNS),

- avec pour conséquences l'apparition d'une neuroinflammation locale importante, une sensibilisation périphérique et le développement d'une douleur neuropathique.

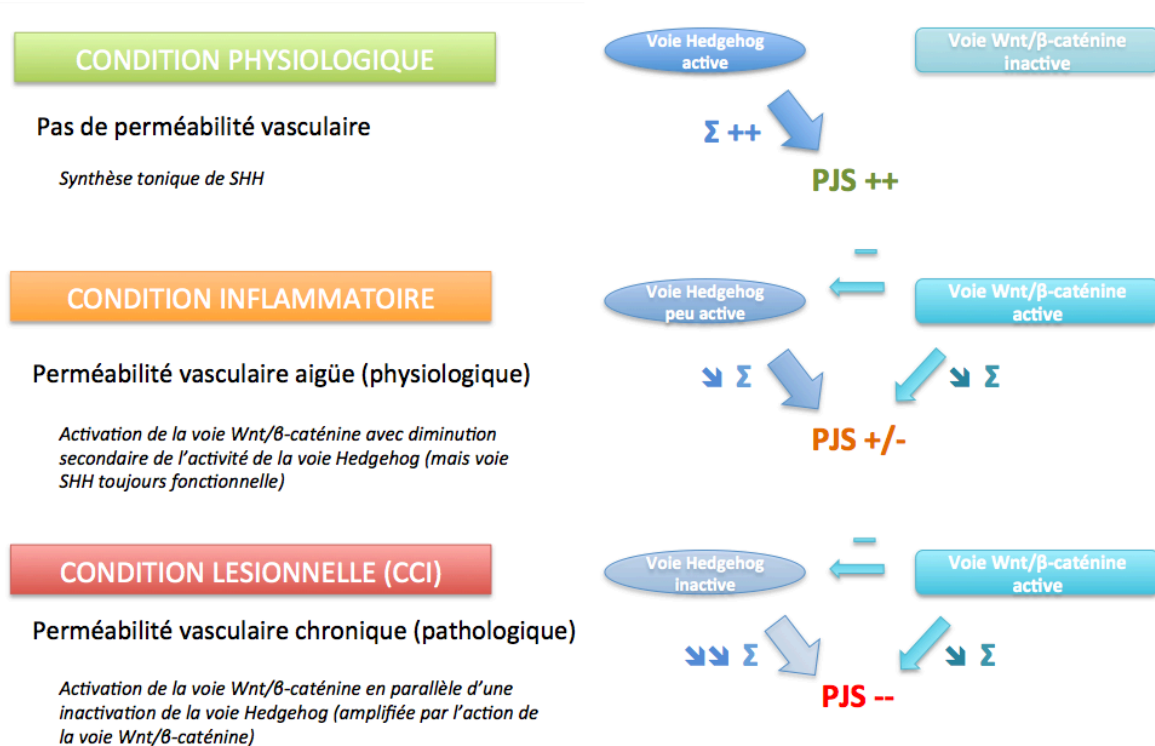


Figure II-57. Représentation schématique des interactions entre les voies SHH et Wnt/β-caténine dans la régulation de la synthèse des protéines de jonctions serrées dans les trois états fonctionnels de la barrière hémato-nerveuse. En condition physiologique, la voie SHH serait activée de façon tonique (tel que décrit par Alvarez et al., 2011 et Walshe et al., 2011) associée à une voie Wnt inactive (peut-être liée à la sécrétion de sFRP1 [He et al., 2006], voir tableau II-5) maintenant la synthèse (Σ) des protéines de jonctions serrées (PJS) au niveau de la BHN. En condition inflammatoire aiguë, l'activation de la voie Wnt/β-caténine (TLR4-dépendante par exemple) va entraîner une inhibition modérée de la synthèse de PJS, selon un mécanisme direct (effet inhibiteur de la β-caténine sur le promoteur de *Claudine-5*) et un mécanisme indirect (inhibition de la synthèse de *Claudine-5* par diminution de la synthèse de Gli-1), responsable d'une « ouverture » transitoire de la BHN. Enfin, en condition lésionnelle (inflammation chronique), l'activation de la voie Wnt/β-caténine associée à l'inhibition majeure de la voie SHH, se traduiront par une inhibition majeure de la synthèse des PJS et une disruption irréversible de la BHN.

Interactions signalétiques Wnt/ β -caténine/SHH et transition phénotypique entre neurite et neuropathie :

L'ensemble de nos résultats suggère que les différences d'altérations moléculaires et vasculaires pourraient résulter d'une inhibition majeure de la voie SHH dans le modèle de neuropathie mais pas dans celui de neurite.

Nous avons montré initialement, qu'après CCI du nerf sciatique, une augmentation transitoire de l'ARNm de *SHH* était observée, associée à une diminution significative de l'expression des ARNm des marqueurs de la voie SHH *Patched-1* et *Gli-1* suggérant que l'inhibition de la voie SHH après CCI ne proviendrait pas d'une diminution de production de SHH mais plutôt d'une diminution d'expression des effecteurs sous-jacents de cette voie de signalisation. De plus, la diminution d'expression de VE-cadhérine est associée à une désorganisation des protéines de jonctions adhérentes et serrées à la surface de la cellule (Gavard et Gutkind, 2008), ainsi qu'une perte de polarité cellulaire (Dejana et Orsenigo, 2013) induisant une perte des cils primaires de la cellule (Das et Storey, 2014), un composant essentiel de la membrane endothéliale nécessaire à une signalisation Hedgehog fonctionnelle (Das et Storey, 2014 ; Gazea et al., 2016). De fait, la diminution d'expression de VE-cadhérine induite par le CCI pourrait induire une perte de la polarité cellulaire endothéliale, avec perte subséquente des cils primaires et l'inhibition de la signalisation Hedgehog (Das et Storey, 2014 ; Gazea et al., 2016). Cette inhibition de la signalisation Hedgehog, expliquerait la diminution majeure d'expression de l'ARNm du récepteur *Smoothened* (et de ses effecteurs moléculaires sous-jacents) observée après CCI dans nos conditions expérimentales, ce dernier nécessitant en effet une architecture ciliaire fonctionnelle pour exercer ses effets biologiques (cf. Figure II-21 ; Pan et al., 2013). La VE-cadhérine semble donc jouer un rôle central dans la régulation de la perméabilité vasculaire endothéliale endoneurale, à l'instar du rôle de la N-cadhérine dans les cellules progénitrices neurales, au centre des interactions entre les voies Wnt et Hedgehog observées dans ces cellules (Miyamoto et al., 2015).

Dans le modèle CCI, les altérations du flux sanguin épineural induites par les ligatures autour du nerf induisent une ischémie nerveuse focale, qui est un mécanisme pathologique initial essentiel au développement du phénotype douloureux (Myers et al., 1993). L'hypoxie résultante (confirmée dans nos expériences via le marqueur *HIF-1 α*) pourrait déclencher la libération de VEGF par les macrophages résidents, ainsi que l'avaient suggéré Lim et al., (2014), induisant alors la phosphorylation et l'internalisation de la VE-cadhérine (Gavard et

Gutkind, 2006 ; Gavard, 2009). De plus, les contraintes de cisaillement générées par le flux sanguin altéré pourraient également induire la phosphorylation de VE-cadhérine (Orsenigo, 2012) menant également à son internalisation (par le complexe mécanosenseur VE-cadhérine/VEGFR2 [Coon et al., 2015]).

Outre les altérations hydrauliques vasculaires, le modèle CCI est également associé à des dommages hypoxiques au niveau du nerf, illustré dans nos conditions expérimentales par une augmentation significative d'expression du marqueur d'hypoxie *HIF-1α* et de la chimiokine *CCL2*, libérée dans le nerf périphérique lésé pour attirer les macrophages sur le site lésé, dans le cadre de la dégénérescence wallérienne physiologique (Sapienza et al., 2014 ; Van Steenwinckel et al., 2015). Etant donné que notre modèle de neurite implique la même procédure chirurgicale que le CCI (exception faite des ligatures), il peut être considéré comme une modélisation des dommages nerveux résultant du CCI. Ceci expliquerait les altérations similaires des niveaux d'expression des ARNm de *CCL2* et *HIF-1α* observées dans nos expériences, suggérant ainsi que les principales différences moléculaires et vasculaires observées entre les modèles de neurite et neuropathie résulteraient principalement de l'altération du flux sanguin épineural (induit par les ligatures) dans le modèle CCI.

Ainsi seraient également expliquées les différences dans la signalisation Hedgehog observées entre ces deux modèles, car l'internalisation de la VE-cadhérine (résultant à la fois de la libération de VEGF et de la détection des contraintes de cisaillement par le complexe mécanosenseur VEGFR2/VE-cadhérine) pourrait mener à une perte de la polarité cellulaire, avec perte des cils primaires et perte d'une signalisation Hedgehog fonctionnelle.

Nous proposons dans la Figure II-58 une modélisation (simplifiée) des mécanismes moléculaires responsables de la disruption de la BHN après CCI, sous forme de synthèse de nos résultats étayée par les données existantes de la littérature.

Lorsqu'on considère les différences entre les modèles de neurite et de neuropathie, il est plausible que les lésions nerveuses induisant des dommages hypoxiques sévères et des contraintes de cisaillement majeures (comme par exemple les transections nerveuses ou les axonotmesis sévères) induisent une perméabilité chronique de la BHN (résultant de l'internalisation de VE-cadhérine et de l'inhibition de la signalisation Hedgehog) et le développement subséquent d'une douleur neuropathique, alors que des lésions nerveuses moins sévères (comme une compression nerveuse transitoire ou un axonotmesis léger) induiront une neuroinflammation aiguë réversible (résultant de « l'ouverture » réversible de la BHN en conséquence de l'activation de la signalisation Wnt/ β -caténine uniquement) qui se terminera par la cicatrisation du nerf lésé et la disparition de la douleur.

Au final, la douleur neuropathique périphérique post-traumatique (telle que modélisée dans le modèle IoN-CCI par exemple) pourrait être considérée comme une pathologie de la perméabilité vasculaire chronique.

II-5-2 Morphogènes et douleurs pathologiques

Nos présents travaux ont montré le rôle majeur de l'interaction signalétique entre les deux voies morphogénétiques Sonic Hedgehog et Wnt/ β -caténine dans la régulation de la perméabilité vasculaire endoneurale des nerfs périphériques après traumatisme nerveux local.

Les voies de signalisation Hedgehog et Wnt ont des caractéristiques distinctes mais sont également relativement similaires avec suffisamment de composants communs pour indiquer une probable origine évolutive commune (Hooper et Scott, 2005). Les ligands des deux voies nécessitent leur palmitoylation par des acyl transférases (les protéines Wnt par Porcupine et les protéines Hh par Skinny Hh (Ski ; ou Rasp)) et les deux nécessitent également des protéoglycanes modifiés par héparanes-sulfates pour le transport ou la présentation à leurs récepteurs spécifiques (*Frizzled* et *Patched*). Les voies de signalisation sont activées par des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (DTM) qui ont des similitudes de séquences importantes (*Smoothed [Smo]* pour Hh et *Frizzled [Fzd]* pour Wnt). Les deux voies utilisent des protéines transmembranaires accessoires pour réguler le récepteur à 7 DTM (*Patched* pour Smo ; *Arrow* pour Fzd). Chaque voie est médiée par un complexe cytoplasmique qui peut être échafaudé pour l'amener à Smo ou Fzd. Ces complexes régulent la phosphorylation, dégradation et l'accès nucléaire d'un facteur de transcription

(Cubitus interruptus (Ci)/GLI pour Hh, β -caténine pour Wnt). Dans chaque cas, GSK3 β et *Caséine kinase I* (CKI) ciblent le facteur de transcription pour l'ubiquityler par *Supernumerary limbs* (Slmb) ; ceci est crucial pour bloquer la signalisation en l'absence de ligand. *Suppressor of Fused* (Sufu) est retrouvé dans les complexes avec β -caténine de même qu'avec Ci et fonctionne comme un régulateur négatif dans les deux voies de signalisation. De façon remarquable, dans *Drosophila melanogaster*, les gènes qui codent les facteurs de transcription des deux voies de signalisation, ci et tcf, sont localisés de façon tellement proche sur le génome qu'ils peuvent être influencés par la même petite mutation génique (Hooper et Scott, 2005).

De manière générale, les molécules participant au développement du système nerveux (i.e. les morphogènes) ont généralement des rôles importants dans le système nerveux adulte, en particulier après lésion. A titre d'exemples, citons : la signalisation de la neurotrophine, les effets inhibiteurs des sémaphorines après lésion ou l'acquisition d'une signalisation netrine-Unc/DCC dans les cellules de Schwann adultes. Il est intéressant de noter que la réémergence de ces fonctions à l'âge adulte ouvre de nouvelles opportunités thérapeutiques (Martinez et al., 2015).

La famille des gènes Hedgehog est impliquée de façon importante dans le développement, de la différenciation cellulaire à la spécification, chaque membre de la famille Hedgehog (SHH, IHH, DHH) présentant des fonctions différentes durant la morphogénèse, la différenciation et la spécification cellulaire. Le morphogène SHH, le plus étudié de cette famille, est impliqué dans la différenciation des neurones moteurs et joue un rôle essentiel dans le guidage des axones commissuraux dans la moelle épinière. Les rôles spécifiques de l'expression de SHH sont la ventralisation du SNC, la répartition antéro-postérieure des membres à travers la zone d'activité polarisante dans la plaque du plancher de la moelle spinale, ainsi que la différenciation et spécification des neurones moteurs. SHH agit comme un morphogène et un signal de guidage avec des effets chimio-attractifs ou chimio-répulsifs.

L'expression de SHH a également été montrée dans les neurones sensitifs des GRD. De façon intéressante, la réexpression de SHH était observée dans les axones en cours de régénération après lésion nerveuse périphérique (Xu et al., 2008). Au niveau des zones de compression du nerf sciatique, des augmentations de la quantité d'ARNm (et de la protéine correspondante) de SHH à 24h et 7 jours post-lésionnels étaient ainsi observées dans les axones au niveau de ces zones de régénération (Xu et al., 2008).

Martinez et al. (2015) ont montré les données suivantes :

- SHH et son complexe récepteur (*Patched* et *Smoothened*) sont exprimés dans les neurones sensitifs primaires adultes, surtout au niveau cytoplasmique mais également nucléaire ;
- L'axotomie entraîne une augmentation du niveau de transcription de SHH dans les GRD et dans les parties proximales des nerfs périphériques lésés ;
- L'axotomie entraîne également une augmentation de la transcription de *Smoothened*;
- Les neurones sensitifs adultes ont moins de croissance et moins de ramifications chez les KO SHH *in vitro* ;
- SHH ne semble pas jouer le rôle de guide du cône de croissance axonale pour les neurones sensitifs adultes ;
- Les nerfs périphériques en cours de régénération présentent moins d'extension axonale et moins de croissance des cellules de Schwann quand le SHH endogène est diminué (KO).

Selon ces auteurs, le comportement et l'expression de SHH observés dans leurs conditions expérimentales illustrent que les molécules du développement persistent et sont actives chez l'adulte, surtout durant la régénération nerveuse. Cependant, leur mode de fonctionnement et les cellules au sein desquelles elles sont exprimées peuvent grandement différer chez l'adulte, par rapport à leur expression initiale au cours du développement (Martinez et al., 2015).

De façon intéressante, nos résultats concernant les marqueurs de la voie Hedgehog dans nos modèles de neuropathies périphériques sont à l'opposé de ceux de Martinez et al., 2015 dans leur modèle lésionnel (axotomie [section complète] du nerf sciatique). Nos résultats interrogent sur le lien entre une voie Hedgehog dysfonctionnelle et le développement d'une neuropathie périphérique. *En effet, le pic transitoire de SHH observé après CCI du nerf sciatique pourrait-il correspondre au démarrage d'un signal réparateur qui ne serait pas maintenu dans le temps, se traduisant par une cicatrisation dysfonctionnelle du nerf et le maintien d'une hypersensibilité douloureuse pendant plusieurs mois ?*

De plus, au niveau central, il a été montré précédemment que lorsque le cerveau ou la moelle épinière sont lésés, les cellules gliales au niveau du site lésionnel subissent des changements biochimiques et morphologiques se traduisant par la formation d'une cicatrice gliale. Cette cicatrice est à la fois bénéfique et délétère à la cicatrisation et la réparation tissulaire (Rodriguez et al., 2014). Dans les premières phases de la cicatrisation, les astrocytes forment

une barrière qui empêche la pénétration des macrophages et lymphocytes au niveau des zones non lésées. A l'inverse, dans des stades plus tardifs, les astrocytes, mais également les oligodendrocytes dégénérés, les cellules progénitrices d'oligodendrocytes et les cellules méningées créent une barrière biochimique empêchant la régénération axonale. Il est intéressant de noter que le blocage de la signalisation Wnt canonique dans les cellules progénitrices d'oligodendrocytes conduit à une diminution de leur effet post-lésionnel anti-régénératif mais également à une diminution des effets anti-régénératifs de la microglie et des astrocytes (Rodriguez et al., 2014). Ainsi, ces réactions gliales réduites créeraient un environnement favorisant la régénération et la réparation axonale. Les neurones adultes ne seraient donc pas dénués de potentiel de régénération axonale, mais l'environnement du SNC lésé ne serait pas permissif à cette régénération.

Compte-tenu de l'activation de la voie Wnt dans notre modèle de neuropathie périphérique, « l'hyperactivité » de la voie Wnt pourrait-elle empêcher la régénération axonale périphérique après CCI à l'instar de son effet anti-régénératif décrit au niveau central ? (Inversement, compte-tenu des différences de régénération entre le SNP et le SNC, il est possible que la voie Wnt activée n'exerce pas un tel effet anti-régénératif au niveau périphérique).

Globalement, il est possible d'émettre l'hypothèse que l'association d'une voie Hedgehog dysfonctionnelle associée à une voie Wnt hyperfonctionnelle puisse participer à un effet global anti-régénératif dans le nerf périphérique lésé, responsable d'une cicatrisation dysfonctionnelle, dont la douleur persistante pourrait en être une illustration phénotypique majeure.

Par ailleurs, des travaux plus anciens suggèrent que la régénération nerveuse pourrait être considérée comme une réminiscence du développement, suggéré notamment par des profils d'expression géniques similaires dans le développement et lors de la régénération nerveuse (Bonilla et al., 2002). Ainsi, la réémergence de molécules de guidage axonal serait essentielle dans la restauration de la connectivité axonale (Fournier et Strittmater, 2002). Wallquist et al. ont ainsi montré que les nerfs sciatiques lésés de rats (par transection ou compression) exprimaient les mêmes laminines (laminine 2 et 8) au cours de la régénération axonale qu'au cours du développement post-natal (Wallquist et al., 2002). De plus, Nguyen et al. ont montré que les axones lésés (après axotomie) régénéraient selon la même distribution anatomique

initiale, restituant ainsi l'innervation de façon quasi-identique, guidés notamment par la persistance des membranes endoneurales et périneurales (Nguyen et al., 2002), récapitulant ainsi -au moins partiellement- la croissance axonale au cours du développement.

Dans le contexte de nos présents travaux, la constriction chronique du nerf infra-orbitaire induisait une inhibition de la voie SHH conjointement à une activation de la voie Wnt/ β -caténine au niveau des cellules endothéliales endoneurales, en opposition avec une voie Hedgehog -a priori- fonctionnellement active et une voie Wnt/ β -caténine peu ou pas active en condition physiologique. Compte-tenu du rôle de la synthèse tonique de SHH dans le maintien de l'homéostasie de la BHE tel que décrit par Alvarez et al. (2011) et de l'absence de signalisation Wnt/ β -caténine en condition basale, on peut émettre l'hypothèse que dans le système nerveux périphérique, la voie Hedgehog est activée de façon tonique pour maintenir l'intégrité de la BHN, dont la perméabilité sera modulée, lorsque nécessaire, par une modulation fine et transitoire de l'expression des protéines de jonctions serrées par la voie Wnt/ β -caténine (au carrefour de nombreuses autres voies de signalisation cellulaires essentielles, comme par exemple les TLR).

Dans nos paradigmes expérimentaux, la constriction chronique du nerf infra-orbitaire semble induire une rupture de l'homéostasie morphogénétique périphérique.

II-5-3 Intérêts thérapeutiques de la modulation de perméabilité de la barrière hémato-nerveuse

Au delà des aspects pathologiques de l'altération de la perméabilité de la barrière hémato-nerveuse, certains auteurs ont suggéré un intérêt thérapeutique de la modulation contrôlée de cette barrière, notamment pour faciliter la diffusion intra-neurale d'agents pharmacologiques. Ainsi, l'ouverture régulée et réversible de la BHN a été explorée pour développer de nouvelles stratégies afin d'améliorer la distribution de drogues au niveau du SNP, améliorant ainsi leur efficacité et limitant les effets indésirables centraux de certains médicaments, notamment les opioïdes (Hackel et al., 2012).

Perméabilisation de la BHN à but thérapeutique :

Lim et al. (2014) ont montré que le ProTX-II, un peptide bloquant le canal ionique Nav1.7 mais ne passant pas la BHN, pouvait prévenir l'allodynie mécanique observée dans leur modèle de douleur neuropathique, un effet probablement limité au site lésionnel (à l'endroit où la BHN est altérée). De fait, des substances telles que le ProTX-II, avec une action limitée aux nerfs périphériques à BHN atteinte et qui ne traversent pas les barrières non altérées (BHE/BHS) pourraient être une nouvelle option thérapeutique pour les neuropathies périphériques avec des effets secondaires limités. Dans le cas particulier du ProTX-II, les effets seraient ainsi limités aux nerfs lésés (Lim et al., 2014).

Une façon de manipuler la BHN pour des applications thérapeutiques serait de modifier la fonction endothéliale via l'utilisation d'oligonucléotides, siRNAs ou de vecteurs viraux. Comme les cellules endothéliales sont les seules cellules en contact avec les constituants sanguins dans le SNP, elles peuvent être aisément manipulées via le système circulatoire. Une autre option serait de modifier les péricytes de la BHN : de petites substances hydrophobes pouvant atteindre la membrane péricytaire à travers la monocouche endothéliale et renforcer l'activité péricytaire (incluant la libération de diverses cytokines/chémokines influençant la fonction endothéliale) seraient de bons médicaments candidats pour contrôler la fonction de la BHN. Cette deuxième approche semble plus prometteuse car la manipulation indirecte des cellules endothéliales via la modulation de la libération de facteurs humoraux par les péricytes, semble plus physiologiquement probante que la modification directe des cellules endothéliales (Kanda, 2013).

En 2012, Rittner et al. ont proposé d'injecter du sérum salin hypertonique pour ouvrir la barrière périneurale, par diminution de la synthèse périneurale de Claudine-1. L'effet durait plus de 6 heures alors que la concentration saline des tissus se normalisait après 15 minutes. Cette modulation de la barrière périneurale pourrait faciliter l'analgésie opioïde périphérique (Rittner et al., 2012).

De plus, certains auteurs ont montré que le *recombinant tissue plasminogen activator* (rtPA) pouvait ouvrir la barrière périneurale via LRP-1, la phosphorylation de Erk, l'augmentation d'expression de miR183-5p et la diminution d'expression de Claudine-1, facilitant la diffusion de molécules analgésiques hydrophiles au sein du nerf périphérique (Yang et al., 2016).

Imperméabilisation de la BHN à but thérapeutique :

Les corticostéroïdes représentent le traitement de première ligne des polyneuropathies inflammatoires démyélinisantes chroniques (PIDC). Il a été montré récemment qu'ils agiraient notamment en améliorant la fonction de barrière de la BHN via une surexpression de la Claudine-5. En effet, l'hydrocortisone augmente l'expression de Claudine-5 associée à une augmentation des propriétés de barrière de la BHN (évaluée par augmentation de la résistance électrique trans-endothéliale) (Kashiwamura et al., 2011).

Certains auteurs ont suggéré -quant à eux- l'utilisation d'inhibiteurs de miRNAs pour lutter contre les pathologies liées à une hyperperméabilité de la BHN (Yang et al., 2016).

Troisième partie :

**Perspectives en recherche translationnelle :
hypothèse du priming inflammatoire dans le
développement des douleurs neuropathiques
trigéminales post-traumatiques**

III - Perspectives en recherche translationnelle : hypothèse du priming inflammatoire dans le développement des douleurs neuropathiques trigéminales post-traumatiques

Les résultats précédemment décrits soulignent le rôle majeur de l'altération de la perméabilité vasculaire endoneurale dans le développement de la douleur neuropathique périphérique post-traumatique. Ils font émerger de nouvelles molécules et voies moléculaires clés dans la physiopathologie de ces douleurs pathologiques qui pourraient servir de biomarqueurs et permettent d'envisager de nouvelles perspectives en recherche translationnelle sur les douleurs neuropathiques. Nous avons cherché à appliquer ces données dans notre domaine d'intérêt clinique : les douleurs neuropathiques trigéminales post-traumatiques.

III-1 Contexte clinique : les Douleurs Neuropathiques Trigéminales Post-Traumatiques iatrogènes

Les Douleurs Neuropathiques Trigéminales Post-Traumatiques définissent un sous-type particulier de neuropathies trigéminales, qui malgré de nombreuses caractéristiques communes aux douleurs neuropathiques, présentent des spécificités physiopathologiques (Latrémolière et al., 2008 ; Dauvergne et al., 2014) et thérapeutiques (Haviv et al., 2014) notables.

Récemment, Benoliel et al. (2012) ont défini la Douleur Neuropathique Trigéminal Post-Traumatique (DNTPT) comme une douleur neuropathique résultant d'un trauma physique ou chirurgical de la région oro-faciale, se présentant sous la forme de signes cliniques positifs (douleur spontanée, hyperalgésie, allodynie) ou négatifs (hypoesthésie) (Benoliel et al., 2012 a, b). Cette sémiologie peut être appréhendée par les explorations neurophysiologiques complexes telles que l'électrophysiologie, de tests sensoriels quantitatifs (*Quantitative Sensory Testing*) ou de questionnaires (Eliav et al., 2007).

La prévalence de telles pathologies neuropathiques chroniques a été estimée entre 0,5 et 12% des cas, après chirurgie orale, incluant les traitements endodontiques orthogrades, la chirurgie apicale, les avulsions dentaires, les énucléations kystiques, la chirurgie orthognathique ou la

chirurgie implantaire (Benoliel et al., 2012 a, b). La prévalence pourrait varier selon différents facteurs, dont l'âge, le sexe, le degré de lésion nerveuse, le type de chirurgie, la technique chirurgicale et la présence de douleurs préopératoires (Polycarpou et al., 2005 ; Nixdorf et al., 2010 ; Klasser et al., 2011).

Concernant ce dernier facteur de risque, la majorité des douleurs dentaires (consécutives à des lésions carieuses ou des maladies parodontales) sont générées par des micro-organismes, déclenchant des réactions inflammatoires locales et exposant les neurones afférents primaires à de nombreuses substances algogènes. Nombre de ces substances algogènes sont connues pour induire des changements phénotypiques et fonctionnels des nerfs et de leur environnement glial, immunitaire et vasculaire (Ren et Dubner, 2010 ; Ji et al., 2014).

Ainsi, un trauma nerveux se produisant dans un environnement local inflammatoire pourrait favoriser l'apparition d'une douleur neuropathique post-traumatique.

III- 2 L'hypothèse du « priming inflammatoire » dans la genèse des DNTPT

Afin d'évaluer l'hypothèse d'une sensibilisation inflammatoire (« priming inflammatoire ») dans la genèse des douleurs neuropathiques trigéminales post-chirurgicales, nous avons réalisé une analyse rétrospective d'une cohorte de patients ayant eu un diagnostic de DNTPT dans l'objectif de rechercher des antécédents de contextes inflammatoires locaux précédents le trauma chirurgical responsable de la douleur neuropathique.

III-2-1 Observations cliniques sur 56 cas de DNTPT

Cette étude rétrospective portait sur l'analyse des dossiers médicaux des patients ayant consulté à la consultation de douleurs oro-faciales du service d'odontologie de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière entre le 03/09/2012 et le 19/12/2014. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique local du service et une autorisation de collection et utilisation des données de patients a été obtenue par la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) sous le numéro #1839648.

Toutes les consultations ont été réalisées par le même praticien sénior (Pr Yves BOUCHER) selon la méthodologie précédemment décrite par Benoliel et al. (Benoliel et al., 2012 b).

La consultation standardisée comportait :

- 1) un interrogatoire sur les antécédents médico-chirurgicaux du patient, incluant les traitements en cours, les comorbidités de la douleur, les antécédents de trauma crânien/spinal, l'état psychologique ainsi qu'un examen sommaire des paires crâniennes ;
- 2) un interrogatoire spécifique sur la douleur et ses caractéristiques incluant le décours temporel, la qualité, les signes autonomiques associées, le retentissement sur le sommeil ;
- 3) un examen clinique exo-buccal incluant la palpation des muscles faciaux, masticateurs et cervicaux, la palpation de la région de l'articulation temporo-mandibulaire ainsi qu'une évaluation cinétique de l'articulation temporo-mandibulaire ;
- 4) un examen clinique endo-buccal incluant les tests de sensibilité pulpaire mécanique/thermique/électrique, l'examen des muqueuses de la cavité orale, avec une attention particulière portée à la recherche de signes d'hypoesthésies/hyperesthésies (à l'aide d'une sonde d'examen [stimulus vif] ou du manche d'un miroir [stimulus contondant]) ou allodynie (par frottement digital) des différentes régions d'innervation trigéminal ;
- 5) des examens complémentaires d'imagerie dentaire et/ou faciale (le cas échéant).

La qualité des traitements endodontiques était évaluée radiographiquement par des clichés standards (radiographies rétro-alvéolaires) complétés lorsque nécessaire par une imagerie tridimensionnelle CBCT (en cas de doute persistant), selon les critères de qualité définis dans la conférence de consensus de la Société Européenne d'Endodontie (European Society of Endodontology, 2006).

Les patients étaient adressés à différents spécialistes (neurologue, ORL, ...) lorsque jugé nécessaire.

Le diagnostic de DNTPT était posé selon les critères de Benoliel et al. (2012 b), c'est à dire remplissant les critères de A à E :

A – Une douleur spontanée ou provoquée par le tact affectant principalement le champ récepteur d'une ou plusieurs divisions du nerf trijumeau. La douleur peut être épisodique (allant de quelques minutes à quelques jours) mais peut aussi être constante.

B – Une douleur se développant dans les 3 mois après un évènement traumatique au niveau de la région douloureuse ou de sa zone d'innervation et qui dure depuis plus de 3 mois.

C – Au moins un signe clinique de dysfonction neurologique évidente : un signe positif (hyperalgésie, allodynie, tuméfaction ou érythème) et/ou négatif (anesthésie, hypoesthésie).

D – Un examen d'imagerie ou d'exploration neurophysiologique démontrant une lésion nerveuse et sa localisation. Dans le contexte clinique de cette étude, les traitements endodontiques et les avulsions dentaires étaient considérés comme une preuve de lésion nerveuse (compte-tenu de la désafférentation obligatoire résultant de ces thérapeutiques).

E – Douleur attribuable à aucune autre pathologie identifiable.

Pour chaque dossier de patient ayant eu une DNTPT diagnostiquée, les éléments suivants étaient colligés : âge ; sexe ; antécédents médico-chirurgicaux ; diagnostic ; description du tableau douloureux incluant la topographie, la présence de descripteurs évocateurs de douleurs neuropathiques (tels que définis dans le questionnaire DN4 : brûlure, picotements, fourmillements, chocs électriques, allodynie), l'évolution au cours de la journée, l'intensité douloureuse mesurée sur une échelle visuelle analogique, l'historique de la douleur (présence ou absence de douleurs antérieures, dates des traitements dentaires antérieurs); la date et la nature des traitements dentaires antérieurs (traitements restaurateurs, endodontiques ou chirurgicaux). Les données collectées ont été transcrites dans un fichier EXCEL (Microsoft) et anonymisées avant leur analyse.

Au total, 268 dossiers de patients ont été identifiés dans la période d'intérêt. Parmi eux, 229 ont pu être récupérés et 56 cas ont été diagnostiqués « DNTPT ».

Cette cohorte de patients était composée de 6 hommes (11%) et 50 femmes (89%, dont 55% étaient ménopausées). L'âge des patients allait de 32 ans à 89 ans, avec un âge moyen de 54.0 ± 14.4 ans. Seuls 13% des patients n'avaient aucun antécédent médical notable. La majorité avait une ou plusieurs comorbidités, principalement de l'ostéoarthrite (21%, n=12), des céphalées (18%, n=10), de l'hypertension artérielle (18%, n=10) ou un antécédent de trauma (chutes, traumatisme cervical, coups...) (11%, n=6). Au total, 82% des patients (n=46) avaient au moins une pathologie chronique (hépatite, diabète, hypercholestérolémie...) au moment de la consultation. De plus, 27% des patients (n=15) rapportaient un stress chronique (résultant de problèmes familiaux ou professionnels sévères) et 23% (n=13) avaient des antécédents psychologiques/psychiatriques connus (dépression, schizophrénie...) ; 37,5% des patients (n=21) combinaient un contexte de stress chronique et des antécédents psychologiques/psychiatriques.

Caractéristiques de la douleur :

Les différentes localisations douloureuses sont résumées dans la Figure III-1. Dans certains cas, la douleur pouvait être présente simultanément dans plusieurs localisations.

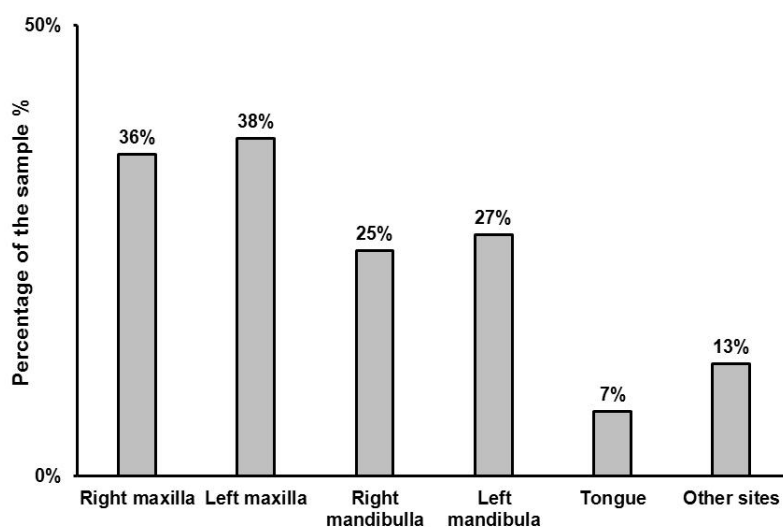


Figure III-1. Localisations douloureuses des DNTPT dans la cohorte étudiée. A noter que certains patients avaient plusieurs localisations douloureuses simultanées (expliquant la somme des pourcentages supérieure à 100).

La majorité des descripteurs de la douleur (Figure III-2) correspondaient aux descripteurs classiques évocateurs de douleurs neuropathiques, bien que 88% des patients (n=49) présentaient également des plaintes plus atypiques (ex : sensation de gonflement). Par ailleurs, une allodynie mécanique était présente dans 34% des cas (n=19).

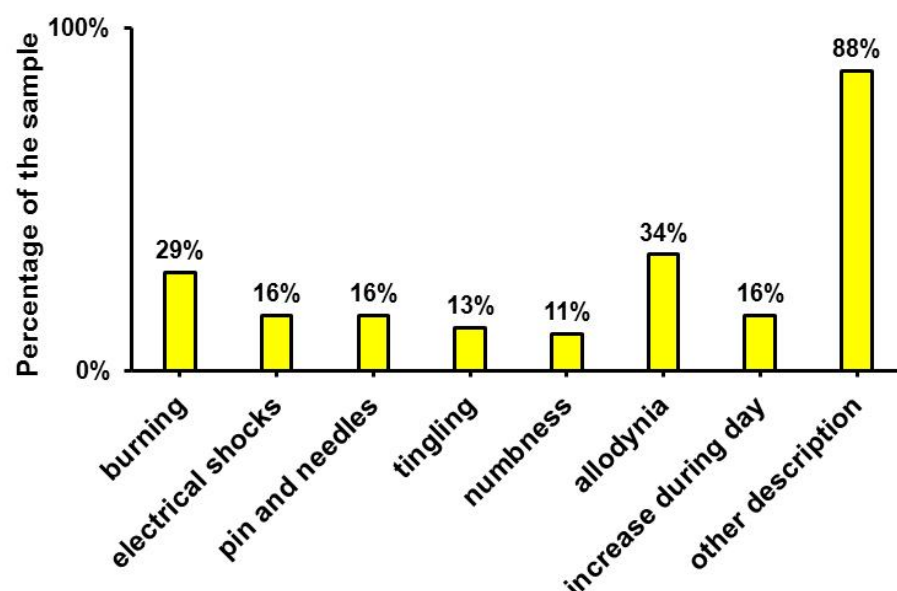


Figure III-2. Principaux descriptifs de la douleur rapportés par les patients ayant une DNTPT. La plupart de ces descriptifs rapportés correspondent aux descriptifs habituels des douleurs neuropathiques, mais étonnamment 88% des patients avaient des descriptions plus atypiques (ex : sensation de gonflement).

Historique de la douleur :

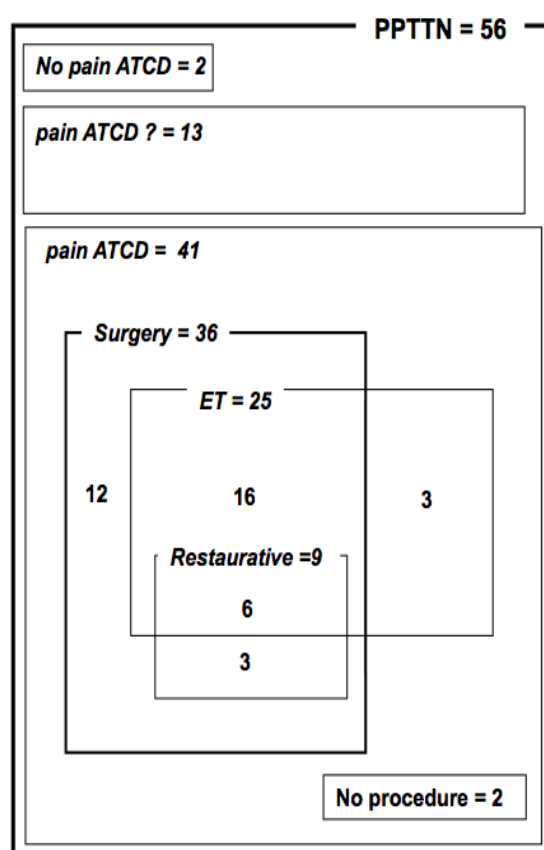
Environ deux-tiers des patients de la cohorte (73%, n=41) rapportaient des antécédents douloureux locaux avant le diagnostic de DNTPT, 4% (n=2) ne rapportaient aucun antécédent douloureux préalable et 23% (n=13) n'étaient pas capable de se rappeler la présence ou non d'antécédents douloureux locaux. Parmi ces 41 patients ayant un antécédent douloureux identifié avant l'apparition de la DNTPT, les traitements dentaires reçus avant l'apparition de la douleur neuropathique étaient, par ordre de fréquence décroissante :

- 1) des traitements chirurgicaux (88%, n=36) dont des avulsions dentaires, des énucléations kystiques ou des chirurgies apicales ;
- 2) des traitements endodontiques (61%, n=25) ;
- 3) des traitements restaurateurs (22%, n=9), en prenant en compte le fait que tous ces patients ont fini par avoir un traitement endodontique ou une avulsion dentaire.

Seuls 2 patients (5%) de cette cohorte n'ont reçu aucun de ces types de traitements. Un des deux patients rapportait que sa douleur (neuropathique) serait apparue après une inflammation gingivale douloureuse causée par une couronne débordante ; le deuxième patient se rappelait

avoir eu des antécédents douloureux de nature différente de la douleur neuropathique diagnostiquée, sans être capable de se rappeler la cause de tels antécédents douloureux. Ces résultats sont résumés dans la Figure III-3.

Figure III-3. Représentation schématique des différents patients ayant eu un diagnostic de Douleur Neuropathique Trigéminal Post-Traumatique. Dans cette cohorte, 56 patients avaient eu un diagnostic de Douleur Neuropathique Trigéminal Post-Traumatique (Painful Post-Traumatic Trigeminal Neuropathy, PPTN). Parmi ces patients, 2 ne rapportaient aucun antécédent douloureux avant le développement de la neuropathie, 13 patients ne se rappelaient plus et 41 patients rapportaient un antécédent douloureux local, dont 36 avaient eu une intervention chirurgicale, 25 un traitement endodontique (ET) et 9 des soins restaurateurs.



Ainsi, dans cette étude, quasiment trois-quarts des patients (73%) ayant eu un diagnostic de DNTPT rapportaient un antécédent douloureux au niveau dentaire ou gingival avant le traitement dentaire ayant engendré la neuropathie.

La grande majorité de ces patients (95%, 39 patients sur 41) avaient eu des traitements dentaires compatibles avec la présence d'une pathologie inflammatoire locale avant le trauma nerveux.

Ces données pourraient soutenir l'hypothèse d'un « priming » inflammatoire des afférences dentaires primaires, les rendant plus susceptibles au développement d'une neuropathie en cas de trauma local.

III-2-2 Rationnel biologique : rôle de l'inflammation orale médiée par le LPS bactérien et activation de la voie TLR4

Cette hypothèse d'une sensibilisation inflammatoire préalable au développement de la neuropathie post-traumatique pourrait être sous-tendue par un rationnel biologique impliquant l'activation de la voie TLR4, dont les rôles majeurs dans le développement de la neuropathie post-CCI ont été développés dans la partie précédente de ce travail.

Le rôle de la neuroinflammation dans le développement de la douleur chronique est un phénomène déjà bien documenté (Ren et Dubner, 2010 ; Ji et al., 2014). L'exposition à des médiateurs inflammatoires peut altérer les propriétés phénotypiques et fonctionnelles des neurones sensitifs primaires, pouvant conduire au développement de la douleur neuropathique. Par exemple, la chimiokine CCL2, une des molécules clés du développement de la douleur neuropathique, pourrait être libérée par des odontoblastes après stimulation bactérienne (Farges et al., 2013) et activer les cellules gliales du ganglion trigéminal et du complexe sensitif trigéminal (Dauvergne et al., 2013).

D'autres molécules inflammatoires telles que des chimiokines, des cytokines, des matrix métalloprotéases peuvent favoriser une telle sensibilisation neuronale, médiées principalement par les cellules gliales (Tanga et al., 2005 ; Ren et Dubner, 2010). Par exemple, la stimulation des récepteurs TLRs par des PAMPs ou DAMPs se traduit par une activation neuronale, gliale et vasculaire et le développement d'une neuroinflammation (Milligan et Watkins, 2009 ; Hains et al., 2010 ; Hoogerwerf et al., 2010 ; Henn et al., 2011 ; Ohara et al., 2013).

De plus, certains travaux ont montré que les cellules gliales peuvent être sensibilisées par un challenge immunitaire initial induisant des réponses potentialisées lors d'un futur challenge immunitaire (concept de « priming » ou « two-hit model »). Par exemple, l'induction de protéines accessoires telles que les *Heat Shock Proteins* (HSP) se traduit par une allodynie après des doses plus faibles de LPS intrathécal. Ainsi, l'augmentation d'expression de protéines accessoires de la signalisation TLR4 pourrait participer à la « sensibilisation » de cette voie de signalisation (Nicotra et al., 2012), mais aussi à la genèse de douleurs référées linguales liées à une inflammation pulpaire (Ohara et al., 2013).

Récemment, il a été montré que les nocicepteurs pouvaient être directement activés par des pathogènes, contribuant directement à l'apparition de la douleur lors d'infections. Les bactéries gram-négatives sécrètent du LPS responsable de l'activation de canaux TRPA1 au niveau des nocicepteurs périphériques, mais également d'une sensibilisation des récepteurs TRPV1 via la signalisation TLR4 (Chiu et al., 2016). En outre, il a été montré que le LPS bactérien était capable de sensibiliser les neurones trigéminaux TRPV1⁺ dans la pulpe dentaire via l'activation de TLR4 (Diogenes et al., 2011 ; Ferraz et al., 2011). Il est également intéressant de noter que l'inflammation de la pulpe dentaire induit des changements de phénotypes neuronaux. Par exemple, les canaux Na_v1.8 (insensibles à la tétrodotoxine) sont surexprimés dans l'inflammation chronique pulpaire, ces canaux étant spécifiquement impliqués dans le développement de la douleur neuropathique (Renton et al., 2005).

Ces données suggèrent que l'inflammation bactérienne pourrait induire des changements phénotypiques neuronaux, responsables d'une augmentation du risque de douleur neuropathique après trauma nerveux au sein d'une zone inflammatoire.

Le récepteur TLR4 endothélial fonctionne comme le premier système sentinelle intra-vasculaire pour détecter les bactéries sanguines (Andonegui et al., 2009). Dans nos conditions expérimentales, la stimulation de la voie TLR4 par les bactéries buccales (par exemple : *Porphyromonas gingivalis*, dont le LPS a été montré capable d'activer la voie Wnt/ β -caténine dans un modèle d'inflammation de cellules souches de la papille apicale dentaire [Wang et al., 2013]) pourrait favoriser le développement d'une neuroinflammation locale tel que montré dans nos précédents résultats (cf. partie II) et participer à la sensibilisation nerveuse périphérique favorisant le développement d'une neuropathie périphérique post-traumatique.

III – 3 Approche expérimentale : Etude de la stimulation préemptive TLR4 dans un modèle de neurite et un modèle de neuropathie trigéminales

Dans l'objectif d'étudier la validité du rationnel biologique sous-tendant l'hypothèse du « priming inflammatoire » dans le développement des DNTPT, nous avons étudié les effets de la stimulation préemptive TLR4 dans un modèle de neurite (le SNS) et un modèle de neuropathie (IoN-CCI) trigéminales.

Des rats Sprague-Dawley mâles (200-250g) ont été séparés en 3 groupes : CCI, SNS et Injection (condition contrôle). Les rats de chaque groupe ont été injectés 2 fois par semaine pendant 4 semaines avec une injection péri-neurale de 50 µL de LPS (1 µg/mL) pour la moitié des rats ou de véhicule (NaCl 0,9%) pour l'autre moitié. Après la dernière injection, les rats ont été soumis respectivement à un CCI ou un SNS du nerf infra-orbitaire droit ou n'étaient pas lésés (groupe contrôle) (voir section II-3 pour le détail des techniques).

Il a été choisi 4 semaines de stimulation afin de permettre l'instauration (plus lente) d'éventuels changements au niveau du ganglion trigéminal. En effet, un premier protocole d'injection sur 4 jours consécutifs n'avait pas permis d'observer de modification au sein du ganglion trigéminal (données non présentées).

A 6 heures post-lésion (CCI ou SNS), les rats des trois groupes ont été sacrifiés par overdose d'isoflurane et les nerfs infra-orbitaires bilatéraux et le ganglion trigéminal ipsi-latéral (coté droit) ont été prélevées pour dosage par RT-PCR semi-quantitative des ARNm de marqueurs d'intérêts (voir section II-3 pour les détails).

III-4 Premiers résultats

III-4-1 Altérations moléculaires différentielles dans les modèles IoN-SNS et IoN-CCI après prétraitement par LPS

Six heures après la dernière injection de LPS ou son véhicule (NaCl 0,9%), une diminution d'expression significative des ARNm de *Claudine-1*, *Claudine-5*, ainsi que *Gli-1* était observée chez les rats soumis à CCI par rapport au groupe ayant reçu une injection de NaCl

(groupe contrôle), sans effet de l'injection LPS hormis pour le marqueur *Gli-1*, significativement diminué après prétraitement par le LPS (Figure III-4).

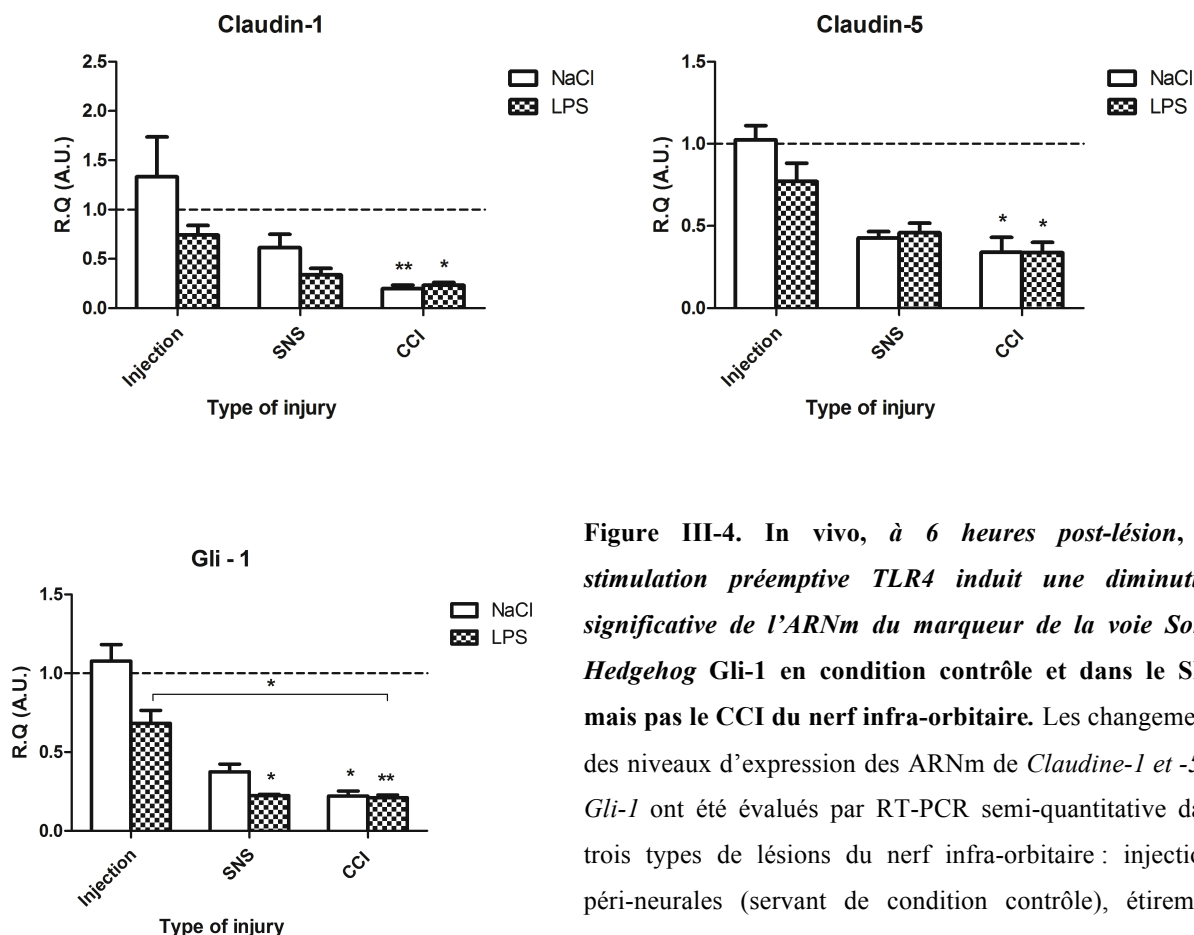


Figure III-4. In vivo, à 6 heures post-lésion, la stimulation préemptive TLR4 induit une diminution significative de l'ARNm du marqueur de la voie Sonic Hedgehog *Gli-1* en condition contrôle et dans le SNS mais pas le CCI du nerf infra-orbitaire. Les changements des niveaux d'expression des ARNm de *Claudine-1* et *-5* et *Gli-1* ont été évalués par RT-PCR semi-quantitative dans trois types de lésions du nerf infra-orbitaire : injections péri-neurales (servant de condition contrôle), étirement simple du nerf infra-orbitaire (Simple Nerve Stretch [SNS],

modèle de neurite) ou la constriction chronique du nerf infra-orbitaire (CCI, modèle de neuropathie), après injections péri-neurales de 50 μ L de LPS (1 μ g/mL) ou NaCl 0,9% (2 injections hebdomadaires pendant 4 semaines), comparativement à l'injection de NaCl servant de valeur contrôle. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de n=5-8 animaux pour chaque marqueur; *p<0,05 ; **p<0,01 ; Effet du LPS : #p<0,05 ; ##p<0,01. Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Dunn ont été utilisés.

De la même façon, une augmentation significative de l'expression des ARNm codant pour *TLR2*, *CCL2*, *CD11b* était observée dans les rats CCI par rapport au groupe injection (NaCl) sans aucun effet particulier de la stimulation préemptive par le LPS (Figure III-5).

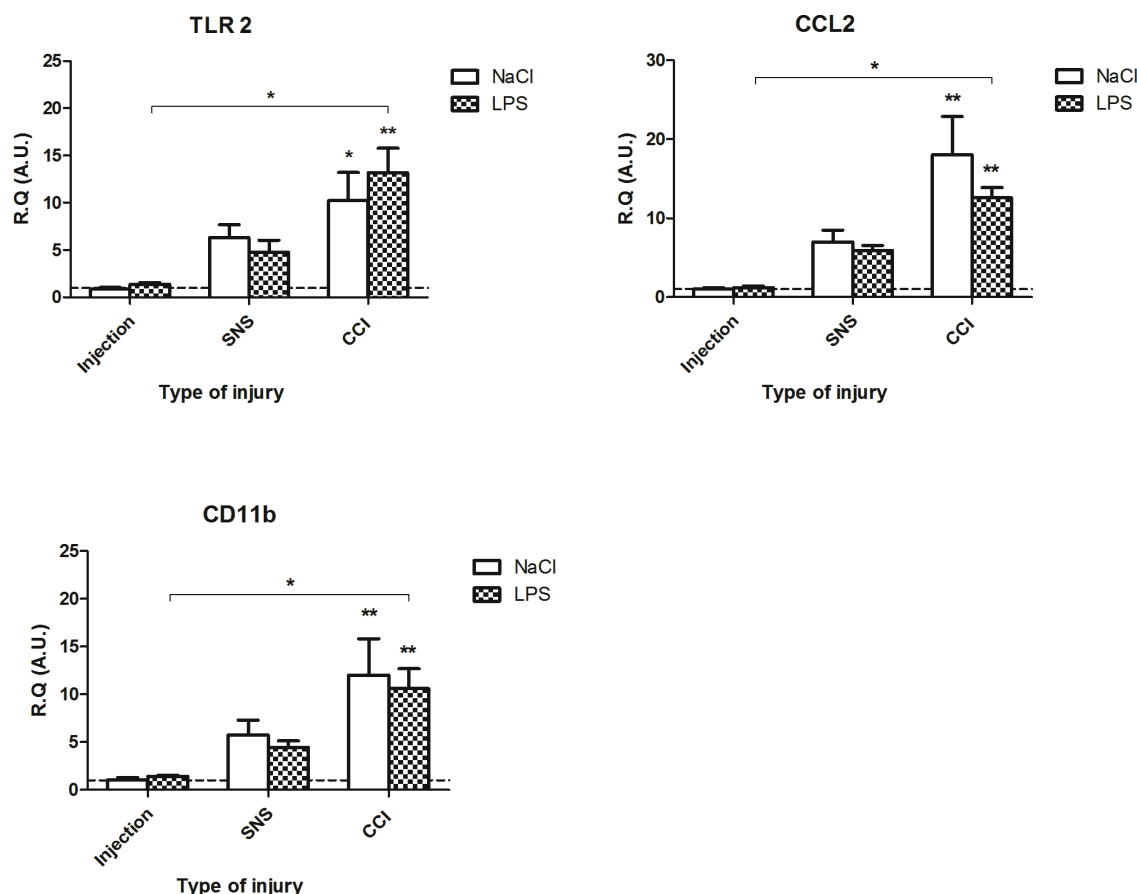


Figure III-5. In vivo, à 6 heures post-lésion, la stimulation préemptive TLR4 n'induit aucune modification particulière des ARNm des marqueurs CCL2, CD11b et TLR2 en condition contrôlée, dans le SNS ou dans le CCI du nerf infra-orbitaire. Les changements des niveaux d'expression des ARNm de *CCL2*, *CD11b* et *TLR2* ont été évalués par RT-PCR semi-quantitative dans trois types de lésions du nerf infra-orbitaire : injections péri-neurales (servant de condition contrôlée), étirement simple du nerf infra-orbitaire (Simple Nerve Stretch [SNS], modèle de neurite) ou la constriction chronique du nerf infra-orbitaire (CCI, modèle de neuropathie), après injections péri-neurales de 50 μ L de LPS (1 μ g/mL) ou NaCl 0,9% (2 injections hebdomadaires pendant 4 semaines), comparativement à l'injection de NaCl servant de valeur contrôlée. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de n=5-8 animaux pour chaque marqueur; *p<0,05 ; **p<0,01. Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Dunn ont été utilisés.

Ces données sont en accord avec nos précédents résultats (cf. partie II-4).

De façon intéressante, le prétraitement par LPS ne modulait l'expression que de l'ARNm du marqueur de la voie Hedgehog *Gli-1*, à la fois dans le groupe injection et dans le groupe SNS (Figure III-4). Dans le groupe SNS, les rats prétraités avec le LPS avaient des niveaux

d'expression de l'ARNm de *Gli-1* identiques aux rats CCI (tant les rats injectés au NaCl 0,9% qu'au LPS). Ces résultats suggèrent que la présence d'un contexte inflammatoire préexistant pourrait favoriser une inhibition plus importante de la voie Hedgehog lors d'une lésion nerveuse réversible. Compte-tenu du rôle majeur de cette inhibition de la voie Hedgehog dans le développement de la neuropathie (cf. partie II-4) il est possible que cette inhibition plus importante de la voie Hedgehog participe à favoriser le développement d'une neuropathie pour un trauma nerveux n'induisant pas de neuropathie en condition non inflammatoire.

Devant l'absence d'effet du LPS sur les marqueurs des protéines de jonctions serrées et les marqueurs inflammatoires dont le marqueur de macrophage CD11b (Figures III-4 et III-5), l'effet sensibilisant du LPS n'est probablement pas médié par une augmentation de la perméabilité vasculaire endoneurale et de l'infiltration macrophagique qui en résulte. De fait, nous avons envisagé la possibilité d'autres mécanismes de sensibilisation nerveuse non immunitaires.

Nous nous sommes notamment intéressés au rôle du canal sodique voltage-dépendant $Na_v1.8$, dont le rôle (à l'instar d'autres canaux sodiques voltage-dépendants) dans la genèse de la neuropathie a été suggéré dans plusieurs études (Gold et al., 2003 ; Joshi et al., 2006 ; Tseng et al., 2014). En effet, ces canaux sodiques voltage-dépendants participent à la genèse du potentiel d'action et leur distribution anormale sur les fibres nerveuses lésée a été associée à la genèse de décharges ectopiques (Tseng et al., 2014), notamment dans des contextes de douleurs neuropathiques post-traumatiques (Bird et al., 2013).

A 6 heures après la dernière injection de LPS ou son véhicule (NaCl 0,9%), aucune variation significative du niveau d'expression de l'ARNm de *Na_v1.8* n'était observée dans les trois conditions expérimentales (injection, SNS, CCI). Cependant, le prétraitement LPS induisait une diminution d'expression de ce canal sodique dans le SNS (0,275x vs. 0,964x comparativement à l'injection de NaCl) et dans le CCI (0,570x vs. 1,536x) (Figure III-6).

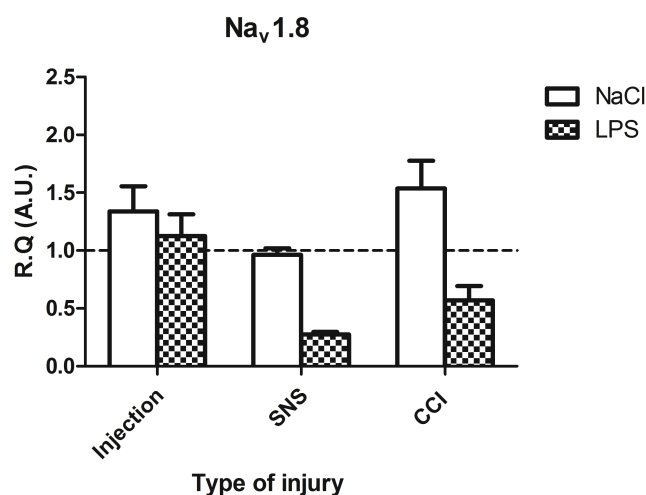


Figure III-6. In vivo, à 6 heures post-lésion, la stimulation préemptive TLR4 induit une diminution importante de l'expression de l'ARNm du canal sodium voltage-dépendant $Na_v1.8$ dans le SNS et dans le CCI du nerf infra-orbitaire. Les changements des niveaux d'expression de l'ARNm de $Na_v1.8$ ont été évalués par RT-PCR semi-quantitative dans trois types de lésions du nerf infra-orbitaire : injections péri-neurales (servant de condition contrôle), étirement simple du nerf infra-orbitaire (Simple Nerve Stretch [SNS], modèle de neurite) ou la constriction chronique du nerf infra-orbitaire (CCI, modèle de neuropathie), après injections péri-neurales de 50 μ L de LPS (1 μ g/mL) ou NaCl 0,9% (2 injections hebdomadaires pendant 4 semaines), comparativement à l'injection de NaCl servant de valeur contrôle. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de n=5-8 animaux pour chaque marqueur. Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Dunn ont été utilisés.

Plusieurs études ont montré que l'expression du canal $Na_v1.8$ est diminuée au niveau du nerf périphérique et des corps cellulaires neuronaux des GRD après CCI (Dib-Hajj et al., 1996 ; Decosterd et al., 2002 ; Gold et al., 2003 ; Li et al., 2015). De façon intéressante, le CCI serait responsable d'un effet dépolarisant sur la courbe d'activation des canaux $Na_v1.8$ sains, responsable de la genèse de décharges ectopiques et ce, malgré la diminution du nombre de canaux (Li et al., 2015).

Par ailleurs, certaines études suggèrent que l'expression du $Na_v1.8$ des nerfs périphériques pourrait être inhibée par l'isoforme ϵ de la Protéine Kinase C ($PKC\epsilon$) (Vijayaragavan et al., 2004), cette dernière étant activée via l'activation de la voie TLR4 par le LPS (McGettrick et al., 2006) et dont le rôle a été montré précédemment dans le « priming » hyperalgésique

chronique (Parada et al., 2005). De fait, la stimulation préemptive TLR4 pourrait favoriser la diminution d'expression du canal Na_v1.8 au niveau du parenchyme nerveux lésé.

Un autre déterminant non immunitaire de la sensibilisation périphérique pouvant être impliqué dans le développement des douleurs neuropathiques après « priming inflammatoire » est le canal *Transient Receptor Potential Vanilloïd-1* (TRPV1), impliqué dans les phénomènes d'hyperalgésie et d'allodynie thermique (Basbaum et al., 2009 ; Simonetti et al., 2014 ; Chiu et al., 2016). Ce canal est d'autant plus intéressant dans le présent contexte expérimental qu'il a été montré « sensibilisable » par une stimulation TLR4 (Diogenes et al., 2011 ; Ferraz et al., 2011).

A 6 heures après la dernière injection de LPS ou son véhicule (NaCl 0,9%), une diminution du niveau d'expression de l'ARNm de *TRPV1* était observée après SNS et également une diminution significative après CCI, comparativement à la condition contrôle (injection de NaCl). Par ailleurs, le prétraitement LPS induisait une diminution d'expression de ce canal dans le SNS (bien que statistiquement non significative dans les présentes conditions expérimentales) mais pas dans le CCI, comparativement à l'injection de véhicule (Figure III-7).

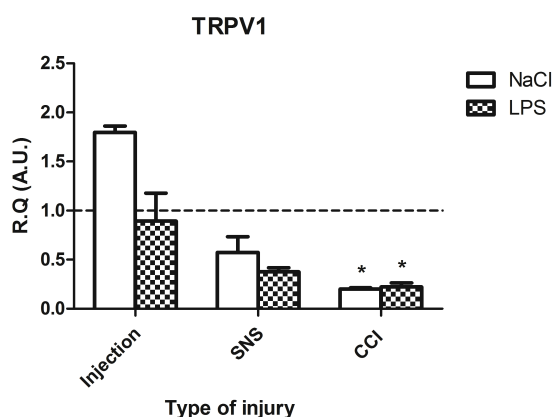


Figure III-7. In vivo, à 6 heures post-lésion, une diminution de l'expression de l'ARNm du canal *TRPV1* était observée dans le SNS et dans le CCI du nerf infra-orbitaire, dont l'effet était augmenté par la stimulation préemptive TLR4 dans le SNS mais pas le CCI. Les changements des niveaux d'expression de l'ARNm de *TRPV1* ont été évalués par RT-PCR semi-quantitative dans trois types de lésions du nerf infra-orbitaire : injections péri-neurales (servant de condition contrôle), étirement simple du nerf infra-orbitaire (Simple Nerve Stretch [SNS],

modèle de neurite) ou la constriction chronique du nerf infra-orbitaire (CCI, modèle de neuropathie), après injections péri-neurales de 50 µL de LPS (1 µg/mL) ou NaCl 0,9% (2 injections hebdomadaires pendant 4 semaines), comparativement à l'injection de NaCl servant de valeur contrôle. Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne ± erreur-type de la moyenne de n=5-8 animaux pour chaque marqueur; *p<0,05. Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Dunn ont été utilisés.

La diminution d'expression de TRPV1 après SNS et CCI est relativement étonnante compte-tenu des données existantes de la littérature. En effet, les lésions nerveuses s'accompagnent le plus souvent d'une augmentation d'expression des canaux TRPV1 au niveau des terminaisons périphériques, participant ainsi au développement d'une hypersensibilité douloureuse (notamment thermique). Ainsi, Biggs et al. (2007) ont montré une augmentation d'expression des canaux TRPV1 au niveau périphérique après lésion du nerf lingual, associée à une augmentation du transport axonal de ces canaux, des corps cellulaires neuronaux aux axones endommagés (Biggs et al., 2007). En 2012, Zakir et al. ont montré des modifications de l'expression de TRPV1 après lésion nerveuse, ce canal étant surexprimé principalement au niveau des fibres myélinisées en voie de régénération (Zakir et al., 2012).

Inversement, Michael et Priestley (1999) ont montré une perte complète d'expression de TRPV1 après section du nerf spinal et une perte partielle d'expression de TRPV1 après section du nerf sciatique, selon eux soit directement causée par la lésion, soit indirectement par la perte d'efficacité de facteurs neurotrophiques (tels que le NGF ou le GDNF) à leur niveau (Michael et Priestley, 1999).

Nos présents résultats suggèrent une diminution significative de l'expression de l'ARNm de TRPV1 après CCI du nerf infra-orbitaire comparativement aux rats contrôles (Figure III-7). Ces données cohérentes avec l'étude de Han et al., 2016 qui ont montré dans un modèle de douleur cancéreuse pancréatique, que l'inhibition de la signalisation Hedgehog était responsable d'une diminution de l'expression de TRPV1, dans leur modèle de tumeur orthotopique (Han et al., 2016).

Ainsi, un mécanisme hypothétique de sensibilisation TLR4-dépendante pourrait impliquer une diminution de la signalisation Hedgehog (se traduisant par une diminution d'expression du facteur de transcription Gli-1) responsable d'une diminution de synthèse de TRPV1 plus importante après stimulation préemptive avec le LPS qu'avec le véhicule (Figure III-7).

Par la suite, nous avons exploré si la stimulation préemptive de la voie TLR4 pouvait induire des altérations moléculaires au niveau du ganglion trigéminal ipsilatéral, qui pourraient participer à la facilitation du développement de la douleur neuropathique. Nous avons notamment exploré le rôle de la chimiokine CX3CL1, impliquée dans les phénomènes de sensibilisation spinale par l'activation de son récepteur microglial CX3CR1 (Milligan et al., 2004) ainsi que de la connexine 43 (Cx43), une protéine de jonction gap dont l'expression est

augmentée dans le ganglion trigéminal après CCI du nerf infra-orbitaire et qui participe à la nociception trigéminal (Ohara et al., 2008). Nous avons également envisagé l'implication de l'interleukine IL-1 β , qui participe à la sensibilisation des neurones trigéminaux de petit diamètre en contexte d'inflammation périphérique par la suppression de l'activité des canaux potassiques voltage-dépendants (Takeda et al., 2008).

A 6 heures après la dernière injection de LPS ou de NaCl 0,9% au niveau du nerf infra-orbitaire droit, une augmentation d'expression des ARNm de *l'interleukine 1 β* (*IL-1 β*) et de la chimiokine *CCL2* (statistiquement significative) étaient observées dans les conditions SNS et CCI par rapport au groupe contrôle (injection NaCl). Inversement, aucune modification significative de l'expression des ARNm du marqueur macrophagique CD11b, de la chimiokine CXCL3, ou de la connexine 43 (Cx43) n'étaient observés après SNS ou CCI (Figure III-8).

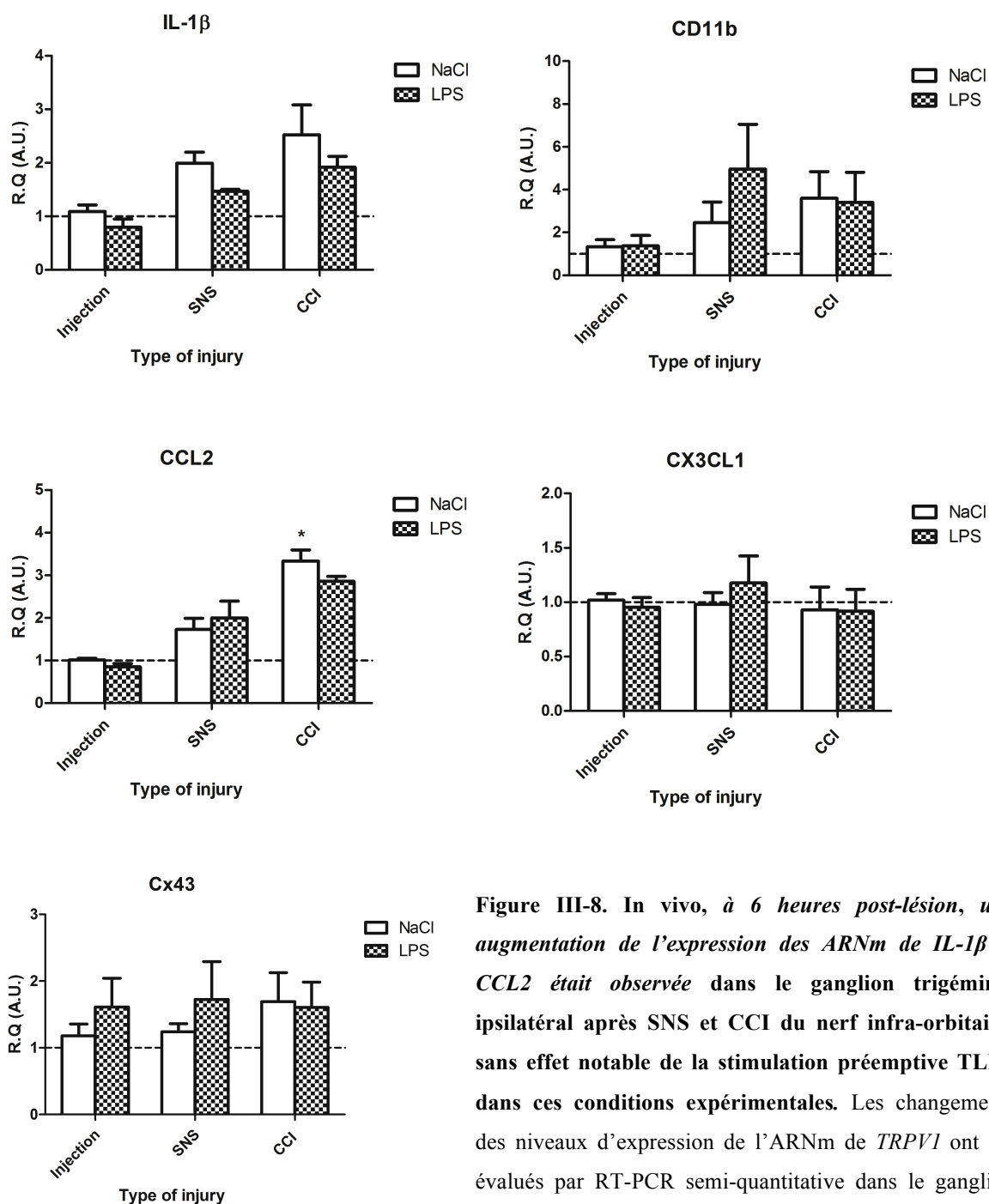


Figure III-8. In vivo, à 6 heures post-lésion, une augmentation de l'expression des ARNm de *IL-1 β* et *CCL2* était observée dans le ganglion trigéminal ipsilatéral après SNS et CCI du nerf infra-orbitaire, sans effet notable de la stimulation préemptive TLR4 dans ces conditions expérimentales. Les changements des niveaux d'expression de l'ARNm de *TRPV1* ont été évalués par RT-PCR semi-quantitative dans le ganglion trigéminal ipsilatéral après trois types de lésions du nerf

infra-orbitaire : injections péri-neurales (servant de condition contrôle), étirement simple du nerf infra-orbitaire (Simple Nerve Stretch [SNS], modèle de neurite) ou la constriction chronique du nerf infra-orbitaire (CCI, modèle de neuropathie), après injections péri-neurales de 50 μ L de LPS (1 μ g/mL) ou NaCl 0,9% (2 injections hebdomadaires pendant 4 semaines). Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de n=5-8 animaux pour chaque marqueur; *p<0,05. Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Dunn ont été utilisés.

En revanche, une diminution significative de l'expression du canal $\text{Na}_v1.8$ était observée dans le ganglion après CCI mais pas SNS (Figure III-9) confirmant le rôle des modifications d'expression de ce canal dans la physiopathologie des neuropathies périphériques (Dib-Hajj et al., 1996 ; Decosterd et al., 2002 ; Gold et al., 2003 ; Li et al., 2015), en particulier au niveau ganglionnaire, de façon similaire aux travaux de Tseng et al. en 2014, qui avaient montré que l'expression des transcrits de $\text{Na}_v1.8$ au niveau des corps cellulaires du GRD était diminuée après CCI du nerf sciatique (Tseng et al., 2014).

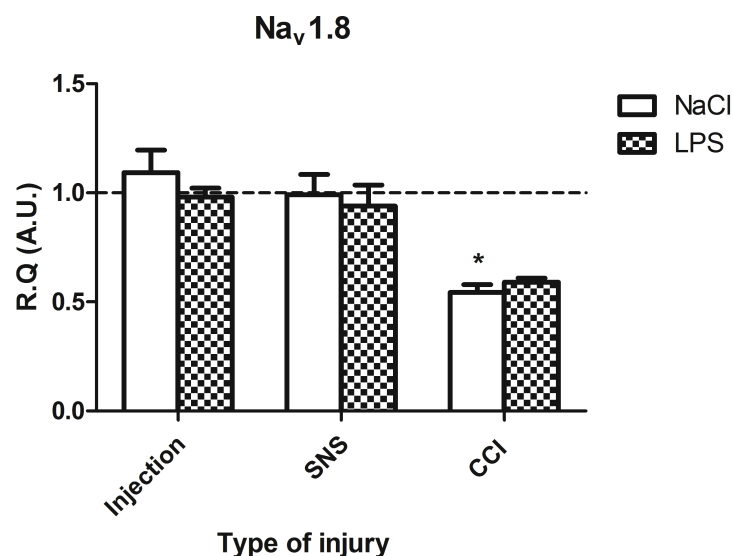


Figure III-9. *In vivo*, à 6 heures post-lésion, la constriction chronique du nerf infra-orbitaire mais pas le SNS induit une diminution significative de l'expression de l'ARNm du canal sodique $\text{Na}_v1.8$ dans le ganglion trigéminal ipsilatéral. Les changements des niveaux d'expression de l'ARNm de $\text{Na}_v1.8$ ont été évalués par RT-PCR semi-quantitative dans le ganglion trigéminal ipsilatéral après trois types de lésions du nerf infra-orbitaire : injections péri-neurales (servant de condition contrôle), étirement simple du nerf infra-orbitaire (Simple Nerve Stretch [SNS], modèle de neurite) ou la constriction chronique du nerf infra-orbitaire (CCI, modèle de neuropathie), après injections péri-neurales de 50 μL de LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) ou NaCl 0,9% (2 injections hebdomadaires pendant 4 semaines). Données présentées sous la forme de quantités relatives (*Relative Quantification*, R.Q.) en unités arbitraires (*Arbitrary Units*, A.U.) correspondant au ratio d'ARNm spécifique sur l'ARNm de RPS18. Chaque histogramme correspond à la moyenne $\pm$ erreur-type de la moyenne de $n=5-8$ animaux pour chaque marqueur; * $p<0,05$. Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Dunn ont été utilisés.

De façon intéressante, le LPS n'avait aucun effet notable sur l'intégralité des ARNm étudiés dans cette expérience. Ainsi, le « priming inflammatoire » induit par l'activation TLR4 serait un effet uniquement périphérique au niveau du nerf lésé qui n'induirait aucune modification

notable au niveau ganglionnaire (du moins, dans ce contexte expérimental et à ce temps post-lésion précis).

L'ensemble de ces résultats suggère qu'une stimulation préemptive TLR4 (mimant la stimulation par le LPS bactérien) pourrait participer à la promotion d'un phénotype neuropathique, notamment en favorisant la diminution d'expression du canal sodique voltage-dépendant $Na_v1.8$ au niveau du nerf périphérique en condition SNS et IoN-CCI et au niveau du ganglion trigéminal (dans le modèle IoN-CCI uniquement), mais aussi potentiellement en favorisant l'inhibition de la voie Hedgehog (par son facteur de transcription Gli-1).

Ces résultats devront être confirmés par la suite, notamment sur le plan électrophysiologique, pour pouvoir établir avec certitude le rôle de la stimulation LPS dans la promotion des neuropathies post-traumatiques en contexte inflammatoire.

III-4-2 Exploration d'un potentiel « profil moléculaire neuropathique »

L'ensemble de nos résultats dans nos différents paradigmes expérimentaux soulignent le rôle des voies de signalisation TLR4, Hedgehog et Wnt/ β -caténine dans les altérations de la perméabilité vasculaire endoneurale à l'origine du développement de la douleur neuropathique post-traumatique après CCI, mais également le rôle des interactions signalétiques entre ces voies dans la transition phénotypique entre neurite et neuropathie. Par ailleurs, la stimulation préemptive de la voie TLR4 dans un modèle de sensibilisation périphérique inflammatoire induisait des modifications de la voie Hedgehog pouvait participer à la promotion du développement de la neuropathie après trauma nerveux en contexte inflammatoire.

Compte-tenu du rôle majeur démontré de ces différentes voies de signalisation, nous avons envisagé l'exploration d'un potentiel profil moléculaire neuropathique, c'est à dire d'une signature moléculaire d'évènements neuronaux irréversibles traduisant le passage vers la neuropathie dans le tissu/modèle étudié. Ceci peut se révéler d'un intérêt notable, notamment pour faciliter la compréhension des mécanismes étiopathogéniques de certains tableaux douloureux suspectés neuropathiques dont l'origine neuropathique n'est pas forcément attestée dans l'état actuel des connaissances.

Pour ce faire, nous avons colligé l'ensemble des variations d'ARNm de marqueurs clés au sein du même contexte expérimental, à savoir les modifications d'ARNm à 3 heures après injection de PKF 118-310 ou de NaCl 0,9% ou après SNS du nerf infra-orbitaire ou après CCI du nerf infra-orbitaire. Ceci nous a permis de dresser un tableau des variations observées dans les différentes conditions expérimentales, analysées par le même test statistique (Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Dunn).

Les variations des ARNm clés à 3 heures post-lésion (injection, SNS ou CCI), exprimées en niveau de significativité (sans présager de la nature de la variation : augmentation ou inhibition), sont résumées dans le tableau III-1.

T = 3h post-lésion		Protéines de jonctions serrées			Perméabilité vasculaire	Marqueurs inflammatoires		Voie Wnt/ β -caténine			Voie Hedgehog	
Condition	Signification	Cld-1	Cld-5	Occludine	VEGF	TLR2	CD11b	VE-Cadhérine	Fzd-7	β -caténine	Gli-1	Ptch-1
Ctrl vs. Injection	« Innocuité » de l'injection	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ctrl vs. SNS	Neurite	ns	*	ns	ns	**	*	ns	ns	ns	ns	ns
Ctrl vs. CCI	Neuropathie	**	**	*	ns	**	***	ns	*	ns	*	ns
SNS vs. CCI	Transition de neurite à neuropathie	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tableau III-1. Tableau récapitulatif des niveaux de significativité des variations d'ARNm dans les différents modèles lésionnels du même contexte expérimental. Les niveaux de significativité statistique des différentes variations de nos ARNm d'intérêts ont été colligés par type de marqueur et par type de condition lésionnelle. Test statistique : Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Dunn; ns = non significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Les données issues de ce tableau confortent nos données relatives à l'implication des voies Hedgehog et Wnt/ β -caténine dans les temps précoces du développement de la neuropathie (3 heures post-lésion). De plus, la modulation de la perméabilité vasculaire VEGF-dépendante pourrait participer à la transition entre neurite et neuropathie tel qu'évoqué précédemment.

De plus, les variations des marqueurs *Claudine-5*, *Frizzled-7* et *Gli-1* semblent illustratives des altérations moléculaires propres au CCI (encadré rouge).

Ainsi, le profil moléculaire suivant pourrait être envisagé :

Profil moléculaire suggestif d'une neuropathie périphérique		
<i>Marqueur</i>	<i>Variation</i>	<i>Justification</i>
Claudine-5	Diminution majeure d'expression	Témoin de l'augmentation de la perméabilité vasculaire endoneurale
Frizzled-7	Diminution majeure d'expression	Témoin de l'augmentation de la perméabilité vasculaire endoneurale et de l'activation de la voie Wnt
Gli-1	Diminution majeure d'expression	Témoin de l'inhibition de la voie Sonic Hedgehog (surtout lors d'une forte diminution d'expression)

Tableau III-2. Potentiel « profil moléculaire neuropathique » d'après nos résultats. La diminution simultanée des ARNm de Claudine-5, Frizzled-7 et Gli-1 pourrait être illustrative des altérations moléculaires intra-parenchymateuses observées après CCI.

Ainsi la diminution d'expression majeure simultanée de ces 3 marqueurs au sein du parenchyme nerveux témoigne indirectement d'une augmentation de la perméabilité vasculaire endoneurale (la Claudine-5 étant la principale protéine de jonction de la BHN [Kanda, 2013]) et l'activation de la voie Wnt accompagnée d'une inactivation de la voie Hedgehog, dont nous avons précédemment montré le rôle essentiel dans le développement de la neuropathie périphérique post-traumatique.

A l'heure actuelle, il n'existe aucun biomarqueur fiable témoignant de la disruption de la BHN, utilisable en pathologie humaine (Kanda, 2013). Comme expliqué précédemment, ce profil moléculaire pourrait être un reflet indirect de la disruption de la BHN (car reflet des voies de signalisation impliquées dans sa rupture), mais nécessitera de nombreuses investigations pour confirmer un intérêt potentiel en clinique.

III-5 Implications cliniques

III-5-1 Rôle promoteur de l'inflammation dans le développement des neuropathies post-traumatiques iatrogènes ?

Nos résultats préliminaires de l'étude de la stimulation préemptive TLR4 dans la promotion du développement des neuropathies périphériques suggèrent un rôle de l'inflammation périphérique dans la sensibilisation du nerf périphérique, notamment via un mécanisme TLR4-dépendant.

Comme il a été précédemment montré, la voie TLR4 peut être activée par le LPS et notamment le LPS issu de bactéries buccales parodontopathogènes comme *Porphyromonas gingivalis*. De fait, la présence d'une inflammation buccale préalablement à un traumatisme nerveux iatrogène pourrait favoriser le développement des neuropathies périphériques à ce niveau. Ainsi, la réalisation d'un geste bucco-dentaire responsable d'une désafférentation dans un contexte inflammatoire pourrait précipiter le développement d'une neuropathie périphérique au niveau d'afférences déjà sensibilisées. Ceci pourrait participer à expliquer le développement de la neuropathie observée chez le patient qui n'avait comme seul facteur traumatisant une couronne débordante entraînant une irritation gingivale (cf. partie III-2-1). Cette irritation gingivale chronique pourrait engendrer une inflammation chronique sensibilisant les fibres nerveuses gingivales, les rendant susceptibles au développement d'une neuropathie au moindre stimulus offensif. De la même façon, la sensibilisation TLR4-dépendante des afférences primaires pulpaire pourrait expliquer le développement plus fréquent de douleurs neuropathiques trigéminales post-traumatiques chez des patients ayant eu un ou plusieurs antécédents douloureux pulpaire (pulpite réversible ou irréversible, nécrose pulpaire...).

D'autres voies moléculaires pourraient également concourir à favoriser le développement d'une neuropathie en contexte inflammatoire (voie TLR2, voie HMGB1/RAGE, ...) et nécessiteraient d'être explorées davantage.

III-5-2 Altérations constitutives de la voie Wnt/ β -caténine ou de la voie Sonic Hedgehog et risque de développement de neuropathies périphériques

La présence d'une voie Wnt constitutivement activée pourrait également participer à la sensibilisation inflammatoire des fibres nerveuses périphériques, par une sensibilisation de la voie de signalisation TLR4, selon des mécanismes évoqués précédemment (cf. partie II-4). Cette hypothèse pourrait participer à expliquer la prévalence féminine (chez des femmes d'âge moyen) des neuropathies périphériques post-traumatiques, en particulier au niveau de la région oro-faciale. En effet, il a été suggéré que la voie Wnt/ β -caténine pouvait être activée de façon constitutive par l'estradiol, notamment dans la physiopathologie endométriale (Wang et al., 2010) et que cette hormone pourrait participer à expliquer les fluctuations douloureuses au cours du cycle menstruel observées dans de nombreuses pathologies douloureuses (Iacovides et al., 2015) ainsi que le priming inflammatoire médié par le récepteur à la ryanodine et la PKC ϵ plus important chez les rats femelles (Ferrari et al., 2016). De façon intéressante, l'influence des hormones gonadiques sur la douleur n'est observée qu'après plusieurs années d'imprégnation hormonale, pouvant expliquer le pic de prévalence de ces pathologies douloureuses autour de la quarantaine (Iacovides et al., 2015). Des mutations gain-de-fonction de la β -caténine ou perte-de-fonction de la protéine APC pourraient se traduire par une suractivation de la voie Wnt/ β -caténine (Jamieson et al., 2012), pouvant prédisposer aux altérations moléculaires décrites dans ce travail et à la douleur neuropathique qui en résulte. Ces hypothèses nécessiteront d'être confirmées, notamment sur des rats femelles, avant d'incriminer pleinement la voie Wnt/ β -caténine dans la prédisposition féminine aux neuropathies périphériques post-traumatiques.

Par ailleurs, les interactions signalétiques entre les voies Wnt et SHH sont essentielles au cours du développement, participant notamment à la morphogénèse dentaire et faciale (Cobourne et Sharpe, 2003 ; Jiang et al., 2006). Ainsi, lors de l'odontogénèse chez le rat, la signalisation Wnt (notamment par l'intermédiaire de la protéine Wnt-7b) exerce des fonctions de répression de la signalisation SHH permettant l'organisation spatiale du développement des germes dentaires au niveau des maxillaires (Cobourne et Sharpe, 2003) (Figure III-10).

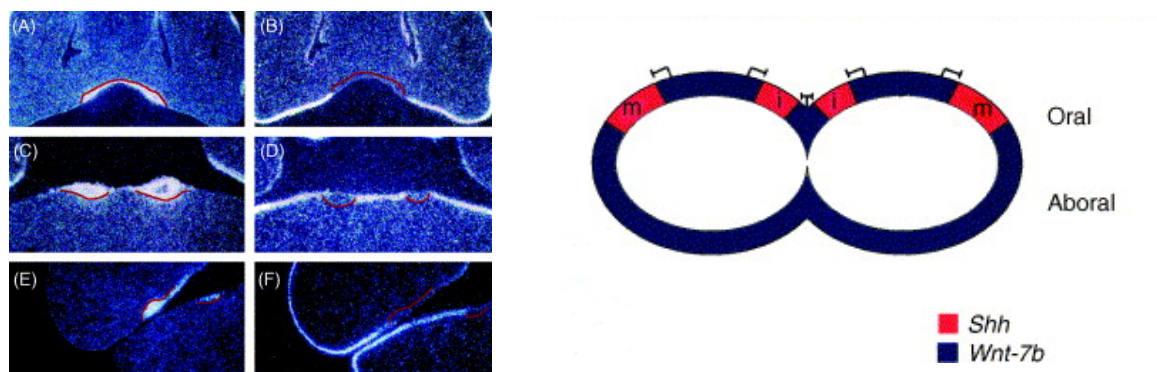


Figure III-10. Illustration des interactions signalétiques mutuellement répressives entre la signalisation Wnt et SHH au niveau des régions des futurs bourgeons dentaires incisives et molaires dans des coupes de premier arc branchial de l'embryon de souris à E11,5. Ces interactions morphogénétiques (observées ici en immunohistochimie, Figure de gauche) permettent la mise en place selon une topographie extrêmement précise et régulée des futurs bourgeons dentaires (incisives et molaires) au niveau du futur épithélium oral, tel que figuré sur le schéma de droite (d'après Cobourne et Sharpe, 2003).

Dans une récente étude de transcriptomique, il a été montré une diminution notable de l'expression de Gli-1 dans les molaires maxillaires par rapport aux molaires mandibulaires, chez des souris C57BL6, d'un facteur 1,34 (Laugel-Haushalter et al., 2013). Cette donnée pourrait revêtir une importance fonctionnelle majeure, en considérant qu'un sous-type de douleurs neuropathiques trigéminales post-traumatiques concerne principalement les molaires maxillaires (fréquemment appelées « odontalgies atypiques » ou « algies faciales atypiques ») (Matwychuk, 2004).

De fait, l'hypothèse d'une voie Hedgehog constitutivement moins active dans ces dents pourrait expliquer la plus grande prévalence de neuropathies post-traumatiques iatrogènes à leur niveau.

Limites

Comme tout travail scientifique, celui-ci présente certaines limites qu'il convient d'énumérer ci-après :

1) Faible transposabilité clinique des modèles animaux de douleurs neuropathiques :

Ainsi qu'il a déjà été évoqué dans l'introduction de ce travail, une des difficultés majeures de la recherche fondamentale sur la neurobiologie de la douleur est la faible prédictivité et transposabilité clinique des modèles animaux de douleurs neuropathiques. Un premier écueil conceptuel est la variabilité des modèles de douleurs neuropathiques qui n'induisent pas rigoureusement les mêmes altérations moléculaires. Les résultats obtenus avec ces modèles témoignent de la mise en jeu de certaines voies moléculaires dépendantes du contexte expérimental mais ne reflétant pas nécessairement les « réels » changements neuropathiques. Par ailleurs, les résultats obtenus sur ces modèles ne sont en effet pas directement transposables à l'homme et ne peuvent donc servir qu'à étayer des hypothèses qui nécessiteront d'être vérifiées en clinique humaine.

Les résultats obtenus dans le présent travail ne s'appliquent donc qu'à l'explication des altérations moléculaires, vasculaires et comportementales induites par la constriction chronique du nerf sciatique ou du nerf infra-orbitaire chez le rat.

2) Mécanismes contexte-dépendants des voies de signalisation morphogénétique Hedgehog et Wnt/ β -caténine :

La voie morphogénétique Hedgehog et surtout la voie Wnt/ β -caténine sont des voies de signalisation contexte-dépendants dont les altérations (inhibition ou activation) peuvent varier d'un tissu à un autre. Ainsi les extrapolations des altérations mécanistiques de ces voies, basées sur de précédents travaux publiés dans la littérature, doivent être envisagées avec une grande circonspection car elles ne représentent pas forcément la réalité du tissu étudié dans un contexte biologique différent.

3) Mécanismes pluri-cellulaires des lésions nerveuses périphériques :

Les lésions nerveuses impliquent des mécanismes complexes pluricellulaires dont la contribution respective de chaque population doit être prise en compte pour expliquer les altérations physiopathologiques observées. Ces populations et leurs contributions respectives varient notamment selon la localisation dans le système nerveux (les lésions nerveuses périphériques ayant par exemple un potentiel de régénération bien meilleur que les lésions nerveuses centrales).

De fait, les altérations moléculaires, vasculaires et comportementales observées dans ce travail ne peuvent rigoureusement représenter l'intégralité des altérations physiopathologiques impliquées dans le contexte étudié.

4) Dimorphisme sexuel de la douleur :

De nombreuses études ont souligné l'existence d'un fort dimorphisme sexuel dans la douleur (Loyd et Murphy, 2014 ; Kisler et al., 2016 ; Ferrari et al., 2016 ; Melchior et al., 2016) et notamment de la douleur neuropathique (Hucho et al., 2006 ; Sorge et al., 2015), expliquant notamment les différences de prévalence de pathologies douloureuses entre les femmes et les hommes.

L'ensemble de nos investigations ayant porté uniquement sur des rats mâles, il est possible que de tels résultats ne soient pas transposables aux rats femelles et ce d'autant plus que les voies TLR et Wnt/ β -caténine sont en partie sous la dépendance des hormones gonadiques féminines.

Conclusion

Conclusion

L'objectif de ce travail était d'étudier le rôle de l'altération de la perméabilité vasculaire endoneurale dans le développement des douleurs neuropathiques périphériques post-traumatiques.

Nous avons montré que dans les modèles de constriction chronique du nerf sciatique et/ou du nerf infra-orbitaire, la disruption précoce de la barrière hémato-nerveuse est un évènement clé de la neuropathie, favorisant l'infiltration de substances algogènes et d'immunocytes dans le parenchyme nerveux, induisant une neuroinflammation locale, une sensibilisation des fibres nerveuses afférentes primaires et le développement d'une douleur neuropathique périphérique.

Parmi les mécanismes régulateurs de l'homéostasie de cette barrière, l'altération des voies de signalisation morphogénétiques Sonic Hedgehog et Wnt/ β -caténine, mais également de la voie de l'immunité innée TLR4, au niveau des cellules endothéliales endoneurales, favorisent la disruption de cette barrière en diminuant la synthèse des protéines de jonctions serrées, molécules clés de l'intégrité de la barrière hémato-nerveuse.

De plus, l'implication différentielle de ces voies de signalisation dans des modèles de neurite et de neuropathie apporte un éclairage nouveau à la transition phénotypique entre neurite et neuropathie, permettant de proposer un profil moléculaire neuropathique, témoignant de la présence d'altérations moléculaires irréversibles au sein du parenchyme nerveux lésé. Ainsi, alors que la neurite s'accompagne d'une perméabilité vasculaire endoneurale réversible, la neuropathie peut être considérée comme une pathologie de la perméabilité vasculaire chronique irréversible.

Nous espérons que ces résultats permettront le développement de nouvelles perspectives en recherche translationnelle, notamment sur le rôle du « priming inflammatoire » dans la genèse des douleurs neuropathiques trigéminales post-traumatiques ou sur le rôle des voies de signalisation Sonic Hedgehog et/ou Wnt/ β -caténine dans la prédisposition aux douleurs neuropathiques. L'amélioration des connaissances relatives aux mécanismes physiopathologiques des douleurs pathologiques devrait permettre une meilleure identification des mécanismes sous-tendant chaque tableau douloureux, permettant la mise en place d'une stratégie antalgique spécifique, améliorant ainsi la prise en charge de ce fléau de santé publique (Dallel, 2000 ; Woolf, 2004 ; Backonja et Woolf, 2010 ; Nagakura, 2017).

Table des illustrations

Table des illustrations

Figures

Introduction

Figure i-1	Pathologies associées aux douleurs neuropathiques.	15
Figure i-2	Démarche diagnostique face à une douleur potentiellement neuropathique.	17
Figure i-3	Distribution neuro-anatomique usuelle des signes et symptômes observés dans les pathologies douloureuses neuropathiques les plus fréquentes.	20
Figure i-4	Techniques d'évaluation clinique des différentes modalités sensitives.	21

Partie I

Figure I-1	Structure du nerf périphérique.	30
Figure I-2	Structure de l'endonèvre.	32
Figure I-3	Formation des mésaxones lors de la myélinisation des axones par les cellules de Schwann.	32
Figure I-4	Composition des jonctions autotypiques des cellules de Schwann.	33
Figure I-5	Vascularisation du nerf périphérique.	34
Figure I-6	Comparaison de la structure de la Barrière Hémato-Nerveuse (BHN) et de la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE).	37
Figure I-7	Composition protéique des jonctions serrées de la Barrière Hémato-Nerveuse (BHN) et rôle dans le transport paracellulaire.	37
Figure I-8	Rôle des péricytes dans les unités neuro-vasculaires du Système Nerveux Central (SNC).	40
Figure I-9	Projections médullaires des afférences primaires.	44
Figure I-10	Anatomie topographique des principales voies nociceptives.	45
Figure I-11	Mécanismes cellulaires de la dégénérescence wallérienne après lésion nerveuse.	47
Figure I-12	Rôle des macrophages dans la régénération axonale après dégénérescence wallérienne.	55
Figure I-13	Diversité phénotypique des différentes populations macrophagiques.	55
Figure I-14	Implication du collagène VI dans l'infiltration macrophagique après lésion nerveuse.	56
Figure I-15	Mécanismes moléculaires de la sensibilisation périphérique.	61
Figure I-16	Mécanismes moléculaires de la sensibilisation centrale.	66

Partie II

Figure II-1	Implication de la perméabilisation des barrières hémato-encéphalique et hémato-spinale dans la transition entre douleur aiguë et douleur chronique.	75
Figure II-2	Procédure expérimentale de constriction chronique du nerf sciatique chez le rat.	80
Figure II-3	Vue macroscopique d'un nerf sciatique à 6 heures post-CCI (gauche), comparé au modèle initial de Bennett et Xie (droite).	81
Figure II-4	Procédure expérimentale de constriction chronique du nerf infra-orbitaire chez le rat.	83
Figure II-5	Altérations moléculaires (ARNm) observées après contact direct du nerf sciatique.	85
Figure II-6	Validation du protocole d'injection péri-neurale au niveau des nerfs sciatique (figure de gauche) et infra-orbitaire (figure de droite).	86
Figure II-7	La constriction chronique (CCI) du nerf sciatique altère la perméabilité vasculaire épineurale.	95
Figure II-8	La constriction chronique (CCI) du nerf sciatique altère la perméabilité vasculaire endoneurale.	96
Figure II-9	La constriction chronique (CCI) du nerf sciatique induit une diminution précoce et prolongée de l'expression des ARNm des protéines de jonctions serrées Claudine-5 et Occludine.	97
Figure II-10	La constriction chronique (CCI) du nerf sciatique induit une diminution de la synthèse endothéliale endoneurale de la protéine de jonctions serrée Occludine.	98
Figure II-11	La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire altère la perméabilité vasculaire endoneurale.	99
Figure II-12	La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire induit une diminution de l'expression des ARNm et de la synthèse endothéliale endoneurale des protéines de jonctions serrées Claudine-1 et Claudine-5.	99
Figure II-13	La constriction chronique (CCI) du nerf sciatique induit une augmentation précoce de l'expression des ARNm de marqueurs neuroinflammatoires clés.	101
Figure II-14	La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire induit une augmentation précoce de l'expression des ARNm de marqueurs neuroinflammatoires clés.	101
Figure II-15	Voies de signalisation moléculaire des différents Toll-Like Receptors (TLRs).	105

Figure II-16	La stimulation du récepteur Toll-like 4 (TLR4) dans les cellules endothéliales cérébrales microvasculaires humaines (hCMEC/D3) induit des changements d'expression des ARNm similaires à ceux observés après constriction chronique (CCI) du nerf sciatique.	109
Figure II-17	Immunoréactivité pour le récepteur Toll-like Receptor 4 (TLR4) dans les cellules endothéliales <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .	110
Figure II-18	L'activation locale du récepteur Toll-like Receptor 4 (TLR4) dans le nerf sciatique de rats naïfs réplique les altérations moléculaires et vasculaires observées après constriction chronique du nerf sciatique.	111
Figure II-19	Schéma récapitulatif de la voie de signalisation Hedgehog au niveau des cils primaires de la membrane cellulaire.	113
Figure II-20	La constriction chronique du nerf sciatique induit une altération précoce des ARNm des composants de la voie de signalisation Sonic Hedgehog.	114
Figure II-21	La constriction chronique (CCI) du nerf sciatique induit une altération des composants de la voie de signalisation Sonic Hedgehog dans les cellules endothéliales endoneurales du nerf sciatique lésé.	115
Figure II-22	L'inhibition locale de la voie de signalisation Sonic Hedgehog dans le nerf sciatique de rats naïfs réplique les altérations moléculaires et vasculaires observées après constriction chronique du nerf sciatique.	116
Figure II-23	La constriction chronique du nerf infra-orbitaire induit une altération précoce des ARNm des composants de la voie de signalisation Sonic Hedgehog.	117
Figure II-24	L'inhibition locale de la voie de signalisation Sonic Hedgehog dans le nerf infra-orbitaire de rats naïfs réplique les altérations moléculaires et vasculaires observées après constriction chronique du nerf infra-orbitaire.	118
Figure II-25	Schéma récapitulatif des 3 voies de signalisation impliquées dans la signalisation Wnt.	120
Figure II-26	Schéma récapitulatif de la voie canonique Wnt/ β -caténine.	121
Figure II-27	Schéma récapitulatif des deux composantes principales de la signalisation canonique Wnt : les complexes récepteurs Frizzled/LRP 5/6 et les cadhérines membranaires.	122
Figure II-28	Schéma récapitulatif du mécanisme de la séquestration LEF-1-dépendante de β -caténine dans les cellules cancéreuses.	123
Figure II-29	Schéma récapitulatif de l'implication de la voie Wnt/Ryk dans la genèse des douleurs neuropathiques	125
Figure II-30	La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire induit une diminution précoce et transitoire de l'expression des ARNm de Fzd-7 et VE-cadhérine dans le nerf infra-orbitaire lésé.	128
Figure II-31	La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire induit une diminution de l'immunoréactivité Fzd-7 dans les micro-vaisseaux endoneuraux comparativement à la condition contrôle (animaux sham) à 24 heures post-CCI dans des coupes longitudinales de nerf infra-orbitaire lésé.	129
Figure II-32	La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire induit une diminution de l'immunoréactivité Fzd-7 dans les micro-vaisseaux endoneuraux comparativement à la condition contrôle (animaux sham) à 24 heures post-CCI dans des coupes axiales de nerf infra-orbitaire lésé.	130
Figure II-33	La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire induit une diminution de l'immunoréactivité VE-cadhérine dans les micro-vaisseaux endoneuraux comparativement à la condition contrôle (animaux sham) à 24 heures post-CCI dans des coupes axiales de nerf infra-orbitaire lésé.	131
Figure II-34	Données préliminaires sur les altérations des niveaux d'expression des ARNm des marqueurs Fzd-7 et VE-cadhérine dans le nerf sciatique de rats après CCI.	132
Figure II-35	La constriction chronique (CCI) du nerf infra-orbitaire induit une augmentation transitoire d'expression de l'ARNm de VEGF-A à 24 heures suivie d'une diminution significative entre 48 heures et 7 jours post-CCI (figure de gauche) associée à une augmentation significative de la synthèse de la protéine VEGF-A dans le nerf infra-orbitaire entre 24 heures et 48 heures post-CCI.	133
Figure II-36	Le récepteur Frizzled-7 est bien exprimé dans les cellules endothéliales hCMEC/D3 <i>in vitro</i> .	134
Figure II-37	<i>In vitro</i> , dans les cellules hCMEC/D3, la modulation de la voie Wnt/ β -caténine induit des changements significatifs des niveaux d'expression des ARNm du complexe VE-cadhérine/ β -caténine/fzd-7.	135
Figure II-38	<i>In vitro</i> , dans les cellules hCMEC/D3, l'activation de la voie Wnt/ β -caténine induit une diminution significative des niveaux d'expression des ARNm des effecteurs clés de la voie Hedgehog.	136
Figure II-39	<i>In vitro</i> , dans les cellules hCMEC/D3, la stimulation TLR4 induit une activation de la voie Wnt.	137
Figure II-40	<i>In vitro</i> , dans les cellules hCMEC/D3, les altérations moléculaires TLR4-dépendantes sont médiées par une signalisation Wnt active.	138
Figure II-41	Modélisation simplifiée des mécanismes moléculaires responsables de l'inhibition de la voie Hedgehog TLR4-dépendante dans les cellules endothéliales après stimulation par le LPS.	141
Figure II-42	Représentation schématique des principales différences entre deux modèles de neuropathies spinale et trigéminal (constriction chronique du nerf sciatique ou du nerf infra-orbitaire).	144

Figure II-43	Comparaisons des variations des niveaux d'expression des ARNm du facteur de transcription Gli-1 et du marqueur de macrophages CD11b entre les modèles de constriction chronique du nerf sciatique (SN-CCI) et du nerf infra-orbitaire (IoN-CCI).	145
Figure II-44	La constriction chronique du nerf infra-orbitaire (IoN-CCI) induit une augmentation précoce de la chimiokine CCL2 et du marqueur d'hypoxie HIF-1 α dès 3 heures dans le nerf infra-orbitaire lésé.	146
Figure II-45	L'inhibition locale de la voie de signalisation Sonic Hedgehog ou l'activation du récepteur TLR4 dans le nerf sciatique de rats naïfs répliquent les altérations comportementales observées après constriction chronique du nerf sciatique.	148
Figure II-46	L'inhibition locale de la voie de signalisation Sonic Hedgehog dans le nerf infra-orbitaire de rats naïfs réplique les altérations comportementales observées après constriction chronique du nerf infra-orbitaire.	149
Figure II-47	Altérations comportements après ligature du nerf infra-orbitaire (IoN-CCI) dans le modèle initial de Vos et al., 1994.	150
Figure II-48	Procédure expérimentale de l'étirement simple du nerf infra-orbitaire (simple nerve stretch, SNS).	151
Figure II-49	Altérations moléculaires (ARNm) observées après étirement simple du nerf infra-orbitaire (simple nerve stretch, SNS).	152
Figure II-50	<i>In vivo</i> , à 3 heures post-lésion, l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine prévient les altérations moléculaires des ARNm de la protéine de jonction serrée Claudine-5 et du facteur pro-perméabilisant VEGF dans le modèle de neurite (SNS) mais pas de neuropathie (CCI).	154
Figure II-51	<i>In vivo</i> , à 3 heures post-lésion, l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine atténue les altérations moléculaires des ARNm du marqueur de l'immunité innée TLR2 et du marqueur de macrophages CD11b dans le modèle de neurite (SNS) mais pas de neuropathie (CCI).	155
Figure II-52	<i>In vivo</i> , à 3 heures post-lésion, l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine prévient les altérations moléculaires des ARNm des marqueurs de la voie SHH Patched-1 et Gli-1 et diminue celles des marqueurs de la voie Wnt VE-cadhérine, Fzd-7 et β -caténine dans le modèle de neurite (SNS) mais pas de neuropathie (CCI) sauf pour Fzd-7.	156
Figure II-53	<i>In vivo</i> , à 3 heures post-lésion, l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine prévient les altérations vasculaires dans le modèle de neurite (SNS) mais pas de neuropathie (CCI).	157
Figure II-54	<i>In vivo</i> , à 3 heures post-lésion, le SNS et le CCI du nerf infra-orbitaire induisent des altérations similaires des niveaux d'expression des ARNm de la chimiokine CCL2 et du marqueur d'hypoxie HIF-1 α .	159
Figure II-55	<i>In vivo</i> , à 6 heures post-lésion, l'inhibition de la voie Sonic Hedgehog induit une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de la chimiokine CCL2 mais pas de l'ARNm du marqueur d'hypoxie HIF-1 α .	161
Figure II-56	Représentation schématique des interactions moléculaires entre les protéines des jonctions adhérentes et les protéines des jonctions serrées au niveau de la membrane endothéliale dans différentes conditions (intégrité endothéliale, perméabilité vasculaire aiguë et disruption pathologique de la barrière endothéliale).	167
Figure II-57	Représentation schématique des interactions entre les voies SHH et Wnt/ β -caténine dans la régulation de la synthèse des protéines de jonctions serrées dans les trois états fonctionnels de la barrière hémato-nerveuse.	170
Figure II-58	Modélisation simplifiée des interactions neuro-immuno-vasculaires au sein des cellules endothéliales endoneurales de nerfs après constriction nerveuse chronique (CCI).	173

Partie III

Figure III-1	Localisations douloureuses des DNTPT dans la cohorte étudiée.	186
Figure III-2	Principaux descriptifs de la douleur rapportés par les patients ayant une DNTPT.	187
Figure III-3	Représentation schématique des différents patients ayant eu un diagnostic de Douleur Neuropathique Trigéminal Post-Traumatique.	188
Figure III-4	<i>In vivo</i> , à 6 heures post-lésion, la stimulation préemptive TLR4 induit une diminution significative de l'ARNm du marqueur de la voie Sonic Hedgehog Gli-1 en condition contrôle et dans le SNS mais pas le CCI du nerf orbitaire.	192
Figure III-5	<i>In vivo</i> , à 6 heures post-lésion, la stimulation préemptive TLR4 n'induit aucune modification particulière des ARNm des marqueurs CCL2, CD11b et TLR2 en condition contrôle, dans le SNS ou dans le CCI du nerf infra-orbitaire.	193
Figure III-6	<i>In vivo</i> , à 6 heures post-lésion, la stimulation préemptive TLR4 induit une diminution importante de l'expression de l'ARNm du canal sodium voltage-dépendant Na _v 1.8 dans le SNS et dans le CCI du nerf infra-orbitaire.	195
Figure III-7	<i>In vivo</i> , à 6 heures post-lésion, une diminution de l'expression de l'ARNm du canal TRPV1 était observée dans le SNS et dans le CCI du nerf infra-orbitaire, dont l'effet était augmenté par la stimulation préemptive TLR4 dans le SNS mais pas le CCI.	196

Figure III-8	<i>In vivo</i> , à 6 heures post-lésion, une augmentation significative de l'expression des ARNm de <i>IL-1β</i> et <i>CCL2</i> était observée dans le ganglion trigéminal ipsilatéral après SNS et CCI du nerf infra-orbitaire, sans effet notable de la stimulation préemptive TLR4 dans ces conditions expérimentales.	199
Figure III-9	<i>In vivo</i> , à 6 heures post-lésion, la constriction chronique du nerf infra-orbitaire mais pas le SNS induit une diminution significative de l'expression de l'ARNm du canal sodique Na _v 1.8 dans le ganglion trigéminal ipsilatéral.	200
Figure III-10	Illustration des interactions signalétiques mutuellement répressives entre la signalisation Wnt et SHH au niveau des régions des futurs bourgeons dentaires incisives et molaires dans des coupes de premier arc branchial de l'embryon de souris à E11,5.	206

Tableaux

Introduction

Tableau i-1.	Données bibliométriques sur le nombre de publications relatives aux douleurs neuropathiques (base de donnée MEDLINE).	23
Tableau i-2.	Principaux modèles animaux de « douleurs neuropathiques ».	24

Partie I

Tableau I-1.	Composants moléculaires des cellules endothéliales endoneurales humaines.	35
Tableau I-2.	Facteurs et voies de signalisation impliquées dans la polarisation M2.	58
Tableau I-3.	Cinétique de l'infiltration d'immunocytes dans le nerf après lésion nerveuse.	69

Partie II

Tableau II-1.	Etudes explorant les altérations de la barrière hémato-encéphalique (BHE) ou de la barrière hémato-spinale (BHS) dans des modèles de douleurs inflammatoires.	74
Tableau II-2.	Liste des « primers » utilisés dans les différentes expériences.	92
Tableau II-3.	Liste des anticorps utilisés dans les différentes expériences.	93
Tableau II-4.	Médiateurs pro-inflammatoires libérés par une activation des TLRs impliqués dans les douleurs chroniques.	105
Tableau II-5.	Données de la littérature sur les interactions signalétiques entre les voies Wnt, SHH et TLR4.	139

Partie III

Tableau III-1	Tableau récapitulatif des niveaux de significativité des variations d'ARNm dans les différents modèles lésionnels du même contexte expérimental.	202
Tableau III-2	Potentiel « profil moléculaire neuropathique » d'après nos résultats.	203

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AJ	Adherens-Junction
Ang-1	Angiopoietin-1
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BBB	Blood-Brain Barrier
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BHN	Barrière Hémato-Nerveuse
BHS	Barrière Hémato-Spinale
BNB	Blood-Nerve Barrier
BSCB	Blood Spinal-Cord Barrier
CCI	Chronic Constriction Injury
CCL	Chemokine (C-C motif) Ligand
CCR	Chemokine (C-C motif) Receptor
CD	Cluster of Differentiation
CGRP	Calcitonin-Gene Related Peptide
CRT	CReatine Transporter
Cx	Connexine
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) Ligand
CXCR	Chemokine (C-X-C motif) Receptor
DAMP	Danger/Damage Associated Molecular Patterns
DMSO	Dimethylsulfoxide
DN4	Douleur Neuropathique en 4 questions
DNTPT	Douleur Neuropathique Trigéminal Post-Traumatique
Fn CS1	Fibronectine contenant la région CS1
FvW	Facteur de von Willebrand
Fzd	Frizzled
GDNF	Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor
GFR	GDNF Family Receptor
GLUT	GLUcose Transporter
GRD	Ganglion de Racine Dorsale
hCMEC	human Cerebral Microvascular Endothelial Cells

HIF	Hypoxia Inducible Factor
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HSP	Heat Shock Protein
IASP	International Association for the Study of Pain
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IL	Interleukine
IoN	Infra-Orbital Nerve
JAM	Junctional Adhesion Molecule
LANSS	Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs
LAT-1	L-type Amino acid Transporter 1
L-LTP	Late-Long Term Potentiation
LPS	Lipopolysaccharide
MAG	Myelin-Associated Glycoprotein
MAP	Matrix-Associated Protein
MBP	Myelin Basic Protein
MCT-1	MonoCarboxylate Transporter 1
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MMP	Matrix Metallo-Proteinase
MRP	Multidrug Resistance Protein
NaFlu	Fluorescéine sodique
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGF	Nerve Growth Factor
NPQ	Neuropathic Pain Questionnaire
NPSI	Neuropathic Pain Symptom Inventory
OAT-3	Organic Anion Transporter-3
OATC	Organic Anion Transporting Polypeptid C
PA	Potentiel d'Action
PAF	Paraformaldéhyde
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCP	Planar Cell Polarity
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
P-gp	P-glycoprotein
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase

PJS	Protéines de Jonctions Serrées
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PM	Poids Moléculaire
PNB	PolyNucléaires Basophiles
PNN	PolyNucléaires Neutrophiles
QST	Quantitative Sensory Testing
SAG	Smoothened Agonist
SN	Sciatic Nerve
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
SNS	Simple Nerve Stretch
SP	Substance P
SHH	Sonic Hedgehog
TGF	Transforming Growth Factor
TJ	Tight-Junction
TLR	Toll-Like Receptor
UEA1	Ulex Europaeus Agglutinin 1
UNV	Unité Neuro-Vasculaire
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZO	Zonula Occludens

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abbadie C, Lindia JA, Cumiskey AM, Peterson LB, Mudgett JS, Bayne EK, et al. Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100:7947-7952.
- Abbadie C, Bhangoo S, De Koninck Y, Malcangio M, Melik-Parsadaniantz S, White FA. Chemokines and pain mechanisms. *Brain Res Rev*. 2009;60:125-134.
- Allport JR, Muller WA, Luscinskas FW. Monocytes induce reversible focal changes in vascular endothelial cadherin complex during transendothelial migration under flow. *J Cell Biol*. 2000;148(1):203-216.
- Almutairi MM, Gong C, Xu YG, Chang Y, Shi H. Factors controlling permeability of the blood-brain barrier. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(1):57-77.
- Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, et al. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science*. 2011;334(6063):1727-1731.
- Andonegui G, Zhou H, Bullard D, Kelly MM, Mullaly SC, McDonald B, et al. Mice that exclusively express TLR4 on endothelial cells can efficiently clear a lethal systemic Gram-negative bacterial infection. *J Clin Invest*. 2009;119(7):1921-1930.
- Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain*. 2005;9:463-484.
- Araujo MC, Sinnott CJ, Strichartz GR. Multiple phases of relief from experimental mechanical allodynia by systemic lidocaine: responses to early and late infusions. *Pain*. 2003;103:21-9.
- Asiedu MN, Tillu DV, Melemedjian OK, Shy A, Sanoja R, Bodell B, et al. Spinal protein kinase M ζ underlies the maintenance mechanism of persistent nociceptive sensitization. *J Neurosci*. 2011;31(18):6646-6653.
- Aurrekoetxea M, Irastorza I, Garcia-Gallastegui P, Jimenez-Rojas L, Nakamura T, Yamada Y, et al. Wnt/ β -catenin regulates the activity of Epiprotein/Sp6, SHH, FGF, and BMP to coordinate the stages of odontogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:25.
- Babcock DT, Shi S, Jo J, Shaw M, Gutstein HB, Galko MJ. Hedgehog signaling regulates nociceptive sensitization. *Curr Biol*. 2011;21(18):1525-1533.
- Backonja M, Woolf CJ. Future directions in neuropathic pain therapy: closing the translational loop. *Oncologist*. 2010;15 Suppl 2:24-29.
- Bajestan SN, Umehara F, Shirahama Y, Itoh K, Sharghi-Namini S, Jessen KR, et al. Desert hedgehog-patched 2 expression in peripheral nerves during Wallerian degeneration and regeneration. *J Neurobiol*. 2006;66:243-55.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139(2):267-284.
- Beggs S, Liu XJ, Kwan C, Salter MW. Peripheral nerve injury and TRPV1-expression primary afferent C-fibers cause opening of the blood-brain barrier. *Mol Pain*. 2010;6:74.
- Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33(1):87-107.
- Benoliel R, Kahn J, Eliav E. Peripheral painful traumatic trigeminal neuropathies. *Oral Dis*. 2012;18(4):317-332. a
- Benoliel R, Zadik Y, Eliav E, Sharav Y. Peripheral painful traumatic trigeminal neuropathy: clinical features in 91 cases and proposal of novel diagnostic criteria *J Orofac Pain*. 2012; 26:49-58. b

- Benowitz LI, Popovich PG. Inflammation and axon regeneration. *Curr Opin Neurol*. 2011;24:577–583.
- Berger A, Dukes EM, Oster G. Clinical characteristics and economic costs of patients with painful neuropathic disorders. *J Pain*. 2004;5:143-149.
- Bettoni I, Comelli F, Rossini C, Granucci F, Giagnoni G, Peri F, Costa B. Glial TLR4 receptor as a new target to treat neuropathic pain: efficacy of a new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice. *Glia*. 2008;56:1312-1319.
- Bianco C, Gotze O, Cohn ZA. Regulation of macrophage migration by products of the complement system. *Proc Natl Acad Sci*. 1979;76:888–891.
- Biggs JE, Yates JM, Loescher AR, Clayton NM, Boissonade FM, Robinson PP. Changes in vanilloid receptor 1 (TRPV1) expression following lingual nerve injury. *Eur J Pain*. 2007;11(2) :192-201.
- Bird EV, Christmas CR, Loescher AR, Smith KG, Robinson PP, Black JA, et al. Correlation of Nav1.8 and Nav1.9 sodium channel expression with neuropathic pain in human subjects with lingual nerve neuromas. *Mol Pain*. 2013;9:52.
- Boivin A, Pineau I, Barrette B, Filali M, Vallieres N, Rivest S, Lacroix S. Toll-like receptor signaling is critical for Wallerian degeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *J Neurosci*. 2007;27:12565–76.
- Bolin LM, Verity AN, Silver JE, Shooter EM, Abrams JS. Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. *J Neurochem*. 1995;64(2):850-858.
- Bonilla IE, Tanabe K, Strittmatter SM. Small proline-rich repeat protein 1A is expressed by axotomized neurons and promotes axonal outgrowth. *J Neurosci*. 2002;22(4):1303-1315.
- Bouhassira D, Attal N. Douleurs neuropathiques. Rueil-Malmaison: Arnette; 2007. 176p.
- Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*. 2008;136:380-387.
- Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain*. 2006;10(4):287-333.
- Breslin JW, Wu MH, Guo M, Reynoso R, Yuan SY. Toll-like receptor 4 contributes to microvascular inflammation and barrier dysfunction in thermal injury. *Shock*. 2008;29:349–55.
- Briggs LE, Burns TA, Lockhart MM, Phelps AL, Van den Hoff MJ, Wessels A. Wnt/ β -catenin and sonic hedgehog pathways interact in the regulation of the development of the dorsal mesenchyma protrusion. *Dev Dyn*. 2016;245(2):103-113.
- Brooks TA, Hawkins BT, Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Chronic inflammatory pain leads to increased blood-brain barrier permeability and tight junction protein alterations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H738-H743.
- Capaldo CT, Nusrat A. Claudin switching: Physiological plasticity of the Tight Junction. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;42:22-29.
- Cattin AL, Burden JJ, Van Emmenis L, Mackenzie FE, Hoving JJ, Garcia Calavia N, et al. Macrophage-induced blood vessels guide schwann cell-mediated regeneration of peripheral nerves. *Cell*. 2015;162:1127–1139.
- Chapouly C, Yao Q, Vandierdonck S, Larrieu-Lahargue F, Mariani JN, Gadeau AP, Renault MA. Impaired Hedgehog signalling-induced endothelial dysfunction is sufficient to induce neuropathy: implication in diabetes. *Cardiovasc Res*. 2016;109(2):217-227.
- Cheepudomwit T, Guzelsu E, Zhou C, Griffin JW, Hoke A. Comparison of cytokine expression profile during Wallerian degeneration of myelinated and unmyelinated peripheral axons. *Neurosci Lett*. 2008;430:230-235.

- Chen P, Piao X, Bonaldo P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol.* 2015;130(5):605-618. a
- Chen P, Cescon M, Zuccolotto G, Nobbio L, Colombelli C, Filaferro M, et al. Collagen VI regulates peripheral nerve regeneration by modulating macrophage recruitment and polarization. *Acta Neuropathol.* 2015;129:97–113. b
- Chiu IM, Pinho-Ribeiro FA, Woolf CJ. Pain and infection: pathogen detection by nociceptors. *Pain.* 2016;157(6):1192-1193.
- Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell.* 2012;149(6):1192-1205.
- Cobourne MT, Sharpe PT. Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. *Arch Oral Biol.* 2003;48(1):1-14.
- Coon BG, Baeyens N, Han J, Budatha M, Ross TD, Fang JS, et al. Intramembrane binding of VE-cadherin to VEGFR2 and VEGFR3 assembles the endothelial mechanosensory complex. *J Cell Biol.* 2015;208(7):975-986.
- Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, et al. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature.* 2003;424(6951):938-942.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci.* 2009;32:1–32. a
- Costigan M, Moss A, Latremoliere A, Johnston C, Verma-Gandhu M, Herbert TA, et al. T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. *J Neurosci.* 2009;29(46):14415-14422. b
- Dallel R. Vers une stratégie antalgique fondée sur l'identification des mécanismes physiopathologiques. *Rev Neurol (Paris).* 2000;156(10):831-836.
- Dallel R, Raboisson P, Auroy P, Woda A. The rostral part of the trigeminal sensory complex is involved in orofacial nociception. *Brain Res.* 1988;448(1):7-19.
- Das RM, Storey KG. Apical abscission alters cell polarity and dismantles the primary cilium during neurogenesis. *Science.* 2014;343(6167):200-204.
- Dauvergne C, Molet J, Reaux-Le Goazigo A, Mauborgne A, Mélik-Parsadaniantz S, Boucher Y, Pohl M. Implication of the chemokine CCL2 in trigeminal nociception and traumatic neuropathic orofacial pain. *Eur J Pain.* 2014;18(3):360-375.
- Davalos D, Ryu JK, Merlini M, Baeten KM, Le Moan N, Petersen MA, et al. Fibrinogen-induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. *Nat Commun.* 2012;3:1227.
- Davies HT, Crombie IK, Macrae WA. Why use a pain clinic? Management of neurogenic pain before and after referral. *J R Soc Med.* 1994;87:382-385.
- Decosterd I, Ji RR, Abdi S, Tate S, Woolf CJ. The pattern of expression of the voltage-gated sodium channels Na(v)1.8 and Na(v) 1.9 does not change in uninjured primary sensory neurons in experimental neuropathic pain models. *Pain.* 2002;96(3):269-277.
- Dejana E. The role of Wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circ Res.* 2010;107:943-952.
- Dejana E, Orsenigo F. Endothelial adherens junctions at a glance. *J Cell Sci.* 2013;126:2545-2549.
- De Koninck Y. Altered chloride homeostasis in neurological disorders: a new target. *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7(1):93-99.

DeLeo JA, Tanga FY, Tawfik VL. Neuroimmune activation and neuroinflammation in chronic pain and opioid tolerance/hyperalgesia. *Neuroscientist*. 2004;10:40-52.

Dib-Hajj S, Black JA, Felts P, Waxman SG. Down-regulation of transcripts for Na channel alpha-SNS in spinal sensory neurons following axotomy. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93(25):14950-14954.

Dieb W, Hafidi A. Astrocytes are involved in trigeminal dynamic mechanical allodynia: potential role of D-serine. *J Dent Res*. 2013;92(9):808-813.

Diogenes A, Ferraz CCR, Akopian AN, Henry MA, Hargreaves KM. LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons *J Dent Res*. 2011; 90:759–64.

DosSantos MF, Holanda-Afonso RC, Lima RL, DaSilva AF, Moura-Neto V. The role of the blood-brain barrier in the development and treatment of migraine and other pain disorders. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:302.

Downes CE, Crack PJ. Neural injury following stroke: are Toll-like receptors the link between the immune system and the CNS? *Br J Pharmacol*. 2010;160(8):1872-1888.

Dubovy P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. *Ann Anat*. 2011;193(4):267-275.

Dyck PJ, Giannini C. Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996;55(12):1181-1193.

Echeverry S, Shi XQ, Rivest S, Zhang J. Peripheral nerve injury alters blood-spinal cord barrier functional and molecular integrity through a selective inflammatory pathway. *J Neurosci*. 2011;31(30):10819-10828.

Echeverry S, Wu Y, Zhang J. Selectively reducing cytokine/chemokine expressing macrophages in injured nerves impairs the development of neuropathic pain. *Exp Neurol*. 2013;240:205-218.

Eliav E, Herzberg U, Ruda MA, Bennett GJ. Neuropathic pain from an experimental neuritis of the rat sciatic nerve. *Pain*. 1999;83(2):169-182.

Eliav E., Kamran B., Schaham R., Czerninski R., Gracely R.H., Benoliel R. Evidence of chorda tympani dysfunction in patients with burning mouth syndrome *J Am Dent Assoc*. 2007;138:628–33.

Elramah S, Landry M, Favereaux A. MicroRNAs regulate neuronal plasticity and are involved in pain mechanisms. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:31.

Engelhardt S, Al-Ahmad AJ, Gassmann M, Ogunshola OO. Hypoxia selectively disrupts brain microvascular endothelial tight junction complexes through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)-dependent mechanism. *J Cell Physiol*. 2014;229:1096–105.

Engelhardt B, Liebner S. Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res*. 2014;355:687–99.

European Society of Endodontology. Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. *Int Endod J*. 2006;39:921–30.

Fan J, Frey RS, Malik AB. TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *J Clin Invest*. 2003;112(8):1234-1243.

Farges JC, Alliot-Licht B, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, Carrouel F. Odontoblast control of dental pulp inflammation triggered by cariogenic bacteria. *Front Physiol*. 2013;4.

Ferrari LF, Bogen O, Reichling DB, Levine JD. Accounting for the delay in the transition from acute to chronic pain: axonal and nuclear mechanisms. *J Neurosci*. 2015;35(2):495-507.

- Ferrari LF, Khomula EV, Araldi D, Levine JD. Marked sexual dimorphism in the role of the ryanodine receptor in a model of pain chronification in the rat. *Sci Rep*. 2016;6:31221.
- Ferraz CCR., Henry MA., Hargreaves KM., Diogenes A. Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* sensitizes capsaicin-sensitive nociceptors *J Endod*. 2011; 37:45–8.
- Ferreira-Tojais N, Peghaire C, Franzl N, Larrieu-Lahargue F, Jaspard B, Reynaud A, et al. Frizzled7 controls vascular permeability through the Wnt-canonical pathway and cross-talk with endothelial cell junction complexes. *Cardiovasc Res*. 2014;103(2):291-303.
- Finnerup NB, Haroutounian S, Kamerman P, Baron R, Bennett DL, Bouhassira D, et al. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. *Pain*. 2016;157(8):1599-1606.
- Fournier AE, Strittmatter SM. Regenerating nerves follow the road more traveled. *Nat Neurosci*. 2002;5(9):821-822.
- Franco CA, Liebner S, Gerhardt H. Vascular morphogenesis: a Wnt for every vessel? *Curr Opin Genet Dev*. 2009;19(5):476-483.
- Galvez R, Marsal C, Vidal J, Ruiz M, Rejas J. Cross-sectional evaluation of patient functioning and health-related quality of life in patients with neuropathic pain under standard care conditions. *Eur J Pain*. 2007;11(3):244-255.
- Gao K, Wang YS, Yuan YJ, Wan ZH, Yao TC, Li HH, Tang PF, Mei XF. Neuroprotective effect of rapamycin on spinal cord injury via activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Neural Regen Res*. 2015;10(6):951-957.
- Garcia-Larrea L, Peyron R. Pain matrices and neuropathic pain matrices: a review. *Pain*. 2013 ;154 Suppl 1 :S29-S43.
- Gaudet AD, Leung M, Poirier F, Kadoya T, Horie H, Ramer MS. A role for galectin-1 in the immune response to peripheral nerve injury. *Exp Neurol*. 2009;220:320–327.
- Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflamm*. 2011;8:110.
- Gavard J. Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS Lett*. 2009;583(1):1-6.
- Gavard J. Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adh Migr*. 2014;8(2):158-164.
- Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol*. 2006;8(11):1223-1234.
- Gavard J, Gutkind JS. VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango. *Nat Cell Biol*. 2008;10(8):883-885.
- Gazea M, Tasouri E, Tolve M, Bosch V, Kabanova A, Gojak C, et al. Primary cilia are critical for Sonic Hedgehog-mediated dopaminergic neurogenesis in the embryonic midbrain. *Dev Biol*. 2016;409(1):55-71.
- Geuna S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *J Neurosci Methods*. 2015;243:39-46.
- Gesue R, Kohama SG, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptors and ischemic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2014;73:378–86.
- Giakoustidis A, Giakoustidis D, Mudan S, Sklavos A, Williams R. Molecular signalling in hepatocellular carcinoma: Role of and crosstalk among WNT/ β -catenin, Sonic Hedgehog, Notch and Dickkopf-1. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2015;29(4):209-217.

- Gold MS, Weinreich D, Kim CS, Wang R, Treanor J, Porreca F, Lai J. Redistribution of Na(V)1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. *J Neurosci*. 2003;23(1):158-166.
- Gomez-Nicola D, Valle-Argos B, Suardiaz M, Taylor JS, Nieto-Sampedro M. Role of IL-15 in spinal cord and sciatic nerve after chronic constriction injury: regulation of macrophage and T-cell infiltration. *J Neurochem*. 2008;107(6):1741-1752.
- Gong L, Wu J, Zhou S, Wang Y, Qin J, Yu B, et al. Global analysis of transcriptome in dorsal root ganglia following peripheral nerve injury in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;478(1):206-212.
- Gordh T, Sharma HS. Chronic spinal nerve ligation induces microvascular permeability disturbances, astrocytic reaction and structural changes in the spinal cord. *Acta Neurochir*. 2006;(Suppl. 96):335-340.
- Ghorpade DS, Holla S, Kaveri SV, Bayry J, Patil SA, Balaji KN. Sonic hedgehog-dependent induction of microRNA 31 and microRNA 150 regulates Mycobacterium bovis BCG-driven toll-like receptor 2 signaling. *Mol Cell Biol*. 2013;33:543-56.
- Gray M, Palispis W, Popovich PG, van Rooijen N, Gupta R. Macrophage depletion alters the blood-nerve barrier without affecting Schwann cell function after neural injury. *J Neurosci Res*. 2007;85:766-777.
- Grote K, Schütt H, Schieffer B. Toll-like receptors in angiogenesis. *Scientific World Journal*. 2011;11:981-91.
- Guilbaud G, Gautron M, Jazat F, Ratinahirana H, Hassig R, Hauw JJ. Time course of degeneration and regeneration of myelinated nerve fibres following chronic loose ligatures of the rat sciatic nerve: can nerve lesions be linked to the abnormal pain-related behaviours? *Pain*. 1993;53:147-158.
- Gupta R, Steward O. Chronic nerve compression induces concurrent apoptosis and proliferation of Schwann cells. *J Comp Neurol*. 2003;461:174-186.
- Gupta R, Truong L, Bear D, Chafik D, Modafferi E, Hung CT. Shear stress alters the expression of myelin-associated glycoprotein (MAG) and myelin basic protein (MBP) in Schwann cells. *J Orthop Res*. 2005;23(5):1232-1239.
- Hackel D, Brack A, Fromm M, Rittner HL. Modulation of tight junction proteins in the perineurium for regional pain control. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1257:199-206.
- Hains LE, Loram LC, Weiseler JL, Frank MG, Bloos EB, Sholar P, et al. Pain intensity and duration can be enhanced by prior challenge: initial evidence suggestive of a role of microglial priming. *J Pain*. 2010;11(10):1004-1014.
- Hall GC, Carroll D, Parry D, Mcquay HJ. Epidemiology and treatment of neuropathic pain: the UK primary care perspective. *Pain*. 2006;122:156-162.
- Han L, Ma J, Duan W, Zhang L, Yu S, Xu Q, et al. Pancreatic stellate cells contribute pancreatic cancer pain via activation of sHH signaling pathway. *Oncotarget*. 2016;7(14):18146-18158.
- Hargreaves KM. Orofacial pain. *Pain*. 2011;152(3 Suppl):S25-S32.
- Haviv Y, Zadik Y, Sharav Y, Benoliel R. Painful traumatic trigeminal neuropathy: an open study on the pharmacotherapeutic response to stepped treatment. *J Oral Facial Pain Headache*. 2014;28(1):52-60.
- He J, Sheng T, Stelter AA, Li C, Zhang X, Sinha M, Luxon BA, Xie J. Suppressing Wnt signaling by the hedgehog pathway through sFRP-1. *J Biol Chem*. 2006;281(47):35598-35602.
- He W, Wang Z, Zhou Z, Zhang Y, Zhu Q, Wei K, et al. Lipopolysaccharide enhances Wnt5a expression through toll-like receptor 4, myeloid differentiating factor 88, phosphatidylinositol 3-OH kinase/AKT and nuclear factor kappa B pathways in the human dental pulp stem cells. *J Endod*. 2014;40(1):69-75.

Henn A, Kirner S, Leist M. TLR2 hypersensitivity of astrocytes as functional consequence of previous inflammatory episodes. *J Immunol.* 2011;186(5):3237-3247.

Hirakawa H, Okajima S, Nagaoka T, Takamatsu T, Oyamada M. Loss and recovery of the blood-nerve barrier in the rat sciatic nerve after crush injury are associated with expression of intercellular junctional proteins. *Exp Cell Res.* 2003;284(2):196-210.

Hoogerwerf JJ, de Vos AF, van't Veer C, Bresser P, de Boer A, Tanck MW, et al. Priming of alveolar macrophages upon instillation of lipopolysaccharide in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;42(3):349-356.

Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(4):306-317.

Hu P, Bembrick AL, Keay KA, McLachlan EM. Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain Behav Immun.* 2007;21(5):599-616.

Hu YJ, Wang YD, Tan FQ, Yang WX. Regulation of paracellular permeability: factors and mechanisms. *Mol Biol Rep.* 2013;40(11):6123-6142.

Huang K, Zhang JX, Han L, You YP, Jiang T, Pu PY, Kang CS. MicroRNA roles in beta-catenin pathway. *Mol Cancer.* 2010; 9:252.

Hucho TB, Dina OA, Kuhn J, Levine JD. Estrogen controls PKCepsilon-dependent mechanical hyperalgesia through direct action on nociceptive neurons. *Eur J Neurosci.* 2006;24(2):527-534.

Hughes RA. Peripheral neuropathy. *Brit Med J.* 2002;324:466-469.

Hutchinson MR, Bland ST, Johnson KW, Rice KC, Maier SF, Watkins LR. Opioid-induced glial activation: mechanisms of activation and implications for opioid analgesia, dependence, and reward. *Scientific World Journal.* 2007;7:98-111.

Hutchinson MR, Zhang Y, Brown K, Coats BD, Shirdhar M, Sholar PW, et al. Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone: involvement of toll-like receptor 4 (TLR4). *Eur J Neurosci.* 2008;28:20-29.

Hutchinson MR, Loram LC, Zhang Y, Shirdhar M, Rezvani N, Berkelhammer D, et al. Evidence that tricyclic small molecules may possess toll-like receptor and myeloid differentiation protein 2 activity. *Neuroscience.* 2010;168:551-563.

Iacovides S, Avidon I, Baker FC. Does pain vary across the menstrual cycle? A review. *Eur J Pain.* 2015;19(10):1389-1405.

IASP. IASP taxonomy. 2012; Disponible sur : <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy?navItemNumber=576#Neuropathicpain> [consulté le 08/12/2016]

Itokazu T, Hayano Y, Takahashi R, Yamashita T. Involvement of Wnt/ β -catenin signaling in the development of neuropathic pain. *Neurosci Res.* 2014;79:34-40.

Jacquin MF, Hess A, Yang G, Adamo P, Math MF, Brown A, Rhoades RW. Organization of the infraorbital nerve in rat: a quantitative electron microscopic study. *Brain Res.* 1984;290(1):131-135.

Jacquin MF, Chiaia NL, Rhoades RW. Trigeminal projections to contralateral dorsal horn: central extent, peripheral origins, and plasticity. *Somatosens Motor Res.* 1990;7:153-183.

Jamieson C, Sharma M, Henderson BR. Wnt signaling from membrane to nucleus: β -catenin caught in a loop. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(6):847-850.

Jang J, Ha JH, Chung SI, Yoon Y. B-catenin regulates NF- κ B activity and inflammatory cytokine expression in

- bronchial epithelial cells treated with lipopolysaccharide. *Int J Mol Med*. 2014;34(2):632-638.
- Ji RR, Woolf CJ. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis*. 2001;8:1–10.
- Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13:533–48.
- Jiang R, Bush JO, Lidral AC. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn*. 2006;235(5):1152-1166.
- Jimenez-Andrade JM, Herrera MB, Ghilardi JR, Vardanyan M, Melemedjian OK, Mantyh PW. Vascularization of the dorsal root ganglia and peripheral nerve of the mouse: implications for chemical-induced peripheral sensory neuropathies. *Mol Pain*. 2008;4:10.
- Joshi SK, Mikusa JP, Hernandez G, Baker S, Shieh CC, Neelands T, et al. Involvement of the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states. *Pain*. 2006;123(1-2):75-82.
- Jurga AM, Rojewska E, Piotrowska A, Makuch W, Pilat D, Przewlocka B, Mika J. Blockage of toll-like receptors (TLR2, TLR4) attenuates pain and potentiates buprenorphine analgesia in a rat neuropathic pain model. *Neural Plast*. 2016;2016:5238730.
- Kanda T. Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune-mediated neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(2):208-212.
- Kashiwamura Y, Sano Y, Abe M, Shimizu F, Haruki H, Maeda T, et al. Hydrocortisone enhances the function of the blood-nerve barrier through the up-regulation of claudin-5. *Neurochem Res*. 2011;36(5):849-855.
- Kiguchi N, Kobayashi Y, Kadowaki Y, Fukazawa Y, Saika F, Kishioka S. Vascular endothelial growth factor signaling in injured nerves underlies peripheral sensitization in neuropathic pain. *J Neurochem*. 2014;129:169-178.
- Kim D, Kim MA, Cho IH, Kim MS, Lee S, Jo EK, et al. A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. *J Biol Chem*. 2007;282:14975-14983.
- Kim W, Kim M, Jho EH. Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J*. 2013;450(1):9-21.
- Kisler LB, Granovsky Y, Sinai A, Sprecher E, Shamay-Tsoory S, Weissman-Fogel I. Sex dimorphism in a mediatory role of the posterior midcingulate cortex in the association between anxiety and pain sensitivity. *Exp Brain Res*. 2016;234(11):3119-3131.
- Klasser GD, Kugelmann AM, Villines D, Johnson BR. The prevalence of persistent pain after nonsurgical root canal treatment. *Quintessence Int*. 2011;42:259–69.
- Klein D, Martini R. Myelin and macrophages in the PNS: An intimate relationship in trauma and disease. *Brain Res*. 2016;1641(Pt A):130-138.
- Ko JS, Eddinger KA, Angert M, Chernov AV, Dolkas J, Strongin AY, et al. Spinal activity of interleukin 6 mediates myelin basic protein-induced allodynia. *Brain Behav Immun*. 2016;56:378-389.
- Kubicek L, Kopacik R, Klusakova I, Dubovy P. Alterations in the vascular architecture of the dorsal root ganglia in a rat neuropathic pain model. *Ann Anat*. 2010;192:101–6.
- Kurosaka H, Trainor PA, Leroux-Berger M, Iulianella A. Cranial nerve development requires coordinated Shh and canonical Wnt signaling. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120821.

Lan LS, Ping YJ, Na WL, Miao J, Chang QQ, Ni MZ, et al. Downregulation of Toll-like receptor 4 gene expression by short interfering RNA attenuates bone cancer pain in a rat model. *Mol Pain*. 2010;6:2.

Latrémolière A, Mauborgne A, Masson J, Bourgoin S, Kayser V, Hamon M, Pohl M. Differential implication of proinflammatory cytokine interleukin-6 in the development of cephalic versus extracephalic neuropathic pain in rats. *J Neurosci*. 2008;28(34):8489-8501.

Latrémolière A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*. 2009;10(9):895-926.

Laugel-Haushalter V, Paschaki M, Thibault-Carpentier C, Dembélé D, Dollé P, Bloch-Zupan A. Molars and incisors: show your microarray IDs. *BMC Res Notes*. 2013;6:113.

Lee C, Zhang F, Tang Z, Liu Y, Li X. PDGF-C: a new performer in the neurovascular interplay. *Trends Mol Med*. 2013;19:474–86.

Lewis SS, Loram LC, Hutchinson MR, Li CM, Zhang Y, Maier SF, et al. (+)-naloxone, an opioid-inactive toll-like receptor 4 signaling inhibitor, reverses multiple models of chronic neuropathic pain in rats. *J Pain*. 2012;13(5):498-506.

Li Y, Shi J, Yang J, Ma Y, Cheng L, Zeng J, et al. A Wnt/ β -catenin negative feedback loop represses TLR-triggered inflammatory responses in alveolar epithelial cells. *Mol Immunol*. 2014;59(2):128-135.

Li G, Liu X, Du J, Chen J, She F, Wu C, Li C. Positive shift of Nav1.8 current inactivation curve in injured neurons causes neuropathic pain following chronic constriction injury. *Mol Med Rep*. 2015;12(3):3583-3590.

Lim TK, Shi XQ, Martin HC, Huang H, Luheshi G, Rivest S, Zhang J. Blood-nerve barrier dysfunction contributes to the generation of neuropathic pain and allows targeting of injured nerves for pain relief. *Pain*. 2014;155(5):954-967.

Lim TK, Shi XQ, Johnson JM, Rone MB, Antel JP, David S, Zhang J. Peripheral nerve injury induces persistent vascular dysfunction and endoneurial hypoxia, contributing to the genesis of neuropathic pain. *J Neurosci*. 2015;35(8):3346-3359.

Liu L, Lanner F, Lendahl U, Das D. Numbl like and Numb differentially affect p53 and Sonic Hedgehog signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;413:426–31.

Liu T, Gao YJ, Ji RR. Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch. *Neurosci Bull*. 2012;28:131–44. a

Liu H, Shiryayev SA, Chernov AV, Kim Y, Shubayev I, Remacle AG, et al. Immunodominant fragments of myelin basic protein initiate T cell-dependent pain. *J Neuroinflamm*. 2012;9:119. b

Liu S, Liu YP, Huang ZJ, Zhang YK, Song AA, Ma PC, Song XJ. Wnt/Ryk signaling contributes to neuropathic pain by regulating sensory neuron excitability and spinal synaptic plasticity in rats. *Pain*. 2015;156(12):2572-2584.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25:402-408.

Lloyd Dr, Murphy AZ. The neuroanatomy of sexual dimorphism in opioid analgesia. *Exp Neurol*. 2014;259:57-63.

Mackinnon SE. Pathophysiology of nerve compression. *Hand Clin*. 2002; 18(2):231-241.

Malmgren LT, Olsson Y. Differences between the peripheral and central nervous system in permeability to sodium fluorescein. *J Comp Neurol*. 1980;191:103-107.

- Marchand F, Perretti M, McMahon SB. Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6:521–32.
- Marchetti B, Pluchino S. Wnt your brain be inflamed? Yes, it Wnt! *Trends Mol Med*. 2013;19(3):14-156.
- Martinez JA, Kobayashi M, Krishnan A, Webber C, Christie K, Guo G, et al. Intrinsic facilitation of adult peripheral nerve regeneration by the Sonic hedgehog morphogen. *Exp Neurol*. 2015;271:493-505.
- Martini R, Fischer S, Lopez-Vales R, David S. Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease. *Glia*. 2008;56:1566–1577.
- Matwychuk MJ. Diagnostic challenges of neuropathic tooth pain. *J Can Dent Assoc*. 2004;70(8):542-546.
- Mazumdar J, O'Brien WT, Johnson RS, LaManna JC, Chavez JC, Klein PS, Simon MC. O₂ regulates stem cells through Wnt/ β -catenin signalling. *Nat Cell Biol*. 2010;12:1007–1013.
- McDermott AM, Toelle TR, Rowbotham DJ, Schaefer CP, Dukes EM. The burden of neuropathic pain: results from a cross-sectional survey. *Eur J Pain*. 2006;10:127-135.
- McGettrick AF, Brint EK, Palsson-McDermott EM, Rowe DC, Golenbock DT, Gay NJ, et al. Trif-related adapter molecule is phosphorylated by PKC epsilon during Toll-like receptor 4 signaling. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(24):9196-9201.
- McGlone F, Wessberg J, Olausson H. Discriminative and affective touch: sensing and feeling. *Neuron*. 2014;82(4):737-755.
- McLachlan EM, Janig W, Devor M, Michaelis M. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature*. 1993;363:543–6.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454:428–35.
- Melchior M, Poisbeau P, Gaumond I, Marchand S. Insights into the mechanisms and the emergence of sex-differences in pain. *Neuroscience*. 2016;338:63-80.
- Mellick RS, Cavanagh JB. Changes in blood vessel permeability during degeneration and regeneration in peripheral nerves. *Brain* 1968;91(1):141-160.
- Menendez D, Shatz M, Resnick MA. Interactions between the tumor suppressor p53 and immune responses. *Curr Opin Oncol*. 2013;25:85–92.
- Meyer-Rosberg K, Kvarnström A, Kinnman E, Gordh T, Nordfors LO, Kristofferson A. Peripheral neuropathic pain- a multidimensional burden for patients. *Eur J Pain*. 2001;5(4):379-389.
- Michael GJ, Priestley JV. Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *J Neurosci*. 1999;19(5):1844-1854.
- Michot B, Bourgoin S, Viguier F, Hamon M, Kayser V. Differential effects of calcitonin gene-related peptide receptor blockade by olcegepant on mechanical allodynia induced by ligation of the infraorbital nerve vs the sciatic nerve in the rat. *Pain*. 2012;153(9):1339-1948.
- Milligan ED, Zapata V, Chacur M, Schoeniger D, Biedenkapp J, O'Connor KA, et al. Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. *Eur J Neurosci*. 2004;20(9):2294-2302.
- Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(1):23-36.

Mirauccourt LS, Dallel R, Voisin DL. Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKCgamma interneurons. *PLoS ONE* 2007;2:e1116.

Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, et al. Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a less from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol.* 2005;169(3):527-538.

Miyamoto Y, Sakane F, Hashimoto K. N-cadherin-based adherens junction regulates the maintenance proliferation and differentiation of neural progenitor cells during development. *Cell Adh Migr.* 2015;9(3):183-192.

Mizisin AP, Weerasuriya A. Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. *Acta Neuropathol.* 2011;121(3):291-312.

Molet J, Mauborgne A, Diallo M, Armand V, Geny D, Villanueva L, Boucher Y, Pohl M. Microglial Janus kinase/signal transduction and activator of transcription 3 pathway activity directly impacts astrocyte and spinal neuron characteristics. *J Neurochem.* 2016;136(1):133-147.

Mueller M, Wacker K, Ringelstein EB, Hickey WF, Imai Y, Kiefer R. Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. *Am J Pathol.* 2001;159:2187-2197.

Mueller M, Leonhard C, Wacker K, Ringelstein EB, Okabe M, Hickey WF, Kiefer R. Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. *Lab Investig.* 2003;83:175-185.

Mullor JL, Dahmane N, Sun T, Ruiz I, Altaba A. Wnt signals are targets and mediators of Gli function. *Curr Biol.* 2001;11(10):769-773.

Murad S. Toll-like receptor 4 in inflammation and angiogenesis: a double-edged sword. *Front Immunol.* 2014;5:313.

Myers RR, Powell HC, Heckman HM, Costello ML, Katz J. Biophysical and pathological effects of cryogenic nerve lesion. *Ann Neurol.* 1981;10:478-485.

Myers RR, James HE, Powell HC. Laser injury of peripheral nerve: a model for focal endoneurial damage. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 1985;48:1265-1268.

Myers R, Yamamoto T, Yaksh T, Powell H. The role of focal nerve ischemia and Wallerian degeneration in peripheral nerve injury producing hyperesthesia. *Anesthesiology.* 1993;78(2):308–316.

Myers RR, Shubayev VI. The ology of neuropathy: an integrative review of the role of neuroinflammation and TNF- α axonal transport in neuropathic pain. *J Periph Nerv Sys.* 2011;16:277-286.

Nadeau S, Filali M, Zhang J, Kerr BJ, Rivest S, Soulet D, et al. Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF: implications for neuropathic pain. *J Neurosci.* 2011;31:12533–12542.

Nagakura Y. The need for fundamental reforms in the pain research field to develop innovative drugs. *Expert Opin Drug Discov.* 2017;12(1):39-46.

Nagyoszi P, WilhelmI, Farkas AE, Fazakas C, Dung NTK, Hasko J, Krizbai IA. Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem Int.* 2010;57:556–64.

Neuwelt EA, Bauer B, Fahlke C, Fricker G, Iadecola C, Janigro D, et al. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12:169-182.

Nguyen QT, Sanes JR, Lichtman JW. Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat Neurosci.* 2002;5(9):861-867.

Nicotra L, Loram LC, Watkins LR, Hutchinson MR. Toll-like receptors in chronic pain. *Exp Neurol*. 2012;234(2):316-329.

Niemi JP, DeFrancesco-Lisowitz A, Roldan-Hernandez L, Lindborg JA, Mandell D, Zigmond RE. A critical role for macrophages near axotomized neuronal cell bodies in stimulating nerve regeneration. *J Neurosci*. 2013;33:16236-16248.

Nixdorf DR, Moana-Filho EJ, Law AS, McGuire LA, Hodges JS, John MT. Frequency of nonodontogenic pain after endodontic therapy: a systematic review and meta-analysis *J Endod*. 2010; 36:1494–8.

Nukada H, Powell HC, Myers RR. Spatial distribution of nerve injury after occlusion of individual major vessels in rat sciatic nerves. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1993;52(5):452-459.

Obata K, Katsura H, Miyoshi K, Kondo T, Yamanaka H, Kobayashi K, et al. Toll-like receptor 3 contributes to spinal glial activation and tactile allodynia after nerve injury. *J Neurochem*. 2008;105:2249-2259.

Ohara PT, Vit JP, Bhargava A, Jasmin L. Evidence for a role of connexin 43 in trigeminal pain using RNA interference in vivo. *J Neurophysiol*. 2008;100(6):3064-3073.

Ohara K, Shimizu K, Matsuura S, Ogiso B, Omagari D, Asano M, et al. Toll-like receptor 4 signaling in trigeminal ganglion neurons contributes to tongue-referred pain associated with tooth pulp inflammation. *J Neuroinflamm*. 2013;10:139.

Old EA, Nadkarni S, Grist J, Gentry C, Bevan S, Kim KW, Mogg AJ, Perretti M, Malcangio M. Monocytes expressing CX3CR1 orchestrate the development of vincristine-induced pain. *J Clin Invest*. 2014;124:2023–36.

Olsson Y. Studies on vascular permeability in peripheral nerves. 3. Permeability changes of vasa nervorum and exudation of serum albumin in INH-induced neuropathy of the rat. *Acta Neuropathol*. 1968;11(2):103-112.

Omura K, Ohbayashi M, Sano M, Omura T, Hasegawa T, Nagano A. The recovery of the blood-nerve barrier in crush nerve injury – a quantitative analysis utilizing immunohistochemistry. *Brain Res*. 2004;1001(1-2):13-21.

Orsenigo F. Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nat Commun*. 2012;3:1208.

Oster G, Harding G, Dukes E, Edelsberg J, Cleary PD. Pain, medication use, and health-related quality of life in older persons with postherpetic neuralgia: results from a population-based survey. *J Pain*. 2005;6(6):356-363.

Pan A, Chang L, Nguyen A, James AW. A review of hedgehog signaling in cranial bone development. *Front Physiol*. 2013;4:61.

Parada CA, Reichling DB, Levine JD. Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKCepsilon second messenger pathways. *Pain*. 2005;113(1-2):185-190.

Parmentier E, Lynn B, Lawson D, Turmaine M, Namini SS, Chakrabarti L, et al. Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron*. 1999;23:713–24.

Peirs C, Bourgois N, Artola A, Dallel R. Protein Kinase C γ interneurons mediate C-fiber-induced orofacial secondary static mechanical allodynia, but not C-fiber-induced nociceptive behavior. *Anesthesiology*. 2016;124(5):1136-1152.

Peltonen S, Alanne M, Peltonen J. Barriers of the peripheral nerve. *Tissue Barriers*. 2013;1(3):e24956.

Pereira CP, Bachli EB, Schoedon G. The wnt pathway: a macrophage effector molecule that triggers inflammation. *Curr Atheroscler Rep*. 2009;11(3):236-242.

Perrin FE, Lacroix S, Viles-Trigueros M, David S. Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1alpha and interleukin-1beta in Wallerian degeneration. *Brain*.

2005;128:854–866.

Persidsky Y, Hill J, Zhang M, Dykstra H, Winfield M, Reichenbach NL, et al. Dysfunction of brain pericytes in chronic Neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(4):794-807.

Pettersson CA, Sharma HS, Olsson Y. Vascular permeability of spinal nerve roots. A study in the rat with Evans blue and lanthanum as tracers. *Acta Neuropathol.* 1990;81(2):148-154.

Pina-Oviedo S, Ortiz-Hidalgo C. The normal and neoplastic perineurium: a review. *Adv Anat Pathol.* 2008;15:147-164.

Pohl M. Sensibilisation nociceptive centrale : systèmes de signalisation cellulaire et moléculaire. *Douleurs Evaluation – Diagnostic – Traitement.* 2014;15:44-51.

Polycarpou N, Ng YL, Canavan D, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of persistent pain after endodontic treatment and factors affecting its occurrence in cases with complete radiographic healing. *Int Endod J.* 2005;38:169–78.

Powell HC, Myers RR, Mizisin AP, Olee T, Brostoff SW. Response of the axon and barrier endothelium to experimental allergic neuritis induced by autoreactive T cell lines. *Acta Neuropathol.* 1991;82:364-367.

Qualtrough D, Rees P, Speight B, Williams AC, Paraskeva C. The hedgehog inhibitor cyclopamine reduces β -catenin-TCF transcriptional activity, induces E-cadherin expression and reduces invasion in colorectal cancer cells. *Cancers (Basel).* 2015;7(3):1885-1899.

Radu BM, Bramanti P, Osculati F, Flonta ML, Radu M, Bertini G, Fabene PF. Neurovascular unit in chronic pain. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:648268.

Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med.* 2010;16:1267–76.

Renault MA, Roncalli J, Tongers J, Thorne T, Klyachko E, Misener S, et al. Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49:490–8.

Renton T, Yiangou Y, Plumpton C, Tate S, Bountra C, Anand P. Sodium channel Nav1.8 immunoreactivity in painful human dental pulp *BMC Oral Health.* 2005;5:5.

Rittner HL, Amasheh S, Moshourab R, Hackel D, Yamdeu RS, Mousa SA, et al. Modulation of tight junction proteins in the perineurium to facilitate peripheral opioid analgesia. *Anesthesiology.* 2012;116(6):1323-1334.

Rodrigues SF, Granger DN. Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers.* 2015;3(1-2):e978720.
Ristoiu V. Contribution of macrophages to peripheral neuropathic pain pathogenesis. *Life Sci.* 2013;93:870–81.

Rodriguez JP, Coulter M, Miotke J, Meyer RL, Takemaru K, Levine JM. Abrogation of β -catenin signaling in oligodendrocyte precursor cells reduces glial scarring and promotes axon regeneration after CNS injury. *J Neurosci.* 2014;34(31):10285-10297.

Rosenberg GA. Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32:1139–51.

Santaolalla R, Sussman DA, Ruiz JR, Davies JM, Pastorini C, Espana CL, et al. TLR4 activates the β -catenin pathway to cause intestinal neoplasia. *PLoS One.* 2013;8(5):e63298.

Sapienza A, Réaux-Le Goazigo A, Rostène W, Mélik-Parsadaniantz S. Chimioquinas et attractivité des cellules myéloïdes dans les douleurs neuropathiques périphériques. *Biol Aujourd'hui.* 2014;208(1):31-44.

Seitz RJ, Reiners K, Himmelmann F, Heininger K, Hartung HP, Toyka KV. The blood-nerve barrier in Wallerian degeneration: a sequential long-term study. *Muscle Nerve.* 1989;12:627–635.

Shamash S, Reichert F, Rotshenker S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 alpha, and interleukin-1 beta. *J Neurosci.* 2002;22:3052–3060.

Shi XQ, Zekki H, Zhang J. The role of TLR2 in nerve injury-induced neuropathic pain is essentially mediated through macrophages in peripheral inflammatory response. *Glia*. 2011;59(2):231-341.

Shi Y, Yuan S, Li B, Wang J, Carlton SM, Chung K, et al. Regulation of Wnt signaling by nociceptive input in animal models. *Mol Pain*. 2012;8:47.

Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, et al. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med*. 2012;18:911-17.

Shimizu F, Sano Y, Maeda T, Abe MA, Nakayama H, Takahashi R, et al. Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. *J Cell Physiol*. 2008;217(2):388-399.

Shimizu F, Sano Y, Abe MA, Maeda T, Ohtsuki S, Terasaki, Kanda T. Peripheral nerve pericytes modify the Blood-Nerve Barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *J Cell Physiol*. 2010;226:255-266.

Shimizu F, Sano Y, Haruki H, Kanda T. Advanced glycation end-products induce basement membrane hypertrophy in endoneurial microvessels and disrupt the blood-nerve barrier by stimulating the release of TGF-beta and vascular endothelial growth factor (VEGF) by pericytes. *Diabetologia*. 2011;54:1517-26.

Siebert H, Dippel N, Mader M, Weber F, Weber F, Brück W. Matrix metalloproteinase expression and inhibition after sciatic nerve axotomy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60:85-93.

Simonetti M, Agarwal N, Stösser S, Bali KK, Karaulanov E, Kamble R, et al. Wnt-Fzd signaling sensitizes peripheral sensory neurons via distinct noncanonical pathways. *Neuron*. 2014;83(1):104-121.

Skurk C, Maatz H, Rocnik E, Bialik A, Force T, Walsh K. Glycogen-Synthase Kinase 3 beta/beta-catenin axis promotes angiogenesis through activation of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circ Res*. 2005;96:308-318.

Smalheiser NR. Do neural cells communicate with endothelial cells via secretory exosomes and microvesicles? *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2009;2009:383086.

Smith LJ, Shih A, Miletic G, Miletic V. Continual systemic infusion of lidocaine provides analgesia in an animal model of neuropathic pain. *Pain*. 2002;97:267-73.

Smith JG, Elias L-A, Yilmaz Z, Barker S, Shah K, Shah S, et al. The psychosocial and affective burden of posttraumatic neuropathy following injuries to the trigeminal nerve. *J Orofac Pain*. 2013;27(4):293-303.

Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett*. 2004;361(1-3):184-187.

Song X, Zhou Y, Huang Y, Li Z, You Q, Lu N, Guo Q. Wogonin influences vascular permeability via Wnt/ β -catenin pathway. *Mol Carcinog*. 2015;54:501-512.

Sorge RE, Mapplebeck JC, Rosen S, Beggs S, Taves S, Alexander JK, et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat Neurosci*. 2015;18(8):1081-1083.

Stillman M. Clinical approach to patients with neuropathic pain. *Cleve Clin J Med*. 2006;73(8):726-730,733-736.

Sugimoto Y, Takayama S, Hiriuchi Y, Toyama Y. An experimental study on the perineurial window. *J Periph Nerv Syst*. 2002;7(2):104-111.

Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, et al. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol*. 2008;10(8):923-934.

- Takahashi-Yanaga F. Activator or inhibitor? GSK-3 as a new drug target. *Biochem Pharmacol.* 2013;86(2):191-199.
- Takeda M, Kitagawa J, Takahashi M, Matsumoto S. Activation of interleukin-1 beta receptor suppresses the voltage-gated potassium currents in the small-diameter trigeminal ganglion neurons following peripheral inflammation. *Pain.* 2008;139(3):594-602.
- Tanga FY, Natile-McMenemy N, DeLeo JA. The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102:5856-5861.
- Thacker MA, Clark AK, Marchand F, McMahon SB. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth Analg.* 2007;105:838-47.
- Thangavel J, Malik AB, Elias HK, Rajasingh S, Simpson AD, Sundivakkam PK, et al. Combinatorial therapy with acetylation and methylation modifiers attenuates lung vascular hyperpermeability in endotoxemia-induced mouse inflammatory lung injury. *Am J Pathol.* 2014;184(8):2237-2249.
- Thangavel J, Samanta S, Rajasingh S, Barani B, Xuan YT, Dawn B, Rajasingh J. Epigenetic modifiers reduce inflammation and modulate macrophage phenotype during endotoxemia-induced acute lung injury. *J Cell Sci.* 2015;128(16):3094-3105.
- Tharakan B, Hellman J, Sawant DA, Tinsley JH, Parrish AR, Hunter FA, et al. β -catenin dynamics in the regulation of microvascular endothelial cell hyperpermeability. *Shock.* 2012;37(3):306-311.
- Tolle T, Xu X, Sadosky AB. Painful diabetic neuropathy: a cross-sectional survey of health state impairment and treatment patterns. *J Diabetes Complications.* 2006;20:26-33.
- Torrance N, Smith BH, Bennett MI, Lee AJ. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *J Pain.* 2006;7:281-289.
- Traiffort E, Charytoniuk D, Watroba L, Faure H, Sales N, Ruat M. Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system. *Eur J Neurosci.* 1999;11:3199-3214.
- Trevisan G, Benemei S, Materazzi S, De Logu F, De Siena G, Fusi C, et al. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain.* 2016;139(Pt 5):1361-1377.
- Tseng TJ, Hsieh YL, Ko MH, Hsieh ST. Redistribution of voltage-gated sodium channel after nerve decompression contributes to relieve neuropathic pain in chronic constriction injury. *Brain Res.* 2014;1589:15-25.
- Tseng TJ, Hsiao TH, Hsieh ST, Hsieh YL. Determinants of nerve conduction recovery after nerve injuries: compression duration and nerve fiber types. *Muscle Nerve.* 2015;52(1):107-112.
- Ubogu EE. The molecular and biophysical characterization of the human blood-nerve barrier: current concepts. *J Vasc Res.* 2013;50(4):289-303.
- Van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain.* 2014;155:654-662.
- Van Steenwinckel J, Reaux-Le Goazigo A, Pommier B, Mauborgne A, Dansereau MA, Kiabgi P, et al. CCL2 released from neuronal synaptic vesicles in the spinal cord is a major mediator of local inflammation and pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci.* 2011;31:5865-5875.
- Van Steenwinckel J, Auvynet C, Sapienza A, Reaux-Le Goazigo A, Combadière C, Melik Parsadaniantz S. Stromal cell-derived CCL2 drives neuropathic pain states through myeloid cell infiltration in injured nerve. *Brain Behav Immun.* 2015;45:198-210.
- Vierck CJ, Hansson PT, Yeziarski RP. Clinical and pre-clinical pain assessment: are we measuring the same thing? *Pain.* 2008;135(1-2):7-10.

- Vijayaragavan K, Boutjdir M, Chahine M. Modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by protein kinase A and protein kinase C. *J Neurophysiol.* 2004;91(4):1556-1569.
- Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci.* 1994;14(5 Pt 1):2708-2723.
- Wälchli T, Wacker A, Frei K, Regli L, Schwab ME, Hoerstrup SP, et al. Wiring the vascular network with neural cues: a CNS perspective. *Neuron.* 2015;87:271–96.
- Wall PD, Gutnick M. Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma. *Exp Neurol.* 1974;43:580–93.
- Wallquist W, Patarroyo M, Thams S, Carlstedt T, Stark B, Cullheim S, Hammarberg H. Laminin chains in rat and human peripheral nerve: distribution and regulation during development and after axonal injury. *J Comp Neurol.* 2002;454(3):284-293.
- Walsh TG, Murphy RP, Fitzpatrick P, Rochfort KD, Guinan AF, Murphy A, Cummins PM. Stabilization of brain microvascular endothelial barrier function by shear stress involves VE-cadherin signaling leading to modulation of pTyr-Occludin levels. *J Cell Physiol.* 2011;226:3053-3063.
- Walshe TE, Connell P, Cryan L, Ferguson G, Gardiner T, Morrow D, et al. Microvascular retinal endothelial and pericyte cell apoptosis in vitro: role of hedgehog and Notch signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(7):4472-4483.
- Wang Y, van der Zee M, Fodde R, Blok LJ. Wnt/B-catenin and sex hormone signaling in endometrial homeostasis and cancer. *Oncotarget.* 2010 ;1(7): 674-684.
- Wang J, Dai J, Liu B, Gu S, Cheng L, Liang J. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide activates canonical Wnt/ β -catenin and p38 MAPK signalling in stem cells from the apical papilla. *Inflammation.* 2013;36(6) :1393-1402.
- Wang Y, Jin S, Sonobe Y, Cheng Y, Horiuchi H, Parajuli B, et al. Interleukin-1 β induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes. *PLoS One.* 2014;9(10):e110024.
- Wang J, Zhang S, Li L, Zhang L. Involvement of Wnt5a within the cerebrospinal fluid-contacting nucleus in nerve injury-induced neuropathic pain. *Int J Neurosci.* 2015;125(2):147-153.
- Weksler B, Romero IA, Couraud PO. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS.* 2013;10:16.
- Westgren N, Levi R. Quality of life and traumatic spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehab.* 1998;79:1433-1439.
- Winkler T, Mahoney EJ, Sinner D, Wylie CC, Dahia CL. Wnt signaling activates Shh signaling in early postnatal intervertebral discs, and reactivates Shh signaling in old discs in the mouse. *PLoS One.* 2014;9(6):e98444.
- Woolf CJ. Dissection out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sci.* 2004;74(21):2605-2610.
- Wu FX, Bian JJ, Miao XR, Huang SD, Xu XW, Gong DJ, et al. Intrathecal siRNA against Toll-like receptor 4 reduces nociception in a rat model of neuropathic pain. *Int J Med Sci.* 2010;7:251-259.
- Xia YP, He QW, Li YN, Chen SC, Huang M, Wang Y, et al. Recombinant human sonic hedgehog protein regulates the expression of ZO-1 and occludin by activating angiopoietin-1 in stroke damage. *PLoS One.* 2013;8(7):e68891.
- Xie W, Strong JA, Meij JTA, Zhang JM, Yu L. Neuropathic pain: Early spontaneous afferent activity is the trigger. *Pain.* 2005;116(3):243-256.

Xu QG, Midha R, Martinez JA, Guo GF, Zochodne DW. Facilitated sprouting in a peripheral nerve injury. *Neuroscience*. 2008;152:877-887.

Xu B, Descalzi G, Ye HR, Zhuo M, Wang YW. Translational investigation and treatment of neuropathic pain. *Mol Pain*. 2012;8:15.

Xu Z, Chen Y, Yu J, Yin D, Liu C, Chen X, Zhang D. TCF4 mediates the maintenance of neuropathic pain through Wnt/ β -catenin signaling following peripheral nerve injury in rats. *J Mol Neurosci*. 2015;56(2):397-408.

Yang S, Krug SM, Heitmann J, Hul L, Reinhold AK, Sauer S, et al. Analgesic drug delivery via recombinant tissue plasminogen activator and microRNA-183-triggered opening of the blood-nerve barrier. *Biomaterials*. 2016;82:20-33.

Ydens E, Cauwels A, Asselbergh B, Goethals S, Peeraer L, Lornet G, et al. Acute injury in the peripheral nervous system triggers an alternative macrophage response. *J Neuroinflammation*. 2012;9:176.

Yen LF, Wei VC, Kuo EY, Lai TW. Distinct patterns of cerebral extravasation by Evans blue and sodium fluorescein in rats. *PLoS One*. 2013;8:e68595.

Young R. Fiber spectrum of the trigeminal sensory root of frog, cat and man determined by electron microscopy. In: *Pain in the trigeminal region* (Anderson DJ, Matthews B, eds). Amsterdam: Elsevier; 1977. pp 137-147.

Young JA, Ting KK, Li J, Moller T, Dunn L, Lu Y, et al. Regulation of vascular leak and recovery from ischemic injury by general and VE-cadherin-restricted miRNA antagonists of miR-27. *Blood*. 2013;122(16):2911-2919.

Zakir HM, Mostafaezur RM, Suzuki A, Hitomi S, Suzuki I, Maeda T, et al. Expressino of TRPV1 channels after nerve injury provides an essential delivery tool for neuropathic pain attenuation. *PLoS One*. 2012 ;7(9):e44023.

Zanin-Zhorov A, Cohen IR. Signaling via TLR2 and TLR4 directly downregulates T cell effector functions: the regulatory face of danger signals. *Front Immunol*. 2013;4:211.

Zhang YK, Huang ZJ, Liu S, Liu YP, Song AA, Song XJ. WNT signaling underlies the pathogenesis of neuropathic pain in rodents. *J Clin Invest*. 2013;123:2268-2286.

Zhang H, Li Y, de Carvalho-Barbosa M, Kavelaars A, Heijnen CJ, Albrecht PJ, Dougherty PM. Dorsal root ganglion infiltration by macrophages contributes to paclitaxel chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J Pain*. 2016;17(7):775-786.

Zhu YL, Xie ZL, Wu YW, Duan WR, Xie YK. Early demyelination of primary A-fibers induces a rapid-onset of neuropathic pain in rat. *Neuroscience*. 2012;200:186-198.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16(2):109-110.

Zinke J, Schneider FT, Harter PN, Thom S, Ziegler N, Toftgård R, et al. β -catenin-Gli-1 interaction regulates proliferation and tumor growth in medulloblastoma. *Mol Cancer*. 2015;14:17.

Annexes

Publications associées à ce travail